

"Studien zu putativen Kältestress-relevanten Schwermetallchaperonen
in *Hordeum vulgare* L. und *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH."

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Olaf Gunter Barth

geb. am: 02. 10. 1976 in: Erlabrunn (Erzgebirge)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Klaus Humbeck
2. Prof. Dr. Nicolaus von Wirén
3. Prof. Dr. Stephan Clemens

Die vorliegende Dissertation wurde am 11.11.2011 öffentlich verteidigt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	4
Zusammenfassung	6
Summary	7
Vorwort und Danksagung	8
1. Einleitung	9
1.1. Pflanzen unter Stress	9
1.2. Stress durch niedrige Temperaturen	9
1.2.1. Schädwirkungen bei Kälte- und Froststress	9
1.2.2. Anpassungsmechanismen von Pflanzen bei Kälte- und Froststress.....	10
1.2.3. Signalperzeption und Signalweiterleitung bei Kälte	14
1.2.4. Regulation der Genexpression bei Kälte	17
1.3. Stress durch Wassermangel.....	20
1.3.1. Schädwirkungen bei Wassermangel.....	20
1.3.2. Anpassungsmechanismen in Pflanzen bei Wassermangel	20
1.3.3. Signalperzeption und Signalweiterleitung bei Wassermangel	21
1.3.4. Regulation der Genexpression bei Wassermangel	24
1.4. Schwermetallstress und Schwermetallhomöostase	26
1.4.1. Toxische und essentielle Schwermetalle	26
1.4.2. Aufnahme von Schwermetallen und Transport.....	26
1.4.3. Intrazellulärer Transport von Schwermetallen	28
1.4.4. Regulation der Expression von Schwermetallhomöostase-Genen	32
2. Material und Methoden	34
2.1. Verwendete Materialien	34
2.1.1. Chemikalien, Lösungsmittel und Enzyme.....	34
2.1.2. Oligonukleotide	34
2.1.3. Mikroorganismen	38
2.1.4. Gentechnische Vektoren.....	38
2.1.5. Pflanzenmaterial.....	39
2.2. Molekulargenetische Methoden	40
2.2.1. cDNA AFLP	40
2.2.2. Amplifikation von DNA-Fragmenten	40
2.2.3. Klonierung von DNA-Fragmenten und Transformation in <i>Escherichia coli</i>	41
2.2.4. Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	41
2.2.5. DNA Sequenzierung.....	42
2.2.6. Isolation von DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	42
2.2.7. Isolation von Plasmid-DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
2.2.8. Isolation von RNA aus <i>Hordeum vulgare</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i>	42
2.2.9. Genexpressionsanalysen mittels Northern Technik	43
2.2.10. Genexpressionsanalysen mittels quantitativer RT-PCR.....	44
2.2.11. Transiente Transformation von Zwiebelepidermiszellen und Fluoreszenzmikroskopie.....	44

2.2.12. Promotor-Glucuronidase Reporteranalysen	45
2.2.13. Hefe-Zwei-Komponenten Analysen.....	46
2.2.14. Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
2.2.15. Proteininteraktionsstudien <i>in vitro</i> mittels 'GST pulldown'	47
2.2.16. Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	48
2.2.17. Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ..	48
2.2.18. DNA- und Protein-Sequenzanalysen.....	48
2.3. Physiologische Methoden.....	49
2.3.1. Chlorophyllfluorometrie.....	49
2.3.2. Bestimmung des relativen Pflanzenwassergehaltes	49
2.3.3. Bestimmung des Wurzelwachstums.....	50
3. Ergebnisse	50
3.1. HvFP1 in Gerste, ein durch Stress reguliertes putatives Schwermetallchaperon im Zellkern	50
3.1.1. Identifizierung von <i>HvFP1</i> als ein durch Kälte induziertes Gen in Primärblättern von <i>Hordeum vulgare</i>	50
3.1.2. Stress- und entwicklungsabhängige Expression von <i>HvFP1</i>	53
3.1.3. Gewebespezifische Expression von <i>HvFP1</i>	57
3.1.4. Subzelluläre Lokalisierung von HvFP1	57
3.2. HIPPs in <i>Arabidopsis thaliana</i>	59
3.2.1. HIPPs und andere Proteine mit HMA Domäne in <i>Arabidopsis thaliana</i>	59
3.2.2. HIPPs in Cluster III	63
3.2.2.1. Kernlokalisierung von GFP-HIPP25, GFP-HIPP26 und GFP-HIPP27	65
3.2.2.2. Entwicklungs- und Stress-abhängige Genexpression.....	68
3.2.2.3. <i>HIPP26</i> -Promotor-Analysen	70
3.2.2.4. Die Identifizierung von Bindungspartnern, die mit den HIPPs interagieren ..	72
3.2.2.5. <i>hipp25</i> , <i>hipp26</i> und <i>hipp25/26</i> Mutanten-Analysen.....	75
3.2.2.5.1. Reaktion auf Kälte.....	77
3.2.2.5.2. Reaktion auf Salzstress.....	79
3.2.2.5.3. Reaktion auf Trockenstress	79
3.2.2.5.4. Reaktion auf erhöhte Schwermetallkonzentrationen.....	80
3.2.2.5.5. HIPP26 beeinflusst die Expression von Zielgenen des Transkriptionsfaktors ATHB29.....	81
4. Diskussion und Ausblick.....	83
4.1. HvFP1, ein Kälte-induziertes Zellkern-lokalisiertes putatives Schwermetallchaperon	83
4.2. HIPPs, Zellkern-lokalisierte putative Schwermetallchaperone in <i>Arabidopsis thaliana</i>	86
5. Literaturverzeichnis.....	94
Curriculum Vitae	109
Erklärung	110

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
AFLP	Methode 'amplified fragment length polymorphism'
AFP	'Anti freeze' Protein
AtFIT1	<i>A. thaliana</i> 'Fe-deficiency induced transcription factor 1'
ATHB	<i>A. thaliana</i> Homeodomänen Transkriptionsfaktor
AtHMA	<i>A. thaliana</i> 'heavy metal ATPase'
ATX1	Kupferchaperon 'antioxidant 1'
bHLH	DNA-Bindedomäne 'basic Helix Loop Helix'
bp	Anzahl der DNA-Basenpaare
bZIP	DNA Bindedomäne 'basic leucine zipper'
cADPR	cyclische Adenosindiphosphat-Ribose
CBF	Transkriptionsfaktor 'C-repeat binding factor'
CBL	Calcineurin B-like Protein
CCH	'Copper chaperone'
CCS	Kupferchaperon der CSD
CDF	Transporter 'Cation diffusion facilitator proteins'
cDNA	durch RT-PCR aus RNA erzeugte 'copy DNA'
<i>COLLI</i>	Genbezeichnung 'cold and light induced'
COPT	'copper transporter'
<i>COR</i>	Genbezeichnung 'cold regulated'
CSD	Cu/Zn Superoxiddismutase
CRLK	Calcium/Calmodulin regulierte Rezeptor-ähnliche Kinase
CTR	'copper transporter'
D1	Kernprotein im PSII
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E-64	trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butan
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELIP	Lichtstressprotein 'early light inducible protein'
<i>ERD</i>	Genbezeichnung 'early responsive to dehydration'
EST	'expressed sequence tag' cDNA-Fragment
FRO	'ferric reductase oxidase'
F ₀	Grundfluoreszenz (alle PSII im Grundzustand, PAM-Fluorometermesswert)
F _m	maximale Fluoreszenz (alle PSII geschlossen, PAM-Fluorometermesswert)
F _{m'}	maximale Fluoreszenz bei Belichtung (PAM-Fluorometermesswert)
F _s	'steady state' Fluoreszenz bei Belichtung (PAM-Fluorometermesswert)
GST	Gluthathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GUS	Glucuronidase
<i>ICE</i>	Transkriptionsfaktor 'Inducer of CBF expression'
InsP ₃	Inositol-(1,4,5)-triphosphat
IRT	'iron-regulated transporter'

HIPP	'heavy metal associated isoprenylated plant protein'
HMA	'heavy metal associated' Proteindomäne
HvFP	<i>Hordeum vulgare</i> farnesyliertes Protein
KIN	Genbezeichnung 'cold induced'
LHC	'Light harvesting complex'
LTI	Genbezeichnung 'low temperature induced'
MAPK	'Mitogen activated protein kinase'
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	'messenger RNA', Gentranskript
MTP	Transporter 'Metal tolerance protein'
MYB	Familie von Transkriptionsfaktoren
MYC	Familie von Transkriptionsfaktoren
NAS	Nicotianaminsynthase
NLS	'nuclear localization signal'
NPQ	Nichtphotochemischer Quench
NRAMP	Transporter 'natural resistance associated macrophage protein'
PAA	'P-type ATPase of <i>Arabidopsis</i> '
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PAR	'photosynthetic active radiation'
P _i	Phosphat ('inorganic')
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR-Protein	'pathogenesis-related' Protein
PSII	Photosystem II
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
RAB	Genbezeichnung 'responsive to abscisic acid'
rel. ETR	relatives Elektronentransportlevel
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	reverse Transkription mit anschließender PCR
SDS	'Sodiumdodecylsulfate'
smRS-GFP	'solubility modified red shifted Green Fluorescent Protein'
SQL	Transkriptionsfaktor ' <i>SQUAMOSA</i> Protomotor binding binding protein-like'
TAE	Tris-Acetat-EDTA
T-DNA	transferierte DNA aus Ti-Plasmiden der <i>Agrobacterien</i>
uidA	Gen codiert für GUS
xg	multipliziert mit der Erdbeschleunigung $g = 9,81\text{m s}^{-2}$
Y2H	'Yeast two hybrid' Hefe-Zwei-Komponenten Analysen
YSL	'yellow stripe 1-like' Oligopeptidtransporter
ZF-HD	Zinkfinger-Homeodomänen-Transkriptionsfaktor
ZIP	Transporter der ZRT/IRT Familie
ZRT	Transporter 'zinc-regulated transporter'

Zusammenfassung

Die Anpassung an eine sich ständig ändernde Umwelt gehört zu den entscheidenden Herausforderungen im Leben einer Pflanze. Unter Stress kommt es in Pflanzen zu einer Vielzahl von Veränderungen mit weitreichenden Folgen sowohl für den Energie- und Stoffwechsel als auch für die Wachstums- und Entwicklungsprozesse. Daraus lassen sich als wichtige Ziele der auf diese Veränderungen folgenden pflanzlichen Reaktionen neben der Reparatur von Schäden, die Einstellung optimaler Gleichgewichte der Stoff- und Energieflüsse und die Anpassung der Wachstums- und Entwicklungsprozesse ableiten. Auf der molekularen Ebene sind die Anpassungsreaktionen unter anderem durch Veränderungen der Genexpression beteiligter Faktoren charakterisiert.

In der vorliegenden Dissertationsschrift wird mit HvFP1 (*Hordeum vulgare* farnesyliertes Protein 1) ein solcher Faktor näher untersucht und beschrieben. *HvFP1* ist mit einer cDNA-AFLP Methode als ein durch kombinierten Kälte-Lichtstress induziertes Gen in Gerste identifiziert worden. Weitere Expressionsanalysen machen deutlich, dass *HvFP1* als Kältestressgen bezeichnet werden kann. Auch bei Wassermangel, erhöhter ABA-Konzentration, während der Blattalterung und in Bereichen der Pflanze mit hohem Leitgewebeanteil sind größere *HvFP1* Transkriptmengen nachweisbar. Die Aminosäuresequenz von HvFP1 beinhaltet eine Schwermetallbindedomäne (HMA Domäne), ein Isoprenylierungsmotiv (CaaX Box) und ein Kernlokalisierungssignal (NLS). Hinweise für eine Lokalisierung von HvFP1 im Zellkern liefern Experimente mit entsprechenden GFP-Fusionsproteinen. Die HMA Domäne von HvFP1 spricht für eine molekulare Funktion als Schwermetallchaperon. Diese Daten werfen eine Reihe von interessanten Fragen auf. Wofür wird ein Schwermetallchaperon im Zellkern benötigt? Warum ist diese molekulare Funktion bei der Anpassung an niedrige Temperaturen wichtig? Welche Bedeutung hat die Isoprenylierung für die molekulare Funktion?

Analysen zu orthologen Proteinen in *Arabidopsis thaliana* liefern Informationen die bei der Suche nach Antworten auf diese Fragen hilfreich sind. *Arabidopsis* besitzt mindestens 46 Gene, welche für Proteine mit HMA Domäne und CaaX Box codieren und deshalb als HIPPs ('Heavy metal associated, isoprenylated plant protein') bezeichnet werden. Computergestützte Prognosen und Experimente mit GFP-Fusionsproteinen deuten für einige dieser HIPPs, ähnlich wie für HvFP1, auf eine Funktion im Zellkern hin. Proteininteraktionsstudien zeigen eine direkte Wechselwirkung mit Transkriptionsfaktoren der Zinkfinger-Homeodomänen-Familie an. Für die Bindung zwischen dem Zinkfinger-Homeodomänen-Transkriptionsfaktor ATHB29 und HIPP26 *in vitro* sind die Cysteinseitenketten im MxCxxC Kernmotiv der Schwermetallbindedomäne von entscheidender Bedeutung. Die Genexpression von HIPP26, welches die größte Ähnlichkeit zur Aminosäuresequenz von HvFP1 aufweist, wird ebenfalls durch Kältestress induziert. Aus den vorliegenden Daten kann die Hypothese abgeleitet werden, dass Proteine wie HvFP1 und HIPP26 als Schwermetallchaperone Zn^{2+} -Ionen von den Transportern an der Plasmamembran zu den Zielproteinen im Zellkern transportieren. Dabei weisen die durchgeführten Genexpressionsanalysen darauf hin, dass die molekulare Funktion von HvFP1 und HIPP26 für die Reaktion auf Kälte von größerer Bedeutung ist.

Summary

Plants have to adapt to an incessantly changing environment. This is one of the most important challenges in the lifetime of a plant. Environmental caused stress may result in imbalances of metabolic pathways with substantial impacts to growth and developmental processes. But plants are able to adapt to unfavourable conditions by repairing damages and adjusting the metabolic pathways, growth and developmental processes. Changes in the gene expression ratio of involved factors characterize amongst others the acclimatization response of plants at the molecular level.

HvFP1 (*Hordeum vulgare* farnesylated protein 1) is one of these factors in barley. Molecular aspects of HvFP1 are studied in this thesis. *HvFP1* was isolated by a cDNA-AFLP method as a gene responsive to a combined cold and light stress treatment. Further investigations turned out that *HvFP1* belongs to the group of so called cor-genes (cold regulated genes). *HvFP1* is additionally transiently induced by drought and exogenous applied ABA. *HvFP1* mRNAs accumulate during leaf senescence and in regions of barley plants enriched with vascular tissues. The HvFP1 amino acid sequence includes a heavy metal associated domain (HMA domain), an isoprenylation motif (CaaX box) and a nuclear localization signal (NLS). Heterologues expression of GFP-HvFP1 fusion proteins in onion epidermal cells provide experimental hints for a nuclear localization. The presence of a HMA domain within the HvFP1 amino acid sequence suggests a molecular function as heavy metal chaperone. All these data raise a lot of interesting questions. Why need plants a heavy metal chaperone within the nucleus? What function does the protein perform during acclimatization response to low temperatures? In order to gain further information, orthologues proteins from *Arabidopsis thaliana* were analysed. There are at least 46 genes encoding proteins, so called HIPPs (Heavy metal associated, isoprenylated plant protein), that contain a HMA domain and a CaaX box together in one peptide chain. Computer generated prognoses and experiments using GFP fusion proteins suggest a nuclear localization of some HIPP proteins. Protein-protein interaction studies reveal direct binding between HIPPs and transcription factors of the zinc finger homeodomain family. The interaction between the zinc finger homeodomain transcription factor ATHB29 and HIPP26 depends on the presence of the cysteine residues within the MxCxxC core metal binding motif of HIPP26. Both HIPP26 that shows a high similarity to HvFP1 and HvFP1 itself belong to the group of cor-genes that show a strong induction of gene expression under cold stress conditions. The presented data suggest that proteins like HIPP26 and HvFP1 act as heavy metal chaperones which may transport Zn^{2+} ions from the transporter at the plasma membrane to the nucleus, where they are delivered to target proteins. The molecular tasks of HvFP1 and HIPP26 are required especially in response to low temperature stress.

Vorwort und Danksagung

Es ist überraschend, faszinierend und beeindruckend wie vielfältig und schön das Leben auf unserer Erde ist. Dabei machen sowohl der Blick in die unterschiedlichen Ökosysteme als auch die Betrachtung einzelner Details immer wieder deutlich, welche Verantwortung wir Menschen mit unserem Handeln für die Zukunft dieses Lebens haben.

In dieser Dissertationsschrift werden Studien vorgestellt, in deren Mittelpunkt eine interessante pflanzliche Proteinfamilie steht. Es wird versucht die erarbeiteten Daten in die komplexen physiologischen Prozesse der pflanzlichen Schwermetallhomöostase und der Reaktionen auf abiotischen Stress einzuordnen und mögliche Zusammenhänge sichtbar zu machen. Ohne die Unterstützung und Hilfsbereitschaft freundlicher Wissenschaftler wäre diese naturwissenschaftliche Arbeit in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen. Aus diesem Grund möchte ich mich bereits im Vorwort bei allen Beteiligten recht herzlich bedanken.

Prof. Dr. Klaus Humbeck danke ich dafür, dass ich frei an diesem interessanten Thema forschen durfte, für seine umfassende Unterstützung, die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Wiebke Zschiesche danke ich für die schönen Northern-Analysen zur Kälte-Licht-Abhängigkeit (Abb. 3.4.), die Trockenstressdaten (Abb. 3.5.), die Expressionsmuster in unterschiedlichen Pflanzenbereichen (Abb. 3.8.), die *HIPP26* qRT-PCR Daten zu Kupferstress und Blattseneszenz (Abb. 3.15.) und ihre sehr humorvolle Art, die richtigen Dinge zu sagen.

Dr. Sylvia Siersleben danke ich für die Northern-Analysen zur ABA-Abhängigkeit (Abb. 3.6.).

Dr. Jan Heise danke ich für die RNA, isoliert aus mit Schwermetallen behandelten Gerstenkeimlingen.

Frau Bauerfeld danke ich für die Northern-Analysen zur blattaltersabhängigen Expression in Gerste (Abb. 3.7.).

Ria Uhlemann danke ich für die *HIPP26* qRT-PCR Daten zur ABA-Abhängigkeit, Salz- und Trockenstress (Abb. 3.15.).

Sebastian Vogt danke ich für das 'Yeast two hybrid screening' und wichtige Erkenntnisse über mich selbst.

Claudia Schramm danke ich für die Hilfe bei den Interaktionsstudien der ATHBs mit den HIPPs.

Dr. Bernd Ihl, Michael Röser, Daniel Rumpold und Dr. Alexander Anders danke vor allem für das Korrekturlesen und die vielen guten Ratschläge.

Nicole Ay, Stefan Ehnert, Dr. Akli Ouelhadj und Dr. Rayko Becher danke ich für die interessanten naturwissenschaftlichen und philosophischen Gespräche.

Dr. Andreas Fischer, Dr. Ingo Hofmann und Dr. Doreen Gürlebeck danke ich für die umfassende Hilfe bei den gentechnischen Arbeiten.

Dr. Christoph Vess danke ich für die vielen guten Hinweise zu molekularbiologischen und biochemischen Methoden, vor allem zur RFDD-PCR.

Dr. Mario Jakob und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klösigen danke ich für die Hilfe bei *in vitro* Transkription und Translation sowie weiteren Fragen zur Proteinanalytik.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Johanningmeier danke ich für die Möglichkeit zur Nutzung der Partikelkanone.

Allen Praktikanten und Diplomanden, die an diesem Thema mitgearbeitet haben und nicht explizit namentlich erwähnt werden und allen aktiven und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Humbeck möchte ich ebenfalls recht herzlich danken.

1. Einleitung

1.1. Pflanzen unter Stress

Pflanzen leben auf unserer Erde meist in Umgebungen, die sich durch häufig ändernde Bedingungen auszeichnen. Die Veränderungen einzelner oder mehrerer Umweltparameter haben oft einen direkten Einfluss auf die physiologischen und molekularen Prozesse innerhalb des pflanzlichen Organismus. Daraus ergeben sich für die Pflanzen Belastungssituationen, die vereinfachend als 'Stress' bezeichnet werden. Der Belastungsfaktor wird Stressor genannt. Im letzten Jahrhundert wurden unterschiedliche Theorien zum biologischen Stresskonzept entwickelt. So bietet unter anderem das ursprünglich von H. Seyle (1936) erarbeitete Konzept vom dynamischen Stresssyndrom einen logischen Rahmen, innerhalb dessen das Interpretieren experimenteller Daten möglich wird. Larcher (1987) bespricht dieses Konzept und kombiniert es mit einer Theorie zur Dürre-resistenz der Pflanzen, welche 1947 von O. Stocker formuliert worden ist. Danach löst der Stressor sowohl für ihn typische spezifische, als auch allgemeine unspezifische Reaktionen aus. Das Stressgeschehen kann dabei in drei Phasen eingeteilt werden. Bei der *Alarmreaktion* kommt es zur Abweichung von der Funktionsnorm, welche vor allem durch eine Abnahme der Vitalität gekennzeichnet ist. In der sich anschließenden *Widerstandsphase* reagiert die Pflanze, stellt durch verschiedene Anpassungsprozesse das Normalverhalten wieder her und steigert ihre Widerstandskraft. Bei weiterhin anhaltender Belastung wird die *Erschöpfungsphase* erreicht. In diesem Stadium des Stressgeschehens ist das Anpassungsvermögen des Organismus überfordert. Die Erschöpfungsphase endet mit dem Tod der Pflanze. Im Mittelpunkt moderner Forschung steht vor allem die Aufklärung der molekularen Mechanismen, welche es bestimmten Pflanzen ermöglichen, Resistenzen gegenüber lang anhaltenden Stressperioden aufzubauen.

Neben biotischen Einflüssen, wie Konkurrenz in Pflanzengemeinschaften, Verbiss, Tritt, Mahd, Insekten-, Pilz-, Bakterien- und Virusbefall haben physikalische und chemische Stressoren eine große Bedeutung für die pflanzliche Entwicklung und damit auch die Höhe landwirtschaftlicher Erträge. Zu den wichtigsten abiotischen Stressoren gehören vor allem hohe und niedrige Temperaturen, Lichtmangel und Lichtüberschuss, Wassermangel, Nährstoffmangel und Nährstoffüberschuss, niedrige und hohe Protonenkonzentrationen, Schwermetalle und hohe Salzkonzentrationen.

Interessant ist, dass bei den unterschiedlichen Stresssituationen Gemeinsamkeiten auftreten, die sich wie folgt interpretieren lassen. Dem pflanzlichen Organismus steht eine Reihe von möglichen Reaktionen zur Verfügung. Je nach Stressor und Belastungssituation muss die Pflanze mit einer geeigneten Kombination dieser Anpassungsreaktionen antworten. Aus diesem Grund haben sich auf der molekularen Ebene komplexe regulatorische Netzwerke entwickelt. Sie ermöglichen eine fein abgestimmte Steuerung von Art und Intensität der den jeweiligen Erfordernissen entsprechenden Anpassungsreaktionen. In den folgenden Kapiteln werden einige der bisher genauer untersuchten molekularen Mechanismen beschrieben, welche bei Stress durch niedrige Temperaturen, Wassermangel und Schwermetallstress, bzw. der Schwermetallhomöostase von Bedeutung sind.

1.2. Stress durch niedrige Temperaturen

1.2.1. Schädwirkungen bei Kälte- und Froststress

Niedrige positive Temperaturen führen zu sogenanntem Kältestress. Es kommt zur Destabilisierung von Proteinen und Proteinkomplexen und zur Beeinträchtigung von Enzymfunktionen. Dies führt zu thermodynamischen Ungleichgewichten mit stark negativem Einfluss auf den kompletten Stoffwechsel. Durch die De-Polymerisierung sowohl der Actinfilamente als auch der Microtubuli treten Schäden am Cytoskelett auf (Pokorna et al., 2004).

Zudem kommt es zur Verringerung der Fluidität zellulärer Membranen (Alonso et al., 1997). Es werden alle Prozesse gestört, die von den semipermeablen Membraneigenschaften und der Funktionalität der Membranproteine abhängig sind. Davon ist besonders die Photosynthese in den Chloroplasten betroffen. Photoinhibition und eine verstärkte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies können für die Pflanzen zu einem großen Problem werden (Teicher et al., 2000; Tjus et al., 2001; Li et al., 2005; Asada, 2006).

Fallen die Temperaturen unter 0°C verstärken sich die negativen Einflüsse auf den pflanzlichen Organismus erheblich. Bei Froststress, d.h. wenn Pflanzen unter natürlichen Bedingungen langsam einfrieren, kommt es zur extrazellulären Eiskristallbildung. Dadurch sinkt im Apoplasten das Wasserpotential und der Gradient zwischen den apoplastischen und den zellulären Wasserpotentialen verändert sich. Entlang dieses Gradienten entsteht zunehmend osmotischer Druck, der dafür sorgt, dass den Zellen Wasser entzogen wird (Guy, 1990). Dies kann in Frost anfälligen Pflanzen zu Plasmolyse-ähnlichen Zuständen führen. In Frost toleranten Pflanzen dagegen kann es zur Cytorrhise kommen, d.h. die Zellwand um die schrumpfende Zelle kollabiert (Yamada et al., 2002). Wachsende Eiskristalle können in lebende Zellen eindringen und diese zerstören (Gusta et al., 2004).

1.2.2. Anpassungsmechanismen von Pflanzen bei Kälte- und Froststress

Pflanzen reagieren auf das Absinken der Temperatur. Dabei ist das Ziel der Gesamtheit aller pflanzlichen Reaktionen das Überleben des entsprechenden Organismus oder wenigstens der nächsten Generation und damit der jeweiligen Spezies. Der Energie- und Stoffwechsel muss den ungünstigen Umständen angepasst werden.

Wachstumsprozesse werden minimiert. Schäden müssen verhindert, eingedämmt oder vielleicht sogar repariert werden. So muss unter anderem die Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies verstärkt werden. Es kommt zur Veränderung der Membranzusammensetzung. Proteine, die zelluläre Strukturen stabilisieren und schützen, akkumulieren ebenso wie unschädliche aber osmotisch wirksame Substanzen (für einen Überblick siehe Thomashow, 1999; Humbeck et al., 2007; Ruelland et al., 2009).

In den letzten 20 Jahren sind viele durch Kälte induzierte Gene, sogenannte COR ('cold regulated'), LTI ('low temperature induced'), KIN ('cold induced') und COLLI ('cold and light induced') Gene identifiziert worden. Dazu kommen Weitere, wie RAB ('responsive to abscisic acid') und ERD Gene ('early responsive to dehydration'), deren Expression nicht nur durch niedrige Temperaturen, sondern auch durch Wassermangel oder Abscisinsäure angeschaltet wird. Einige von diesen Genen codierten Proteine, die auch als Dehydrine bezeichnet werden. Dehydrine besitzen sehr hydrophile Eigenschaften. Sie bleiben nach Aufkochen löslich und beinhalten charakteristische Aminosäuresequenzabschnitte, die amphipathische α -Helices bilden könnten und K-Segmente genannt werden (für einen Überblick siehe Kosova et al., 2007). Es wird angenommen, dass Dehydrine unter osmotisch ungünstigen Bedingungen wie Frost und Wassermangel zur Stabilisierung der Membranen beitragen (Close, 1997). Transgene *Arabidopsis* Pflanzen, die entweder die Dehydrinpaare RAB18 und COR47, oder LTI29 und LTI30 konstitutiv auf hohem Level exprimieren sind toleranter gegenüber Frost (Puhakainen et al., 2004). Es sind noch weitere Kältestressproteine bekannt, denen eine ähnliche Membranen stabilisierende Funktion zugeschrieben wird. Dazu gehört unter anderem das in Plastiden importierte COR15A (Steponkus et al., 1998).

Eine weitere Gruppe von COR Genen codiert für 'Anti freeze' Proteine (AFPs). So konnten Tremblay et al., (2005) für die AFPs TaIRI1 und TaIRI2 in Weizen nicht nur eine Induktion der Genexpression durch niedrige Temperaturen, sondern auch deutlich höhere Transkriptlevel in frosttoleranteren Winterweizensorten nachweisen. Rekombinant hergestelltes TaIRI1 inhibiert die Eiskristallbildung *in vitro*. Bei AFPs handelt es sich häufig um sekretorische Proteine, die von PR-Proteinen, d.h. wichtigen Faktoren bei der Pathogenabwehr, abstammen. Es

wird vermutet, dass sie mit ihren hydrophilen Domänen im Apoplasten an Eiskristalle binden und dadurch deren Wachstum verhindern (Griffith und Yaish, 2004).

Neben der stressbedingten Neusynthese membranstabilisierender Dehydriene können einige Pflanzen im Zuge der Anpassung an niedrige Temperaturen und des Aufbaus von Toleranz gegenüber Frost die molekulare Zusammensetzung ihrer Membranen verändern. In Winterroggen und Hafer kommt es während der Kältehärtungsphase zur Erhöhung des Anteils an Phospholipiden. Die Mengen an Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin Molekülen, bei welchen die beiden Fettsäurereste mindestens einfach ungesättigt sind, steigen an. Der Anteil an Cerebrosiden nimmt dagegen ab (Lynch und Steponkus, 1987; Uemura und Steponkus, 1994). Dies konnte auch für *Arabidopsis*-Blätter nachgewiesen werden. Zusätzlich verringert sich in den entsprechenden *Arabidopsis*-Membranen der Anteil an Sterolen, insbesondere an freien nichtglykosylierten Sterolderivaten (Uemura et al., 1995). Der Gehalt an Monogalaktosyldiacylglycerol sinkt und die Mengen an Digalaktosyldiacylglycerol erhöhen sich im Zuge der Kältehärtung von Winterroggen, sowohl in den inneren als auch in den äußeren Hüllmembranen der Plastiden. Der Anteil an Phosphatidylcholin dagegen nimmt während der Anpassung an niedrige Temperaturen nur in der äußeren Chloroplastenmembran ab und bleibt in der inneren Membran nahezu konstant. Der Ausgangsgehalt an Phosphatidylcholin ist unter normalen Temperaturbedingungen in den äußeren (31,5 mol%) deutlich höher als in den inneren Plastidenmembranen (8,1 mol%, Uemura und Steponkus, 1997). In den Membranen des endoplasmatischen Retikulums von Rapskeimlingen steigen während der Akklimatisierung an niedrige Temperaturen der Gehalt an Phosphatidylethanolamin und die Anteile mehrfach ungesättigter Fettsäuren in den Membranlipiden (Tasseva et al., 2004). Dass eine Erhöhung der Menge an mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den Membranlipiden für das Überleben von Pflanzen bei Kälte sehr wichtig ist, zeigen Experimente mit *Arabidopsis fad2* Mutanten, die eine stark verminderte Aktivität der 18:1 Ölsäure desaturase aufweisen. *fad2* Pflanzen entwickeln sich unter normalen Temperaturen ähnlich gut, wie die entsprechenden Wildtypkontrollpflanzen. Bei 12°C kommt das Streckungswachstum der Blütenstände in den *fad2* Mutanten zum Erliegen. Blüten und Schötchen werden dennoch gebildet. Bei Umgebungstemperaturen von 6°C sterben *fad2* Pflanzen nach ca. 10 Tagen ab (Miquel et al., 1993).

Wie bereits erwähnt, ist die Anhäufung von osmotisch wirksamen, aber unschädlichen Substanzen, sogenannten kompatiblen Soluten, eine wichtige Säule bei der Anpassung an Kälte und Frost. Kohlenhydrate, wie Saccharose, Raffinose und Trehalose, aber auch Aminosäuren, wie Prolin, Alanin, Glycin und Serin, Betaine, wie Glycinbetain und Polyamine gehören zu den bei der Kältehärtung akkumulierenden osmotisch wirksamen Molekülen (für einen Überblick siehe Ruelland et al., 2009).

Koster und Lynch (1992) konnten nachweisen, dass in Winterroggen während der ca. 28 Tage dauernden Härtingsphase unter niedrigen positiven Temperaturen sowohl die Saccharose- als auch die Raffinosegehalte um mehr als das Fünffache ansteigen. Der Gehalt an Glycinbetain steigt von 287 auf 1294 $\mu\text{g g}^{-1}$ Frischgewicht. Der Prolingehalt erhöht sich von 27 auf 262 $\mu\text{g g}^{-1}$ Frischgewicht, erreicht allerdings im Gegensatz zu Saccharose und Raffinose innerhalb dieses Zeitraumes noch nicht sein maximales Level von weit über 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ Frischgewicht. Interessant ist, dass sich die Frosttoleranz im gleichen Zeitraum deutlich erhöht (Koster und Lynch, 1992). Die minimale Temperatur bei der 50% der Roggenprotoplasten überleben (LT₅₀ Wert) sinkt von ca. -5°C im nicht gehärteten Zustand innerhalb von 4 Wochen Härtingsphase auf unter -25°C (Uemura und Steponkus, 1989).

Experimente mit transgenen *Arabidopsis* Pflanzen, die entweder erhöhte oder verringerte Aktivitäten der Saccharosephosphat-Synthase (SPS) oder eine verringerte Aktivität der cytosolischen Fruktose-1,6-bisphosphatase (cFBPase) besitzen, illustrieren die enorme Bedeutung löslicher Zucker und Saccharose für die Etablierung von Toleranz gegenüber Frost. Strand et

al., (2003) konnten mit Hilfe dieser Mutanten eine Korrelation zwischen steigenden Gehalten an löslichen Zuckern oder Saccharose und einer erhöhten Frosttoleranz nachweisen.

Transgene *Arabidopsis* Pflanzen, welche ein chimäres bifunktionelles Enzym bestehend aus der Hefe Trehalose-6-phosphat-Synthase und der Trehalose-6-phosphat-Phosphatase exprimieren, sind ebenfalls toleranter gegenüber Frost. Die Zahl von froststressüberlebenden Individuen korreliert mit der Höhe des Gehaltes an Trehalose in der jeweiligen transgenen Linie (Miranda et al., 2007).

Nanjo et al., (1999) gelang es in *Arabidopsis* durch die Expression von Antisense-RNA die Aktivität der Prolinhydrogenase so zu reduzieren, dass in den entsprechenden Pflanzen unter induzierenden Bedingungen deutlich mehr Prolin akkumuliert. Diese *anti-prodh* Pflanzen sind toleranter gegenüber Froststress, was die Bedeutung der Prolinakkumulierung bei der Kältehärtung deutlich macht.

Glycinbetain akkumuliert im Zuge der Anpassung an niedrige Temperaturen in Pflanzen wie Roggen (Koster und Lynch, 1992) und Weizen (Kamata und Uemura, 2004), während *Arabidopsis*, Tomaten, Kartoffel und Reis keine Betaine akkumulieren (Wyn Jones und Storey, 1981). Exogen appliziertes Glycinbetain erhöht jedoch die Kältestresstoleranz von Tomatenpflanzen, die wie bereits erwähnt natürlicherweise kein Glycinbetain bilden. Bereits 1mM Glycinbetain verringert den durch 3°C hervorgerufenen zellulären Verlust von Elektrolyten und reduziert das Absinken der Photosystem II Effizienz (Park et al., 2006).

Es sind mittlerweile eine Reihe von Theorien zu den molekularen Mechanismen, welche die Fragen nach der Wirkung dieser kompatiblen Solute bei Froststress beantworten sollen, diskutiert worden. Neben der Erhöhung des osmotischen Potentials und der Absenkung des Gefrierpunktes in den Zellen, könnten die kompatiblen Solute an der Stabilisierung von Membranen und Proteinen beteiligt sein, die Eiskristallbildung beeinflussen und an der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies mitwirken (Ruelland et al., 2009).

Eine weitere wichtige Säule der Anpassung von Pflanzen an niedrige Temperaturen ist die Neujustierung der Photosyntheseprozesse. In überwinternden, immergrünen, mehrjährigen Pflanzen wie Kiefer, Fichte und Efeu reduziert sich die Photosyntheseleistung vor allem unter Frost sehr deutlich (Öquist et al., 1980; Bolhar-Nordenkampf und Lechner, 1988; Oberhuber und Bauer, 1991). Bei einem Vergleich zwischen Kiefer und Winterweizen unter Kältestress wird hinsichtlich des Netto-CO₂-Gasaustausches deutlich, dass die Kiefer mit einer starken Inhibierung reagiert. Dieser Effekt fällt unter hohen Lichtintensitäten noch stärker aus. Kältegehärteter Winterweizen dagegen zeigt keine durch Kältestress hervorgerufene Inhibierung des Netto-CO₂-Gasaustausches. Weiterhin sinken in Kiefernadeln unter niedrigen Temperaturen auch die Werte für die photochemische Quantenausbeute des PSII, der Chlorophyllgehalt, und die Mengen an D1-Protein, Lhcb5 und besonders an LHCI Proteinen, während diese in Winterweizen nahezu konstant bleiben. Diese Daten illustrieren, dass überwinternde einjährige krautartige Pflanzen unter Kältestress einen hohen Bedarf an Photoassimilaten haben und andere Anpassungsstrategien besitzen, als immergrüne mehrjährige Pflanzen, die ihre Photosyntheseeffizienz und Photosynthesekapazität generell absenken (Savitch et al., 2002).

Unter Kälte angezogene Pflanzen von frosttoleranten Roggen- und Weizensorten besitzen eine höhere maximale Photosynthesekapazität als unter normalen Bedingungen angezogene Pflanzen, die dann aber ebenfalls niedrigen Temperaturen ausgesetzt werden. Dies korreliert mit einem höheren Level an oxidiertem Plastochinon Q_A in den unter Kälte angezogenen Pflanzen. Weniger frosttoleranten Sorten fehlt diese Anpassungsfähigkeit (Huner et al., 1993). Interessant in diesem Zusammenhang ist auch, dass unter normalen Bedingungen entwickelte Blätter nicht in der Lage sind, eine vollständige Resistenz gegen durch Kälte verursachte Photoinhibition aufzubauen, die sich während der Kältephase neu entwickelten Blätter dagegen schon (Boese und Huner, 1990).

Die höhere Netto CO₂-Assimilation in Winterweizenblättern, deren Entwicklung bei Kälte stattgefunden hat, korreliert mit einer verstärkten Saccharose- und Fruktanbiosynthese in den Blättern und einem stärkeren Export in apikale Bereiche der Pflanze. Eine Reihe von Enzymaktivitäten, wie die der Saccharosephosphatsynthase, der Saccharosesynthase (in Syntheserichtung), der Saccharose-Saccharosefructosyltransferase und der Invertasen sind in den akklimatisierten Blättern deutlich erhöht (Savitch et al., 2000). Dahinter verbirgt sich eine wichtige Anpassungsreaktion, durch die eine verstärkte Rückführung von anorganischem Phosphat (Pi) bewirkt wird. Dies verringert die sonst bei Kälte beobachtete Limitierung an freiem Pi, welche Hurry et al., (1993) als Ursache für die Inhibierung der CO₂-Assimilation unter Kältestress identifiziert haben. Auch in *Arabidopsis* Pflanzen sind die durch Kälte hervorgerufene Limitierung an freiem Pi und die damit verbundene Aktivierung der Saccharosebiosynthese ein Schlüsselement bei der Wiederherstellung der Photosyntheseaktivität unter Kältestress und beim Aufbau der vollständigen Frosttoleranz. Die Proteingehalte und die Aktivitäten der Saccharosebiosyntheseenzyme Saccharosephosphatsynthase und der cytosolischen Fruktose-1,6-bisphosphatase werden während der Akklimatisierung unter Kältestress erhöht. Zudem steigen auch die Aktivitäten der Enzyme des Calvinzykluses. In *pho1-2* Mutanten, welche geringere Mengen an freiem Pi aufweisen, sind diese Prozesse und die damit verbundene Frosthärtung verbessert. In *pho2-1* Mutanten, welche hohe Mengen an freiem Pi aufweisen, ist die Fähigkeit zur Kältehärtung verringert (Hurry et al., 2000).

Eine weitere Anpassungsreaktion von Pflanzen bei Kältestress ist die verstärkte Abgabe überschüssiger Lichtenergie in Form von Wärme mittels Zeaxanthin- und Δ pH-abhängiger Prozesse am Photosystem II. Bei Kältestress erhöhen sich die Mengen der Xanthophyllzyklusmoleküle Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin generell. Bei überschüssiger Anregung von Photosystem II, wie es unter Bedingungen mit niedrigen Temperaturen oft der Fall ist, erhöhen sich die Mengen an Antheraxanthin und Zeaxanthin. Dies konnte unter anderem für Weizen (Hurry et al., 1992) und Gerste (Montane et al., 1999) nachgewiesen werden. Antheraxanthin und Zeaxanthin sind nicht in der Lage die Anregungsenergie auf Chlorophyll a Moleküle zu übertragen. Sie sorgen für eine erhöhte Abgabe der Anregungsenergie in Form von Wärme. Dies überführt unter photoinhibitorischen Bedingungen vor allem die Photosysteme II vom Status der effizienten Energieumwandlung in einen Status verstärkter Wärmeabgabe. Dies verringert den Teil der überschüssig absorbierten Energie, welcher zu photooxidativen Schäden führt. *Arabidopsis npq1* Mutanten besitzen keinen Xanthophyllzyklus, da ihnen die Funktion der Violaxanthindeepoxidase fehlt. Diese Mutanten sind innerhalb der ersten 2 Tage nach Transfer in eine Umgebung mit 10°C und 1000 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ stärker von Photoinhibition betroffen. Im weiteren Stressverlauf kommt es jedoch sowohl in den entsprechenden Wildtypkontrollen als auch in den *npq1* Pflanzen zur Anpassung auf etwa gleichem Niveau (Havaux und Kloppstech, 2001). Dies zeigt, dass der Xanthophyllzyklus vor allem bei der schnellen Anpassung an kurzfristige erhöhte Mengen von Exzitonen wichtig ist.

Dagegen hat die Akkumulation von Flavonoiden unter Kältestress, ähnlich wie die bereits besprochenen Anpassungsprozesse zur Verringerung der durch Kälte hervorgerufenen Limitierung an freiem Pi, für einige Pflanzen eine große Bedeutung bei der langfristigen Akklimatisierung. Havaux und Kloppstech, (2001) konnten stärkere photoinhibitorische Effekte und vermehrt photooxidative Schäden in *Arabidopsis* Mutanten mit verringerter Flavonoidbiosynthese nachweisen. Die dabei untersuchten Pflanzen wurden für 6 Tage mit 8°C und 1000 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ behandelt. Den deutlichsten Effekt zeigen die *tt5* Mutanten, welchen neben den bei Grünlicht absorbierenden Anthocyanen auch bei UV/Blau Licht absorbierende Flavonoide fehlen.

Eine weitere wichtige Säule der Anpassung an Kältestress ist eine verstärkte und effizientere Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies. In Roggenblättern steigen während der Frosthärtung die Mengen an Radikalfängern wie α -Tocopherol, Carotinoiden und Superoxiddismutase sowie die Konzentrationen an Glutathionreduktase und den Antioxidantien Ascorbat und Glu-

tathion (Streb et al., 1999). In Kälte sensitiven Pflanzen wie Mais erhöht sich unter Kälteeinwirkung (4°C) die Genexpression der mitochondrialen Katalase CAT3. Keimlinge, die für 3 Tage bei 14°C akklimatisiert worden sind, zeichnen sich durch höhere CAT3 Transkriptlevel sowie höhere CAT3 und Guaiacol Peroxidase Enzymaktivitäten aus. Akklimatisierte Maiskeimlinge weisen nach einem Transfer in eine Umgebung mit 4°C deutlich geringere Mengen an H₂O₂ auf und besitzen eine höhere Überlebensrate als nicht angepasste Pflanzen (Prasad et al., 1994). Guo et al., (2006) gelang es durch einen Vergleich von kältetoleranten und kältesensitiven Reissorten die Bedeutung einer effektiveren Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies aufzuzeigen. In den untersuchten kältetoleranten Kultivaren sind der Elektrolytverlust, der H₂O₂ Gehalt und das Ausmaß der Lipidperoxidation, gemessen anhand der Mengen an Substanzen die mit Thiobarbiturat reagieren, deutlich verringert. Dies korreliert mit erhöhten Enzymaktivitäten der Superoxiddismutasen, Katalasen, Ascorbatperoxidasen und größeren Mengen an Antioxidantien wie Ascorbat und reduziertem Glutathion. Transgene Süßkartoffelpflanzen, welche die Nukleotiddiphosphatkinase *AtNDPK2* aus *Arabidopsis* unter Kontrolle eines durch Stress induzierten Promotors exprimieren, besitzen neben der unter Kältestress erhöhten NDPK Aktivität auch größere Peroxidase-, Ascorbatperoxidase- und Katalaseaktivitäten. Diese transgenen Pflanzen sind nicht nur resistenter gegenüber Superoxidgenerierendem Methylviologen, sondern auch toleranter gegenüber abiotischem Stress, wie Wassermangel, Salz- und Kältestress. Die Autoren führen die erhöhte Stresstoleranz auf die Aktivierung der antioxidativ wirkenden Enzyme zurück (Kim et al., 2009).

Neben den bereits besprochenen Veränderungen zellulärer Membranen kommt es im Zuge der Anpassung an Kältestress und der Frosthärtung auch zu Veränderungen der Blattmorphologie und des strukturellen Aufbaus der Zellwände. Winterroggenblätter, die sich unter Kältebedingungen entwickelt haben, sind aufgrund 1,5fach längerer Mesophyllzellen insgesamt dicker und besitzen eine geringere Anzahl Stomata pro Blattfläche. Auch die Zellwände von Bündelscheidenzellen sind in akklimatisierten Pflanzen deutlich dicker als in nichtakklimatisierten (Huner et al., 1981). Solecka et al., (2008) konnten an Winterrapsblättern mit fortschreitender Kältehärtung eine steigende Zugfestigkeit der Zellwände messen. Zudem erhöhen sich in Abhängigkeit von der Dauer der Kältebehandlung auch der Zellwandanteil am Gesamtrockengewicht, der Pektingehalt und die Pektinmethylesteraseaktivität. Diese Veränderungen korrelieren mit der entsprechend erhöhten Toleranz gegenüber Frost.

Während der Anpassung an Kälte kommt es auch zu Veränderungen des Cytoskelettes. Sowohl Actin- als auch Tubulinfilamente depolymerisieren (Pokorna et al., 2004). Dass diese Veränderungen bei der Perzeption niedriger Temperaturen von Bedeutung sind, wird im folgenden Kapitel besprochen. In mit kältebehandelten Tabakzellen akkumuliert Tubulin während der Interphase im Zellkern (Schwarzerova et al., 2006). Farajalla und Gulick, (2007) konnten die differentielle Expression einer Reihe von Tubulingenen in Weizen unter Kältestress nachweisen. Obwohl die exakten molekularen Zusammenhänge noch zu klären sind, illustrieren diese Daten, dass Veränderungen im Aufbau des Cytoskelettes bei der Anpassung an niedrige Temperaturen wichtig sind.

1.2.3. Signalperzeption und Signalweiterleitung bei Kälte

Über welche Signale nehmen pflanzliche Zellen niedrige Temperaturen wahr? Welche regulatorischen Netzwerke leiten die eben besprochenen Anpassungsreaktionen ein? In den zurückliegenden Jahren ist intensiv nach Antworten auf diese wichtigen Fragen gesucht worden. Vieles deutet darauf hin, dass sowohl die Membranen als auch das Cytoskelett in Verbindung mit einem raschen Anstieg der Ca²⁺ Ionen Konzentration im Cytosol bei der Perzeption niedriger Temperaturen eine entscheidende Rolle spielen. Innerhalb von 20 Minuten nach Absinken der Temperatur von 25°C auf unter 15°C steigt der Influx von Ca²⁺ Ionen in Alfalfa Zellen auf das 20fache (Monroy und Dhindsa, 1995). Örvar et al., (2000) gelang ebenfalls an

Alfalfa Protoplasten der Nachweis, dass sowohl Veränderungen der Membranfluidität als auch Veränderungen von Actinfilamenten des Cytoskelettes für den Einstrom von Ca^{2+} Ionen ins Cytosol verantwortlich sind. So unterbindet Benzylalkohol durch seinen positiven Einfluss auf die Membranfluidität den üblichen Influx von Ca^{2+} Ionen ins Cytosol bei 4°C . Entsprechend mit Benzylalkohol behandelte Alfalfa Protoplasten weisen eine geringere Frosttoleranz und ein deutlich niedrigeres Transkriptlevel des Kältestressgenes *cas30* auf. Alfalfa Zellen, die mit Jasplakinolid behandelt worden sind, zeigen die gleichen Reaktionen bei niedrigen positiven Temperaturen. Jasplakinolid erhöht die Stabilität der Actinfilamente des Cytoskelettes, bzw. induziert deren Polymerisierung. Eine Behandlung von Alfalfa Protoplasten mit Dimethylsulfoxid (DMSO) oder mit Cytochalasin D führt bei optimalen Temperaturen von 25°C zu einem deutlich ansteigenden Ca^{2+} Einstrom, zu erhöhter Frosttoleranz und höheren *cas30* Transkriptmengen. DMSO setzt die Fluidität von Biomembranen herab. Cytochalasin D destabilisiert die Actinfilamente des Cytoskelettes. Promotor-Reportergergen Experimente mit transgenem Raps zeigen ebenfalls, dass sowohl die Fluidität der Membranen und der Zustand des Cytoskelettes als auch der Einstrom von Ca^{2+} Ionen ins Cytosol wichtige Komponenten bei der Signalperzeption von niedrigen Temperaturen sind (Sangwan et al., 2001).

Dodd et al., (2006) konnten zeigen, dass die durch Kälte induzierte transiente Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} Konzentration von der circadianen Uhr beeinflusst wird. Der Kälte abhängige Ca^{2+} Einstrom ins Cytosol ist auch bei Dauerlicht im Zeitraum der ursprünglichen Lichtphase signifikant größer als im Zeitraum der ursprünglichen Dunkelperiode.

Die durch das Signal 'Kälte' erhöhte Konzentration an Ca^{2+} Ionen im Cytosol aktiviert eine Reihe von regulatorisch wirksamen Proteinen. Bekannt sind vor allem Calmoduline, Calmodulin bindende Transkriptionsaktivatoren, Calcium/Calmodulin abhängige Proteinkinasen, Calcineurin B-like Proteine (CBL Proteine), mit CBL interagierende Proteinkinasen und die Phospholipasen C und D (Dodd et al., 2010; Ruelland et al., 2009).

Werden *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit W7 (N-(6-Aminohexyl-5-chlor-1-naphthalinsulfonamid, einem Antagonisten von Calmodulin und Calcium abhängigen Proteinkinasen) behandelt, verlieren sie die Fähigkeit der Kältehärtung. Des Weiteren ist eine deutlich geringere Induktion der Transkriptmengen der Kältestressgene *kin1* und *kin2*, ausgelöst durch niedrige positive Temperaturen, nachweisbar (Tähtiharju et al., 1997). W7 bindet Calciumionen im Cytosol und transportiert sie aus den Zellen heraus. Doherty et al., (2009) gelang in *Arabidopsis* der Nachweis, dass der Calmodulin bindende Transkriptionsaktivator CAMTA3 an der Induktion der Genexpression des bei der Kältehärtung wichtigen Transkriptionsfaktors CBF2 durch niedrige Temperaturen beteiligt ist. Pflanzen mit einer Doppelmutation *camta1/camta3* besitzen nach einer Kältehärtungsphase von einer Woche bei 4°C eine geringere Frosttoleranz als entsprechende Wildtypkontrollen.

Yang et al., (2010) konnten aus einer *Arabidopsis* Kältestress-cDNA-Bibliothek die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Rezeptor-ähnliche Proteinkinase CRLK1 isolieren. Die Genexpression der CRLK1 ist auf Transkriptebene sowohl durch niedrige positive Temperaturen als auch durch H_2O_2 induziert. Entsprechende *crkl1* Mutanten reagieren sensitiver auf Kälte- und Froststress als Wildtyppflanzen. Diese geringere Toleranz gegenüber Kälte und Frost korreliert mit der verzögerten Induktion der Transkripte bekannter Kältestressgene wie *CBF1*, *RD29A*, *COR15a*, and *KIN1*.

Eine durch Kälte induzierte Genexpression ist mittlerweile für eine Reihe von Genen, die für CBL Proteine und mit CBL Proteinen interagierenden Proteinkinasen codieren, nachgewiesen worden (z.B. Cheong et al., 2003; Kim et al., 2003; Pandey et al., 2004; Mahajan et al., 2006; Zhang et al., 2008). Dass CBL Proteine bei der Signalweiterleitung unter Kältestress eine wichtige Rolle spielen, zeigen unter anderem Experimente mit *Arabidopsis* Mutanten. Pflanzen, die CBL1 nicht bilden können, sind toleranter gegenüber Frost. Pflanzen, die konstitutiv deutlich mehr CBL1 bilden, sind sensitiver als die entsprechenden Kontrollpflanzen (Cheong et al., 2003).

Die Aktivität der Phospholipasen C und D wird durch niedrige Temperaturen induziert. Ruelland et al., (2002) gelang mit *Arabidopsis* Zellkulturen der Nachweis, dass Kälte innerhalb weniger Minuten die Bildung von Inositol-(1,4,5)-triphosphat (InsP₃) induziert. InsP₃ und Diacylglycerin entstehen durch Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Phospholipase C katalysiert diese Reaktion.

Eine ähnlich schnelle Induktion der Phospholipase D Aktivität durch Kälte konnte anhand einer verstärkten Bildung von Phosphatidylbutanol nachgewiesen werden. Phosphatidylbutanol wird in Anwesenheit von Butanol im Medium, katalysiert durch die Phospholipase D, bei der Spaltung von Phosphatidylcholin oder Phosphatidylethanolamin gebildet.

Werden den Zellkulturen der Calciumkanalblocker La³⁺ oder der Calciumchelator EGTA zugegeben, sinkt die kälteabhängige Bildung von Phosphatidylsäure und InsP₃. Das illustriert die Bedeutung des kälteabhängigen Ca²⁺-Influxes für die Induktion der Aktivitäten von Phospholipase C und D und untermauert die Rolle von Calcium bei der Signalweiterleitung unter Kältestress.

Vergnolle et al., (2005) konnten ebenfalls unter Verwendung von *Arabidopsis* Zellkulturen eine Reihe durch Kältestress regulierte Gene isolieren, deren Genexpression von der Aktivität der Phospholipasen C oder D beeinflusst wird. In DNA-Microarray Transkriptomanalysen wurden Proben, bei denen entweder die Produktion von Phosphatidylsäure durch die Phospholipase D inhibiert war oder die Aktivität der Phospholipase C durch das Aminosteroid U73122 herabgesetzt wurde, unter Kältestress mit entsprechenden Kontrollen verglichen. Die Daten zeigen, dass das Signal Kälte zur Regulation der Transkriptlevel von 50 Genen über die Phospholipase C, von 79 Genen über die Phospholipase D und von 8 Genen über beide Signaltransduktionskomponenten weitergeleitet wird.

Arabidopsis Mutanten, die keine Phospholipase D δ (*pld δ*) synthetisieren können, reagieren trotz Kältehärtung sensitiver auf Frost als entsprechende Wildtypkontrollen. Nicht an Kälte akklimatisierte *pld δ* Pflanzen zeichnen sich durch die gleiche Frosttoleranz wie entsprechende Wildtypkontrollen aus. Mutanten, die konstitutiv mehr Phospholipase D δ exprimieren, besitzen eine erhöhte Toleranz gegenüber Froststress (Li et al., 2004). Diese Daten machen deutlich, wie wichtig die Aktivität der Phospholipase D δ für die Ausbildung der Frosttoleranz in Pflanzen ist.

Es konnten mittlerweile auch Daten an *Arabidopsis* Mutanten erhoben werden, die zeigen dass Inositolpolyphosphate wichtige Moleküle bei der Signalweiterleitung unter Kältestress sind. *fiery1/hos2* Mutanten, die keine Inositolpolyphosphat 1-Phosphatase bilden können, reagieren sensitiver auf Kältestress als entsprechende Wildtypkontrollen. Es wird angenommen, dass die fehlende Inositolpolyphosphat 1-Phosphataseaktivität in den *fiery1/hos2* Mutanten und die dadurch veränderten Konzentrationen an Inositolpolyphosphaten zu einer Störung der Signalweiterleitung bei Kältestress führen und somit für den beobachteten Kälte sensitiven Phänotyp verantwortlich sind (Xiong et al., 2004). Über die weiteren Signalkomponenten, welche von den Signalmolekülen wie der Phosphatidylsäure und den Inositolpolyphosphaten als Reaktion auf das Signal Kälte aktiviert werden, liegen bisher keine genauen Erkenntnisse vor (Ruelland et al., 2009). Testerink et al., (2004) gelang es, an Phosphatidylsäure bindende Proteine mit potentiell regulatorischer Funktion aus Pflanzen zu isolieren. Darunter finden sich Proteine wie eine SNF1-ähnliche Proteinkinase, 14-3-3 Proteine, GTP bindende Proteine und eine Untereinheit der Proteinphosphatase PP2A. Die Bedeutung dieser Komponenten bei der Signalweiterleitung unter Kältestress ist bisher allerdings unklar.

El-Khatib et al., (2007) beschreiben, dass es innerhalb weniger Minuten nach Einsetzen von Kältestress bei einer Reihe von Proteinen, welche aus *Arabidopsis* Zellkulturen isoliert wurden, zu einer Veränderung des Phosphorylierungszustandes kommt. Diese Daten weisen darauf hin, dass auch die Aktivitäten von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen für die Signalweiterleitung bei Kältestress und der entsprechenden Akklimatisierung an niedrige Temperaturen wichtig sind. Neben Calcium abhängigen Proteinkinasen, Ca²⁺/Calmodulin abhängi-

gen Proteinkinasen, CBL-Protein abhängigen Proteinkinasen und MAPKinasen konnten mittlerweile auch Proteinphosphatasen mit einer Funktion bei Kälte in Verbindung gebracht werden.

Monroy et al., (1993) konnten 10 Proteine aus *Medicago sativa* Zellkulturen isolieren, deren Phosphorylierungsstatus durch eine Behandlung mit 4°C für 3h verändert wird. Interessant ist, dass diese kälteabhängig veränderten Phosphorylierungsmuster unter Verwendung des Calciumkanalblockers La³⁺ oder eines Antagonisten von Calmodulin bzw. Ca²⁺ abhängigen Proteinkinasen etwa auf das Niveau der unbehandelten Kontrollen reduziert werden können.

Promotor-Reporterger Experimente mit transgenem Raps zeigen unter Verwendung genereller und spezifischer Inhibitoren die große Bedeutung der Aktivität von Proteinkinasen und Phosphatasen. So unterbindet unter anderem ein Proteinkinase C spezifischer Inhibitor (1-(5-Isochinolin-Sulfonyl)-2-Methylpiperazin-Dihydrochlorid) die durch Kälte induzierte Aktivierung der Genexpression am Promotor des Kältestressgenes *BN115*. Entsprechend behandelte Blätter zeichnen sich durch eine geringere Frosttoleranz aus. Eine Behandlung mit den Proteinphosphatase Inhibitoren Okadeinsäure und Calyculin A (CalyA), welche sowohl die Proteinphosphatase 1 als auch die Proteinphosphatase 2A inhibieren, führt bei einer optimalen Temperatur von 25°C zur Induktion der Genexpression am *BN115* Promotor und erhöhter Frosttoleranz (Sangwan et al., 2001).

Eine Induktion der MAPK2 Aktivität ist an Kälte behandelten *Arabidopsis* Protoplasten nachweisbar. Die MAPK2 wiederum aktiviert durch Phosphorylierung die MAPKinasen 4 und 6 in *Arabidopsis* Pflanzen. Diese MAPK2 abhängige Aktivierung ist bereits innerhalb von 15 Minuten nach Absinken der Temperatur auf 4°C detektierbar. *Arabidopsis* Mutanten, die keine MAPK2 bilden können, sind sensitiver, Mutanten die MAPK2 konstitutiv exprimieren resistenter gegenüber Froststress als entsprechende Wildtypkontrollpflanzen. Die Transkriptlevel einiger Kältestressgene, unter anderem die der regulatorisch wichtigen Transkriptionsfaktoren CBF2 und CBF3, sind unter optimalen Temperaturen deutlich induziert, wenn die Pflanzen mit künstlich erhöhter MAPK2 Aktivität ausgestattet sind (Teige et al., 2004). Diese Daten beweisen, dass die MAPKinasen an der Signalweiterleitung bei niedrigen Temperaturen beteiligt sind und einen messbaren Einfluss auf die Genexpression bei Kältestress haben.

1.2.4. Regulation der Genexpression bei Kälte

Für eine gut abgestimmte Kältestressantwort und das Aufbauen der Frosttoleranz besitzen Pflanzen komplexe regulatorische Netzwerke. Mit den an der Signalperzeption und an der Signalweiterleitung beteiligten Komponenten (Kapitel 1.2.3.) wurde bereits ein wichtiger Teil dieser molekularen Steuerung näher beschrieben. Ein weiterer wichtiger Teil ist die gezielte Veränderung der Genexpression. Unter Kältestress und während der Kältehärtung finden enorme Veränderungen der Expression einer Vielzahl von Genen statt. Es ist zu vermuten, dass dabei alle möglichen Ebenen der Regulation involviert sind.

Globale Transkriptanalysen mittels DNA-Microarray-Technik illustrieren, dass in *Arabidopsis thaliana* die mRNA Mengen von einer großen Zahl von Genen unter Kältestress verändert werden. Vogel et al., (2005) haben in entsprechenden Experimenten 514 Gene mit verändertem Transkriptlevel unter Kälteeinwirkung identifiziert. Hannah et al., (2005) gehen davon aus, dass etwa 45% aller Gene in *Arabidopsis* durch Kälte veränderte mRNA Mengen aufweisen. Von etwa 100 dieser durch Kälte regulierten Gene ist bekannt, dass deren Expression unter dem Einfluss des sogenannten CBF Regulons steht (Maruyama et al., 2004; Gilmour et al., 2004; Vogel et al., 2005). CBF steht für 'C-repeat binding factor' und beschreibt eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die aufgrund des entsprechenden DNA Bindemotives zur Klasse der pflanzlichen APETALA2/Ethylen responsive element binding protein' (AP2/EREBP) Transkriptionsfaktoren gehören. Das *Arabidopsis* Protein CBF1 ist 1997

von Stockinger und seinen Kollegen durch Bindung an das als C-repeat bezeichnete cis-Element erstmals identifiziert und charakterisiert worden. In *Arabidopsis thaliana* existieren mit *CBF1*, *CBF2* und *CBF3* drei durch Kälte induzierte CBF Gene. Bereits 15 Minuten nach Transfer der Pflanzen in eine Umgebung mit 2,5°C ist ein deutlicher Anstieg der mRNA Mengen von *CBF1* und *CBF2* nachweisbar (Gilmour et al., 1998). Alle drei CBF Gene zeigen einen transienten Induktionsverlauf mit einem Maximum nach 3h.

24h nach Einsetzen von Kälte sinkt das *CBF* Transkriptlevel auf ein sehr niedriges Niveau (Zarka et al., 2003). Chinnusamy et al., (2003) konnten mit dem MYC-like basic Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor ICE1 ('Inducer of CBF Expression 1') einen weiteren wichtigen Schalter für die Induktion der Genexpression durch Kälte identifizieren. Es wird vermutet, dass ICE1 bei niedrigen Temperaturen durch Phosphorylierung aktiviert wird (Chinnusamy et al., 2007). Zudem ist die Aktivität der SUMO-E3-Ligase SIZ1 für die Anpassung bei Kälte wichtig. Es wird vermutet, dass SIZ1 den Transkriptionsfaktor ICE1 stabilisiert. Es konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass durch die entsprechende Sumoylierung das Polyubiquitinierungslevel von rekombinant erzeugtem ICE1 sinkt (Miura et al., 2007). Die SIZ1 vermittelte Sumoylierung könnte somit der Degradation durch Ubiquitinierung und anschließendem proteolytischen Abbau entgegenwirken. Das die üblichen Mengen ICE1 Protein durch die Aktivität der E3 Ubiquitinligase HOS1 negativ beeinflusst werden, konnte u.a. durch entsprechende 'Gain- und loss-of function' *Arabidopsis* Mutanten gezeigt werden (Dong et al., 2006). Zarka et al., (2003) ist es gelungen mit ICer1 und ICer2 zwei cis-Elemente im *CBF2* Promotor zu identifizieren, die für die Induktion der Genexpression von *CBF2* durch Kälte essentiell sind. Da *ice1* Mutanten ähnliche *CBF2* Transkriptlevel wie entsprechende Wildtypkontrollpflanzen aufweisen (Chinnusamy et al., 2003), wird vermutet, dass es weitere ICE1 ähnliche Transkriptionsfaktoren geben muss, die für die beobachtete Induktion von *CBF2* verantwortlich sind (Zarka et al., 2003).

Fursova et al., (2009) konnten mit ICE2 einen Transkriptionsfaktor charakterisieren, der unter anderem für die Regulation des *CBF1* Genes verantwortlich ist. Unter Verwendung von Transkriptomanalysen und Genomdaten konnten Computer-gestützt zwei weitere potentielle cis-Elemente (ICer3 und ICer4) in den Promotoren Kälte-regulierter Gene vorhergesagt werden (Benedict et al., 2006).

Interessant ist auch, dass *CBF2* einen negativen Einfluss auf die transkriptionsaktivierende Funktion von *CBF1* und *CBF3* hat. *cbf2* Mutanten sind toleranter gegenüber Frost und besitzen unter Kältestress deutlich höhere *CBF1* und *CBF3* mRNA Mengen als entsprechende Wildtypkontrollpflanzen (Novillo et al., 2004).

Mit ZAT12 und MYB15 sind zwei Repressoren der *CBF* Gene identifiziert worden. Beide weisen eine ähnliche Induktionskinetik unter Kältestress auf, wie die CBFs selbst. *35S::ZAT12* Pflanzen sind ohne Kältehärtung toleranter gegenüber Frost. Die Induktion der *CBF* Gene bei niedrigen positiven Temperaturen fällt in den *35S::ZAT12* Pflanzen deutlich geringer aus (Vogel et al., 2005). Sowohl das cis-regulatorische Element ICer3 als auch ICer4 befinden sich im Promotorbereich von *ZAT12* (Benedict et al., 2006). Der R2R3-Typ-Myb Transkriptionsrepressor MYB15 bindet an Typ-II-Myb DNA Motive, die in den Promotoren von *CBF1*, *CBF2* und *CBF3* vorkommen. MYB15 Proteine interagieren sowohl in Hefe als auch *in vitro* mit ICE1. In *35S::MYB15* Pflanzen liegen die *CBF* Transkriptlevel nach 3h Kältestress niedriger als in den entsprechenden Kontrollpflanzen. In *myb15* 'loss of function' Mutanten sind die mRNA Mengen von *CBF1*, *CBF2* und besonders von *CBF3* unter Kälteeinwirkung höher, als in den Kontrollpflanzen (Agarwal et al., 2006). Die DEAD-box RNA Helikasen STRS1 und STRS2 und das CTD-Phosphatase-like 1 Protein (CPL1/FIERY2) konnten ebenfalls als Repressoren der *CBF* Genexpression identifiziert werden (Kant et al., 2007, Xiong et al., 2002). Ein weiterer interessanter Regulator des CBF Regulons ist FVE, eine Untereinheit des Histondeacetylase-Komplexes. Kim et al., (2004) konnten *Arabidopsis acg1* Mutanten isolieren, deren *FVE* Transkriptlevel in Northern-Analy-

sen unterhalb der Detektionsgrenze liegt. Diese Mutanten tragen ein GUS-Reportergen mit 4 künstlich hintereinander angeordneten CRT/DRE DNA-cis-Elementen. Unter Kälteeinwirkung zeigen die *acg1* Pflanzen eine deutlich schnellere und stärkere Reportergenaktivierung als die entsprechenden Kontrollen.

Unterhalb der Regulationsebene des CBF Regulons gibt es eine Reihe weiterer Faktoren, die die Expression der Kältestressgene beeinflussen. Dazu gehören aktivierende Faktoren, wie SFR6 (Knight et al., 2009), das C2H2 Zinkfinger-Protein SCOF-1 (Kim et al., 2001) und der NAC Transkriptionsfaktor LOV1 (Yoo et al., 2007), aber auch Repressoren, wie der R2R3-Typ Myb Transkriptionsfaktor HOS10 (Zhu et al., 2005), der Homeodomänen Transkriptionsfaktor HOS9 (Zhu et al., 2004) und das WD40-repeat Protein HOS15. Interessant ist, dass HOS15 an Histon H4 binden kann und einen Einfluss auf den Grad der Acetylierung von Histon H4 hat. *hos15* Mutanten reagieren sensitiv auf Frost (Zhu et al., 2008). Der Einfluss von Regulatoren wie HOS15 und FVE bei der Anpassung an niedrige Temperaturen zeigt, dass epigenetische Regulationsmechanismen bei Kältestress von Bedeutung sind. Ein weiteres Beispiel für den Einfluss epigenetischer Prozesse auf die Anpassung an Kälte ist das Polycomb Protein EMF2. Polycomb Proteine verändern z.B. durch Histonmethylierung den Zustand bestimmter DNA-Bereiche, was unter anderem zu einer geringeren Transkriptionsaktivität in den betroffenen Bereichen führen kann. *emf2* Mutanten zeichnen sich unter normalen Temperaturbedingungen durch erhöhte *CBF1*, *LOV1*, *COR15A* und *KIN1* Transkriptlevel im Vergleich zu den Wildtypen aus (Kim et al., 2010b).

Mittlerweile sind einige posttranskriptionelle Regulatoren von Kältestressgenen bekannt.

Karlson et al., (2002) konnten mit WCSP1 ('wheat cold shock protein 1) ein potentiell mRNA Chaperone aus Weizen isolieren. Die Genexpression von *WCSP1* wird durch niedrige Temperaturen induziert. Rekombinant hergestelltes WCSP1 bindet *in vitro* dsDNA, ssDNA und RNA Ribohomopolymere. Die Autoren vermuten, dass WCSP1 eine wichtige regulatorische Bedeutung bei der Kältehärtung besitzt. Als eine mögliche Funktion von WCSP1 wäre unter anderem die Destabilisierung von Sekundärstrukturen in mRNA Molekülen denkbar, welche zu einer effizienteren Translation der betreffenden Transkripte führen könnte.

Dunn et al., konnten bereits 1996 mit *BLT801* ein Kältestressgen in Gerste identifizieren, welches für ein Glycin-reiches RNA bindendes Protein codiert. Wie wichtig Glycin-reiche RNA bindende Proteine für den Prozess der Kältehärtung sind, zeigen Experimente mit *Arabidopsis grp7* Mutanten, welche deutlich sensitiver auf Frost reagieren (Kim et al., 2008). Interessant ist, dass dieser sensitive Phänotyp gegenüber Frost sowohl durch das *Arabidopsis* Kälteschockprotein CDSP1 (Park et al., 2009) als auch durch die *Oryza* Glycin-reichen RNA bindenden Proteine OsGRP1, OsGRP4 und OsGRP6 (Kim et al., 2010) komplementiert werden kann.

Lee et al., (2006) konnten mit STA1 einen prä-mRNA-Spleißfaktor identifizieren, der unter anderem für das korrekte Spleißen der *COR15A* mRNA verantwortlich ist. *stal* Mutanten reagieren sensitiv auf niedrige positive Temperaturen.

Sunkar und Zhu, (2004) konnten erste Hinweise für eine Funktion von microRNAs bei Kälte sammeln. miR393 ist durch eine 24h andauernde Behandlung der entsprechenden *Arabidopsis* Pflanzen mit 0°C deutlich induziert und miR389a.1 reprimiert. In *Brachypodium* akkumulieren miR172 und miR397 unter Kältestress (Zhang et al., 2009).

Eine große Zahl von Genen und Regulatoren, die bei Kältestress und Frosthärtung von Bedeutung sind, haben auch bei Wassermangel, Salz- und Schwermetallstress wichtige Funktionen. So konnten unter anderem Seki et al., (2002) 22 *Arabidopsis* Gene identifizieren, deren Expression sowohl bei Trockenheit, Kälte- und Salzstress induziert ist. Darunter befinden sich z.B. die Transkriptionsfaktoren DREB2A und Constans-like 1.

Der Promotor eines Metallothioneines (OsMT2b) aus Reis wird nicht nur durch hohe Zink-Ionen Konzentrationen, sondern auch durch ABA und osmotischen Stress aktiviert (Ren and Zhao, 2009). Ein weiteres Metallothionein aus Reis *OsMT1a* wird ebenfalls durch Zink-

ionen und osmotischen Stress induziert. Transgene Pflanzen, die deutlich mehr OsMT1a bilden, akkumulieren nicht nur mehr Zink, sondern sind auch toleranter gegenüber Trockenstress (Yang et al., 2009). Es ist denkbar, dass die große Anzahl von bei Kälte verstärkt exprimierten Transkriptionsfaktoren, welche Zn^{2+} als Cofaktor benötigen, einen Einfluss auf die Homöostase dieses essentiellen Schwermetalles innerhalb der Pflanze hat.

1.3. Stress durch Wassermangel

1.3.1. Schadwirkungen bei Wassermangel

Längere Phasen ohne Regen führen bei Pflanzen zu sogenanntem Trockenstress. Die damit verbundene Abnahme der Menge des für die Pflanze verfügbaren Wassers stellt ein ernstes Problem für den pflanzlichen Stoffwechsel dar. Wassermangel inhibiert die Wachstums- und Entwicklungsprozesse in Pflanzen. Besonders dramatisch sind die Effekte auf Pflanzen, die vor dem erfolgreichen Abschluss der Samenbildung von Trockenstress betroffen sind. Unter besonders ungünstigen Umständen führt Trockenheit sogar gänzlich zum Stillstand der pflanzlichen Entwicklung, welche dann mit dem Tod des Organismus endet. Die Zellteilung und die Zellstreckung werden durch Wassermangel sowohl in vegetativen als auch in generativen Organen und Geweben negativ beeinflusst.

Trockenstress kann während der generativen Phase, in der die männlichen und die weiblichen Gametophyten gebildet werden, zu Anomalien bei der Entwicklung von Pollen, Samenanlagen und zur Degenerierung der Zygote führen (Saini und Westgate, 2000; Boyer und Westgate, 2004). Dies ist vor allem für landwirtschaftliche Nutzpflanzen von enormer Bedeutung, da diese zunehmend auch in Gebieten angebaut werden, die aus ökologischer Sicht als Standort eher ungeeignet sind.

Die Schadwirkungen von Wassermangel umfassen das Absinken des Wasserpotentials (Ψ) und damit einhergehend des Turgors, die Inhibierung von Zellwachstum und Zellwandsynthese, eine verringerte Nährstoffversorgung und den anhaltenden Stomataverschluss verbunden mit niedrigeren Transpirationsraten, geringerer CO_2 Assimilation und der Inhibierung der Photosynthese (Hsiao, 1973; Chaves et al., 2009). Unter Trockenstress werden verstärkt reaktive Sauerstoffspezies gebildet. Vor allem in photosynthetisch aktivem Gewebe sind oxidative Schäden nachweisbar. Price und Hendry, (1991) konnten im Spross verschiedener Gräser unter Wassermangel eine verstärkte Lipidperoxidation, verringerte Chlorophyll- und Proteinkonzentrationen nachweisen. Lipidperoxidation wird anhand erhöhter Malonylaldehydmengen gemessen. Dagegen konnten nur geringfügige Veränderungen der Protein- und Malonylaldehydmengen in den Wurzeln der entsprechend mit Trockenheit gestressten Pflanzen gemessen werden.

Bei starker Dehydratation kann es aufgrund des großen Wasserverlustes zur Kristallisierung zellulärer Komponenten kommen (Ingram und Bartels, 1996). Das Schrumpfen der Zellen, die Komprimierung des Cytoplasma, die Verringerung des Volumen der Vakuolen und das Auffalten der Zellwände sind generelle Effekte, die beim Austrocknen auf ultrastruktureller Ebene beobachtet werden können. Bei sehr niedrigen Wasserpotentialen ab -15bar und tiefer sind zunehmend mehr Fetttropfchen, Golgi-Vesikel und Zellen mit zerstörten Plasma- und Tonoplastenmembranen zu beobachten (Fellows und Boyer, 1978).

1.3.2. Anpassungsmechanismen in Pflanzen bei Wassermangel

Zu den generellen Zielen der pflanzlichen Anpassungsreaktionen unter Bedingungen mit Wassermangel gehören die Verringerung des Wasserverlustes, eine erhöhte Wasseraufnahme, das Justieren der osmotischen Verhältnisse, das Anpassen von Energie- und Stoffwechsel und der Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies. Um diese Ziele zu erreichen, kommt es zu einer

Reihe von molekularen, zellulären und physiologischen Veränderungen. Dabei gibt es nicht nur zwischen unterschiedlichen Arten, sondern auch zwischen unterschiedlichen Genotypen einer Art z. T. große Unterschiede. So zeichnen sich gegenüber Trockenheit tolerante Mais-sorten, die generell höhere Mengen an ABA aufweisen, bereits unter optimalen Bedingungen durch eine xeromorphe Blattanatomie aus. Sie haben eine geringere Blattfläche als sensitive Sorten, einen größeren Leitgefäßquerschnitt, weniger und kleinere Stomata (Ristic und Cass, 1991). Parsons und Howe, (1984) konnten zeigen, dass sich *Phaseolus acutifolius* im Vergleich zu zwei *Phaseolus vulgaris* Sorten besser an Wassermangelbedingungen anpasst und bei sinkendem relativen Wassergehalt einen höheren Turgor aufrecht erhalten kann. *Rosmarinus officinalis* reagiert auf Trockenheit unter anderem mit Veränderungen der Blattanatomie. Die Epidermiszellen und die Interzellularen im Blattgewebe sind deutlich kleiner (Olmos et al., 2007).

Ein sehr großer Teil des Wasserverlustes einer Pflanze kann durch das Schließen der Stomata verhindert werden. Die Stomata reagieren sowohl auf kurzfristige Veränderungen des Wasserpotentials in den Blättern als auch langfristig in Abhängigkeit von Abscisinsäure, welche beim Austrocknen der Erde in den Wurzeln freigesetzt wird und über den Transpirationsstrom in die Blätter gelangt (für einen Überblick siehe Buckley, 2005; Davies und Zhang, 1991).

Um die Wasseraufnahme unter Trockenstress zu verbessern, können einige Pflanzen das Verhältnis zwischen Spross und Wurzel verändern. In Soja-Keimlingen wird das Hypokotylwachstum mit abnehmendem Wasserpotential im Boden deutlich inhibiert, während das Wurzelwachstum konstant bleibt (Creelman et al., 1990). In Baumwoll-Keimlingen wird neben der Inhibierung des Sprosswachstums das Wachstum von Haupt- und Seitenwurzeln unter Trockenheit sogar angeregt (Pace et al., 1999). Rodrigues et al., (1995) konnten für drei unterschiedliche Ökotypen der Lupine einen signifikanten Anstieg der Größe des Wurzelsystems nachweisen. Dabei fällt besonders die deutliche Zunahme an sehr feinen Wurzeln in tieferen Bodenschichten auf.

Ähnlich wie bei Kältestress (siehe Kapitel 1.2.2.), akkumulieren unter Wassermangel organische osmotisch wirksame Substanzen, wie Prolin, Betaine, Mannitol, Fructane, Trehalose. Obwohl die Erhöhung der Osmolarität in den Zellen durch die Anhäufung dieser osmotisch wirksamen Substanzen unbestritten ist, wird ihre Bedeutung für die Einstellung geeigneter osmotischer Bedingungen unter Stress kontrovers diskutiert (Hare et al., 1998).

Eine weitere Gemeinsamkeit der Anpassung an Kälte- und Trockenstress ist die verstärkte Synthese von Dehydrinen. Dehydrine gehören zu den bei der Samenentwicklung wichtigen Proteinen der LEA Gruppe II ('late embryogenesis abundant', siehe Allagulova et al., 2003 für einen Überblick). In gegenüber Trockenstress toleranteren Weizensorten wird die Genexpression einiger Dehydrine bereits bei höheren relativen Wassergehalten induziert (Rampino et al., 2006). In den letzten Jahren konnten viele weitere Gene bzw. Proteine identifiziert werden, deren Expression durch Wassermangel verändert wird (siehe Kapitel 1.3.4.). Aber wie nehmen pflanzliche Zellen überhaupt wahr, dass weniger Wasser verfügbar ist?

1.3.3. Signalperzeption und Signalweiterleitung bei Wassermangel

Es wird vermutet, dass die Perzeption des Signals 'Wassermangel' an verschiedenen Stellen in den Pflanzen erfolgt und über mehrere Signalwege weitergeleitet wird. Zhu, (2002) stellt in diesem Zusammenhang die folgenden Signalwege in den Mittelpunkt.

1. Reaktionswege, die für das Einstellen des osmotischen Gleichgewichtes wichtig sind.
2. Reaktionswege, welche für die Entgiftung toxischer Stoffe und Metabolite, wie z.B. reaktive Sauerstoffspezies, verantwortlich sind und
3. Signalwege, welche die Wachstums- und Entwicklungsprozesse steuern.

Um die molekularen Zusammenhänge zu verstehen, die für das Justieren des osmotischen Gleichgewichtes von Bedeutung sind, ist es sinnvoll, das Geschehen sowohl auf der Ebene der Organe als auch auf zellulärer Ebene zu betrachten.

In einer Reihe von Untersuchungen an unterschiedlichen Pflanzen konnte nachgewiesen werden, dass bei Trockenheit das Absinken des Wasserpotentials im Boden unter anderem die Synthese von ABA in den Wurzeln induziert (Walton et al., 1976; Hubick et al., 1986; Lancho and Baker, 1986). Innerhalb der Wurzeln einiger Arten unterbinden die erhöhten ABA Mengen die Produktion von Ethylen und die damit einhergehende Inhibierung des Wurzelwachstums (Ober und Sharp, 2007). Über den Transpirationsstrom im Xylem gelangt ABA anschließend in den Spross und die Blätter (Davies und Zhang, 1991). Je nach Zelltyp und Gewebe löst ABA dann unterschiedliche Reaktionen aus. Dazu gehören das Schließen der Stomata und die Veränderung der Genexpression (Schroeder et al., 2001; Bray, 2002). Neben ABA werden noch eine Reihe weitere Faktoren, wie z.B. Cytokinine, der pH-Wert im Xylemsaft, Ethylenvorstufen und Malat als Signale diskutiert, über welche Wurzeln das Signal 'Wassermangel' zu den oberirdischen Organen übermitteln (Schachtman und Goodger, 2008). Seit vielen Jahren wird auf der zellulären Ebene nach Sensoren gesucht, welche für die Perception von Veränderungen im Wasserpotential verantwortlich sind. Experimente an Wurzelhaaren sprechen eher für die Existenz eines 'Osmo-Sensors' und weniger für einen 'Turgor-Sensor'. Wird der Turgor direkt durch eine Drucksonde erhöht, sind keine veränderten Membranpotentiale und keine veränderten Membranleitfähigkeiten messbar. Dagegen führt ein indirekter Einfluss auf den Turgor durch Behandlung mit unterschiedlich osmolaren Lösungen sowohl zu veränderten Membranpotentialen als auch zu veränderten Leitfähigkeiten (Lew, 1996).

Die osmotischen Veränderungen an den Membranen führen sowohl bei Wassermangel als auch bei Salzstress ähnlich wie bei niedrigen Temperaturen (siehe Kapitel 1.2.3.) zu einem Einstrom von Calcium-Ionen in das Cytosol. Unter Verwendung entsprechender Inhibitoren konnte eine Beteiligung von L-Typ Calciumkanälen und den Aktivitäten der Phospholipase C und der myo-Inositol-1-Phosphatase am Ca^{++} -Influx nachgewiesen werden (Knight et al., 1997). Eine besondere Rolle spielt der Calcium-Influx bei der Regulierung der Spaltöffnungen. Verschiedene Stimuli wie ABA, CO_2 , oxidativer Stress, InsP_3 , cADPR und niedrige Konzentrationen an Kalium-Ionen im Apoplasten bewirken durch den Einstrom von Ca^{++} ins Cytosol das Schließen der Stomata (McAnish et al., 1997).

Die Aktivität der Prolin-reichen Extensin-ähnlichen Rezeptorkinase PERK4 spielt für den durch ABA induzierten Calcium-Influx ins Cytosol von *Arabidopsis* Zellen ebenfalls eine wichtige Rolle (Bai et al., 2009).

Die Calcium-Ionen binden im Zellplasma an Ca^{++} -abhängige Proteinkinasen, CBL-Proteine und Calmoduline und leiten so das Signal 'Wassermangel' weiter. Es konnte mittlerweile eine Reihe von Beispielen für die Calcium-vermittelte Signaltransduktion bei Wassermangel beschrieben werden.

CBL1 ist ein wichtiger von Calcium abhängiger Regulator bei abiotischem Stress. Das CBL1 Protein beeinflusst die Genexpression von einigen wichtigen Trockenstressgenen positiv, wie z.B. die des Transkriptionsfaktors DREB2A. Dagegen ist die Wirkung auf die Expression des bei Kältestress bedeutsamen Transkriptionsfaktors DREB1A negativ. Interessanterweise reagieren *cbl1* Mutanten sensitiv auf Salz- und Trockenstress und tolerant auf Froststress, während die Überexpression von CBL1 in *MAS::CBL1* Mutanten eine gesteigerte Sensitivität auf Frost und eine höhere Toleranz gegenüber Salz- und Trockenstress bewirkt (Cheong et al., 2003).

Die Aktivität der mit den CBL-Proteinen CBL1 und CBL 9 interagierenden Proteinkinase CIPK23 ist für *Arabidopsis* Pflanzen unter Trockenstress sehr wichtig. In *cipk23* Mutanten reagieren die Stomata hypersensitiv auf ABA (Cheong et al., 2007).

35S::CBL5 Arabidopsis Mutanten exprimieren typische Trockenstressgene, wie *DREB2A*, *RD29A*, *RD29B*, *RAB18*, aber auch Kältestressgene, wie *COR15A*, *KINI* und *COR47*, stärker als entsprechende Kontrollpflanzen. Die *35S::CBL5* Pflanzen sind toleranter gegenüber Trockenheit und Salzstress (Cheong et al., 2010).

Magnan et al., (2008) konnten mit *CML9* ein Calmodulin in *Arabidopsis* identifizieren, dessen Expression auf Transkriptebene sowohl durch Wassermangel als auch durch ABA-Applikation, Salz- und Kältestress induziert wird. *cml9* Mutanten reagieren in Keimungstests hypersensitiv auf ABA und sind toleranter gegenüber Salz- und Trockenstress.

Yang et al., (2010b) berichten über eine Calcium/Calmodulin bindende Rezeptorkinase *GsCBRLK* aus *Glycine soja*, deren Expression auf mRNA Level in Blättern ähnlich wie bei *AtCML9* durch Wassermangel, ABA-Applikation, Salz- und Kältestress induziert wird. *35S::GsCBRLK* Mutanten reagieren in Keimungs- und Wurzelwachstumstests toleranter gegenüber ABA-Applikation und hohen Salzkonzentrationen.

Durch die heterologe Expression einer Ca^{++} abhängigen Proteinkinase ACPK aus Weintrauben in *Arabidopsis* entstehen Pflanzen die sensitiv auf ABA reagieren und sich durch die veränderte Genexpression einiger Stressgene wie *RAB18*, *KINI* und *KIN2* auszeichnen (Yu et al., 2007).

Der beim Schließen der Stomata wichtige Anionen-Kanal *SLAC1*

wird von der Ca^{++} abhängigen Proteinkinase *CPK21* reguliert (Geiger et al., 2010).

Die Genexpression der Ca^{++} abhängigen Proteinkinase *CPK6* aus *Arabidopsis* wird durch Wassermangel und Salzstress induziert. *35S::AtCPK6* Mutanten zeigen eine erhöhte Toleranz gegenüber Wassermangel und Salzstress. Die Expression ausgewählter Trockenstressgene, wie *RD29A*, *RD29B* und *RD22*, Kältestressgene, wie *COR15A* und *KINI*, und der Gehalt an freiem Prolin sind unter Stressbedingungen in den *35S::AtCPK6* Mutanten erhöht. Die Lipidperoxidation ist in den Pflanzen mit künstlich erhöhten Mengen an *AtCPK6* unter Stressbedingungen deutlich reduziert (Xu et al., 2010).

All diese Daten machen deutlich, welchen bedeutenden Einfluss die Erhöhung der Konzentration von Ca^{++} -Ionen im Cytosol bei der Signalweiterleitung in Pflanzen unter Trockenheit und Salzstress hat. Der Ca^{++} -Influx aktiviert wie oben beschrieben eine Reihe von Proteinkinasen, wodurch u. a. über eine Veränderung der Genexpression eine Anpassung an Trockenheit erfolgt.

Dass Ca^{++} -abhängige Proteinkinasen durch Phosphorylierung die Aktivität von Transkriptionsfaktoren regulieren, konnte z.B. für *AtCPK32* gezeigt werden. *AtCPK32* phosphoryliert den Leucin-Zipper Transkriptionsfaktor *ABF4*, von dem bekannt ist, dass seine Aktivität durch ABA induziert wird (Choi et al., 2005).

Hirayama et al., konnten bereits 1995 nachweisen, dass die Genexpression der Phospholipase C *AtPLC1* in *Arabidopsis* unter Wassermangel, Kälte- und Salzstress induziert wird. Rekombinant erzeugte *AtPLC1* zeigt die typischen Ca^{++} abhängigen Aktivitäten sowohl für die Hydrolyse von InsP_2 als auch InsP .

Die Genexpression der Phospholipase C *BnPLC2* wird in Raps ebenfalls unter Wassermangel, Kälte- und Salzstress induziert (Das et al., 2005). Durch die künstlich erhöhte Phospholipase C-Aktivität in transgenem Mais konnte die Toleranz gegenüber Trockenstress in den entsprechenden Pflanzen verbessert werden. Besonders eindrucksvoll ist, dass die *ZmUBI::ZmPLC1* Pflanzen unter Wassermangel höhere Erträge als die entsprechenden Wildtypkontrollpflanzen produzieren (Wang et al., 2008).

Diese Beispiele illustrieren die Bedeutung des Phosphoinositol-Reaktionsweges unter Trocken-, Kälte- und Salzstress. In Pflanzen hat insbesondere die Bildung von InsP_6 eine wichtige Funktion bei der Freisetzung von Calcium-Ionen und der Signalweiterleitung unter osmotisch ungünstigen Bedingungen (Munnik und Veermeer, 2010).

Eine weitere interessante Gruppe von Proteinen, die an der Perzeption von Wassermangel und ABA mitwirken, sind die Rezeptor-Histidinkinasen. In *Arabidopsis* existieren sechs Rezeptor-

Histidinkinasen, welche nicht für die Bindung von Ethylen verantwortlich sind. AHK2, AHK3 und CRE1, sind an der Signaltransduktion von Cytokinin beteiligt. Für die Rezeptor-Histidinkinasen AHK2 und AHK3 konnten Tran et al., (2007b) eine Rolle als negative Regulatoren bei der Trockenstressantwort nachweisen. Dagegen hat AHK1 eine positive Funktion unter Wassermangel. *ahk1* Mutanten reagieren sensitiv auf Trocken- und Salzstress. Eine Reihe von wichtigen Trockenstressgenen werden in den *ahk1* Mutanten deutlich schwächer exprimiert. Transgene Pflanzen, die artifiziell erhöhte AHK1 Mengen besitzen, sind gegenüber Wassermangel deutlich toleranter. Interessant ist, dass AHK1 auch bei der Samenentwicklung eine wichtige Funktion innehat. So weisen *ahk1* Mutanten in Samen unter anderem geringere Level an entsprechend spezifischen Transkripten und Speicherproteinen auf (Wohlbach et al., 2008).

Die SnRK2 Proteinkinasen SnRK2D, SnRK2E und SnRK2I sind für die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren ABI5, ABF2/AREB1 und AREB3 wichtig und scheinen somit für deren Aktivierung von Bedeutung zu sein. Entsprechende dreifach *snrk2d/e/i* Mutanten zeigen eine verringerte Expression ABA-abhängiger Gene, eine gestörte Samenentwicklung (Nakashima et al., 2009) und reagieren sensitiv auf Wassermangel (Fujita et al., 2009).

Weiterhin gibt es experimentelle Hinweise darauf, dass auch die MAP Kinase Kaskade als wichtige Komponente bei der Signalweiterleitung unter Trockenstress eine Rolle spielt.

Die MAP Kinase 4 aus *Medicago sativa* wird sowohl durch Wassermangel als auch durch niedrige Temperaturen aktiviert (Jonak et al., 1996). Matsuoka et al., (2002) konnten eine Aktivierung der MEK1, einer MAP Kinase Kinase aus *Arabidopsis thaliana*, unter Trockenstress, nachweisen. Interessanterweise führen Kälte, Salzstress und Verwundung ebenfalls zur Aktivierung der AtMEK1.

Ein weiteres Signal, welches bei morphologischen, ontogenetischen und metabolischen Prozessen regulatorische Einflüsse hat, ist der zelluläre Redoxstatus (Pastori und Foyer, (2002); Kacperska, (2004)). Das Redoxpotential im Cytosol verändert sich unter Trockenstress nachweisbar in Richtung oxidierende Bedingungen. Diese Veränderung kann durch Wiederbewässerung rückgängig gemacht werden (Jubany-Mari et al., 2010).

1.3.4. Regulation der Genexpression bei Wassermangel

Die im Kapitel 1.3.3 besprochenen Signalwege führen zu Veränderungen der Expression einer großen Zahl von Genen (Kreps et al., 2002; Seki et al., 2002).

Matsui et al., (2008) konnten mehr als 2400 durch Trockenstress induzierte und mehr als 2000 entsprechend reprimierte *Arabidopsis thaliana* Gene identifizieren. In Reis werden 582 Gene in den Blättern, 1257 Gene im Spross und 614 Gene in den Rispen unter Wassermangel verstärkt exprimiert (Zhou et al., 2007). In Gerste konnten 3330 durch Trockenstress differentiell exprimierte Gene nachgewiesen werden (Tommasini et al., 2008).

An der Regulation der Genexpression bei Wassermangel ist eine große Zahl von Transkriptionsfaktoren beteiligt.

Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, (2006) unterteilen diese nach deren Abhängigkeit vom Phytohormon ABA in zwei Gruppen.

Zu den ABA-unabhängigen Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana*, welche für die Anpassung an Trockenheit relevante Gene induzieren, gehören u.a. DREB2A und DREB2B (Liu et al., 1998). Die Expression der entsprechenden Gene *DREB2A* und *DREB2B* wird nicht nur durch Trockenheit, sondern auch bei Salzstress induziert (Nakashima et al., 2000). DREB2A und DREB2B gehören zu den ERF/AP2-Domänen Transkriptionsfaktoren. Sie binden, ähnlich wie die bei Kältestress wichtigen und ebenfalls zu dieser Proteinfamilie gehörenden CBFs an CRE/DRE cis-Elemente in den Promotoren der Zielgene (Sakuma et al., 2002).

Zu den ABA-abhängigen Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana* zählen unter anderem CBF4/DREB1D (Haake et al., 2002), NFYA5 (Li et al., 2008), ANAC019, ANAC055,

ANAC072/RD26 (Fujita et al., 2004; Tran et al., 2004), AZF2, STZ (Sakamoto et al., 2004), MYC2 (Abe et al., 1997), MYB2 (Urao et al., 1993), ABI5 (Liu und Stone, 2010) und ABF1 bis ABF4 (Choi et al., 2000). Es gibt experimentelle Hinweise, dass die Calcium-abhängige Proteinkinase AtCPK32 den Transkriptionsfaktor ABF4/AREB2 durch Phosphorylierung aktiviert (Choi et al., 2005).

Die SnRK2 Proteinkinasen SnRK2D, SnRK2E und SnRK2I sind für die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren ABI5, ABF2/AREB1 und AREB3 wichtig und scheinen somit für deren Aktivierung von Bedeutung zu sein. (Nakashima et al., 2009, Fujita et al., 2009). ABF2, ABF3 und ABF4 aktivieren ABA-abhängige Gene als Homo- und Heterodimere, u.a. in Pflanzen unter Trocken- und Salzstress. Dreifach *abf2/3/4* Mutanten reagieren sensitiver auf Wassermangel als entsprechende Kontrollpflanzen (Yoshida et al., 2010).

Der *Arabidopsis* Transkriptionsfaktor HDG11 ist ebenfalls an den komplexen Regulationsprozessen bei Wassermangel beteiligt. HDG11 besitzt neben einer Homeodomäne, die für die DNA Bindung verantwortlich ist, eine START-Domäne, welche vermutlich für Wechselwirkungen mit anderen regulatorischen Faktoren wichtig ist. Interessant ist, dass HDG11 die Transkription von sowohl *CIPK3* (Calcineurin B-like interagierende Proteinkinase 3, Ca⁺⁺ Signalkomponente), *ERECTA* (Leucine-rich-repeat-Rezeptorkinase, reguliert neben der Entwicklung der Blütenstände auch die Transpirationseffizienz), als auch *NCED3* (9-cis Epoxy-carotinoiddioxygenase, ABA-Biosynthese) aktivieren kann. Mutanten mit entsprechend erhöhten Mengen an HDG11 sind toleranter gegenüber Trockenstress. Sie besitzen größere Mengen an ABA und Prolin und zeichnen sich durch eine erhöhte Superoxiddismutase-Aktivität aus. Zu den Trockenstress-relevanten anatomischen Besonderheiten der HDG11 Mutanten gehören ein stärkeres Wurzelwachstum und eine geringere Anzahl an Stomata pro Blattfläche (Yu et al., 2008).

Der Zinkfinger-Homeodomänen-Transkriptionsfaktor ZFHD1/ATHB29 hat gemeinsam mit den NAC Transkriptionsaktivatoren ANAC019, ANAC055 und ANAC072 eine wichtige Funktion bei der Induktion Trockenstress-relevanter Gene und der Etablierung einer Toleranz gegenüber Wassermangel (Tran et al., 2007a).

Karaba et al., (2007) konnten mit HARDY einen AP2/ERF-like Transkriptionsfaktor identifizieren, dessen verstärkte Expression ebenfalls zu Trockenstress-toleranten Pflanzen mit größerem Wurzelsystem und erhöhter Expression Trockenstress-relevanter Gene führt.

Weiterhin ist der *Arabidopsis* Transkriptionsfaktor AtMYB44 an regulatorischen Prozessen im Zuge der Anpassung an Wassermangel und Salzstress beteiligt. *atmyb44* Mutanten reagieren sensitiv bei Trockenheit und hohen Salzkonzentrationen (Jung et al., 2008).

Interessant ist, dass sich sowohl die Genexpression als auch die Aktivität einiger dieser Transkriptionsfaktoren nicht nur unter Trockenstressbedingungen verstärken, sondern auch bei Kälte-, Salz- und künstlich erzeugtem osmotischen Stress angeschaltet werden. Dies legt Gemeinsamkeiten der entsprechenden Anpassungsreaktionen nahe, welche sich auch in globalen Expressionsanalysen wieder spiegeln. In Reis reagieren ca. 30% der jeweils differentiell exprimierten Gene sowohl bei Trockenheit als auch bei Salzstress (Zhou et al., 2007). In Gerste liegen 4% der induzierten und ca. 3% der reprimierten Gene bei Kälte- ebenso wie unter Trockenstress entsprechend reguliert vor (Tommasini et al., 2008). Dass es bei Trockenheit, Wassermangel, Kälte und Frost auch zu Veränderungen der Verfügbarkeit von Nährstoffen im Allgemeinen und Mikronährstoffen wie Zink, Eisen, Kupfer, Mangan und Nickel im Speziellen kommt, ist bisher kaum beachtet worden. Dabei erscheint die Frage nach den molekularen Zusammenhängen, welche zwischen den Reaktionen von Pflanzen auf Trockenheit und Kälte sowie den Prozessen der Schwermetallhomöostase und der pflanzlichen Entwicklung bestehen, durchaus interessant.

1.4. Schwermetallstress und Schwermetallhomöostase

1.4.1. Toxische und essentielle Schwermetalle

Es existiert keine eindeutige, allgemein akzeptierte Definition, die festlegt, welche Elemente zur Gruppe der 'Schwermetalle' gehören. Meist werden mit dem Begriff Schwermetall die Metalle bezeichnet, deren Dichte größer als $5 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ist. Oxidierte Schwermetalle, wie Zn^{2+} , Cu^{2+} oder Cu^{1+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} und Ni^{2+} sind für eine große Zahl an Proteinen als Cofaktor wichtig (Hänsch und Mendel, 2009). In den entsprechenden Metallproteinen sind sie durch ihre besonderen physikochemischen Eigenschaften von großer Bedeutung für deren jeweilige katalytische oder molekulare Funktion. In der 'The Arabidopsis Information Resource' TAIR Datenbank sind 1272 Proteine gelistet, deren Funktion mit Zn^{2+} in Verbindung steht. Weiterhin können in der TAIR Datenbank 108 Kupfer-abhängige, 106 Eisen-abhängige, 12 Mangan-abhängige und 4 Nickel-abhängige *Arabidopsis* Proteine gefunden werden. Diese Zahlen machen deutlich, warum die entsprechenden Schwermetalle als Mikronährstoffe eine große Bedeutung für die pflanzliche Entwicklung besitzen. Ein Vergleich der hohen, in Pflanzen gespeicherten, Mengen an essentiellen Schwermetallen mit den für die Wurzeln in den meisten Böden verfügbaren Konzentrationen illustriert, welche erstaunlich effizienten pflanzlichen Aufnahme-, Transport- und Speichermechanismen existieren (Krämer et al., 2007). Umweltbedingte Fluktuationen der verfügbaren Mengen an essentiellen Schwermetallen führen zu Schwermetallstress. Sowohl Mangelbedingungen als auch eine Überversorgung wirken sich negativ auf pflanzliche Entwicklungsprozesse aus. Dies macht deutlich, welchen großen Stellenwert molekulare Mechanismen haben, die für die Schwermetallhomöostase auf allen Ebenen des pflanzlichen Organismus verantwortlich sind.

Eine weitere Ursache für eine gestörte pflanzliche Entwicklung durch Schwermetallstress ist das Vorkommen von toxischen Schwermetallionen wie z.B. Cd^{2+} , Pb^{2+} und Hg^{2+} . Gelangen solche Schwermetalle, die nicht als Cofaktoren für die Funktion bestimmter Proteine von Bedeutung sind, in die Pflanze, ist ein Überleben nur möglich, wenn eine entsprechende Toleranz aufgebaut werden kann. Bei der Etablierung einer solchen Schwermetalltoleranz sind u. a. Mechanismen zur Chelatierung des entsprechenden Schwermetalles und dessen Entsorgung erforderlich. Die toxischen Schwermetalle gelangen zum Teil über die gleichen Wege in die Pflanze, welche die Aufnahme der essentiellen Schwermetalle gewährleisten (Clemens, 2001; Hall, 2002).

Dies illustriert, dass die molekularen Mechanismen der Schwermetallhomöostase auch in enger Verbindung zur Toleranz gegenüber toxischen Schwermetallen stehen. Die bekannten molekularen Mechanismen, welche die zellulären Level der essentiellen Schwermetalle in den Pflanzen im Gleichgewicht halten, werden im Folgenden detailliert beschrieben. Für einen Überblick zu den ebenfalls äußerst interessanten molekularen Zusammenhängen der Entgiftung toxischer Schwermetalle wird an dieser Stelle auf weitere Übersichtsartikel verwiesen (Cobbett und Goldsbrough, 2002; Clemens, 2006; Clemens und Persoh, 2009; Maestri et al., 2010; Lux et al., 2011).

1.4.2. Aufnahme von Schwermetallen und Transport

Die essentiellen Schwermetalle sind in den meisten Böden in ausreichender Menge vorhanden, liegen aber oft in unlöslichen Verbindungen vor. Cu und Zn^{2+} sind oft an Lehm, CaCO_3 oder organische Verbindungen im Humus gebunden. Fe^{3+} liegt hauptsächlich in Form von $\text{Fe}(\text{OH})_3$ vor. H^+ -ATPasen sorgen für eine Energie-abhängige Ansäuerung der Rhizosphäre. Durch die ansteigenden Protonenkonzentrationen lösen sich die Schwermetallkationen. Zudem entsteht durch das Ausschleusen von Protonen ein stark negatives Membranpotential, welches die treibende Kraft für die Aufnahme der Schwermetallkationen ist. Mit Ausnahme der Gräser nehmen die meisten Pflanzen Cu und Fe in reduzierter Form als Cu^+ und Fe^{2+} auf

(Palmer und Guerinot, 2009). Die Eisenchelat-Reduktasen *FRO2* und *FRO3* sind vermutlich an der NADH-abhängigen Reduktion von Fe^{3+} und Cu^{2+} beteiligt. *FRO2* wird unter Eisenmangel (Robinson et al., 1999) und *FRO3* bei Kupfermangel in Wurzelzellen stärker exprimiert (Mukherjee et al., 2006).

In den letzten Jahren sind eine Reihe von Transportern identifiziert worden, die u. a. für die Aufnahme der Schwermetallkationen in die Wurzelzellen verantwortlich sind. AtIRT1 ist der wichtigste Fe^{2+} Transporter in *Arabidopsis*. *irt1-1* Mutanten sind bei normaler Versorgung mit Eisen nicht lebensfähig. Sowohl die in den *irt1-1* Mutanten erhöhte *FRO2* Aktivität, als auch die erhöhte *IRT2* Expression können den Eisenmangel-Phänotyp nicht kompensieren. Interessant ist, dass unter Eisenmangel über AtIRT1 auch Mn^{2+} und Zn^{2+} verstärkt importiert werden (Vert et al., 2002).

AtIRT3 transportiert sowohl Zn^{2+} als auch Fe^{2+} (Lin et al., 2009). AhIRT3 wird in den Wurzeln der Zink-hyperakkumulierenden Pflanze *Arabidopsis halleri* deutlich stärker als in *Arabidopsis thaliana* exprimiert (Talke et al., 2006).

Die Genexpression der Transporter AtZIP1, AtZIP2, AtZIP3, AtZIP4, AtZIP5 und AtZIP9 wird in *Arabidopsis* Wurzeln unter Zink-Mangelbedingungen deutlich induziert (Grotz et al., 1998; Wintz et al., 2003; Talke et al., 2006). Welche Bedeutung diese Transporter für den Import von Zink oder andere Schwermetalle in die Wurzelzellen haben, ist allerdings noch nicht lückenlos aufgeklärt.

AtCOPT1 transportiert Cu^{1+} Ionen. *COPT1::GUS* Promotor-Reporteranalysen weisen darauf hin, dass *COPT1* in Wurzelspitzen exprimiert wird. *COPT1* antisense Pflanzen nehmen deutlich weniger Kupfer auf, als entsprechende Kontrollpflanzen (Sancenon et al., 2004). Ein weiterer wichtiger Transporter mit Bedeutung für die Aufnahme von Schwermetallen in die Wurzeln, scheint AtNRAMP1 zu sein. Die Genexpression von *AtNRAMP1* wird unter Eisenmangel in Wurzeln induziert. *35S::AtNRAMP1* Pflanzen sind toleranter gegenüber hohen Eisenkonzentrationen (Curie et al., 2000). Neben der erhöhten Expression unter Eisenmangel wird *AtNRAMP1* auch bei Mangandefizit in Wurzeln induziert. *AtNRAMP1::GUS* Promotor-Reporteranalysen zeigen eine besonders starke Expression im Bereich der Elongationszone in den Wurzeln unter Manganmangel. AtNRAMP1 Proteine befinden sich in der Plasmamembran. *atnramp1-1* Mutanten reagieren anfällig auf Manganmangel und akkumulieren weniger Mangan in Wurzel und Spross. Diese Daten weisen auf eine wichtige Funktion von AtNRAMP1 bei der Aufnahme von Mangan in die Wurzeln hin (Cailliatte et al., 2010).

Nachdem die essentiellen Schwermetalle in die Wurzeln aufgenommen worden sind, können sie im Symplasten von der Epidermis bis zum Perizykel wandern und müssen dort aktiv ins Xylem transportiert werden. Über den Ferntransport im Xylem gelangen sie dann in den Spross (Palmer und Guerinot, 2009). Einige Sinkbereiche der Pflanzen, wie z.B. sich entwickelnde Samen und Blätter müssen allerdings über das Phloem mit Schwermetallkationen versorgt werden (Curie et al., 2009).

Der Transport von Zn^{2+} ins Xylem wird durch die $\text{P}_{1\text{B}}$ -type ATPasen AtHMA2 und AtHMA4 bewerkstelligt. AtHMA2 konnte bereits experimentell in der Plasmamembran von Wurzelzellen nachgewiesen werden. *AtHMA2::GUS* und *AtHMA4::GUS* Promotor-Reporteranalysen zeigen, dass beide Gene sehr stark im Leitgewebe von Wurzel, Blatt und Stängel exprimiert werden. *hma2hma4* Mutanten zeigen einen Zinkmangel-Phänotyp, der durch Applizierung größerer Zn^{2+} Mengen kompensiert werden kann. Die Tatsache, dass *hma2hma4* Pflanzen in den Wurzeln größere und im Spross geringere Zn^{2+} Mengen als entsprechende Wildtypkontrollpflanzen akkumulieren, unterstreicht die Bedeutung dieser ATPasen für den Zinkferntransport aus der Wurzel in den Spross (Hussain et al., 2004).

AtPCR2 scheint als integrales Membranprotein neben der Entgiftung von Zink und anderen Schwermetallen, auch an der Beladung des Xylems mit Zn^{2+} in den Wurzeln beteiligt zu sein. Hierfür spricht unter anderem die starke Expression von *AtPCR2* in Wurzelepidermiszellen und im Xylemparenchym junger Wurzeln (Song et al., 2010).

Auf welchem Weg Eisen in den Wurzeln ins Xylem transportiert wird, ist im Detail noch nicht aufgeklärt. Durett et al., (2007) stellen die Hypothese auf, dass der 'Multidrug and toxin efflux' (MATE) Transporter AtFRD3 über den Transport von Citrat auch den Transport von Fe-Ionen ins Xylem der Wurzeln ermöglicht. Gestützt wird diese Hypothese unter anderem durch die Tatsache, dass *frd3 Arabidopsis* Mutanten deutlich mehr Eisen in den Wurzeln akkumulieren und dieser Effekt durch die Applizierung von 3mM Citrat aufgehoben werden kann. Die Mengen an Citrat und Eisen im Xylemsaft sind in *frd3* Pflanzen deutlich niedriger als in entsprechenden Wildtypkontrollen. Yokosho et al., (2009) können ähnliche Daten für den MATE Transporter OsFRDL1 in Reis nachweisen.

Cu^{1+} wird in den Wurzeln möglicherweise von der $\text{P}_{1\text{B}}$ -type ATPase AtHMA5 ins Xylem transportiert. Zum einen wird AtHMA5 vor allem in Wurzeln exprimiert und zum anderen reagieren *hma5* Mutanten hypersensitiv auf hohe Kupferkonzentrationen und akkumulieren unter diesen Bedingungen deutlich mehr Cu in den Wurzeln als entsprechende Wildtyppflanzen (Andres-Colas et al., 2006).

Im Xylemsaft werden die Schwermetallkationen gebunden an organische Säuren (z.B. Zitronensäure), freie Aminosäuren (z.B. Histidin, Prolin) oder Peptide und Nicotianamin transportiert (Cataldo et al., 1988; Krämer et al., 1996; Pich und Scholz, 1996; Irtelli et al., 2009; Rellan-Alvarez et al., 2010).

Die genauen molekularen Mechanismen, über die die Schwermetalle im Mesophyll und anderen Sprossbereichen aus dem Xylem entladen werden und welche die Aufnahme in die entsprechenden Zellen ermöglichen, sind noch nicht genau beschrieben (Park et al., 2008; Palmer und Guerinot, 2009). Curie et al., (2009) stellen die Hypothese auf, dass die Oligopeptid-Transporter der YSL Familie ('yellow stripe-like') durch den Transport von Nicotianamin-Metallkomplexen nicht nur an der Be- und Entladung des Phloem mit Cu, Zn und Fe, sondern auch beim Entladen der Schwermetalle aus dem Xylem im Spross beteiligt sind. Zudem könnten YSL Transporter, die sowohl im Xylemparenchym, als auch in Phloembegleitzellen exprimiert werden, für den Transport von Nicotianamin-Metallkomplexen vom Xylem ins Phloem verantwortlich sein. Der Transport von essentiellen Schwermetallen im Phloem ist vor allem für die Versorgung von Geweben ohne Xylemanbindung von großer Bedeutung. Dazu gehören u. a. junge Organe, deren Xylem noch nicht voll entwickelt ist und der Samen mit dem Embryo, dessen Xylemanbindung im Zuge der Samenentwicklung getrennt wird.

1.4.3. Intrazellulärer Transport von Schwermetallen

Nachdem die essentiellen Schwermetalle in den Wurzeln aufgenommen wurden und über das Ferntransportsystem zum jeweiligen Gewebe gelangt sind, können sie dort in die Zellen importiert werden. Eine ungerichtete Verteilung der Schwermetalle innerhalb der Zellen, welche durch zufällige Bindungen und Dissoziationen geprägt wäre, ist zu langsam und ineffizient (Krämer et al., 2007). Zudem stellen die toxischen Eigenschaften, vor allem der redoxaktiven Schwermetalle Fe und Cu, eine ernste Gefahr für die Prozesse und Moleküle im Cytosol dar. Unter Anbetracht dieser Gegebenheiten scheint die Notwendigkeit eines zellulären Logistiksystems zur exakt abgestimmten und genau steuerbaren Lieferung, Lagerung und Entsorgung von essentiellen Schwermetallen offensichtlich zu sein. In diesem Zusammenhang findet seit den späten 90er Jahren des letzten Jahrhunderts das Konzept von sogenannten molekularen 'Metallchaperonen' immer größerer Beachtung. Demnach übernehmen Metallchaperone, als metallbindende Proteine, den gezielten Transport des jeweiligen Schwermetalles vom Importer an der Plasmamembran zu den entsprechenden Zielen innerhalb der Zelle. Solche Ziele sind u. a. Apoproteine, die das Schwermetall als Cofaktor benötigen, und Transporter, die das Schwermetall in andere zelluläre Kompartimente transferieren (O'Halloran und Culotta, 2000).

Mittlerweile konnten viele interessante Informationen gesammelt werden, die ein tieferes Verständnis über den intrazellulären Transport von Cu^{1+} ermöglichen (Burkhead et al., 2009). Der Import von Kupfer ins Cytosol wird wahrscheinlich durch die Transporter COPT1 bis COPT6 bewerkstelligt (Penarrubia et al., 2010). Obwohl keine direkten experimentellen Daten vorliegen, zeigen Komplementationsanalysen in Hefe, dass COPT1, COPT2, COPT3 und COPT5 die Funktion der Kupfertransporter ScCTR1 und ScCTR3 übernehmen und Cu ins Cytosol importieren können (Sancenon et al., 2003). Genexpressionsanalysen weisen darauf hin, dass *COPT1* und *ZIP2* aufgrund ihrer Kupfer-abhängigen Regulation im Spross am Import von Cu ins Cytosol beteiligt sind. Beide Gene werden unter Kupfermangelbedingungen induziert und bei Kupferüberschuss reprimiert (del Pozo et al., 2010).

Inwieweit für den Import von Cu^{1+} ins Cytosol eine Reduktion von Cu^{2+} im Apoplasten erforderlich ist, bleibt im Detail noch zu klären. Genexpressionsdaten der *Arabidopsis FRO* Eisenchelatreduktase Familie geben Hinweise für die Notwendigkeit einer entsprechenden Reduktion. *FRO3* wird nicht nur in Wurzeln, sondern auch im Spross unter Kupfermangel induziert (Mukherjee et al., 2006).

Nachdem der Import über die Plasmamembran erfolgt ist, werden die Cu-Ionen von Metallchaperonen übernommen. In *Arabidopsis thaliana* sind mit CCH (Himmelblau et al., 1998), AtATX1 (Andres-Colas et al., 2006) und CCS (Wintz und Vulpe, 2002; Chu et al., 2005) drei Kupferchaperone identifiziert worden.

AtATX1 ist ortholog zum Kupferchaperon ATX1 ('antioxidant 1', Lin und Culotta, 1995) aus Bäckerhefe. Das Hefe ScATX1 transportiert Cu-Ionen vom Importer ScCTR1 an der Plasmamembran zur Kupfer-transportierenden ATPase ScCCC2. ScCCC2 pumpt die Cu-Ionen in Postgolgivesikel. In diesen Vesikeln werden die Cu-Ionen als Cofaktor bei der Assemblierung der Multikupfer-Oxidase ScFET3 benötigt (Lin et al., 1997). Das *Arabidopsis* AtATX1 scheint eine ähnliche molekulare Funktion in der pflanzlichen Zelle auszuüben. AtATX1 komplementiert in Hefe die Deletion des Kupferchaperons ScATX1 (Puig et al., 2007b). Hefe-Zwei-Komponenten-Analysen zeigen, dass AtATX1 mit den Cu-transportierenden P_{1B} -Typ ATPasen AtHMA5 (Andres-Colas et al., 2006) und AtHMA7 (RAN1, Puig et al., 2007b) in Wechselwirkung treten kann. AtHMA7 (RAN1) transportiert Cu-Ionen in noch nicht genau identifizierte Vesikel des sekretorischen Systems. Diese Kupferionen sind für die korrekte Assemblierung des Ethylenrezeptors AtETR1 und dadurch auch dessen Funktion bei der Ethylenbindung und Signalweiterleitung von entscheidender Bedeutung. Binder et al., (2010) konnten mit Experimenten in Hefe nachweisen, dass die AtETR1-Ethylenbindung, sowohl von Kupferionen als auch von der Aktivität der Cu-transportierenden P_{1B} -Typ ATPase AtHMA7 (RAN1) abhängig ist. Ob AtATX1, neben AtHMA5 und AtHMA7 (RAN1) noch weitere Proteine mit Kupfer beliefert, muss noch geklärt werden.

Große Mengen an CCH Protein befinden sich in den Siebröhren des Phloem von seneszierenden *Arabidopsis* Blättern und Blattstielen. CCH scheint an der Remobilisierung und dem Ferntransport von Cu beteiligt zu sein (Mira et al., 2001). Ein deutlicher Unterschied zwischen CCH und anderen eukaryotischen Kupferchaperonen, wie ATX1 aus Hefe, ATOX1 aus Maus und HAH1 aus Mensch ist der 50 Aminosäuren umfassende C-Terminus des pflanzlichen Metallchaperons (Himmelblau et al., 1998). Aufgrund der zu sich selbst komplementären Struktur einiger geladener Aminosäurereste innerhalb dieses C-Terminus kann es bei neutralen und sauren pH-Werten zur Bildung von amyloidartigen Fibrillen kommen (Mira et al., 2004). Interessant ist, dass CCH ohne den C-terminalen Proteinteil in Hefe ähnlich wie AtATX1 mit den Cu-transportierenden P_{1B} -Typ ATPasen AtHMA5 (Andres-Colas et al., 2006) und AtHMA7 (RAN1, Puig et al., 2007b) interagieren kann. Welche physiologische Funktion eine solche Wechselwirkung inne haben könnte, ist vor allem in Anbetracht der Abhängigkeit dieser Interaktion vom Zustand des C-Terminus von CCH ohne weitere molekulare Zusammenhänge unverständlich.

Ein weiteres bereits näher untersuchtes pflanzliches Kupferchaperon ist AtCCS. AtCCS ist ortholog zum Kupferchaperon (ScCCS) der Cu/Zn Superoxiddismutase in Hefe und komplementiert dessen Funktion in entsprechenden Deletionsmutanten (Abdel-Ghany et al., 2005b). AtCCS besitzt ein N-terminales Transitpeptid, welches für den Import des Proteins in die Chloroplasten verantwortlich ist (Abdel-Ghany et al., 2005b; Chu et al., 2005). Untersuchungen an *atccs* Mutanten beweisen, wie enorm wichtig die Funktion von AtCCS als Kupferchaperon sowohl für die Stabilität, als auch für die Aktivität der pflanzlichen Cu/Zn Superoxiddismutasen CSD1, CSD2 und CSD3 ist. CSD1 und CSD2 kommen im Cytosol und in den Plastiden vor. Für die CSD3 wird eine peroxisomale Lokalisierung vermutet. Interessant ist, dass für die CSD2 Aktivität AtCCS im Plastiden essentiell zu sein scheint, während cytosolische AtCCS Proteine für die Aktivierung von CSD1 und CSD3 genügen (Chu et al., 2005). Die Cu-transportierenden P_{1B}-Typ ATPasen AtHMA5 und AtHMA7 (RAN1) werden wahrscheinlich wie bereits erwähnt von den Kupferchaperonen AtATX1 und CCH mit Cu-Ionen beliefert.

Die Kupferchaperone, welche sowohl die Mitochondrien, als auch die plastidären Cu-transportierenden P_{1B}-Typ ATPasen AtHMA6 (PAA1) und AtHMA8 (PAA2) mit Cu-Ionen versorgen, sind bislang unbekannt (Burkhead et al., 2009).

AtHMA6 (PAA1) ist bereits 1997, als cDNA Klon, der für eine Metall-transportierende P-Typ ATPase codiert, von Tabata et al., isoliert worden. Die große Ähnlichkeit zur Aminosäurezusammensetzung der Cu-transportierenden ATPase PacS aus Cyanobakterien gab damals bereits den Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zum Kupfertransport in die Plastiden. Dies konnte kurze Zeit später mit *paa1 Arabidopsis* Mutanten bestätigt werden. *paa1* Pflanzen zeichnen sich durch ein deutlich reduziertes Wachstum aus. Das Fehlen von PAA1 hat dramatische Auswirkungen auf die Photosynthese. Das maximale relative Elektronentransportlevel beträgt etwa 30% bezogen auf die volle Leistungsfähigkeit der entsprechenden Wildtypkontrollen. PAA1 besitzt ein prozessierbares plastidäres Transitpeptid. Während der Kupfergehalt in *paa1* Blättern nur geringfügig niedriger ist, sind in den entsprechenden Plastiden der *paa1* Pflanzen nur etwa die Hälfte und in den Thylakoiden etwa ein Viertel der normalen Kupfermengen nachweisbar. Der Gehalt an Plastocyanin, dem am photosynthetischen Elektronentransport beteiligten blauen Kupferprotein, ist in den *paa1* Mutanten deutlich verringert (Shikanai et al., 2003). Abdel-Ghany et al., (2005) konnten mit verschiedenen GFP-Fusionsproteinen zeigen, dass sich AtHMA6 (PAA1) an der Peripherie, wahrscheinlich in der inneren Plastidenhüllmembran, und AtHMA8 (PAA2) in der Thylakoidmembran befinden. Dass PAA2 für den Kupfertransport über die Thylakoidmembran verantwortlich ist, zeigt auch der mit Wildtyppflanzen vergleichbare plastidäre Kupfergehalt in *paa2* Mutanten. Die Kupfermengen in den Thylakoiden sind in *paa2* Pflanzen sehr gering. Sie liegen noch unter dem Kupfergehalt in *paa1* Mutanten. Ob PAA1 die Cu-Ionen nach dem Import in den Plastiden direkt an PAA2 übergibt oder Kupferchaperone hierfür benötigt werden, ist noch nicht geklärt. Die Tatsache, dass die phänotypischen Veränderungen der *paa1* und *paa2* Mutanten durch Gabe von größeren Kupfermengen zurückgedrängt werden können, spricht für die Existenz eines weiteren aber weniger effizienten Weges der Kupferaufnahme in die Plastiden (Burkhead et al., 2009). Die P_{1B}-Typ ATPase AtHMA1 scheint ebenfalls am plastidären Import von Kupfer- aber auch Zink-, und Mangan-Ionen beteiligt zu sein. AtHMA1 befindet sich in der Fraktion der plastidären Hüllmembranen. Analysen von 'gain of function' und 'loss of function' *Arabidopsis* Mutanten geben Hinweise auf eine mögliche Rolle bei der plastidären Zink- und Kupferhomöostase (Seigneurin-Berny et al., 2006). Welche Funktion AtHMA1 dabei spielt ist jedoch unklar, nicht zuletzt durch zum Teil konträre Daten in Bezug auf die Zink- und Kupfergehalte in den Plastiden einer weiteren *athma1* Mutante (Kim et al., 2009b). Die deutlich verringerte Aktivität der Cu/Zn Superoxiddismutasen in den Plastiden der *athma1* Pflanzen (Seigneurin-Berny et al., 2006) und die unter hohen Lichtintensitäten im Vergleich zu den Wildtypkontrollen klar veränderten Chlorophyllfluoreszenzparameter führen

zur Annahme, dass die Funktion von AtHMA1 einen bedeutenden Einfluss auf den Halliwell-Asada-Zyklus hat (Higuchi et al., 2009). Moreno et al., (2008) können im Hefesystem eine Aktivierung der ATPase-Aktivität von AtHMA1 durch Kupfer, Zink, Cadmium und Cobalt nachweisen. Zudem nehmen isolierte Membranvesikel von Hefezellen, die AtHMA1 heterolog exprimieren, ATP-abhängig mehr Ca^{2+} auf. Die Autoren vermuten deshalb, dass AtHMA1 als eine Art Multimetalltransporter fungiert.

In den Mitochondrien muss vor allem die Cytochrom C Oxidase mit Kupfer als Cofaktor versorgt werden. Es existieren zwei als *AtCOX17* bezeichnete Gene im *Arabidopsis* Genom, die für mitochondriale Kupferchaperone codieren (Wintz und Vulpe, 2002). Balandin und Castresana, (2002) konnten die Funktion von AtCOX17-1 als mitochondriales Kupferchaperon in Hefe bestätigen. Mit AtCOX19-1 ist ein weiteres Metallchaperone in *Arabidopsis* beschrieben, das in die Mitochondrien importiert wird und in Hefe die Deletion des ScCOX19 komplementiert (Attallah et al., 2007). In Hefe übernehmen ScCOX11 und ScSCO1 die Kupferionen von ScCOX17 und vermitteln als 'Co-Metallchaperone' bei der Assemblierung der Cytochrom C Oxidase Untereinheiten ScCOX1 und ScCOX2 (Carr und Winge, 2003). Orthologe Proteine konnten in *Arabidopsis* bisher noch nicht identifiziert werden.

Die vorgestellten Daten illustrieren, dass für die intrazelluläre Verteilung von Kupferionen ein effizientes genau steuerbares Transportsystem existiert. Im Gegensatz dazu konnten bisher noch keine Metallchaperone, die den gezielten intrazellulären Transport von Fe und Zn^{2+} bewerkstelligen, beschrieben werden. Es sind jedoch einige Transporter bekannt, die sowohl für die intrazelluläre Lagerung und Remobilisierung von Eisen-, Zink- und Mangan-Ionen als auch für die Entsorgung von Schwermetallen von großer Bedeutung zu sein scheinen.

Die P_{1B}-Typ Schwermetall-ATPase AtHMA3 pumpt sowohl Zn^{2+} , als auch Cd^{2+} , Pb^{2+} und Co^{2+} in die Vakuolen von *Arabidopsis* -Zellen. Eine künstlich verstärkte Expression von AtHMA3 führt zu einer erhöhten Schwermetalltoleranz (Morel et al., 2009). In der Zink und Cadmium-hyperakkumulierenden Pflanze *Arabidopsis halleri* wird das zum *Arabidopsis thaliana* orthologe Gen *AhHMA3* ca. 100fach stärker exprimiert (Becher et al., 2004; Talke et al., 2006). Welche Schwermetallchaperone die ATPase AtHMA3 mit Schwermetallen beliefern ist bislang unbekannt.

Des Weiteren besitzt *Arabidopsis thaliana* 11 Gene, die für Metalltransporter der CDF/MTP Familie ('Cation diffusion facilitator proteins'/'Metal tolerance protein') codieren (Maser et al., 2001; Delhaize et al., 2003). AtMTP3 sitzt in der Tonoplastenmembran und ist aktiv an der Schwermetallhomöostase beteiligt. In Hefe transportiert AtMTP3 Zink und Cobalt, aber weder Eisen, noch Mangan oder Cadmium. Die Expression von *AtMTP3* ist in den Wurzeln deutlich größer als im Spross. AtMTP3 sorgt vor allem bei einer Überversorgung mit Zink und unter Eisenmangelbedingungen für eine geringere Akkumulation von Zink im Spross. Die unter diesen Bedingungen größeren Mengen an aufgenommenen Zn^{2+} Ionen werden verstärkt in den Vakuolen der Wurzeln abgelagert (Arrivault et al., 2006).

AtMTP1 ist, wie Komplementationsanalysen in Hefe belegen, ebenfalls am Transport von Zn^{2+} -Ionen beteiligt. Der Transporter ist in der Tonoplastenmembran lokalisiert. Im Unterschied zu AtMTP3 wird AtMTP1 in Spross und Blättern gleich stark exprimiert. *AtMTP1* RNAi Mutanten akkumulieren weniger Zink im Spross und reagieren sensitiv auf eine Überversorgung mit Zn^{2+} -Ionen (Desbrosses-Fonrouge et al., 2005).

AtMTP11 ist an der Homöostase von Mangan beteiligt. In Hefe erhöht die Expression von *AtMTP11* die Toleranz gegenüber Mn-Ionen und in Anwesenheit von AtMTP11 und Mn-, aber nicht Zn^{2+} - oder Cd^{2+} -Ionen verringert sich der Protonengradient an isolierten Membranvesikeln schneller, als in entsprechenden Kontrollen. *atmtp11* Mutanten reagieren sensitiv auf eine Überversorgung mit Manganionen. AtMTP11 ist in prävakuolären Vesikeln lokalisiert (Delhaize et al., 2007).

Bereits im Jahr 2000 konnten Thomine et al., zeigen, dass pflanzliche NRAMP Transporter wie AtNRAMP3 und AtNRAMP4 aus *Arabidopsis* im Hefesystem Schwermetalle wie in die-

sem Fall Eisen transportieren. AtNRAMP3 ist in der Tonoplastenmembran lokalisiert. *atnramp3-1* Mutanten akkumulieren unter Eisenmangelbedingungen große Mengen an Mangan und Zink in den Wurzeln (Thomine et al., 2003). Wie wichtig AtNRAMP3 und AtNRAMP4 für die Remobilisierung von Eisen aus den Vakuolen während der Keimung sind, zeigen Keimungsexperimente von *atnramp3 atnramp4* Doppelmutanten. *atnramp3 atnramp4* Pflanzen reagieren mit einer starken Entwicklungsverzögerung bei Keimung unter Eisenmangelbedingungen. Die Zugabe großer Mengen Eisen hebt diesen Phänotyp auf (Lanquar et al., 2005). Neueste Analysen zeigen, dass AtNRAMP3 und AtNRAMP4 auch an der Remobilisierung von Mn-Ionen aus den Vakuolen beteiligt sind. *atnramp3 atnramp4* Doppelmutanten reagieren anfällig auf Manganmangelbedingungen. Chlorophyllfluoreszenzmessungen zeigen eine verringerte Aktivität der Photosysteme II in den *atnramp3 atnramp4* Pflanzen unter Manganmangel (Lanquar et al., 2010).

1.4.4. Regulation der Expression von Schwermetallhomöostase-Genen

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln erwähnt, existieren viele Komponenten, welche die pflanzliche Schwermetallhomöostase gewährleisten. Für viele dieser Komponenten sind Veränderungen der Genexpression bei einer entsprechend veränderten Schwermetallverfügbarkeit beschrieben. Dies führt zu der interessanten Frage nach den Faktoren, welche für die Regulation der Genexpression von Schwermetallhomöostase-Genen verantwortlich sind.

Das im Folgenden beschriebene Beispiel für eine Schwermetall-abhängige Regulation der Genexpression ist für die Kupferhomöostase von Bedeutung (für einen Überblick siehe Burkhead et al., 2009). Unter Kupfermangel sind sowohl die Gene der Cu/Zn Superoxiddismutasen *CSD1* und *CSD2*, als auch des dazugehörigen Kupferchaperons *AtCCS* deutlich schwächer exprimiert (Wintz et al., 2003). Das Transkriptlevel vom Plastocyanin-Gen bleibt auch bei geringer Kupferverfügbarkeit unverändert (Abdel-Ghany und Pilon, 2008). *CSD1* und *CSD2* werden posttranskriptionell durch die microRNA *miR398* reguliert (Sunkar et al., 2006; Yamasaki et al., 2007). *miR397*, *miR408* und *miR857* sind als Regulatoren für die Transkripte von Laccasen und Plantacyanin vorhergesagt. Sowohl *miR398* als auch *miR397*, *miR408* und *miR857* werden als 'Cu-Micro-RNAs' unter Kupfermangel sehr stark exprimiert (Yamasaki et al., 2007, Abdel-Ghany und Pilon, 2008). Aus diesen Daten kann die Hypothese abgeleitet werden, dass die Cu-Micro-RNAs unter Kupfermangel für den Abbau der Transkripte von weniger wichtigen Kupferproteinen sorgen, um die Kupferverfügbarkeit für essentielle Kupferproteine, wie das Plastocyanin, zu sichern (Burkhead et al., 2009).

Yamasaki et al., (2009) ist es gelungen mit dem Transkriptionsfaktor *SQL7* ('*SQUAMOSA* Promotor binding protein-like 7') einen wichtigen Regulator der Kupferhomöostase zu identifizieren. *SQL7* bindet an die GATC-Boxen im *miR398c* Promotor. Im Vergleich zu entsprechenden Wildtypkontrollen sind *sql7* Mutanten unter Kupfermangel nicht in der Lage, die Expression von *miR398b* und *miR398c* zu induzieren. Dadurch sind *sql7* Pflanzen nicht fähig, die *CSD1* und *CSD2* mRNA-Level bei Kupferdefizit herunterzufahren. *SQL7* ist neben der Induktion weiterer Cu-Micro-RNAs (*miR397*, *miR408* und *miR857*) auch für das Anschalten wichtiger Kupferhomöostase-Gene wie *COPT1*, *COPT2*, *ZIP2*, *ZIP4*, *FRO3* und *CCH* bei geringer Kupferverfügbarkeit verantwortlich (Yamasaki et al., 2009).

Dem zu *SQL7* orthologen Transkriptionsfaktor *CRR1* aus *Chlamydomonas* wird eine Funktion als Kupfersensor zugeschrieben. In entsprechenden Modellen sorgt eine direkte Bindung von Kupfer für die Inaktivierung von *CRR1*. In einem der vorgeschlagenen Modelle verhindert die Substituierung von Zn^{2+} mit Cu^{1+} in der SBP DNA-Bindedomäne eine Bindung an die entsprechenden cis-Elemente (Kropat et al., 2005).

SQL7 besitzt zwei spezielle Zn^{2+} Bindemotive, welche wahrscheinlich an der DNA-Bindung beteiligt sind (Yamasaki et al., 2004). Ob eine direkte Bindung von Cu^{1+} -Ionen an *SQL7* die

DNA-Bindung verhindert oder ein weiteres Sensorprotein für die Inaktivierung von *SQL7* bei normaler bis exzessiver Kupferverfügbarkeit verantwortlich ist, muss noch geklärt werden.

In den letzten Jahren konnten einige Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die an der Regulation von Genen mit Bedeutung für die Eisenhomöostase beteiligt sind. Colangelo und Guerinot, (2004) haben mit *AtFIT1* ('Fe-deficiency induced transcription factor 1') einen *Arabidopsis* bHLH ('basic Helix Loop Helix') Transkriptionsfaktor beschrieben, dessen Expression in Reaktion auf Eisendefizit induziert wird. *FIT1::FIT1-GUS* Promotor-Reportergenanalysen zeigen, dass *FIT1* sehr stark in äußeren Wurzelzellen exprimiert wird. *fit1* Mutanten akkumulieren weniger Eisen und zeigen eine deutlich schwächere Induktion der Expression einer großen Zahl von Eisenhomöostase-Genen, wie z.B. *FRO2*, *NRAMP1*, *ZIP9* und *NAS1*. Trotz vergleichbarer Transkriptmengen sind *fit1* Pflanzen nicht fähig, nennenswerte Proteinmengen des Eisentransporters *AtIRT1* zu bilden.

Mit *bHLH038*, *bHLH039*, *bHLH100* und *bHLH101* konnten mittlerweile weitere *Arabidopsis* Gene identifiziert werden, die für bHLH Transkriptionsfaktoren codieren und deren Expression bei Eisenmangel in Wurzeln und Blättern induziert wird. Interessant ist, dass *bHLH038*, *bHLH039*, *bHLH100* und *bHLH101* sowohl bei einer Überversorgung mit Eisen als auch bei Kupfer- und Zinkmangel reprimiert werden (Wang et al., 2007).

Yuan et al., (2008) gelang mit Experimenten in Hefe der Nachweis, dass *AtFIT1* (*bHLH29*) sowohl mit *bHLH38* als auch *bHLH39* interagieren kann. Transgene *Arabidopsis* Pflanzen, die *AtFIT1* und *bHLH38* oder *bHLH39* artifiziell verstärkt exprimieren, weisen konstitutiv höhere *FRO2* und *IRT1* mRNA-Level auf. Diese Mutanten akkumulieren signifikant höhere Eisenmengen im Spross sowohl unter Eisenmangel als auch bei normaler Eisenversorgung.

Der Transkriptionsfaktor *IDEF1* aus Reis, gehört zur ABI3/VP1 Transkriptionsfaktor-Familie, welche die für Pflanzen spezifische B3 DNA Bindedomäne besitzt. *IDEF1* bindet an *IDE1* cis-DNA-Elemente ('iron deficiency-responsive cis-acting element 1', Kobayashi et al., 2007). *IDE1* und *IDE2* sind wichtige cis-DNA-Elemente im Promotor des bei Eisenmangel induzierten *IDS1* Genes in Gerste. Sie sind für die typische Transkriptionsaktivierung bei Eisendefizit in Cortex, Endodermis und Perizykel der Wurzeln verantwortlich. *IDE1* Elemente kommen in den Promotoren einer ganzen Reihe von Eisenhomöostase-Genen vor (Kobayashi et al., 2003). In *35S::IDEF1* transgenen Reispflanzen werden der Eisentransporter *OsIRT1* und der bHLH Transkriptionsfaktor *OsIRO2* verstärkt exprimiert. Diese Mutanten reagieren toleranter auf eine geringe Verfügbarkeit von Fe-Ionen (Kobayashi et al., 2007).

Der NAC Transkriptionsfaktor *OsIDEF2* bindet an *IDE2* cis-DNA-Elemente. Sowohl *OsIDEF2* als auch *HvIDEF2* werden in Wurzeln und Blättern bei Eisenmangel und normaler Eisenversorgung auf etwa gleichem Level exprimiert. *OsIDEF2* RNAi und CRES-T ('Chimeric repressor gene-silencing technology') Mutanten sind unfähig, die sonst übliche Induktion des Fe⁺²-Nicotianamintransportergenes *OsYSL2* unter Eisenmangel zu bewerkstelligen. *IDEF2* bindet direkt an den Promotor des *OsYSL2* Genes (Ogo et al., 2008).

All diese Beispiele lassen die Komplexität der Regulation der Genexpression, welche für die Eisenhomöostase zuständig ist, erahnen. Einige wichtige Transkriptionsfaktoren konnten mittlerweile identifiziert werden. Unklar ist allerdings, wie die Signale 'viel Eisen' und 'wenig Eisen' perzipiert werden und die Aktivierung der entsprechenden Transkriptionsfaktoren erfolgt.

Vor kurzem konnten in *Arabidopsis* Regulatoren isoliert und charakterisiert werden, die eine wichtige Rolle für die Zinkhomöostase spielen. Die Transkriptionsfaktoren *AtbZIP19* und *AtbZIP23* sind in einem 'Yeast-one Hybrid Screening' am *AtZIP4* Promotor als Transkriptionsaktivatoren nachgewiesen worden. *AtZIP4* wird unter Zinkmangelbedingungen induziert und codiert für einen Schwermetalltransporter der ZRT/IRT Familie. *Arabidopsis* Mutanten, die kein *AtbZIP19* und/oder *AtbZIP23* synthetisieren können, akkumulieren deutlich weniger Zn²⁺ in den Wurzeln. *bzip19bzip23* Doppelmutanten reagieren sensitiv auf eine Unterversor

gung mit Zink-Ionen. In den *bzip19bzip23* Pflanzen sind vor allem die ZIP Transportergene von einer deutlich geringeren Expression unter Zinkdefizit betroffen. Einige weitere an der Zinkhomöostase beteiligte Faktoren, wie z.B. die Nicotianaminsynthasegene *NAS2* und *NAS4*, und Regulatoren, wie z.B. die Transkriptionsfaktoren *ANRI* und *RAP2.3*, zeigen ebenfalls eine veränderte Expression in den *bzip19bzip23* Doppelmutanten (Assuncao et al., 2010).

Nach weiteren Regulatoren, welche einen entscheidenden Einfluss auf die Genexpression bei Veränderungen der Zn^{2+} Verfügbarkeit haben, muss noch intensiver gesucht werden. Die Frage nach dem Sensor, der den zellulären Status an Zn^{2+} -Ionen misst, kann momentan allenfalls lückenhaft beantwortet werden. Baekgaard et al., (2010) vermuten, dass die C-terminale Domäne der Schwermetall-ATPase AtHMA4 eine Funktion als Zn^{2+} Sensor haben könnte. Über welche Wege und Komponenten die möglichen Signale 'viel' bzw. 'wenig' Zink dann weitergeleitet werden, ist unbekannt.

Interessant ist an dieser Stelle auch die bisher selten gestellte Frage nach dem Einfluss anderer abiotischer Faktoren wie Kälte, Frost und Trockenheit auf die pflanzliche Schwermetallhomöostase. Gibt es gemeinsame Knoten im regulatorischen Netzwerk, welches sowohl die pflanzliche Entwicklung als auch die Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen steuert?

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Materialien

2.1.1. Chemikalien, Lösungsmittel und Enzyme

Die für die experimentellen Arbeiten verwendeten Laborchemikalien und organischen Lösungsmittel sind, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich GmbH (Hamburg), Diagonal GmbH & Co KG (Münster), AppliChem GmbH (Darmstadt), Duchefa Biochemie B.V. (Haarlem, Niederlande), Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe) und Merck KGaA (Darmstadt) bezogen worden.

Enzyme und molekularbiologische 'Kits' sind von den Firmen Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, gehört zu Thermo Fisher Scientific), Invitrogen GmbH (Darmstadt), Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim), Qiagen GmbH (Hilden), Invitek GmbH (Berlin) und Promega (Madison, USA) bezogen worden. Radioaktiv markiertes L- ^{35}S -Methionin und [γ - ^{33}P]-ATP sind von der GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, Vertrieb jetzt über PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA)) bezogen worden.

2.1.2. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide sind von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) geliefert worden.

Primer für das Überprüfen der Allele in den Loci von <i>HIPP25</i> und <i>HIPP26</i> auf Transposon-Insertion	
ET7654 for	5'- AGA AGA ATC GAG ACG GCG ACT A - 3'
ET7654 rev	5'- AAA TCT AAC AGA TGG CTG TAT CA - 3'
GT.108178 for	5'- CAA AAT ATT CAT CAA TTC TGT A - 3'
GT.108178 ref	5'- CGT AAG GAA CGA AAG GAT ATA G - 3'
Ds5-1	5'- GAA ACG GTC GGG AAA CTA GCT CTA C - 3'
Ds3-2	5'- CGA TTA CCG TAT TTA TCC CGT TC - 3'

2.1. Verwendete Materialien

Primer für das Klonieren HvFP1, HvFP2, HvFP3 und smRS-GFP und die gerichtete Mutagenese von HvFP1	
HVFP1forB	5'- AGA GAA TTC ATG GGG ATC GTG GAC GTG GTG - 3'
HVFP1revB	5'- GGA TCC CAT GAC GGA GCA GGC GTT GGG GTT - 3'
HVFP1forCD	5'- AGA AGA TCT ATG GGG ATC GTG GAC GTG GTG - 3'
HVFP1revC	5'- AGA TCT ACA TGA CGG AGC CGG CGT TGG GGT TC - 3'
HVFP1revD	5'- GCG GAT CCC TAC ATG ACG GAG CAG GCG TTG - 3'
HVFP2+3 for	5'- ATG GGC GTC TTG GAT CAC CTC TCC GAT TTG - 3'
HVFP2 rev	5'- AAC TCA TAG TGA TAA TTT AGC CTT TAC CTG - 3'
HVFP3 rev	5'- TTT CGC TCT TTG TAT ATT CGC TGT TCG CAC - 3'
GFP for	5'- GAG AGG ATC CAT GAG TAA AGG AGA AGA AC - 3'
GFP rev01	5'- GAG AGC TCT TAT TTG TAT AGT TCA TCC ATG - 3'
GFP rev02	5'- CTG GAG CTC AGA TCT GTA TAG TTC ATC CAT - 3'

Primer für das Klonieren der vollständigen codierenden Bereiche weiterer HIPPs	
HIPP20 for	5'- GAA TTC ATG GGA GCT CTT GAT TCT CTT TCC G - 3'
HIPP20 rev	5'- GGA TCC TTA CAT AAC GGT GCA AGC GTT GG - 3'
HIPP21 for	5'- GAA TTC ATG GGT GCA TTT GAT TAT ATC TC - 3'
HIPP21 rev	5'- GGA TCC TCA CAT GAT GGA ACA AGC GGC GTG - 3'
HIPP22 for	5'- GAA TTC ATG GGA GCT CTC AAT TAT CTT TCT G - 3'
HIPP22 rev	5'- GGA TCC TCA CAT AAC GGT GCA GGC GTT AGG - 3'
HIPP23 for	5'- GAA TTC ATG GGA GTT GGG GGA ACG TTG GA - 3'
HIPP23 rev	5'- GGA TCC CTA CAT AAT AGA GCA AGC ATT AGG AT - 3'
HIPP24 for	5'- GAA TTC ATG GGA GTG GAA GGA ACG ATG GA - 3'
HIPP24 rev	5'- GGA TCC CTA CAT GAT AGC GCA AGA ATT AGG GTT C - 3'
HIPP25 for	5'- GAA TTC ATG GGT GTT CTT GAT CAC GTC TC - 3'
HIPP25 for 02	5'- AGA TCT ATG GGT GTT CTT GAT CAC GTC TC - 3'
HIPP25 rev	5'- GGA TCC TCA CAT AAC AAC ACA AGC GGA GGC GT - 3'
HIPP27 for	5'- GAA TTC ATG GGC TTC CGA GAC ATT TGT TAC - 3'
HIPP27 for 02	5'- AGA TCT ATG GGC TTC CGA GAC ATT TGT TAC - 3'
HIPP27 rev	5'- GGA TCC TCA CAT GAT GGT ACA AGC GTT GG - 3'
HIPP30 for	5'- GAA TTC ATG CCA ATG GCT CGT CCA CTT TCT - 3'
HIPP30 rev	5'- GGA TCC TTA CAT AAG GCT ACA TGC GTG GAC - 3'
HIPP31 for	5'- GAA TTC ATG TCT ATG ACA GTG GAG ATA AG - 3'
HIPP31 rev	5'- AGA TCT CTA CAT AAT AGT ACA AGC ATG GGG AT - 3'
CCH-like for	5'- GAA TTC ATG GGT GAT CTT CAA ATC GTG CCG - 3'
CCH-like rev	5'- GGA TCC TCA AAA GGA AAG GGA TCT AGT GAA G - 3'

Primer für Kolonie-PCR und Sequenzierungen	
pUC/M13 for	5'- CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC - 3'
pUC/M13 rev	5'- TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C - 3'
pKEx4tr for	5'- GGG ACT CTA GAT AAT ACG ACT C - 3'
pKEx4tr rev	5'- TTT ATT GCC AAA TGT TTG AAC G - 3'
pGEM-T for (NewT7)	5'- GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C - 3'
pGEM-T rev (SP6)	5'- AGC TAT TTA GGT GAC ACT ATA G - 3'
pGBKT7 for	5'- GGA ATT TGT AAT ACG ACT CAC TAT - 3'
pGBKT7 rev	5'- TAA GAG TCA CTT TAA AAT TTG TAT - 3'
pAD-Gal4-2.1for	5'- CTA TTC GAT GAT GAA GAT ACC - 3'
pAD-Gal4-2.1rev	5'- GAA ATT GAG ATG GTG CAC GAT G - 3'
pGEX-2TKmod for	5'- GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG - 3'
pGEX-2TKmod rev	5'- CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG - 3'
HVSMEg0015J14 for 01	5'- ATG GGG ATC GTG GAC GTG - 3'
HVSMEg0015J14 for 02	5'- ACG TGG CGC ACC CCT AC - 3'
HVSMEg0015J14 for 03	5'- CCC GGC CAC CGG CAA CCT TTT C - 3'

2.1. Verwendete Materialien

Primer für das Klonieren des <i>HIPP26</i> Promotor (Fragmente: A = 1055bp, B = 620bp und C = 320bp)	
HIPP26Pro A for	5'- GAT CTA GAG CCG CTT CAA CAC TGA AAA TTT GCA TAT - 3'
HIPP26Pro B for	5'- GAT CTA GAC TTT GCG AGT CAT CAT CGA TTA TCC A - 3'
HIPP26Pro C for	5'- GAT CTA GAA ACT AGA AAT TAG GAA ACC GTT AGC A - 3'
HIPP26Pro ABC rev	5'- GAC CCG GGT TCT TCT TCT TTT TAT TCC AGA AAA GG - 3'

Primer für das Klonieren und die gerichtete Mutagenese von <i>HIPP26</i> (At4g38580)	
HIPP26cDNAfor	5'- GTT CTT AAC TCT CCT GGG TTC TTC AG - 3'
HIPP26cDNArev	5'- CCA TAA CAA ATT GAA ACA GTA GTA GTC - 3'
HIPP26forAB	5'- GGA TCC ATG GGT GTT CTT GAT CAT GTC TC - 3'
HIPP26revA	5'- AGA TCT ACT AGT TCA CAT GAC CAC ACA AGC CGC CGG GTT C - 3'
HIPP26revB	5'- AGA TCT ACT AGT TCA CAT GAC CAC ACC AGC CGC CGG GTT C - 3'
HIPP26forCDEF	5'- GAA TTC ATG GGT GTT CTT GAT CAT GTC TC - 3'
HIPP26forF	5'- GGA CGG CGA AGG TGG CGA GCG GAA AGT GCG GCG TTC TGT C - 3'
HIPP26revC	5'- CTC GAG GGA TCC TCA CAT GAC CAC ACA AGC CGC CGG GTT C - 3'
HIPP26revD	5'- CTC GAG GGA TCC TCA CAT GAC CAC ACC AGC CGC CGG GTT C - 3'
HIPP26revE	5'- CTC GAG GGA TCC TCA TGC AGT GGT GTA GCG GAC CTC GGT G - 3'
HIPP26revF	5'- CGC CAC CTT CGC CGT CCA TTT TCA CTT TAA TCT CCA CCG TC - 3'

Primer für das Klonieren der vollständigen codierenden Bereiche weiterer <i>ATHBs</i>	
ATHB21 for	5'- GAA TTC ATG GAG ATT GCA AGT CAA GAA GAT C - 3'
ATHB21 rev	5'- AGA TCT CTA AGG ATT AGT AGA AGC AAG AT - 3'
ATHB22 for	5'- CAA TTG ATG AAT TTT GAG GAT CAA GAA GAA GAT AT - 3'
ATHB22 rev	5'- GGA TCC TTA GGG TTT CTT ACC AAG AGA GTT CTT GT - 3'
ATHB23 for	5'- CAA TTG ATG ATG GAT ATG ACT CCT ACA ATA AC - 3'
ATHB23 rev	5'- AGA TCT TCA CGA CGA CGA TGA TCC GTT AAC G - 3'
ATHB24 for	5'- GAA TTC ATG GAA GTT AGA GAG AAG AAA GAT G - 3'
ATHB24 rev	5'- AGA TCT TTA CAA ATC CTT CTT CTT TGC TGC - 3'
ATHB25 for	5'- CAA TTG ATG GAG TTT GAA GAC AAC AAC AAC A - 3'
ATHB25 rev	5'- GGA TCC TCA TGG TTG GTC TTG TTC ATG ATG - 3'
ATHB27 for	5'- CAA TTG ATG GAT GAG ATA AAA CCA AAG AAA G - 3'
ATHB27 rev	5'- AGA TCT TCA TTC ATC AAT TAT AAT TTT ATC C - 3'
ATHB28 for	5'- GAA TTC ATG GAG CTT GGA GGA AAA TGC AAT G - 3'
ATHB28 rev	5'- AGA TCT CTA TTC ACT AAT GTT ACT ATT GTT TC - 3'
ATHB30 for	5'- GAA TTC ATG GAT GTA ATA GCT ACT ACA ACT - 3'
ATHB30 rev	5'- AGA TCT TCA CGT CGA AGA AAA CGA CCC ATT TG - 3'
ATHB31 for	5'- GAA TTC ATG GAA ATT GCA AGT CAA GAA GAT C - 3'
ATHB31 rev	5'- GGA TCC TCA TGG GAC GAT CTT AGT CAT GTC - 3'
ATHB32 for	5'- GAA TTC ATG CAG AGT ACT TGT GTC TAC AG - 3'
ATHB32 rev	5'- GGA TCC TTA GTG ATA AAA CTT TTT ATT ATT G - 3'
ATHB33 for	5'- GAA TTC ATG GAT ATG AGA AGC CAT GAA ATG - 3'
ATHB33 rev	5'- GGA TCC TTA GAG AGT AGT TGT TGG TGT TGG - 3'
ATHB34 for	5'- CAA TTG ATG CTT GAA GTT AGA TCA ATG GAT - 3'
ATHB34 rev	5'- AGA TCT TCA CGA CGA AGA CGA CGA GGC GT - 3'

Primer für das Klonieren von <i>ATHB29</i> (At1g69600)	
ATHB29for	5'- ATG GAT TTG TCT TCC AAA CCA C - 3'
ATHB29rev	5'- TCA AGA AGA TGA AGA CCC ATC AC - 3'
ATHB29for 02	5'- GAA TTC ATG GAT TTG TCT TCC AAA CCA C - 3'
ATHB29rev 02	5'- GGA TCC TCA AGA AGA TGA AGA CCC ATC AC - 3'

2.1. Verwendete Materialien

Primer für die qRT-PCR Analysen	
CCH-like (At4g27590) for	5'- ACA TAG TTA AAG TAT AAT GGG TGA TC - 3'
CCH-like (At4g27590) rev	5'- GCA CCA TCA TTT CTA CGT ACT GT - 3'
HIPP31 (At3g48970) for	5'- CTT CCA CAC TCC CGC GGA TTA CT - 3'
HIPP31 (At3g48970) rev	5'- CAA ATT TGG ACG AAG AAG ATG AAC TG - 3'
HIPP30 (At2g18196) for	5'- GCC ACCTCA ACC ATT ACC ACA C - 3'
HIPP30 (At2g18196) rev	5'- TAC CCA ACC ACC GTT ACT CTC TC - 3'
HIPP29 (At1g29100) for	5'- CAG GTA GTG GAA ATG GAA GTG C - 3'
HIPP29 (At1g29100) rev	5'- TAC TCT CTG CTG TTT TAT GTC TAT CTG A - 3'
HIPP28 (At1g06330) for	5'- AGC TTT TAT TGT TCA TGA ACC TAA C - 3'
HIPP28 (At1g06330) rev	5'- CCA TGT CGA TTT CAA CTG CAT C - 3'
HIPP27 (At5g66110) for	5'- CTC GCC GAC CCT CTA GTG GC - 3'
HIPP27 (At5g66110) rev	5'- TAT GAA TTG ATC ACA TGA TGG TAC AAG - 3'
HIPP26 (At4g38580) for	5'- CGG TGT CTA CGA CAA GAA GGC A - 3'
HIPP26 (At4g38580) rev	5'- CCA TAA CAA ATT GAA ACA GTA GTA GTC - 3'
HIPP25 (At4g35060) for	5'- TAT ATC TCA ACA TAT AGA GTC TAA CT - 3'
HIPP25 (At4g35060) rev	5'- CAT TTT TCT TGT TTC TTG GTT TCT TC - 3'
HIPP24 (At4g08570) for	5'- AAC TGC AAA GAG AAG TGG TGT GAG TGA - 3'
HIPP24 (At4g08570) rev	5'- GCT ACT GTT TGC ATT TGC TTC TT - 3'
HIPP23 (At4g39700) for	5'- GAT AAA ATC AAC AAG ATG GGA GTT GG - 3'
HIPP23 (At4g39700) rev	5'- CTT CCC CGT CGC TTT AGC CTT C - 3'
HIPP22 (At1g22990) for	5'- CGC CGG GTT TTG TGA GGA AG - 3'
HIPP22 (At1g22990) rev	5'- TTA TAA CAT CGG CTC ATG CTA TCT ATA C - 3'
HIPP21 (At5g17450) for	5'- CCA TCA TGT GAG CCA ACC AAC CA - 3'
HIPP21 (At5g17450) rev	5'- TTA TTA CAA AGT TCC TAC ATT ACC T - 3'
HIPP20 (At1g71050) for	5'- CCT CGG CAT AAC ACT TGT CCA T - 3'
HIPP20 (At1g71050) rev	5'- TCC CAT GTC TAT TAC TCT CAC CAA G - 3'
At1g13320 for	5'- TAA CGT GGC CAA AAT GAT GC - 3'
At1g13320 rev	5'- GTT CTC CAC AAC CGC TTG GT - 3'
At3g53090 for	5'- GGC TTT GAA CCG AGT GAA CG - 3'
At3g53090 rev	5'- CCA AAG AGA GGT ATC ACA AGA GAC T - 3'
At4g26410 for	5'- GAG CTG AAG TGG CTT CCA TGA C - 3'
At4g26410 rev	5'- GGT CCG ACA TAC CCA TGA TCC - 3'
At4g37990 for	5'- TGG CCG GGA AAC ACA ACA TCA CT - 3'
At4g37990 rev	5'- GCG GTA CCT AAC GTC GGC TTT CTC - 3'
At4g37370 for	5'- AGC TAA GGA GAA AGG AAA CAC TAT - 3'
At4g37370 rev	5'- GCC CAT TCT AAC GTA ACC GCT GAT - 3'
At3g60140 for	5'- GCT TTC TAA GCC CTA AAA TCG TA - 3'
At3g60140 rev	5'- GAT CAT AAC CCG CAA CAG TCA - 3'
At1g56430 for	5'- GCT TCG GAT CTC GCG TGT AAC T - 3'
At1g56430 rev	5'- GAA CAC AGC ATT TTT CTA GGT AAG - 3'
At3g56970 for	5'- GCA TTA GTC CCT TCA TTT TTC ACA - 3'
At3g56970 rev	5'- GAT GAG TCA CTT CAT AAG TCT G - 3'
At5g15970 for	5'- GAA CAA GTA GCG ATC CGA GTC A - 3'
At5g15970 rev	5'- ACA TCT AAA GGG AGA AGA AAC AT - 3'
At5g52310 for	5'- TGA TCG ATG CAC CAG GCG TAA C - 3'
At5g52310 rev	5'- CGG AAG ACA CGA CAG GAA ACA C - 3'
At18SrRNA for	5'- GCA TTT GCC AAG GAT GTT TTC - 3'
At18SrRNA rev	5'- GCG GAG TCC TAT AAG CAA C - 3'

2.1.3. Mikroorganismen

Zum Klonieren von Plasmid-DNA sind die im Folgenden aufgelisteten *Escherichia coli* Stämme verwendet worden. Für die Expression von pflanzlichen Proteinen in *Escherichia coli* ist der Stamm Rosetta(DE3)pLysS verwendet worden.

Stamm	Genotyp (Bezugsquelle)
XL1-Blue MRF ⁺	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F^+ proAB lac^{\Delta}Z\Delta M15 Tn10 (Tet^r)]$ (Stratagene)
DH5 α	$F^+ \phi 80 lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk^-, mk^+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 \lambda^+$ (Invitrogen)
GM2163	$F^+, araC14, leuB6(Am), fhuA13, lacY1, tsx-78, glnV44(AS), galK2(Oc), galT22, \lambda^-, mcrA0, dcm-6, hisG4(Oc), rfbC1, rpsL136(strR), dam-13::Tn9, xylA5, mtl-1, thi-1, mcrB9999, hsdR2$
XLORL	$\Delta(mcrA)183, \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F^+ proAB lac^{\Delta}Z\Delta M15 Tn10 (Tet^r)] Su^+$ (nonsuppressing) λ^R (lambda resistant) (Stratagene)
Rosetta(DE3)pLysS	$F^+ ompT hsdS_{B}(r_B^- m_B^-) gal dcm lacY1 (DE3) pLysSRARE^2 (Cm^R)$ (Novagen [®] , Merck KGaA)

Für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* ist der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 pMP90 (Koncz und Schell, 1986) verwendet worden.

Für die Hefe-Zwei-Komponenten Analysen sind die nachfolgend aufgelisteten Hefestämme verwendet worden.

Stamm	Genotyp (Bezugsquelle)
AH109	$MAT\alpha, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4\Delta, gal80\Delta, MEL1, LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ$ (Clontech Laboratories, Inc.)
Y187	$MAT\alpha, ura3-52, his3-200, ade2-101, MEL1, trp1-901, leu2-3, 112, gal4\Delta, gal80\Delta, met^-, URA3 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ$ (Clontech Laboratories, Inc.)

2.1.4. Gentechnische Vektoren

Die für diese Arbeit verwendeten Vektoren sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Vektor	Besondere Merkmale	Verwendung/Referenz
pGEM [®] -T	Amp ^r , MCS in <i>lacZ</i> , T7- und SP6- Promotor	T/A Klonieren von PCR Produkten, die 3'-A Überhänge haben (Promega)
pKEx4tr-GUS	Amp ^r , MCS, <i>uidA</i>	Vektor für transiente Expression eines <i>GUS</i> -Fusionsproteins unter Kontrolle des <i>CaMV</i> -35S Promotors (Van Den Ackerveken et al. 1996)
psmRSGFP	Amp ^r , smRS-GFP	beinhaltet das Gen <i>smRS-GFP</i> (ABRC Stock Center, Stock Nr.: CD3-327, Davis and Vierstra, 1998)
pKEx-GFP01-1	Amp ^r , smRS-GFP mit UAA Translationsstopcodon	Vektor für transiente Expression von Proteinen mit C-terminaler GFP-Fusion unter Kontrolle eines modifizierten <i>CaMV</i> -35S Promotors (diese Arbeit, Barth et al. 2004)

2.1. Verwendete Materialien

pKEx-GFP02-4	Amp ^r , smRS-GFP mit BglII 'Site in frame' statt Translationsstopcodon	Vektor für transiente Expression von Proteinen mit N-terminaler GFP-Fusion unter Kontrolle eines modifizierten CaMV-35S Promotors (diese Arbeit, Barth et al. 2004)
pGPTV-Kan	T-DNA-Border-Sequenzen, MCS, uidA, Kan ^r	Binärer Vektor zur stabilen <i>Agrobacterium</i> -vermittelten Transformation von Pflanzen für Promotor-GUS Reporteranalysen (Becker et al. 1992)
pGBKT7	ColE1 Origin und 2 μ Origin, Kan ^r , P _{ADH1(30-736bp)} ::GAL4 BD, TRP1	Binärer Vektor zur Expression von Proteinfusionen mit der Gal4-DNA Bindedomäne für Hefe-Zwei-Komponenten Analysen (Clontech Laboratories, Inc.)
pGBKT7-Lam	ColE1 Origin und 2 μ Origin, Kan ^r , P _{ADH1(30-736bp)} ::GAL4 BD::hLamC, TRP1	Binärer Vektor zur Expression von Gal4-BD-hLamin C als negative Kontrolle für Hefe-Zwei-Komponenten Analysen (Clontech Laboratories, Inc.)
pAD-GAL4-2.1	ColE1 Origin und 2 μ Origin, Amp ^r , P _{ADH1(4-408bp)} ::GAL4 AD::Arabidopsis cDNA Bibliothek, LEU2	<i>Arabidopsis thaliana</i> cDNA Bibliothek CD4-30 konstruiert von Fan et al. (1997) für Hefe-Zwei-Komponenten Analysen (ABRC DNA Stock Center, USA)
pGAD-C1	ColE1 Origin und 2 μ Origin, Amp ^r , P _{ADH1(4-408bp)} ::GAL4 BD, LEU2	Binärer Vektor zur Expression von Proteinfusionen mit der Gal4-Aktivierungsdomäne für Hefe-Zwei-Komponenten Analysen (James et al. 1996)
pGEX-2TKmod	Amp ^r , lacI ^r , P _{lac} ::GST::MCS	Vektor für induzierbare Expression von Proteinen mit N-terminalem Gluthathion-S-Transferase-Tag in <i>E. coli</i> (GE Healthcare Europe GmbH)
pGEM-HIPP26	Amp ^r , HIPP26 cDNA	Vektor mit vollständiger codierender cDNA Sequenz von HIPP26, welche mittels OneStep-RT PCR Kit (Qiagen) und den Primern HIPP26cDNAfor und HIPP26cDNArev amplifiziert worden ist (diese Arbeit, Barth et al. 2009)

2.1.5. Pflanzenmaterial

Die Anzucht der Wintergerste (*Hordeum vulgare* L. cv. Trixi) ist, soweit nicht anders vermerkt, unter standardisierten Bedingungen in Klimaschränken (KBWF720, Binder Labor-technik GmbH, Tuttlingen) mit 50-65% relativer Luftfeuchte, einer Lichtphase von 16h bei 21°C und einer Lichtintensität von 100 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ sowie einer Dunkelphase von 8h bei 16°C durchgeführt worden. Für die Analysen der Expression in unterschiedlichen Pflanzenteilen (Ernte: 18 Tage nach Aussaat) und der Altersabhängigkeit (Ernte: 9, 21, 35, 38 Tage nach Aussaat) im Verlauf der Primärblattentwicklung erfolgte die Anzucht von je 10 Pflanzen in Mitscherlichgefäßen auf Erde mit 4g Dünger pro Topf (Osmocote[®] Exact[®] Standard 3-4M, Scotts Cetaflor GmbH, Mainz). Kältestress ist bei unterschiedlichen Lichtintensitäten (100 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ und 600 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) in einem VB0714 Klimaschrank mit zusätzlichem Tieftemperaturmodul (Vötsch Industrietechnik GmbH, Balingen-Frommern) durchgeführt worden. Die Primärblätter von 7 Tage alten Keimlingen, die unter Dauerlicht (100 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) oder im Dunkel etioliert bei 21°C auf Vermiculit (Korngröße 3-8mm, Deutsche Vermiculit Dämmstoff GmbH, Sprockhövel) angezogen wurden, sind als Ausgangsmaterial für die Expressionsanalysen bei kombiniertem Kälte- und Lichtstress sowie für die Untersuchungen zur ABA-, Licht- und Temperaturabhängigkeit verwendet worden. Für die Behandlung mit 50 μM ABA (Duchefa Biochemie B.V.) sind die Primärblätter abgeschnitten und schwimmend auf den entsprechenden Lösungen inkubiert worden. Trockenstress ist mit 7 Tage alten hydroponischen angezogenen Gerstenkeimlingen durch das Entfernen des Murashige and Skoog Flüssigmedium (Duchefa Biochemie B.V.) durchgeführt worden. Für die Behandlung mit 1mM CuCl₂ und CdCl₂ sind 10 Tage alte Gerstenkeimlinge hydroponisch in Leitungswasser angezogen und für 48h in den entsprechenden Schwermetalllösungen inkubiert worden. Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. erfolgte, soweit nicht anders vermerkt, unter standardisierten Bedingungen in klimatisierten Räumen mit einer Tagestemperatur von 23°C, einer Nachttemperatur von 18°C, 45-55% relativer Luftfeuchte und einer Lichtintensität von 80-100 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Neben den Ökotypen Columbia Col-0 (N1093) und Landsberg erecta

Ler-0 (NASC Code: NW20) sind die 'enhancer trap' und 'gene trap' Transposon-Insertionslinien ET7654 (Cold Spring Harbor Laboratory, USA, Genbank Accession: AY200075 und AY200076, Genlocus: At4g38580, *HIPP26*) und GT.108178 (NASC Code: N170130, Genbank Accession: CR382262, Genlocus: At4g35060, *HIPP25*) verwendet worden. Um den Einfluss von Mutationen in anderen Loci so gering wie möglich zu halten, sind homozygote Nachkommen (F3 bis F5 Generation, Überprüfung der Allele mittels PCR) sowohl aus der Kreuzung der Linien Ler-0 x ET7654 (Kapitel 3.2.2.5.5.) als auch aus der Kreuzung von ET7654 x GT.108178 (Kapitel 3.2.2.5. bis 3.2.2.5.4.) verwendet worden.

Für die Kältestressexperimente sind die Pflanzen 8 Wochen im Tag-Nacht-Rhythmus mit einer 12h Lichtphase und einer 12h Dunkelphase (Ökotyp Col-0, Kapitel 3.2.2.2.) bzw. 6 Wochen 10h Tag/14h Nacht (Kapitel 3.2.2.5.1.) auf Erde (Einheitserde classic ED73, Gebr. Patzer GmbH & Co. KG, Sinntal-Jossa) angezogen worden. Für die Expressionsanalysen zu den unterschiedlichen Stresszeitpunkten ist die vollständige Rosette geerntet worden. Für die Chlorophyllfluoreszenzmessungen sind die Blätter 9 bis 10 von jeweils 4 unterschiedlichen Pflanzen der jeweiligen Linie pro Messzeitpunkt untersucht worden. Die Col-0 Pflanzen für die Analysen der Genexpression in seneszenten Blättern sind ebenfalls auf Erde unter Langtagbedingungen (16h Tag/8h Nacht) angezogen worden. Anschließend sind von 9 Tage ('ausgewachsen') und 38 Tage ('seneszent') alten Pflanzen die Rosettenblätter 5 bis 8 geerntet worden. Die Col-0 Pflanzen für die Expressionsanalysen bei Behandlung mit ABA-, 250mM NaCl, 50µM CuCl₂ und Trockenstress sind 8 Wochen im 12h Tag/ 12h Nacht-Rhythmus hydroponisch in 0,1fach 'Hoagland's No.2 basal salt mixture' Medium (#H2395, Sigma-Aldrich) angezogen, für die angegebenen Zeiträume entsprechend behandelt und die vollständige Rosette zur Isolierung von RNA geerntet worden.

2.2. Molekulargenetische Methoden

2.2.1. cDNA AFLP

Die verwendete cDNA-AFLP Methode wird auch als 'Restriction fragment differential display-PCR' bezeichnet. Es wurde das DisplayPROFILE™ Kit, welches in Deutschland von der Firma Q·BIOgene (Heidelberg) vertrieben wird, verwendet und streng nach der Anleitung des Herstellers gearbeitet. Aus den Gesamt-RNA Lösungen der entsprechenden Proben sind zunächst die mRNA's mit dem PolyATtract® mRNA Isolation System (Promega) isoliert worden. Danach erfolgte die Herstellung doppelsträngiger cDNA, deren Verdau mit *TaqI*, die Ligation der DisplayPROFILE™ Adapter und die PCR unter Verwendung der DisplayPROFILE™ Primer (0-extension Primer, und die selektiven Primer Eu-1, Eu-9 und Eu16). Der 0-extension Primer ist vor den PCR-Reaktionen mittels [γ^{33} P]-ATP und T4 Polynukleotidkinase radioaktiv markiert worden. Die Trennung der amplifizierten cDNA-Fragmente erfolgte auf 8% Harnstoff-Polyacrylamid-Fertigsequenziergelen (CastAway Precast Sequencing System; Stratagene, La Jolla, CA, USA). Nach dem Trocknen der Gele wurden Kodak Biomax MR-Filme (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) für die autoradiographische Analyse verwendet. Interessante Fragmente sind anschließend aus dem Gel eluiert, per PCR reamplifiziert, in *E.coli* kloniert und sequenziert worden.

2.2.2. Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die Vervielfältigung von DNA und cDNA Abschnitten erfolgte mittels PCR, unter Verwendung unterschiedlicher *Taq*- und *Pfu*-DNA Polymerasen. Es sind hauptsächlich das OneStep RT-PCR Kit, die HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen), *Taq* DNA Polymerase (Roboklon GmbH, Berlin) und *Pfu* DNA Polymerase (Fermentas/Thermo Fisher Scientific) mit den jeweils mitgelieferten Puffern verwendet worden. Je nach Primerkombination und Ausgangs-

DNA lagen die optimalen Mg^{2+} Konzentrationen im Bereich von 1,5mM bis 2,5mM, die Primerkonzentrationen zwischen 0,1 μ M bis 0,8 μ M, die dNTP Konzentrationen zwischen 50 μ M und 200 μ M, die DNA Polymeraseaktivität pro Reaktion bei 0,1U bis 2,5U und die Zyklenzahl bei 25 bis 35. Für einige Primerkombinationen war es erforderlich eine sogenannte 'Touch-down' PCR durchzuführen. Dabei wird im ersten Zyklus eine 5-10°C höhere Primerhybridisierungstemperatur gewählt, als für die verwendeten Primer berechnet. Dann wird diese Hybridisierungstemperatur im weiteren Verlauf der PCR um 0,5°C bis 1°C pro Zyklus abgesenkt bis die berechnete Temperatur erreicht ist. Die abschließenden Zyklen werden mit dieser Hybridisierungstemperatur durchgeführt.

2.2.3. Klonierung von DNA-Fragmenten und Transformation in *Escherichia coli*

Die zu klonierenden DNA-Fragmente sind mittels TAE-Agarose Gelelektrophorese nach ihrer Molekülgröße getrennt und anschließend mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel isoliert worden. Die mit *Taq* DNA Polymerase erzeugten PCR-Produkte sind unter Verwendung des pGEM-T[®] Vector Systems I (Promega) in den entsprechenden *E. coli* Vektor ligiert worden. Alle anderen DNA-Fragmente sind ebenso wie die entsprechend verwendeten Vektoren mit geeigneten Restriktionsendonukleasen für die Ligation vorbereitet worden. Bei ungerichteten Ligationen, ist der linearisierte Vektor vor der Gelaufreinigung mit alkalischer Phosphatase (CIAP, Fermentas/Thermo Fisher Scientific) dephosphoryliert worden. Die Ligationen sind mit 200ng linearisiertem Vektor, DNA-Fragment im Verhältnis 5:1 Fragment:Vektor und 1U T4 DNA Ligase (Fermentas/Thermo Fisher Scientific) und geeignetem Puffer für 3h bei 18°C oder über Nacht bei 14°C durchgeführt worden. Nach einer Hitzeinaktivierung von 10min bei 65°C sind die Ligationsansätze komplett in chemisch kompetente *E.coli* Zellen transformiert worden. Für die Herstellung der kompetenten *E.coli* Stämme wird eine 100ml Hauptkultur in LB-Flüssigmedium bis zu einer optischen Dichte bei 600nm von 0,8 bei 37°C und 180Umin⁻¹ im Thermoschüttler inkubiert. Nach dem vollständigen Pelletieren bei 4000xg und 4°C für 5min werden die Zellen in 40ml sterilem eiskaltem Puffer (30mM Kaliumacetat, 100mM RbCl, 10mM CaCl₂, 50mM MnCl, 15% (v/v) Glycerin, pH 5.8 mit Essigsäure einstellen) resuspendiert, erneut pelletiert, das Pellet in 4ml sterilem eiskaltem Puffer (10mM MOPS, 10mM RbCl, 75mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin, pH auf 6.5 mit KOH einstellen) resuspendiert, á 150 μ l auf Eis aliquotiert, in flüssigem Stickstoffschockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Nachdem der jeweilige Ligationsansatz direkt auf die gefrorenen kompetenten Zellen gegeben wurde, werden diese für 20min auf Eis inkubiert. Dann erfolgt der Hitzeschock für 1min bei 41°C. Danach werden die Zellen sofort für 2min auf Eis gekühlt, 850 μ l LB-Flüssigmedium zugesetzt, für 1h bei 37°C und 180Umin⁻¹ inkubiert, anschließend auf Platten mit geeignetem LB-Selektivmedium ausplattiert und 16h bei 37°C inkubiert. Die positiven Kolonien können per Kolonie-PCR auf die Anwesenheit der entsprechenden DNA-Fragmente überprüft werden.

2.2.4. Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolation der Plasmide aus *E. coli* sind die Kit's QIAprep Spin Miniprep Kit (bis 10 μ g Plasmid-DNA, Qiagen), QIAGEN Plasmid Midi Kit (bis 100 μ g Plasmid-DNA, Qiagen) und Invisorb[®] Spin Plasmid Mini Two (bis 10 μ g Plasmid-DNA, STRATEC Molecular GmbH) verwendet worden. Für die Isolation der Hefe-Zwei-Komponenten cDNA-Bibliothek CD4-30 wurde das QIAGEN Plasmid Mega Kit (bis 2,5mg Plasmid-DNA, Qiagen) verwendet.

2.2.5. DNA Sequenzierung

Zur DNA-Sequenzanalyse wurde die Methode nach Sanger (1977) angewandt. Für die Sequenzier-PCR sind 300-500µl gereinigte Plasmid-DNA-Lösung, 2µl (10pmol) des entsprechenden Primers, 2µl BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing RR-100 Mix (Applied Biosystems, Darmstadt), 1µl 5x BigDye Sequencing Puffer v1.1 zugegeben und mit reinst Wasser auf 10µl aufgefüllt worden. Die PCR Reaktionen sind in einem Biometra-Cycler T3 (BIOMETRA, Göttingen) mit einer Heiz/Kühlrate von 0,99°C s⁻¹ und dem folgenden Programm durchgeführt worden. Sequenzierprogramm: 96°C für 10s, 35x(96°C für 10s, 50°C-60°C (je nach Primer) für 5s, 60°C für 4min), 4°C Pause. Nach der Reaktion wurde die DNA mit 1/10Vol. 3M Natriumacetatlösung (pH 4,8) und 3Vol. 96%igem Ethanol präzipitiert, bei 13000xg für 20 min pelletiert, das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und bei -20°C aufbewahrt. Die automatische Sequenzierung erfolgte mit einem ABI377 Sequenzierer (Applied Biosystems).

2.2.6. Isolation von DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Sowohl für die Amplifikation der *HIPP26* Promotor-Fragmente als auch für die Überprüfung der Nachkommen aus den gekreuzten *Arabidopsis* Linien in Bezug auf die Allele in den Loci für *HIPP25* und *HIPP26* auf Anwesenheit der 'enhancer trap' und 'gene trap' Transposons ist es erforderlich, DNA aus den zu untersuchenden Pflanzen zu isolieren.

Hiefür ist ein Blatt im Reaktionsgefäß unter flüssigem Stickstoff fein zerrieben, in 250µl Extraktionspuffer (2% (w/v) CTAB, 1,4M NaCl, 20mM EDTA (pH 8,0), 100mM Tris-HCl (pH 8,0), 1% (w/v) PVP (M_w = 40000 g mol⁻¹)) homogenisiert und für 30min bei 65°C inkubiert worden. Anschließend sind unlösliche Zelltrümmer durch Zentrifugieren bei 13000xg für 10min pelletiert worden. Der Überstand ist mit 250µl CI-Lösung (96% Chloroform, 4% Isoamylalkohol) versetzt, stark gemischt und für 5min bei 13000xg zentrifugiert worden. Aus dem Überstand wird die DNA mit 3Vol. reinst Ethanol ausgefällt und durch Zentrifugieren bei 13000xg und 4°C für 20min pelletiert. Das DNA-Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10mM Tris-HCl (pH 8.5) gelöst und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.7. Isolation von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Isolation von Plasmid-DNA sind die Zellen von den entsprechenden Stämmen in 10ml Übernachtskultur, welche im geeigneten SD-Selektivmedium (Yeast Protocols Handbook, PT3024-1 Version PR13103, Clontech Laboratories, Inc.) bei 30°C und 200U min⁻¹ schüttelnd inkubiert wurden, vermehrt und durch Zentrifugieren bei 5000xg für 5min pelletiert. Die Pellets sind anschließend in 250µl Puffer P1 (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) resuspendiert, mit 50-100µl Glaskugeln (G8772, Sigma-Aldrich) gemischt und 5min kräftig gevortext worden. Nach dem Absetzen der Glasperlen ist der Überstand weiter nach der Anleitung des QIAprep Spin Miniprep Kit's bearbeitet worden. Zur weiteren Analyse sind die in 25µl Elutionspuffer EB isolierten Binärvektoren danach in chemisch kompetente *E. coli* Zellen vom Stamm XL1-Blue MRF' transformiert worden.

2.2.8. Isolation von RNA aus *Hordeum vulgare* und *Arabidopsis thaliana*

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Pflanzen basiert auf der Methode zur Isolation von RNA aus Polysaccharid- und Proteoglycan-reichen Proben mittels TRI-Reagenz, welche Chomczynski und Mackey 1995 beschrieben haben. Dabei wird das entsprechende Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff sehr fein zerrieben. Dann werden 50-300mg Material mit 1ml 60°C warmen TRIzol[®] (Kat.Nr.: 15596, Invitrogen GmbH, oder der alternativen TRI-

Reagenz (38% saures, wassergesättigtes Phenol, 0,8M Guanidiniumthiocyanat, 0,4M Ammoniumthiocyanat, 0,1M Na-Acetat (pH 5,0 mit Essigsäure eingestellt), 5% Glycerin) siehe 'DNA-Microarray Protocols' veröffentlicht vom *Arabidopsis* Functional Genomics Consortium, Version 2.0)) homogenisiert, 5min bei 60°C inkubiert, unlösliche Zelltrümmer bei 13000xg und 4°C für 10min abzentrifugiert und der Überstand mit 200µl Chloroform intensiv gevortext. Nach einer Inkubation bei 22°C für 5min wird 15min bei 13000xg und 4°C zentrifugiert, die obere wässrige Phase vorsichtig abgehoben, die Ribonukleinsäuren mit 250µl 0,8M Na-Citrat/ 1,2M NaCl Lösung und 250µl Isopropanol (pro ml ursprünglich verwendetem TRIzol) ausgefällt, 10min bei 22°C inkubiert, 10min bei 13000xg und 4°C pelletiert, das Pellet mit 1ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50µl DEPC behandeltem Wasser gelöst. Diese RNA wird ein weiteres Mal durch Zusetzen von 1/10 Vol. 4M NaCl und 2Vol. reinst Ethanol ausgefällt, durch Zentrifugieren bei 13000xg und 4°C für 20min pelletiert, das Pellet mit 1ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50µl DEPC behandeltem Wasser gelöst. Anschließend erfolgen die Konzentrationsbestimmung mit einem NanoDrop Spektrophotometer (PEQLAB Biotechnologie GMBH/Thermo Fisher Scientific, Erlangen) und die Lagerung bei -80°C bis zur weiteren Verwendung.

2.2.9. Genexpressionsanalysen mittels Northern Technik

Für die elektrophoretische Trennung der Gesamt-RNA sind denaturierende Agarose-Formaldehyd-Gele verwendet worden. Die Gele enthielten 1% (w/v) Agarose, 4% Formaldehyd und 1/10Vol. 10xMOPS-Puffer (400mM MOPS, 100mM Na-Acetat, 10mM Na-ETDA, pH 7,2 mit NaOH einstellen) und reinst Wasser. 1xMOPS-Puffer ist als Laufpuffer verwendet worden. Definierte Mengen, z.B. 15µg RNA, sind von den zu untersuchenden RNA-Proben mit 1/10 Vol. 4M NaCl und 2Vol. reinst Ethanol gefällt, durch zentrifugieren bei 13000xg und 4°C für 20min pelletiert, das Pellet mit 150µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20µl RNA-Probenpuffer (1x MOPS-Puffer, 50% deionisiertes Formamid, 6% Formaldehyd, 10% Glycerin und 0,008% (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen, für 10 min bei 65 °C denaturiert und in die Taschen des Gels aufgetragen worden. Nach dem Ende der elektrophoretischen Trennung sind die Gele für 30min in Wasser gewaschen, 30min mit 100mM Tris-HCl-Puffer, (pH 9,0) der 0,1µg ml⁻¹ Ethidiumbromid enthielt, gefärbt und zweimal 30min mit 100mM Tris-HCl-Puffer (pH 9,0) entfärbt worden. Die RNA ist dann unter UV-Licht dokumentiert, mit einer Druckblottapparatur (Stratagene) unter Verwendung von 10xSSC-Puffer (150mM Na-Citrat, 1,5M NaCl, pH 7,0 mit Zitronensäure einstellen) auf positive geladene Nylonmembranen (Roche Diagnostics Deutschland GmbH) übertragen, im Stratalinker (Stratagene) mit UV-Lichtbestrahlung kovalent an die Membran gekoppelt, im Hybridisationsofen (OV3, Biometra/Analytik Jena, Göttingen) bei 50°C für 90min mit High-SDS-Puffer (7% (w/v) SDS, 50% deionisiertes Formamid, 5xSSC-Puffer, 5% Natriumphosphat-Puffer (1M Na₂HPO₄, pH 7,0 mit Phosphorsäure einstellen), 0,1% (w/v) N-Lauroylsarcosin und 2% (w/v) Blocking Reagenz (Roche Diagnostics Deutschland GmbH)) äquilibriert und anschließend mit den entsprechenden Sondenlösungen (25ng ml⁻¹ DIG-11dUracil markierte cDNA in High-SDS-Puffer) für 16h ebenfalls im Hybridisationsofen bei 50°C inkubiert worden. Nach der Hybridisierung der Sonden sind die Membranen zweimal 15min in 2xSSC-Puffer mit 0,1% (w/v) SDS, zweimal 15min bei 50°C mit vorgewärmtem 0,5xSSC-Puffer mit 0,1% (w/v) SDS gewaschen, 3min in Waschpuffer (100mM Maleinsäure, 150mM NaCl, 0,3% Tween 20, pH 7,5 mit NaOH einstellen) äquilibriert, 45min in Blocklösung (1% (w/v) Roche Blockreagenz, 100mM Maleinsäure, 150mM NaCl, pH 7,5 mit NaOH einstellen) und 30min in Blocklösung mit Anti-DIG-F_{ab}-alkalische-Phosphatase-Konjugaten (Roche Diagnostics Deutschland GmbH) inkubiert, zweimal 15min mit Waschpuffer gewaschen und 2min in Detektionspuffer (100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH9,5) äquilibriert worden. Anschließend sind die Membranen 15min bei 37°C mit dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD® (Roche Diagnostics Deutschland GmbH) inkubiert, in Sarogold®-Folie (Carl Roth GmbH & Co KG) verpackt

und die Chemilumineszenzsignale mit Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare Europe GmbH) detektiert worden.

DIG-markierte cDNA Sonden sind entweder per PCR unter Verwendung der entsprechenden cDNA-Klone und des DIG DNA Labeling Mix (10×conc.) oder per Klenow-Enzym und Hexanucleotid-Mix im DIG DNA Labeling Kit (Roche Diagnostics Deutschland GmbH) entsprechend der Herstellerempfehlungen erzeugt worden.

2.2.10. Genexpressionsanalysen mittels quantitativer RT-PCR

Die von den zu untersuchenden Proben isolierte Gesamt-RNA ist zunächst mit DNase I (Roche Diagnostics Deutschland GmbH) behandelt worden, um Kontaminationen mit DNA zu beseitigen. Anschließend sind pro Probe 1 µg RNA unter Verwendung des RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas/Thermo Fisher Scientific) in cDNA umgeschrieben worden. Als Primer ist ein Gemisch aus 0,5 µl Oligo-(dT)₁₈-Primer (100 µM) und 1 µl Hexanucleotid-Mix (100 µM) verwendet worden. Die reverse Transkription ist zunächst für 5 min bei 25°C und dann für 60 min bei 45°C durchgeführt worden. Da trotz der Hitzeinaktivierung der reversen Transkriptase inhibitorische Effekte auf die quantitative PCR bei der Verwendung hoher cDNA Mengen als Vorlagen auftreten (Suslov und Steindler, 2005), sind die cDNA-Lösungen anschließend einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Reinigung unterzogen worden. Dabei sind die 20 µl cDNA-Reaktionsansätze mit 10 mM Tris-HCl (pH 7,8) auf ein Volumen von 100 µl gebracht, mit 100 µl Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, pH 7,5-8,0; Carl Roth GmbH & Co KG) kräftig gemischt, 5 min bei 22°C inkubiert, 5 min bei 9000xg zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgehoben, die Unterphase nochmals mit 100 µl 10 mM Tris-HCl (pH 7,8) ausgeschüttelt, 5 min bei 9000xg zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgehoben, mit dem ersten Überstand vereinigt, mit 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 5,0) und 2,5 Vol. reinst Ethanol gefällt, 30 min bei 13000xg und 4°C pelletiert, mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in 20 µl 10 mM Tris-HCl (pH 7,8) gelöst worden. Für die anschließende quantitative PCR sind Verdünnungsreihen mit dem Verdünnungsfaktor 0,25 hergestellt worden. Anhand dieser Verdünnungsreihen und der jeweils gemessenen qPCR C_T-Werte, können die PCR-Effizienzen aller Primerkombinationen bestimmt werden (Pfaffl, 2001). Für jede PCR-Reaktion sind 2 µl der entsprechenden Verdünnungsstufe als Vorlage, je 0,3 µM von beiden Primern, 10 nM Fluorescein (Kat.-Nr.: 170-8780, Bio-Rad, Laboratories GmbH, München) als passives Referenzfluorophor und Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen GmbH) verwendet worden. Die qPCR Analysen sind auf einem iCycler der 1. Generation oder auf einem MyiQ2-Cycler (beide von Bio-Rad, Laboratories GmbH) durchgeführt und sowohl die jeweiligen C_T-Werte als auch die Anstiege der Regressionsgeraden zur Berechnung der PCR-Effizienzen aus den Verdünnungsreihen mit der entsprechenden Cyclersoftware ausgelesen worden.

Für jede Probe sind 3 biologische Wiederholungen untersucht worden. Für jedes biologische Replikat sind 3 qPCR-Messungen, d.h. 3 technische Wiederholungen, durchgeführt worden. Anhand der Mittelwerte der technischen Wiederholungen sind unter Verwendung der REST® 2009 Software für die biologischen Wiederholungen (Pfaffl et al. 2002, Qiagen GmbH) die relativen Expressionslevel (Pfaffl, 2001) und die Standardfehler, beruhend auf der C_T-Wert-Abweichung zwischen behandelten und Kontrollproben, PCR-Effizienz korrigiert und auf das entsprechende Referenzgen normalisiert, für die unterschiedlichen Zielgene berechnet worden.

2.2.11. Transiente Transformation von Zwiebelepidermiszellen und Fluoreszenzmikroskopie

Für die transiente Transformation von Zwiebelepidermiszellen und die Expression von GFP-Fusionsproteinen ist das smRS-GFP ('solubility modified, red shifted', Davis und Vierstra,

1998), welches im *E. coli* Vektor psmRSGFP (ABRC Code: CD3-327) vorliegt, mit den Primern GFP for, GFP rev01 (mit Stop Codon) und GFP rev02 ('in frame' *Bgl*III Site statt Stop Codon) amplifiziert und gerichtet (*Bam*HI, *Sac*I) anstelle des *uidA* Gens hinter den modifizierten CaMV35S Promotor (Mindrinos et al. 1994) in den *E. coli* Vektor pKEx4tr-G (van den Ackerveken et al. 1996) kloniert worden. Die resultierenden Vektoren können für die Expression von Fusionsproteinen mit GFP am C-Terminus (pKEx-GFP01-1) und am N-Terminus (pKEx-GFP02-4) in pflanzlichen Zellen verwendet werden. Verschiedene Versionen von *HvFP1* sind mit den Primern HVFP1forB und HVFP1revB bzw. HVFP1forCD und HVFP1revC oder HVFP1revD am cDNA Klon HVSMEg0015J14 (Genbank Acc.: AJ508227) amplifiziert, mit dem pGEM-T Vector System (Promega) kloniert, sequenziert und in die Vektoren pKEx-GFP01-1 (*Eco*RI, *Bam*HI) bzw. pKEx-GFP02-4 (*Bgl*III) gebracht worden. *HIPP26* ist mit den Primern HIPP26forAB und HIPP26revA oder HIPP26revB am cDNA Klon pGEM-HIPP26 amplifiziert, mit dem pGEM-T Vector System (Promega) kloniert, sequenziert und in den Vektor pKEx-GFP02-4 (*Bgl*III) gebracht worden. *HIPP25* und *HIPP27* sind mit den Primern HIPP25 for02 und HIPP25 rev bzw. HIPP27 for02 und HIPP27 rev an den entsprechenden cDNA Klonen (Kapitel 2.2.12.) amplifiziert, ebenfalls in pGEM-T kloniert, sequenziert und in pKEx-GFP02-4 (*Bgl*III) gebracht worden. Für die Transformation sind die Plasmide im Verhältnis 2µg DNA pro mg Wolfram in einer Lösung mit 80µg Wolframpartikel (0,6µm bis 1,2µm Durchmesser) pro µl, 1M CaCl₂ und 10,4mM Spermidin gemischt und für 10min auf den Wolframpartikeln präzipitiert worden. Pro Schuss sind 2,5µl dieser Partikel-DNA-Suspension mit einem Heliumgasdruck von 12bar unter Vakuum (-0,8bar) bei einer Distanz von 9cm in einer speziell angefertigten Partikelkanone (AG Prof. Dr. U. Johanningmeier, MLU Halle-Wittenberg) auf ca. 1cm² große Zwiebelepidermistücke geschossen worden. Die Epidermen sind anschließend auf Platten mit 0,5fach Murashige and Skoog Medium (Duchefa Biochemie B.V.), 30g l⁻¹ Saccharose, 2,5µg ml⁻¹ Amphotericin B, 5µg ml⁻¹ Chloramphenicol und 2% (w/v) Plant-Agar (Duchefa Biochemie B.V.) für 5-10h dunkel bei 28°C inkubiert worden. Die Epidermen sind dann in 1xPBS-Puffer (8mM Na₂HPO₄, 1,47mM KH₂PO₄, 137mM NaCl, 2,7mM KCl, pH 7,4 mit HCl oder NaOH einstellen) eingebettet, die Zellkerne teilweise mit 6µM 4',6-Diamidino-2-Phenylindole-Dihydrochlorid angefärbt und mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop LSM710 (Carl Zeiss, Oberkochen) untersucht worden.

2.2.12. Promotor-Glucuronidase Reporteranalysen

Die unterschiedlichen *HIPP26* Promotor-Fragmente sind per PCR mit den Primern HIPP26Pro A for (1055bp), HIPP26Pro B for (620bp) oder HIPP26Pro C for (320bp) und HIPP26Pro ABC rev (siehe Abb. 3.16.) an *Arabidopsis thaliana* Col-0 DNA amplifiziert, in pGEM-T kloniert und sequenziert worden. Anschließend sind diese Fragmente gerichtet in die *Xba*I *Sma*I Restriktionsendonukleaseschnittstellen des binären Vektors pGPTV-Kan direkt vor den codierenden Bereich des *uidA* Gens kloniert worden. Sowohl diese Plasmide als auch der 'leere' pGPTV-Kan Vektor sind mittels *Agrobacterium tumefaciens* in *Arabidopsis thaliana* Col-0 Pflanzen transformiert worden. Die Glucuronidase-Aktivität ist in Keimlingen der T2 und T3 Generation histologisch untersucht worden. Dafür sind die Pflanzen mit einer Farbstofflösung (50mM NaPO₄ (pH 7.2), 0.5mM K₃Fe(CN)₆, 0.1% Triton X-100, 10mM Na-EDTA und 1mM X-GlcA (Kat.-Nr.: X1406, DUCHEFA Biochemie B.V.) unter Vakuum infiltriert worden. Nach einer Inkubation bei 37°C für 24h im Dunkel sind die Pigmente durch 5-10maliges Waschen mit 50% Ethanol für jeweils 24h aus den Pflanzen entfernt und die *HIPP26* Promotor-Aktivität indirekt durch die Glucuronidase-Aktivität anhand der Blaufärbung sichtbar gemacht worden.

2.2.13. Hefe-Zwei-Komponenten Analysen

Die Standardtechniken für den molekularbiologischen Umgang mit *Saccharomyces cerevisiae* sind angewendet worden (Guthrie and Fink, 1991 und Yeast Protocols Handbook, PT3024-1 Version PR13103, Clontech Laboratories, Inc.). Die Untersuchungen der 'Yeast two hybrid' cDNA Bibliothek sind nach den Protokollen des Matchmaker Two-Hybrid System 3 (Clontech Laboratories, Inc.) durchgeführt worden. Drei unterschiedliche *HIPP26* Fragmente sind mittels PCR unter Verwendung des pGEM-HIPP26 Klonen und der Primer HIPP26forCDEF und HIPP26revC (*HIPP26*), HIPP26revD (*hipp26 C150G*) oder HIPP26revE (*hipp26 Δ142-153*), amplifiziert, in pGEM-T kloniert, sequenziert, gerichtet in den Gal4-DNA-Bindedomänen Vektor pGBKT7 (*EcoRI*, *BamHI*) kloniert und als Köderkonstrukte in den Hefestamm AH109 transformiert worden. Anschließend sind sowohl die c-myc-Gal4-BD-HIPP26 Köderproteinexpression mittels Immunoblot-Analysen als auch die Autoaktivierung der Y2H-Reportergene durch die Köderproteine allein überprüft worden.

100µg der Y2H-cDNA Bibliothek (ABRC Stock: CD4-30, Fan et al., 1997) sind in den Hefestamm Y187 transformiert worden und lieferten 866.000 Einzelkolonien. Diese sind mit den Stämmen AH109, die sowohl das Wildtyp-*HIPP26*-Köderkonstrukt als auch die *hipp26 C150G* Version enthalten, gepaart und die resultierenden diploiden Zellen auf SD-Medium ohne Leucin, Tryptophan und Adenin selektiert worden. Aus positiven Kolonien sind die entsprechenden pAD-GAL4-2.1-cDNA Vektoren isoliert, im *E.coli* Stamm XL1-Blue MRF' kloniert, sequenziert, zurück in den Hefestamm Y187 transformiert, mit den *HIPP26* Köderstämmen gepaart und die Proteininteraktion durch die Aktivierung der Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *lacZ* verifiziert worden.

Zusätzlich sind die codierenden Bereiche weiterer HIPPs und ATHBs mittels OneStep RT-PCR Kit (Qiagen), Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana* Col-0 und den entsprechenden Primern (siehe Kapitel 2.1.2.) amplifiziert, in pGEM-T kloniert, sequenziert, in den Gal4-DNA-Bindedomänenvektor pGBKT7 bzw. den Gal4-Aktivierungsdomänenvektor pGAD-C1 kloniert, in die Hefestämme AH109 bzw. Y187 transformiert, gepaart und auf Aktivierung der Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *lacZ* untersucht worden.

2.2.14. Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Die verwendete Methode ist ursprünglich von Akada et al., (2000) beschrieben worden.

Eine 50ml Hauptkultur in YPDA-Flüssigmedium (1x YPD Broth (Kat.-Nr.: Y1708, DUCHEFA Biochemie B.V.), 0,003% (w/v) Adenin-Hemisulfat) ist mit 2ml einer 16h Vorkultur angeimpft, bei 30°C und 180U min⁻¹ bis zu einer optischen Dichte bei 600nm Wellenlänge von 0,8 im Thermoschüttler inkubiert, die Zellen bei 3000xg für 5min pelletiert und in 2ml frisch hergestellter, steriler PLAG-Lösung (10mM Tris-HCl (pH 7,5), 1mM Na-EDTA, 40% (w/v) PEG 4000, 0,1M Li-Acetat, 15% Glycerin) resuspendiert worden. Anschließend sind der Zellsuspension 250µl *E. coli* RNA (10mg ml⁻¹) zugesetzt, gemischt, 200µl Portionen in sterile Reaktionsgefäße abgefüllt und diese dann langsam bei -80°C eingefroren worden. Am nächsten Tag sind den gefrorenen Zellen 0,5-1,0µg Plasmid-DNA hinzugefügt, die Suspension 3min bei 37°C im Thermoschüttler aufgetaut, für 2h bei 42°C inkubiert, auf entsprechenden SD Selektivmedien (6,7g l⁻¹ YNB ('Yeast nitrogen base without amino acids', Difco), 7,5 g l⁻¹ Microagar (DUCHEFA Biochemie B.V.), 10% 10x Dropout Solution, pH 5,8) ausplattiert und die Platten 40h bei 30°C inkubiert worden.

10x Dropout Solution enthält, mit Ausnahme der für die jeweilige Selektion der auxotrophen Marker wichtigen Nährstoffe, 200mg l⁻¹ L-Adenin-Hemisulfat, 200mg l⁻¹ L-Argenin-HCl, 200mg l⁻¹ L-Histidin-HCl-Monohydrat, 300mg l⁻¹ L-Isoleucin, 1000mg l⁻¹ L-Leucin, 300mg l⁻¹ L-Lysin-HCl, 200mg l⁻¹ L-Methionin, 500mg l⁻¹ L-Phenylalanin, 2000mg l⁻¹ L-Threonin, 200mg l⁻¹ L-Tryptophan, 300mg l⁻¹ L-Tyrosin, 200mg l⁻¹ L-Uracil und 1500mg l⁻¹ L-Valin.

2.2.15. Proteininteraktionsstudien *in vitro* mittels 'GST pulldown'

Der vollständige codierende Bereich von *ATHB29* ist mittels OneStep RT-PCR Kit (Qiagen), Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana* Col-0 Blütenständen und den Primern ATHB29for ATHB29rev amplifiziert, in pGEM-T kloniert und sequenziert worden. Der entsprechende Vektor ist direkt hinter dem 3'-Ende der *ATHB29* cDNA mit *Sac*II linearisiert worden. Für das Umschreiben von *ATHB29* in RNA sind 2µg dieser linearisierten Plasmid-DNA pro 25µl Reaktionsansatz und 5µl 5x SP6 Transkriptionspuffer, 5µl NTPs-GTP-reduziert (je 2,5mM ATP, CTP, UTP und 0,25mM GTP), 1,2µl 10mM CAP-Analagon (m7G(5')ppp(5')G, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf), 2,5µl 100mM DTT, 25U RiboLock™ RNase Inhibitor und 20U SP6 RNA Polymerase (Fermentas/Thermo Fisher Scientific) für 1h bei 37°C und nach Zugabe von 11,25nmol GTP nochmals 30min bei 37°C inkubiert worden. Anschließend sind die Ansätze auf 100µl aufgefüllt, mit 0,1Vol. 3M Na-Acetat und 2,5Vol. reinst Ethanol gefällt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert worden. Pro *in vitro* Translationansatz sind 20µl der RNA-Fällung für 30min bei 13000xg und 4°C pelletiert, mit 100µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und mit 8,7µl reinst H₂O, 12,5µl Flexi® Rabbit Reticulocyte Lysate System (Promega), 0,5µl 1mM Aminosäure-Mix ohne Methionin 1,8µl 1M KCl, 0,5µl 0,1M DTT und 1,0µl L-³⁵S-Methionin (GE Healthcare Europe GmbH) für 90min bei 30°C inkubiert worden. Anschließend sind 2µl als 'IVTL INPUT' Kontrolle in 2x SDS-PAGE Probenpuffer aufgeköcht und die restlichen 23µl für die 'GST pulldown' Analysen verwendet worden.

Die *HIPP26* (C36G,C39G) Substitutionsmutante ist durch gerichtete Mutagenese per PCR zunächst unter Verwendung des cDNA Klones pGEM-HIPP26 als Vorlage und der Primer HIPP26forCDEF und HIPP26revF (Produkt 1) sowie HIPP26forF und HIPP26revC (Produkt 2) und einer dritten PCR mit den durch Gelextraktion gereinigten PCR-Produkten 1+2 als Vorlagen und den Primern HIPP26forCDEF und HIPP26revC erzeugt, in pGEM-T kloniert, sequenziert und ebenso wie der vollständige codierende Bereich des Wildtyp *HIPP26* gerichtet in den Vektor pGEX-2TKmod (*Eco*RI, *Xho*I, GE Healthcare Europe GmbH) kloniert worden. Die resultierenden Plasmide pGEX-HIPP26-1, pGEX-HIPP26-4 und der 'leere' Vektor pGEX-2TKmod sind zur Proteinexpression in den *E. coli* Stamm Rosetta(DE3)pLysS (Novagen®, Merck KGaA) transformiert worden. Für die Expression sind 100ml Hauptkulturen bei einer optischen Dichte ($\lambda = 600\text{nm}$) von 0,8 mit 2mM Isopropyl- β -D-thiogalactosid induziert, nach einer Inkubation bei 37°C und 180U min⁻¹ für 3h durch Zentrifugieren bei 4°C und 5000xg für 5min pelletiert und bei -20°C eingefroren worden. Das Pellet ist in 5ml Aufschlusspuffer (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM H₂PO₄, 1mM PMSF, 1mM EDTA, 1µM E64, pH 7,3) resuspendiert, die Zellen durch Ultraschall-Behandlung (Model 250 Sonifier®, Branson) aufgeschlossen und unlösliche Zelltrümmer bei 4°C und 12000xg für 30min pelletiert worden. Der Überstand ist zur Fällung der DNA für 15min mit 0,1% (w/v) Protaminsulfat auf Eis inkubiert und für 30 min bei 4°C und 12000xg zentrifugiert worden. Die Proteinextrakte sind anschließend zur Bindung der Fusionsproteine mit 70µl zuvor mit 5ml Bindepuffer (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, 0,05% Nonidet P40, pH 7,3) äquilibrierter Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare Europe GmbH) für 16h bei 4°C und 30U min⁻¹ inkubiert worden. Die GSH-Sepharose ist bei 4°C für 2min mit 1000xg im Ausschwingrotor pelletiert, der Überstand entfernt und dreimal mit 5ml Waschpuffer (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, pH 7,3) gewaschen worden. Etwa die Hälfte der entsprechend präparierten Sepharose (35µl) ist anschließend mit 1ml Pulldown-Bindepuffer (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, 0,05% Nonidet P40, 1mM DTT, pH 7,3) äquilibriert, bei 4°C und 1000xg für 30s pelletiert, in Pulldown-Bindepuffer resuspendiert, mit 23µl *in vitro* translatiertem ATHB29 für 1h bei 4°C und 30U min⁻¹ inkubiert, dreimal mit 900µl Puffer (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, 1mM DTT, pH 7,3) gewaschen und in 40µl 2xSDS-PAGE Probenpuffer aufgeköcht (3min bei 95°C) worden. Die Proteinproben sind anschlie-

ßend mittels Elektrophorese auf 16% Polyacrylamid-SDS-Gelen getrennt und mit dem Fujifilm BAS-System auf einem Phosphorfluoroimager (Fujifilm FLA-3000) dokumentiert worden.

2.2.16. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Der verwendete *Agrobacterium* Stamm GV3101 pMP90 ist in einer 200ml Hauptkultur mit YEB-Flüssigmedium (5g l⁻¹ Bacto Fleischextrakt, 1g l⁻¹ Bacto Hefeextrakt, 5g l⁻¹ Bacto Pepton, 5g l⁻¹ Saccharose, pH 7,2 mit 5N NaOH einstellen, autoklavieren, danach 0,2% sterile 1M MgSO₄-Lösung, 25µg ml⁻¹ Gentamicin und 100µg ml⁻¹ Rifampicin zusetzen) bei 28°C und 180U min⁻¹ bis zu einer optischen Dichte ($\lambda = 600\text{nm}$) von 0,6 angezogen, 10min auf Eis abgekühlt, die Zellen bei 4°C und 4000xg für 20min pelletiert, mit 20ml eiskaltem Puffer (10mM Tris-HCl (pH 7,2), 1mM Na-EDTA) gewaschen, pelletiert, in 20mM CaCl₂ resuspendiert, á 200µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert worden. Für die Transformation sind die Zellen auf Eis aufgetaut, 5µg Plasmid-DNA hinzugegeben, vorsichtig gemischt, 5min auf Eis inkubiert, für 5min in flüssigem Stickstoff eingefroren, 5min bei 37°C inkubiert, 1ml YEB Flüssigmedium hinzugesetzt, für 3h bei 28°C und 180U min⁻¹ inkubiert, auf YEB-Platten inklusive der entsprechenden Antibiotika ausplattiert und für 2 Tage bei 28°C inkubiert worden.

2.2.17. Transformation von *Arabidopsis thaliana* mittels *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* mittels *Agrobacterium tumefaciens* ist die von Clough und Bent (1998) entwickelte 'floral dip' Methode verwendet worden. Eine 1l Hauptkultur ist in YEB Flüssigmedium inklusive der benötigten Antibiotika mit 10ml einer entsprechenden 24h Vorkultur angeimpft, für 18h bei 180U min⁻¹ und 28°C inkubiert, die Zellen für 15min bei 4500xg pelletiert und durch Resuspendieren in Infiltrationsmedium (5% (w/v) Saccharose, 10mM MgCl₂) auf eine optische Dichte ($\lambda = 600\text{nm}$) von 0,8 gebracht worden. Anschließend sind die Bakteriensuspensionen in geeignete Schalen überführt und vorsichtig mit 0,03% Silwet L-77 (LEHLE SEEDS, Round Rock, Texas, USA) vermischt worden. Ungestresste *Arabidopsis* Pflanzen mit jungen 2-10cm hohen Blütenständen sind für 5s vorsichtig durch diese Bakteriensuspension getaucht, für 24h dunkel in mit Plastikhauben abgedeckten Schalen und anschließend wieder unter Standardlangtagbedingungen inkubiert worden. Nach dem Absammeln der Samen sind zunächst deren Oberflächen sterilisiert worden. Hierfür sind die Samen für 2min in 70% Ethanol, 10min mit Bleichlösung (9% Natriumhypochlorid-Lösung, 0,5% Tween 20) behandelt und fünfmal mit reinst H₂O gewaschen worden. Die so behandelten Samen sind dann zum Selektieren transgener Keimlinge anhand der Kanamycinresistenz, welche mit der T-DNA von pGPTV-Kan in die entsprechenden Pflanzen gelangt, auf Platten (0,5x Murashige and Skoog Medium, 0,8% (w/v) Plant-Agar (beides Duchefa Biochemie B.V.) und 100µg ml⁻¹ Kanamycinmonosulfat) ausgesät, 3 Tage dunkel bei 4°C stratifiziert, 3 Tage dunkel bei 23°C etioliert zur Keimung gebracht und die Keimlinge 1Tag mit 100µE m⁻² s⁻¹ beleuchtet worden. Kan-resistente Keimlinge sind anhand der grünen Kotyledonen identifiziert und auf Erde pikiert worden.

2.2.18. DNA- und Protein-Sequenzanalysen

Für die Datenbanksuche von DNA- und Proteinsequenzen sind die 'Nucleotide Blast', 'Protein Blast', 'BlastX', 'TblastN', 'TblastX' und 'Conserved Domain Search' Programme des National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verwendet worden. Für die Analyse von Genen und den entsprechend codierten Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* sind zudem die TAIR-Datenbank (The Arabidopsis Information Re

source, <http://www.arabidopsis.org/>), WoLF PSORT (*in silico* Proteinvorhersagen, <http://wolfpsort.org/>), NetNES 1.1 (Vorhersage von Leucin-reichen NuklearExport Signalen, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>) und die PFAM Datenbank von Proteinfamilien und konservierten Proteindomänen (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) verwendet worden. Die Consensussequenz der HMA Domäne ('heavy metal associated domain', PFAM00403) ist für die Suche nach Genen von *Arabidopsis thaliana*, die für Proteine mit HMA Domäne codieren, benutzt worden. Die Vergleiche mehrerer Aminosäuresequenzen sind mit dem ClustalW Algorithmus des MegAlign Programms der 'Lasergene expert sequence analysis' Software (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) durchgeführt worden. Dabei sind die ClustalW Parameter 'Gap Penalty': 18,00; 'Gap Length Penalty': 0,50; 'Delay Divergent Seqs(%)': 50; 'DNA Transition Weight': 0,80 und 'Protein Weight Matrix' = Gonnet Series verwendet worden. 91 Aminosäuresequenzen, welche den auf 62 Aminosäuren begrenzten Bereich der HMA Domänen in den 76 *Arabidopsis* Proteinen mit HMA Domäne und HvFP1 repräsentieren, sind für den multiplen Sequenzvergleich und den daraus resultierenden phylogenetischen Baum benutzt worden.

Anhand der 'PLant Cis-Acting regulatory DNA Elements (PLACE) Datenbank (Higo et al. 1999, <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) sind *in silico* DNA-Bindestellen für pflanzliche Transkriptionsfaktoren im 1055bp umfassenden Promotorbereich des *HIPP26* Gens identifiziert worden. Für die Auswertung von DNA-Sequenzierungsdaten sind das SeqMan Programm der 'Lasergene expert sequence analysis' Software (DNASTAR Inc.) und die bereits erwähnten Internethilfsmittel verwendet worden.

2.3. Physiologische Methoden

2.3.1. Chlorophyllfluorometrie

Die Messungen der PSII-Effizienz ($F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$) sind mit einem Mini-PAM Chlorophyllfluorometer (Heinz Walz GmbH, Effeltrich) und die Messungen des relativen Chlorophyllgehaltes mit einem SPAD Messgerät (Konica Minolta Sensing Europe B.V., München) an jeweils 10 Gerstenproben durchgeführt worden.

Die Messungen der PSII-Effizienz (F_v/F_m), des relativen Elektronentransportlevels (rel. ETR = $0.5 \times \text{Yield} \times \text{PAR} \times \text{Absorptivity}$) und des nichtphotochemischen Quench ($\text{NPQ} = (F_m - F_m')/F_m'$) an *Arabidopsis* Pflanzen sind mit einem Imaging-PAM Chlorophyllfluorometer (Heinz Walz GmbH) durchgeführt worden. Die Messungen sind bei Raumtemperatur durchgeführt worden. Für die Bestimmung von F_0 und F_m sind die Blätter 5min dunkeladaptiert worden. Anschließend sind die Blätter für die Bestimmung von F_s und F_m' für 4min mit einer Lichtintensität von $100 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ ('photosynthetic active radiation' PAR) bestrahlt worden.

Die maximale PSII-Effizienz bei dieser PAR berechnet sich wie folgt: $\text{Yield} = (F_m - F_s)/F_m'$.

Die Absorption der Blätter wird durch Messung des von den Proben reflektierten roten LED-Lichtes (R), des von den Proben reflektierten nahe-infraroten LED-Lichtes (NIR) und folgender Berechnung: $\text{Absorptivity} = 1 - R/\text{NIR}$ bestimmt.

2.3.2. Bestimmung des relativen Pflanzenwassergehaltes

Für die Untersuchungen zum Einfluss von Wassermangel auf die unterschiedlichen Mutanten sind diese auf Erde im 10h Tag/ 14h Nacht-Rhythmus angezogen worden. Pro Topf ist Erde mit einer Trockenmasse von 55mg verwendet worden (= 0% Bodenwassergehalt). Mit Wasser gesättigte Erde wurde gleich 100% Bodenwassergehalt gesetzt. Um den Einfluss unterschiedlicher Standortbedingungen zu minimieren, sind pro Topf 4 Pflanzen, je eine Pflanze pro Linie (Ler-0, *hipp25*, *hipp26* und *hipp25/26*), pikiert worden.

Pro Messzeitpunkt und Linie sind jeweils 10 Pflanzen analysiert worden. Hierfür sind die Frischgewichte (FG) des vollständigen oberirdischen Pflanzenmaterials und nach 48h bei 80°C die Trockengewichte (TG) der jeweiligen Proben mit einer Feinwaage gewogen und der relative Pflanzenwassergehalt (PWC) nach der folgenden Beziehung berechnet worden:

$$\text{PWC} = (\text{FG} - \text{TG}) / \text{FG} \times 100\%.$$

2.3.3. Bestimmung des Wurzelwachstums

Für die Untersuchungen zum Einfluss von Salz, Zink und Kupfer auf den Wurzelzuwachs der unterschiedlichen Mutanten sind oberflächensterilisierte Samen zunächst auf Platten mit 0,5fach Hoagland Medium und 0,8% (w/v) Plant Agar (DUCHEFA Biochemie B.V.) ausgelegt, 3 Tage bei 4°C stratifiziert und 3 Tage im Langtag (16h Licht/8h Nacht) zur Keimung gebracht worden. Danach sind pro Linie je 10 Keimlinge mit einer Wurzellänge von ca. 5mm auf 0,5fach Hoagland Kontrollplatten und Platten, denen mit 120mM NaCl, 200µM ZnSO₄ oder 30µM CuSO₄ zugefügt war, umgesetzt, für weitere 9 Tage im Langtag inkubiert und anschließend gemessen worden.

3. Ergebnisse

3.1. HvFP1 in Gerste, ein durch Stress reguliertes putatives Schwermetallchaperon im Zellkern

3.1.1. Identifizierung von *HvFP1* als ein durch Kälte induziertes Gen in Primärblättern von *Hordeum vulgare*

Welche molekularen Faktoren ermöglichen es höheren Pflanzen bei niedrigen Temperaturen zu überleben? Welche Rolle spielen dabei weitere Stressfaktoren wie z. B. Starklicht? Es gibt eine Reihe von experimentellen Ansätzen, um solche wichtigen physiologischen Fragen zu beantworten. So ist es unter anderem möglich, nach Genen zu suchen, die als Reaktion auf plötzlich absinkende Umgebungstemperaturen bei gleichzeitig hohen Lichtintensitäten aktiviert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu eine cDNA-AFLP Methode verwendet. Hierfür wurden die mRNA-Moleküle aus nicht behandelten (21°C und 100µE m⁻²s⁻¹) und unterschiedlich lange mit Kälte (2°C) und hohen Lichtintensitäten (600µEm⁻²s⁻¹) gestressten Gerstenkeimlingen isoliert, in cDNA umgeschrieben, gezielt vermehrt, dabei radioaktiv markiert, nach Molekülgröße separiert und photographisch dokumentiert (siehe Abb. 3.1.). Ein Vergleich der unterschiedlichen Signalintensitäten ermöglicht es, cDNA-Fragmente von induzierten Genen gezielt zu isolieren, zu klonieren, zu sequenzieren und weiter zu analysieren. Mit Hilfe der Basensequenz, des in Abb. 3.1. dargestellten 206bp cDNA-Fragmentes, konnte *in silico* ein cDNA Klon (Genbank Acc.: BE231003) mit großer Sequenzhomologie (182 von 206 verglichenen Basen identisch) aus der Gersten-cDNA Library HVcDNA0008 des Clemson University Genomics Institute (New Cherry St. Clemson, USA) identifiziert werden. Eine vollständige Sequenzierung diese Klones ergibt die in Abb. 3.1. gezeigte mRNA Sequenz. Sowohl ein Teil des 5' nicht translatierten Bereiches und der vollständige 3' nicht translatierte Bereich (5'- und 3'-UTR) als auch das polyadenylierte 3' Ende sind ablesbar. Für weitere Expressionsanalysen auf Transkriptebene wurde das 206bp große cDNA-Fragment als Sonde markiert in Northern-Experimenten verwendet.

Der codierende Bereich ist mit 468 Basen angegeben. Das Genprodukt umfasst 155 Aminosäuren und wird als *Hordeum vulgare* farnesyliertes Protein 1 (HvFP1, Barth et al. 2004) bezeichnet.

Anhand der Aminosäuresequenz können für HvFP1 ein Kernlokalisierungssignal (NLS), eine Schwermetallbindedomäne (HMA, *heavy metal associated domain*) und ein C-terminales

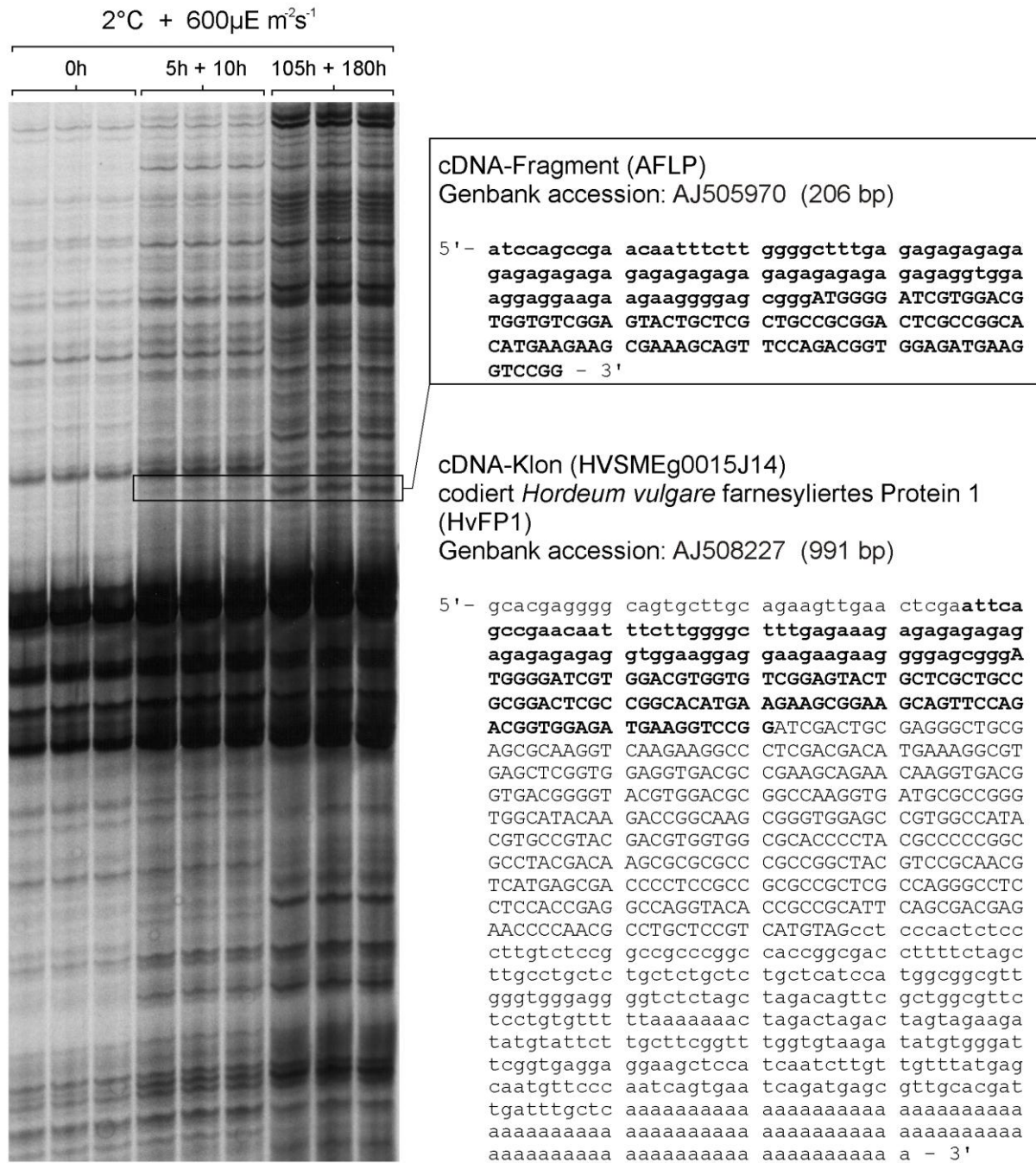


Abb. 3.1. Die Identifizierung von *HvFP1* mittels cDNA-AFLP unter Verwendung von Blättern aus Gerstenkeimlingen, die unterschiedlich lang mit Kälte und Starklicht behandelt worden sind. Der Eu-9 Primer ist als selektiver Primer verwendet worden. Der homologe Bereich zwischen dem AFLP-cDNA-Fragment aus der Wintergerstensorte Trixi und dem cDNA Klon aus der Wintergerstensorte Morex ist fettgedruckt. Der für *HvFP1* codierende Bereich ist durch große Buchstaben hervorgehoben.

Isoprenylierungsmotiv (I) *in silico* vorhergesagt werden (siehe Abb. 3.2. B). Über Datenbankanalysen konnten zwei weitere Gersten-Proteine mit hoher Sequenzhomologie identifiziert werden. Hierfür sind überlappende EST Sequenzen computergestützt zu größeren Contigs (größere zusammenhängende DNA Sequenzinformationen, die aus mehreren einzelnen Sequenzabschnitten zusammengesetzt werden) zusammengefügt worden. Nachdem die jeweiligen codierenden Sequenzbereiche identifiziert werden konnten, sind sie inklusive eines Teils des jeweiligen 3'-UTR mittels RT-PCR aus *Hordeum vulgare* cv. Trixi als cDNA

isoliert, kloniert und sequenziert worden. Die dabei erhaltenen Sequenzen codieren für HvFP2 (Genbank Accession Nr.: AJ549118) und HvFP3 (Genbank Accession Nr.: AJ549119), welche wie HvFP1 mit HMA, Isoprenylierungsmotiv und NLS die drei typischen Sequenzmotive besitzen (Barth et al. 2004).

Die Aminosäuresequenzen der HMA Domänen von HvFP1, HvFP2 und HvFP3 sind in Abb. 3.2. A im Vergleich zu der in der Datenbank vorgegebenen HMA-Consensussequenz (PFAM00403) dargestellt. Eine hohe Übereinstimmung ist vor allem im zentralen Metallbindemotiv (MxCxxC) zu erkennen. Das MxCxxC Motiv, mit den beiden Metall-bindenden Cysteinresten, ist als charakteristisches Sequenzmotiv in vielen eukaryotischen Metalltransportern und Metallchaperonen zu finden (Arnesano et al., 2002). Allerdings besitzt HvFP1 anstelle des Methionins ein Isoleucin. Die HMA-Domänen weiterer, bereits bekannter Kupferchaperone wie CopZ (Cobine et al., 1999), ScATX1 (Lin und Culotta, 1995), AtATX1 (Andres-Colas et al., 2006), AtCCH (Himmelblau et al., 1998) und AtCCS (Wintz und Vulpe, 2002; Chu et al., 2005) sind ebenfalls dargestellt. Die deutlich sichtbare Ähnlichkeit ist ein Hinweis auf eine mögliche Funktion von HvFP1, HvFP2 und HvFP3 als Schwermetallchaperone. Auffällig ist, dass sowohl HvFP1 als auch HvFP2 und HvFP3 ein Aspartat direkt vor dem ersten Cystein und jeweils eine Glutamat direkt hinter den beiden Cysteinen des MxCxxC Motivs aufweisen. Diese Aminosäurereste sorgen vermutlich für eine hohe Affinität der Schwermetallbindetasche zu den entsprechend transportierten Metallionen. So konnten zum Beispiel Eren et al., (2007) zeigen, dass eine Substitution des Glutamat mit Alanin oder Cystein im ICCxxE Kernmotiv der HMA Domäne der Zink-transportierenden P_{1B}-Typ ATPase AtHMA2 deren Affinität zur Bindung von Zinkionen deutlich verringert.

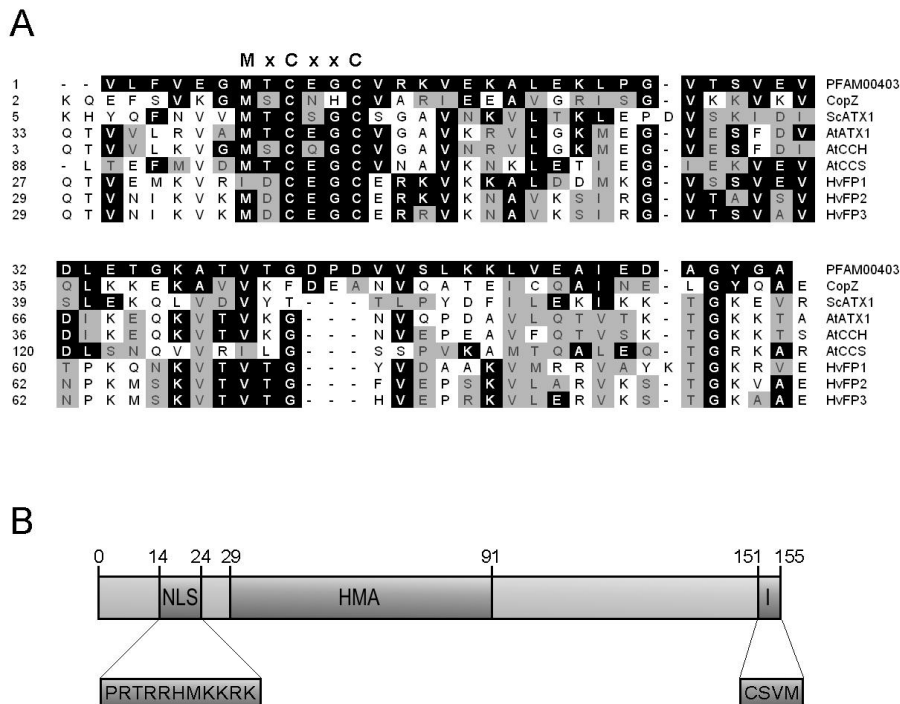


Abb. 3.2. Die HvFP1 Aminosäuresequenz weist auf eine Proteinfunktion als Schwermetallchaperon hin. (A) Aminosäuresequenzvergleich der HMA Consensus Sequenz (PFAM00403, März2009), bekannter Kupferchaperone wie CopZ (B56085, *Enterococcus hirae*), ScATX1 (NP_014140, *Saccharomyces cerevisiae*), AtATX1 (NP_564870, *Arabidopsis thaliana*), AtCCH (NP_191183, *Arabidopsis thaliana*), AtCCS (NP_563910, *Arabidopsis thaliana*) mit den HMA Domänen von HvFP1 (CAD48128), HvFP2 (CAD70172) und HvFP3 (CAD70173) aus *Hordeum vulgare*. Mit PFAM00403 identische Aminosäurereste sind schwarz und ähnliche Aminosäuren grau unterlegt dargestellt. **(B)** Schematische Darstellung der Domänenstruktur von HvFP1. *In silico* vorhergesagte Domänen sind wie folgt bezeichnet: Kernlokalisierungssignal (NLS), Schwermetallbindedomäne (HMA, 'heavy metal associated domain') und ein C-terminales Isoprenylierungsmotiv (I).

3.1.2. Stress- und entwicklungsabhängige Expression von *HvFP1*

Die Expression des *HvFP1* Genes zeichnet sich in kombiniert Kälte-Licht gestressten Wintergerstenkeimlingen durch einen transienten Induktionsverlauf aus. Die jeweiligen mRNA Mengen liegen zum Startzeitpunkt der Stresskinetik unterhalb der Detektionsgrenze. Sie steigen innerhalb von 10 bis 15 Stunden nach Transfer der Keimlinge in eine Umgebung mit 2°C und 600 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ auf ein Maximum an (Abb. 3.3.). Im weiteren Stressverlauf sinkt der *HvFP1* Transkriptgehalt auf ein deutlich niedrigeres Niveau ab. Interessant ist, dass das Transkriptlevel eines Lichtstressproteines aus der ELIP Familie ('early light inducible protein') sehr ähnlich transient reguliert wird (Abb. 3.3.). Im Unterschied zu *HvFP1* und *Elip* erhöht sich die mRNA Menge des von Cattivelli und Barthels, 1990 identifizierten durch Kälte regulierten Genes *Cor14b* innerhalb von 38 Stunden und bleibt im weiteren Stressverlauf konstant auf diesem relativ hohen Niveau. Die plastidär codierten Photosynthesegene *PsaA/B*, welche für die zentralen Proteine A und B des Photosystem I codieren, werden während kombiniertem Kälte-Lichtstress auf Transkriptebene nahezu konstant exprimiert.

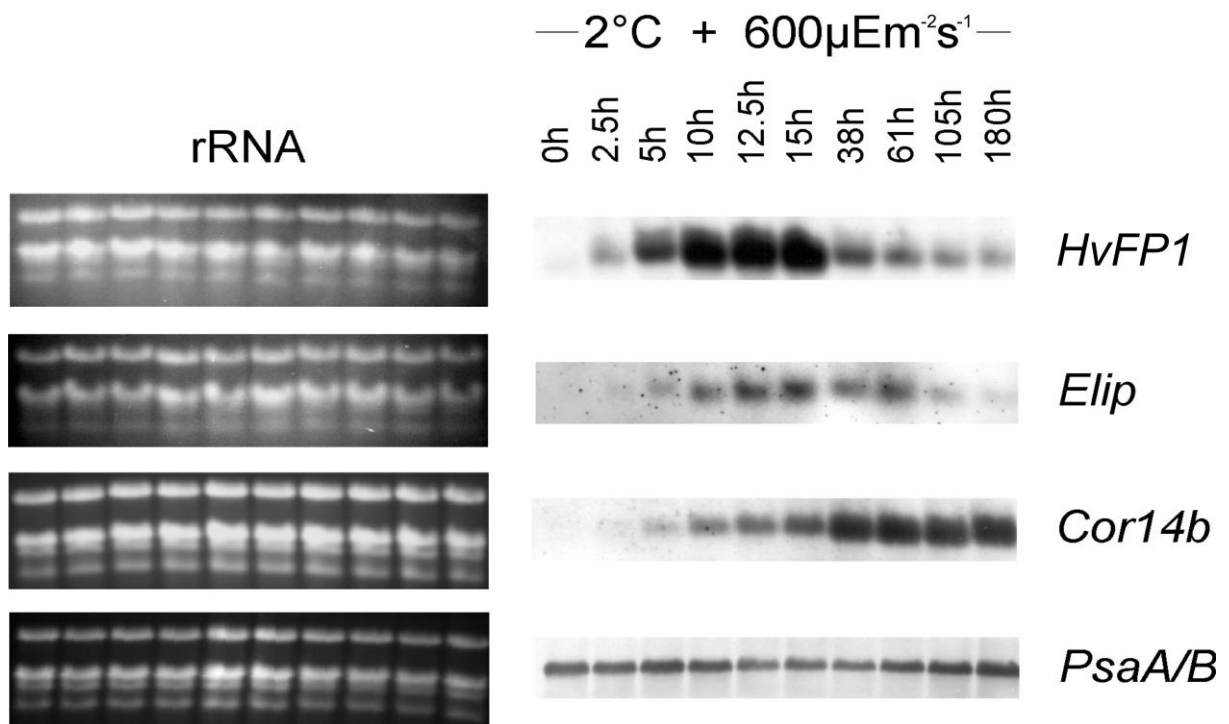


Abb. 3.3. Northern-Analysen zeigen eine Induktion der Genexpression von *HvFP1*, *Elip* und *Cor14b* unter kombinierten Kälte- und Lichtstressbedingungen. Es sind jeweils 20 μg Gesamt-RNA, extrahiert aus Primärblättern von 7 Tage alten und anschließend entsprechend mit kombiniertem Kälte- und Lichtstress behandelten Gerstenkeimlingen, verwendet worden. Die Ethidiumbromid gefärbte rRNA ist als Ladekontrolle ebenfalls dargestellt.

Diese Ergebnisse werfen folgende Fragen auf. Sind die niedrigen Temperaturen, die erhöhte Lichteinstrahlung oder die Kombination aus beidem das Signal, welches zur Induktion der *HvFP1* Genexpression führt? Handelt es sich bei *HvFP1* um ein echtes *cor*-Gen ('cold regulated'), d.h. ein durch Kälte induzierbares Gen? Zur Beantwortung dieser Fragen ist es erforderlich, Gerstenkeimlinge mit unterschiedlicher Licht- und Temperaturbehandlung zu analysieren. In 7 Tage alten Keimlingen, die unter 21°C und 100 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ angezogen werden, können große Mengen an *HvFP1* mRNA nachgewiesen werden, wenn diese Pflanzen für 10 Stunden bei 2°C inkubiert werden (siehe Abb. 3.4.). Diese von Kälte abhängige Induktion des *HvFP1* Genes findet sowohl unter einer Lichteinstrahlung von 100 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ und 600 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, als auch im Dunkel statt. In etioliert angezogenen Keimlingen akkumulieren die *HvFP1*

Transkripte ebenfalls innerhalb von 10 Stunden nach Beginn der Kältebehandlung. Im Unterschied dazu erfolgt keine Induktion des *HvFP1* Genes durch Einstrahlung von Licht mit höherer Intensität bei optimalen Temperaturen. Damit ähnelt das Expressionsmuster von *HvFP1* in der frühen Induktionsphase sehr stark dem des Kältestressgenes *Cor14b*.

Geringe Mengen an *Elip* mRNA sind sowohl in etiolierten als auch in voll ergrünten Gerstenkeimlingen nach einer Behandlung mit 2°C im Dunkel für 10 Stunden detektierbar. Für eine deutliche Aktivierung der Genexpression von *Elip* ist allerdings ein Anstieg der eingestrahlten Lichtintensität erforderlich. Eine solche Erhöhung der Lichtmenge führt auch bei 21°C zur Induktion von *Elip*. Zudem wird die Genexpression von *Elip* ebenfalls aktiviert, wenn etiolierte Keimlinge bei einer Temperatur von 21°C belichtet werden (siehe Abb. 3.4.). Dies konnte bereits 1987 von Grimm und Klopstech, nachgewiesen werden.

Die in Abb. 3.4. gezeigten Expressionsanalysen machen deutlich, dass *HvFP1* bei niedrigen positiven Temperaturen angeschaltet wird. Eine Erhöhung der eingestrahlten Lichtintensität bei optimalen Temperaturen führt nicht zur Induktion der Genexpression. Die Expression von *HvFP1* ist somit temperaturabhängig. In der frühen Induktionsphase ähnelt die Expression von *HvFP1* der des Kältestressgenes *Cor14b* und weniger der Expression des Lichtstressproteines *Elip*.

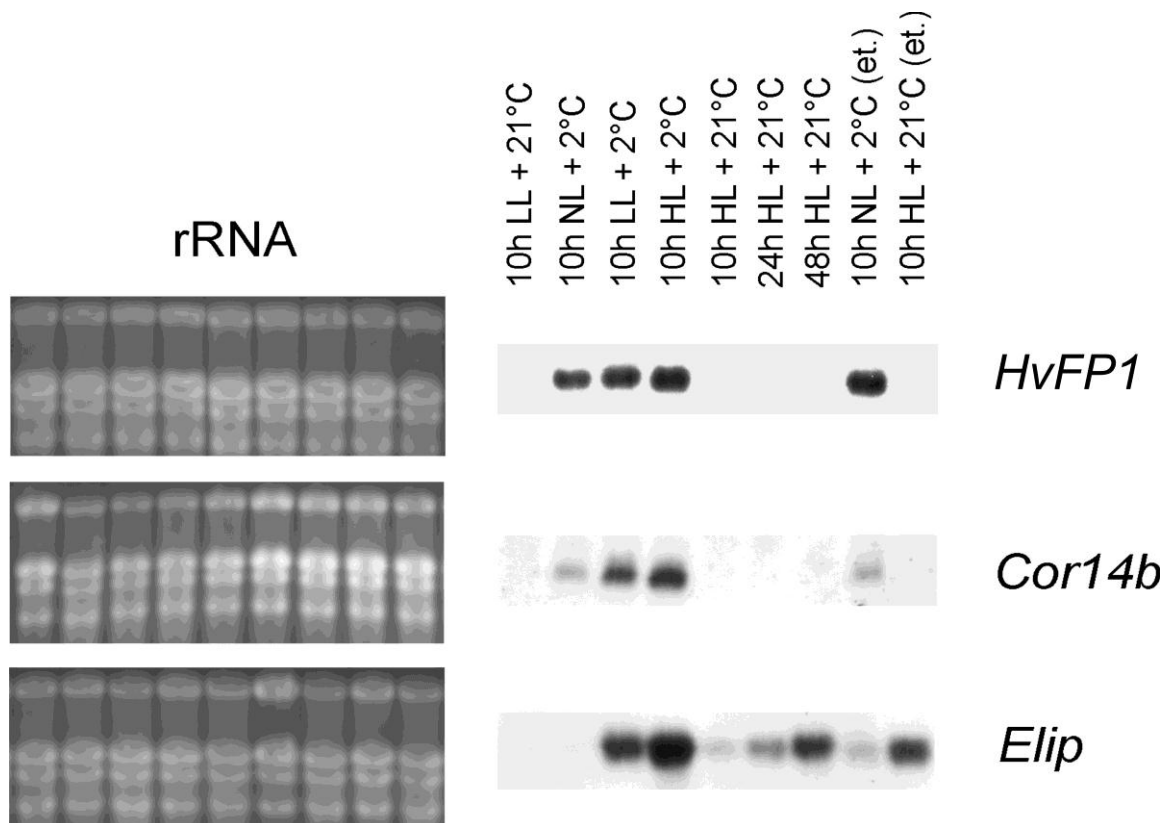


Abb. 3.4. Northern-Analysen zeigen, dass die Induktion der Genexpression von *HvFP1* durch Kälte ausgelöst wird. NL...kein Licht, LL... $100\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ Licht, HL... $600\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ Licht, (et.)...etiolierte Pflanzen, sonst bei $100\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ Licht und 21°C angezogene Pflanzen. Es sind jeweils 20 μg Gesamt-RNA, extrahiert aus Primärblättern von 7 Tage alten und anschließend entsprechend behandelten Gerstenkeimlingen, verwendet worden. Die Ethidiumbromid gefärbte rRNA ist als Ladekontrolle ebenfalls dargestellt.

In den letzten Jahren sind viele Gene beschrieben worden, die sowohl bei Kälte- als auch bei osmotischem Stress oder Trockenheit induziert werden (Kreps et al., 2002; Seki et al., 2002; Mantri et al., 2007; Tommasini et al., 2008). Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, (2006) unterteilen die als Antwort auf Kälte- und osmotischen Stress induzierten Gene in zwei Grup-

pen. Die erste dieser beiden Gruppen umfasst Gene mit schnellem und transientem Induktionsverlauf. Die Autoren weisen darauf hin, dass diese Gene meist für Proteine mit regulatorischen Funktionen codieren. In diesem Zusammenhang ist die Tatsache interessant, dass *HvFP1* neben der Induktion bei Kälte auch durch Trockenstress schnell und transient angeschaltet wird (siehe Abb. 3.5.). Werden in Hydrokultur angezogene Gerstenkeimlinge ab dem 7. Tag nach Aussaat aus dem Medium gehoben, sinkt etwa 24 Stunden später die PSII Effizienz als Indikator photoinhibitorischer Schädigungen der Photosyntheseapparate in den Primärblättern. Der relative Wassergehalt fällt bereits innerhalb von 10 Stunden um beachtliche 5%. Die *HvFP1* Transkripte akkumulieren innerhalb von 4 Stunden. Weitere 4 Stunden später sinkt die *HvFP1* mRNA Menge wieder.

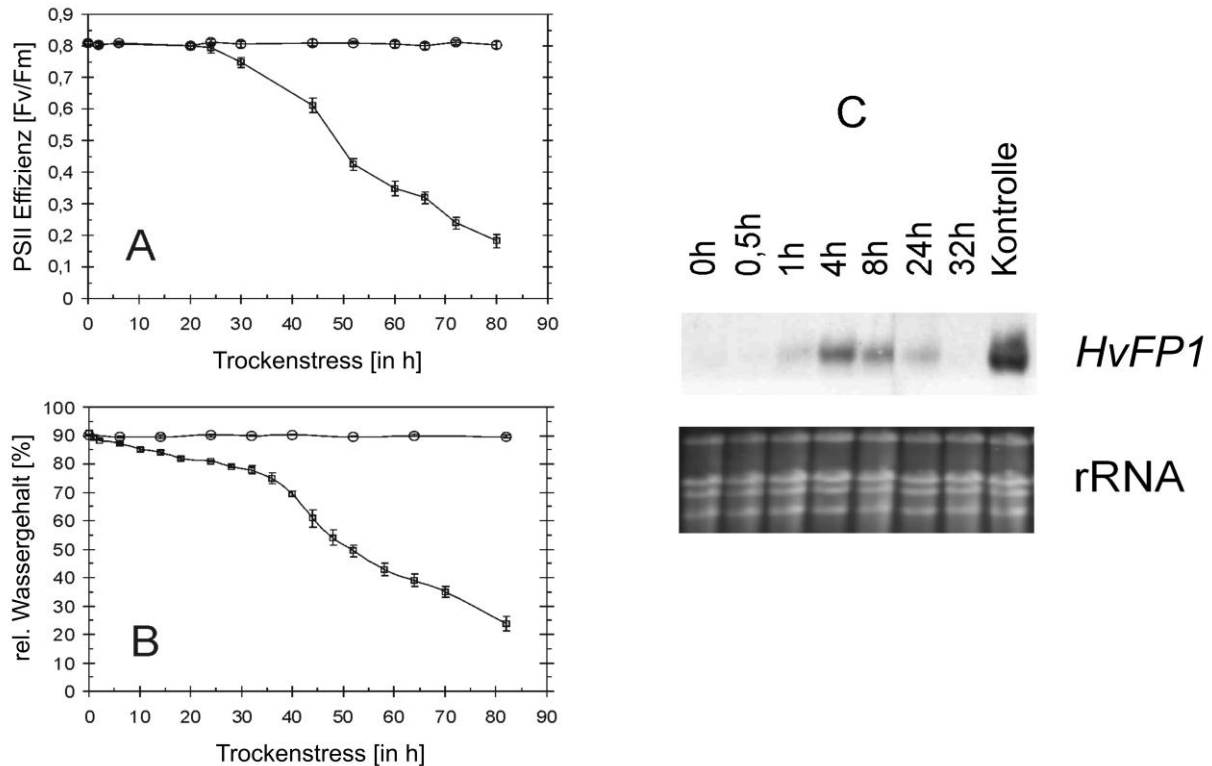


Abb. 3.5. Die Genexpression von *HvFP1* wird bei Trockenstress schnell und transient induziert. Trockenstresseffekte auf in Hydrokultur angezogene Gerstenkeimlinge nach dem Entfernen des Medium. **(A)** Photosystem II Effizienz (□...Daten der gestressten Pflanzen und ○...Daten der Kontrollen, n = 5), relativer Wassergehalt **(B)** und Northern-Analysen zur Expression von *HvFP1* **(C)**. Es sind jeweils 25µg Gesamt-RNA, extrahiert aus Primärblättern von 7 Tage alten hydroponisch angezogenen Gerstenkeimlingen, verwendet worden, welche für die Dauer des Trockenstress aus dem Hoagland Flüssigmedium entfernt worden sind. Als Kontrolle ist Gesamt-RNA aus 10h kombiniert Kälte (2°C) - Licht (600µEm⁻²s⁻¹) gestressten Gerstenkeimlingen aufgetragen worden. Die Ethidiumbromid gefärbte rRNA ist als Ladekontrolle ebenfalls dargestellt.

Das pflanzliche Stresshormon Abscisinsäure (ABA) spielt bei der Anpassung an Trockenheit eine entscheidende Rolle. Dabei ist ABA in ein komplexes regulatorisches Netzwerk integriert (für einen Überblick siehe Christmann et al., 2006; Cutler et al., 2010). Innerhalb dieses Netzwerkes kommt es zur Überlappung mit anderen Anpassungsreaktionen. So werden einige Gene, die durch ABA induziert werden nicht nur bei Trocken-, sondern auch bei Salz- und Kältestress angeschaltet (Rabbani et al., 2003; Zhu et al., 2010). Die Expression von *HvFP1* kann auf Transkriptebene ebenfalls durch exogen applizierte Abscisinsäure schnell und transient induziert werden (siehe Abb. 3.6). Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Funktion von *HvFP1* bei Anpassungsprozessen unter abiotischem Stress.

HvFP1 wird neben der oben dargestellten schnellen transienten Induktion durch abiotischen Stress auch entwicklungsabhängig im Verlauf der natürlichen Primärblattseneszenz angeschaltet. 38 Tage nach Aussaat sind große Mengen an *HvFP1* mRNA detektierbar (siehe Abb. 3.7.). Die Primärblätter befinden sich zu diesem Zeitpunkt in der letzten Phase ihrer Entwicklung, was durch einen deutlich verringerten Chlorophyllgehalt und das Absinken der Photosystem II Effizienz angezeigt wird. Die Remobilisierungsprozesse aller für die Pflanze

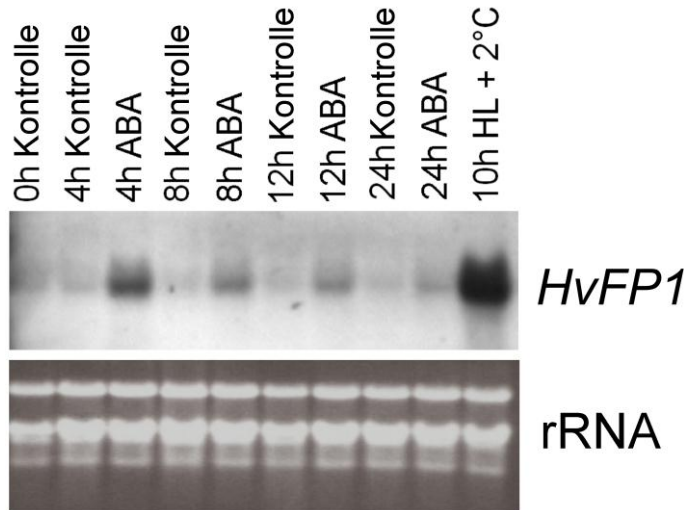


Abb. 3.6. Die Genexpression von *HvFP1* wird durch 50µM exogen applizierte Abscisinsäure transient induziert. Es sind jeweils 20µg Gesamt-RNA, extrahiert aus Primärblättern von 7 Tage alten Gerstenkeimlingen, verwendet worden, welche abge schnitten und für die Dauer der Behandlung auf Leitungswasser mit bzw. ohne 50µM Abscisinsäure inkubiert worden sind. Neben der Northern detektion ist die Ethidiumbromid gefärbte rRNA als Ladekontrolle ebenfalls dargestellt.

wichtigen und weiterverwertbaren Stoffe werden unter anderem durch den in dieser Phase um über 70% gesunkenen Proteingehalt nachweisbar (Miersch et al., 2000). Himmelblau und Amasino, (2001) haben gezeigt, dass es in alternden *Arabidopsis* Blättern zu einer Induktion der Genexpression des Kupferchaperons CCH und der Cu-transportierenden P_{1B}-Typ ATPase RAN1 (AtHMA7) kommt. Durch sehr große Mengen (je 1mM) von exogen applizierten Kupfer- und Cadmium-Ionen kann *HvFP1* innerhalb von 48h schwach induziert werden.

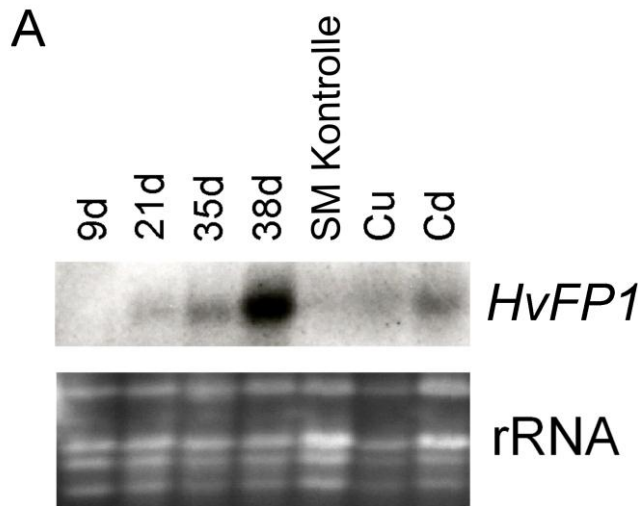


Abb. 3.7. Northern-Analysen zeigen, dass die Genexpression von *HvFP1* während der natürlichen Seneszenz der Primärblätter und bei Behandlung mit 1mM Cu²⁺ bzw. Cd²⁺ induziert wird.

(A) Northern-Analysen mit jeweils 30µg Gesamt-RNA, extrahiert aus Primärblättern von Gerstenkeimlingen. Die Schwermetallbehandlung wurde mit 10 Tage alten hydroponisch angezogenen Pflanzen durchgeführt. Die Ethidiumbromid gefärbte rRNA ist als Ladekontrolle ebenfalls dargestellt. (B) Physiologische Parameter für das jeweilige Entwicklungsstadium. Der Mittelwert ist aus je 10 unabhängigen Messungen berechnet worden. Die Standardabweichung ist ebenfalls angegeben.

B

	9d	21d	35d	38d	SM Kontrolle	Cu ⁺⁺	Cd ⁺⁺
PSII Effizienz (Fv/Fm)	0,74 ±0,04	0,78 ±0,05	0,76 ±0,03	0,69 ±0,02	0,82 ±0,02	0,809 ±0,04	0,808 ±0,02
Chlorophyllgehalt (rel. Einheiten)	42,0 ±1,3	35,8 ±1,7	21,7 ±4,4	10,7 ±4,1	32,0 ±0,9	21,5 ±4,9	19,9 ±2,0

3.1.3. Gewebespezifische Expression von *HvFP1*

In welchen Organen bzw. Organteilen von 18 Tage alten Gerstenpflanzen wird *HvFP1* exprimiert? Die in Abb. 3.8. dargestellten Northern-Analysen illustrieren, dass v.a. im Spross von unbehandelten Pflanzen, aber auch den Wurzeln und den Blattscheiden, in denen sich bereits weitere junge Folgeblätter befinden, *HvFP1* Transkripte vorhanden sind. Eine deutliche Induktion der mRNA-Mengen erfolgt in allen Pflanzenteilen, wenn die Gerste in diesem Stadium für 15h mit niedrigen positiven Temperaturen (2°C) und höheren Lichtintensitäten ($600\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) behandelt wird. Unter diesen Bedingungen sind die *HvFP1* Transkripte auch in Primärblättern und in den Blattspreiten des 1. und 2. Folgeblattes nachweisbar.

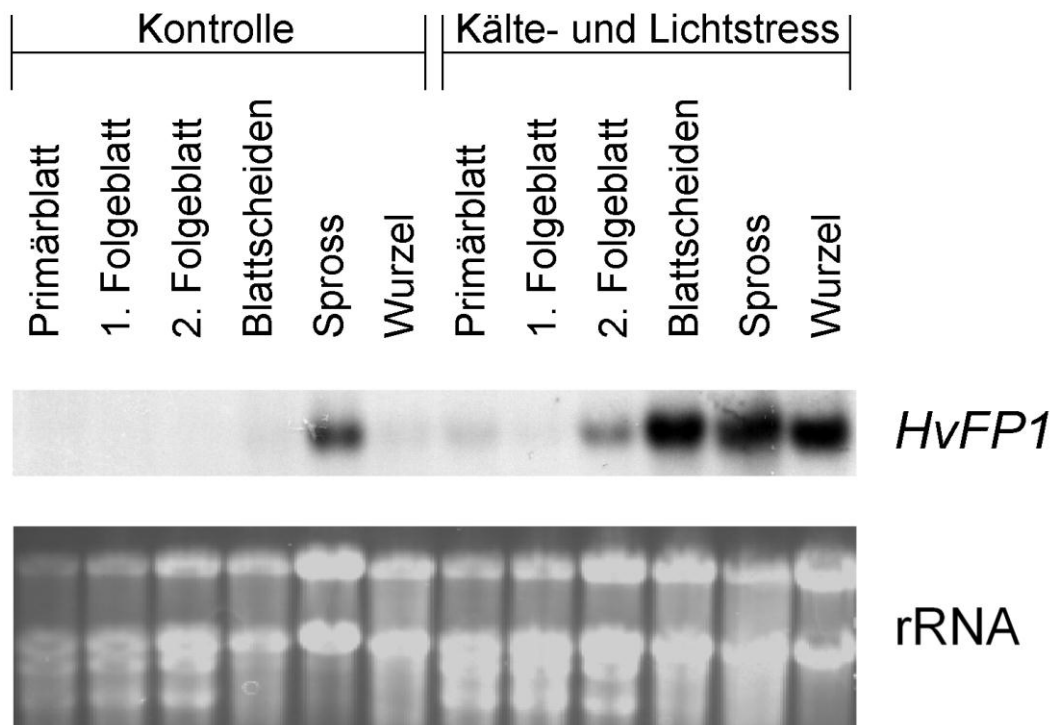


Abb. 3.8. Northern-Analysen der Expression von *HvFP1* in verschiedenen Pflanzenteilen unter Kontroll- und Stressbedingungen (2°C und $600\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ für 15h). Die Pflanzen sind vor Stressbeginn 18 Tage im Tag-Nacht-Rhythmus ($16\text{h } 21^{\circ}\text{C}$ und $100\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ / $8\text{h } 16^{\circ}\text{C}$ dunkel) angezogen worden. Für die Northern-Analysen sind jeweils $20\mu\text{g}$ Gesamt-RNA verwendet worden. Die Ethidiumbromid gefärbte rRNA ist als Ladekontrolle ebenfalls dargestellt.

3.1.4. Subzelluläre Lokalisierung von *HvFP1*

Neben dieser von Kälte abhängigen und Organ-spezifischen Genexpression von *HvFP1* ist auch die zelluläre Lokalisierung der entsprechenden Proteine besonders interessant. Wie bereits erwähnt, sind für *HvFP1* *in silico* ein Kernlokalisierungssignal und ein C-terminales Isoprenylierungsmotiv vorhergesagt (siehe Abb. 3.2.). Werden verschiedene chimäre *HvFP1*-GFP Fusionsproteine heterolog in Zwiebelepidermiszellen exprimiert, ist der größte Teil der GFP-Fluoreszenz im Zellkern zu finden (siehe Abb. 3.9.). GFP-*HvFP1* Fusionsproteine mit intaktem Isoprenylierungsmotiv (Abb. 3.9. D) akkumulieren im Zellkern an distinkten Positionen besonders stark. Im Gegensatz dazu verteilen sich *HvFP1*-GFP Fusionsproteine, die aufgrund maskierter (Abb. 3.9. B) oder gezielt durch Mutation veränderter Isoprenylierungsmotive (Abb. 3.9. C) nicht isoprenyliert werden können, im gesamten Zellkern deutlich gleichmäßiger. Allerdings sind auch die nicht isoprenylierten *HvFP1*-GFP Fusionsproteine in

größeren Mengen in den Bereichen der Nucleoli nachweisbar. Die Kernlokalisierung der HvFP1-GFP Fusionsproteine spricht für eine molekulare Funktion von HvFP1, die einen Einfluss auf regulatorische Prozesse innerhalb des Zellkerns haben kann.

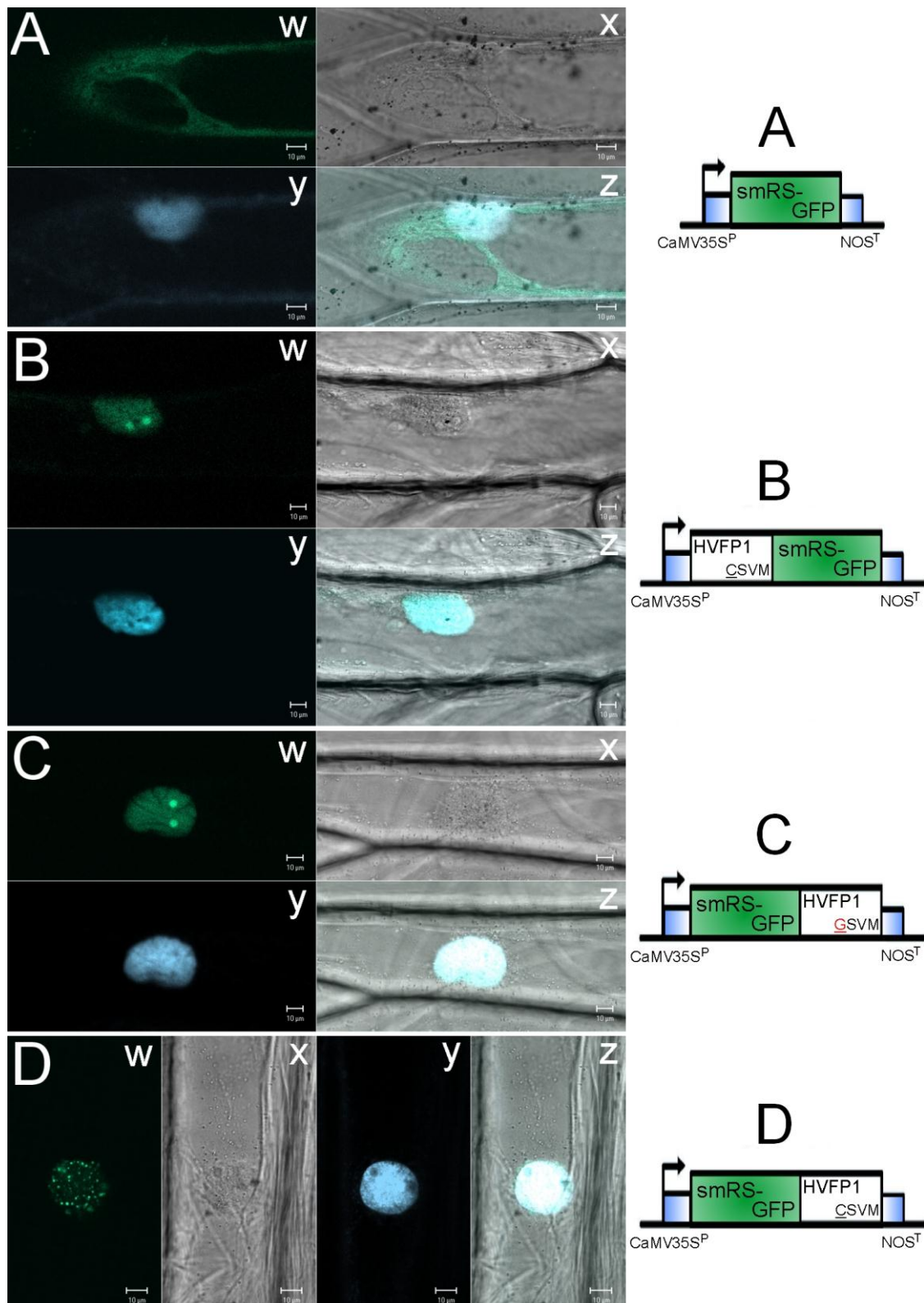


Abb. 3.9. Zelluläre Lokalisierung von GFP (A), HvFP1-GFP (B), GFP-HvFP1-C152G (C) und GFP-HvFP1 (D) heterolog in Zwiebelepidermiszellen. Es wurde mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop ausgewertet. Es sind der GFP Kanal (w), der differentielle Interferenzkontrast DIC (x), der DAPI Kanal (y) und alle drei Kanäle übereinandergelegt (z) dargestellt.

3.2. HIPPs in *Arabidopsis thaliana*

Das im Kapitel 3.1. vorgestellte Gen *HvFP1* aus Gerste wird bei abiotischem Stress, wie Kälte und plötzlichem Wassermangel, durch exogen applizierte Abscisinsäure und während der natürlichen Blattseneszenz induziert. Hohe Expressionslevel sind vor allem in jungen Sprossen nachweisbar. Daraus ergibt sich die Frage nach der Bedeutung, die das Protein HvFP1 unter diesen Bedingungen in den entsprechenden Organen der Gerste hat. Auf der Basis der in Kapitel 3.1. präsentierten Daten lässt sich folgende Hypothese formulieren: HvFP1 versorgt als potentiell Schwermetallchaperon mit seiner HMA-Domäne Zielproteine im Zellkern mit Schwermetallen wie Zink oder Kupfer und greift so möglicherweise in regulatorische Netzwerke der abiotischen Stressantwort ein. In Gerste konnten, wie bereits erwähnt, zwei weitere Proteine identifiziert werden, die sich ebenfalls durch das Vorhandensein einer HMA Domäne, eines C-terminalen Isoprenylierungsmotives (CaaX-Box) und putativer Kernlokalisierungssignale auszeichnen. Interessant daran ist vor allem das gemeinsame Auftreten von HMA Domäne und CaaX-Box innerhalb ein und derselben Peptidsequenz. Diese Besonderheit ist bisher nur für Proteine von höheren Pflanzen beschrieben worden, wobei die meisten Untersuchungen mit der Pflanze *Arabidopsis thaliana* durchgeführt worden sind (z.B. Dykema et al., 1999; Wintz und Vulpe, 2002). Die in diesem Kapitel dargestellten weiteren Analysen zur Rolle von Proteinen mit HMA-Domäne und CaaX-Box sind unter Verwendung dieser Modellpflanze erarbeitet worden.

3.2.1. HIPPs und andere Proteine mit HMA Domäne in *Arabidopsis thaliana*

Durch Recherchen in den *Arabidopsis thaliana* Sequenzdatenbanken können 76 Proteine identifiziert werden, die innerhalb ihrer Aminosäuresequenz einen zur HMA Domäne ähnlichen Bereich aufweisen (siehe Tab. 3.1. und 3.2.). Von diesen 76 Proteinen mit HMA Domäne besitzen 46 am C-Terminus eine CaaX-Box und sind somit potentielle Substrate von Farnesyl- und/oder Geranylgeranyltransferasen. Aufgrund der beiden für diese Proteinfamilie charakteristischen Sequenzmerkmale werden alle Vertreter als HIPPs ('heavy metal associated, isoprenylated plant proteins', engl. für Schwermetall assoziierte, isoprenylierbare pflanzliche Proteine) bezeichnet (Barth et al., 2009). Das 'WOLF PSORT' Programm (Horton et al., 2007) sagt für 27 der 46 HIPPs eine zelluläre Lokalisierung im Nukleus und/oder ein Kernlokalisierungssignal voraus. 10 HIPPs besitzen zwei HMA Domänen. Die HIPPs HIPP5 alias ATFP2, HIPP7 alias ATFP3, HIPP16 alias ATFP4, HIPP26 alias ATFP6 und HIPP22 alias ATFP7 sind 1999 von Dykema und seinen Kollegen als *in vitro* farnesylierte Proteine identifiziert worden. Das *HIPP6* Gen alias *cdi19* wurde 2001 von Suzuki und seinen Kollegen bei der Suche nach Genen, deren Expression durch Cadmium induzierbar ist, erstmals erwähnt. Es konnte gezeigt werden, dass HIPP6 (*cdi19*) sowohl Cd^{2+} , als auch Cu^{2+} und Hg^{2+} Ionen binden kann (Suzuki et al., 2002). *HIPP18* alias MEE56 wurde bei der Suche nach Mutanten mit Defekten während der Entwicklung weiblicher Gametophyten identifiziert. Das Ausschalten von *HIPP18* stoppt die Entwicklung des Endosperm (Pagnussat et al., 2005). Weitere Hinweise auf die molekulare Funktion der HIPPs konnten bisher nicht gefunden werden.

Die Aminosäuresequenzbereiche der HMA Domänen aller 76 *Arabidopsis* HMA Proteine können mittels ClustalW Algorithmus miteinander verglichen und aus den resultierenden Sequenzunterschieden ein phylogenetischer Baum erstellt werden. In einem solchen phylogenetischen Baum wird optisch deutlich, dass die HMA Proteine grob in 8 Gruppen, sogenannte Cluster, eingeteilt werden können (siehe Abb. 3.10.).

Tab. 3.1. Arabidopsis thaliana Proteine mit Aminosäuresequenzbereichen die Ähnlichkeit zur HMA Domäne (PFAM00403.Feb 2010) haben.

Bitscore errechnet mit Conserved Domain Search (Marchler-Bauer und Bryant 2004), Wolf PSORT Vorhersage (Horton et al. 2007)², n.s.f. = CD-Cearch hat keine signifikante Ähnlichkeit zu PFAM00403 gefunden, dann ist die 'Align Score' mit dem NCBI Protein BLAST und folgenden 'Scoring' Parametern verwendet worden (Matrix: PAM70, Gap Costs: Existence: 10, Extension: 1, no adjustment, no filter).

Genbank accession	AGI code	Name	Sequenzvergleich mit HMA Domäne (Bitscore) ¹	Lokalisierungsvorhersage ² (k-Nearest-Neighbor-Algorithmus)	NLS ²	CaaX-Box ²	Funktion
NP_568105.1	AT5G02600		71.10	chlor: 10, extr: 2, nucl: 1, cyto: 1	nein	-	
NP_176533.1	AT1G63440	AHMA5	69.17 und 57.23 und 42.59	plas: 13, E.R.: 1	ja	-	P1B-type ATPase (Cu and Ag) Andrés-Colás et al. 2006
NP_187173.2	AT3G05220	HIPP34	69.17	nucl: 9, pero: 2, cyto: 1, mito: 1, plas: 1	nein	CSIM	
NP_566273.1	AT3G06130	HIPP32	65.70	nucl: 5, cyto: 5, mito: 4	nein	CDIM	
NP_198121.1	AT5G27690	HIPP36	65.32	nucl: 12, chlor: 1, plas: 1	ja	CCVM	
NP_197410.1	AT5G19090	HIPP33	64.93	nucl: 8, cyto: 6	nein	CNIM	
NP_180434.2	AT2G28660		62.24	chlor: 7.5, chlor_mito: 6.5, mito: 4.5, nucl: 1, plas: 1	ja	-	
NP_172122.1	AT1G06330	HIPP28	62.24	nucl: 5, cyto: 5, chlor: 3, plas: 1	nein	CSIM	
NP_198292.1	AT5G44790	AHMA7 (RAN1)	61.47 und 61.08 und 32.96	plas: 12, E.R.: 2	ja	-	P1B-type ATPase (Cu) Hirayama et al. 1999
NP_181275.2	AT2G37390		61.08	chlor: 8, extr: 3, nucl: 1, cyto: 1, mito: 1	nein	-	
NP_174205.1	AT1G29100	HIPP29	61.08	chlor: 9, nucl: 3, mito: 1, plas: 1	nein	CSIM	
NP_173713.1	AT1G23000	HIPP37	60.70	nucl: 10, plas: 2, cyto: 1, mito: 1	nein	CNIM	
NP_198958.1	AT5G03380	HIPP6 (cdf19)	60.31 und 46.83	cyto: 12, chlor: 1, nucl: 1	ja	CSVM	Cd induziert, bindet Cd, Cu und Hg (cdf19), Suzuki et al. 2002
NP_568913.1	AT3G48970	HIPP31	59.54	cyto: 12, chlor: 2	nein	CTIM	
NP_198602.1	AT5G37860		58.77	nucl: 4.5, mito: 4, cyto_nucl: 4, cyto: 2.5, chlor: 2, pero: 1	nein	-	
NP_177261.1	AT1G71050	HIPP20	56.07	chlor: 8, nucl: 2, cyto: 2, extr: 2	ja	CTVM	
NP_564713.1	AT1G56210	HIPP35	56.07	nucl: 12, cyto: 2	ja	CAIM	
NP_974795.1	AT5G17450	HIPP21	55.69	cyto: 12, mito: 1, plas: 1	ja	CSIM	
NP_849973.2	AT2G18196	HIPP30	55.69	cyto: 13, extr: 1	nein	CSLM	
NP_190921.2	AT3G53530		54.92	chlor: 7, nucl: 4, cyto: 1, plas: 1, cysk: 1	ja	-	
NP_173712.1	AT1G22990	HIPP22 (ATFP7)	54.92	cyto: 6, nucl: 4, chlor: 2, plas: 2	ja	CTVM	<i>in vitro</i> farnesyliert (ATFP7) Dykema et al. 1999
NP_567924.1	AT4G33520	AHMA6 (PAA1)	54.15	mito: 8, chlor: 6	nein	-	P1B-type ATPase (Cu) Shikanei et al. 2003
NP_563910.2	AT1G12520	CCS	54.15	pero: 11, cyto: 2.5, cyto_nucl: 2	nein	-	Kupfer Chaperon der Cu/Zn SOD (Chu et al. 2005)
NP_568449.1	AT5G24580	HIPP9	52.61 und 39.12	cyto: 8, chlor: 3, nucl: 1, mito: 1, extr: 1	nein	CCIS	
NP_56855.1	AT2G38950	HIPP5 (ATFP2)	52.22 und 47.98	cyto: 8, chlor: 3, pero: 3	nein	CSVM	<i>in vitro</i> farnesyliert (ATFP2) Dykema et al. 1999
NP_195680.1	AT4G39700	HIPP23	52.22	chlor: 6, cyto: 4, nucl: 3, cysk: 1	ja	CSIM	
NP_564870.1	AT1G66240	ALATX1	51.84	chlor: 7, pero: 6, nucl: 1	nein	-	Kupfer Chaperon (Puig et al. 2007 b)
NP_192597.1	AT4G08570	HIPP24	51.84	chlor: 6, cyto: 5, nucl: 2, extr: 1	ja	CAIM	
NP_567975.1	AT4G35060	HIPP25	50.68	cyto: 10, chlor: 2, nucl: 2	ja	CVVM	
NP_201412.2	AT5G66110	HIPP27	50.68	cyto: 11, nucl: 2, mito: 1	nein	CTIM	
NP_566747.1	AT3G24450		50.29	chlor: 5, cyto: 5, nucl: 1, mito: 1, extr: 1, cysk: 1	nein	-	
NP_567779.1	AT4G27590	CCH-like	49.91	extr: 5, nucl: 4, chlor: 2, cyto: 2, golg: 1	ja	-	
NP_568974.1	AT5G63530	HIPP7 (ATFP3)	49.52 und 46.44	cyto: 6, chlor: 5, cysk: 2, nucl: 1	nein	CTVM	<i>in vitro</i> farnesyliert, bindet Cu, Zn, Ni (ATFP3) Dykema et al. 1999
NP_188946.1	AT3G02960	HIPP8	49.52 und 35.27	nucl: 8, cyto: 3, extr: 2, chlor: 1	ja	CSIM	
NP_195570.1	AT4G38580	HIPP26 (ATFP6)	49.14	cyto: 11, chlor: 2, nucl: 1	ja	CVVM	<i>in vitro</i> farnesyliert (ATFP6) Dykema et al. 1999
NP_001078368.1	AT4G10465	HIPP44	48.75	chlor: 13.0	ja	CRLM	
NP_680181.2	AT5G21930	AHMA8 (PAA2)	48.37	chlor: 5, plas: 5, mito: 3, pero: 1	ja	-	P1B-type ATPase (Cu) Abdel-Ghany et al. 2005
NP_191183.1	AT3G56240	CCH	48.37	chlor: 10, cyto: 2, mito: 1, extr: 1	nein	-	Kupfer Chaperon (Himeibiau et al. 1998)

Tab. 3.2. *Arabidopsis thaliana* Proteine mit Aminosäuresequenzbereichen die Ähnlichkeit zur HMA Domäne (PFAM00403.Feb 2010) haben.

Bitscore errechnet mit 'Conserved Domain Search' (Marchler-Bauer und Bryant 2004)¹, Wolf PSORT Vorhersage (Horton et al. 2007)², n.s.f. = CD-Ceatch hat keine signifikante Ähnlichkeit zu PFAM00403 gefunden, dann ist die 'Align Score' mit dem NCBI Protein BLAST und folgenden Scoring Parametern verwendet worden (Matrix: PAM70, Gap Costs: Existence: 1, no adjustment, no filter).

Genbank accession	AGI code	Name	Sequenzvergleich mit HMA Domäne (Bitscore) ¹	Lokalisierungsvorhersage ² (k-Nearest-Neighbor-Algorithmus)	NLS ²	CaaX-Box ²	Funktion
NP_566264.1	AT3G05920	HIPP43	47.98	extr: 5.0, chlo: 4.0, cyto: 4.0	nein	CTIL	
NP_200888.2	AT5G60800	HIPP3	47.21 und 39.12	nuci: 6, chlo: 3, cyto: 2, mito: 1, plas: 1, cysk: 1	ja	CVVM	
NP_199887.2	AT5G50740	HIPP45	46.44 und 44.52	cyto: 7, nuci: 3, mito: 1, plas: 1, extr: 1, cysk: 1	ja	CTII	
NP_175974.1	AT1G55780	HIPP41	46.06	chlo: 14.0	nein	CRIL	
NP_974601.1	AT4G23882		45.67	cyto: 4, chlo: 3, nuci: 2, plas: 2, extr: 1, vacu: 1, E.R.: 1	ja	-	
NP_001078533.1	AT5G05365		45.29	chlo: 7.0, extr: 4.0, cyto: 2.0	nein	-	
NP_850876.1	AT5G26690	HIPP2	44.90	extr: 6, chlo: 5, cyto: 3	nein	CTIV	
NP_180376.1	AT2G28090	HIPP1	44.13 und 35.66	nuci: 5, cyto: 4, chlo: 2, extr: 2, cysk: 1	ja	CSYM	
NP_200087.1	AT5G52750	HIPP13	43.75	nuci: 8, cyto: 3, pero: 2, extr: 1	nein	CVIM	
NP_001031117.1	AT1G30473		43.75	nuci: 12.0, chlo: 1.0	ja	-	
NP_176578.1	AT1G63950	HIPP15	43.36	nuci: 8.5, cysk nuci: 5, cyto: 4, chlo: 1	nein	CVIC	
NP_188786.1	AT3G21490	HIPP19	41.05	cyto: 5, extr: 5, chlo: 1, nuci: 1, plas: 1, cysk: 1	ja	CSIS	
NP_176089.1	AT1G57780	HIPP17	40.67 und 26.80	extr: 11, chlo: 2, cysk: 1	nein	CSIS	
NP_171656.1	AT1G01490	HIPP39	40.28	cyto: 8.0, nuci: 3.0, chlo: 2.0	ja	CVIC	
NP_200086.1	AT5G52740	HIPP12	39.51	cyto: 11, extr: 2, mito: 1	ja	CVTS	
NP_174195.1	AT1G29000	HIPP4	37.97 und 30.26	cyto: 11, cysk: 2, extr: 1	ja	CRVS	
NP_193074.1	AT4G13380	HIPP18	37.97	cyto: 7, extr: 3, chlo: 2, nuci: 2	nein	CSIS	MEE56 (maternal. effect embryo arrest 56) Pagnussat et al. 2005
NP_187141.1	AT3G04900	HIPP42	37.97	nuci: 4.0, cyto: 3.0, mito: 3.0, chlo: 1.0, extr: 1.0, cysk: 1.0	ja	CSIM	
NP_194740.1	AT4G30110	AHMA2	37.58	plas: 12, vacu: 1, E.R.: 1	ja	-	PIB-type ATPase (Zn, Cd) Eren and Argiello 2004, Hussain et al. 2004
NP_194741.2	AT4G30120	AHMA3	37.20	plas: 8, vacu: 4, E.R.: 2	nein	-	PIB-type ATPase (Zn, Cd, Co, Pb) Gravot et al. 2004, Hussain et al. 2004
NP_179501.1	AT2G19110	AHMA4	36.81	plas: 11, nuci: 2, mito: 1	ja	-	PIB-type ATPase (Zn, Cd, Co, Pb) Verret et al. 2004, Hussain et al. 2004
NP_200089.1	AT5G52770		35.27	extr: 6, chlo: 3, cyto: 3, nuci: 1, golg: 1	nein	CLFF	
NP_565819.1	AT2G35730		34.89	cyto: 4.5, chlo: 4.0, plas: 3.0, cyto_nuci: 3.0, mito: 1.0	ja	-	
NP_187417.1	AT3G07600	HIPP16 (ATFP4)	34.12	cyto: 5, nuci: 4, chlo: 3, mito: 1, plas: 1	nein	CRIM	<i>in vitro</i> farnesylert (ATFP4) Dykema et al. 1999
NP_974659.1	AT4G16380	HIPP46	34.12	cyto: 8.0, chlo: 3.0, extr: 2.0	nein	CSIM	
NP_200085.1	AT5G52730	HIPP11	33.73	cyto: 8, nuci: 3, plas: 1, extr: 1, cysk: 1	ja	CIIM	
NP_175520.1	AT1G51090	HIPP40	33.73	chlo: 10.0, cyto: 2.0, nuci: 1.0	nein	CSIM	
NP_200088.1	AT5G52760	HIPP14	33.35	cyto: 5, extr: 5, chlo: 4	nein	CVIM	
NP_175367.1	AT1G49420	HIPP38	32.19	nuci: 8, mito: 4, chlo: 1, plas: 1	nein	CSIM	
NP_568436.1	AT5G23760		29.11	cyto: 9.0, plas: 3.0, chlo: 1.0	ja	-	
NP_200081.1	AT5G52690		27.95	cyto: 5, extr: 5, nuci: 2, chlo: 1, golg: 1	nein	-	
NP_200084.2	AT5G52720	HIPP10	25.64	chlo: 4, extr: 3, nuci: 2, cyto: 2, plas: 2, mito: 1	nein	CIIL	
NP_200080.1	AT5G52680		24.10	cysk: 6, cyto: 3, extr: 3, chlo: 1, nuci: 1	nein	-	
NP_566781.1	AT3G25855		23.72	nuci: 4, cyto: 4, mito: 2, plas: 2, chlo: 1, cysk: 1	nein	-	
NP_200082.1	AT5G52700		n.s.f. (25.3 bits (52))	cyto: 6.5, cyto_nuci: 4, E.R.: 3, mito: 1, plas: 1, extr: 1, pero: 1	ja	-	
NP_200079.1	AT5G52670		n.s.f. (20.4 bits (40))	cyto: 7, extr: 4, chlo: 2, nuci: 1	ja	-	
NP_564933.1	AT1G68585		n.s.f. (16.1 bits (30))	chlo: 5.0, nuci: 3.0, extr: 3.0, cyto: 1.0, plas: 1.0	ja	-	
NP_200083.1	AT5G52710		n.s.f. (12.3 bits (21))	nuci: 13.0	ja	-	

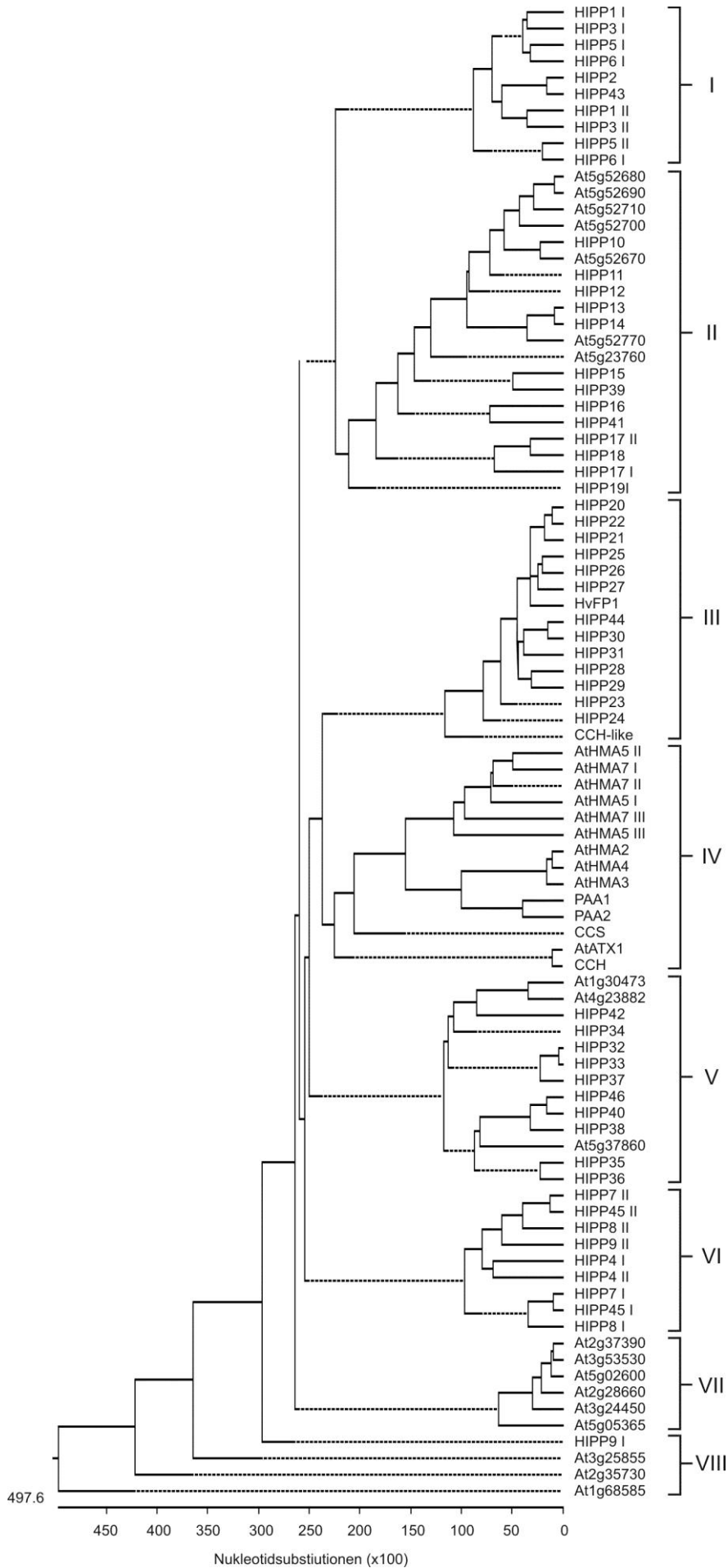


Abb. 3.10. Phylogenetischer Baum der HMA Domänen von *Arabidopsis thaliana* Proteinen und HvFP1 aus *Hordeum vulgare*.

Der Baum basiert auf einem Sequenzvergleich, der mit einem ClustalW Algorithmus des MegAlign Modules der Lasergene Software (DNASTAR Inc., Madison, USA) erstellt worden ist. Für *Arabidopsis* Proteine mit unbekannter Funktion ist der AGI Code für den Genlocus als Bezeichnung verwendet worden.

Interessant ist, dass sich sowohl die HMA Domänen der Cu^{1+} transportierenden Chaperone (AtATX1, CCH und CCS) und $\text{P}_{1\text{B}}$ -Typ ATPasen (AtHMA5, AtHMA6, AtHMA7 und AtHMA8) als auch die HMA Domänen der Zn^{2+} transportierenden $\text{P}_{1\text{B}}$ -Typ ATPasen (AtHMA2, AtHMA3 und AtHMA4) gemeinsam in Cluster IV anordnen. Dies ist ein Hinweis auf eher funktionelle statt Schwermetall-spezifische Gemeinsamkeiten der entsprechenden HMA Proteine in den jeweiligen Gruppen. Die HMA Domäne des Gersten-HIPPs HvFP1 gruppiert sich in Cluster III. Dies deutet an, dass in diesem Cluster die *Arabidopsis*-HIPPs mit ähnlicher molekularer Funktion zu finden sind.

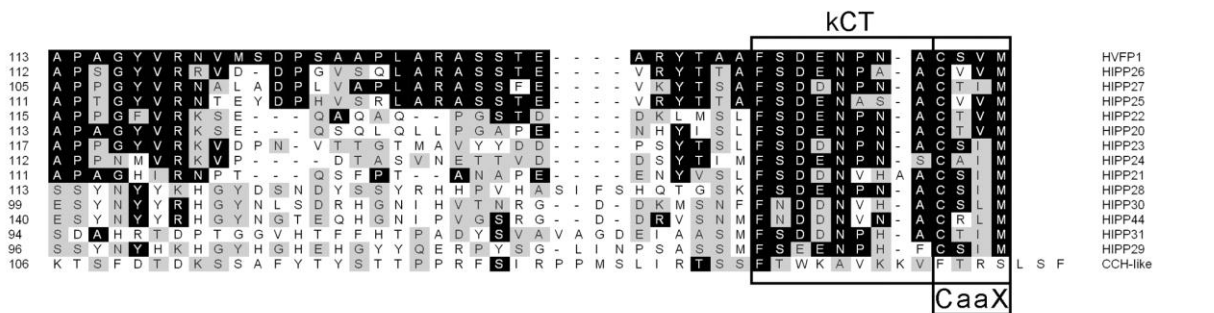
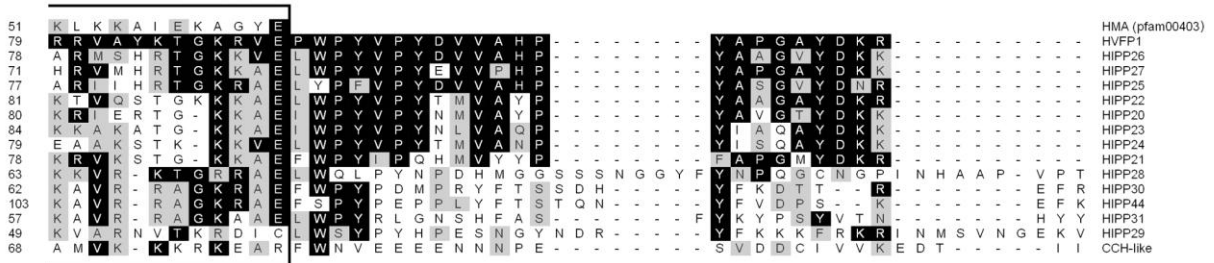
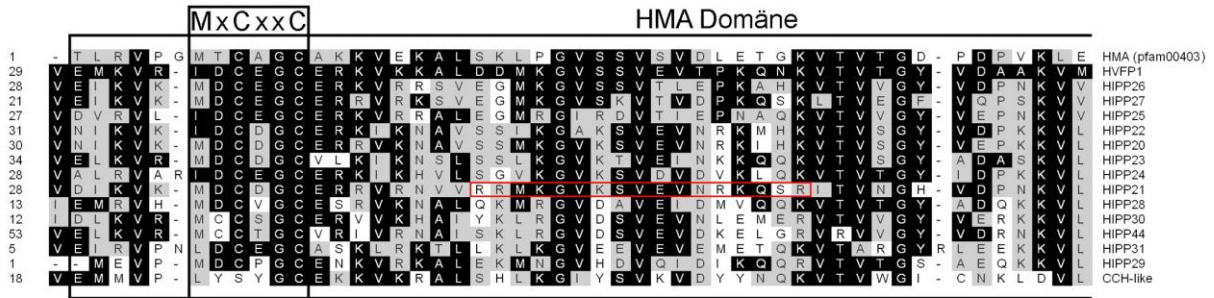
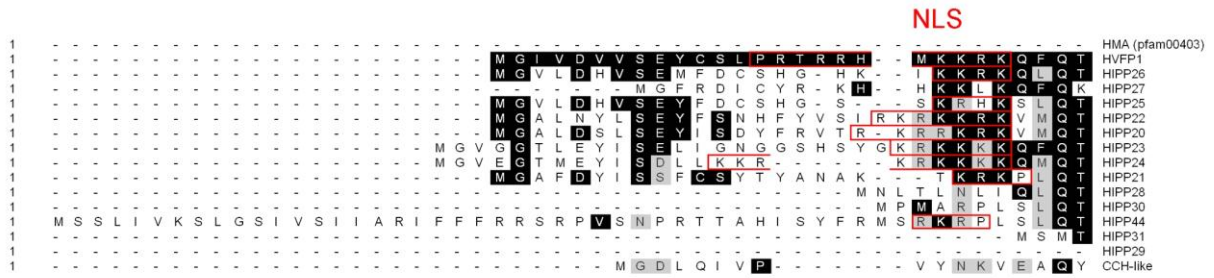
3.2.2. HIPPs in Cluster III

Cluster III (siehe Abb. 3.10.) umfasst 13 *Arabidopsis*-HIPPs und ein 'CCH-like' Protein, welches diese Bezeichnung in den Sequenzdatenbanken aufgrund seiner Ähnlichkeit zum Kupferchaperon CCH erhalten hat. Die jeweiligen Molekulargewichte liegen im Bereich zwischen 16 und 21kDa. Es handelt sich also um relativ kleine Proteine. Ein Sequenzvergleich der vollständigen Polypeptidketten zeigt, dass die N-Termini und die Bereiche zwischen HMA Domäne und konserviertem C-Terminus (kCT) inklusive CaaX-Box die größten Unterschiede aufweisen (siehe Abb. 3.11.). Interessant ist u.a. die hohe Ähnlichkeit im Bereich des Schwermetallbindemotives (MxCxxC). Hier sind auffällig viele negativ geladene Aminosäurereste zu finden. Außer HIPP30, HIPP44 und dem CCH-like Protein besitzen alle HIPPs in Cluster III direkt vor dem ersten Cystein des MxCxxC Motivs ein Aspartat. Die gleiche Aminosäurekonstellation ist in bakteriellen Zn^{++} -ATPasen vom ZntA-Typ vorhanden (Eren et al., 2007). HIPP30 und HIPP44 tragen an dieser Aminosäureposition ein Cystein, ähnlich wie die pflanzlichen Zn^{++} -ATPasen AtHMA2, AtHMA3 und AtHMA4. Bei diesem Vergleich zeigen sich allerdings auch deutliche Unterschiede, da die Zink-Pumpen in ihrem Kernmotiv der Schwermetallbindedomäne (ICCxxE) nur zwei Cysteinreste aufweisen. Eine weitere stark konservierte Aminosäureposition ist das Glycin direkt vor dem zweiten Cystein der Schwermetallbindestelle. Zudem tragen HIPP24, HIPP25, HIPP26, HIPP27 und HvFP1 jeweils zwei Glutamatseitenketten, welche direkt auf die beiden Cysteine im Kernmotiv der HMA Domäne folgen. Vermutlich haben diese konservierten Aminosäurereste einen großen Einfluss auf die Affinität der HIPPs zum entsprechend transportierten Schwermetallion. Eren et al., (2007) konnten einen derartigen Einfluss auf die Bindung von Zinkionen für die Glutamatseitenkette im ICCxxE Kernmotiv der Schwermetallbindedomäne von AtHMA2 nachweisen. Ähnliche Analysen sollten für die HIPPs ebenfalls durchgeführt werden.

Mit Hilfe des 'WOLF PSORT' Programms (Horton et al., 2007) sind Kernlokalisierungssignale (NLS) für die HIPPs 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 und 44 vorhergesagt worden. Der Algorithmus des NetNES Server (La Cour et al., 2004) sagt für die HIPPs 21, 23, 26, 28, 30, 31 und 44 Leucin-reiche Kernexportsignale (NES) voraus. Zwei Sequenzbereiche in HIPP25 und HIPP27 verfehlen bei einer entsprechenden Analyse den Schwellenwert für eine positive NES Vorhersage nur knapp (Daten nicht gezeigt).

HIPP26 aus *Arabidopsis* besitzt mit 64,7% identischen Aminosäuren die größte Ähnlichkeit zu HvFP1 aus *Hordeum vulgare*. HIPP27 und HIPP25 weisen ebenfalls zu HvFP1 stark orthologe Aminosäuresequenzen auf (siehe Abb. 3.11.). Obwohl HIPP27 in der entsprechenden N-terminalen Region viele aufeinander folgende positiv geladene Aminosäurereste aufweist, hat WOLF PSORT kein bekanntes Kernlokalisierungssignal identifizieren können. Vermutlich verhindert die Aminosäure Leucin in Position 15 der HIPP27 Peptidsequenz eine positive NLS-Vorhersage.

3.2. HIPPs in *Arabidopsis thaliana*



identische Aminosäuren (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
1	■	35.5	30.6	29.0	25.8	32.3	32.3	35.5	41.9	30.6	33.9	38.7	38.7	35.5	35.5	33.9	1	HMA (pfam00403)
2	102.1	■	64.7	62.6	58.8	53.9	52.0	47.7	47.3	47.0	34.8	33.1	31.6	29.3	27.0	20.6	2	HVFP1
3	120.6	44.3	■	66.7	74.5	52.6	54.6	48.4	48.7	47.0	30.1	28.9	30.7	29.3	27.7	13.7	3	HIPP26
4	127.7	47.6	38.5	■	55.1	47.6	51.0	48.3	43.5	48.3	34.0	27.5	27.9	31.4	30.5	15.0	4	HIPP27
5	143.8	59.0	30.4	62.6	■	45.4	45.4	39.2	40.7	38.9	31.4	31.0	30.7	29.3	27.7	17.6	5	HIPP25
6	120.6	65.8	68.1	75.2	88.4	■	75.0	57.2	55.3	53.7	33.6	35.2	32.2	27.1	25.5	20.4	6	HIPP22
7	114.0	66.7	64.3	69.2	85.4	28.0	■	52.0	44.7	57.7	34.9	35.2	34.9	30.7	29.1	16.4	7	HIPP20
8	102.1	73.1	78.1	78.9	106.6	63.7	63.7	■	61.3	47.0	35.4	28.9	31.6	31.4	30.5	17.3	8	HIPP23
9	84.3	70.4	77.1	83.7	97.0	60.9	72.8	51.8	■	36.9	31.3	27.5	30.7	33.6	30.5	19.3	9	HIPP24
10	127.7	77.2	81.7	66.5	106.4	66.5	54.9	92.5	105.4	■	27.5	35.9	32.2	27.9	23.4	19.5	10	HIPP21
11	107.8	107.6	139.6	125.5	135.9	133.2	125.1	117.3	127.3	136.9	■	40.1	35.2	29.3	43.3	21.8	11	HIPP28
12	102.1	128.8	151.8	156.2	139.6	119.4	121.8	135.9	146.3	113.2	107.3	■	70.4	35.7	36.2	17.6	12	HIPP30
13	91.5	155.5	149.2	153.6	153.1	146.9	148.1	134.5	152.1	136.3	110.9	37.6	■	31.4	29.8	15.4	13	HIPP44
14	93.8	128.3	130.6	118.2	135.6	116.5	119.0	109.7	123.2	126.7	129.0	123.9	127.3	■	27.1	22.1	14	HIPP31
15	111.5	152.6	166.3	157.4	173.5	158.4	142.3	136.8	128.7	158.4	84.8	126.0	136.9	152.3	■	14.9	15	HIPP29
16	114.0	201.0	221.0	224.0	214.0	193.4	206.0	196.0	198.0	226.0	217.0	221.0	228.0	198.0	258.0	■	16	CCH-like
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		

←

Abb. 3.11. Aminosäuresequenzvergleich der *Arabidopsis* HIPPs und des CCH-like Proteins aus Cluster III, der HMA Consensussequenz (PFAM00403.Feb 2010) und HvFP1 aus *Hordeum vulgare*. Der Sequenzvergleich ist mit einem ClustalW Algorithmus des MegAlign Moduls der Lasergene Software (DNASTAR Inc., Madison, USA) erstellt worden. Mit Wolf PSORT vorhergesagte Kernlokalisierungssignale (NLS) sind rot eingerahmt. Des Weiteren sind die Bereiche der HMA Domäne mit dem Schwermetallbindemotiv (MxCxxC) und der konservierte C-Terminus (kCT) mit dem Isoprenylierungsmotiv (CaaX) eingezeichnet. Mit HvFP1 identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Aminosäuren grau unterlegt. Der prozentuale Anteil identischer Aminosäuren der HIPPs und des CCH-like Proteins zu HvFP1 ist rot markiert. Die Divergenz wird bezogen auf die phylogenetische Verwandtschaft des jeweiligen Paares und die prozentuale Identität aus dem direkten Vergleich der Aminosäuren errechnet.

3.2.2.1. Kernlokalisierung von GFP-HIPP25, GFP-HIPP26 und GFP-HIPP27

Wird HIPP26, das am stärksten zu HvFP1 orthologe *Arabidopsis* Protein, ähnlich wie HvFP1 (siehe Kapitel 3.1. Abb. 3.9.) als chimäres GFP-Fusionsprotein heterolog in Zwiebelepidermiszellen exprimiert, kann anhand der entsprechenden GFP-Fluoreszenz der Import des GFP-HIPP26 Fusionsproteins in den Zellkern sichtbar gemacht werden (siehe Abb. 3.12.).

Die isoprenylierbare Form von GFP-HIPP26 (Abb. 3.12. B und 3.13. B) akkumuliert ähnlich wie das orthologe GFP-HvFP1 aus Gerste innerhalb des Zellkernes an distinkten Punkten. Die Gesamtfluoreszenz im Nukleus ist allerdings insgesamt höher, d.h. im Vergleich zu GFP-HvFP1 ist ein kleinerer Anteil an GFP-HIPP26 in den definierten Akkumulationspunkten zu finden. GFP-HIPP26 Proteine, die aufgrund einer gerichteten Mutagenese nicht isoprenyliert werden können, akkumulieren ebenfalls im Zellkern (Abb. 3.12. C). Sie sind, ähnlich wie nicht isoprenylierte GFP-HvFP1 Proteine (Abb. 3.9. B und C), verstärkt in den Nucleoli nachweisbar. Die in allen Fällen am Fluoreszenzmikroskop schwach sichtbare GFP-Fluoreszenz am Plasmalemma ist in konfokal-Laser-gescannten Mikroskopbildern nicht sichtbar. Die Ursache hierfür ist der große Intensitätsunterschied zu den Fluoreszenzsignalen in den Zellkernen.

GFP-HIPP25 wird in Zwiebelepidermiszellen ebenfalls nahezu vollständig in den Zellkern transportiert (Abb. 3.13. D). Obwohl es sich, wie bei GFP-HIPP26 (Abb. 3.12. B und 3.13. B), um die isoprenylierbare Proteinversion handelt, ist das Fluoreszenzsignal fast gleichmäßig im gesamten Kern verteilt.

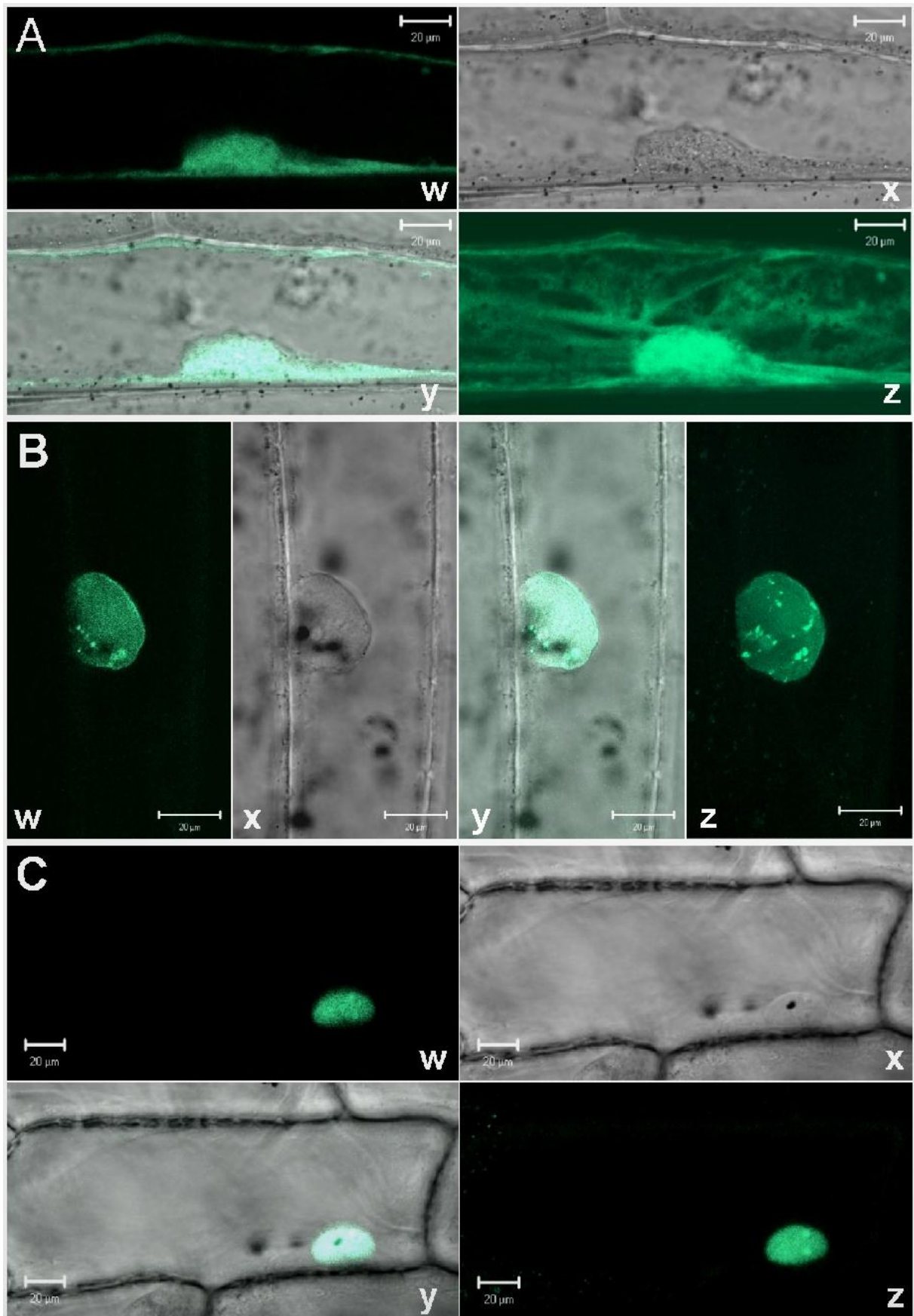
GFP-HIPP27, für welches kein Kernlokalisierungssignal vorhergesagt ist, akkumuliert ausschließlich innerhalb des Nukleus an scheinbar exakt definierten Positionen (Abb. 3.13. E).

Diese Experimente liefern somit erste Hinweise darauf, dass die drei *Arabidopsis* HIPPs mit der größten Ähnlichkeit zu HvFP1 aus Gerste ebenfalls in pflanzlichen Zellkernen lokalisiert sind. Dies spricht dafür, dass HIPP25, HIPP26 und HIPP27 an regulatorischen Prozessen innerhalb des Nukleus beteiligt sind.

Abb. 3.12. Zelluläre Lokalisierung von GFP (A), GFP-HIPP26 (B) und GFP-HIPP26-C150G (C) heterolog in Zwiebelepidermiszellen. Es wurde mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop ausgewertet. Es sind der GFP Kanal (w), der differentielle Interferenzkontrast DIC (x), beide Kanäle übereinandergelegt (y) und eine 3 dimensionale Projektion mehrerer optischer Schnitte durch die jeweilige Zelle im GFP Kanal (z) dargestellt. Für w, x und y liegt die Schnittebene etwa in der Mitte des Zellkerns.

↓

3.2. HIPPs in *Arabidopsis thaliana*



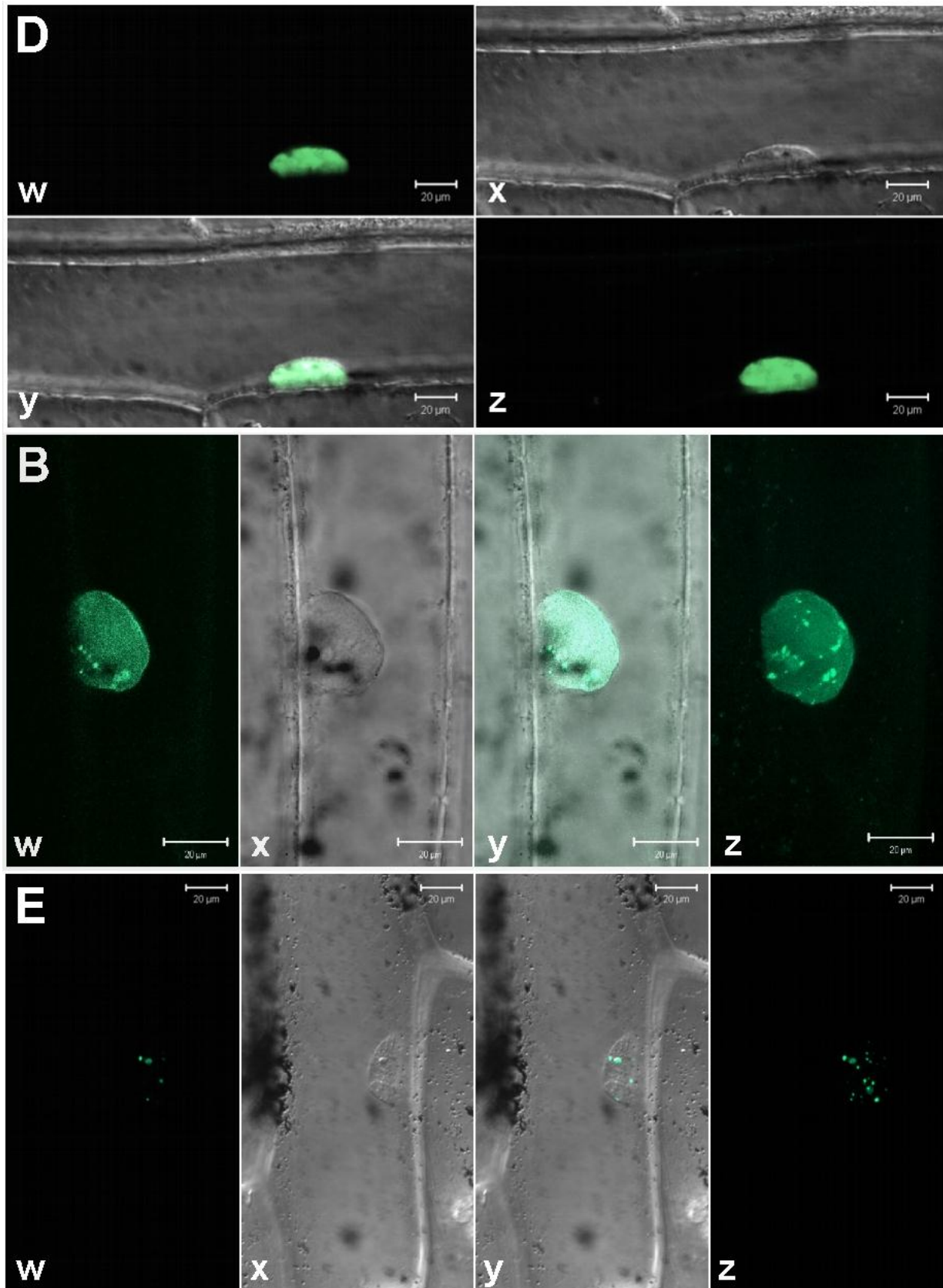


Abb. 3.13. Zelluläre Lokalisierung von GFP-HIPP25 (D), GFP-HIPP26 (B) und GFP-HIPP27 (E) heterolog in Zwiebelepidermiszellen. Es wurde mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop ausgewertet. Es sind der GFP Kanal (w), der differentielle Interferenzkontrast DIC (x), beide Kanäle übereinandergelegt (y) und eine 3 dimensionale Projektion mehrerer optischer Schnitte durch die jeweilige Zelle im GFP Kanal (z) dargestellt. Für w, x und y liegt die Schnittebene etwa in der Mitte des Zellkerns.

3.2.2.2. Entwicklungs- und Stress-abhängige Genexpression

HvFP1 ist aufgrund seiner starken transienten Induktion der Genexpression auf Transkriptebene, ausgelöst durch niedrige positive Temperaturen, isoliert worden (siehe Kapitel 3.1.). Quantitative RT-PCR Analysen zeigen auch für *HIPP23*, *24*, *25* und *26* durch Kältestress erhöhte Transkriptmengen an (Abb. 3.14.). Im Unterschied dazu sinken die *HIPP22*, *27* und *31* mRNA Gehalte in Kältestress behandelten *Arabidopsis* Pflanzen.

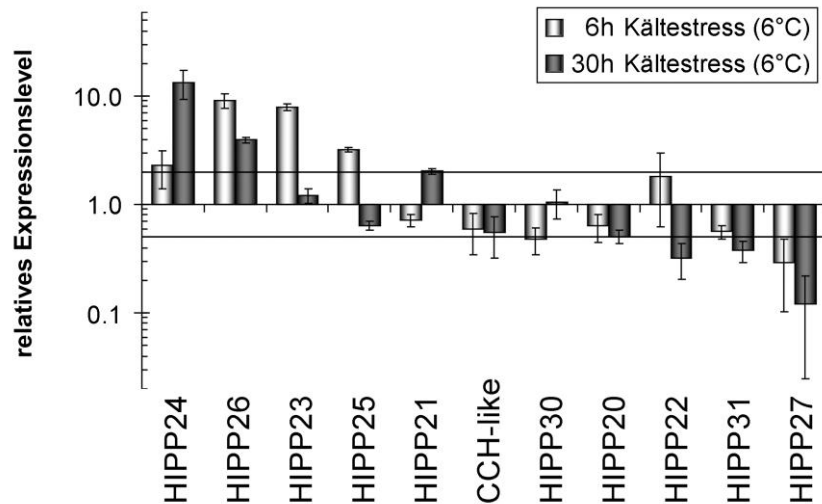


Abb. 3.14. Quantitative RT-PCR Analysen zur Expression des *CCH-like* Gens und der *HIPP* Gene aus Cluster III unter Kältestressbedingungen. Die relativen Expressionslevel bezogen auf die entsprechenden unbehandelten Kontrollen sind nach dem von Pfaffl et al., (2001) vorgeschlagenen mathematischen Modell, unter Verwendung des *18SrRNA* Referenzgens und der Korrektur auf die jeweilige PCR-Effizienz ermittelt worden. Der dargestellte Standardfehler ist auf der Grundlage von 3 biologischen Wiederholungen berechnet worden. Zusätzliche Hilfslinien sind bei relativen Expressionswerten von 2 und 0,5 eingezeichnet.

Northern-Analysen zeigen für *HIPP26* eine starke Induktion der Genexpression durch niedrige positive Temperaturen an. Das *HIPP26* Transkriptlevel liegt bei Kältestress für mindestens 48 Stunden auf einem sehr hohen Niveau (Abb. 3.15. A). Dies ist ein Unterschied zur Expression von *HvFP1* bei Kälte in Gerste. Dennoch ist die klare Induktion beider Gene durch niedrige Temperaturen ein Hinweis auf eine Funktion bei den Anpassungsreaktionen unter Kältestressbedingungen.

Wie im 1. Kapitel bereits erwähnt, gibt es in höheren Pflanzen Gene, die sowohl bei Kältestress als auch bei Wassermangel angeschaltet werden. Da *HvFP1* zu dieser Gruppe von Genen gehört (siehe Kapitel 3.1.2.), ist auch die Expression von *HIPP26* bei Trockenstress untersucht worden. Bei Wassermangel kommt es innerhalb von 1,5 Stunden zu einer geringfügigen Induktion von *HIPP26* (Abb. 3.15. B). 4 Stunden nach dem Entfernen des hydroponischen Mediums wird das Transkriptlevel der Kontrollpflanzen wieder erreicht. Deutlich stärker und anhaltender ist die Expression von *HIPP26* bei Salzstress (Abb. 3.15. B). Im Zusammenhang mit der Induktion der Genexpression bei osmotischem Stress, wie Trockenheit und hohen Salzkonzentrationen im Medium, ist auch die Frage nach dem Einfluss des Phytohormones Abscisinsäure sehr interessant. Die Expression von *HIPP26* ist bei einer Behandlung mit Abscisinsäure innerhalb eines Zeitraumes von 12 Stunden konstant (Abb. 3.15. B). Dies ist ein deutlicher Unterschied zur Expression von *HvFP1*, welche bereits 4 Stunden nach exogener Applizierung von ABA deutlich induziert wird (Abb. 3.6.).

In alternden Blättern und 8 Stunden nach Applikation von 50 μ M CuCl_2 sind geringere *HIPP26* mRNA Mengen nachweisbar (Abb. 3.15. B). Die Verringerung des *HIPP26* Trans-

3.2.2.3. *HIPP26*-Promotor-Analysen

Werden die HIPPs in allen Organen und Geweben gleichmäßig stark exprimiert? Um diese Frage zu klären, sind Promotor-GUS-Reporteranalysen für das *Arabidopsis* HIPP mit der größten Ähnlichkeit zu HvFP1 aus Gerste durchgeführt worden. Es sind unterschiedlich große Bereiche des *HIPP26* Promotors (1055bp, 620bp und 320bp) verwendet worden. Die Blaufärbung in den transgenen *Arabidopsis* Pflanzen zeigt, dass vor allem im Leitgewebe sehr starke Promotoraktivitäten vorhanden sind (Abb. 3.16.). Der etwa 1000bp umfassende Bereich vor dem *HIPP26* Gen sorgt für eine starke Reporteraktivierung in nahezu allen Zellen von jungen *Arabidopsis* Keimlingen. Eine besonders hohe Transkriptionsaktivität ist im Blattstiel, im Hypocotyl und wie bereits erwähnt im Leitgewebe von Wurzel und Spross nachweisbar. In ausgewachsenen Blättern sind die Leitgewebe ebenfalls die Bereiche mit der stärksten Aktivität des *HIPP26* Promotors (Abb. 3.16. D-F). Ein 321bp großes DNA-Fragment, das direkt vor dem Translationsstart ATG des *HIPP26* Gens liegt, ist für die Transkription des Reportergens im Bereich des Hypocotyls und im Leitgewebe von Wurzel und Spross ausreichend. Die Promotoraktivität dieses stark verkürzten Fragmentes ist auch im Leitgewebe ausgewachsener Blätter nachweisbar (Abb. 3.16. J-L), scheint aber im Vergleich zu den größeren Promotorkonstrukten deutlich geringer auszufallen. Interessant ist, dass die Reporteraktivierung im Bereich des Apikalmeristems und der neuen Blattanlagen nur unter Verwendung des 1000bp umfassenden DNA-Fragmentes detektiert werden kann.

Mit Hilfe der 'Plant cis-acting regulatory DNA elements' oder kurz PLACE Datenbank (Higo et al., 1999) und einer entsprechend computergestützten Analyse des Promotorbereiches von *HIPP26* können viele potentiell cis-regulatorische DNA-Sequenzmotive gefunden werden. In Abb. 3.16. sind einige wichtige Bindestellen für Stress-abhängige Transkriptionsfaktoren schematisch dargestellt. LTRE-1 (low temperature responsive element, Dunn et al., 1998), DRE2 (dehydration responsive element, Dubouzet et al., 2003), die MYC Bindestellen (u.a. Bindung von ICE1, dem Hauptaktivator von Kältegenen, Chinnusamy et al., 2003) und die MYB Bindestellen (Abe et al., 1997) können sowohl bei osmotischem als auch bei Kältestress wichtige Rollen spielen. GT-1 Boxen sind u.a. in die Regulierung der Genexpression bei Salz- und biotischem Stress involviert (Park et al., 2004). CCAAT Boxen werden u.a. bei der Hitzestressantwort benötigt (Haralampidis et al., 2002).

Abb. 3.16. *HIPP26*::GUS Promotor-Reporteranalysen zur Gewebe-spezifischen Transkriptionsaktivierung von *HIPP26* und schematische Darstellung einiger vorhergesagter cis-DNA-Elemente im *HIPP26* Promotor. Die Glucuronidase-Aktivität ist durch die Farbstofffreisetzung unter Verwendung von 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure sichtbar gemacht worden. Stabile transgene, 10 Tage alte *Arabidopsis* Keimlinge sowie Blätter von entsprechend ausgewachsenen Pflanzen der pGPTV-Kan Leervektorkontrolllinie (A-C) und von Linien, welche die 1055bp (D-F), 620bp (G-I) oder 320bp (J-L) umfassenden *HIPP26*::GUS Promotorkonstrukte tragen, sind analysiert worden. Potentielle regulatorische cis-DNA-Elemente sind mit einer entsprechenden computergestützten Suche in der 'Plant cis-acting regulatory DNA elements' oder kurz PLACE Datenbank (Higo et al., 1999) identifiziert worden.

↓

3.2.2.4. Die Identifizierung von Bindungspartnern, die mit den HIPPs interagieren

Wie in den vorangehenden Kapiteln gezeigt, handelt es sich bei *HIPP26* um ein Gen, welches sehr stark im Bereich der Leitgefäße exprimiert wird. Die Genexpression wird durch abiotischen Stress insbesondere durch niedrige Temperaturen induziert. Die große Ähnlichkeit der *HIPP26* Aminosäuresequenz zu der des zuvor in Gerste analysierten HvFP1 und die Hinweise für eine Lokalisierung im Zellkern führen zur gleichen Hypothese über die entsprechende molekulare Funktion. *HIPP26* könnte ebenso wie HvFP1 als Schwermetallchaperon essentielle Schwermetalle zu entsprechenden Zielproteinen in den Zellkern transportieren. Zur Identifizierung von Interaktionspartnern und damit möglichen Zielproteinen von *HIPP26* ist eine *Arabidopsis* cDNA-Bibliothek mit Hilfe der Hefe-Zwei-Komponenten-Technik nach entsprechenden Genen durchsucht worden. Mit diesem Ansatz konnten die beiden Zinkfinger-Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren ATHB29 und ATHB21 als *HIPP26* Interaktoren identifiziert werden. Die Analysen legen eine hochaffine Bindung zwischen *HIPP26* und ATHB29 nahe. Dies wird durch die klare Aktivierung aller drei Reportergene (*lacZ*, *His3* und *Ade2*, siehe Abb. 3.17. B) deutlich sichtbar.

Die Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen *HIPP26* und ATHB29 kann auch *in vitro* nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.17. C). *In vitro* translatiertes radioaktiv markiertes ATHB29 Protein kann an immobilisiertes Glutathion-S-Transferase-Tag-fusioniertes *HIPP26* Protein binden und entsprechend angereichert werden. Werden die Cysteine, welche sich im Kernmotiv der Schwermetallbindedomäne von *HIPP26* befinden, durch gezielte Mutagenese verändert (*hipp26C36G, C39G*), ist keine Bindung an den Transkriptionsfaktor ATHB29 nachweisbar. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Kernsequenz der Schwermetallbindedomäne eine entscheidende Rolle für die Protein-Protein-Wechselwirkung mit dem Transkriptionsfaktor spielt.

ATHB21 und ATHB29 gehören zur Genfamilie der Zinkfinger-Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren. Tan und Irish, (2006) haben 14 Mitglieder dieser Genfamilie genauer untersucht. Aufgrund von Daten aus Hefe-Zwei-Komponenten-Analysen konnten sie zeigen, dass die ATHBs generell sehr stark zur Heterodimerisierung neigen. Die Autoren diskutieren diese beobachtete Tendenz zur Heterodimerisierung als zusätzliche Möglichkeit, die Spezifität der Zielgenaktivierung zu modulieren.

Kann *HIPP26* mit weiteren Mitgliedern der ATHB Familie interagieren? Kommt es auch zwischen weiteren HIPPs aus Cluster III und den verschiedenen ATHBs zu Protein-Protein-Wechselwirkungen? In gezielt durchgeführten Hefe-Zwei-Komponenten-Analysen kann nachgewiesen werden, dass ATHB29 neben *HIPP26* auch mit *HIPP20*, *HIPP21*, *HIPP23*, *HIPP24*, *HIPP27* und *HIPP30* interagiert. Eine deutliche Affinität zur Bindung von ATHB21 mit *HIPP30* ist ebenfalls durch die Aktivierung von mindestens zwei Reportergenen detektierbar (siehe Abb. 3.18.). Weitere schwächere Interaktionen zwischen ATHB30, *HIPP20* und *HIPP30*, bzw. *HIPP26* und den ATHBs 24, 25 und 33 werden durch die Aktivierung von nur einem Reportergen angezeigt. Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen HIPPs und ATHBs mit geringeren Affinitäten, wie die zwischen ATHB21 und *HIPP26* können mit dem in Abb. 3.18. verwendeten Gal4-Aktivierungsdomänenvektor (pGAD-C1) nicht analysiert werden. pGAD-C1 (James et al., 1996) besitzt einen stark verkürzten *ADH* Promotor, so dass nur sehr geringe Mengen an Gal4-AD-Fusionsprotein exprimiert werden.

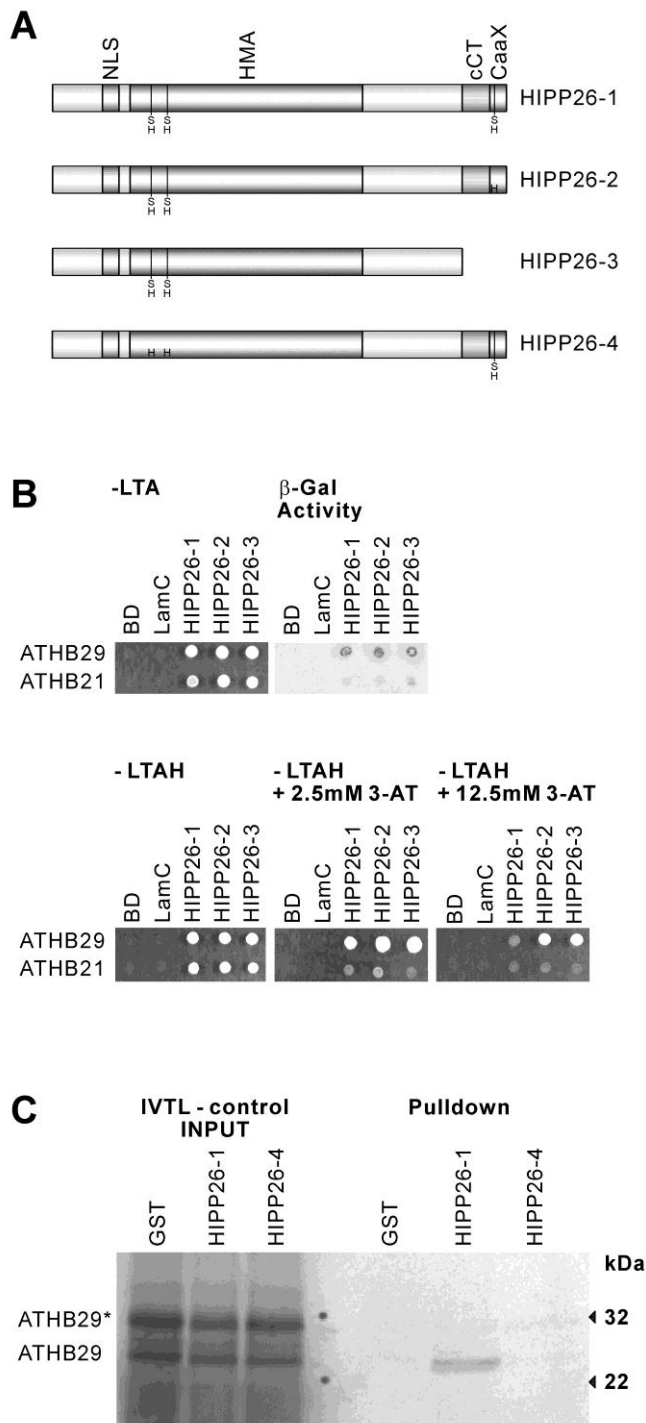


Abb. 3.17. Proteininteraktionsstudien zeigen, dass HIPP26 mit dem Zinkfinger-Homeodomänen-Transkriptionsfaktor ATHB29 interagiert.

Schematische Darstellung der von den verwendeten Genkassetten codierten HIPP26 Proteine (A), Verifizierung der Protein-Protein Wechselwirkung von den identifizierten HIPP26 Interaktoren nach Rücktransformation der aus der durchsuchten cDNA-Bibliothek isolierten Vektoren in Hefe (B) und 'GST-Pulldown' Experiment zur Bestätigung der Protein-Protein Wechselwirkung zwischen HIPP26 und ATHB29 *in vitro* (C).

HIPP26-1 (native Form von HIPP26), HIPP26-2 (Substitutionsmutante, *hipp26C150G*), HIPP26-3 (Deletionsmutante *hipp26Δ142-153*), HIPP26-4 (Substitutionsmutante, *hipp26C36G,C39G*), Selektivmedien: -LTA (ohne Leucin → Selektion auf Gal4 Aktivierungsdomänenvektor/cDNA Bibliothek, ohne Tryptophan → Selektion auf Gal4 DNA Bindedomänenvektor und ohne Adenin → Selektion auf *ADE2* Reporterogenaktivierung), -LTAH (wie -LTA und zusätzlich ohne Histidin → Selektion auf *HIS3* Reportergen), -LTAH + 3-AT (wie LTAH und zusätzlich mit 3-Amino-1,2,4-Triazol, einem kompetitiven Inhibitor des *HIS3* Proteins zur gezielten Erhöhung des Selektionsdruckes auf die *HIS3* Reportergenaktivierung). Das colorimetrische Reportergen *lacZ* ist im Filterlift-Assay getestet worden. BD (Gal4 DNA Bindedomäne), LamC (Fusionsprotein aus Gal4 DNA Bindedomäne und dem humanen Lamin C Protein). Für den 'Pull-down' sind die HIPP26 Versionen als GST Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert und an Glutathion-sepharosepartikel immobilisiert worden. Als Kontrolle ist GST (Glutathion-S-Transferase-Tag) ohne HIPP-Fusion verwendet worden. ATHB29* ist ein Nebenprodukt der *in vitro* Translation. Das erwartete Molekulargewicht von ATHB29 ist 26kDa.

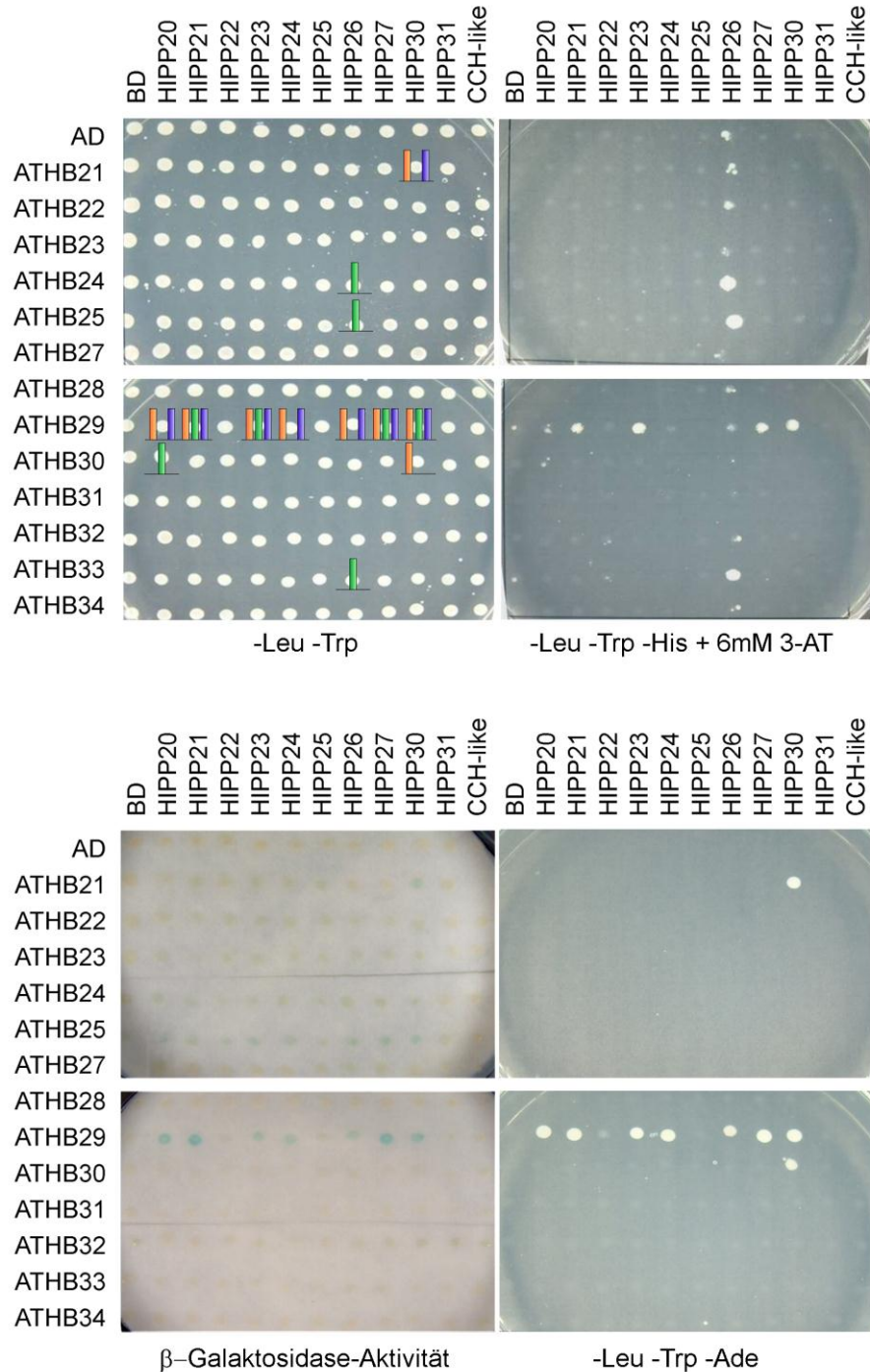


Abb. 3.18. Hefe-Zwei-Komponenten Analysen der Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den *Arabidopsis* HIPPs aus Cluster III und den *Arabidopsis* ATHBs (Zinkfinger-Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren).

Die verwendeten Selektivmedien sind gekennzeichnet: -Leu (ohne Leucin → Selektion auf Gal4 Aktivierungsdomänenvektor), -Trp (ohne Tryptophan → Selektion auf Gal4 DNA Bindedomänenvektor), -Ade (ohne Adenin → Selektion auf *ADE2* Reportergergenaktivierung), -His (ohne Histidin → Selektion auf *HIS3* Reportergergen) und + 6mM 3-AT (zusätzlich mit 6mM 3-Amino-1,2,4-Triazol, einem kompetitiven Inhibitor des *HIS3* Proteins zur gezielten Erhöhung des Selektionsdruckes auf die *HIS3* Reportergergenaktivierung). Das colorimetrische Reportergergen *lacZ* ist im Filterlift-Assay, mit allen -Leu -Trp selektierten Stämmen getestet worden. AD (Gal4 Aktivierungsdomäne), BD (Gal4 DNA Bindedomäne). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist auf den -Leu -Trp Kontrollplatten oben links mit farbigen Säulen dargestellt: grüne Säule = *HIS3* Aktivierung, orange Säule = *ADE2* Aktivierung, blau Säule = *lacZ* Aktivierung.

3.2.2.5. *hipp25*, *hipp26* und *hipp25/26* Mutanten-Analysen

Welche physiologische Bedeutung haben HIPPs wie HIPP26 für eine *Arabidopsis* Pflanze? Die Analyse von Mutantenlinien, soll helfen, Antworten auf diese Frage zu finden.

Für diese Analysen konnten aus den weltweit verfügbaren *Arabidopsis* Mutantenpools die beiden Transposon-Insertionslinien ET7654 (*hipp26*) und GT.108178 (*hipp25*) identifiziert und verwendet werden. Beide Linien besitzen als Hintergrund den *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Landsberg erecta. Werden beide Linien miteinander gekreuzt, so lassen sich aus den folgenden Generationen Pflanzen isolieren, die in keinem, einem oder beiden Loci den Wildtyp repräsentieren. Mit Northern-Analysen kann nachgewiesen werden, dass die ausgekreuzten Wildtypen (Ler-0) sowohl *HIPP25* als auch *HIPP26* mRNA bilden können (siehe Abb. 3.19.). Dagegen sind die entsprechenden Mutantenlinien nicht in der Lage, die jeweiligen Transkripte in detektierbaren Mengen zu produzieren.

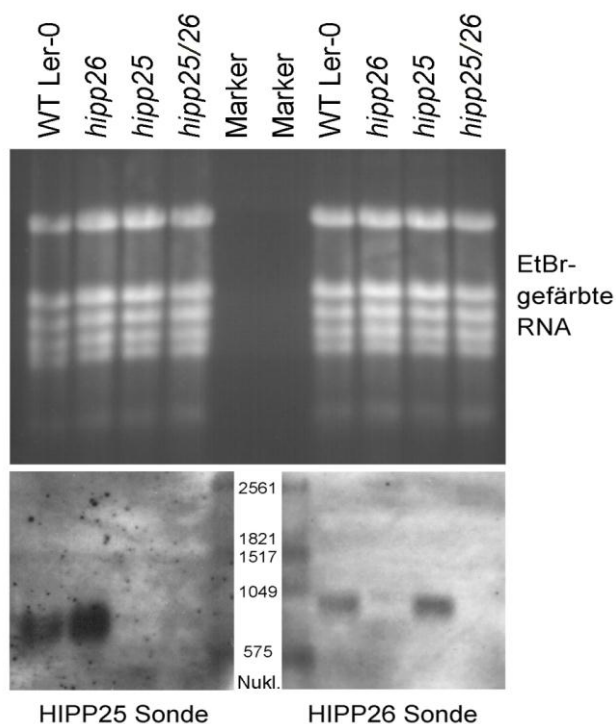
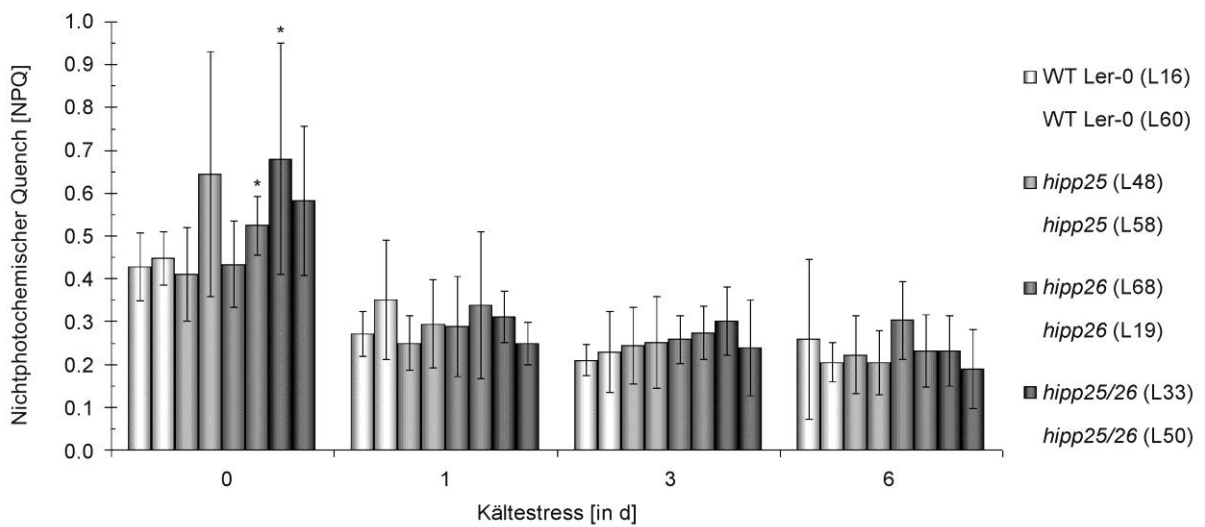
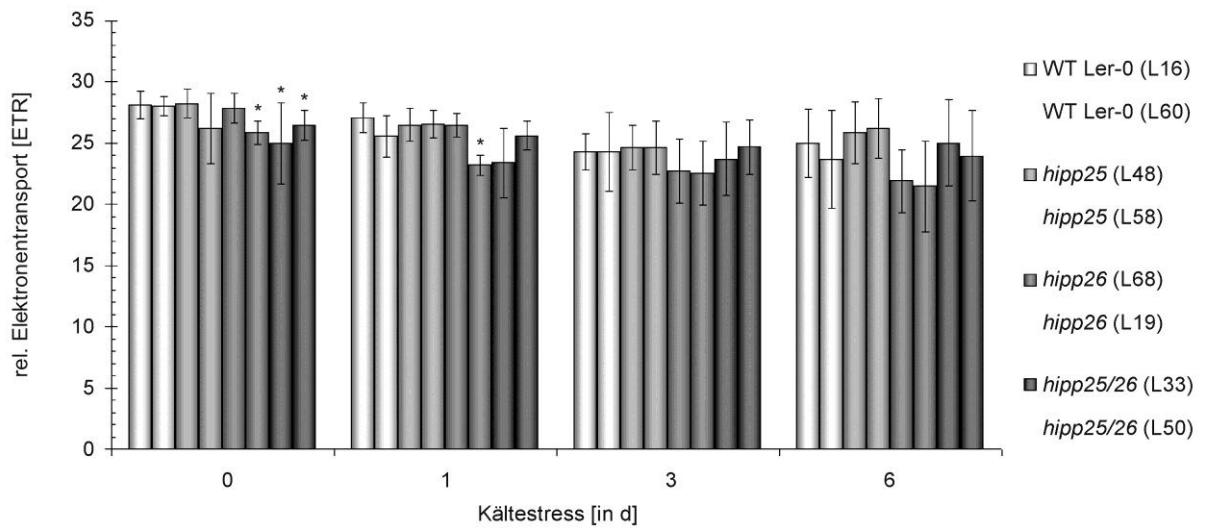
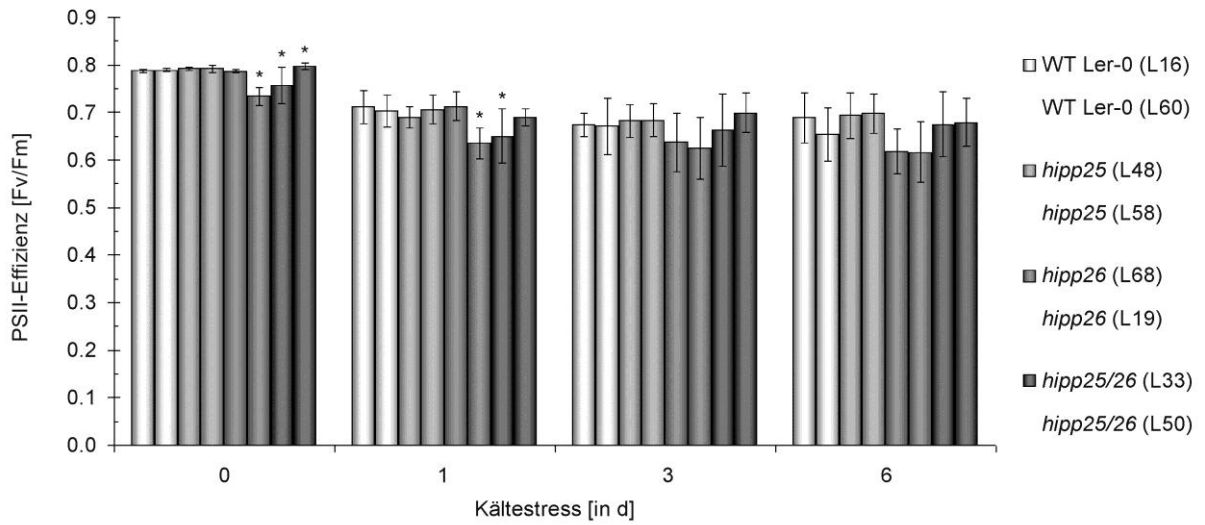


Abb. 3.19. Northern-Analysen der Genexpression von *HIPP25* und *HIPP26* in den verwendeten *Arabidopsis thaliana* Linien. Es sind jeweils 15µg Gesamt-RNA, extrahiert aus dem vollständigen oberirdischen Material von je 3 *Arabidopsis* Pflanzen pro Probe, verwendet worden. Die Ethidiumbromid gefärbte rRNA ist als Ladekontrolle ebenfalls dargestellt.

Bei einem Vergleich der vier unterschiedlichen Linien lassen sich unter optimalen Bedingungen sowohl im Lang- als auch im Kurztag kaum Unterschiede feststellen. Das relative Elektronentransportlevel ist in *hipp25/26* Mutanten geringfügig, jedoch signifikant, niedriger als in den entsprechenden Kontrollpflanzen (Abb. 3.20.). Dagegen sind die Entwicklungskinetiken der unterschiedlichen Linien sind in Bezug auf die Parameter Biomasse, Blühzeitpunkt, Blattanzahl, Blattform und Samenproduktion nicht unterscheidbar (Daten nicht gezeigt).

In den Expressionsanalysen zeigte sich, dass *HIPP26* unter Kältestress, Salzstress und Trockenstress induziert, und unter Schwermetallstress (50µM Cu) reprimiert wird (Kapitel 3.2.2.2.). Dies deutet auf eine mögliche Funktion von *HIPP26* bei der Stressantwort der Pflanzen hin. Deswegen sind die Mutanten-Linien *hipp26*, *hipp25* und die Doppelmutante *hipp25/26* unter diesen Stressbedingungen vergleichend zum Wildtyp analysiert worden.

3.2. HIPPs in *Arabidopsis thaliana*



←

Abb. 3.20. Vergleichende Darstellung von Photosyntheseparametern (Fv/Fm, rel. ETR und NPQ), welche an *hipp25*, *hipp26*, *hipp25/26* Mutanten und Wildtyppflanzen gemessen werden können, wenn diese über einen längeren Zeitraum unter Kältestress (4°C) stehen. Die Messungen sind mit einem Imaging-PAM Chlorophyllfluorometer (Heinz Walz GmbH, Effeltrich) durchgeführt worden. Von jeder Linie sind Pflanzen verwendet worden, die auf je zwei unterschiedliche F1 Nachkommen der Kreuzung beider Transposon-Insertionslinien ET7654 (*hipp26*) und GT.108178 (*hipp25*) zurückzuführen sind. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind aus den Daten von je 16 Messungen berechnet worden. Mittelwerte von Mutanten-Linien, die sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$ (t-Test) von den entsprechenden beiden Mittelwerten der Wildtyp-Linien signifikant unterscheiden sind mit einem Sternchen gekennzeichnet.

3.2.2.5.1. Reaktion auf Kälte

In Kapitel 3.2.2.2. ist dargestellt, dass die Genexpression von *HIPP25* und *HIPP26* auf Transkriptebene durch niedrige positive Temperaturen induziert werden. Dies impliziert eine Funktion der entsprechend codierten Proteine bei Kälte. Bei einem Vergleich von Photosyntheseparametern zwischen *hipp25*, *hipp26*, *hipp25/26* und Wildtyppflanzen, die über einen längeren Zeitraum in einer Umgebung mit 4°C unter Kältestress behandelt werden, zeigen sich keine deutlichen Unterschiede.

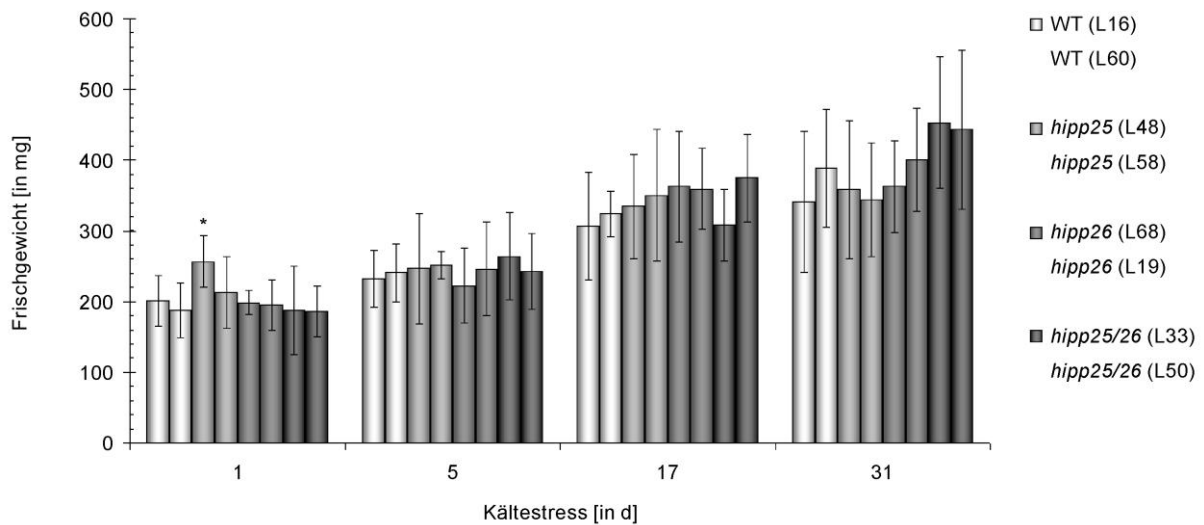


Abb. 3.21. Entwicklung der Biomasse (Frischgewichte) von *hipp25*, *hipp26*, *hipp25/26* Mutanten und Wildtyppflanzen, wenn diese über einen längeren Zeitraum unter Kältestress (4°C) stehen. Von jeder Linie sind Pflanzen verwendet worden, die auf je zwei unterschiedliche F1 Nachkommen der Kreuzung beider Transposon-Insertionslinien ET7654 (*hipp26*) und GT.108178 (*hipp25*) zurückzuführen sind. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind aus den Daten von je 8 Messungen berechnet worden. Mittelwerte von Mutanten-Linien, die sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$ (t-Test) von den entsprechenden beiden Mittelwerten der Wildtyp-Linien signifikant unterscheiden sind mit einem Sternchen gekennzeichnet.

Sowohl die Effizienz der Energieweiterleitung innerhalb der Photosysteme II (Fv/Fm) als auch der relative Elektronentransport an der Thylakoidmembran und die Abgabe der Anregungsenergie in Form von Wärme (NPQ) sinken in allen Linien innerhalb von 24h auf etwas niedrigere Werte ab und stabilisieren sich auf diesem Niveau für die folgenden Tage (siehe Abb. 3.20.). Im untersuchten Zeitraum lassen sich unter Kältestress zu keinem

Zeitpunkt signifikante Unterschiede der beiden für jeden Mutantentyp verwendeten Linien in eine bestimmte Richtung nachweisen. Die Abwesenheit von HIPP25, HIPP26 bzw. beiden HIPPs bleibt auch unter Kältestress ohne Auswirkung auf photosynthetische Prozesse in den entsprechenden Pflanzen.

Da niedrige Temperaturen das pflanzliche Wachstum inhibieren, sind die *hipp25*-, *hipp26*-, *hipp25/26*- und Wildtyppflanzen auch hinsichtlich der Zunahme ihrer Biomasse unter Kältebedingungen untersucht worden (Abb. 3.21.). Innerhalb eines großen Zeitraumes von 31 Tagen ist in allen untersuchten Linien etwa eine Verdopplung der Frischgewichte messbar. Ein Vergleich der jeweiligen Biomassen offenbart keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtypen und den Mutantenlinien. Die Abwesenheit von HIPP25, HIPP26 bzw. beiden HIPPs führt unter Kältestress zu keiner deutlich nachweisbaren Veränderung von Wachstums- und Entwicklungsprozessen.

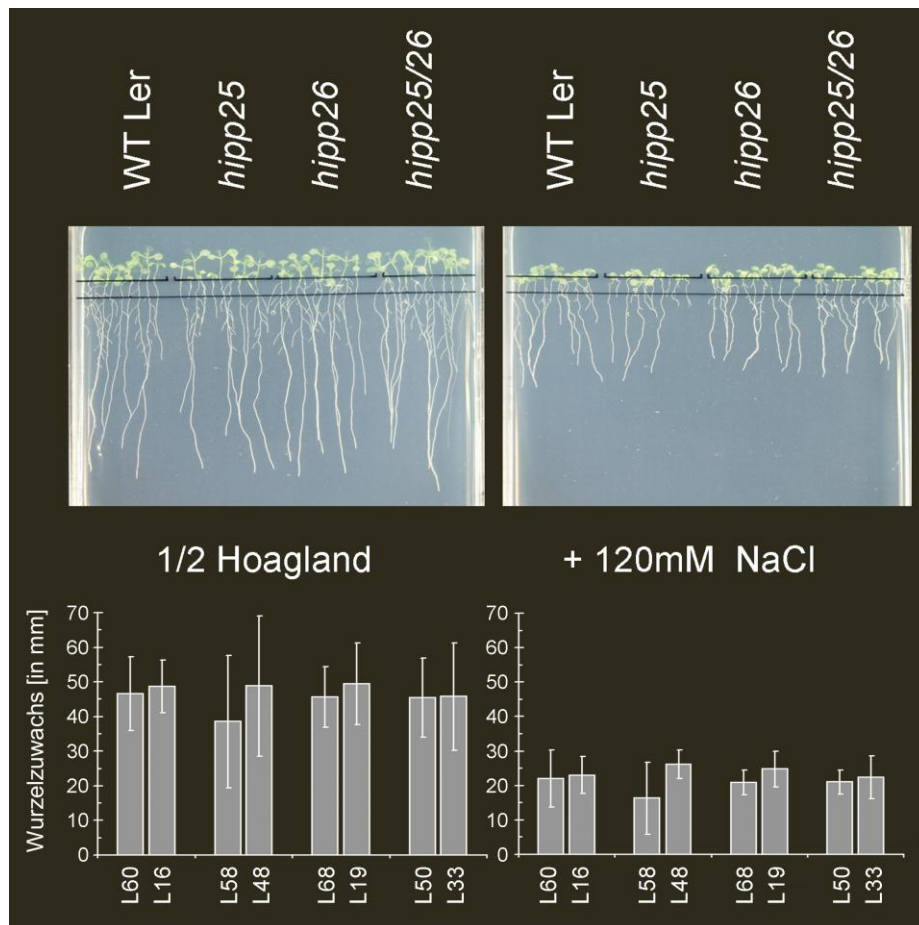


Abb. 3.22. Wurzelwachstum von Wildtyppflanzen und *hipp25*, *hipp26* und *hipp25/26* Mutanten unter Salzstress. Von jeder Linie sind Pflanzen verwendet worden, die auf je zwei unterschiedliche F1 Nachkommen der Kreuzung beider Transposon-Insertionslinien ET7654 (*hipp26*) und GT.108178 (*hipp25*) zurückzuführen sind. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind aus den Daten von je 10 Messungen berechnet worden. Mittelwerte von Mutanten-Linien, die sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$ (t-Test) von den entsprechenden beiden Mittelwerten der Wildtyp-Linien signifikant unterscheiden konnten nicht nachgewiesen werden.

3.2.2.5.2. Reaktion auf Salzstress

Die Genexpression von *HIPP26* wird durch hohe NaCl Konzentrationen induziert (Kapitel 3.2.2.2.). Aus diesem Grund ist der Einfluss von Salzstress auf das Wurzelwachstum der *hipp25*, *hipp26*, *hipp25/26* Mutanten und der entsprechenden Wildtypkontrollpflanzen untersucht worden. Für diesen Test sind die Keimlinge der unterschiedlichen *Arabidopsis* Linien 3 Tage nach Keimung von Platten mit halbstarkem Hoagland Medium auf Platten mit Kontrollmedium, bzw. Medium das zusätzlich 120mM NaCl enthält umgesetzt und für weitere 9 Tage unter Langtagbedingungen inkubiert worden. Der Wurzelzuwachs ist auf 0,5fachem Hoagland Medium deutlich größer und für alle vier Linien gleich. 120mM NaCl inhibiert den Wurzelzuwachs im untersuchten Zeitraum. Das Fehlen von HIPP25, HIPP26 oder beiden HIPPs in den entsprechenden Mutanten hat keinen Einfluss auf die Stärke dieser Wachstumshemmung (Abb. 3.22.).

3.2.2.5.3. Reaktion auf Trockenstress

Die Genexpression von *HIPP26* wird neben niedrigen Temperaturen auch durch Wassermangel induziert (siehe Kapitel 3.2.2.2.). Um eine mögliche Funktion von HIPP26 und HIPP25 für die Anpassung an Wassermangel zu untersuchen, kann ein Vergleich der Veränderungen der relativen Pflanzenwassergehalte von Wildtyppflanzen und *hipp25*, *hipp26*, *hipp25/26* Mutanten im Verlauf anhaltender Trockenheit durchgeführt werden (Abb. 3.23.).

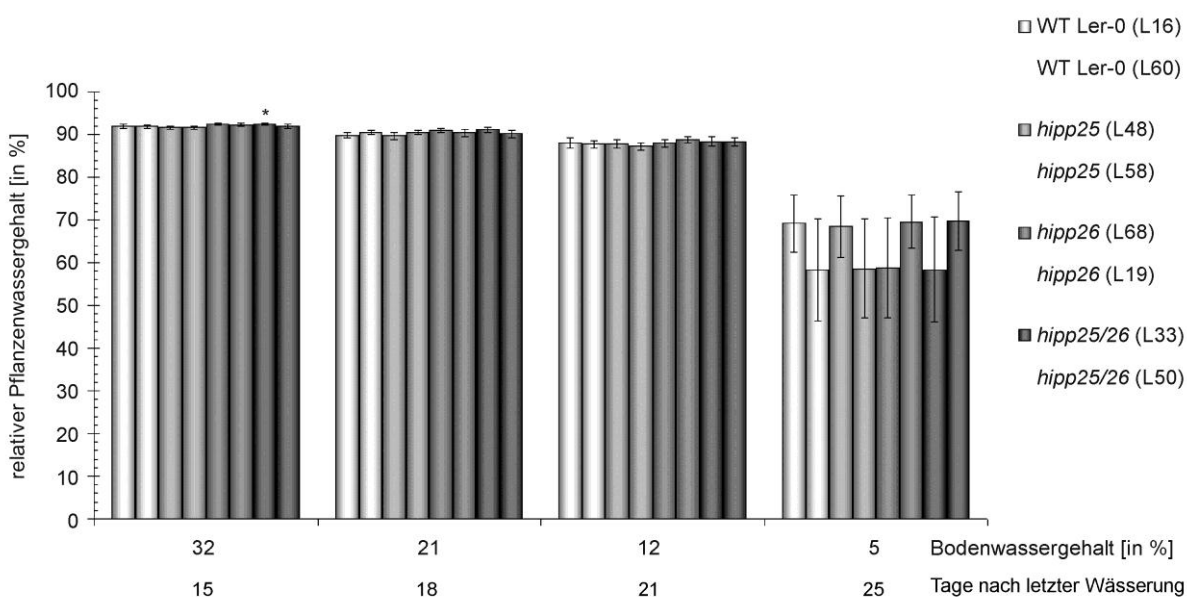


Abb. 3.23. Entwicklung des relativen Pflanzenwassergehaltes von Wildtyppflanzen und *hipp25*, *hipp26* und *hipp25/26* Mutanten unter Wassermangel. Für die gewählten Messzeitpunkte innerhalb der Trockenstresskinetik ist der jeweilige Bodenwassergehalt angegeben. Von jeder Linie sind Pflanzen verwendet worden, die auf je zwei unterschiedliche F1 Nachkommen der Kreuzung beider Transposon-Insertionslinien ET7654 (*hipp26*) und GT.108178 (*hipp25*) zurückzuführen sind. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind aus den Daten von je 10 Messungen berechnet worden. Mittelwerte von Mutanten-Linien, die sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$ (t-Test) von den entsprechenden beiden Mittelwerten der Wildtyp-Linien signifikant unterscheiden sind mit einem Sternchen markiert.

Der relative Wassergehalt sinkt in den untersuchten Pflanzen über einen Zeitraum von 6 Tagen nur um etwa 4%. Im gleichen Zeitfenster ist ein dramatisches Absinken des für die Pflanzen im Boden verfügbaren Wassers von 32% auf 12% zu verzeichnen. Aus diesen Daten

wird deutlich, dass es den Pflanzen in dieser wichtigen Phase des Trockenstressverlaufes durch entsprechende Anpassungsreaktionen gelingt den überlebenswichtig hohen internen Wassergehalt aufrechtzuerhalten. Das Absinken des Bodenwassergehaltes unter 10% wird von den untersuchten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen nicht toleriert. Der entsprechende relative Pflanzenwassergehalt verringert sich drastisch auf Werte unter 70%. Die Pflanzen welken. Die Abwesenheit von HIPP26, HIPP25 oder beiden HIPPs hat auf die Resistenz gegenüber Trockenheit keinen nachweisbaren Einfluss. Im untersuchten Zeitraum lassen sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede der beiden für jeden Mutantentyp verwendeten Linien in eine bestimmte Richtung nachweisen. (Abb. 3.23.).

3.2.2.5.4. Reaktion auf erhöhte Schwermetallkonzentrationen

Ein zentrales Element in der Proteinstruktur der HIPPs ist die HMA Domäne. Ein Reihe von strukturellen Daten illustriert, dass vor allem über die konservierten Cysteine im MxCxxC Motiv Schwermetalle, wie Kupfer, Zink und Quecksilber, gebunden werden können (Arnesano et al., 2002). Bisher liegen aber nur für wenige HMA-Proteine Daten zur Schwermetallbindung vor.

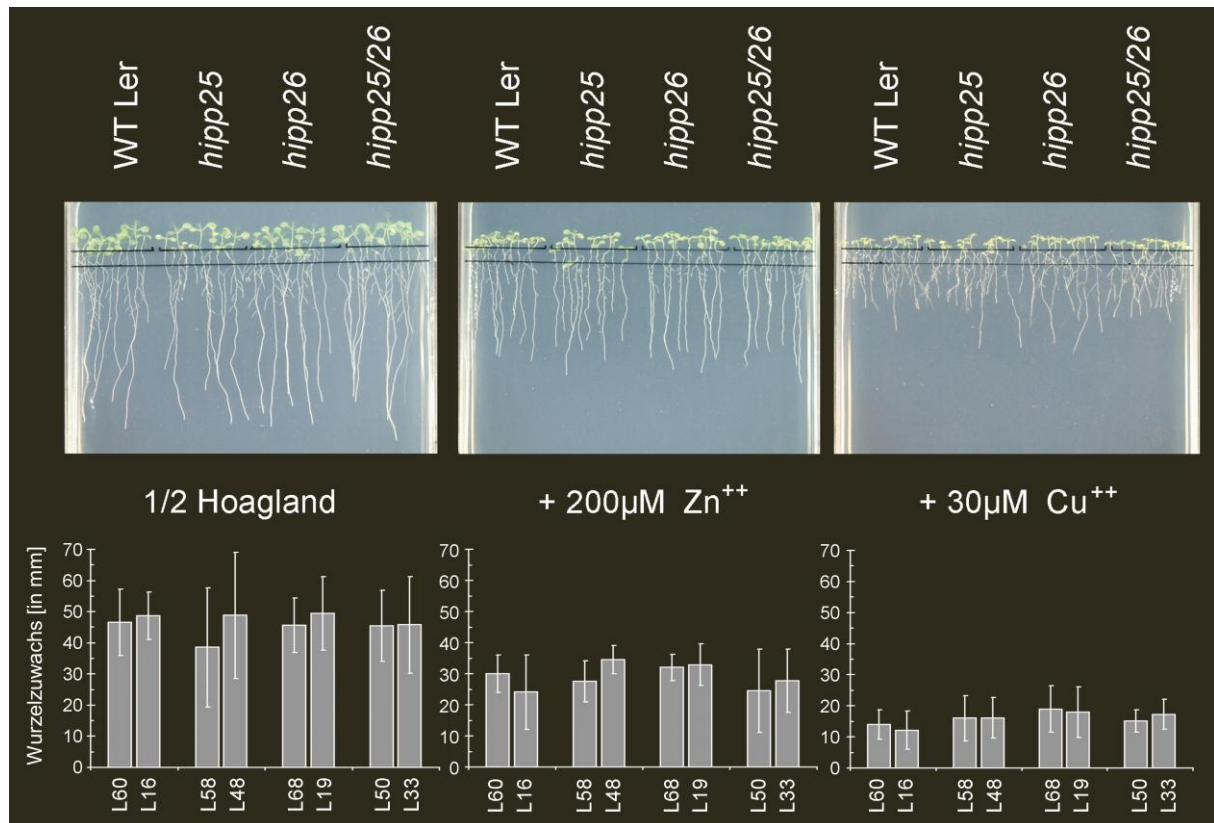


Abb. 3.24. Wurzelwachstum von Wildtyppflanzen und *hipp25*, *hipp26* und *hipp25/26* Mutanten unter Bedingungen mit toxisch hohen Zink- und Kupferkonzentrationen. Von jeder Linie sind Pflanzen verwendet worden, die auf je zwei unterschiedliche F1 Nachkommen der Kreuzung beider Transposon-Insertionslinien ET7654 (*hipp26*) und GT.108178 (*hipp25*) zurückzuführen sind. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind aus den Daten von je 10 Messungen berechnet worden. Mittelwerte von Mutanten-Linien, die sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$ (t-Test) von den entsprechenden beiden Mittelwerten der Wildtyp-Linien signifikant unterscheiden konnten nicht nachgewiesen werden.

Die Bindung von Kupferionen an CCH ist indirekt über die Komplementation der *atx1* Mutation in Hefe nachgewiesen worden (Himmelblau et al., 1998). Das *Arabidopsis* Kupferchaperon AtATX1 komplementiert die *atx1* Mutation in Hefe ebenfalls (Puig et al., 2007b). Dykema et al., (1999) haben mit Hilfe immobilisierter Metalle im Affinitätschromatographieverfahren (IMAC) direkte experimentelle Hinweise für die Bindung von Kupfer-, Nickel- und Zinkionen an HIPP7 (ATFP3) erhalten. Für HIPP6 (Cdi19) sind nach Zugabe von Cadmium-, Quecksilber- und Kupferionen Veränderungen der CD-Spektren (Circular dichroismus) im Wellenlängenbereich zwischen 200nm und 220nm nachweisbar. Veränderungen in diesem Spektralbereich zeigen Konformationsänderungen von geordneten β -Faltblatt- und α -helikalen Bereichen des jeweiligen Proteins an. Sie sind somit ein Hinweis auf eine Bindung von Cd, Hg und Cu an HIPP6 (Cdi19, Suzuki et al., 2002). Für das Kupferchaperon der Cu/Zn SOD in *Glycine max* GmCCS sind sowohl die Bindung von Cu- als auch Zn-Ionen über spektroskopische Verfahren nachgewiesen worden (Sagasti et al., 2011). *In vitro* translatiertes HIPP26 bindet in IMAC Analysen sowohl Cu^{2+} als auch Cd^{2+} und Pb^{2+} (Gao et al., 2009). Für weitere HIPPs im Allgemeinen und speziell für HIPP25 liegen noch keine Daten zur Spezifität der Metallbindung vor.

Um eine mögliche Funktion von HIPP25 und HIPP26 bei der Reaktion der Pflanzen auf erhöhte Schwermetallkonzentrationen zu untersuchen, sind die Mutantenlinien *hipp25*, *hipp26* und *hipp25/26* bei schädlich hohen Konzentrationen von Zn- und Cu-Ionen auf Agarplatten inkubiert worden. Als sensitiver Messparameter ist das Wurzelwachstum bestimmt worden. Für diesen Test sind die Keimlinge der unterschiedlichen *Arabidopsis* Linien 3 Tage nach Keimung von Platten mit 0,5fachem Hoagland Medium auf Platten mit Kontrollmedium, bzw. Medien die zusätzlich $200\mu\text{M Zn}^{2+}$ und $30\mu\text{M Cu}^{2+}$ Ionen enthalten, umgesetzt und für weitere 9 Tage unter Langtagbedingungen inkubiert worden. Der Wurzelzuwachs ist auf 0,5fachem Hoagland Medium am größten und für alle untersuchten Linien etwa gleich. Sowohl $200\mu\text{M Zn}^{2+}$ als auch $30\mu\text{M Cu}^{2+}$ inhibieren das Wurzelwachstum deutlich. Allerdings wirkt sich das Fehlen von HIPP25 und/oder HIPP26 in den entsprechenden Mutanten nicht signifikant auf diese Inhibierung aus (siehe Abb. 3.24.).

3.2.2.5.5. HIPP26 beeinflusst die Expression von Zielgenen des Transkriptionsfaktors ATHB29

Der Zinkfinger-Homeodomänen-Transkriptionsfaktor ATHB29 konnte mittels Hefe-DiHybrid-Technik und *in vitro* mit 'GST-Pulldown' Experimenten als putativer Interaktor von HIPP26 identifiziert werden (siehe Kapitel 3.2.2.3.). Im Jahr 2007(a) konnten Tran et al., unter Verwendung von *Arabidopsis thaliana* 35S::*ATHB29* Linien in Microarray-Transkriptom-Analysen putative Zielgene des Transkriptionsfaktors ATHB29 (ZFHD1) identifizieren. In Abbildung 3.25.A sind einige dieser Gene aufgeführt. Tran et al., (2007a) haben sowohl Gene, die in den 35S::*ATHB29* Mutanten im Vergleich zu entsprechenden Kontrollpflanzen deutlich induziert werden (orange in Abb. 3.25.A), als auch Gene, die deutlich reprimiert vorliegen (grün in Abb. 3.25.A), nachgewiesen. Interessant ist, dass die durch ATHB29 aktivierten Gene in *hipp26* Pflanzen deutlich schwächer exprimiert werden, als in den entsprechenden Wildtypkontrollen (siehe Abb. 3.25.B). Die ebenfalls untersuchten ATHB29-abhängig reprimierten Gene und die zusätzlich analysierten nicht regulierten Referenzgene At3g53090 und At4g26410 dagegen werden in den *hipp26* Mutanten ähnlich stark wie in den Kontrollpflanzen exprimiert. Dies ist ein Hinweis darauf, dass HIPP26 einen positiven Einfluss auf die Funktion des Transkriptionsfaktors ATHB29 und somit auf die Induktion der Genexpression entsprechender Zielgene hat.

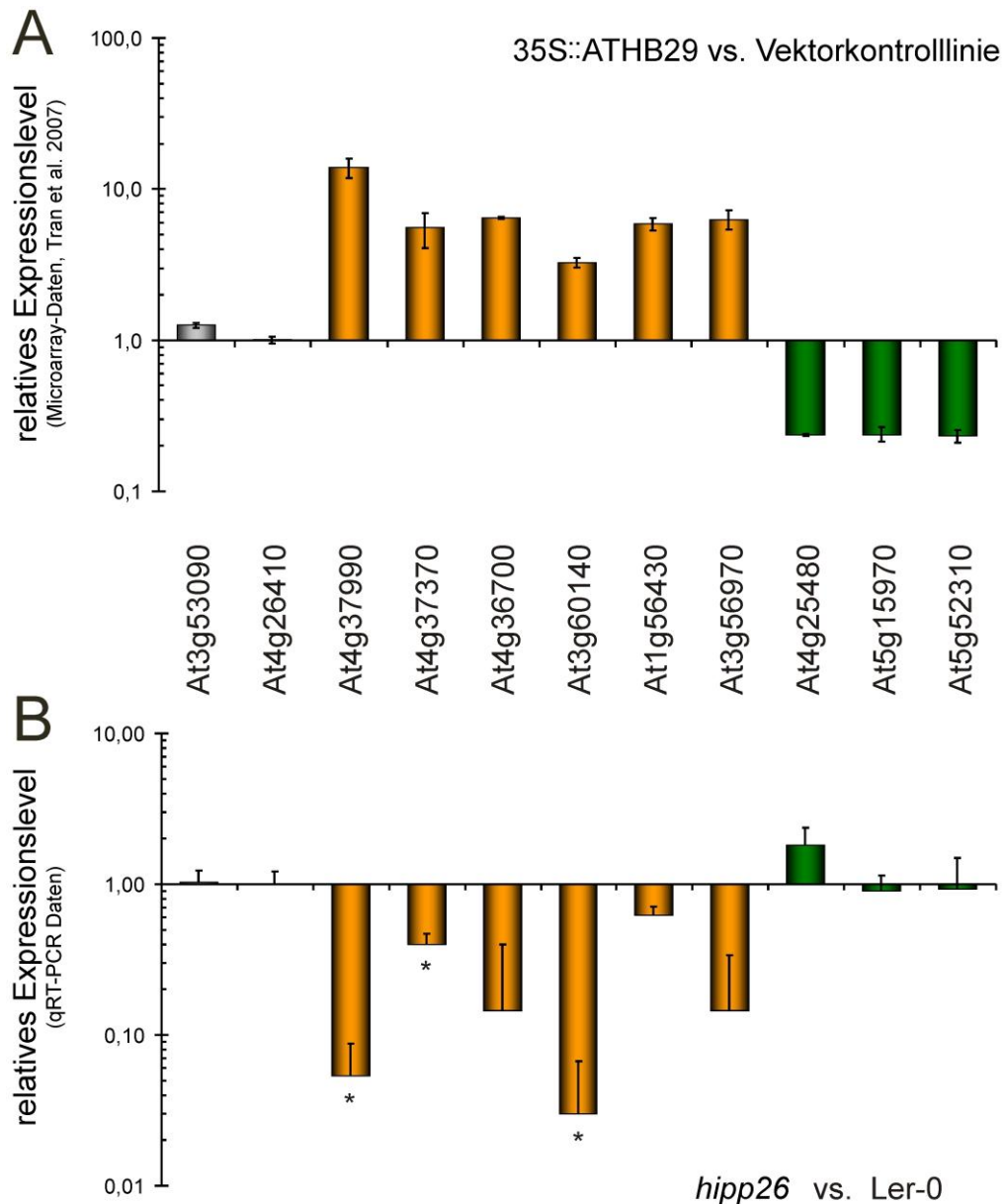


Abb. 3.25. Relative Genexpressionslevel von *Arabidopsis thaliana* Genen, deren Expression sowohl durch ATHB29 (A) als auch durch HIPP26 (B) beeinflusst wird. (A) Gene, deren Expression in 35S::ATHB29 Linien positiv beeinflusst wird, sind orange, negativ beeinflusst grün oder gar nicht beeinflusst grau dargestellt. Die auf die entsprechenden Leervektorkontrollen bezogenen Expressionslevel in den 35S::ATHB29 Mutanten sind Tran et al., (2007a) entnommen worden. (B) Die relativen Expressionslevel in den hipp26 Mutanten sind mittels quantitativer RT-PCR analysiert worden. Dabei sind die relativen Expressionslevel der untersuchten Gene nach Pfaffl et al., (2001), bezogen auf die entsprechenden Wildtypkontrollen und normalisiert auf das Referenzgen At1g13320 berechnet worden. *Expressionsunterschiede sind mit $p=0,05$ signifikant ('Pair wise fixed reallocation randomisation test', Pfaffl et al., 2002). Pro Linie sind drei biologische Parallelproben mit Blättern von je drei Pflanzen analysiert worden.

4. Diskussion und Ausblick

4.1. HvFP1, ein Kälte-induziertes Zellkern-lokalisiertes putatives Schwermetallchaperon

HvFP1 ist ein Gen in *Hordeum vulgare*, dessen Expression bei abiotischem Stress induziert wird. Vor allem bei kombiniertem Stress durch niedrige positive Temperaturen und hohe Lichtintensitäten wird *HvFP1* in einem Zeitraum von weniger als drei Stunden angeschaltet (Abb. 3.3.). Diese sehr schnelle transiente Induktion legt nahe, dass die Funktion von *HvFP1* vor allem in der frühen Phase des Stressgeschehens benötigt wird. In dieser auch als *Alarmreaktion* bezeichneten Phase kommt es zu vielfältigen molekularen Veränderungen, die eine Anpassung ermöglichen sollen. *HvFP1* könnte demnach, innerhalb dieser *Alarmreaktion* von Bedeutung sein. Dagegen werden andere Kältestressgene, wie *Cor14b*, vor allem während der *Widerstandsphase* benötigt. *Cor14b* Transkripte akkumulieren unter Bedingungen mit kombiniertem Kälte-Lichtstress kontinuierlich und bleiben über einen Zeitraum von mehr als sieben Tagen auf gleichbleibend hohem Niveau (Abb. 3.3.). Die Höhe der Lichtintensität spielt für die Stärke der Induktion von *HvFP1* bei Kälte eine eher untergeordnete Rolle. Dies ist ein klarer Unterschied zu *Cor14b* und *Elip*. Beide Gene codieren für plastidäre Proteine (Crossati et al., 1999; Grimm und Kloppstech, 1987) und werden deutlich stärker angeschaltet, wenn zu den niedrigen Temperaturen steigende Lichtintensitäten hinzukommen (Abb. 3.4.).

HvFP1 kann aufgrund seiner Induktion bei niedrigen positiven Temperaturen, welche auch ohne Lichteinfluss in etiolierten Pflanzen nachweisbar ist (Abb. 3.4.), wie *Cor14b* in die Gruppe der Kältestressgene eingeordnet werden. Dagegen gehört das Gen des Lichtstressproteins ELIP nicht ausschließlich zu den Kältestressgenen, da dessen Expression auch unter optimalen Temperaturen durch hohe Lichtintensitäten angeschaltet wird. Dieser Zusammenhang ist bereits 1997 von Montane et al., ausführlich untersucht worden. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass neben der *Elip* mRNA Menge auch die entsprechenden Proteinmengen bei kombiniertem Kälte-Lichtstress ansteigen. Zusätzlich ist unter Kälte- und/oder Starklichtbedingungen eine reziproke Regulation der *Elip* und *Lhcb2* Transkriptlevel nachweisbar. Die Pflanzen versuchen, die Menge an überschüssig absorbierte Lichtenergie zu verringern, indem sie die Expression der äußeren Antennenproteine mindern. Vermutlich setzen die zeitgleich transient neu gebildeten ELIPs sowohl durch Bindung von freien nicht organisierten Chlorophyllmolekülen (Adamska et al., 1999; Hutin et al., 2003) als auch durch Inhibierung der Chlorophyllbiosynthese die Gefährdung durch photooxidative Prozesse herab (Tzvetkova-Chevolleau et al., 2007).

Die Genexpression von *HvFP1* wird auch bei Trockenstress (Abb. 3.5.) und durch exogen applizierte ABA (Abb. 3.6.) schnell und transient induziert. Damit reiht sich *HvFP1* in eine Gruppe von Genen ein, die sowohl bei Kältestress als auch bei Wassermangel verstärkt exprimiert werden (Kreps et al., 2002; Seki et al., 2002; Mantri et al., 2007; Tommasini et al., 2008). Viele dieser Gene, deren Expression sowohl bei Kälte- als auch bei Salz- und Trockenstress induziert wird, besitzen in ihren Promotoren entsprechende regulatorische cis-DNA-Elemente. Dazu gehören z.B. die bei Kälte und Trockenheit wichtigen CRT/DRE ('C-Repeat Elements'/'Drought Responsive Elements') und die bei osmotischem Stress bedeutsamen ABREs ('ABA Responsive Elements', siehe Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 2006 für einen Überblick). Seki et al., (2002) haben mehrere dieser cis-Elemente in den Promotoren von Genen, die durch Kälte-, Salz- und Trockenstress induziert werden, identifizieren können. Das Expressionsverhalten von *HvFP1* legt nahe, dass diese cis-Elemente und die entsprechenden Aktivatoren an der Induktion bei Kälte und Wassermangel beteiligt sind. Für eine entsprechende Analyse sollte in naher Zukunft die DNA des Genlocus von *HvFP1* und dessen direkte Umgebung isoliert, sequenziert und charakterisiert werden. Hierfür kann die in dieser Arbeit aufgeklärte cDNA Sequenz von *HvFP1* als Ausgangspunkt verwendet werden. Zudem

sollten, z.B. mit Hilfe der RACE-Technik ('rapid amplification of cDNA ends'), der oder die Transkriptionsstartpunkt(e) ermittelt werden.

Neben dieser Stress-abhängigen Induktion von *HvFP1* in Primärblättern von Gerstenkeimlingen ist ein Anstieg der Transkriptmenge im Verlauf der natürlichen Primärblattseneszenz nachweisbar. Vor allem in der letzten Phase dieses Entwicklungsabschnittes, d.h. etwa 35 Tage nach Aussaat, ist eine starke Zunahme von *HvFP1* mRNA Molekülen in Primärblättern von *Hordeum vulgare* zu verzeichnen (Abb. 3.7.). Dies spricht dafür, dass HvFP1 Proteine nicht nur bei Kälte- und Trockenstress in größeren Mengen benötigt werden, sondern auch während der letzten Phase der Blattentwicklung von Bedeutung sind. In der frühen Phase der Blattalterung sind strukturelle Veränderungen in den Chloroplasten zu beobachten. Es kommt zu geordneten Abbau- und Remobilisierungsprozessen. Vor allem Makromoleküle wie Proteine, Lipide und Nukleinsäuren werden degradiert. Die Abbauprodukte werden in katabolischen Prozessen verbraucht oder über das Phloem in Sinkbereiche der jeweiligen Pflanze transportiert. Mitochondrien und der Zellkern bleiben sehr lange intakt und sichern den geordneten Ablauf der Blattseneszenz. Aufgrund der beobachtbaren Symptome in der späten Phase der Seneszenz, wie z.B. dem Kollabieren der Vakuolen, der Chromatinkondensation und dem 'DNA Laddering' kann in diesem Zusammenhang von programmiertem Absterben der entsprechenden Zellen gesprochen werden (Lim et al., 2007). Die starke Induktion der Genexpression von *HvFP1* in dieser späten Seneszenzphase ist ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der molekularen Funktion von HvFP1 und den Prozessen, die in dieser letzten Entwicklungsphase des Blattes ablaufen. Die molekulare Funktion von HvFP1 könnte z. B. für die Remobilisierung essentieller Schwermetalle während der Blattseneszenz von Bedeutung sein. Himmelblau und Amasino, (2001) konnten in alternden *Arabidopsis thaliana* Blättern eine Reduzierung der Kupfer- und Zinklevel um über 50% nachweisen. Die Autoren sehen dies als Indiz für die Mobilisierung dieser Mikronährstoffe und deren Transport in Samen, Speicherorgane oder junge noch wachsende Organe.

Eine Behandlung mit toxisch hohen Konzentrationen an Cu- und Cd-Ionen sorgt ebenfalls für eine schwache Induktion von *HvFP1*. Die entsprechenden Transkriptlevel in diesen jungen Primärblättern 48 Stunden nach Schwermetallbehandlung sind in etwa mit denen in alternden Primärblättern 35 Tage nach Aussaat vergleichbar. Der Chlorophyllgehalt ist sowohl in den mit Schwermetallen behandelten Blättern als auch in 35 Tage alten Blättern auf ein ähnliches Niveau abgesunken. Dies illustriert, dass die Abbauprozesse in den Chloroplasten dieser Primärblätter vergleichbar weit vorangeschritten sind.

Weitere Hinweise für einen Zusammenhang zwischen der molekularen Funktion von HvFP1 und der Schwermetallhomöostase liefern Genexpressionsanalysen von *HvFP1* in 18 Tage alten Gerstenpflanzen unter optimalen Temperaturbedingungen. Das Gen ist vor allem im Bereich der Ferntransportsysteme und jungen noch wachsenden Geweben aktiv. Besonders viele *HvFP1* Transkripte lassen sich im Bereich des Sprosses, der zu diesem Entwicklungszeitpunkt wenige Millimeter groß ist und neben dem Apikalmeristem auch die basalen Blattmeristeme beinhaltet, nachweisen. Daneben sind auch in den Wurzeln und dem Bereich der Blattscheiden, welche weitere junge noch nicht sichtbare Folgeblätter beinhalten, *HvFP1* mRNA Moleküle in detektierbar großen Mengen vorhanden (Abb. 3.8.).

Die enorme Induktion von *HvFP1* in allen Teilen der Gerstenpflanze nach 15 Stunden bei 2°C und 600 μ Em⁻²s⁻¹ zeigt einen steigenden Bedarf an HvFP1 bei kombiniertem Kälte-Lichtstress in der gesamten Pflanze an. In weiteren Untersuchungen muss allerdings noch geklärt werden, ob die in dieser Arbeit dargestellten Veränderungen der Genexpression auf Transkriptebene entsprechende Veränderungen auf der Proteinebene nach sich ziehen. Hierfür wäre es sinnvoll immunologische Nachweisverfahren anzuwenden.

Neben den Daten zur Genexpression liefert vor allem die Aminosäuresequenz von HvFP1 eine Reihe von Hinweisen, die es erlauben, über die molekulare Funktion dieses Proteins als Schwermetallchaperon in Gerste zu spekulieren. Die HMA Domäne ist für die Funktion von

4.2. HIPPs, Zellkern-lokalisierte putative Schwermetallchaperone in *Arabidopsis thaliana*

Proteine, welche sowohl HMA Domänen als auch C-terminale Isoprenylierungsmotive besitzen, können bisher nur in Gefäßpflanzen nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die speziellen Erfordernisse innerhalb pflanzlicher Organismen im Verlauf der Evolution zur Entstehung dieser besonderen Klasse von Schwermetallchaperonen geführt haben. Von 76 Proteinen mit HMA Domäne in *Arabidopsis thaliana* weisen 46, d.h. deutlich mehr als die Hälfte dieser Proteine, ein C-terminales Isoprenylierungsmotiv auf (Tab. 3.1. und 3.2.). Diese Proteine können deshalb als HIPPs ('heavy metal associated, isoprenylated plant proteins', engl. für Schwermetall bindende, isoprenylierbare pflanzliche Proteine, Barth et al., 2009) bezeichnet werden. Aufgrund von Homologien der Aminosäuresequenzen lassen sich die HMA Domänen der jeweiligen Proteine in 8 Gruppen einteilen (Abb. 3.10.). Die HMA Domäne von HvFP1 aus Gerste lässt sich zusammen mit 13 *Arabidopsis* HIPPs und einem *Arabidopsis* CCH-like Protein in Cluster III einordnen. Die HIPPs in dieser Gruppe weisen auch in Bezug auf die gesamte Aminosäuresequenz die größte Ähnlichkeit zu HvFP1 auf. Dies spricht dafür, dass diese HIPPs, vor allem HIPP25, HIPP26 und HIPP27 die gleiche oder zumindest eine ähnliche molekulare Funktion wie HvFP1 innehaben. Zudem wird die Genexpression von *HIPP26* ähnlich wie die von *HvFP1* durch niedrige Temperaturen deutlich induziert (Abb. 3.14. und 3.15.). Die Induktion der Expression von *HIPP25* durch Kälte fällt weniger stark aus und *HIPP27* wird bei niedrigen Temperaturen abgeschaltet (Abb. 3.14.). *HIPP26* gehört demnach wie *HvFP1* zu den Kältestressgenen. Die *HIPP26* Expression lässt sich allerdings nicht durch ABA und nur schwach bei Trockenstress induzieren. Im Verlauf der natürlichen Blattseneszenz wird *HIPP26* in *Arabidopsis* abgeschaltet. Neben den großen Gemeinsamkeiten in Bezug auf die Aminosäuresequenz und die Induktion bei Kältestress gibt es zwischen HvFP1 aus Gerste und HIPP26 aus *Arabidopsis* also auch deutliche Unterschiede. Diese Unterschiede schließen jedoch eine ähnliche molekulare Funktion der beiden Proteine im jeweiligen Organismus nicht aus. Ein weiteres gemeinsames Merkmal im Vergleich mit HvFP1 ist die Kernlokalisierung sowohl von HIPP26 als auch von HIPP25 und HIPP27. Die Fluoreszenzsignale der entsprechenden GFP-Fusionsproteine im Zellkern zeigen vor allem für HIPP26 und HIPP27 eine zu HvFP1 sehr ähnliche Lokalisierung an (Abb. 3.14.). HIPP25 akkumuliert ebenfalls im Zellkern, liegt dort aber im Unterschied zu HvFP1, HIPP26 und HIPP27 gleichmäßig verteilt vor. Dies ist ein Hinweis darauf, dass HIPP25 andere Zielproteine bindet als HIPP26, HIPP27 und HvFP1. Für die Akkumulation von HIPP26 an distinkten Punkten innerhalb des Zellkernes ist ein intaktes Isoprenylierungsmotiv notwendig (Abb. 3.13.). In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, ob die Positionen identisch sind, an denen HvFP1, HIPP26 und HIPP27 akkumulieren. Sollte dies der Fall sein, läge ein weiterer Hinweis dafür vor, dass HvFP1, HIPP26 und HIPP27 die gleiche molekulare Funktion erfüllen. Zudem könnte die Lokalisierung der HIPPs mit anderen Techniken, z.B. durch Fraktionieren der unterschiedlichen zellulären Kompartimente in Verbindung mit immunologischen Nachweisverfahren, überprüft und quantifiziert werden. So könnten mögliche Veränderungen des Gleichgewichtes zwischen dem Proteinanteil, welcher an der Plasmamembran lokalisiert ist, und dem im Zellkern befindlichen Teil unter verschiedenen physiologischen Bedingungen untersucht werden.

Solche Analysen würden möglicherweise auch die Diskrepanz erklärbar machen, welche beim Vergleich der in dieser Arbeit gezeigten Daten mit denen bei Gao et al., (2009) dargestellten Daten, auftreten. Gao et al., (2009) haben in vergleichbaren Experimenten die GFP-HIPP26 Fluoreszenzsignale nahezu vollständig an der Plasmamembran von Zwiebelepidermiszellen nachgewiesen.

Die Genexpressionsanalysen zu *HIPP26* zeigen deutlich, dass dieses Schwermetallchaperon besonderes bei Kälte- und Salzstress gebraucht wird (Abb. 3.14. und 3.15.). Gao et al., (2009) zeigen mit Northern-Analysen an 14 Tage alten *Arabidopsis* Keimlingen, dass *HIPP26* (*ATFP6*) mRNA Moleküle in allen Teilen der Pflanze nachweisbar sind. Vor allem in Organ-

bereichen mit hohem Leitgewebeanteil sind große *HIPP26* Transkriptmengen nachweisbar. Toxisch hohe Mengen von 1mM Cd^{2+} sorgen nach 24 Stunden sowohl in Wurzeln als auch im Spross für eine Induktion der Genexpression von *HIPP26*. Durch 1mM Cu wird *HIPP26* abgeschaltet und auch 1mM Zn^{2+} hat einen negativen Einfluss auf dessen Expression (Gao et al., 2009). Diese Daten weisen auf die Bedeutung von *HIPP26* für Prozesse, die mit der pflanzlichen Schwermetallhomöostase in Verbindung stehen, hin.

In silico Analysen des 1055bp DNA Bereiches, der vor dem Translationsstart ATG der für *HIPP26* codierenden Sequenz liegt, offenbaren eine Reihe von möglichen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, welche für die Induktion bei abiotischem Stress verantwortlich sein können. So können unter anderem bei Kälte- und osmotischem Stress wichtige cis-DNA-Elemente wie LTRE-1 (Dunn et al., 1998), DRE2 (Dubouzet et al., 2003), MYC- (Chinnusamy et al., 2003) und MYB-Bindestellen (Abe et al., 1997) im *HIPP26* Promotorbereich identifiziert werden. Hinzu kommen cis-DNA-Elemente, welche bei Salz- und biotischem Stress (GT-1 Boxen, Park et al., 2004) sowie bei Hitze (CCAAT Boxen, Haralampidis et al., 2002) von Bedeutung sind.

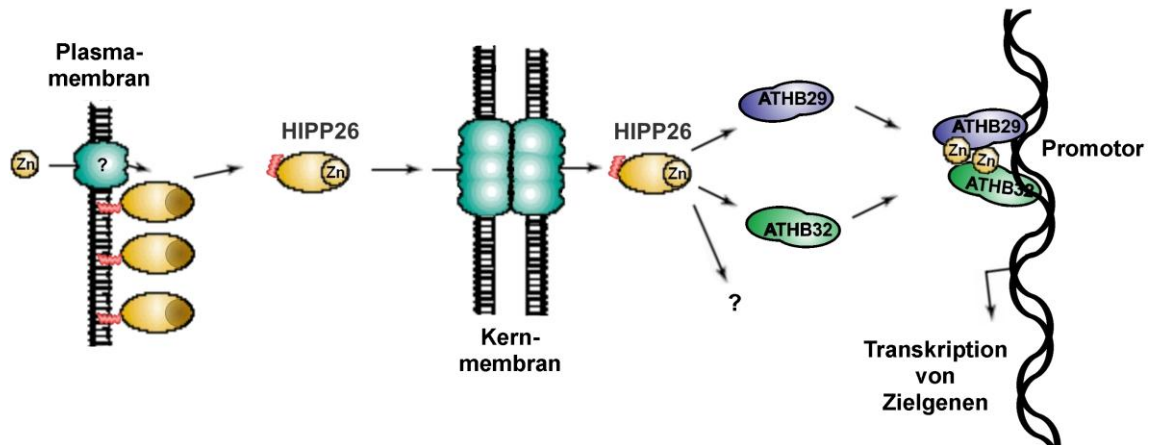
Zusätzlich eröffnen *HIPP26::GUS* Promotor-Reporteranalysen einen Blick auf die Expressionsstärke von *HIPP26* in den unterschiedlichen Teilen einer *Arabidopsis* Pflanze. Dabei kann ein hohes Expressionslevel im Bereich der Leitgefäße nachgewiesen werden (Kapitel 3.2.2.3.). Dies könnte mit dem Transport essentieller Schwermetalle in engem Zusammenhang stehen. Es gibt bereits erste Hinweise, dass in den Wurzeln Proteine mit HMA Domäne an der Beladung des Xylems mit essentiellen Schwermetallen beteiligt sind. Die $\text{P}_{1\text{B}}$ -Typ ATPasen AtHMA2 und AtHMA4 transportieren Zn^{2+} über die Plasmamembran parenchymatischer Zellen innerhalb des Leitgewebes in den Apoplasten des Xylems. *AtHMA2::GUS* und *AtHMA4::GUS* Promotor-Reporteranalysen zeigen, dass beide Gene ähnlich wie *HIPP26* sehr stark im Leitgewebe von Wurzel, Blatt und Stängel exprimiert werden. *hma2hma4* Mutanten zeigen einen Zinkmangel-Phänotyp, der durch Applizierung großer Zn^{2+} Mengen kompensiert werden kann. *hma2hma4* Pflanzen akkumulieren in den Wurzeln größere und im Spross geringere Zn^{2+} Mengen als entsprechende Wildtypkontrollpflanzen (Hussain et al., 2004). Cu^{1+} wird in den Wurzeln möglicherweise von der $\text{P}_{1\text{B}}$ -type ATPase AtHMA5 in den Apoplasten des Xylems transportiert. Zum einen wird *AtHMA5* vor allem in Wurzeln exprimiert und zum anderen reagieren *hma5* Mutanten hypersensitiv auf hohe Kupferkonzentrationen und akkumulieren unter diesen Bedingungen deutlich mehr Cu in den Wurzeln als entsprechende Wildtyppflanzen (Andres-Colas et al., 2006).

Obwohl die genauen molekularen Mechanismen, über die die Schwermetalle im Mesophyll und anderen Sprossbereichen aus dem Xylem entladen werden, noch unbekannt sind (Park et al., 2008; Palmer und Guerinot, 2009), ist anzunehmen, dass die Metallionen, die in diesen apoplastischen Bereichen ankommen, über geeignete Transporter ins Cytosol der parenchymatischen Leitgewebezellen aufgenommen werden. Es liegt nahe, dass Schwermetallchaperone wie *HIPP26* diese Metallionen direkt nach dem Transport über die Plasmamembran übernehmen und sie im Symplasten zu ihren Zielen geleiten. Diese Hypothese steht im Einklang mit der starken Expression von *HIPP26* im Bereich der Leitgewebe.

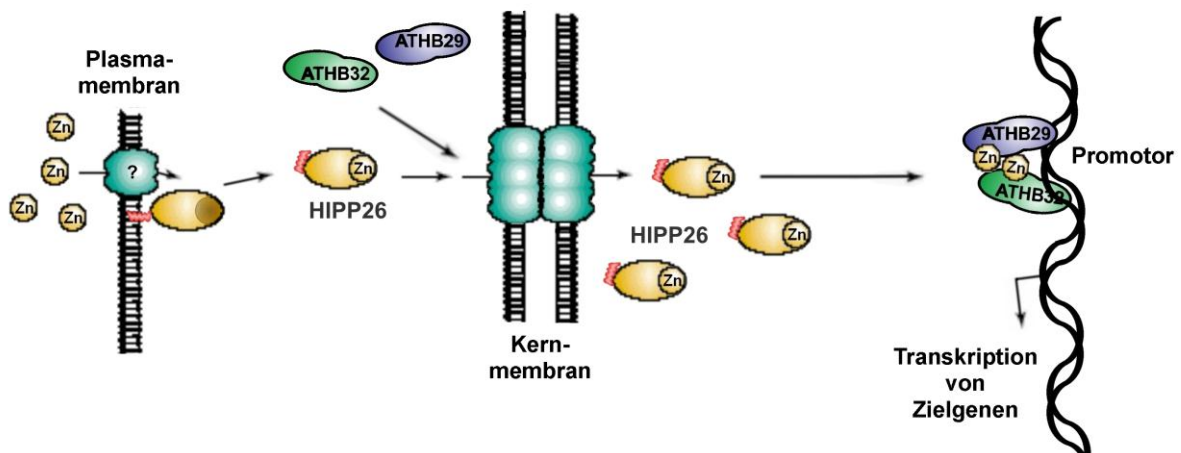
Die Genexpressionsdaten weisen, wie bereits erwähnt, für *HIPP26* auf eine Funktion bei der Schwermetallhomöostase hin, die vor allem bei Kälte- und Salzstress an Bedeutung gewinnt (Kapitel 3.2.2.2.). Die Tatsache, dass mit *HvFP1* ein sehr ähnliches Gen in *Hordeum vulgare* existiert, dessen Expression ebenfalls bei niedrigen Temperaturen deutlich induziert wird (Kapitel 3.1.2.), untermauert diese Bedeutung zusätzlich. Es kann also ein molekularer Zusammenhang zwischen der Anpassungsreaktion der Pflanzen bei Kältestress und der Funktion von Schwermetallchaperonen wie *HvFP1* und *HIPP26* postuliert werden. Um die Verbindung der pflanzlichen Reaktionen bei Kältestress mit den Prozessen der Schwermetallhomöostase verstehen zu können, sind detaillierte Kenntnisse der molekularen Funktion der Schwermetallchaperone erforderlich.

Wichtige Hinweise über die molekulare Funktion dieser Schwermetallchaperone ergeben sich aus den jeweiligen Aminosäuresequenzen. Vor allem die in diesen Sequenzen dominanten HMA Domänen, implizieren für Proteine wie HvFP1 und HIPP26 eine Rolle als Schwermetallchaperon. Die Isoprenylierung liefert dem Metallchaperon einen hydrophoben Anker, der wahrscheinlich die Assoziation mit der Plasma- und/oder Kernmembran ermöglicht. Demnach wäre es u. a. denkbar, dass HIPP26 über den Farnesylrest am C-Terminus in der Plasmamembran verankert ist, um dort die entsprechenden Schwermetalle von einem Schwermetallimporter zu übernehmen.

Situation 1



Situation 2



4.1. Hypothetisches Modell zur mechanistischen Beschreibung der molekularen Funktion von HIPP26 als Schwermetallchaperon. In **Situation 1** gelangen weniger Zinkionen in die Zelle, als dort benötigt werden. Die Metallchaperone 'warten' an der Plasmamembran auf die zu transportierende Fracht. Diese wird direkt am Importer übernommen. Möglicherweise dient das kovalent mit dem Protein verknüpfte Isoprenoidmolekül als hydrophober Membrananker (rot dargestellt). Eventuell bewirkt eine Konformationsänderung bei der Metallübernahme das Lösen der Membranverankerung, so dass das Metallchaperon in den Zellkern importiert werden kann. Dort erfolgt die Übergabe der Zinkionen an Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, wie ATHB29, welche dadurch aktiviert werden. Anschließend verlässt das HIPP den Kern und verankert sich wieder in der Plasmamembran. In **Situation 2** gelangen deutlich mehr Zinkionen in die Zelle, als dort benötigt werden. Ähnlich wie in Situation 1 transportiert HIPP26 die Schwermetallionen in den Zellkern, wo diese auf die Zielproteine übertragen werden. Alle Metallchaperone, die das entsprechend gebundene Zinkion noch nicht auf ein Zielprotein übertragen konnten, bilden im Zellkern einen Pool, aus welchem sich neusynthetisierte Metallproteine, wie ATHB29, direkt nach dem Import in den Zellkern mit Zink versorgen können.

Durch die Bindung des entsprechenden Schwermetalls, z.B. Zink, und die dabei auftretenden Konformationsänderungen könnte sich das Schwermetallchaperon von der Plasmamembran lösen. Daraufhin wird es in den Zellkern importiert, wo es das gebundene Schwermetallion an ein entsprechendes Zielprotein überträgt (Abb. 4.1.). Nach erfolgreichem Schwermetalltransfer wird das Metallchaperon aus dem Nukleus exportiert und verankert sich wieder in der Plasmamembran, um weitere Metallionen zu transportieren. Für dieses Modell sind verschiedene Situationen denkbar. In Situation 1 ist weniger Metall für die Zellen verfügbar, als von den Zielproteinen im Zellkern benötigt wird. In diesem Fall würden die HIPPs die Schwermetallionen direkt nach dem Import in den Zellkern auf die ATHBs transferieren, sich zur Plasmamembran zurückbewegen und dort erneut verankern. Pro Zelle würden größere Mengen von HIPP Protein vorliegen, welche kein Schwermetallion gebunden haben. Unter umgekehrten Verhältnissen wäre es ebenso denkbar, dass bereits mit Schwermetallionen beladene HIPPs im Zellkern akkumulieren, ähnlich wie dies für die sehr stark in Zwiebel-epidermiszellen exprimierte GFP-Fusionsproteine nachweisbar ist (Abb. 3.12. und 3.13.). In dieser zweiten Situation würden die Schwermetallchaperone im Zellkern eine Art Pool oder Pufferspeicher bilden, aus welchem sich die Zielproteine jederzeit mit dem für sie wichtigen Schwermetall bedienen können (Abb. 4.1. Situation 2). Geeignete Experimente zur Bestimmung der membrangebundenen, der pendelnden und der im Zellkern befindlichen Proteinmengen an Metallchaperon und der entsprechend gebundenen Metallionen wären äußerst hilfreich, um die zelluläre Situation genauer beschreiben zu können. Sowohl für biochemische Analysen mittels Fraktionierung der unterschiedlichen zellulären Kompartimente als auch für zytologische Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie ist die Herstellung von sehr spezifischen und hoch affinen Anti-HIPP26-Antikörpern eine wichtige Voraussetzung, da diese dann zur Detektion von HIPP26 eingesetzt werden können.

Nach den in dieser Arbeit dargestellten experimentellen Daten handelt es sich bei den Zielproteinen von HIPP26 z.B. um ATHB29, einen Zinkfinger-Homeodomänen-Transkriptionsfaktor, der bei der Blütenbildung (Tan und Irish, 2006) und bei Trockenstress (Tran et al., 2007a) von großer Bedeutung ist. Hefe-Zwei-Komponenten Analysen deuten darauf hin, dass neben HIPP26 weitere HIPPs aus Cluster III nicht nur mit ATHB29 sondern weiteren Transkriptionsfaktoren der Zinkfinger-Homeodomänen-Familie in Wechselwirkung treten können (3.18.). Dieser interessante Punkt sollte in fortführenden Untersuchungen biochemisch und genetisch genauer analysiert werden. Dabei ist die Bestimmung der Affinitäten für die Bindung der unterschiedlichen Kombinationen von HIPP und ATHB Protein wichtig. Zudem wäre es hilfreich, ein *in vivo* System zu etablieren, mit dem die Wechselwirkungen zwischen HIPP und ATHB unter physiologischen Bedingungen analysiert werden können. Ein solches System würde den Vorteil bieten, dass alle entsprechend einflussnehmenden Faktoren, auch bisher unbekannt Komponenten, vorhanden sind.

Die in dieser Arbeit dargestellten GST-Pulldown Experimente (Abb. 3.17.) zeigen, dass ein funktionelles Schwermetallbindemotiv von HIPP26 für die Bindung an ATHB29 nötig ist. Dies ist ein Hinweis darauf, dass HIPP26 Schwermetalle auf ATHB29 überträgt. Da ATHB29 Zinkionen als Cofaktor benötigt, liegt die Vermutung nahe, dass HIPP26 als Zn^{2+} -Chaperon fungiert. In ähnlichen *in vitro* Analysen sollten sowohl weitere strukturell wichtige Aminosäurereste als auch die Art der für die Bindung wichtigen Metallionen genauer analysiert werden.

Gao et al., (2009) konnten mit dem *Arabidopsis thaliana* Acyl-CoA-bindenden Protein 2 (ACBP2) einen weiteren Interaktionspartner von HIPP26 identifizieren. Bei ACBP2 handelt es sich um ein mit der Plasmamembran assoziiertes Protein, welches die aktivierten Fettsäure-Coenzym-A-Ester Linoleoyl-CoA, Linolenoyl-CoA und mit geringerer Affinität auch Palmitoyl-CoA binden kann. Immobilisierte metallaffinitätschromatographische Analysen zeigen, dass sowohl ACBP2 als auch HIPP26 (ATFP6) Cu^{2+} -, Cd^{2+} - und Pb^{2+} -Ionen binden können. Die Autoren vermuten, dass beide Proteine am Transfer von Schwermetallen, wie

Kupfer, Cadmium und Blei involviert sind. In einer Beteiligung an Reparaturprozessen von Phospholipiden, welche unter Schwermetallstress durch oxidative Prozesse geschädigt worden sind, sehen Gao et al., (2009) eine weitere mögliche Funktion der Wechselwirkung von HIPP26 mit ACBP2. Die IMAC Analysen zeigen, dass HIPP26 *in vitro* Schwermetalle binden kann. In zukünftigen Studien sollten weitere Nebengruppenmetalle der vierten Periode, wie Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+} ebenfalls auf ihre Fähigkeit zur Metall-HIPP26 Komplexbildung hin untersucht werden. Von der Irving-Williams Serie zur Reihenfolge der Stabilität von Metallkomplexen (Irving und Williams, 1948) lässt sich vor allem für freie Cu^{2+} -Ionen eine starke kompetitive Bindung an die Amin- und Thiolgruppen in den Metallbindetaschen von Metallproteinen ableiten (In *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*, 2nd ed.; Frausto da Silva, J. J. R., Williams, R. J. P., Eds.; Clarendon Press: Oxford, UK, 2002.). Es ist zu vermuten, dass vor allem Cu^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen *in vitro* ebenfalls mit ähnlich hohen Affinitäten wie Cd^{2+} und Pb^{2+} an HIPP26 binden können. Dies macht deutlich, dass *in vivo* die Art des jeweils gebundenen Schwermetalls stark von der Spezifität der entsprechenden Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen Importer, Metallchaperon, Zielprotein und Efflux-Transporter, also dem Weg des entsprechenden Schwermetalls innerhalb der Zelle abhängig ist. Demnach sind sowohl die Metallspezifitäten der Importer an der Plasmamembran als auch die Affinitäten zwischen den jeweils interagierenden Metallproteinen innerhalb der Zelle für die korrekten Transportwege des entsprechenden Schwermetalls verantwortlich.

Interessant in diesem Zusammenhang ist auch der Umstand, dass *in vivo* die Bindung des 'richtigen' Metalls an das entsprechende Protein über die dabei auftretenden Konformationsänderungen dessen Aktivität allosterisch beeinflussen kann. Für diesen Zusammenhang sprechen unter anderem Daten, die am Beispiel des Transkriptionsrepressors NikR aus *E. coli* erhoben worden sind. NikR bindet *in vitro* nicht nur Ni^{2+} mit hoher Affinität im picomolaren Bereich sondern auch Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} und Cd^{2+} . Die Höhe der Affinitäten spiegelt dabei die Reihenfolge der Irving-Williams Serie. Chemische und thermische Denaturierungsexperimente zeigen, dass die Bindung von Ni^{2+} -Ionen nicht nur die Stabilität der Metallbindedomäne erhöht, sondern auch die Stabilität des gesamten Proteins inklusive der DNA-Bindedomäne verbessert. Weder Kupfer noch eines der anderen getesteten Metalle haben einen ähnlich großen Einfluss auf die Stabilität von NikR (Wang et al., 2004). In Anwesenheit von divalenten Metallionen wie Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} und Cd^{2+} bindet NikR an DNA Moleküle. Die spezifische Bindung von Ni^{2+} -NikR Komplexen an den *nik* Promotor erfolgt mit einer sehr großen Affinität im nanomolaren Bereich. Sie ist geringer, wenn NikR Cu^{2+} oder Co^{2+} gebunden hat. (Bloom und Zamble, 2004).

Die hohen Affinitäten der unterschiedlichen Schwermetalle zu den verschiedenen Metallproteinen sind vor allem bei deren Freisetzung innerhalb der Zelle unter Stress und während der Recyclingprozesse im Verlauf der Seneszenz gefährlich. So können bei Stress auftretende oxidative Prozesse die Metallproteine schädigen, zur Freisetzung der Metallionen führen und damit einen gefährlichen Kreislauf in Gang setzen (Tottey et al., 2005). Die Induktion von Metallchaperonen wie HvFP1 aus *Hordeum vulgare* oder HIPP26 aus *Arabidopsis thaliana* bei Kältestress könnte durchaus mit derartigen Prozessen in Zusammenhang stehen. Denkbar wäre unter anderem, dass es unter diesen Bedingungen sowohl zur verstärkten Degradation von bei niedrigen Temperaturen nicht benötigten nukleären Metallproteinen als auch zur enormen Neusynthese z.B. von Zinkionen bindenden Transkriptionsfaktoren kommt. Die Aufnahme der bei Abbauprozessen freigesetzten Metalle und die Übertragung von diesen Metallen als Cofaktor auf neu gebildete Transkriptionsfaktoren und andere Metallproteine würde unter diesen Bedingungen die Gefahr, die von freien Schwermetallionen ausgeht, deutlich verringern.

Wie weitreichend Störungen der zellulären Schwermetallhomöostase sind, zeigen Transkriptomanalysen an *35S::PIC1* Mutanten. PIC1 ('Permease in chloroplasts 1') ist in der inneren Hüllmembran der Plastiden lokalisiert und am Transport von Fe^{2+} in die Plastiden beteiligt (Duy et al., 2007). *35S::PIC1* Mutanten akkumulieren deutlich erhöhte Mengen an Eisen in Blättern und Blüten. Die Überversorgung der Plastiden mit Eisen führt zu signifikanten Veränderungen der Expression einer Reihe von Genen, die für Schwermetalltransporter, Metallothioneine und Proteine mit HMA Domäne, wie At5g50740, CCH, AtATX1 und den HIPPs HIPP6 (At5g03380), HIPP7 (At5g63530), HIPP21 (At5g17450) und HIPP26 (At4g38580), codieren (Duy et al., 2011).

Für einen genaueren Blick auf die molekularen Mechanismen der Schwermetallhomöostase auf zellulärer Ebene ist es erforderlich die Identität der Schwermetallimporter aufzuklären, welche den Transport über die Plasmamembran ins Cytosol und die Übertragung auf die Schwermetallchaperone bewerkstelligen. Ob die HIPPs und weitere HMA Proteine von den Transportern der ZIP/IRT-Familie, COPT-Familie oder anderen Importern mit Schwermetallionen versorgt werden, ist im Detail bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt und sollte näher untersucht werden. Interessant ist, dass die Genexpression von *AtZIP3*, *AtZIP4*, *AtZIP9* und *AtIRT3* im Spross unter Zinkmangelbedingungen deutlich induziert vorliegt und durch eine Wiederversorgung mit Zn^{2+} innerhalb weniger Stunden auf das Niveau der normal versorgten Kontrollen zurückgefahren wird (Talke et al., 2006). *AtIRT3* ist am Transport von Fe^{2+} und Zn^{2+} beteiligt. *35S::AtIRT3* Pflanzen akkumulieren in den Wurzeln größere Mengen an Fe^{2+} und Zn^{2+} und im Spross mehr Zn^{2+} als entsprechende Kontrollpflanzen (Lin et al., 2009). *Arabidopsis bzip19/23* T-DNA Insertionsmutanten, denen die Transkriptionsfaktoren bZIP19 und bZIP23 fehlen, sind nicht in der Lage die unter Zinkmangel übliche Induktion der Genexpression der Transporter ZIP1, ZIP3, ZIP4, ZIP5, ZIP9, ZIP12 und IRT3 zu bewerkstelligen. *bzip19/23* Pflanzen reagieren hypersensitiv auf Zinkmangelbedingungen (Assuncao et al., 2010). Diese Daten lassen vermuten, dass der Import von Zinkionen ins Cytosol über diese Transporter ermöglicht und reguliert wird. Auf experimentellem Weg sollte untersucht werden, ob HIPP26 oder andere HIPPs mit diesen oder weiteren relevanten Schwermetallimportern in Wechselwirkung treten.

Analysen mit *Arabidopsis* Transposon-Insertionslinien, die keine funktionellen *HIPP25* und/oder *HIPP26* Gene besitzen, erbrachten bisher keine auffälligen phänotypischen Unterschiede zum Wildtyp. Weder bei Kälte- noch bei Salz- oder Trockenstress sind Unterschiede nachweisbar, die auf das Fehlen von *HIPP25* und/oder *HIPP26* zurückgeführt werden können (siehe Kapitel 3.2.2.5.1. bis 3.2.2.5.3.). Bei einer Überversorgung mit Cu^{2+} und Zn^{2+} sind inhibitorische Effekte auf die Keimlinge aller Pflanzenlinien nachweisbar. Unterschiede zwischen den Wildtyp- und *hipp25*, *hipp26* und *hipp25/26* Pflanzen können unter diesen Schwermetallstressbedingungen nicht festgestellt werden (siehe Kapitel 3.2.2.5.4.). Obwohl ein Vergleich dieser Linien unter Schwermetallmangelbedingungen noch aussteht und weitere Metalle, wie Eisen, Cobalt, Nickel, Cadmium und Blei noch getestet werden müssen, ist dies ein Hinweis darauf, dass die Funktion von *HIPP25* und *HIPP26* zumindest teilweise durch andere Faktoren übernommen oder deren Fehlen durch andere Prozesse ausgeglichen werden kann. Phänotypische Unterschiede wären in diesem Fall nur durch das zusätzliche Ausschalten dieser weiteren Faktoren nachweisbar. In diesem Zusammenhang sei wiederholt auf die große Homologie der Aminosäuresequenzen der HIPPs aus Cluster III insbesondere von *HIPP25*, *HIPP26* und *HIPP27* verwiesen (siehe Kapitel 3.2.2.).

Tehseen et al., (2010) konnten für *hipp20/21/22 Arabidopsis* Mutanten eine verringerte Toleranz gegenüber Cd^{2+} im Konzentrationsbereich von $4\mu\text{M}$ bis $6\mu\text{M}$ nachweisen, während *hipp20/21*, *hipp20/22* und *hipp21/22* Pflanzen keine erhöhte Cd^{2+} -Sensitivität besitzen. Diese Daten zeigen, dass funktionelle Redundanzen für die HIPPs in Cluster III existieren.

Für solche funktionellen Redundanzen der HIPPs aus Cluster III sprechen auch die Daten der bereits diskutierten Protein-Protein Interaktionsstudien.

Diese Analysen weisen darauf hin, dass neben HIPP26 weitere HIPPs aus Cluster III mit ATHB29 und weiteren Transkriptionsfaktoren der Zinkfinger-Homeodomänen-Familie in Wechselwirkung treten können (siehe Kapitel 3.2.2.4.). Zudem vermuten Tan und Irish, (2006), dass funktionelle Redundanzen auch innerhalb der Familie der ATHB Transkriptionsfaktoren auftreten. Alle 13 getesteten *ATHB* Gene werden sehr stark in den Blütenständen und in geöffneten Blüten exprimiert. Die Autoren haben T-DNA Insertionslinien für 8 unterschiedliche *ATHB* Gene untersucht. Es konnten weder Veränderungen in Bezug auf die ablaufenden Entwicklungsprozesse noch morphologische Unterschiede zwischen den Pflanzen der einzelnen Linien und den Wildtypkontrollen nachgewiesen werden. Solche funktionellen Redundanzen erschweren die genetischen Analysen der entsprechenden Proteinfamilien anhand von 'loss of function' Mutanten enorm.

Tran et al., (2007a) ist es in globalen Transkriptanalysen mittels Microarray-Technik gelungen Gene zu identifizieren, deren Expression in transgenen *35S::ATHB29 Arabidopsis* Pflanzen deutlich verstärkt bzw. verringert wird. Die Expression einiger ATHB29 abhängiger Gene ist in *hipp26* Mutanten deutlich niedriger als in den entsprechenden Wildtypkontrollpflanzen (siehe Kapitel 3.2.2.5.5.). Diese Genexpressionsdaten machen einen positiven Einfluss des Metallchaperons HIPP26 auf den Transkriptionsfaktor ATHB29 sichtbar. Obwohl die Spezifität der Schwermetallbindung durch HIPP26 *in vivo* noch analysiert werden muss, liefern diese Expressionsdaten ein weiteres Indiz für die folgende in der vorliegenden Dissertationsschrift herausgearbeitete Hypothese. HIPP26 transportiert als Metallchaperon Zn^{2+} -Ionen vom Importer an der Plasmamembran in den Zellkern. Dort übergibt HIPP26 die Zn^{2+} -Ionen an den Zinkfinger-Homeodomänen-Transkriptionsfaktor ATHB29, weitere ATHBs und möglicherweise noch andere Zielproteine (siehe Abb. 4.1.). Während die Homeodomäne für die Bindung der ATHBs an die DNA wichtig ist, sind die Zinkfingerbereiche für die Dimerisierung verantwortlich (Windhövel et al., 2001). Einige ATHBs sind dazu fähig Homodimere zu bilden. Die Tendenz zur Heterodimerisierung ist für alle untersuchten ATHBs mit z.T. erstaunlich hohen Interaktionsstärken nachweisbar. Tan und Irish, (2006) vermuten hinter der Vielzahl an möglichen Kombinationen zur Dimerisierung zwischen den unterschiedlichen ATHBs eine besondere Form die Expression der entsprechenden Zielgene, fein abgestimmt zu regulieren.

Diese Zusammenhänge weisen darauf hin, welche große Bedeutung den Zn^{2+} Ionen als Cofaktor zukommt. Zudem sprechen die in dieser Arbeit vorgelegten Daten dafür, dass Metallchaperone wie HIPP26 und HvFP1, über die Bereitstellung dieses Cofaktors einen wichtigen Einfluss auf die Prozesse haben, welche für die Steuerung der Genexpression bei Stress und während der pflanzlichen Entwicklung verantwortlich sind.

Tran et al., (2007a) haben anhand einer Reihe von Daten zeigen können, das ATHB29 (ZFHD1) an der Aktivierung von Genen beteiligt ist, die bei abiotischem Stress für die Anpassungsreaktionen wichtig sind. *35S::ATHB29* Mutanten besitzen eine deutlich größere Toleranz gegenüber Wassermangel als die entsprechenden Kontrollen. Obwohl in *hipp26* Mutanten einige der ATHB29 abhängigen Gene schwächer exprimiert werden als in den entsprechenden Wildtypkontrollen (Kapitel 3.2.2.5.5.), wirkt sich das Fehlen von HIPP26 in den Mutanten nicht signifikant auf die Toleranz gegenüber Wassermangel aus (Kapitel 3.2.2.5.3.). Dies zeigt, dass der Einfluss von HIPP26 auf das Geschehen bei der Anpassung an Trockenheit eher gering ist. Zudem konnten Tan und Irish, (2006), wie bereits erwähnt, sowohl für *athb29* als auch 7 weitere T-DNA Insertionslinien in anderen *ATHB* Genen keinerlei phänotypische Veränderung im Vergleich zu den Wildtypkontrollpflanzen feststellen. Dies ist ein klarer Hinweis darauf, dass funktionelle Redundanzen auch innerhalb der Familie der Zinkfinger-Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren existieren. Die Hefe-Zwei-Komponenten-Analysen zur Bestimmung der Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen den ATHBs und den HIPPs aus Cluster III deuten darauf hin, dass neben HIPP26 weitere HIPPs als Schwermetallchaperone für ATHB29 und andere ATHBs fungieren (Kapitel 3.2.2.4.). Um die Situa-

tion in den *hipp* Mutanten genauer beschreiben zu können, wäre es also erforderlich, das Verhältnis von ATHB29 mit und ohne Zn^{2+} als Cofaktor zu bestimmen. Wie stabil sind ATHB29 Proteine mit und ohne Cofaktor?

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Frage wie viele und welche HIPPs in entsprechenden Mutanten fehlen müssen, um phänotypische Unterschiede hervorzurufen, welche auf eine Zink-Unterversorgung der ATHBs und weiterer Faktoren im Zellkern zurückgeführt werden können.

Die relativ große Anzahl von 46 unterschiedlichen HIPPs und 30 anderen Proteinen mit HMA Domäne in Gefäßpflanzen wie *Arabidopsis thaliana* impliziert besondere Erfordernisse an die molekularen Systeme, welche die Schwermetallhomöostase gewährleisten. Höchstwahrscheinlich sind die HIPPs und die anderen Proteine mit HMA Domäne entscheidend an der genau gesteuerten Verteilung essentieller und/oder toxischer Schwermetalle innerhalb pflanzlicher Zellen beteiligt. Wie bereits erwähnt (Kapitel 1.4.) sind einige dieser Schwermetallproteine an der Verteilung von Kupferionen in den Zellen involviert. Dazu gehören in *Arabidopsis thaliana* die Kupferchaperone CCH (Himmelblau et al., 1998), AtATX1 (Andres-Colas et al., 2006; Puig et al., 2007b) und CCS (Wintz und Vulpe, 2002; Chu et al., 2005) und die Cu^{1+} -transportierenden P_{1B} -Typ ATPasen AtHMA5 (Andres-Colas et al., 2006), AtHMA6 (Tabata et al., 1997, Shikanai et al., 2003), AtHMA7 (Puig et al., 2007b) und AtHMA8 (Abdel-Ghany et al., 2005). Interessant ist, dass sich deren HMA Domänen, wie in Kapitel 3.2.1. dargestellt, phylogenetisch wahrscheinlich vom gleichen Vorläufer ableiten, wie die HMA Domänen der Zn^{2+} -transportierenden P_{1B} -Typ ATPasen AtHMA2 (Eren und Argüello, 2004; Hussain et al., 2004), AtHMA3 (Gravot et al., 2004; Hussain et al., 2004) und AtHMA4 (Verret et al., 2004; Hussain et al., 2004). Dies führt zu der Hypothese, dass eine Reihe von HIPPs und weitere HMA Proteine aus den anderen phylogenetischen Gruppen (Kapitel 3.2.1.), entweder monovalente Kupferionen oder divalente Zink-, Cobalt-, Cadmium- und Bleiionen binden und innerhalb der Zelle zu den entsprechenden Zielen transportieren. Solange die entsprechende Schwermetallspezifität unbekannt ist, sollte demnach die von Wintz und Vulpe, (2002) sehr eng gefasste Beschreibung der Proteine mit HMA Domäne als 'Kupferchaperone' zu 'Schwermetallchaperone' erweitert werden. Die in dieser Dissertationsschrift präsentierten Daten liefern Hinweise darauf, dass HIPP26 und weitere HIPPs aus Cluster III des entsprechenden phylogenetischen Baumes (Abb. 3.10.) als Schwermetallchaperone fungieren und Zielproteine im Zellkern mit Zn^{2+} -Ionen beliefern. Eine Bestätigung dieser Hypothese durch weitere experimentelle Analysen wäre der Beginn für ein neues Kapitel bei der Beschreibung der molekularen Prozesse der pflanzlichen Schwermetallhomöostase.

5. Literaturverzeichnis

- Abdel-Ghany, S.E., and Pilon, M.** (2008). MicroRNA-mediated Systemic Down-regulation of Copper Protein Expression in Response to Low Copper Availability in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 15932-15945.
- Abdel-Ghany, S.E., Muller-Moule, P., Niyogi, K.K., Pilon, M., and Shikanai, T.** (2005). Two P-Type ATPases Are Required for Copper Delivery in *Arabidopsis thaliana* Chloroplasts. *Plant Cell* **17**, 1233-1251.
- Abdel-Ghany, S.E., Burkhead, J.L., Gogolin, K.A., Andrés-Colás, N., Bodecker, J.R., Puig, S., Peñarrubia, L., and Pilon, M.** (2005b). AtCCS is a functional homolog of the yeast copper chaperone Ccs1/Lys7. *FEBS Letters* **579**, 2307.
- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., and Shinozaki, K.** (1997). Role of *Arabidopsis* MYC and MYB Homologs in Drought-and Abscisic Acid-Regulated Gene Expression. *Plant Cell* **9**, 1859-1868.
- Adamska, I., Roobol-Bóza, M., Lindahl, M., and Andersson, B.** (1999). Isolation of pigment-binding early light-inducible proteins from pea. *European Journal of Biochemistry* **260**, 453.
- Agarwal, M., Hao, Y., Kapoor, A., Dong, C.-H., Fujii, H., Zheng, X., and Zhu, J.-K.** (2006). A R2R3 Type MYB Transcription Factor Is Involved in the Cold Regulation of CBF Genes and in Acquired Freezing Tolerance. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 37636.
- Akada, R., Kawahata, M., and Nishizawa, Y.** (2000). Elevated temperature Greatly Improves Transformation of Fresh and Frozen Competent Cells in Yeast. *BioTechniques* **28**, 852-853.
- Allagulova, C.R., Gimalov, F.R., Shakirova, F.M., and Vakhitov, V.A.** (2003). The Plant Dehydrins: Structure and Putative Functions. *Biochemistry (Moscow)* **68**, 945.
- Alonso, A., Queiroz, C.S., and Magalhães, A.C.** (1997). Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1323**, 75.
- Andrés-Colás, N., Sancenón, V., Rodríguez-Navarro, S., Mayo, S., Thiele, D.J., Ecker, J.R., Puig, S., and Peñarrubia, L.** (2006). The *Arabidopsis* heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *The Plant Journal* **45**, 225-236.
- Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Huffman, D.L., and O'Halloran, T.V.** (2001). Solution Structure of the Cu(I) and Apo Forms of the Yeast Metallochaperone, Atx1. *Biochemistry* **40**, 1528.
- 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 Research* **12**, 255-271.
- 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. *The Plant Journal* **46**, 861.
- Asada, K.** (2006). Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiol.* **141**, 391-396.
- Assuncao, A.G.L., Herrero, E., Lin, Y.-F., Huettel, B., Talukdar, S., Smaczniak, C., Immink, R.G.H., van Eldik, M., Fiers, M., Schat, H., and Aarts, M.G.M.** (2010). *Arabidopsis thaliana* transcription factors bZIP19 and bZIP23 regulate the adaptation to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 10296-10301.
- Attallah, C., Welchen, E., Pujol, C., Bonnard, G., and Gonzalez, D.** (2007). Characterization of *Arabidopsis thaliana* genes encoding functional homologues of the yeast metal chaperone Cox19p, involved in cytochrome *c* oxidase biogenesis. *Plant Molecular Biology* **65**, 343.
- Baekgaard, L., Mikkelsen, M.D., Sørensen, D.M., Hegelund, J.N., Persson, D.P., Mills, R.F., Yang, Z., Husted, S., Andersen, J.P., Buch-Pedersen, M.J., Schjoerring, J.K., Williams, L.E., and Palmgren, M.G.** (2010). A Combined Zinc/Cadmium Sensor and Zinc/Cadmium Export Regulator in a Heavy Metal Pump. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 31243-31252.
- Bai, L., Zhang, G., Zhou, Y., Zhang, Z., Wang, W., Du, Y., Wu, Z., and Song, C.P.** (2009). Plasma membrane-associated proline-rich extensin-like receptor kinase 4, a novel regulator of Ca²⁺ signalling, is required for abscisic acid responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **60**, 314.
- Balandin, T., and Castresana, C.** (2002). AtCOX17, an *Arabidopsis* Homolog of the Yeast Copper Chaperone COX17. *Plant Physiol.* **129**, 1852-1857.
- Barth, O., Zschiesche, W., Siersleben, S., and Humbeck, K.** (2004). Isolation of a novel barley cDNA encoding a nuclear protein involved in stress response and leaf senescence. *Physiologia Plantarum* **121**, 282-293.
- Barth, O., Vogt, S., Uhlemann, R., Zschiesche, W., and Humbeck, K.** (2009). Stress induced and nuclear localized HIPP26 from *Arabidopsis thaliana* interacts via its heavy metal associated domain with the drought stress related zinc finger transcription factor ATHB29. *Plant Molecular Biology* **69**, 213.

- 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*. *The Plant Journal* **37**, 251.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J., and Masterson, R.** (1992). New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Molecular Biology* **20**, 1195.
- Benedict, C., Geisler, M., Trygg, J., Huner, N., and Hurry, V.** (2006). Consensus by Democracy. Using Meta-Analyses of Microarray and Genomic Data to Model the Cold Acclimation Signaling Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **141**, 1219-1232.
- Binder, B.M., Rodriguez, F.I., and Bleecker, A.B.** (2010). The Copper Transporter RAN1 Is Essential for Biogenesis of Ethylene Receptors in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 37263-37270.
- Bloom, S.L., and Zamble, D.B.** (2004). Metal-Selective DNA-Binding Response of *Escherichia coli* NikR. *Biochemistry* **43**, 10029.
- Boese, S.R., and Huner, N.P.A.** (1990). Effect of Growth Temperature and Temperature Shifts on Spinach Leaf Morphology and Photosynthesis. *Plant Physiol.* **94**, 1830-1836.
- Bolhàr-Nordenkamp, H.R., and Lechner, E.G.** (1988). Temperature and light dependent modifications of chlorophyll fluorescence kinetics in spruce needles during winter. *Photosynthesis Research* **18**, 287.
- Boyer, J.S., and Westgate, M.E.** (2004). Grain yields with limited water. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2385.
- Bray, E.A.** (2002). Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the *Arabidopsis* genome. *Plant, Cell & Environment* **25**, 153.
- Buckley, T.N.** (2005). The control of stomata by water balance. *New Phytologist* **168**, 275.
- Burkhead, J.L., Gogolin Reynolds, K.A., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M., and Pilon, M.** (2009). Copper homeostasis. *New Phytologist* **182**, 799.
- Cailliatte, R., Schikora, A., Briat, J.-F., Mari, S., and Curie, C.** (2010). High-Affinity Manganese Uptake by the Metal Transporter NRAMP1 Is Essential for *Arabidopsis* Growth in Low Manganese Conditions. *Plant Cell* **22**, 904-917.
- Carr, H.S., and Winge, D.R.** (2003). Assembly of Cytochrome c Oxidase within the Mitochondrion. *Accounts of Chemical Research* **36**, 309.
- Cataldo, D.A., McFadden, K.M., Garland, T.R., and Wildung, R.E.** (1988). Organic Constituents and Complexation of Nickel(II), Iron(III), Cadmium(II), and plutonium(IV) in Soybean Xylem Exudates. *Plant Physiol.* **86**, 734-739.
- Cattivelli, L., and Bartels, D.** (1990). Molecular Cloning and Characterization of Cold-Regulated Genes in Barley. *Plant Physiol.* **93**, 1504-1510.
- Chaves, M.M., Flexas, J., and Pinheiro, C.** (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* **103**, 551.
- Cheong, Y., Sung, S., Kim, B.-G., Pandey, G., Cho, J.-S., Kim, K.-N., and Luan, S.** (2010). Constitutive overexpression of the calcium sensor *CBL5* confers osmotic or drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Molecules and Cells* **29**, 159.
- Cheong, Y.H., Kim, K.-N., Pandey, G.K., Gupta, R., Grant, J.J., and Luan, S.** (2003). CBL1, a Calcium Sensor That Differentially Regulates Salt, Drought, and Cold Responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 1833-1845.
- Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Grant, J.J., Batistic, O., Li, L., Kim, B.G., Lee, S.C., Kudla, J., and Luan, S.** (2007). Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **52**, 223.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., and Zhu, J.-K.** (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science* **12**, 444.
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B.-h., Hong, X., Agarwal, M., and Zhu, J.-K.** (2003). ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **17**, 1043.
- Choi, H.-i., Hong, J.-h., Ha, J.-o., Kang, J.-y., and Kim, S.Y.** (2000). ABFs, a Family of ABA-responsive Element Binding Factors. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 1723-1730.
- Choi, H.-i., Park, H.-J., Park, J.H., Kim, S., Im, M.-Y., Seo, H.-H., Kim, Y.-W., Hwang, I., and Kim, S.Y.** (2005). *Arabidopsis* Calcium-Dependent Protein Kinase AtCPK32 Interacts with ABF4, a Transcriptional Regulator of Abscisic Acid-Responsive Gene Expression, and Modulates Its Activity. *Plant Physiol.* **139**, 1750-1761.
- Chomczynski, P., and Mackey, K.** (1995). Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. *BioTechniques* **19**, 942-945.
- Christmann, A., Moes, D., Himmelbach, A., Yang, Y., Tang, Y., and Grill, E.** (2006). Integration of Abscisic Acid Signalling into Plant Responses. *Plant Biol (Stuttg.)* **8**, 314.
- 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**, 425-436.

- Clemens, S.** (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**, 475.
- Clemens, S.** (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* **88**, 1707.
- Clemens, S., and Persoh, D.** (2009). Multi-tasking phytochelatin synthases. *Plant Science* **177**, 266.
- Close, T.J.** (1997). Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum* **100**, 291.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**, 735.
- Cobbett, C., and Goldsbrough, P.** (2002). PHYTOCHELATINS AND METALLOTHIONEINS: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 159-182.
- Cobine, P., Wickramasinghe, W.A., Harrison, M.D., Weber, T., Solioz, M., and Dameron, C.T.** (1999). The *Enterococcus hirae* copper chaperone CopZ delivers copper(I) to the CopY repressor. *FEBS Letters* **445**, 27.
- Colangelo, E.P., and Guerinot, M.L.** (2004). The Essential Basic Helix-Loop-Helix Protein FIT1 Is Required for the Iron Deficiency Response. *Plant Cell* **16**, 3400-3412.
- Creelman, R.A., Mason, H.S., Bensen, R.J., Boyer, J.S., and Mullet, J.E.** (1990). Water Deficit and Abscisic Acid Cause Differential Inhibition of Shoot versus Root Growth in Soybean Seedlings: Analysis of Growth, Sugar Accumulation, and Gene Expression. *Plant Physiol.* **92**, 205-214.
- Crosatti, C., Polverino de Laureto, P., Bassi, R., and Cattivelli, L.** (1999). The Interaction between Cold and Light Controls the Expression of the Cold-Regulated Barley Gene *cor14b* and the Accumulation of the Corresponding Protein. *Plant Physiology* **119**, 671-680.
- Crowell, D.N.** (2000). Functional implications of protein isoprenylation in plants. *Progress in Lipid Research* **39**, 393.
- Crowell, D.N., and Huizinga, D.H.** (2009). Protein isoprenylation: the fat of the matter. *Trends in Plant Science* **14**, 163.
- Curie, C., Alonso, J.M., Le Jean, M., Ecker, J.R., and Briat, J.F.** (2000). Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem. J.* **347**, 749-755.
- Curie, C., Cassin, G.I., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M., Misson, J., Schikora, A., Czernic, P., and Mari, S.p.** (2009). Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of Botany* **103**, 1-11.
- Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R., and Abrams, S.R.** (2010). Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 651.
- Das, S., Hussain, A., Bock, C., Keller, W.A., and Georges, F.** (2005). Cloning of *Brassica napus* phospholipase C2 (BnPLC2), phosphatidylinositol 3-kinase (BnVPS34) and phosphatidylinositol synthase1 (BnPtdIns S1)—comparative analysis of the effect of abiotic stresses on the expression of phosphatidylinositol signal transduction-related genes in *B. napus*. *Planta* **220**, 777.
- Davies, W.J., and Zhang, J.** (1991). Root Signals and the Regulation of Growth and Development of Plants in Drying Soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**, 55.
- Davis, S.J., and Vierstra, R.D.** (1998). Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Molecular Biology* **36**, 521.
- del Pozo, T., Cambiazo, V., and González, M.** (2010). Gene expression profiling analysis of copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **393**, 248.
- Delhaize, E., Kataoka, T., Hebb, D.M., White, R.G., and Ryan, P.R.** (2003). Genes Encoding Proteins of the Cation Diffusion Facilitator Family That Confer Manganese Tolerance. *Plant Cell* **15**, 1131-1142.
- Delhaize, E., Gruber, B.D., Pittman, J.K., White, R.G., Leung, H., Miao, Y., Jiang, L., Ryan, P.R., and Richardson, A.E.** (2007). A role for the *AtMTP11* gene of *Arabidopsis* in manganese transport and tolerance. *The Plant Journal* **51**, 198.
- 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 Letters* **579**, 4165.
- Dodd, A.N., Kudla, J., and Sanders, D.** (2010). The Language of Calcium Signaling. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 593-620.
- Dodd, A.N., Jakobsen, M.K., Baker, A.J., Telzerow, A., Hou, S.-W., Laplaze, L., Barrot, L., Scott Poethig, R., Haseloff, J., and Webb, A.A.R.** (2006). Time of day modulates low-temperature Ca²⁺ signals in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **48**, 962.
- Doherty, C.J., Van Buskirk, H.A., Myers, S.J., and Thomashow, M.F.** (2009). Roles for *Arabidopsis* CAMTA Transcription Factors in Cold-Regulated Gene Expression and Freezing Tolerance. *Plant Cell* **21**, 972-984.
- Dong, C.-H., Agarwal, M., Zhang, Y., Xie, Q., and Zhu, J.-K.** (2006). The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 8281.

- Dubouzet, J.G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E.G., Miura, S., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal* **33**, 751.
- Dunn, M.A., Brown, K., Lightowers, R., and Hughes, M.A. (1996). A low-temperature-responsive gene from barley encodes a protein with single-stranded nucleic acid-binding activity which is phosphorylated in vitro. *Plant Molecular Biology* **30**, 947.
- Dunn, M.A., White, A.J., Vural, S., and Hughes, M.A. (1998). Identification of promoter elements in a low-temperature-responsive gene (blt4.9) from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Molecular Biology* **38**, 551.
- Durrett, T.P., Gassmann, W., and Rogers, E.E. (2007). The FRD3-Mediated Efflux of Citrate into the Root Vasculature Is Necessary for Efficient Iron Translocation. *Plant Physiol.* **144**, 197-205.
- Duy, D., Ståbe, R., Wanner, G., and Philippar, K. (2011). The Chloroplast Permease PIC1 Regulates Plant Growth and Development by Directing Homeostasis and Transport of Iron. *Plant Physiology* **155**, 1709-1722.
- Duy, D., Wanner, G., Meda, A.R., von Wiren, N., Soll, J., and Philippar, K. (2007). PIC1, an Ancient Permease in *Arabidopsis* Chloroplasts, Mediates Iron Transport. *The Plant Cell Online* **19**, 986-1006.
- Dykema, P., Sipes, P., Marie, A., Biermann, B., Crowell, D., and Randall, S. (1999). A new class of proteins capable of binding transition metals. *Plant Molecular Biology* **41**, 139.
- El-Khatib, R.T., Good, A.G., and Muench, D.G. (2007). Analysis of the *Arabidopsis* cell suspension phosphoproteome in response to short-term low temperature and abscisic acid treatment. *Physiologia Plantarum* **129**, 687.
- Eren, E., and Argüello, J.M. (2004). *Arabidopsis* HMA2, a Divalent Heavy Metal-Transporting PIB-Type ATPase, Is Involved in Cytoplasmic Zn²⁺ Homeostasis. *Plant Physiol.* **136**, 3712-3723.
- Eren, E., Gonzalez-Guerrero, M., Kaufman, B.M., and Argüello, J.M. (2007). Novel Zn²⁺ Coordination by the Regulatory N-Terminus Metal Binding Domain of *Arabidopsis thaliana* Zn²⁺-ATPase HMA2. *Biochemistry* **46**, 7754.
- Fan, H.-Y., Hu, Y., Tudor, M., and Ma, H. (1997). Specific interactions between the K domains of AG and AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins. *The Plant Journal* **12**, 999.
- Farajalla, M.R., and Gulick, P.J. (2007). The α -tubulin gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) and differential gene expression during cold acclimation. *Genome* **50**, 502.
- Fellows, R.J., and Boyer, J.S. (1978). Altered ultrastructure of cells of sunflower leaves having low water potentials. *Protoplasma* **93**, 381.
- Fujita, M., Fujita, Y., Maruyama, K., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Tran, L.-S.P., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2004). A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *The Plant Journal* **39**, 863.
- Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Umezawa, T., Fujita, M., Maruyama, K., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Nakasone, S., Yamada, K., Ito, T., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Three SnRK2 Protein Kinases are the Main Positive Regulators of Abscisic Acid Signaling in Response to Water Stress in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **50**, 2123-2132.
- Fursova, O.V., Pogorelko, G.V., and Tarasov, V.A. (2009). Identification of *ICE2*, a gene involved in cold acclimation which determines freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **429**, 98.
- Gao, W., Xiao, S., Li, H.-Y., Tsao, S.-W., and Chye, M.-L. (2009). *Arabidopsis thaliana* acyl-CoA-binding protein ACBP2 interacts with heavy-metal-binding farnesylated protein AtFP6. *New Phytologist* **181**, 89-102.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Wellmann, C., Al-Rasheid, K.A.S., Grill, E., Romeis, T., and Hedrich, R. (2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 8023.
- Gilmour, S.J., Fowler, S.G., and Thomashow, M.F. (2004). *Arabidopsis* Transcriptional Activators CBF1, CBF2, and CBF3 have Matching Functional Activities. *Plant Molecular Biology* **54**, 767.
- Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Stockinger, E.J., Salazar, M.P., Houghton, J.M., and Thomashow, M.F. (1998). Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *The Plant Journal* **16**, 433.
- Gravot, A., Lieutaud, A., Verret, F., Auroy, P., Vavasseur, A., and Richaud, P. (2004). AtHMA3, a plant PIB-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast. *FEBS Letters* **561**, 22.
- Griffith, M., and Yaish, M.W.F. (2004). Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends in Plant Science* **9**, 399.
- Grimm, B., and Kloppstech, K. (1987). The early light-inducible proteins of Barley. *European Journal of Biochemistry* **167**, 493-499.

- 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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**, 7220-7224.
- Guo, Z., Ou, W., Lu, S., and Zhong, Q. (2006). Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. Plant Physiology and Biochemistry **44**, 828.
- Gusta, L.V., Wisniewski, M., Nesbitt, N.T., and Gusta, M.L. (2004). The Effect of Water, Sugars, and Proteins on the Pattern of Ice Nucleation and Propagation in Acclimated and Nonacclimated Canola Leaves. Plant Physiol. **135**, 1642-1653.
- Guthrie, C., and Fink, G. (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. Methods in Enzymology **194**, Academic Press, New York.
- Guy, C.L. (1990). Cold Acclimation and Freezing Stress Tolerance: Role of Protein Metabolism. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **41**, 187.
- Haake, V., Cook, D., Riechmann, J.L., Pineda, O., Thomashow, M.F., and Zhang, J.Z. (2002). Transcription Factor CBF4 Is a Regulator of Drought Adaptation in *Arabidopsis*. Plant Physiol. **130**, 639-648.
- Hall, J.L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. Journal of Experimental Botany **53**, 1-11.
- Hänsch, R., and Mendel, R.R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). Current Opinion in Plant Biology **12**, 259.
- Haralampidis, K., Milioni, D., Rigas, S., and Hatzopoulos, P. (2002). Combinatorial Interaction of Cis Elements Specifies the Expression of the *Arabidopsis* AtHsp90-1 Gene. Plant Physiology **129**, 1138-1149.
- Hare, P.D., Cress, W.A., and Van Staden, J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. Plant, Cell & Environment **21**, 535.
- Havaux, M., and Kloppstech, K. (2001). The protective functions of carotenoid and flavonoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis npq* and *tt* mutants. Planta **213**, 953.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., and Korenaga, T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. Nucl Acids Res **27**, 297 - 300.
- Higuchi, M., Ozaki, H., Matsui, M., and Sonoike, K. (2009). A T-DNA insertion mutant of AtHMA1 gene encoding a Cu transporting ATPase in *Arabidopsis thaliana* has a defect in the water-water cycle of photosynthesis. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **94**, 205.
- Himelblau, E., and Amasino, R.M. (2001). Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. Journal of Plant Physiology **158**, 1317.
- Himelblau, E., Mira, H., Lin, S.J., Culotta, V.C., Penarrubia, L., and Amasino, R.M. (1998). Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from *Arabidopsis*. Plant Physiol **117**, 1227 - 1234.
- Hirayama, T., Ohto, C., Mizoguchi, T., and Shinozaki, K. (1995). A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**, 3903.
- Hirayama, T., Kieber, J.J., Hirayama, N., Kogan, M., Guzman, P., Nourizadeh, S., Alonso, J.M., Dailey, W.P., Dancis, A., and Ecker, J.R. (1999). RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson Disease-Related Copper Transporter, Is Required for Ethylene Signaling in *Arabidopsis*. Cell **97**, 383.
- Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C.J., and Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. Nucl. Acids Res. **35**, W585-587.
- Hsiao, T.C. (1973). Plant Responses to Water Stress. Annual Review of Plant Physiology **24**, 519-570.
- Hubick, K.T., Taylor, J.S., and Reid, D.M. (1986). The effect of drought on levels of abscisic acid, cytokinins, gibberellins and ethylene in aeroponically-grown sunflower plants. Plant Growth Regulation **4**, 139.
- Humbeck, K., Zschiesche, W., and Barth, O. (2007). Molecular response of plants to low temperature and high light. In Physiology of northern plants under changing environment, E. Taulavuori and K. Taulavuori, eds (Trivandrum: Research Signpost), pp. 135-156.
- Huner, N., Öquist, G., Hurry, V., Krol, M., Falk, S., and Griffith, M. (1993). Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold tolerant plants. Photosynthesis Research **37**, 19.
- Huner, N.P.A., Palta, J.P., Li, P.H., and Carter, J.V. (1981). Anatomical Changes in Leaves of Puma Rye in Response to Growth at Cold-Hardening Temperatures. Botanical Gazette **142**, 55.
- Hurry, V., Strand, Å., Furbank, R., and Stitt, M. (2000). The role of inorganic phosphate in the development of freezing tolerance and the acclimatization of photosynthesis to low temperature is revealed by the pho mutants of *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal **24**, 383.
- Hurry, V.M., Gardeström, P., and Öquist, G. (1993). Reduced sensitivity to photoinhibition following frost-hardening of winter rye is due to increased phosphate availability. Planta **190**, 484.
- Hurry, V.M., Krol, M., Öquist, G., and Huner, N.P.A. (1992). Effect of long-term photoinhibition on growth and photosynthesis of cold-hardened spring and winter wheat. Planta **188**, 369.

- Hussain, D., Haydon, M.J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S.M., Young, J., Camakaris, J., Harper, J.F., and Cobbett, C.S. (2004). P-Type ATPase Heavy Metal Transporters with Roles in Essential Zinc Homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 1327-1339.
- Hutin, C., Nussaume, L., Moise, N., Moya, I., Kloppstech, K., and Havaux, M. (2003). Early light-induced proteins protect *Arabidopsis* from photooxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 4921-4926.
- Ingram, J., and Bartels, D. (1996). THE MOLECULAR BASIS OF DEHYDRATION TOLERANCE IN PLANTS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 377.
- Irtelli, B., Petrucci, W.A., and Navari-Izzo, F. (2009). Nicotianamine and histidine/proline are, respectively, the most important copper chelators in xylem sap of *Brassica carinata* under conditions of copper deficiency and excess. *Journal of Experimental Botany* **60**, 269-277.
- Irving, H., and Williams, R.J.P. (1948). Order of Stability of Metal Complexes. *Nature* **162**, 746-747.
- James, P., Halladay, J., and Craig, E.A. (1996). Genomic Libraries and a Host Strain Designed for Highly Efficient Two-Hybrid Selection in Yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436.
- Jonak, C., Kiegl, S., Ligterink, W., Barker, P.J., Huskisson, N.S., and Hirt, H. (1996). Stress signaling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 11274-11279.
- Jubany-Mari, T., Alegre-Batlle, L., Jiang, K., and Feldman, L.J. (2010). Use of a redox-sensing GFP (c-roGFP1) for real-time monitoring of cytosol redox status in *Arabidopsis thaliana* water-stressed plants. *FEBS Letters* **584**, 889.
- Jung, C., Seo, J.S., Han, S.W., Koo, Y.J., Kim, C.H., Song, S.I., Nahm, B.H., Choi, Y.D., and Cheong, J.-J. (2008). Overexpression of AtMYB44 Enhances Stomatal Closure to Confer Abiotic Stress Tolerance in Transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **146**, 623-635.
- Kacperska, A. (2004). Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity? *Physiologia Plantarum* **122**, 159.
- Kamata, T., and Uemura, M. (2004). Solute accumulation in wheat seedlings during cold acclimation: Contribution to increased freezing tolerance. *Cryoletters* **25**, 311.
- Kant, P., Kant, S., Gordon, M., Shaked, R., and Barak, S. (2007). STRESS RESPONSE SUPPRESSOR1 and STRESS RESPONSE SUPPRESSOR2, Two DEAD-Box RNA Helicases That Attenuate *Arabidopsis* Responses to Multiple Abiotic Stresses. *Plant Physiol.* **145**, 814-830.
- Karaba, A., Dixit, S., Greco, R., Aharoni, A., Trijatmiko, K.R., Marsch-Martinez, N., Krishnan, A., Nataraja, K.N., Udayakumar, M., and Pereira, A. (2007). Improvement of water use efficiency in rice by expression of HARDY, an *Arabidopsis* drought and salt tolerance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 15270-15275.
- Karlson, D., Nakaminami, K., Toyomasu, T., and Imai, R. (2002). A Cold-regulated Nucleic Acid-binding Protein of Winter Wheat Shares a Domain with Bacterial Cold Shock Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 35248.
- Kim, H.-J., Hyun, Y., Park, J.-Y., Park, M.-J., Park, M.-K., Kim, M.D., Kim, H.-J., Lee, M.H., Moon, J., Lee, I., and Kim, J. (2004). A genetic link between cold responses and flowering time through FVE in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* **36**, 167.
- Kim, J.C., Lee, S.H., Cheong, Y.H., Yoo, C.M., Lee, S.I., Chun, H.J., Yun, D.J., Hong, J.C., Lee, S.Y., Lim, C.O., and Cho, M.J. (2001). A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. *The Plant Journal* **25**, 247.
- Kim, J.S., Jung, H.J., Lee, H.J., Kim, K.A., Goh, C.H., Woo, Y., Oh, S.H., Han, Y.S., and Kang, H. (2008). Glycine-rich RNA-binding protein7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **55**, 455.
- Kim, J.Y., Kim, W.Y., Kwak, K.J., Oh, S.H., Han, Y.S., and Kang, H. (2010). Glycine-rich RNA-binding proteins are functionally conserved in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* during cold adaptation process. *Journal of Experimental Botany* **61**, 2317.
- Kim, K.-N., Lee, J.-S., Han, H., Ah Choi, S., Joo Go, S., and Sun Yoon, I. (2003). Isolation and characterization of a novel rice Ca²⁺-regulated protein kinase gene involved in responses to diverse signals including cold, light, cytokinins, sugars and salts. *Plant Molecular Biology* **52**, 1191.
- Kim, S.Y., Zhu, T., and Sung, Z.R. (2010b). Epigenetic Regulation of Gene Programs by EMF1 and EMF2 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **152**, 516-528.
- Kim, Y.-H., Lim, S., Yang, K.-S., Kim, C., Kwon, S.-Y., Lee, H.-S., Wang, X., Zhou, Z., Ma, D., Yun, D.-J., and Kwak, S.-S. (2009). Expression of *Arabidopsis* NDPK increases antioxidant enzyme activities and enhances tolerance to multiple environmental stresses in transgenic sweetpotato plants. *Molecular Breeding* **24**, 233.
- Kim, Y.-Y., Choi, H., Segami, S., Cho, H.-T., Martinoia, E., Maeshima, M., and Lee, Y. (2009b). AtHMA1 contributes to the detoxification of excess Zn(II) in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **58**, 737.
- Knight, H., Trewavas, A.J., and Knight, M.R. (1997). Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *The Plant Journal* **12**, 1067.

- Knight, H., Mugford, S.G., Ülker, B., Gao, D., Thorlby, G., and Knight, M.R.** (2009). Identification of SFR6, a key component in cold acclimation acting post-translationally on CBF function. *The Plant Journal* **58**, 97.
- Kobayashi, T., Nakayama, Y., Itai, R.N., Nakanishi, H., Yoshihara, T., Mori, S., and Nishizawa, N.K.** (2003). Identification of novel cis-acting elements, IDE1 and IDE2, of the barley IDS2 gene promoter conferring iron-deficiency-inducible, root-specific expression in heterogeneous tobacco plants. *The Plant Journal* **36**, 780.
- Kobayashi, T., Ogo, Y., Itai, R.N., Nakanishi, H., Takahashi, M., Mori, S., and Nishizawa, N.K.** (2007). The transcription factor IDEF1 regulates the response to and tolerance of iron deficiency in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 19150-19155.
- Kosová, K., Vítámvás, P., and Prášil, I.** (2007). The role of dehydrins in plant response to cold. *Biologia Plantarum* **51**, 601.
- Koster, K.L., and Lynch, D.V.** (1992). Solute Accumulation and Compartmentation during the Cold Acclimation of Puma Rye. *Plant Physiol.* **98**, 108-113.
- Kramer, U., Cotter-Howells, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M., and Smith, J.A.C.** (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* **379**, 635.
- Krämer, U., Talke, I.N., and Hanikenne, M.** (2007). Transition metal transport. *FEBS Letters* **581**, 2263.
- Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H.-S., Zhu, T., Wang, X., and Harper, J.F.** (2002). Transcriptome Changes for Arabidopsis in Response to Salt, Osmotic, and Cold Stress. *Plant Physiol.* **130**, 2129-2141.
- Kropat, J., Tottey, S., Birkenbihl, R.P., Depège, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 18730-18735.
- la Cour, T., Kiemer, L., Molgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., and Brunak, S.** (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Engineering, Design and Selection* **17**, 527-536.
- Lachno, D.R., and Baker, D.A.** (1986). Stress induction of abscisic acid in maize roots. *Physiologia Plantarum* **68**, 215.
- Lanquar, V., Ramos, M.S., Lelievre, F., Barbier-Brygoo, H., Krieger-Liszka, A., Kramer, U., and Thomine, S.** (2010). Export of Vacuolar Manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 Is Required for Optimal Photosynthesis and Growth under Manganese Deficiency. *Plant Physiol.* **152**, 1986-1999.
- Lanquar, V., Lelievre, F., Bolte, S., Hames, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schroder, A., Kramer, 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**, 4041.
- Larcher, W.** (1987). Streß bei Pflanzen. *Naturwissenschaften* **74**, 158.
- Lee, B.H., Kapoor, A., Zhu, J., and Zhu, J.K.** (2006). STABILIZED1, a stress-upregulated nuclear protein, is required for pre-mRNA splicing, mRNA turnover, and stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 1736 - 1749.
- Lew, R.R.** (1996). Pressure Regulation of the Electrical Properties of Growing *Arabidopsis thaliana* L. Root Hairs. *Plant Physiol.* **112**, 1089-1100.
- Li, W.-X., Oono, Y., Zhu, J., He, X.-J., Wu, J.-M., Iida, K., Lu, X.-Y., Cui, X., Jin, H., and Zhu, J.-K.** (2008). The *Arabidopsis* NFYA5 Transcription Factor Is Regulated Transcriptionally and Posttranscriptionally to Promote Drought Resistance. *Plant Cell* **20**, 2238-2251.
- Li, W., Li, M., Zhang, W., Welti, R., and Wang, X.** (2004). The plasma membrane-bound phospholipase D[delta] enhances freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotech* **22**, 427.
- Li, X.G., Bi, Y.P., Zhao, S.J., Meng, Q.W., Zou, Q., and He, Q.W.** (2005). Cooperation of xanthophyll cycle with water-water cycle in the protection of photosystems 1 and 2 against inactivation during chilling stress under low irradiance. *Photosynthetica* **43**, 261.
- Lim, P.O., Kim, H.J., and Gil Nam, H.** (2007). Leaf Senescence. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 115.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 9215-9220.
- Lin, S.J., and Culotta, V.C.** (1995). The ATX1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3784 - 3788.
- Lin, Y.-F., Liang, H.-M., Yang, S.-Y., Boch, A., Clemens, S., Chen, C.-C., Wu, J.-F., Huang, J.-L., and Yeh, K.-C.** (2009). *Arabidopsis* IRT3 is a zinc-regulated and plasma membrane localized zinc/iron transporter. *New Phytologist* **182**, 392.
- Liu, H., and Stone, S.L.** (2010). Abscisic Acid Increases Arabidopsis ABI5 Transcription Factor Levels by Promoting KEG E3 Ligase Self-Ubiquitination and Proteasomal Degradation. *Plant Cell* **22**, 2630-2641.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (1998). Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA Binding Domain Separate

- Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low-Temperature-Responsive Gene Expression, Respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1391-1406.
- Lux, A., Martinka, M., Vaculik, M., and White, P.J.** (2011). Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of Experimental Botany* **62**, 21-37.
- Lynch, D.V., and Steponkus, P.L.** (1987). Plasma Membrane Lipid Alterations Associated with Cold Acclimation of Winter Rye Seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiol.* **83**, 761-767.
- Maestri, E., Marmiroli, M., Visioli, G., and Marmiroli, N.** (2010). Metal tolerance and hyperaccumulation: Costs and trade-offs between traits and environment. *Environmental and Experimental Botany* **68**, 1-13.
- Magnan, F., Ranty, B., Charpenteau, M., Sotta, B., Galaud, J.P., and Aldon, D.** (2008). Mutations in AtCML9, a calmodulin-like protein from *Arabidopsis thaliana*, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid. *The Plant Journal* **56**, 575.
- Mahajan, S., Sopory, S.K., and Tuteja, N.** (2006). Cloning and characterization of CBL-CIPK signalling components from a legume (*Pisum sativum*). *FEBS Journal* **273**, 907.
- Mantri, N., Ford, R., Coram, T., and Pang, E.** (2007). Transcriptional profiling of chickpea genes differentially regulated in response to high-salinity, cold and drought. *BMC Genomics* **8**, 303.
- Maruyama, K., Sakuma, Y., Kasuga, M., Ito, Y., Seki, M., Goda, H., Shimada, Y., Yoshida, S., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2004). Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *The Plant Journal* **38**, 982.
- Maser, P., Thomine, S., Schroeder, J.I., Ward, J.M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I.N., Amtmann, A., Maathuis, F.J.M., Sanders, D., Harper, J.F., Tchiew, J., Gribskov, M., Persans, M.W., Salt, D.E., Kim, S.A., and Gueriot, M.L.** (2001). Phylogenetic Relationships within Cation Transporter Families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**, 1646-1667.
- Matsui, A., Ishida, J., Morosawa, T., Mochizuki, Y., Kaminuma, E., Endo, T.A., Okamoto, M., Nambara, E., Nakajima, M., Kawashima, M., Satou, M., Kim, J.-M., Kobayashi, N., Toyoda, T., Shinozaki, K., and Seki, M.** (2008). *Arabidopsis* Transcriptome Analysis under Drought, Cold, High-Salinity and ABA Treatment Conditions using a Tiling Array. *Plant and Cell Physiology* **49**, 1135-1149.
- Matsuoka, D., Nanmori, T., Sato, K.-i., Fukami, Y., Kikkawa, U., and Yasuda, T.** (2002). Activation of AtMEK1, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase, in vitro and in vivo: analysis of active mutants expressed in *E. coli* and generation of the active form in stress response in seedlings. *The Plant Journal* **29**, 637.
- McAinsh, M.R., Brownlee, C., and Hetherington, A.M.** (1997). Calcium ions as second messengers in guard cell signal transduction. *Physiologia Plantarum* **100**, 16.
- Miersch, I., Heise, J., Zelmer, I., and Humbeck, K.** (2000). Differential Degradation of the Photosynthetic Apparatus During Leaf Senescence in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Biol (Stuttg)* **2**, 618.
- Mindrinos, M., Katagiri, F., Yu, G.-L., and Ausubel, F.M.** (1994). The *A. thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell* **78**, 1089.
- Miquel, M., James, D., Dooner, H., and Browse, J.** (1993). *Arabidopsis* requires polyunsaturated lipids for low-temperature survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 6208.
- Mira, H., Martínez-García, F., and Peñarrubia, L.** (2001). Evidence for the plant-specific intercellular transport of the *Arabidopsis* copper chaperone CCH. *The Plant Journal* **25**, 521.
- Mira, H., Vilar, M., Esteve, V., Martinell, M., Kogan, M., Giralt, E., Salom, D., Mingarro, I., Penarrubia, L., and Perez-Paya, E.** (2004). Ionic self-complementarity induces amyloid-like fibril formation in an isolated domain of a plant copper metallochaperone protein. *BMC Structural Biology* **4**, 7.
- Miranda, J., Avonce, N., Suárez, R., Thevelein, J., Van Dijck, P., and Iturriaga, G.** (2007). A bifunctional TPS-TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* **226**, 1411.
- Miura, K., Jin, J.B., Lee, J., Yoo, C.Y., Stirn, V., Miura, T., Ashworth, E.N., Bressan, R.A., Yun, D.-J., and Hasegawa, P.M.** (2007). SIZ1-Mediated Sumoylation of ICE1 Controls *CBF3/DREB1A* Expression and Freezing Tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 1403-1414.
- Monroy, A.F., and Dhindsa, R.S.** (1995). Low-Temperature Signal Transduction: Induction of Cold Acclimation-Specific Genes of Alfalfa by Calcium at 25[deg]C. *Plant Cell* **7**, 321-331.
- Montané, M.-H., Petzold, B., and Kloppstech, K.** (1999). Formation of early-light-inducible-protein complexes and status of xanthophyll levels under high light and cold stress in barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.). *Planta* **208**, 519.
- Montané, M.-H., Dreyer, S., Triantaphylides, C., and Kloppstech, K.** (1997). Early light-inducible proteins during long-term acclimation of barley to photooxidative stress caused by light and cold: high level of accumulation by posttranscriptional regulation. *Planta* **202**, 293.
- Morel, M., Crouzet, J., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., Vavasseur, A., and Richaud, P.** (2009). AtHMA3, a P1B-ATPase Allowing Cd/Zn/Co/Pb Vacuolar Storage in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **149**, 894-904.

- Moreno, I., Norambuena, L., Maturana, D., Toro, M., Vergara, C., Orellana, A., Zurita-Silva, A.s., and Ordenes, V.R. (2008). AtHMA1 Is a Thapsigargin-sensitive Ca²⁺/Heavy Metal Pump. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 9633-9641.
- Mukherjee, I., Campbell, N., Ash, J., and Connolly, E. (2006). Expression profiling of the *Arabidopsis* ferric chelate reductase (*FRO*) gene family reveals differential regulation by iron and copper. *Planta* **223**, 1178.
- Munnik, T., and Vermeer, J.E.M. (2010). Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signalling in plants. *Plant, Cell & Environment* **33**, 655.
- Nakashima, K., Shinwari, Z.K., Sakuma, Y., Seki, M., Miura, S., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Molecular Biology* **42**, 657.
- Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S., Maruyama, K., Yoshida, T., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Three *Arabidopsis* SnRK2 Protein Kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, Involved in ABA Signaling are Essential for the Control of Seed Development and Dormancy. *Plant and Cell Physiology* **50**, 1345-1363.
- Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1999). Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **461**, 205.
- Novillo, F., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Salinas, J. (2004). CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 3985.
- O'Halloran, T.V., and Culotta, V.C. (2000). Metallochaperones, an Intracellular Shuttle Service for Metal Ions. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 25057-25060.
- Ober, E.S., and Sharp, R.E. (2007). Regulation of root growth responses to water deficit. In *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*, M.A. Jenks, P.M. Hasegawa, and S.M. Jain, eds (Springer Netherlands), pp. 33.
- Oberhuber, W., and Bauer, H. (1991). Photoinhibition of photosynthesis under natural conditions in ivy *Hedera helix* L.) growing in an understory of deciduous trees. *Planta* **185**, 545.
- Ogo, Y., Kobayashi, T., Nakanishi Itai, R., Nakanishi, H., Kakei, Y., Takahashi, M., Toki, S., Mori, S., and Nishizawa, N.K. (2008). A Novel NAC Transcription Factor, IDEF2, That Recognizes the Iron Deficiency-responsive Element 2 Regulates the Genes Involved in Iron Homeostasis in Plants. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 13407-13417.
- Olmos, E., Sánchez-Blanco, M.J., Ferrández, T., and Alarcón, J.J. (2007). Subcellular Effects of Drought Stress in *Rosmarinus officinalis*. *Plant Biology* **9**, 77.
- Öquist, G., Brunes, L., Hällgren, J.E., Gezelius, K., Hallen, M., and Malmberg, G. (1980). Effects of artificial frost hardening and winter stress on net photosynthesis, photosynthetic electron transport and RuBP carboxylase activity in seedlings of *Pinus sylvestris*. *Physiologia Plantarum* **48**, 526.
- Örvar, B.L., Sangwan, V., Omann, F., and Dhindsa, R.S. (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J* **23**, 785 - 794.
- Pace, P.F., Cralle, H.T., El-Halawany, S.H.M., Cothren, J.T., and Senseman, S.A. (1999). Drought-induced Changes in Shoot and Root Growth of Young Cotton Plants. *Journal of Cotton Science* **3**, 183-187.
- Pagnussat, G.C., Yu, H.-J., Ngo, Q.A., Rajani, S., Mayalagu, S., Johnson, C.S., Capron, A., Xie, L.-F., Ye, D., and Sundaresan, V. (2005). Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis*. *Development* **132**, 603.
- Palmer, C.M., and Guerinot, M.L. (2009). Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nat Chem Biol* **5**, 333.
- Pandey, G.K., Cheong, Y.H., Kim, K.-N., Grant, J.J., Li, L., Hung, W., D'Angelo, C., Weinl, S., Kudla, J., and Luan, S. (2004). The Calcium Sensor Calcineurin B-Like 9 Modulates Abscisic Acid Sensitivity and Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 1912-1924.
- Park, E.-J., Jeknic, Z., and Chen, T.H.H. (2006). Exogenous Application of Glycinebetaine Increases Chilling Tolerance in Tomato Plants. *Plant and Cell Physiology* **47**, 706.
- Park, H.C., Kim, M.L., Kang, Y.H., Jeon, J.M., Yoo, J.H., Kim, M.C., Park, C.Y., Jeong, J.C., Moon, B.C., Lee, J.H., Yoon, H.W., Lee, S.-H., Chung, W.S., Lim, C.O., Lee, S.Y., Hong, J.C., and Cho, M.J. (2004). Pathogen- and NaCl-Induced Expression of the SCaM-4 Promoter Is Mediated in Part by a GT-1 Box That Interacts with a GT-1-Like Transcription Factor. *Plant Physiology* **135**, 2150-2161.
- Park, J., Kim, Y.-Y., Martinoia, E., and Lee, Y. (2008). Long-distance transporters of inorganic nutrients in plants. *Journal of Plant Biology* **51**, 240.

- Park, S.J., Kwak, K.J., Oh, T.R., Kim, Y.O., and Kang, H. (2009). Cold Shock Domain Proteins Affect Seed Germination and Growth of *Arabidopsis thaliana* Under Abiotic Stress Conditions. *Plant and Cell Physiology* **50**, 869.
- Parsons, L.R., and Howe, T.K. (1984). Effects of water stress on the water relations of *Phaseolus vulgaris* and the drought resistant *Phaseolus acutifolius*. *Physiologia Plantarum* **60**, 197.
- Pastori, G.M., and Foyer, C.H. (2002). Common Components, Networks, and Pathways of Cross-Tolerance to Stress. The Central Role of "Redox" and Abscisic Acid-Mediated Controls. *Plant Physiol.* **129**, 460-468.
- Peñarrubia, L., Andrés-Colás, N., Moreno, J., and Puig, S. (2010). Regulation of copper transport in *Arabidopsis thaliana* a biochemical oscillator? *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **15**, 29.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, e45.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* **30**, e36.
- Pich, A., and Scholz, G. (1996). Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem. *Journal of Experimental Botany* **47**, 41-47.
- Pokorna, J., Schwarzerova, K., Zelenkova, S., Petrasek, J., Janotova, I., Čapkova, V., and Opatrny, Z. (2004). Sites of actin filament initiation and reorganization in cold-treated tobacco cells. *Plant, Cell & Environment* **27**, 641.
- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A., and Stewart, C.R. (1994). Evidence for Chilling-Induced Oxidative Stress in Maize Seedlings and a Regulatory Role for Hydrogen Peroxide. *Plant Cell* **6**, 65-74.
- Price, A.H., and Hendry, G.A.F. (1991). Iron-catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. *Plant, Cell & Environment* **14**, 477.
- Puhakainen, T., Hess, M.W., Mäkelä, P., Svensson, J., Heino, P., and Palva, E.T. (2004). Overexpression of Multiple Dehydrin Genes Enhances Tolerance to Freezing Stress in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **54**, 743.
- Puig, S., Mira, H., Dorcey, E., Sancenón, V., Andrés-Colás, N., Garcia-Molina, A., Burkhead, J.L., Gogolin, K.A., Abdel-Ghany, S.E., Thiele, D.J., Ecker, J.R., Pilon, M., and Peñarrubia, L. (2007b). Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **354**, 385.
- Rabbani, M.A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M.A., Katsura, K., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Monitoring Expression Profiles of Rice Genes under Cold, Drought, and High-Salinity Stresses and Abscisic Acid Application Using cDNA Microarray and RNA Gel-Blot Analyses. *Plant Physiol.* **133**, 1755-1767.
- Rampino, P., Pataleo, S., Gerardi, C., Mita, G., and Perrotta, C. (2006). Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant, Cell & Environment* **29**, 2143.
- Rellan-Alvarez, R., Giner-Martanez-Sierra, J., Orduna, J., Orera, I., Rodriguez-Castrillon, J.A., Garcia-Alonso, J.I., Abadia, J., and Alvarez-Fernandez, A. (2010). Identification of a Tri-Iron(III), Tri-Citrate Complex in the Xylem Sap of Iron-Deficient Tomato Resupplied with Iron: New Insights into Plant Iron Long-Distance Transport. *Plant and Cell Physiology* **51**, 91-102.
- Ren, Y., and Zhao, J. (2009). Functional analysis of the rice metallothionein gene OsMT2b promoter in transgenic *Arabidopsis* plants and rice germinated embryos. *Plant Science* **176**, 528.
- Ristic, Z., and Cass, D.D. (1991). Leaf Anatomy of *Zea mays* L. in Response to Water Shortage and High Temperature: A Comparison of Drought-Resistant and Drought-Sensitive Lines. *Botanical Gazette* **152**, 173.
- Robinson, N.J., Procter, C.M., Connolly, E.L., and Guerinot, M.L. (1999). A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**, 694.
- Rodrigues, M.L., Pacheco, C.M.A., and Chaves, M.M. (1995). Soil-plant water relations, root distribution and biomass partitioning in *Lupinus albus* L. under drought conditions. *Journal of Experimental Botany* **46**, 947.
- Ruelland, E., Vaultier, M.-N., Zachowski, A., and Hurry, V. (2009). Chapter 2 Cold Signalling and Cold Acclimation in Plants. In *Advances in Botanical Research* (Academic Press), pp. 35.
- Ruelland, E., Cantrel, C., Gawer, M., Kader, J.-C., and Zachowski, A. (2002). Activation of Phospholipases C and D Is an Early Response to a Cold Exposure in *Arabidopsis* Suspension Cells. *Plant Physiol.* **130**, 999-1007.
- Sagasti, S., Yruela, I., Bernal, M., Lujan, M.A., Frago, S., Medina, M., and Picorel, R. (2011). Characterization of the recombinant copper chaperone (CCS) from the plant *Glycine (G.) max*. *Metallomics* **3**, 169.

- Saini, H.S., and Westgate, M.E. (1999). Reproductive Development in Grain Crops during Drought. In *Advances in Agronomy*, D.L. Sparks, ed (Academic Press), pp. 59.
- Sakamoto, H., Maruyama, K., Sakuma, Y., Meshi, T., Iwabuchi, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). *Arabidopsis* Cys2/His2-Type Zinc-Finger Proteins Function as Transcription Repressors under Drought, Cold, and High-Salinity Stress Conditions. *Plant Physiol.* **136**, 2734-2746.
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). DNA-Binding Specificity of the ERF/AP2 Domain of *Arabidopsis* DREBs, Transcription Factors Involved in Dehydration- and Cold-Inducible Gene Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **290**, 998.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 15348-15355.
- Sancenón, V., Puig, S., Mira, H., Thiele, D.J., and Peñarrubia, L. (2003). Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **51**, 577.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**, 5463-5467.
- Sangwan, V., Foulds, I., Singh, J., and Dhindsa, R.S. (2001). Cold-activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx. *The Plant Journal* **27**, 1.
- Savitch, L.V., Harney, T., and Huner, N.P.A. (2000). Sucrose metabolism in spring and winter wheat in response to high irradiance, cold stress and cold acclimation. *Physiologia Plantarum* **108**, 270.
- Savitch, L.V., Leonardos, E.D., Krol, M., Jansson, S., Grodzinski, B., Huner, N.P.A., and Öquist, G. (2002). Two different strategies for light utilization in photosynthesis in relation to growth and cold acclimation. *Plant, Cell & Environment* **25**, 761.
- Schachtman, D.P., and Goodger, J.Q.D. (2008). Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Science* **13**, 281.
- Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M., and Waner, D. (2001). GUARD CELL SIGNAL TRANSDUCTION. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 627-658.
- Schwarzerová, K., Petrášek, J., Panigrahi, K.C.S., Zelenková, S., Opatrný, Z., and Nick, P. (2006). Intranuclear accumulation of plant tubulin in response to low temperature. *Protoplasma* **227**, 185.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 2882-2892.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y., and Shinozaki, K. (2002). Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* **31**, 279.
- Selye, H. (1936). A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature* **138**, 32-34.
- 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**, 1333-1346.
- Solecka, D., Zebrowski, J., and Kacperska, A. (2008). Are Pectins Involved in Cold Acclimation and Deacclimation of Winter Oil-seed Rape Plants? *Annals of Botany* **101**, 521.
- Song, W.-Y., Choi, K.S., Kim, D.Y., Geisler, M., Park, J., Vincenzetti, V., Schellenberg, M., Kim, S.H., Lim, Y.P., Noh, E.W., Lee, Y., and Martinoia, E. (2010). *Arabidopsis* PCR2 Is a Zinc Exporter Involved in Both Zinc Extrusion and Long-Distance Zinc Transport. *Plant Cell* **22**, 2237-2252.
- Steponkus, P.L., Uemura, M., Joseph, R.A., Gilmour, S.J., and Thomashow, M.F. (1998). Mode of action of the COR15a gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 14570.
- Stocker, O. (1947). Probleme der pflanzlichen Dürresistenz. *Naturwissenschaften* **34**, 362.
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J., and Thomashow, M.F. (1997). *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 1035.
- Strand, Å., Foyer, C.H., Gustafsson, P., Gardeström, P., and Hurry, V. (2003). Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. *Plant, Cell & Environment* **26**, 523.
- Streb, P., Shang, W., and Feierabend, J. (1999). Resistance of cold-hardened winter rye leaves (*Secale cereale* L.) to photo-oxidative stress. *Plant, Cell & Environment* **22**, 1211.
- Sunkar, R., and Zhu, J.-K. (2004). Novel and Stress-Regulated MicroRNAs and Other Small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 2001-2019.

- Sunkar, R., Kapoor, A., and Zhu, J.-K. (2006). Posttranscriptional Induction of Two Cu/Zn Superoxide Dismutase Genes in *Arabidopsis* Is Mediated by Downregulation of miR398 and Important for Oxidative Stress Tolerance. *Plant Cell* **18**, 2051-2065.
- Suslov, O., and Steindler, D.A. (2005). PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency. *Nucleic Acids Research* **33**, e181.
- Suzuki, N., Koizumi, N., and Sano, H. (2001). Screening of cadmium-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* **24**, 1177-1188.
- Suzuki, N., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., and Sano, H. (2002). Functional characterization of a heavy metal binding protein CdI19 from *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **32**, 165-173.
- Tabata, K., Kashiwagi, S., Mori, H., Ueguchi, C., and Mizuno, T. (1997). Cloning of a cDNA encoding a putative metal-transporting P-type ATPase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1326**, 1.
- Tähtiharju, S., Sangwan, V., Monroy, A.F., Dhindsa, R.S., and Borg, M. (1997). The induction of *kin* genes in cold-acclimating *Arabidopsis thaliana* Evidence of a role for calcium. *Planta* **203**, 442.
- Talke, I.N., Hanikenne, M., and Kramer, U. (2006). Zinc-Dependent Global Transcriptional Control, Transcriptional Deregulation, and Higher Gene Copy Number for Genes in Metal Homeostasis of the Hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiol.* **142**, 148-167.
- Tan, Q.K.G., and Irish, V.F. (2006). The *Arabidopsis* Zinc Finger-Homeodomain Genes Encode Proteins with Unique Biochemical Properties That Are Coordinately Expressed during Floral Development. *Plant Physiol.* **140**, 1095-1108.
- Tasseva, G., Davy de Virville, J., Cantrel, C., Moreau, F., and Zachowski, A. (2004). Changes in the endoplasmic reticulum lipid properties in response to low temperature in *Brassica napus*. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 811.
- Tehseen, M., Cairns, N., Sherson, S., and Cobbett, C.S. (2010). Metallochaperone-like genes in *Arabidopsis thaliana*. *Metallomics* **2**, 556.
- Teicher, H.B., Møller, B.L., and Scheller, H.V. (2000). Photoinhibition of Photosystem I in field-grown barley (*Hordeum vulgare* L.): Induction, recovery and acclimation. *Photosynthesis Research* **64**, 53.
- Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Dóczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J.L., and Hirt, H. (2004). The MKK2 Pathway Mediates Cold and Salt Stress Signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **15**, 141.
- Testerink, C., Dekker, H.L., Lim, Z.Y., Johns, M.K., Holmes, A.B., de Koster, C.G., Ktistakis, N.T., and Munnik, T. (2004). Isolation and identification of phosphatidic acid targets from plants. *The Plant Journal* **39**, 527.
- Thomashow, M.F. (1999). PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 571 - 599.
- Thomine, S., Lelièvre, F., Debarbieux, E., Schroeder, J.I., and Barbier-Brygoo, H. (2003). AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *The Plant Journal* **34**, 685.
- Thomine, S.b., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M., and Schroeder, J.I. (2000). Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 4991-4996.
- Tjus, S.E., Scheller, H.V., Andersson, B., and Moller, B.L. (2001). Active Oxygen Produced during Selective Excitation of Photosystem I Is Damaging Not Only to Photosystem I, But Also to Photosystem II. *Plant Physiol.* **125**, 2007-2015.
- Tommasini, L., Svensson, J., Rodriguez, E., Wahid, A., Malatrasi, M., Kato, K., Wanamaker, S., Resnik, J., and Close, T. (2008). Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Functional & Integrative Genomics* **8**, 387.
- Tottey, S., Harvie, D.R., and Robinson, N.J. (2005). Understanding How Cells Allocate Metals Using Metal Sensors and Metallochaperones. *Accounts of Chemical Research* **38**, 775.
- Tran, L.-S.P., Urao, T., Qin, F., Maruyama, K., Kakimoto, T., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007b). Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 20623.
- Tran, L.-S.P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S.D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Isolation and Functional Analysis of *Arabidopsis* Stress-Inducible NAC Transcription Factors That Bind to a Drought-Responsive cis-Element in the early responsive to dehydration stress 1 Promoter. *Plant Cell* **16**, 2481-2498.
- Tran, L.-S.P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Osakabe, Y., Qin, F., Simpson, S.D., Maruyama, K., Fujita, Y., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007a). Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **49**, 46.

- Tremblay, K., Ouellet, F.o., Fournier, J., Danyluk, J., and Sarhan, F.** (2005). Molecular Characterization and Origin of Novel Bipartite Cold-regulated Ice Recrystallization Inhibition Proteins from Cereals. *Plant and Cell Physiology* **46**, 884.
- Tzvetkova-Chevolleau, T., Franck, F., Alawady, A.E., Dall'Osto, L., Carrière, F., Bassi, R., Grimm, B., Nussaume, L., and Havaux, M.** (2007). The light stress-induced protein ELIP2 is a regulator of chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **50**, 795.
- Uemura, M., and Steponkus, P.L.** (1989). Effect of Cold Acclimation on the Incidence of Two Forms of Freezing Injury in Protoplasts Isolated from Rye Leaves. *Plant Physiol.* **91**, 1131-1137.
- Uemura, M., and Steponkus, P.L.** (1994). A Contrast of the Plasma Membrane Lipid Composition of Oat and Rye Leaves in Relation to Freezing Tolerance. *Plant Physiology* **104**, 479-496.
- Uemura, M., and Steponkus, P.L.** (1997). Effect of Cold Acclimation on the Lipid Composition of the Inner and Outer Membrane of the Chloroplast Envelope Isolated from Rye Leaves. *Plant Physiol.* **114**, 1493-1500.
- Uemura, M., Joseph, R.A., and Steponkus, P.L.** (1995). Cold Acclimation of *Arabidopsis thaliana* (Effect on Plasma Membrane Lipid Composition and Freeze-Induced Lesions). *Plant Physiol.* **109**, 15-30.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S., and Shinozaki, K.** (1993). An *Arabidopsis* myb Homolog Is Induced by Dehydration Stress and Its Gene Product Binds to the Conserved MYB Recognition Sequence. *Plant Cell* **5**, 1529-1539.
- Van den Ackerveken, G., Marois, E., and Bonas, U.** (1996). Recognition of the Bacterial Avirulence Protein AvrBs3 Occurs inside the Host Plant Cell. *Cell* **87**, 1307.
- Vergnolle, C., Vaultier, M.-N., Taconnat, L., Renou, J.-P., Kader, J.-C., Zachowski, A., and Ruelland, E.** (2005). The Cold-Induced Early Activation of Phospholipase C and D Pathways Determines the Response of Two Distinct Clusters of Genes in *Arabidopsis* Cell Suspensions. *Plant Physiol.* **139**, 1217-1233.
- 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 Letters* **576**, 306.
- Vert, G., Grotz, N., Dedaldechamp, F., Gaynard, F., Guerinot, M.L., Briat, J.-F., and Curie, C.** (2002). IRT1, an *Arabidopsis* Transporter Essential for Iron Uptake from the Soil and for Plant Growth. *Plant Cell* **14**, 1223-1233.
- Vogel, J.T., Zarka, D.G., Van Buskirk, H.A., Fowler, S.G., and Thomashow, M.F.** (2005). Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **41**, 195.
- Walton, D.C., Harrison, M.A., and Coté, P.** (1976). The effects of water stress on abscisic-acid levels and metabolism in roots of *Phaseolus vulgaris* L. and other plants. *Planta* **131**, 141.
- Wang, C.-R., Yang, A.-F., Yue, G.-D., Gao, Q., Yin, H.-Y., and Zhang, J.-R.** (2008). Enhanced expression of phospholipase C 1 *ZmPLC1* improves drought tolerance in transgenic maize. *Planta* **227**, 1127.
- Wang, H.-Y., Klatte, M., Jakoby, M., Bäumlein, H., Weisshaar, B., and Bauer, P.** (2007). Iron deficiency-mediated stress regulation of four subgroup Ib *BHLH* genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **226**, 897.
- Wang, S.C., Dias, A.V., Bloom, S.L., and Zamble, D.B.** (2004). Selectivity of Metal Binding and Metal-Induced Stability of *Escherichia coli* NikR. *Biochemistry* **43**, 10018.
- Wimmer, R., Herrmann, T., Solioz, M., and Wüthrich, K.** (1999). NMR Structure and Metal Interactions of the CopZ Copper Chaperone. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 22597-22603.
- Windhövel, A., Hein, I., Dabrowa, R., and Stockhaus, J.** (2001). Characterization of a novel class of plant homeodomain proteins that bind to the C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Flaveria trinervia*. *Plant Molecular Biology* **45**, 201.
- Wintz, H., and Vulpe, C.** (2002). Plant copper chaperones. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 732-735.
- Wintz, H., Fox, T., Wu, Y.-Y., Feng, V., Chen, W., Chang, H.-S., Zhu, T., and Vulpe, C.** (2003). Expression Profiles of *Arabidopsis thaliana* in Mineral Deficiencies Reveal Novel Transporters Involved in Metal Homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 47644-47653.
- Wohlbach, D.J., Quirino, B.F., and Sussman, M.R.** (2008). Analysis of the *Arabidopsis* Histidine Kinase ATHK1 Reveals a Connection between Vegetative Osmotic Stress Sensing and Seed Maturation. *Plant Cell* **20**, 1101-1117.
- Wyn Jones, R.G., and Storey, R.** (1981). Betaines. In "The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants" (L. G. Paleg and D. Aspinal, eds.), 171-204 Academic Press, New York.
- Xiong, L., Lee, H., Huang, R., and Zhu, J.K.** (2004). A single amino acid substitution in the *Arabidopsis* FIERY1/HOS2 protein confers cold signaling specificity and lithium tolerance. *The Plant Journal* **40**, 536.
- Xiong, L., Lee, H., Ishitani, M., Tanaka, Y., Stevenson, B., Koiwa, H., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., and Zhu, J.-K.** (2002). Repression of stress-responsive genes by FIERY2, a novel transcriptional regulator in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 10899.

- Xu, J., Tian, Y.-S., Peng, R.-H., Xiong, A.-S., Zhu, B., Jin, X.-F., Gao, F., Fu, X.-Y., Hou, X.-L., and Yao, Q.-H. (2010). AtCPK6, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Planta* **231**, 1251.
- Yalovsky, S., Rodríguez-Concepción, M., and Gruissem, W. (1999). Lipid modifications of proteins - slipping in and out of membranes. *Trends in Plant Science* **4**, 439.
- Yamada, T., Kuroda, K., Jitsuyama, Y., Takezawa, D., Arakawa, K., and Fujikawa, S. (2002). Roles of the plasma membrane and the cell wall in the responses of plant cells to freezing. *Planta* **215**, 770.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2006). TRANSCRIPTIONAL REGULATORY NETWORKS IN CELLULAR RESPONSES AND TOLERANCE TO DEHYDRATION AND COLD STRESSES. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 781-803.
- Yamasaki, H., Hayashi, M., Fukazawa, M., Kobayashi, Y., and Shikanai, T. (2009). SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like7 Is a Central Regulator for Copper Homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 347-361.
- Yamasaki, H., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M., Kobayashi, Y., Shikanai, T., and Pilon, M. (2007). Regulation of Copper Homeostasis by Micro-RNA in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 16369-16378.
- Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M., Tateno, M., Yamasaki, T., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Nunokawa, E., Ishizuka, Y., Terada, T., Shirouzu, M., Osanai, T., Tanaka, A., Seki, M., Shinozaki, K., and Yokoyama, S. (2004). A Novel Zinc-binding Motif Revealed by Solution Structures of DNA-binding Domains of *Arabidopsis* SBP-family Transcription Factors. *Journal of Molecular Biology* **337**, 49.
- Yang, L., Ji, W., Zhu, Y., Gao, P., Li, Y., Cai, H., Bai, X., and Guo, D. (2010b). GsCBRLK, a calcium/calmodulin-binding receptor-like kinase, is a positive regulator of plant tolerance to salt and ABA stress. *Journal of Experimental Botany* **61**, 2519.
- Yang, T., Chaudhuri, S., Yang, L., Du, L., and Poovaiah, B.W. (2010). A Calcium/Calmodulin-regulated Member of the Receptor-like Kinase Family Confers Cold Tolerance in Plants. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 7119.
- Yang, Z., Wu, Y., Li, Y., Ling, H.-Q., and Chu, C. (2009). OsMT1a, a type 1 metallothionein, plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice. *Plant Molecular Biology* **70**, 219.
- Yokosho, K., Yamaji, N., Ueno, D., Mitani, N., and Ma, J.F. (2009). OsFRDL1 Is a Citrate Transporter Required for Efficient Translocation of Iron in Rice. *Plant Physiol.* **149**, 297-305.
- Yoo, S.Y., Kim, Y., Kim, S.Y., Lee, J.S., and Ahn, J.H. (2007). Control of Flowering Time and Cold Response by a NAC-Domain Protein in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **2**, e642.
- Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *The Plant Journal* **61**, 672.
- Yu, H., Chen, X., Hong, Y.-Y., Wang, Y., Xu, P., Ke, S.-D., Liu, H.-Y., Zhu, J.-K., Oliver, D.J., and Xiang, C.-B. (2008). Activated Expression of an *Arabidopsis* HD-START Protein Confers Drought Tolerance with Improved Root System and Reduced Stomatal Density. *Plant Cell* **20**, 1134-1151.
- Yu, X.-C., Zhu, S.-Y., Gao, G.-F., Wang, X.-J., Zhao, R., Zou, K.-Q., Wang, X.-F., Zhang, X.-Y., Wu, F.-Q., Peng, C.-C., and Zhang, D.-P. (2007). Expression of a grape calcium-dependent protein kinase ACPK1 in *Arabidopsis thaliana* promotes plant growth and confers abscisic acid-hypersensitivity in germination, postgermination growth, and stomatal movement. *Plant Molecular Biology* **64**, 531.
- Yuan, Y., Wu, H., Wang, N., Li, J., Zhao, W., Du, J., Wang, D., and Ling, H.-Q. (2008). FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in *Arabidopsis*. *Cell Res* **18**, 385.
- Zarka, D.G., Vogel, J.T., Cook, D., and Thomashow, M.F. (2003). Cold Induction of *Arabidopsis* CBF Genes Involves Multiple ICE (Inducer of CBF Expression) Promoter Elements and a Cold-Regulatory Circuit That Is Desensitized by Low Temperature. *Plant Physiol.* **133**, 910-918.
- Zhang, H., Yin, W., and Xia, X. (2008). Calcineurin B-Like family in *Populus*: comparative genome analysis and expression pattern under cold, drought and salt stress treatment. *Plant Growth Regulation* **56**, 129.
- Zhang, J., Xu, Y., Huan, Q., and Chong, K. (2009). Deep sequencing of *Brachypodium* small RNAs at the global genome level identifies microRNAs involved in cold stress response. *BMC Genomics* **10**, 449.
- Zhou, J., Wang, X., Jiao, Y., Qin, Y., Liu, X., He, K., Chen, C., Ma, L., Wang, J., Xiong, L., Zhang, Q., Fan, L., and Deng, X. (2007). Global genome expression analysis of rice in response to drought and high-salinity stresses in shoot, flag leaf, and panicle. *Plant Molecular Biology* **63**, 591.
- Zhu, J.-K. (2002). SALT AND DROUGHT STRESS SIGNAL TRANSDUCTION IN PLANTS. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 247.
- Zhu, J., Shi, H., Lee, B.-h., Damsz, B., Cheng, S., Stirm, V., Zhu, J.-K., Hasegawa, P.M., and Bressan, R.A. (2004). An *Arabidopsis* homeodomain transcription factor gene, HOS9, mediates cold tolerance

- through a CBF-independent pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**, 9873.
- Zhu, J., Jeong, J.C., Zhu, Y., Sokolchik, I., Miyazaki, S., Zhu, J.-K., Hasegawa, P.M., Bohnert, H.J., Shi, H., Yun, D.-J., and Bressan, R.A.** (2008). Involvement of Arabidopsis HOS15 in histone deacetylation and cold tolerance. Proceedings of the National Academy of Sciences **105**, 4945.
- Zhu, J., Verslues, P.E., Zheng, X., Lee, B.-h., Zhan, X., Manabe, Y., Sokolchik, I., Zhu, Y., Dong, C.-H., Zhu, J.-K., Hasegawa, P.M., and Bressan, R.A.** (2005). HOS10 encodes an R2R3-type MYB transcription factor essential for cold acclimation in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**, 9966.
- Zhu, Q., Zhang, J., Gao, X., Tong, J., Xiao, L., Li, W., and Zhang, H.** (2010). The *Arabidopsis* AP2/ERF transcription factor RAP2.6 participates in ABA, salt and osmotic stress responses. Gene **457**, 1.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name Olaf Gunter Barth
Geburtsdatum 02.10.1976
Geburtsort Erlabrunn (Erzgebirge)
Familienstand verheiratet, 2 Kinder

Tätigkeiten

2002 bis 2010 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biologie, Institutsbereich Pflanzenphysiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Humbeck

1996 - 2001 Biologie (Diplom) - Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

1999 Praktikum am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle

1995 – 1996 Zivildienstleistender beim Unabhängigen Behindertenverband Schwarzenberg e.V. in Schwarzenberg (Erzgebirge)

1991 – 1995 Bertolt-Brecht-Gymnasium in Schwarzenberg

1983 - 1991 Polytechnische Oberschule 'Maxim Gorki' in Schwarzenberg

Veröffentlichungen

Barth, O., Vogt, S., Uhlemann, R., Zschiesche, W., and Humbeck, K. (2009). Stress induced and nuclear localized HIP26 from *Arabidopsis thaliana* interacts via its heavy metal associated domain with the drought stress related zinc finger transcription factor ATHB29. *Plant Molecular Biology* 69, 213.

Ay N, Clauß K, Barth O, Humbeck K (2008) Identification and characterization of novel senescence-associated genes from barley (*Hordeum vulgare*) primary leaves. *Plant Biology* 10, 121-135.

Humbeck K, Zschiesche W, Barth O (2007). Molecular response of plants to low temperature and high light. In: *Physiology of Northern Plants under changing Environment*, Research Sign Post (Taulavuori E and Taulavuori K, eds.), pp. 135-156.

Philipps G, Drzewiecki C, Barth O, Zschiesche W, Humbeck K. (2006). Light dependent expression of the cold-regulated gene HvMC1 in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Thermal Biol.* 31, 473-482.

Barth O, Zschiesche W, Siersleben, S., Humbeck K. (2004). Isolation of a novel barley cDNA encoding a nuclear protein involved in stress response and leaf senescence. *Physiol. Plantarum.* 121, 282-293.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertation erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe.

Ferner erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel sind nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommen Stellen als solche kenntlich gemacht worden.

Halle, den 07. 07. 2011

O. Barth