

UNIVERSITÄT  
BAYREUTH

**Untersuchung des Beitrags von**  
***Nicotianaminsynthase* zur Zinkhyperakkumulation**  
**in *Arabidopsis halleri***

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

vorgelegt der  
Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der Universität Bayreuth

von

**Ulrich Deinlein**

geboren am 04.09.1982 in Pegnitz

Bayreuth, im April 2012

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2008 bis März 2012 am Lehrstuhl Pflanzenphysiologie in Bayreuth unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Stephan Clemens angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am 11. April 2012

Das wissenschaftliche Kolloquium fand statt am 30. Mai 2012

Amtierende Dekanin:

Prof. Dr. Beate Lohnert

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Stephan Clemens (Erstgutachter)

PD Dr. Stefan Geimer (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Egbert Matzner (Vorsitz)

Prof. Dr. Olaf Stemmann

Prof. Dr. Benedikt Westermann

Teile dieser Arbeit wurden in dem Artikel

**“Elevated Nicotianamine Levels in *Arabidopsis halleri* Roots Play a Key Role in Zinc Hyperaccumulation“**

(Deinlein *et al.* (2012). *The Plant Cell* 24: 708-723)

veröffentlicht.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Der pflanzliche Zinkhaushalt .....	1
1.2. Hyperakkumulation von Zink und Cadmium in Pflanzen .....	8
1.3. Biofortifikation.....	12
1.4. Phytoremediation .....	14
1.5. <i>Arabidopsis halleri</i> .....	17
1.6. Nicotianaminsynthase .....	18
1.7. Zielsetzung dieser Arbeit .....	21
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
2.1. Molekularbiologische Standardmethoden.....	22
2.1.1. gDNA Isolierung.....	22
2.1.2. Polymerasekettenreaktionen.....	22
2.1.3. Klonierungs-PCR .....	23
2.1.4. DNA-Sequenzierung .....	24
2.1.5. Bakterientransformation.....	24
2.1.6. Easyprep (rapid boiling prep).....	24
2.1.7. Proteinextraktionsmethoden.....	25
2.1.7.1. Proteinextraktion aus <i>E. coli</i> .....	25
2.1.7.2. Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial von <i>A. halleri</i> .....	25
2.1.8. Proteinbestimmung.....	26
2.1.9. SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	26
2.1.10. Western Blot.....	26
2.1.11. Amido Black-Färbung.....	27
2.1.12. Coomassie-Färbung.....	27
2.2. Pflanzenmaterial, -kultivierung und Transformationen .....	27
2.2.1. Behandlung der für die Pflanzenanzucht verwendeten Erde.....	27
2.2.2. Kultivierung der für die Experimente verwendeten <i>Arabidopsis</i> Pflanzen.....	27
2.2.3. Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	28
2.2.3.1. Testen der Transformanten.....	28
2.2.4. Transformation von <i>Arabidopsis halleri</i> .....	29
2.2.5. Transformation von <i>A. thaliana</i> (Floral Dip).....	30
2.3. Transkriptanalyse mit realtime PCR .....	30

2.4.	Analyse der Expressionsdaten.....	32
2.5.	Analyse des Nicotianamingehaltes mit LC-MS.....	33
2.6.	Metallprofile und Analyse von zinkbindenden Liganden.....	34
2.6.1.	Elementanalyse mit ICP-OES.....	34
2.6.1.1.	Analyse von Blatt- und Wurzelmaterial.....	34
2.6.1.2.	Erdanalyse.....	34
2.6.2.	Zink-Speziierungsanalyse mit SEC-ICP-MS und Identifizierung von Liganden mit ESI-TOF-MS.....	35
2.6.2.1.	Speziierungsanalyse von Pflanzenmaterial.....	35
2.6.2.2.	Speziierungsanalyse von Xylemsaft.....	36
2.6.3.	Elementanalyse mit Transmissionselektronenmikroskopie.....	36
2.6.3.1.	Fixierung durch Hochdruckgefrieren.....	36
2.6.3.2.	Tieftemperaturentwässerung und Einbettung der Proben.....	37
2.6.3.3.	Ultramikrotomie und Nachkontrastierung.....	37
2.6.3.4.	Transmissionselektronenmikroskopische Analyse der Ultrastruktur und EDX-Analyse.....	38
2.6.4.	Zinkfärbung mit Zinpyr-1.....	38
2.7.	Thiolanalyse mit LC-MS.....	39
2.8.	pH-Wert-Bestimmung von Erdproben.....	39
2.9.	Herstellung eines spezifischen Antikörpers für <i>AhNAS2</i> .....	39
2.10.	Generierung von RNAi-Pflanzen für <i>AhNAS4</i> und <i>AhPCS</i> .....	40
2.11.	Verwendete Medien.....	40
2.12.	Statistische Analysen.....	41
2.13.	Verwendete Chemikalien.....	41
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
3.1.	Charakterisierung verschiedener <i>A. halleri</i> Populationen.....	42
3.1.1.	<i>NAS2</i> -Expression in Wurzeln verschiedener <i>A. halleri</i> Populationen.....	42
3.1.2.	Herstellung eines spezifischen Antikörpers für <i>AhNAS2</i> .....	44
3.1.3.	Messung der Nicotianamingehalte in Wurzeln und Blättern verschiedener <i>A. halleri</i> Populationen.....	45
3.2.	Charakterisierung von <i>AhNAS2</i> RNAi-Linien mit unterschiedlicher Transkriptreduktion.....	47
3.2.1.	Expressionsanalyse der verschiedenen Isoformen von <i>Nicotianaminsynthase</i> .....	47

3.2.2.	Messungen der NA-Gehalte im Wildtyp Langelsheim und in fünf <i>AhNAS2</i> RNAi-Linien .....	56
3.2.3.	Metallprofile von Wildtyp Langelsheim und fünf <i>AhNAS2</i> RNAi-Linien.....	61
3.2.3.1.	Zinkgehalte in Wurzeln und Blättern .....	61
3.2.3.2.	Mangan- und Eisengehalte in Wurzeln und Blättern .....	65
3.2.4.	Toleranzexperimente .....	67
3.2.4.1.	Kurzzeitexperimente unter Zinküberschussbedingungen .....	67
3.2.4.2.	Langzeitexperimente unter Zinküberschussbedingungen .....	68
3.2.4.3.	Toleranzexperimente mit erhöhten Nickel- und Cadmiumkonzentrationen .....	69
3.3.	Experimente mit kontaminierter Erde .....	74
3.3.1.	Pflanzenanzucht in artifiziell kontaminierter Erde.....	74
3.3.2.	Pflanzenanzucht in kontaminierter Erde von <i>A. halleri</i> -Standorten aus dem Harz.....	78
3.4.	Microarrays .....	86
3.5.	Zinkfärbung mit Zinpyr-1 .....	89
3.6.	Untersuchung der Zink-Speziierung mit SEC-ICP-MS und ESI-TOF-MS .....	93
3.6.1.	Analyse von Wurzel- und Blattmaterial .....	93
3.6.2.	Thiolanalyse des Wurzelmaterials mit LC-MS .....	96
3.6.3.	Speziierungsanalyse des Xylemsaftes mit SEC-ICP-MS.....	97
3.7.	Zinklokalisierung im Blattgewebe durch Elektronenmikroskopie.....	97
3.8.	<i>A. thaliana</i> - <i>NAS2</i> -Überexpressionslinien.....	98
3.9.	Analyse einer BAC-Bibliothek zur Bestimmung der Kopienzahl von <i>AhNAS2</i> ....	100
3.10.	Analyse von <i>AhNAS4</i> RNAi-Linien .....	101
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>103</b>
4.1.	Zinkhyperakkumulation in <i>A. halleri</i> .....	103
4.2.	Analyse von Individuen verschiedener <i>A. halleri</i> Populationen .....	104
4.3.	Analyse von RNAi Linien mit unterschiedlichen <i>AhNAS2</i> -Transkriptionsebenen.....	106
4.3.1.	Transkriptanalyse und NA-Analytik .....	106
4.3.2.	ICP-OES-Messungen .....	107
4.3.2.1.	Pflanzenanzucht im hydroponischen System .....	107
4.3.2.2.	Kultivierung auf artifiziell kontaminierter Erde und auf belasteten Böden von nativen <i>A. halleri</i> -Standorten.....	113
4.3.3.	Speziierungsanalyse mit SEC-ICP-MS und ESI-TOF-MS .....	118

---

4.3.3.1.	Analyse von Pflanzenwurzeln.....	118
4.3.3.2.	Analyse des Xylemsaftes .....	119
4.3.4.	Microarrays .....	121
4.3.5.	Versuch der Zinklokalisierung mittels Elektronenmikroskopie.....	122
4.3.6.	Zinkfärbung mit Zinpyr-1 .....	123
4.4.	Kopienzahl von <i>AhNAS2</i> .....	124
4.5.	Versuch der Gewinnung eines <i>AhNAS2</i> -spezifischen Antikörpers.....	125
4.6.	Nas planta Linien .....	125
4.7.	<i>AhNAS4</i> RNAi-Linien .....	126
4.8.	Fazit und Ausblick .....	126
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>130</b>
<b>6.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>132</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>134</b>
<b>Anhang.....</b>		<b>i</b>
	Anhang A: Alignment der vier Isoformen von <i>AhNAS</i> .....	i
	Anhang B: Primerliste.....	ii

## Abkürzungsverzeichnis

AGI	<i>Arabidopsis thaliana</i> Gene Index
<i>A. halleri</i>	<i>Arabidopsis halleri</i>
APS	Ammoniumpersulfat
As	Arsen
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BAC	bacterial artificial chromosome
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CIM	“callus induction medium”
Cd	Cadmium
CDF	“cation diffusion facilitator”
cDNA	“complementary DNA”
CIM	“callus induction medium”
Co	Cobalt
Col-0	Columbia- 0 (Wildtyp: <i>A. thaliana</i> )
Cr	Chrom
Cu	Kupfer
Da	Dalton
DNase	Desoxyribonuklease
DTPA	Diethylentriaminpentansäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskop
EPPS	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Propansulfonsäure
ESI-TOF-MS	“electrospray ionization - time of flight - mass spectrometry”
<i>et al.</i>	und Mitarbeiter
Fe	Eisen
Fe-HBED	Eisen-N,N'-Bis-(2-Hydroxybenzoyl)-Ethylendiamin-N-N'- diacetat
FIT	“fer-like iron deficiency-induced transcription factor”
FRD	“ferric reductase deficient”
FRO	“ferric chelate reductase”
g	Erdbeschleunigung

<i>Gpc-B1</i>	<i>Grain Protein Content B1</i>
GSH	Glutathion
GUS	“beta-glucuronidase“
h	Stunde
HEPES	N-2-(Hydroxyethyl)piperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HILIC	“hydrophilic interaction liquid chromatography“
HMA	“heavy metal ATPase“
ICP-OES	“inductively coupled plasma – optical emission spectrometry“
IPTG	Isopropylthiogalactosid
IRT	“iron regulated transporter“
kb	“kilo base“ (kilo Base)
l	Liter
LB	Luria-Bertani (Vollmedium für E. coli)
LB-Amp	LB-Medium + Ampicillin (50µg/ml)
LC-MS	“liquid chromatography–mass spectrometry“
leu	Leucin
M	Molar (mol/l)
MAS5	MicroArray Suite version 5
MBrB	Monobrombiman
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
min	Minute
Mn	Mangan
mRNA	“messenger“ – RNA
MS	Murashige & Skoog
MSA	Methansulfonsäure
N	Stickstoff
NA	Nicotianamin
NaCl	Natriumchlorid
NAS	Nicotianaminsynthase
Ni	Nickel
NRAMP	“natural resistance associated macrophage protein“
PC2	Phytochelatin mit der Kettelänge 2
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol

PCR	“polymerase chain reaction“
PCS	Phytochelatinsynthase
ppm	Teile pro Million = $1 \cdot 10^{-6}$
RIM	“root induction medium“
RMA	Robust Multi-chip Analysis
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	“RNA interference“
RNAse	Ribonuclease
rpm	“rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	“reverse transcriptase polymerase chain reaction“
SIM	“shoot induction medium“
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SDS	“sodium dodecyl sulfate“ (Natriumdodecylsulfat)
SEC-ICP-MS	“size exclusion- inductively coupled plasma-mass spectrometry“
<i>N. caerulescens</i>	<i>Noccaea caerulescens</i>
T-DNA	Transfer - DNA
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan (Puffersubstanz)
Tris-HCl	Tris-Puffer dessen pH mit Salzsäure eingestellt wurde
UPLC-ESI-QTOF-MS	“ultra performance liquid chromatography - electrospray ionization – quantitative time of flight – mass spectrometry“
WHO	“world health organization“
YSL	“yellow-stripe 1-like“
Zhf	“Zinc homeostasis factor“
ZIF	“Zink-Induced Facilitator“
ZIP	“ZRT-, IRT-like proteins“
Zn	Zink
ZRT	“zinc regulated transporter“

## 1. Einleitung

**“Heavy metal tolerance in plants is probably an example of more powerful evolution in action than industrial melanism in moths” (Antonovics *et al.*, 1971)**

Nur wenige Pflanzenspezies sind in der Lage, auf schwermetallkontaminierter Erde zu überleben und sich fortzupflanzen. In der Literatur wird dies als eines der besten Beispiele für die Anpassung an extreme Umweltbedingungen aufgeführt (Antonovics *et al.*, 1971).

### 1.1. Der pflanzliche Zinkhaushalt

Zink ist nach Eisen das zweithäufigste Übergangsmetall in Organismen und das einzige Metall, welches in allen sechs Enzymklassen vorkommt (Webb, 1992; Broadley *et al.*, 2007). Die Erdkruste enthält normalerweise zwischen 70 und 80 µg/g Zink, während die Konzentration in Sedimentgesteinen bei 10-120 µg/g liegt (Friedland, 1989; Barak & Helmke, 1993; Alloway, 1995; Broadley *et al.*, 2007). Durchschnittliche Zinkkonzentrationen in Erde liegen bei 50-66 µg/g, wobei die meisten landwirtschaftlichen Böden 10-300 µg/g enthalten (Barber, 1995; Alloway, 1995; Broadley *et al.*, 2007). Dabei tritt Zink in gesteinsbildenden Mineralien auf, wo es Magnesium und Eisen unspezifisch ersetzt (Barak & Helmke, 1993). Obwohl einige Metallionen essentielle Mikronährstoffe sind, die beispielsweise als Cofaktoren für Enzyme und Metalloproteine fungieren, können sie in erhöhten Konzentrationen toxisch wirken, indem sie essentielle funktionelle Gruppen blockieren, andere Metallionen verdrängen oder die aktive Konformation biologischer Moleküle verändern (Collins & Stotzky, 1989). Da dies auch für Zink zutrifft, ist ein exakt regulierter Zinkhaushalt mit einer fein abgestimmten Expression von Transporterproteinen unerlässlich für die Zinkaufnahme aus dem Boden, die Mobilisierung zwischen Pflanzenorganen und –geweben und die intrazelluläre Sequestrierung (Assunção *et al.*, 2010). Diese koordinierten Prozesse sind nötig, um alle Zelltypen in allen Entwicklungsstufen und unter verschiedenen Umweltbedingungen in ausreichendem Maße zu versorgen (Clemens, 2001). Zink ist beispielsweise in die DNA- und RNA-Synthese involviert und ein wichtiger Bestandteil vieler für das Zellwachstum und die -differenzierung verantwortlicher Enzyme, wobei ca. 8 % der Proteine in Pflanzen Zn-abhängig sind (Andreini *et al.*, 2006). Zinkgehalte zwischen 0,01 und 0,03 % in getrocknetem Blattmaterial stellen das Maximum dar, das Anbaupflanzen

anreichern können, ohne Symptome von Toxizität zu zeigen (Marschner, 2011; Dräger *et al.*, 2004). Dieser basalen Zinktoleranz, die alle Pflanzen besitzen, steht eine deutlich erhöhte Toleranz von sogenannten Metallophyten gegenüber, die in Gegenwart von sehr hohen Metallkonzentrationen überleben können. Sie werden in absolute Metallophyten, die nur auf kontaminierten Böden wachsen und fakultative Metallophyten, die sowohl an belasteten als auch an unbelasteten Standorten gefunden werden können, eingeteilt (Willems *et al.*, 2007). Gerade diese, an extreme Konditionen angepassten Pflanzenspezies wachsen teilweise in Gegenwart von außerordentlich hohen Schwermetallkonzentrationen, was durch zwei unterschiedliche Hauptstrategien ermöglicht wird. Einerseits existieren sogenannte Hyperakkumulierer, zu denen auch die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Pflanze *Arabidopsis halleri* gehört und zum anderen gibt es sogenannte "Excluder", welche die Metallgehalte im Sprossgewebe im Bereich der im Boden verfügbaren Konzentrationen, oder sogar noch niedriger zu halten versuchen. Metallhyperakkumulation und Metallexklusion stellen somit zwei gegensätzliche physiologische Strategien dar, die von Pflanzen angewendet werden, um auf kontaminierten Böden wachsen und sich reproduzieren zu können (Reeves & Baker, 2000; Krämer *et al.*, 2007). Auf die Schwermetallhyperakkumulation, im Besonderen von Zink, wird in Abschnitt 1.2. näher eingegangen.

Grundlegend kann der pflanzliche Zinkhaushalt in die einzelnen Vorgänge der Mobilisierung von Zinkionen im Boden, Aufnahme in die Wurzel, Xylembeladung, Xylementladung und Sequestrierung unterteilt werden. An jedem dieser Vorgänge sind bestimmte Proteine beteiligt, von denen einige wichtige bereits identifiziert werden konnten. In *Arabidopsis* beispielsweise wurden unterschiedliche Mitglieder essentieller Familien von Kationentransportern charakterisiert, von denen einige auch in die Zinkhomöostase involviert sind (Mäser *et al.*, 2001; Krämer *et al.*, 2007). Auf die Mobilisierung der Metallionen aus dem Boden soll hier nur kurz eingegangen werden. Etwa 30 % aller Böden weltweit sind alkalisch (Palmer & Guerinot, 2009) und da der Großteil des Zinks an diesen Standorten nicht bioverfügbar ist und in unlöslichen Komplexen vorliegt (Barber, 1995), müssen Pflanzen verschiedene Strategien anwenden, um einer drohenden Zinkdefizienz entgegenzuwirken. Eine Methode ist die Ansäuerung des Bodens durch Protonenexport (Palmer & Guerinot, 2009). Die Reduzierung des pH-Werts steigert die Verfügbarkeit von im Boden komplexierten Mikronährstoffen und erleichtert somit deren Aufnahme durch die Pflanzenwurzel (Palmgren *et al.*, 2008). Eine weitere Möglichkeit, die von Poaceen angewendet wird (Curie *et al.*, 2009), ist die Ausscheidung von sogenannten Chelatoren, zu denen auch die später näher behandelten Phytosiderophore gehören. Diese nicht-

proteinogenen Aminosäuren komplexieren im Boden enthaltene Metallionen, wobei die gebildeten Komplexe dann von spezifischen Transportern, wie beispielsweise den “yellow-stripe 1-like“ (YSL) Proteinen in die Wurzel aufgenommen werden (Shojima *et al.*, 1990; Curie *et al.*, 2009). Eine weitere Proteinfamilie, die das primäre Aufnahmesystem von Zink und Eisen in Pflanzen darstellt, sind die “ZRT-, IRT-like proteins” oder kurz ZIP-Transporter, die in *Arabidopsis thaliana* 15 Gene umfassen (Guerinot, 2000; Grotz *et al.*, 1998; Palmgren *et al.*, 2008). Die Bedeutung dieser in der Plasmamembran lokalisierten Kationentransporter soll anhand der wohl bekanntesten Mitglieder ZIP2, ZIP4, ZIP9, ZIP10 sowie IRT1 und IRT3 kurz näher betrachtet werden. IRT1 ist der erste identifizierte Vertreter der ZIP-Transporter. Dieser gut charakterisierte Metalltransporter, der in Nicht-Hyperakkumulierern nur unter Eisenmangelbedingungen in den Wurzeln exprimiert wird, stellt den wichtigsten Aufnahmemechanismus für  $\text{Fe}^{2+}$  in Pflanzen dar (Vert *et al.*, 2002). In Hefe wurde für IRT1 nicht nur eine Rolle im Transport von  $\text{Fe}^{2+}$ , sondern auch in dem von  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  nachgewiesen (Korshunova *et al.*, 1999; Guerinot, 2000; Rogers & Guerinot, 2002). Das zu IRT1 sehr homologe Protein IRT3 (Eide *et al.*, 1996) transportiert ebenfalls sowohl Zink als auch Eisen (Lin *et al.*, 2009), was auch in *A. halleri* gezeigt werden konnte (Talke *et al.*, 2006). Des Weiteren sind ZIP6 und ZIP9 in Hyperakkumulierern konstitutiv höher exprimiert, als in *A. thaliana* (Weber *et al.*, 2004; Assunção *et al.*, 2010b). Die Expression der Isoformen *AtZIP2* und *AtZIP4* in Hefe resultierte in einer Erhöhung des zellulären Zinkgehalts (Grotz *et al.*, 1998). Außerdem war die Expression der beiden Isoformen ZIP4 und ZIP10 unter Zinkmangelbedingungen in den beiden Hyperakkumulierern *A. halleri* und *Nocca caerulescens* induziert (Talke *et al.*, 2006; Becher *et al.*, 2004; van de Mortel *et al.*, 2006; Lasat *et al.*, 2000). Im Kontext der ZIP-Transporter gelang Assunção *et al.* (2010a) eine wichtige Entdeckung bezüglich der Regulation der pflanzlichen Zinkhomöostase. Sie konnten nachweisen, dass zwei Transkriptionsfaktoren der bZIP-Genfamilie (“basic-region leucine zipper“) eine entscheidende Rolle für die Expression von mehreren Kationentransportern der ZIP-Familie und auch von zwei Isoformen der in Abschnitt 1.6. näher behandelten *Nicotianaminsynthase* (NAS) spielen. Unter zinkdefizienten Bedingungen war in *A. thaliana* Wildtyp Pflanzen sowohl die Expression von ZIP1, ZIP3, ZIP4, ZIP5, ZIP9, ZIP12 und IRT3 als auch von NAS2 und NAS4 signifikant induziert, während in *bzip19bzip23*-Doppelmutanten keine Veränderung der Transkriptmengen gemessen wurde (Assunção *et al.*, 2010a; Assunção *et al.*, 2010b). Ferner konnte bestätigt werden, dass die durch *bZIP19* und *bZIP23* regulierten Gene eine gemeinsame palindromische Erkennungssequenz in ihren Promotoren besitzen, die jeweils in einer bis hin zu mehreren Kopien vorliegt (Assunção *et al.*, 2010a). Die Tatsache,

dass diese Bindungsstelle in Monokotyledonen, Dikotyledonen, aber auch in Gymnospermen und Moosen, wie beispielsweise *Physcomitrella patens*, konserviert ist, in anderen ZIP-Transporter-besitzenden Organismen aller phylogenetischen Ebenen jedoch nicht nachgewiesen werden konnte, deutet stark auf eine unabhängige Evolution der Regulation der Zinkaufnahme unter defizienten Bedingungen in Pflanzen hin (Assunção *et al.*, 2010a).

Ein Großteil der in die Wurzel aufgenommenen Metallionen wird über das Xylem ins Sprossgewebe der Pflanze transportiert. Der Rest wird hauptsächlich in die Vakuole sequestriert, wie es zum Beispiel für Cadmium der Fall ist. Dieses toxische Schwermetall gelangt über Zinkaufnahmesysteme in die Zellen (Clemens, 2006) und muss dann entgiftet werden, was beispielsweise mit Hilfe von Phytochelatinen (PCs) erreicht werden kann. Diese Chelatoren werden von Pflanzen als Antwort auf erhöhte Cadmiumkonzentrationen, von der Vorstufe Gluthathion ausgehend, synthetisiert (Grill *et al.*, 1985). Beispielsweise kann die *A. thaliana*-Mutante *cad1-3* keine Phytochelatine synthetisieren und besitzt eine erhöhte Sensitivität gegenüber  $\text{Cd}^{2+}$  (Howden *et al.*, 1995). Die unspezifische Aufnahme von bereits in geringen Konzentrationen toxischen Metallen durch Pflanzen stellt ein großes Problem dar, da z.B. Cadmium nicht nur die Pflanze selbst schädigen, sondern auch über Anbaupflanzen in die menschliche Nahrungskette gelangen kann (Clemens, 2006). Cadmium, Blei oder Quecksilber sind solche Elemente, die aufgrund ihrer hohen Reaktivität mit Schwefel- und Stickstoffatomen in den Seitenketten von Aminosäuren (Clemens, 2001) giftig sind und deshalb über Mechanismen, wie die angesprochene Vakuolensequestrierung, detoxifiziert werden müssen.

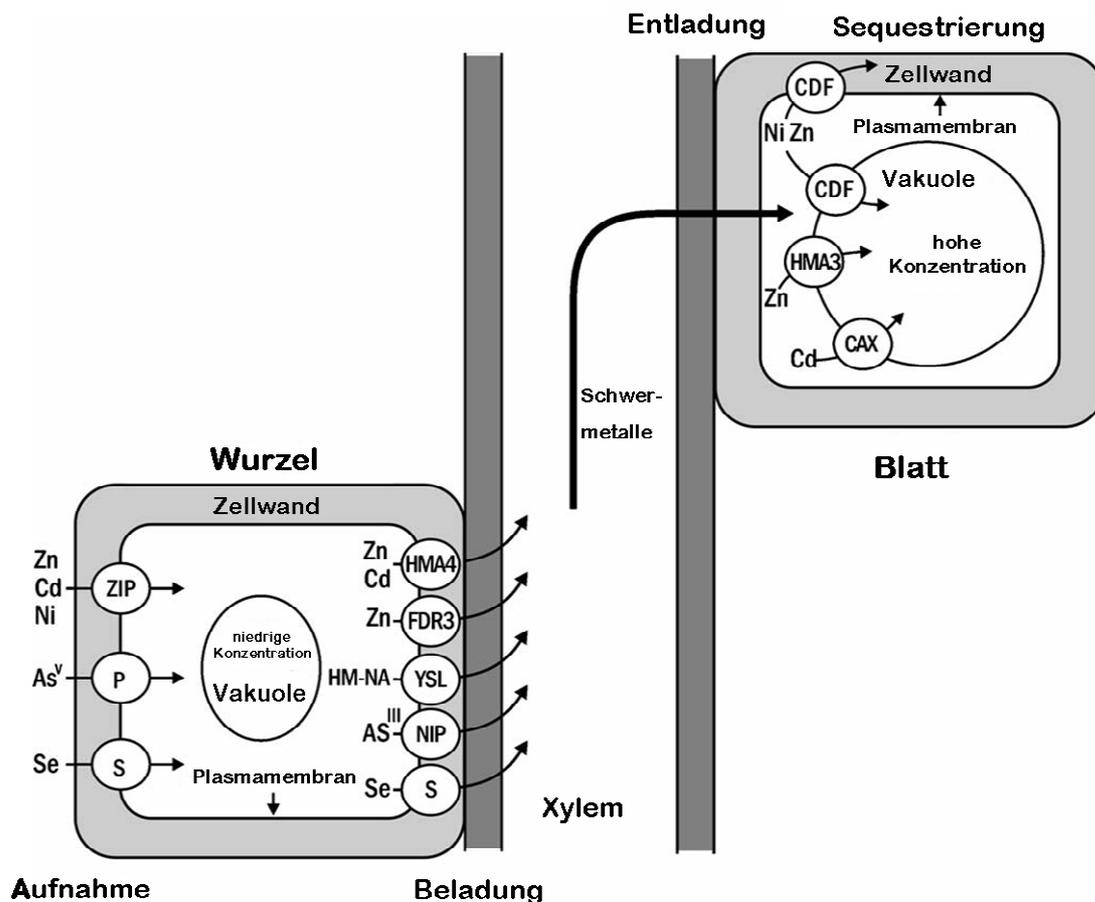
Ein weiteres Gen, dem eine wichtige Rolle in der Wurzelsequestrierung von Metallionen zugeschrieben wird, ist *ZIF1* ("Zinc-Induced Facilitator 1") aus der "major facilitator superfamily" (MSF) (Haydon & Cobbett, 2007b). *ZIF1* ist in der vakuolären Membran lokalisiert und wichtig für die bereits angesprochene basale Zinktoleranz von Pflanzen (Haydon & Cobbett, 2007b; Haydon *et al.*, 2012). Im Spross von *zif1* Mutanten konnte erhöhte Akkumulation von Zink, jedoch nicht von anderen Metallionen, gemessen werden. Daraus wurde gefolgert, dass *ZIF1* in einen neuen Mechanismus der Zinksequestrierung, möglicherweise durch den Transport von Zinkliganden bzw. Zink-Liganden-Komplexen in die Wurzelvakuole, involviert ist (Haydon & Cobbett, 2007b; Palmgren *et al.*, 2008). Die Reduktion der *ZIF1*-Aktivität führt somit dazu, dass weniger Zink in die Wurzelvakuole gelangt und dadurch mehr in den Spross transportiert wird.

Grundsätzlich ist es sehr wichtig, dass essentielle Mikroelemente, die beispielsweise für die Photosynthese im Blattgewebe benötigt werden, über die Xylemgefäße aus den Wurzeln in

den Spross transportiert werden. Es gibt viele Hinweise darauf, dass ein schneller und effizienter Wurzel-Spross-Transport von großen Mengen an Schwermetallen, wie er in hyperakkumulierenden Pflanzen der Fall ist, durch eine verbesserte Xylembeladung ermöglicht wird. Diese höhere Effizienz ist wiederum auf die stärkere Expression von Metalltransportergenen zurückzuführen, die auch in Nicht-Hyperakkumulierern vorhanden sind (Rascio & Navari-Izzo, 2011). In diesem Kontext zählen Mitglieder der P<sub>1B</sub> Unterfamilie der *ATPasen*, die sogenannten “*Heavy Metal ATPasen*“ (*HMA*), zu den wichtigsten Genen. Sie sind in den Transport, die Hyperakkumulation und die Toleranz gegenüber Schwermetallen involviert und besitzen somit eine wichtige Rolle im Schwermetallhaushalt der Pflanze (Axelsen & Palmgren, 2001). Von den acht, in *Arabidopsis* existenten P<sub>1B</sub> ATPasen fungieren “*Heavy Metal ATPase 2*“ (*HMA2*) und *HMA4* nachweislich als Zinktransporter (Wong & Cobbett, 2009). *HMA4* ist in der Plasmamembran lokalisiert und hauptsächlich für die Beladung des Xylems mit Zink und Cadmium verantwortlich (Hussain *et al.*, 2004) (siehe Abb. 1). Außerdem ist *HMA4* eines der Gene, die in den Hyperakkumulierern *A. halleri* und *N. caerulescens* deutlich höher exprimiert sind als in *A. thaliana* (Talke *et al.*, 2006) und liegt in einem Genomabschnitt, in dem vier QTLs (“*Quantitative Trait Loci*“) für Zink- und Cadmiumtoleranz sowie Hyperakkumulation beider Metalle lokalisiert sind (Willems *et al.*, 2010; Frérot *et al.*, 2010; Hanikenne & Nouet, 2011). QTL-Regionen sind Genomabschnitte, in denen Gene liegen, die nachweislich für ein bestimmtes phänotypisches Merkmal der Pflanze verantwortlich, bzw. damit verknüpft sind (Collard *et al.*, 2005). In Experimenten mit *HMA4* RNAi-Linien konnte gezeigt werden, dass erhöhte *AhHMA4*-Expression essentiell für die Hyperakkumulation von Zink und für die Hypertoleranz gegenüber Zink und Cadmium ist (Hanikenne *et al.*, 2008; Hanikenne & Nouet, 2011). Hanikenne und Mitarbeiter konnten auch nachweisen, dass die erhöhten *AhHMA4*-Transkriptmengen auf Veränderungen *cis*-regulatorischer Elemente und eine Verdreifachung der Genkopienzahl in *A. halleri* zurückzuführen sind. Dies bekräftigt die Hypothese, dass Hyperakkumulation nicht durch zusätzlich existente Gene erklärt werden kann, sondern vielmehr durch Anpassung der Regulation und evolutiver Veränderung der Genexpression von wichtigen Metallhomöostasegenen, die auch in Nicht-Hyperakkumulierern existieren (Talke *et al.*, 2006; Hanikenne & Nouet, 2011). Interessanterweise resultiert die konstitutiv erhöhte *HMA4*-Expression in *A. halleri* in einer Induktion von mehreren Genen, die in die Aufnahme von Metallionen in die Wurzel involviert sind. Zu diesen zählen beispielsweise Mitglieder der bereits erwähnten ZIP-Familie. Dies deutet stark darauf hin, dass der Wurzel-Spross-Transport die treibende Kraft

der Hyperakkumulation darstellt, indem er eine permanente Metalldefizienzantwort in der Wurzel auslöst (Hanikenne *et al.*, 2008; Rascio & Navari-Izzo, 2011). Ob die Metallionen für den Transport im Xylem ungebunden oder komplexiert vorliegen, kann nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Im Xylemsaft von *N. caerulescens* und *A. halleri* beispielsweise liegen Zink und Cadmium größtenteils in freier, hydratisierter Form vor (Salt *et al.*, 1999; Ueno *et al.*, 2008). Möglich ist auch, dass Metalle in Komplexen mit Chelatoren, wie Nicotianamin, Histidin oder Citrat, im Transpirationsstrom des Xylems in den Spross transportiert werden (Krämer *et al.*, 1996; Clemens *et al.*, 2002).

Im Blattgewebe angekommen werden die Metallionen aus dem Xylem entladen und verteilt bzw. gespeichert. Die Speicherung kann in der Vakuole erfolgen, was meist im Zuge der Detoxifizierung geschieht. Dabei kommen erneut P-Typ ATPasen, wie HMA3 und Proteine der CDF ("Cation Diffusion Facilitator") Familie, wie beispielsweise MTP1 ("Metal Tolerance Protein 1") zum Einsatz (siehe Abb.1). Sowohl das vakuoläre HMA3 als auch das in der Tonoplastenmembran lokalisierte MTP1 sind Metalltransporter, die den Ionenefflux aus dem Cytoplasma vermitteln (van de Mortel *et al.*, 2008; Gustin *et al.*, 2009). Wie von *HMA4* existieren auch mehrere Genkopien von *MTP1* in *A. halleri*, wodurch die konstitutiv erhöhte Expression im Vergleich zu *A. thaliana* erklärt werden kann (Weber *et al.*, 2004; Talke *et al.*, 2006). In allen untersuchten *A. halleri* Populationen konnten mindestens vier, vereinzelt sogar fünf Kopien dieses Metalltransporters nachgewiesen werden (Shahzad *et al.*, 2010). Die beiden am stärksten exprimierten Genkopien liegen dabei in einer QTL-Region für Zinktoleranz (Dräger *et al.*, 2004; Hanikenne & Nouet, 2011). Neben *HMA4* ist *MTP1* somit das prominenteste Beispiel für veränderte Genregulation als Grundlage der Hyperakkumulation und Toleranz. Zusätzlich zu den bereits behandelten sind noch weitere Metallhomöostasegene in den Hyperakkumulierern *A. halleri* und *N. caerulescens* konstitutiv höher exprimiert als im Nicht-Hyperakkumulierer *A. thaliana*, was in vergleichenden Microarrayexperimenten nachgewiesen werden konnte (Weber *et al.*, 2004; Talke *et al.*, 2006). In Abbildung 1 ist eine Übersicht mit den wichtigsten dieser bereits identifizierten Kandidaten und ihrer vorgeschlagenen Funktion dargestellt (modifiziert nach Rascio & Navari-Izzo, 2011).



**Abbildung 1:** Schlüsselproteine in der Aufnahme und im Transport von Schwermetallen in hyperakkumulierenden Pflanzen (Rascio & Navari-Izzo, 2011).

In *A. halleri* dienen Trichome und Mesophyllzellen als Hauptspeicherorte für Zink (Küpper *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2000). Obwohl  $Zn^{2+}$  für viele biologische Prozesse benötigt wird, liegt es nur in minimalen Konzentrationen in der freien hydratisierten Ionenform im Cytosol vor (Clemens *et al.*, 2002). Die Konzentrationswerte dieses freien Zinkpools liegen in einem sehr engen Bereich, der durch ein streng reguliertes Puffersystem aufrechterhalten wird (Colvin *et al.*, 2010). Diese Pufferung ist außerdem von essentieller Bedeutung, da der Gehalt an Zink in eukaryotischen Zellen in der Regel höher ist als der anderer Übergangsmetalle und weil die Zinkionen auf etliche Proteine mit einer Vielzahl von Funktionen verteilt werden müssen. Zu hohe Konzentrationen an freiem Zink würden zu unspezifischen Interaktionen und möglicherweise schädigenden Effekten auf andere Metalloproteine führen (Colvin *et al.*, 2010). Um dieses Gleichgewicht konstant zu halten, braucht die Zelle zinkbindende Moleküle, die bei Bedarf Zink komplexieren bzw. abgeben können (Colvin *et al.*, 2010). Es wird spekuliert, dass zu diesen beispielsweise die sogenannten Metallothioneine (MT) und auch die bereits erwähnten Phytochelatine gehören. Es ist bekannt, dass Metallothioneine aus

Säugetierzellen Cadmiumtoleranz verleihen können (Masters *et al.*, 1994) und dass sie vorwiegend das Metallion  $Zn^{2+}$  binden, weshalb ihnen eine Rolle in der zellulären Zinkpufferung zugesprochen wird (Clemens, 2001). Das erste in Pflanzen entdeckte Metallothionein stammt aus Weizen. Es konnte isoliert und seine Fähigkeit,  $Zn^{2+}$  zu binden, nachgewiesen werden (Lane *et al.*, 1987; Clemens, 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Synthese von Phytochelatinen nicht nur durch  $Cd^{2+}$ , sondern auch durch  $Zn^{2+}$  aktiviert wird und dass PC-defiziente *A. thaliana* Pflanzen eine erhöhte Zinksensitivität aufweisen (Tennstedt *et al.*, 2009). Die in Hefeexperimenten erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass überschüssiges  $Zn^{2+}$  im Cytosol von PC chelatiert werden kann (Tennstedt *et al.*, 2009).

Auch so genannte Metallochaperone sind in die zelluläre Schwermetallpufferung involviert und dienen zum Beispiel als Bindungspartner von Kupferionen (O'Halloran & Culotta, 2000). Da sie allerdings keine Rolle in der Komplexierung von Zink zu spielen scheinen, soll hier nicht näher auf sie eingegangen werden. Es wird angenommen, dass in Pflanzen neben den Metallothioneinen auch Phytochelatine und weitere Chelatoren mit niedrigem Molekulargewicht, wie die bereits erwähnten Nicotianamin, Glutathion, Histidin und Citrat, für die inter- und subzelluläre Verteilung von Zink verantwortlich sind (Krämer & Clemens, 2006; Clemens *et al.*, 2002). So wurde Citrat als einer der Hauptliganden von  $Cd^{2+}$  bei niedrigen Cadmiumkonzentrationen vorgeschlagen (Wagner, 1993) und auch mit der Akkumulation von  $Zn^{2+}$  und der Zinktoleranz in Verbindung gebracht (Godbold *et al.*, 1984; Clemens, 2001). Malat soll ebenfalls als cytosolischer Chelator zur Zinktoleranz beitragen (Mathys, 1977), wenngleich weder für Citrat, noch für Malat endgültige Beweise für die postulierten Funktionen in der pflanzlichen Zinkhomöostase erbracht werden konnten (Clemens, 2001).

## 1.2. Hyperakkumulation von Zink und Cadmium in Pflanzen

Es existieren viele zinkkontaminierte Böden, deren Belastung meist anthropogenen Ursprungs ist. Beispielsweise an ehemaligen Minenstandorten können Zinkkonzentrationen von über 15000  $\mu\text{g/g}$  in der Erde gemessen werden. Unter derartig extremen Bedingungen besteht die Flora meist überwiegend aus den bereits erwähnten Metallophyten. Zum ersten Mal erschienen Berichte über solche zinkhypertoleranten Pflanzen bereits im Jahr 1855. In der Asche des gelben Galmeiveilchens *Viola calaminaria* wurde eine Menge von mehr als 1 % Zink gemessen (Reeves & Baker, 2000). Kurz danach, im Jahr 1865, wurde von einem Zinkgehalt von über 1 % des Trockengewichts von *Thlaspi alpestre*, heute bekannt als

*Noccaea caerulescens*, berichtet (Reeves & Baker, 2000). Seitdem wird eine Zinkkonzentration von mehr als 10000 µg/g Trockengewicht im Spross einer in ihrer natürlichen Umgebung gewachsenen Pflanzenspezies als Hyperakkumulation definiert (Baker & Brooks, 1989). Etwa ein Jahrhundert später, in den 1960er Jahren, wurden einige verschiedene Wildpflanzen entdeckt, die oft auf Mineralböden wuchsen und in hohem Maße Metalle in ihrem Blattgewebe akkumulierten (Baker & Brooks, 1989; Raskin *et al.*, 1997). Die meisten bis heute beschriebenen Zn-Hyperakkumulierer gehören zu den Brassicaceen (Macnair, 2003; Broadley *et al.*, 2007). Innerhalb dieser Familie sind die beiden Arten *Arabidopsis halleri* und *Noccaea caerulescens* die am besten untersuchten Zinkhyperakkumulierer und wurden als Modellsysteme etabliert (Krämer, 2010; Bert *et al.*, 2000; Assunção *et al.*, 2003). Die Aufspaltung zwischen *A. thaliana* und *N. caerulescens* liegt etwa 20 Millionen Jahre zurück, also deutlich länger als die zwischen *A. halleri* und *A. thaliana*, die vor 3,5 bis 5,8 Millionen Jahren stattfand (Yogeeswaran *et al.*, 2005; Talke *et al.*, 2006; Becher *et al.*, 2004). Folglich müssen Zink- und Cadmiumhyperakkumulation sowie die Toleranz gegenüber diesen beiden Schwermetallen in *A. halleri* und *N. caerulescens* unabhängig voneinander evolviert sein (Krämer, 2010). Anhand von Experimenten mit Kreuzungen zwischen *A. halleri* und der nicht-hyperakkumulierenden und nicht-toleranten Spezies *A. petraea* postulierten Macnair und Mitarbeiter, dass Hyperakkumulation und Toleranz genetisch unabhängige Faktoren darstellen (Macnair *et al.*, 1999). Diese Hypothese konnte teilweise, zum Beispiel anhand von *HMA4*, widerlegt werden. Beide Phänomene treten sowohl in *A. halleri* als auch in *N. caerulescens* konstitutiv auf, wobei beide Spezies mehrere Veränderungen in der Metallhomöostase gemeinsam haben (Hanikenne & Nouet, 2011). Diese beinhalten physiologische Modifikationen, wie erhöhte Metallionenaufnahme durch die Wurzel, effizienten symplastischen Metalltransport in Richtung des Xylems gekoppelt mit reduzierter Sequestrierung in die Wurzelvakuole, erhöhten Metalltransport von der Wurzel ins Sprossgewebe und schließlich effiziente Metallverteilung und vakuoläre –speicherung in den Blättern (Hanikenne & Nouet, 2011). Neben diesen Anpassungen besitzen *A. halleri* und *N. caerulescens* auch eine Reihe von Veränderungen auf molekularer Ebene, zu denen die Expressionserhöhung mehrerer Metallhomöostasegene gehört (Weber *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2006; Talke *et al.*, 2006; Filatov *et al.*, 2006; van de Mortel *et al.*, 2006). Grundsätzlich werden zwei Hauptstrategien bei der Identifizierung wichtiger Hyperakkumulationsfaktoren verfolgt. Zum einen sind dies vergleichende Transkriptomanalysen, bei denen die Expression der Gene von metallhyperakkumulierenden und der von nicht-hyperakkumulierenden Pflanzen verglichen

wird. Die in Hyperakkumulierern stärker exprimierte Gene werden dann im Hinblick auf ihre Rolle in der Metallanreicherung untersucht und näher charakterisiert. Durch diese Strategie konnten bereits mehrere wichtige Metallhomöostasekomponenten identifiziert werden (Weber *et al.*, 2004; Talke *et al.*, 2006; Filatov *et al.*, 2006). Der zweite Ansatz ist das Kartieren von den in Abschnitt 1.1. angesprochenen QTL-Regionen, wodurch Kandidatengene enthaltende Genomabschnitte eingegrenzt werden können (Filatov *et al.*, 2007). Beispielsweise konnten in *N. caerulea* sowohl für die Zink- als auch für die Cadmiumanreicherung in Wurzeln zwei QTL-Regionen kartiert werden. Außerdem wurden drei weitere Genomabschnitte für die Hyperakkumulation von Zink im Spross und ein weiterer für die von Cadmium identifiziert (Deniau *et al.*, 2006). Die Analyse von Kreuzungen zwischen *Arabidopsis halleri* und der nahe verwandten, nicht zinktoleranten Spezies *Arabidopsis lyrata* ssp. *petraea* lieferte ebenfalls drei QTLs für Zink- und zwei zusätzliche für Cadmiumtoleranz in *A. halleri* (Willems *et al.*, 2010). Eine der für die Zinkhyperakkumulation wichtigen QTL-Regionen liegt dabei auf Chromosom 3 (Frérot *et al.*, 2010) und überschneidet sich größtenteils mit einem bereits beschriebenen Abschnitt, der für die Toleranz gegenüber Cadmium und Zink wichtig ist (Willems *et al.*, 2010). Somit besitzen Zinktoleranz und –hyperakkumulation wohl eine zum Teil gemeinsame genetische Basis, die sich möglicherweise gleichzeitig auf metallbelasteten Böden entwickelt hat (Frérot *et al.*, 2010), größtenteils funktionieren beide Mechanismen jedoch unabhängig voneinander. Trotz der Existenz einzelner Kandidatenregionen für Zinkhyperakkumulation kann die Frage nach solchen QTLs noch nicht abschließend beantwortet werden (Filatov *et al.*, 2007). Die interessanten Genomabschnitte müssen erst genau kartiert werden, um die restlichen, der Hyperakkumulation und Toleranz zugrunde liegenden Gene identifizieren und charakterisieren zu können (Hanikenne & Nouet, 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde *A. halleri* als Modellpflanze für die Zinkhyperakkumulation und –toleranz untersucht. Unter natürlichen Bedingungen konnten im Blattmaterial von *A. halleri* Zinkkonzentrationen zwischen 3000 und 22000 µg/g Trockengewicht gemessen werden (Bert *et al.*, 2000), was mehr als das Hundertfache von in *A. thaliana* Blättern gemessenen Werten ist. In Tabelle 1 sind einerseits die Schwellenwerte der für Pflanzen kritischen Toxizitätskonzentrationen verschiedener Metalle und andererseits die Werte, ab denen Hyperakkumulation definiert wird, aufgelistet. Außerdem sind für Cobalt, Kupfer und Zink jeweils neu vorgeschlagene Hyperakkumulationsschwellenwerte angegeben sowie zusätzlich, in wie vielen Taxa und Familien Hyperakkumulierer der jeweiligen Metalle vorkommen.

**Tabelle 1:** Konzentrationsschwellenwerte für die Hyperakkumulation von Schwermetallen (Krämer, 2010).

		Hyperakkumulations-Schwellenwert [ $\mu\text{g/g}^{-1}$ ]		Taxa	Familien
Element	Kritischer Toxizitäts-Schwellenwert [ $\mu\text{g/g}^{-1}$ ]	Bisher anerkannt	Vorgeschlagen	Anzahl	Anzahl
Antimon	< 2	> 1000		2	2
Arsen	< 2 - 80	> 1000		15	2
Cadmium	6 - 10	> 100		5	2
Cobalt	> 0,4	> 1000	> 300	26	11
Kupfer	20 - 30	> 1000	> 300	35	15
Blei	0,6 - 28	> 1000		14	7
Mangan	200 - 3500	> 10000		10	6
Nickel	10 - 50	> 1000		390	42
Selen	3 - 100	> 1000		20	7
Thallium	20	> 1000		1	1
Zink	100 - 300	> 10000	> 3000	15	6

Die Abwehr von Fressfeinden und der Schutz vor Pilzen werden als Hauptgründe für die Hyperakkumulation von Schwermetallen in Pflanzen angenommen (Reeves *et al.*, 1981; Baker & Brooks, 1989; Boyd & Martens 1992; Boyd & Martens, 1998). Der protektive Effekt von Zink gegenüber Herbivoren konnte beispielsweise im Zinkhyperakkumulierer *N. caerulescens* nachgewiesen werden (Pollard & Baker, 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Insekten den arsenhyperakkumulierenden Farn *Pteris vitatta* vermieden, wenn die Pflanzen auf arsenhaltigem Medium angezogen wurden, wobei auf arsenfreiem Medium gewachsene Farne gefressen wurden (Rathinasabapathi *et al.*, 2007).

Hyperakkumulierer haben das Interesse der Wissenschaftsgemeinde geweckt, da sie sehr gute Modellorganismen für die Untersuchung des pflanzlichen Metallhomöostasenzwerks darstellen. Des Weiteren können mit ihnen die Hintergründe der pflanzlichen Anpassung an extreme Umweltbedingungen sehr gut studiert werden. Neben diesen, die Grundlagenforschung betreffenden Aspekten, existieren auch zwei methodische Ansätze, bei denen die Forschung an hyperakkumulierenden Pflanzen eine wichtige Rolle spielt. Diese sind zum einen die Biofortikation von ernährungsrelevanten Pflanzen (Clemens *et al.*, 2002; Guerinot & Salt, 2001) und zum anderen der potentielle Einsatz in der Phytoremediation (Krämer, 2005).

### 1.3. Biofortifikation

Zinkarme Böden stellen ein weltweites Problem dar, wobei zum Beispiel große Flächen in Indien, der Türkei, China, Brasilien und Australien betroffen sind (Broadley *et al.*, 2007; Cakmak, 2007). Dies hat zur Folge, dass Zinkdefizienz die am meisten verbreitete Mikronährstoffmangelercheinung in Anbaupflanzen ist (White & Broadley, 2009; Assunção *et al.*, 2010). Daraus resultierend wird angenommen, dass etwa 25-33 % der Weltbevölkerung zu wenig Zink über die Nahrung erhalten, während mehr als die Hälfte der Weltbevölkerung unter allgemeiner Unterversorgung durch Spurenelemente, wie beispielsweise Eisen, Fluor oder Iod leidet (Hotz & Brown, 2004; Cakmak, 2007; Gómez-Galera *et al.*, 2009; Mayer *et al.*, 2008). Am meisten sind die Bewohner von Ländern in der Dritten Welt betroffen, wo die Ernährung hauptsächlich auf Getreide basiert (Assunção *et al.*, 2010). Einem Report der WHO zufolge steht Zinkmangel an fünfter Stelle der wichtigsten Faktoren für Gesundheitsschäden in Entwicklungsländern und an elfter Stelle weltweit (WHO, 2010; Palmgren *et al.*, 2008). Insgesamt sterben jährlich 1,4 % der Weltbevölkerung an den Folgen von Zinkmangel (WHO, 2010). Während er in starker Ausprägung eher selten vorkommt, ist leichte Defizienz weltweit verbreitet. Wie bereits erwähnt, ist etwa ein Drittel der Weltbevölkerung betroffen, wobei es in bestimmten Regionen bis zu 75 % der Menschen sind (WHO, 2010). Zinkunterversorgung kann zu gestörtem Wachstum, Fehlfunktionen des Immunsystems, erhöhter Anfälligkeit für Krankheiten und verkürzter Lebenserwartung führen. Des Weiteren können Fehlgeburten und die Ausprägung von Verhaltensstörungen als Folge von Zinkmangel auftreten (Mayer *et al.*, 2008). Eine einfache Möglichkeit, um Zinkdefizienz in Anbaupflanzen entgegenzuwirken, ist die Verwendung von Zinkdüngern. Diese sogenannte "agronomic biofortification" kann in vielen sehr armen Regionen jedoch nicht angewendet werden, da die vorhandene Infrastruktur keine ausreichende Versorgung mit qualitativ ausreichenden Zinkdüngern zulässt (Bouis & Welch, 2010; Assunção *et al.*, 2010). Eine weitere Methode, um den Zinkgehalt der Nahrung zu steigern, ist die Zugabe von Zinkoxid zum Getreidemehl, welches in den meisten Teilen der Erde die Grundlage der Ernährung bildet (Rosado, 2003). Auch hier werden die Anwendungsmöglichkeiten durch Verfügbarkeit und Infrastruktur limitiert. Neben den beiden zuvor erwähnten Ansätzen stellt die Entwicklung von Nutzpflanzen durch Kreuzung bereits bestehender Varietäten eine weitere Möglichkeit dar, die Gehalte an bioverfügbaren Mikroelementen in den erntbaren Pflanzenteilen zu erhöhen. Dabei müssen Konzentrationen erreicht werden, die einen positiven Einfluss auf die menschliche Gesundheit bewirken. Voraussetzung ist hierbei, dass eine ausreichende Variation für einen bestimmten genetischen Faktor vorhanden ist. Für Zink

und Eisen ist es möglich, durch gezieltes Züchten höhere Konzentrationen in den Körnern zu erreichen, da es ausreichend genotypische Unterschiede in den Hauptgetreidesorten gibt (White & Broadley, 2005; White & Broadley, 2009; Ortiz-Monasterio *et al.*, 2007). Dies ist in Bezug auf Zink beispielsweise in wildem Emmerweizen der Fall (Cakmak, 2007). Pflanzenzüchter arbeiten in der Regel mit hunderten oder sogar tausenden von Populationen, um eine ausreichende Zahl an genotypischen Kombinationen zu erhalten (Ribaut & Betrán, 1999; Witcombe & Virk, 2001). Die in molekularbiologischen Analysen erhaltenen Erkenntnisse können für die klassische Pflanzenzüchtung von großem Nutzen sein. In diesem Zusammenhang kann die sogenannte “marker-assisted selection“ (MAS), also die Selektion von Populationen mithilfe von molekularen Markern genannt werden. DNA-Marker, die eng mit agronomisch wichtigen Genen verknüpft sind, können als Hilfswerkzeuge für die Selektion der in der Züchtung verwendeten Populationen benutzt werden (Ribaut & Hoisington, 1998; Collard *et al.*, 2005). Dabei wird die Existenz bzw. Abwesenheit eines Markers für die Auswahl ausgenutzt. Die MAS besitzt eine Reihe von Vorteilen, wie beispielsweise eine große Zeitersparnis im Gegensatz zu aufwendigen Feldversuchen, den Verzicht auf subjektive Phänotypenbewertungen oder die Tatsache, dass die Selektion der Genotypen bereits im Keimlingsstadium stattfindet (Collard *et al.*, 2005).

Ist keine ausreichende genotypische Vielfalt zwischen den verfügbaren Populationen gegeben, um MAS zu betreiben, so stellt die auf gezielten genetischen Modifikationen basierende Nutzpflanzenentwicklung eine zusätzliche, viel versprechende Möglichkeit in Bezug auf Biofortifikation von Grundnahrungsmitteln dar (Mayer *et al.*, 2008). Es existieren bereits Beispiele, bei denen sich die Veränderung bestimmter Gene positiv auf den Gehalt an Mikronährstoffen in der Pflanze auswirkte. In diesem Kontext können beispielsweise die Experimente von Lee und Mitarbeitern mit transgenen Reispflanzen genannt werden (Lee *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011). Auch die Identifikation der QTL-Region *Gpc-B1* (*Grain Protein Content B1*), die mit erhöhten Gehalten an Protein, Zink und Eisen im Getreidekorn assoziiert ist (Uauy *et al.*, 2006), zeigt das große Potential genetischer Modifikationen in Bezug auf die Biofortifikation von Nutzpflanzen auf. Wie bereits erwähnt, brauchen Pflanzen ein streng reguliertes System, um die Aufnahme und Verteilung von Mikronährstoffen zu steuern. Toxische Schwermetalle, wie zum Beispiel Cadmium, können über die Aufnahmemechanismen essentieller Elemente, wie Zink, in den Organismus gelangen und dort durch den auf die Mikronährstoffe ausgelegten Metallhaushalt weiter verteilt werden (Clemens, 2006). Diese unspezifische Aufnahme von Schwermetallen über die Nahrung kann schwerwiegende Folgen für die menschliche Gesundheit haben (Ow, 1996). Die Vermeidung

derartiger, nicht selektiver Anreicherungen in den erntbaren Pflanzenteilen stellt neben der Konzentrationserhöhung von essentiellen Mineralstoffen die größte Herausforderung der Biofortifikation dar (Palmgren *et al.*, 2008). So besteht ein sehr großes Problem bei der Verbesserung des pflanzlichen Zinkgehaltes darin, dass sich Cadmium von seinen chemischen Eigenschaften her sehr ähnlich verhält und schon in geringen Konzentrationen für alle Organismen toxisch wirkt (Martelli *et al.*, 2006; Bertin & Averbeck, 2006). Wie auch Zink wird Cadmium von Pflanzenwurzeln aufgenommen und hat eine weitaus höhere Bioverfügbarkeit als andere toxische Schwermetalle (Intawongse & Dean, 2006; Reeves & Chaney, 2008; Palmgren *et al.*, 2008). In Abschnitt 1.1. wurde bereits die schädigende Wirkungsweise von giftigen Elementen, wie Cadmium, Blei und Quecksilber, angesprochen, die alle eine hohe Reaktivität mit den Schwefel- und Stickstoffatomen von Aminosäuren gemeinsam haben (Clemens, 2001).

Neben der Biofortifikation besitzen auch Phytoremediationsanwendungen großes Potential und sollen im nächsten Abschnitt näher betrachtet werden.

#### **1.4. Phytoremediation**

Ein großer Teil der landwirtschaftlich genutzten Böden weltweit besitzt leichte Schwermetallkontaminationen, wobei viele Regionen aufgrund zu starker Belastung überhaupt nicht für die agrarische Nutzung in Frage kommen. Häufig treten toxische Metalle wie Arsen, Cadmium, Blei oder Quecksilber in erhöhten Konzentrationen auf (Krämer & Chardonens, 2001), doch auch essentielle Mikroelemente wie Zink können in diesem Kontext ein Problem darstellen. Somit schränkt sowohl Zinkdefizienz an vielen Standorten als auch Zinktoxizität in anderen Regionen die Möglichkeit zum Anbau von Nutzpflanzen ein und tritt insbesondere in Böden auf, die durch Erzbergbau und Metallschmelzen kontaminiert wurden. Zusätzlich existieren agrarische Anbauflächen, die durch Behandlung mit Klärschlamm und andere anthropogene Einwirkungen belastet wurden (Robson, 1993; Broadley *et al.*, 2007). Um diese kontaminierten Flächen zu entgiften bzw. für die Landwirtschaft nutzbar zu machen, gibt es verschiedene Strategien, die unter dem Überbegriff Phytoremediation zusammengefasst werden. Darunter versteht man die Entfernung oder Entgiftung von Kontaminationen der Umwelt unter Verwendung von Pflanzen (Cunningham & Berti, 1993).

Phytoremediation wird im Allgemeinen in sechs Methoden unterteilt (Raskin *et al.*, 1997; Salt *et al.*, 1998):

- Phytoextraktion: Entfernung von Metallen oder organischen Substanzen mittels erntbarer, schadstoffakkumulierender Pflanzen
- Phytodegradierung: Verwendung von Pflanzen und assoziierten Mikroorganismen, um organische Kontaminationen abzubauen
- Rhizofiltration: Einsatz von Pflanzen, deren Wurzeln Schadstoffe absorbieren und adsorbieren
- Phytostabilisierung: Reduzierung der Bioverfügbarkeit von Kontaminanten in der Umwelt mittels Pflanzen
- Phytovolatilisation: Verwendung von Pflanzen, um Schadstoffe zu verflüchtigen
- Schadstoffentfernung aus der Luft durch Pflanzen

Ursprünglich kam der Gedanke, Pflanzen für die Entfernung von Kontaminanten aus dem Boden einzusetzen, bei der bereits erwähnten Entdeckung der Metallhyperakkumulierer (Baker & Brooks, 1989; Raskin *et al.*, 1997). Chaney wurde bereits 1983 von dem Phänomen der Hyperakkumulation dazu inspiriert, das Konzept der Phytoextraktion zu formulieren (Chaney, 1983). Sie findet in Forschung und Praxis Anwendung und kann über zwei Strategien erfolgen, welche als induzierte und kontinuierliche Phytoextraktion bezeichnet werden (Salt *et al.*, 1998).

Bei der induzierten Phytoextraktion werden chelatierende Substanzen eingesetzt, um natürlicherweise nicht-hyperakkumulierenden Pflanzen die Aufnahme von Schwermetallen zu erleichtern. So wird der Erde beispielsweise die Chemikalie EDTA beigemischt, sobald die darauf wachsenden Pflanzen ausreichend Biomasse gebildet haben. Die durch das EDTA komplexierten Metallionen sind für die Pflanzen dann besser verfügbar (Salt *et al.*, 1998).

Bei der kontinuierlichen Phytoextraktion werden Hyperakkumulierer eingesetzt, die auch unter natürlichen Bedingungen auf metallkontaminierten Böden wachsen können. Die wesentlichen Vorteile dieser Methode liegen darin, dass dem Boden keine zusätzlichen Chemikalien beigemischt werden müssen und dass die Pflanzen vom Zeitpunkt der Einpflanzung an der Erde Metallionen entziehen und in ihrem Blattgewebe akkumulieren (Salt *et al.*, 1998). Pflanzen können in diesem Zusammenhang mit solargetriebenen Pumpen verglichen werden, die bestimmte Elemente aus ihrer Umwelt extrahieren und konzentrieren können (Salt *et al.*, 1995). Es existieren bereits mehrere Feldversuche zur kontinuierlichen Phytoextraktion von Metallen. Mit *N. caerulea* und *Silene vulgaris* wurde die Entgiftung

von Cd bzw. Zn getestet (Brown *et al.*, 1995). Mit *Brassica oleracea*, *Raphanus sativus*, *N. caerulescens*, *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum murale* und *A. thaliana* wurde die Entgiftung von Zn, Cd, Ni, Cu, Pb und Cr untersucht (Baker *et al.*, 1991; Broadhurst *et al.*, 2004).

Ein vielversprechender Kandidat im Hinblick auf Bodensanierung ist auch *Pteris vittata*. Dieser arsenhyperakkumulierende Farn, der ebenfalls bereits in Phytoextraktionsexperimenten getestet wurde, speichert As bis zu Konzentrationen von 22630 µg/g in den Wedeln (Ma *et al.*, 2001). Dass diese Pflanze verhältnismäßig viel Biomasse produziert und schnell wächst, macht sie ebenso interessant für die Forschung, wie die schnelle Aufnahme und Speicherung des Arsens in den Wedeln. *P. vittata* Pflanzen, die auf arsenkontaminierter Erde kultiviert wurden, konnten ihren Arsengehalt 126-fach erhöhen (Ma *et al.*, 2001).

Nach dem Einsatz von Hyperakkumulierern auf kontaminierten Böden stellt sich die Frage der Entsorgung bzw. Weiterverarbeitung des metallhaltigen Gewebes. Eine Möglichkeit ist das Abernten der Pflanzen und die anschließende Verbrennung bzw. Kompostierung des Materials. In speziellen Fällen kann auch eine Rückgewinnung der Metalle aus der Biomasse angestrebt werden (Salt *et al.*, 1998). Die Idee, Metallakkumulierer in mineral- oder erzhaltige Böden zu pflanzen, um anschließend durch das Verbrennen der Biomasse die aus dem Boden extrahierten Metalle zu gewinnen, wurde schon häufig diskutiert (Brooks *et al.*, 1998). Dieses sogenannte „Phytomining“ eröffnet die Möglichkeit, ansonsten nur schwer zugängliche Erzvorkommen zu erschließen, wobei der negative Einfluss auf die Umwelt im Vergleich zum herkömmlichen Erzbergbau und der damit verbundenen Erosion nur sehr gering einzuschätzen ist (Brooks *et al.*, 1998). Die perfekte Pflanze für Phytoremediationsanwendungen besitzt folgende Eigenschaften (nach Garbisu & Alkorta, 2001):

- Toleranz gegenüber hohen Metallgehalten
- Akkumulation hoher Gehalte an Metallen im erntbaren Gewebe
- Schnelle Wachstumsrate
- Potential hoher Biomasseproduktion unter natürlichen Bedingungen
- Stark ausgeprägtes Wurzelsystem

Betrachtet man die vorher aufgelisteten Merkmale, so haben Bäume großes Potential, erfolgreich in der Phytoremediation eingesetzt zu werden. Verglichen mit herkömmlichen Hyperakkumulierern besitzen sie eine sehr hohe Biomasse und ein massives Wurzelwerk, das mehrere Meter ins Erdreich eindringen kann (Stomp *et al.*, 1994). Neben diesen beiden

Aspekten sind im Wesentlichen die niedrigen Wachstumsraten und die fehlenden Technologien, um geeignete Pflanzenarten im großen Maßstab kultivieren zu können, die limitierenden Faktoren der Phytoextraktion (Salt *et al.*, 1995). Mit bekannten Hyperakkumulierern würde die Engiftung stark kontaminierter Böden Jahrzehnte beanspruchen (Rascio & Navari-Izzo, 2011). Zum Beispiel wären mit *N. caerulescens* 18 Anbauzyklen nötig, um die Zinkkonzentration im Boden von 500 auf 300 mg Zn / kg Erde zu senken (Zhao *et al.*, 2003) und es würde gar 28 Jahre dauern, um mit dieser Pflanze 2100 mg Zn / kg aus der Erde zu entfernen (Brown *et al.*, 1994). Wie aus diesen Rechenbeispielen deutlich wird, ist die Phytoremediation noch weit von der Anwendung auf stark kontaminierten Böden entfernt. Die bereits getesteten Versuchsansätze sind bestenfalls auf schwach belasteten Böden aussichtsreich, was sich beispielsweise in Feldversuchen mit *P. vittata* gezeigt hat. Immerhin konnten hier 26 % des ursprünglichen Arsengehalts eines leicht kontaminierten Bodens entfernt werden (Ma *et al.*, 2001). Die angesprochene gentechnische Veränderung von Bäumen bringt auch schwerwiegende Probleme, wie deren lange Generationszeiten mit sich. Deshalb würde es sich lohnen, für erste Anwendungsexperimente, transgene Getreidesorten herzustellen, deren Biomasseproduktion um einiges größer ist, als die von natürlichen Hyperakkumulierern (Ow, 1996). Eine Tatsache, die bei der Planung von Phytoremediationsexperimenten immer bedacht werden muss, ist, dass die Effizienz nicht nur von der Biomasseproduktion, sondern auch von dem sogenannten Biokonzentrationsfaktor des Metalls abhängt. Je höher dieser Wert ist, desto effizienter ist die Entfernung der Metalle aus dem Boden, wobei er bei Zink und Cadmium logarithmisch linear mit der Metallkonzentration im Boden sinkt (Zhao *et al.*, 2003).

### **1.5. *Arabidopsis halleri***

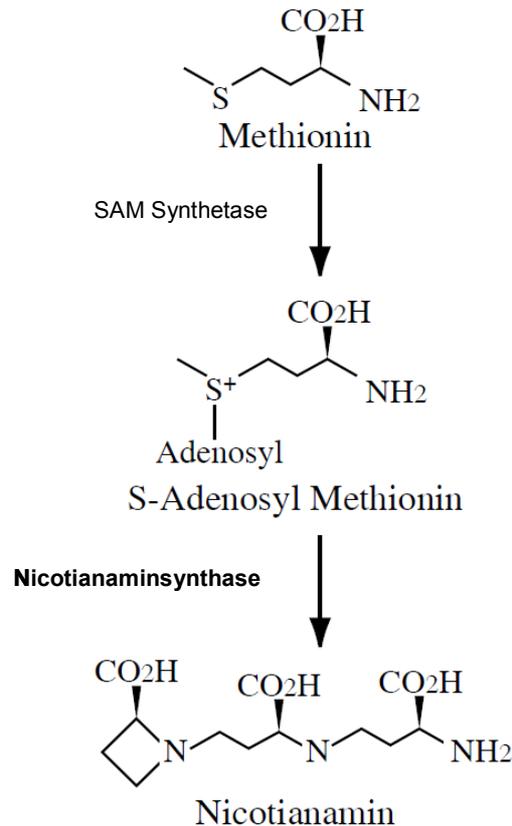
*Arabidopsis halleri* (L.) O'Kane and Al-Shehbaz ssp. *halleri* ist ein fakultativer Metallophyt, der in seinem Blattgewebe Zink und Cadmium hyperakkumuliert (Zhao *et al.*, 2000) und hypertolerant gegenüber diesen Schwermetallen ist (Macnair *et al.*, 1999). *A. halleri* und der Nicht-Hyperakkumulierer *A. thaliana* sind in ihren codierenden Nukleotidsequenzen zu etwa 94 % identisch (Talke *et al.*, 2006; Becher *et al.*, 2004). Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl auf zinkkontaminierten als auch auf unbelasteten Böden gewachsene *A. halleri* Pflanzen konstitutive Zinkhypertoleranz besitzen (Pauwels *et al.*, 2006). Dies unterstützt die Hypothese, dass Zinktoleranz nur einmal, möglicherweise früh nach der Entstehung dieser Spezies, entstanden ist (Pauwels *et al.*, 2008; Roosens *et al.*, 2008). *Arabidopsis lyrata* ist eine sehr nah mit *A. halleri* verwandte Pflanzenart, die jedoch nicht in der Lage ist, Schwermetalle

zu hyperakkumulieren und auch nicht schwermetallhypertolerant ist. Das Genom von *A. lyrata* ist bereits komplett sequenziert und publiziert (Hu *et al.*, 2011). Diese Tatsache vereinfacht auch die Arbeit mit *A. halleri* als Modellpflanze für Zn-Hyperakkumulation. Durch die hohe Ähnlichkeit der Genome können beispielsweise Primergenerierung oder Alignments mit Hilfe der *A. lyrata* Sequenz durchgeführt werden. Die Analyse von Kreuzungen zwischen *A. halleri* und *A. lyrata* ssp. *petraea* führte zur Identifikation von Hyperakkumulations-QTL Regionen, in denen viele Kandidatengene liegen, die für die Zn- und Cd-Hyperakkumulation sowie für die Toleranz gegenüber diesen Metallen wichtig sein könnten (Willems *et al.*, 2010).

Eine der wichtigsten Grundlagen dieser Arbeit waren vergleichende Microarrayexperimente, in denen Wurzelmaterial von *A. thaliana* und *A. halleri* hinsichtlich der Unterschiede in der Genexpression untersucht wurde (Weber *et al.*, 2004). Dabei konnten über 150 Gene identifiziert werden, die unter Kontrollbedingungen in *A. halleri* im Vergleich zu *A. thaliana* um mindestens den Faktor 5 höher exprimiert waren. Aus diesen Experimenten ging eine Liste von Kandidatengen hervor, die eine potentielle Rolle in der Zinkhyperakkumulation spielen. Auf einige der am stärksten exprimierten Gene wird nachfolgend näher eingegangen, wobei jedoch das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit auf der, die Liste anführenden, *Nicotianaminsynthase2* (*AhNAS2*) liegt. Diese war in *A. halleri* um Faktor 73 höher exprimiert und stellt somit einen der besten Kandidaten für eine wichtige Rolle in der Zinkhyperakkumulation dar (Weber *et al.*, 2004).

## 1.6. Nicotianaminsynthase

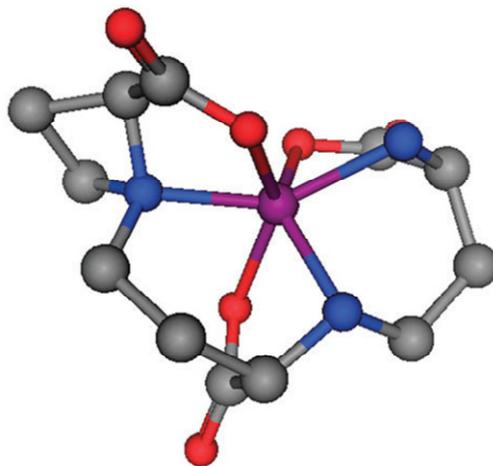
In *Arabidopsis thaliana* existieren vier Isoformen der *Nicotianaminsynthase*, wobei diese Unterschiede in der Expression aufweisen. Transkripte der Isoformen *NAS1* und *NAS4* können sowohl in Blättern als auch in Wurzeln nachgewiesen werden. *NAS2* hingegen wird nur in Wurzeln, *NAS3* überwiegend in Blättern exprimiert (Klatte *et al.*, 2009). In allen höheren Pflanzen katalysiert *NAS* die Bildung der nicht-proteinogenen Aminosäure Nicotianamin (NA) durch die Kondensation von drei Molekülen S-Adenosyl-Methionin (SAM) (von Wiren *et al.*, 1999). Das Reaktionsschema des Enzyms ist in Abbildung 2 dargestellt (Inoue *et al.*, 2003).



**Abbildung 2:** Schema der Nicotianaminsynthese. Dargestellt ist die durch das Enzym Nicotianaminsynthase (NAS) katalysierte Kondensation von drei Molekülen S-Adenosyl-Methionin (SAM) (modifiziert nach Inoue *et al.*, 2003).

Zuerst wurde NA in Tabak entdeckt (Noma *et al.*, 1971) und konnte bisher in allen untersuchten Pflanzen nachgewiesen werden (Noma & Noguchi, 1976; Rudolph *et al.*, 1985). In Gräsern ist es eine Vorstufe der Mugininsäure (Shojima *et al.*, 1990), die zu den sogenannten Phytosiderophoren gehört. Diese Chelatoren werden von den Wurzeln zur Fe(II)- und Fe(III)-Komplexierung sekretiert (Takagi, 1976). Unter anderem konnte gezeigt werden, dass Phytosiderophore als Antwort auf Eisen- (Higuchi *et al.*, 1994; Higuchi *et al.*, 1996a; Kanazawa *et al.*, 1994; Higuchi *et al.*, 1996b) aber möglicherweise auch auf Zinkdefizienz (Cakmak *et al.*, 1996a; Cakmak *et al.*, 1996b) synthetisiert werden. Dikotyle Pflanzen hingegen sind nicht in der Lage aus dem gebildeten NA Mugininsäure zu synthetisieren (Kim *et al.*, 2005). Die Tomatenmutante *Chloronerva* trägt einen Basenaustausch im einzigen *NAS*-Gen und kann dadurch kein NA bilden. Dies hat starke Chlorosen zwischen den Blattadern junger Blätter, reduziertes Wachstum und komplette Sterilität zur Folge (Ling *et al.*, 1999; Curie *et al.*, 2009). Die Mutante besitzt jedoch einen höheren Eisengehalt als der Wildtyp und die auf Eisenmangel hindeutenden Symptome können durch künstliche Zugabe von NA rückgängig gemacht werden. Folglich wurde NA eine Schlüsselrolle in der Verfügbarkeit und

Löslichkeit von Eisen zugeschrieben, da das Eisen in Abwesenheit von NA in unlöslichen Phosphatkomplexen vorliegt (Pich & Scholz, 1991; Becker & Manteuffel, 1995). In der Literatur wurde NA bisher hauptsächlich in Verbindung mit dem pflanzlichen Eisenhaushalt erwähnt (Inoue *et al.*, 2003), wobei es auch Komplexe mit Nickel, Zink (Trampczynska *et al.*, 2010), Kupfer, Cobalt und Mangan (Stephan & Scholz, 1993; Stephan *et al.*, 1996) formen kann. Drei Amino- und drei Carboxygruppen innerhalb des NA-Moleküls erlauben die Bildung einer hexagonalen Koordination, die zur Formation eines sehr stabilen Oktaederchelats mit einem zentralen Metallion führt (Blindauer & Schmid, 2010) (Abb. 3).



**Abbildung 3:** Vorgeschlagene chemische Struktur eines Nicotianamin-Zink-Komplexes nach (Blindauer & Schmid, 2010).

Aufgrund der Fähigkeit, Metalle komplexieren zu können, kommt NA auch eine wichtige Rolle in deren Langstreckentransport innerhalb der Pflanze zu (Takahashi *et al.*, 2003). Die Tatsache, dass die nachgewiesenen NA-Metall-Komplexe bei neutralem pH-Wert am stabilsten sind, deutet daraufhin, dass NA eher ein symplastischer Metallchelator ist (Curie *et al.*, 2009). So führte ein reduzierter NA-Gehalt in transgenen Tabakpflanzen zu geringeren Konzentrationen von Eisen, Zink, Kupfer und Mangan in den Blättern, während die Behandlung der Blätter mit einer NA-Lösung in einem Anstieg der Zink- und Kupfergehalte resultierte. Der bereits erwähnte Bezug zwischen NA und Nickel konnte ebenfalls experimentell nachgewiesen werden. In *Arabidopsis thaliana* führte beispielsweise die Überexpression von *HvNAS1* aus Gerste zu erhöhten NA-Konzentrationen und daraus resultierend zu einer größeren Toleranz gegenüber hohen Metallkonzentrationen, im Besonderen gegenüber Nickel (Kim *et al.*, 2005). Bei Nickelüberschuss im Wachstumsmedium wurden die Expressionsstärken der vier bekannten *NAS*-Isoformen in *A. thaliana* bestimmt, wobei die Transkripte aller vier Gene auf 200  $\mu\text{M}$  nickelhaltigem Medium erhöht waren, was auf einen Beitrag von NA zur Nickeltoleranz hindeutet (Kim *et*

*al.*, 2005). Metall-NA-Komplexe sind Substrate der bereits erwähnten Membrantransporter der YSL (yellow-stripe-like)- und möglicherweise anderer Proteinfamilien (Gendre *et al.*, 2006; Talke *et al.*, 2006). Hauptsächlich wurde von diesen Komplexen im Zusammenhang mit dem pflanzlichen Eisentransport berichtet, wobei auch eine Rolle in der Zinkaufnahme diskutiert wird (von Wiren *et al.*, 1996; Schaaf *et al.*, 2005). Untersuchungen von *ysl1ysl3*-Doppelmutanten weisen darauf hin, dass diese Proteine für eine effiziente Zink- und Kupfermobilisierung von den Blättern und Schoten in die Samen sorgen (Waters & Grusak, 2008). Auch dem in Abschnitt 1.1. beschriebenen Protein ZIF1, welches in die Zinksequestrierung in die Wurzelvakuole involviert ist, wird eine Funktion als NA-Transporter vom Cytosol in die Vakuole zugeschrieben (Haydon *et al.*, 2012). Diese Hypothese wird durch Ergebnisse gestützt, die von Experimenten mit *AhNAS3*-überexprimierenden Hefezellen, die *AtZIF1* coexprimierten, stammen. Die heterologe *ZIF1*-Expression führte zu einer erhöhten NA-Akkumulation in den Zellen, wobei ZIF1 in der Vakuolenmembran lokalisiert war (Haydon *et al.*, 2012).

Interessanterweise konnte in Vergleichsstudien nachgewiesen werden, dass die Nicotianaminkonzentrationen in Wurzeln von *A. halleri* höher sind, als in *A. thaliana*, wobei Zink in *A. halleri* hauptsächlich ins Sprossgewebe transportiert wird, während es in *A. thaliana* in den Wurzeln verbleibt (Talke *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2004). Dies deutet auf die wichtige Rolle von NA im interzellulären Zinktransport, auch in Wurzeln, hin (Palmgren *et al.*, 2008).

## 1.7. Zielsetzung dieser Arbeit

Wie bereits erwähnt, konnte in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass *Nicotianaminsynthase2* in den Wurzeln von *Arabidopsis halleri* um ein Vielfaches stärker exprimiert ist, als in *Arabidopsis thaliana* (Weber *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2006). Diese Tatsache macht *NAS2* zu einem wichtigen Kandidatengen für die Zn- bzw. Cd-Hyperakkumulation, wobei es aufgrund der in Hefeexperimenten erhaltenen Ergebnisse auch zu einem Kandidatengen für die Zn-Hypertoleranz wurde (Weber *et al.*, 2004). Die Kernaufgabe der vorliegenden Dissertation war, einen potentiellen Zusammenhang zwischen der in *A. halleri* erhöhten *NAS2*-Expression und der Hyperakkumulation von Zink zu untersuchen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Molekularbiologische Standardmethoden

Polymerasekettenreaktionen (PCR), Agarosegelelektrophoresen, Restriktionsverdauung, Dephosphorylierungen von Vektoren und Ligationen wurden nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook & Russell, 2001).

Die PCR Purifications, Gelextraktionen und Spin Minipreps wurden jeweils mit einem Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System der Firma Promega (Madison, USA) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

#### 2.1.1. gDNA Isolierung

Pflanzenmaterial wurde in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt, in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und anschließend fein gemörsert. Zu dem Pflanzenpulver wurde 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA (pH 8,0), 500 mM NaCl, 1,5 % SDS, 0,5 % β-MercaptoEtOH, H<sub>2</sub>O) zugegeben und der Ansatz für 10 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl einer 5 M Kaliumacetat-Lösung (60 % 5 M Kaliumacetat, 11,5 % Eisessig, pH 4,8) folgte eine Inkubation von mindestens 10 min bis zu einer Stunde, auf Eis. Als nächstes wurde für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorffzentrifuge des Typs 5424 (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert, anschließend der Überstand mit 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI) versetzt und gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min bei Maximalgeschwindigkeit wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70 %igem Ethanol und erneutem Zentrifugieren gewaschen. Zum Schluss wurde das Pellet in 25 µl H<sub>2</sub>O (Millipore) resuspendiert.

#### 2.1.2. Polymerasekettenreaktionen

Alle PCR-Reaktionen wurden in Thermocyclern des Typs MJ Mini Personal Thermal Cycler bzw. iCycler (beide von Bio-Rad, München) durchgeführt.

Pipettierschema: 50 µl – PCR-Ansatz

- 5 µl 10-fach PCR-Reaktionspuffer
- 1 µl 20 mM dNTP-Mix
- 1 µl 20 µM Primer forward
- 1 µl 20 µM Primer reverse
- 40,5 µl H<sub>2</sub>O

- 0,5 µl *Taq*-Polymerase
- 1 µl DNA

#### Verwendetes PCR-Programm

1. Zyklus: 1mal: Stufe 1: 96°C für 3 min
2. Zyklus: 10mal: Stufe 1: 96°C für 30 sec  
Stufe 2: Primer-Annealing für 2 min  
Stufe 3: 72°C (Zeit je nach Ampliconlänge, ca. 1 min pro 1 kb)
3. Zyklus: 30mal: Stufe 1: 96°C für 30 sec  
Stufe 2: Primer-Annealing für 30 sec  
Stufe 3: 72°C (Zeit je nach Ampliconlänge, ca. 1 min pro 1 kb)
4. Zyklus: 1mal: Stufe 1: 72°C für 5 min

### 2.1.3. Klonierungs-PCR

Alle wichtigen Klonierungs-PCRs wurden mit Phusion-Polymerase aus einem Kit der Firma FINNZYMES (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte) angesetzt.

#### Pipettierschema: 50 µl – Ansatz Phusion-PCR

- 10 µl 5-fach Hf-Puffer
- 1 µl 20 mM dNTP-Mix
- 1 µl 20 µM Primer fw.
- 1 µl 20 µM Primer rev.
- 35,5 µl H<sub>2</sub>O
- 0,5 µl Phusion-Polymerase
- 1 µl DNA

#### Verwendetes Programm für Phusion-PCR:

1. Zyklus: 1mal: Stufe 1: 98°C für 4 min
2. Zyklus: 40mal: Stufe 1: 98°C für 30 sec  
Stufe 2: Primer-Annealing für 1:30 min  
Stufe 3: 72°C (Zeit je nach Ampliconlänge, ca. 30 sec pro 1 kb)
3. Zyklus: 1mal: Stufe 1: 72°C für 7 min

#### 2.1.4. DNA-Sequenzierung

Für die Überprüfung von Gensequenzen, entweder aus mit PCR amplifizierter DNA oder aus Plasmidaufreinigungen, wurden die jeweiligen Proben von der Firma LGC Genomics (Berlin) sequenziert und anschließend mit Hilfe der Software GENTle (V 1.9.4) ausgewertet.

#### 2.1.5. Bakterientransformation

Es wurden je 2 µl Ligation zu chemokompetenten DH 10B *Escherichia coli* Zellen gegeben, die Ansätze gut gemischt und für 30 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Proben für eine Minute bei 42°C inkubiert und wieder auf Eis gelegt. Nach Zugabe von je 1ml LB-Medium ohne Antibiotikum folgte eine Inkubation für 1 h bei 37°C in einem mit 180 rpm laufenden Schüttler. Danach wurden die Zellen 5 min lang in einer Eppendorfszentrifuge des Typs 5424 bei 3400 g zentrifugiert und der Überstand steril abgenommen. Das Pellet wurde in 80 µl LB-Medium resuspendiert und die Suspension anschließend auf Agarplatten, die Ampicillin, X-Gal und IPTG enthielten, ausplattiert.

#### 2.1.6. Easyprep (rapid boiling prep)

Eine Easyprep ist eine schnelle Methode zur Aufreinigung von Plasmid-DNA und wurde zur Identifizierung positiver Klone nach einer Ligation, beispielsweise für einen späteren Verdau, angewendet. Wurde mit dem gewünschten Plasmid nach der Aufreinigung weitergearbeitet, so wurde eine Spin-Miniprep mit einem Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System der Firma Promega (Madison, USA) durchgeführt, um reinere DNA als die aus der Easyprep, zu erhalten.

2 ml einer Übernachtskultur von transformierten *E. coli*-Zellen wurden für 30 sec. bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorfszentrifuge des Typs 5424 zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 100 µl Lysispuffer (10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0), 15 % w/v Saccharose, 2 mg/ml Lysozym, 0,2 mg/ml RNase, 0,1 mg/ml BSA) resuspendiert und für 1-2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte eine Inkubation von 1 min bei 100°C mit anschließendem Abkühlen auf Eis für mindestens 5 min. Zum Schluss wurde noch einmal für 10 min bei maximalen rpm zentrifugiert und 5 µl für einen Kontrollverdau eingesetzt. Das Pellet wurde bei -20°C eingefroren.

### 2.1.7. Proteinextraktionsmethoden

#### 2.1.7.1. Proteinextraktion aus *E. coli*

Eine 2 ml Übernachtskultur wurde in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angesetzt und am nächsten Morgen die OD<sub>600</sub> gemessen. Anschließend wurden 2-3 ml frisches LB-Medium auf OD<sub>600</sub> = 0,1 angeimpft und inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 – 0,8 erreicht war. Dann wurde in bestimmten Fällen mit IPTG induziert und erneut für 3 bis 4 Stunden inkubiert. Die Kultur wurde nach der Inkubation bei 3000g und 4°C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µl Leitungswasser resuspendiert und anschließend in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Danach erfolgte erneut eine Zentrifugation bei 3000g und 4°C für 5 min, wobei der Überstand wieder verworfen wurde. Nach Zugabe des Lysispuffers (1% des Ausgangskulturvolumens) wurde der Ansatz für 30 min auf Eis gelagert. Anschließend wurde mit einer Sonde sechsmal für je 10 Sekunden Ultraschall angewendet und die Suspension danach bei 10 000g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand mit der löslichen Proteinfraction wurde nun in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit SDS-Probenpuffer versetzt. Das Pellet mit der unlöslichen Fraktion wurde in 30 µl Lysispuffer resuspendiert, anschließend ebenfalls mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 1 min in einem Wasserbad gekocht und danach auf Eis abgekühlt. Auf das SDS-Gel wurden 5µl lösliches Protein mit 1,2 µl 5-fach SDS-Probenpuffer und 2 µl von der aufgekochten unlöslichen Fraktion aufgetragen.

Rezept für 1 ml Lysispuffer:

- 500 µl 2-fach Stammlösung (4°C)
- 10 µl 1M Imidazol (4°C)
- 5 µl 200 mM PMSF (-20°C)
- 5 µl 1M β-Mercapto (4°C)
- 2 µl 5% Lysozym (-20°C)
- 10 µl 1% DNase (-20°C)
- 10 µl 1% RNase (-20°C)
- ad 1 ml H<sub>2</sub>O

#### 2.1.7.2. Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial von *A. halleri*

100 mg gefrorenes homogenisiertes Pflanzenmaterial wurde mit 100 µl Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,0), 1 mM EDTA, 0,2 % (v/v) Triton X-100, 1-fach Inhibitor-Cocktail) versetzt und unter mehrmaligem Mischen auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde die Suspension 15 min auf Eis inkubiert und danach für 15 min bei 4°C und maximaler

Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### **2.1.8. Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmungen wurden mit einem BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit der Firma Pierce (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) den Herstellerangaben folgend durchgeführt.

### **2.1.9. SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

SDS-PAGE wurde für die Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts durchgeführt. Sie setzt sich aus einem 5 %-igen Sammelgel (30 % Acrylamid, 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 10 % SDS, 10 % APS, TEMED) und einem 15 %-igen Trenngel (30 % Acrylamid, 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 10 % SDS, 10 % APS, TEMED) zusammen. Die Proben wurden mit 5-fach SDS-Probenpuffer (100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 200 mM DTT, 20 % (v/v) Glycerin, 4 % (w/v) SDS) versetzt, für 20 sec im Wasserbad aufgeköcht und anschließend sofort auf Eis gelagert. Es wurden jeweils 10 µg Protein (versetzt mit SDS-Probenpuffer) sowie 5 µl PageRuler<sup>TM</sup> Protein Ladder (10-200 kDa, Fermentas GmbH, St. Leon Rot) aufgetragen. Für die Aufkonzentrierung der Proteinproben wurden 10 mA pro Sammelgel und für die anschließende Auftrennung im Trenngel 20 mA pro Trenngel angewendet.

### **2.1.10. Western Blot**

Mit einem Western Blot wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman Protran, GE Healthcare, München) nach dem Semi-Dry-Verfahren übertragen. Vier Lagen Filterpapier und eine Nitrocellulosemembran wurden für mehrere Minuten in Transferpuffer (50 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol, 40 mM Glycin) inkubiert. Das Blotting der Proteine erfolgte für 1 h bei 0,8 mA / cm<sup>2</sup> Membran. Nach dem Blotting wurde die Nitrocellulosemembran für 1 h in 5 ml Blockierlösung (10% Milchpulver in TBS-T (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 0,05 % Tween20, 0,2 % Triton X-100)) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran in primärer Antikörper-Lösung (anti-His, 1:3000 Verdünnung in Blockierlösung) bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde dreimal für jeweils 5 min in 20 ml TBS-T gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran für 1 h in sekundärer Antikörper-Lösung (anti-mouse IgG, 1:10000 Verdünnung in Blockierlösung). Danach wurde die Membran erneut viermal für je 5 min in 20 ml TBS-T gewaschen. Die Detektion der Proteine mit Hilfe der Chemilumineszenz erfolgte mit 1 ml ECL-Reagenz. Die Membran inkubierte für 5 min bei 37°C. Anschließend

wurde die Chemilumineszenz-Detektion durchgeführt (Chemiluminescence Imager, INTAS, Göttingen).

#### **2.1.11. Amido Black-Färbung**

Für den Nachweis, dass die Proteinproben erfolgreich geblottet wurden, wurde eine Amido Black-Färbung der Membran durchgeführt. Nach Detektion der Proteine mit Chemilumineszenz (Abschnitt 2.1.10.) wurde die Membran zweimal für je 5 min in Millipore-H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation in 25 ml Amido Black-Färbelösung für 20 min. Danach wurde die Membran mit Millipore-H<sub>2</sub>O entfärbt.

Rezept für 500 ml Amido Black-Färbelösung:

- 200 ml Methanol
- 50 ml Essigsäure
- 0,5 ml (w/v) Amido Black (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- ad 500 ml H<sub>2</sub>O

#### **2.1.12. Coomassie-Färbung**

Um zu überprüfen, ob alle Proteinproben gleichmäßig auf das SDS-Gel geladen wurden, wurde eine Coomassie-Färbung durchgeführt. Hierfür wurde das Gel für 20 min in Coomassie-Färbelösung (PageBlue<sup>TM</sup> Protein Staining Solution, Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte) gelegt. Zum Entfärben wurde das SDS-Gel anschließend über Nacht in Millipore-H<sub>2</sub>O inkubiert.

## **2.2. Pflanzenmaterial, -kultivierung und Transformationen**

### **2.2.1. Behandlung der für die Pflanzenanzucht verwendeten Erde**

Es wurde Einheitspflanzenerde des Typs GS90 grob® (Einheitserde Werkverband, Sinnatal-Jossa), Pikiererde (Ökohum, Herbertingen) und Vermiculit (Deutsche Vermiculite Dämmstoff GmbH, Sprockhoevel) in einem Verhältnis von 3:3:1 gemischt und für ca. 1,5 Stunden in einem Sterilo 1 K bei 80°C pasteurisiert.

### **2.2.2. Kultivierung der für die Experimente verwendeten *Arabidopsis* Pflanzen**

Verschiedene Individuen von *A. halleri* (L.) O’Kane and Al-Shehbaz subsp. *halleri* wurden im Feld gesammelt und ins Labor transferiert. Die Pflanzen wurden mittels Stecklingbildung vegetativ vermehrt und in Phytokammern in Erde angezogen.

Für Transkript- und Nicotianaminanalysen sowie für die Erstellung eines Metallverteilungsprofils wurden *Arabidopsis halleri* subsp. *halleri*, *Arabidopsis halleri* (L.) subsp. *gemmifera*, und *A. thaliana* (L.) Heynhold (Ökotyp Columbia) Pflanzen hydroponisch in einem modifizierten 1/10 Hoaglandmedium (0,0871 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,4 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 0,6 mM  $\text{KNO}_3$ , 0,2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 5  $\mu\text{M}$  eines Fe(III)-Komplexes und *N,N'*-di-(2-hydroxybenzoyl)-ethylenediamin-*N,N'*-diacetat (HBED, ABCR Dr. Braunagel GmbH & Co. KG, Karlsruhe), 4,63  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,032  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 0,915  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 0,077  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,011  $\mu\text{M}$   $\text{MO}_3$ ) mit oder ohne zusätzliches  $\text{Zn}^{2+}$  für drei Wochen kultiviert.

Des Weiteren wurden *A. halleri* subsp. *halleri* Pflanzen auf unbehandelter Erde aus dem Harz angezogen und ein Elementprofil des Sprossmaterials angefertigt.

### 2.2.3. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Eine chemokompetente GV3101 *Agrobacterium tumefaciens* Kultur wurde in 5 ml LB-Medium, welches Rifampicin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und Gentamycin (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) enthielt, bei 28°C über Nacht bei leichtem Schütteln inkubiert. Nach zwei Tagen wurden 50 ml YEP-Medium in einem 250 ml – Erlenmeyerkolben mit 2 ml der Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln solange inkubiert, bis eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 – 1,0 erreicht war. Jetzt wurde die Kultur auf Eis abgekühlt und für 5 min in einer Eppendorffzentrifuge des Typs 5415 R bei 3000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml  $\text{CaCl}_2$  (20 mM) resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 100  $\mu\text{l}$  in ein gekühltes Reaktionsgefäß überführt, ehe 1  $\mu\text{g}$  DNA zugegeben wurde und das Eppendorffgefäß für 5 min in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde. Nach einer Inkubation von 5 min bei 37°C wurde den Zellen 1 ml LB-Medium zugegeben und der Ansatz für 2 bis 4 Stunden bei 28°C in einem Schüttler inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 2350 g für 10 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet 100  $\mu\text{l}$  LB-Medium resuspendiert und ausplattiert. Auf einer Kontrollplatte wurden Zellen, denen keine DNA zugegeben worden war, ausgestrichen. Nach ca. 2 Tagen Inkubation bei 28°C waren kleine *Agrobacterium tumefaciens*-Kolonien zu sehen.

#### 2.2.3.1. Testen der Transformanten

Es wurden eine *Agrobacterium tumefaciens* – Übernachtskultur und eine Wasserkontrolle ohne Bakterien in LB-Medium, das Rifampicin, Gentamycin und Kanamycin enthielt, bei 28°C angezogen. Je 1 ml der Kulturen wurde für 3 min bei 3400 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen mit 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und erneut zentrifugiert. Wieder

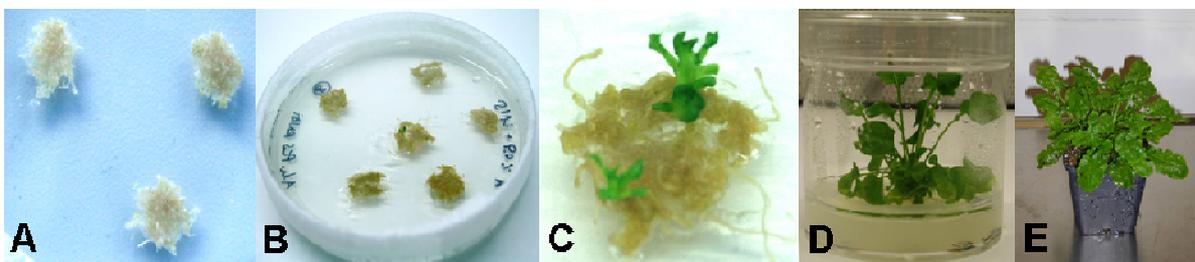
wurde der Überstand verworfen und nach Zugabe von 200 µl H<sub>2</sub>O wurden die Zellen resuspendiert und für 5 min bei 95°C inkubiert. Nach einer letzten Zentrifugation wurden 2 µl des Überstandes in die Test-PCR eingesetzt.

#### 2.2.4. Transformation von *Arabidopsis halleri*

Für die Generierung des *AhNAS2* RNAi-Konstruktes wurde ein 392 Basenpaare langes Fragment der *AhNAS2* cDNA mittels PCR amplifiziert. Dafür wurden die folgenden Primer verwendet: RNAi-fw (5'-TTGGCCAAGTTCCATCTTCC-3') und RNAi-rev (5'-caccGCGATGACCACCGAATTAACC-3'). Das Fragment wurde in den Vektor pENTR/D-Topo (Life Technologies GmbH, Darmstadt) kloniert und mittels eines Gateway® LR Clonase® Enzymmixes (Life Technologies GmbH, Darmstadt) in das Plasmid pHELLSGATE 8 subkloniert. Für die stabile Transformation wurde das Konstrukt in *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) transformiert und anschließend *A. halleri* subsp. *halleri* (accession Langelsheim) Pflanzen mittels einer auf Gewebekultur basierenden Technik transformiert (Hanikenne *et al.*, 2008).

Steriles Wurzelmaterial wurde in 2-3 cm lange Stücke geschnitten und für 7-8 Tage auf Kallusinduktionsmedium (CIM) inkubiert (Abb. 4 A). Anschließend wurden die Wurzeln in eine *Agrobacterium tumefaciens* Suspension getaucht und für 2-3 Tage co-kultiviert (Abb. 4 B). Danach wurden die Wurzelkalli auf kanamycinhaltiges Sprossinduktionsmedium (SIM) überführt, um transgene Zellen zu selektieren (Abb. 4 C). Dabei wurde die Antibiotikakonzentration im Medium schrittweise erhöht, wobei sie in der ersten Woche 25 µg/ml und in der zweiten Woche 50 µg/ml betrug.

Nach der Induktion des Wurzelwachstums, ebenfalls auf speziellem Medium (RIM; Abb. 4 D), wurden die transgenen Pflanzen in Erde gebracht (Abb. 4 E).



**Abbildung 4:** Einzelne Schritte der auf Gewebekultur basierenden, stabilen Transformation von *A. halleri*.

In Tabelle 2 sind die Zusammensetzungen der, für die Transformation verwendeten, Wachstumsmedien aufgeführt.

**Tabelle 2:** Zusammensetzungen der für die Transformation von *A. halleri* verwendeten Wachstumsmedien; MS (Murashige & Skoog), CIM (Callus induction medium), SIM (Shoot induction medium), RIM (Root induction medium)

Medium	Zusammensetzung
MS	4,4 g/l MS-Pulver; 0,05 % MES; 2 % Saccharose; pH 5,7-5,8 (mit KOH einstellen); 0,7-0,8 % Agar
CIM	MS; 1 mg/l 2,4-D; 0,5 mg/l Kinetin
SIM	MS; 1 mg/l BAP; 0,5 mg/l NAA; 300 mg/l Cefotaxim (nach 1-2 Wochen plus 25 mg/l Kanamycin; nach 2-3 Wochen plus 50 mg/l Kanamycin
RIM	MS; 1 mg/l IAA; 300 mg/l Cefotaxim; 50 mg/l Kanamycin

### 2.2.5. Transformation von *A. thaliana* (Floral Dip)

Die Transformation der *A. thaliana* Pflanzen wurde mit der Floral Dip-Methode durchgeführt (Clough & Bent, 1998). Um die Transformanten zu selektieren, wurden die von den behandelten Pflanzen erhaltenen Samen entweder auf Erde gebracht oder auf hygromycinhaltigen 0,5 MS-Agarplatten ausgelegt. Die Keimlinge in Erde wurden im Vier-Keimblattstadium mit dem Herbizid BASTA (Glufosinat-Ammonium 18 %) besprüht, da der für die Transformation verwendete Vektor über eine BASTA-Resistenz verfügte. Pflanzen, die die BASTA-Behandlung überlebten, wurden in Erde transferiert. Für die Anwendung wurde eine 1:2500 verdünnte BASTA-Lösung (200 mg/ml) verwendet. Auf den Hygromycinplatten (25 µg/ml) wurden ebenfalls die überlebenden Pflanzen selektiert und anschließend in Erde eingepflanzt.

Rezept für 0,5 MS<sub>Hygromycin</sub>-Agarplatten:

- 0,22 % MS-Pulver
- 0,05 % MES
- 0,5 % Saccharose
- 1 % Agar
- pH 5,7
- 25 µg/ml Hygromycin

### 2.3. Transkriptanalyse mit realtime PCR

Für die Quantifizierung der Transkriptmenge mittels realtime PCR und für die Durchführung der Microarray-Analysen wurde mit der Trizol-Methode (Life Technologies GmbH,

Darmstadt) nach Herstellerangaben RNA aus homogenisiertem *A. halleri* Blatt- bzw. Wurzelmaterial extrahiert.

Das Pflanzengewebe wurde unter Zugabe von flüssigem Stickstoff fein gemörsert und ca. 200 mg Pulver mit 1000 µl Trizol-Reagenz versetzt. Anschließend wurden die Proben 5 min lang gevortext, dann mindestens weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut für 2 min gevortext. Als nächstes wurden die Proben mit 200 µl Chloroform versetzt, zum Mischen für 30 sec kräftig geschüttelt und wieder für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 13500 g in einer Eppendorf-Kühlzentrifuge des Typs 5415 R trennte den Inhalt der Reaktionsgefäße in zwei Phasen, wobei die wässrige obere vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt wurde. Für die darauf folgende Fällung wurden 500 µl Isopropanol zugegeben. Durch mehrmaliges Invertieren der Gefäße wurden die Phasen gemischt, dann bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert, ehe die Proben für 10 min bei 4°C und 13500 g zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen und das Pellet mit 1000 µl 70 % EtOH gewaschen und für 5 min zentrifugiert. Nachdem das Pellet an der Luft getrocknet war, wurde die RNA in Millipore-H<sub>2</sub>O gelöst und für 5 min bei 50°C inkubiert. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80°C. Die RNA Proben wurden nach der Extraktion mit einem Nanophotometer vermessen und anschließend mit einem RNA-Gel auf potentielle Degradierungen überprüft. Für die cDNA-Synthese mit einem Invitrogen SuperScript II kit (Life Technologies GmbH, Darmstadt) wurde 1 µg DNaseI-behandelte RNA eingesetzt. Die realtime PCR-Reaktionen wurden in 96-well Platten in einem Bio-Rad iCycler mit einem MyiQ realtime PCR Detektionssystem (Bio-Rad, München) durchgeführt. Um die cDNA-Amplifikation zu quantifizieren wurde SYBR Green (Eurogentec, Köln) verwendet. Ein PCR-Ansatz enthielt 10 µl SYBR Green-Mix, 5 µl 1:50 verdünnte cDNA und 5 pmol forward- und reverse-Primer in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Das Standardprogramm des Thermocyclers war wie nachfolgend beschrieben: 95°C für 8 min, danach 40 Zyklen 95°C für 10 Sekunden und 60°C für 1 min. Die erhaltenen Daten wurden mit der iQ5 Optical System Software Version 2.0 (Bio-Rad, München) analysiert und die relativen Transkriptwerte mittels Berechnung des Unterschieds zwischen dem C<sub>T</sub>-Wert des Zielgens und dem C<sub>T</sub>-Wert des Referenzgens *EF1α*. Die Formel für die Berechnung des relativen Transkriptwertes lautet  $1000 * 2^{-\Delta C_T}$ . Die mittleren C<sub>T</sub>-Werte für *EF1α* von allen analysierten Blattproben hatte eine Variation von weniger als 5,98 % ( $\pm 1,37$  Amplifikationszyklen) bei einer Stichprobenzahl von 18. Die mittleren C<sub>T</sub>-Werte für *EF1α* von allen analysierten Wurzelproben hatte eine Variation von weniger als 8,44 % ( $\pm 1,61$  Amplifikationszyklen) bei einer Stichprobenzahl

von 21. Die realtime PCR-Primer wurden mit der Software Primer3 (Rozen & Skaletsky, 1999) generiert und sowohl Primer als auch deren Amplicons mit dem Programm mfold (Zuker, 2003) auf die Ausbildung potenzieller Sekundärstrukturen überprüft.

Bevor die *AhNAS2* Transkriptanalyse von Individuen verschiedener *A. halleri* Populationen durchgeführt wurde, wurde die intronlose genomische *AhNAS2* Sequenz amplifiziert, sequenziert und auf Polymorphismen in den Primerbindungsstellen überprüft. Es wurden folgende Primer für die realtime PCR verwendet:

**Tabelle 3:** Verwendete realtime PCR Primer für *A. halleri*.

Gen	forward-Primer (5'-3')	reverse-Primer (5'-3')
<i>EF1<math>\alpha</math></i>	TGAGCACGCTCTTCTTGCTTTCA	GGTGGTGGCATCCATCTTGTTACA
<i>AhNAS1</i>	TGATCTTCCACACAACGGACGTAC	AACGACGTCATATTGGTCAAGGC
<i>AhNAS2</i>	ACAACTGATGTGTAAACGCTAAG	GCTTTGACCTTTGACTCTTTATCC
<i>AhNAS3</i>	TCTGATCCAGACATCTCTCAACGG	TCTGTCACGTCCATTATATCAACGG
<i>AhNAS4</i>	TGGACCTAGAGCGTTTCTCTATCCC	ACCGATAAAACTTGGAAACCTTGG
<i>AhIRT1</i>	CCCCGCAAATGATGTTACCTT	GGTATCGCAAGAGTTGTGCAT
<i>AhIRT3</i>	AGTCACCCTCCTGGTCATGGTT	GCCCATGCCCAATGTCAAT
<i>AhZIP4</i>	AGCAAGAGAGGAATCAGGCTGC	CCAACCACGGGAACAACAGCA
<i>AhZIP9</i>	CCATCACTACTCCCATCGGTGT	CACCAATGACGCAACGCTATAA

Die Microarray-Analyse wurde mit einem Affymetrix ATH1 Chip im Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (KFB) in Regensburg nach Herstellerangaben durchgeführt. 250 ng Gesamt-RNA wurde mit RNeasy Minisäulen (Qiagen, Hilden) nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt, um anschließend doppelsträngige cDNA und biotin-markierte cRNA zu generieren. Die Länge der cRNA-Produkte wurde mit einem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Böblingen) gemessen. Nach der Fragmentierung wurden die cRNA-Produkte für 16 Stunden bei 45°C in einer rotierenden Kammer mit dem Array hybridisiert. Die hybridisierten Chips wurden danach gewaschen und in einer Affymetrix Fluidics Station FS450 (Affymetrix UK Ltd., High Wycombe, England) angefärbt. Die Fluoreszenzsignale wurden in einem Affymetrix GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix UK Ltd., High Wycombe, England) gemessen.

## 2.4. Analyse der Expressionsdaten

Die von dem Microarray mit dem Affymetrix Chip erhaltenen CEL-Dateien wurden mit dem Programm R ausgewertet, wobei Bioconductor Pakete (Gentleman *et al.*, 2004) verwendet wurden. Die "Robust Multi-chip Average" (RMA) Normalisierung wurde mit den

Basiseinstellungen der entsprechenden R-Funktion (Irizarry *et al.*, 2003) durchgeführt. Um die Menge der exprimierten mRNA zu bestimmen, wurde die “present call“ Information des nicht-parametrischen “Wilcoxon signed rank test“ (PMA Werte, Liu *et al.*, 2002) anhand des “affy“ Pakets berechnet (Gautier *et al.*, 2004). Hybridisierungsdaten von drei biologischen Replikaten sowohl für den Wildtyp Langelshem als auch für die RNAi-Linie 1-2 wurden generiert. Die Analyse unterschiedlich exprimierter Gene wurde mit dem LIMMA Paket durchgeführt, wobei die mit RMA normalisierten Expressionswerte verwendet wurden (Smyth *et al.*, 2005). Als Schwellenwert wurde ein p-Wert von  $<0,05$  eingesetzt und ein Gen wurde als hoch- bzw. herunterreguliert bezeichnet, wenn mindestens ein zweifacher Unterschied gegeben war. Die ATH1 Genome Array Microarray Plattform, die für dieses Experiment benutzt wurde, ist in der GEO (Gene Expression Omnibus) Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) unter der Zugangsnummer GSE31778 verfügbar. Die hier beschriebenen Microarray-Versuche sind nach MIAME (“Minimum Information About a Microarray Experiment“) Richtlinien beschrieben.

## 2.5. Analyse des Nicotianamingehaltes mit LC-MS

Die Quantifizierung von Nicotianamin wurde mit einem UPLC-ESI-QTOF-MS Verfahren durchgeführt (Schmidt *et al.*, 2011). Je Probe wurden 100 mg homogenisiertes Pflanzenmaterial mit 100  $\mu$ l Wasser extrahiert. Nach Zugabe eines internen Standards [ $^{15}\text{N}_3\text{-NA}$ ] wurden 10  $\mu$ l des Extraktes mit Fmoc-Cl bei Raumtemperatur derivatisiert. Die 120  $\mu$ l Reaktion wurde nach einer Minute durch Zugabe von 80  $\mu$ l Aminopropanollösung gestoppt. Für Auftrennung und Detektion wurde ein Acquity UPLC System verwendet, das an ein Q-TOF Premier Massenspektrometer (Waters, Milford, USA) gekoppelt ist. Zwei  $\mu$ l Probe wurden bei 40°C auf einer BEH C18 Säule (2,1 $\times$ 100 mm, 1,7  $\mu$ m; Waters, Milford, USA) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetrennt. Als Lösungsmittel wurden Wasser (A) und Acetonitril (B) verwendet, wobei beide mit 0,1 % (v/v) Ameisensäure angesäuert wurden. Es wurde der folgende zweistufige Gradient verwendet: 0,5 min 20 % (v/v) B, von 0,5 bis 4,5 min ein linearer Gradient bis 95 % B, 95 % B für 0,9 min, ein linearer Gradient bis hin zu den anfänglichen Konditionen für 1,6 min und Equilibration (20 % B) für eine min. Das Massenspektrometer wurde im ESI V+ Modus betrieben. Die Quantifizierung erfolgte über die rekonstruierten Ionenspuren der jeweiligen protonierten molekularen Ionen unter Verwendung des QuanLynx Moduls der MarkerLynx Software.

## 2.6. Metallprofile und Analyse von zinkbindenden Liganden

### 2.6.1. Elementanalyse mit ICP-OES

#### 2.6.1.1. Analyse von Blatt- und Wurzelmaterial

Für die Elementanalyse von Pflanzen wurde das Blattmaterial geerntet, mit Millipore Wasser gewaschen und mit Papierhandtüchern getrocknet. Die Wurzeln der hydroponisch angezogenen Pflanzen wurden für je zehn Minuten mit eiskaltem Wasser, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM EDTA und erneut mit Wasser gewaschen und anschließend ebenfalls mit Papierhandtüchern getrocknet. Die Proben wurden für zwei Tage in einer Lyophylle (Christ Alpha, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode am Harz) gefriergetrocknet.

Maximal 300 mg Pflanzenmaterial je Probe wurden mit HNO<sub>3</sub> (65 %, v/v) / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %, v/v) in einem Verhältnis von 3:1 in einem START 1500 Mikrowellensystem (MLS GmbH, Leutkirch) extrahiert. Die einzelnen Temperaturschritte der Mikrowelle sind in Tabelle 4 aufgelistet.

**Tabelle 4:** Temperaturschritte beim Säureaufschluss von Pflanzenmaterial mit der Mikrowelle.

Temperatur	Dauer [min]
75°C	2:30
130°C	5:30
200°C	7:00
200°C	12:00
Ventilation	25:00

Die aufgeschlossenen Proben wurden, wenn nötig, mit 2 % HNO<sub>3</sub> verdünnt und in einem ICP-OES iCAP 6300-Gerät der Firma Thermo Electron Corporation (Waltham, USA) analysiert.

#### 2.6.1.2. Erdanalyse

Für die Messung der extrahierbaren Metalle wurden je 3 g getrocknete und gesiebte (1-mm Maschen) Erde in 25 ml 0,1 M HCl bei 25°C für 30 min bei 70 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension bei 4°C und 3000 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Für die Messung der austauschbaren Ionen wurden zwei verschiedene Methoden angewendet. Zum einen wurden 3 g Erde in 25 ml 10 mM CaCl<sub>2</sub> für 2 h bei 70 rpm geschüttelt und danach, wie bei der HCl-Methode, zentrifugiert und der Überstand vermessen. Bei der anderen Extraktionsmethode wurde die Erde in einer Lösung aus DTPA (5 mM), Calciumchlorid (10 mM) und Triethanolamin (100 mM) mit einem pH-Wert von 7,3 für zwei

Stunden geschüttelt. Danach wurde die Suspension mit Rotilabo®-Rundfiltern (Typ 601A, Carl Roth, Karlsruhe) filtriert.

Für die ICP-OES-Messungen wurden alle Proben mit 2 % HNO<sub>3</sub> verdünnt. In Tabelle 5 sind die einzelnen Wellenlängen, bei denen die verschiedenen Metalle in der ICP-OES gemessen wurden, aufgeführt.

**Tabelle 5:** In der ICP-OES gemessene Elemente samt Wellenlängen.

analysiertes Element	gemessene Wellenlänge [nm]
Ca	315,8
Cd	226,5
Co	228,6
Cu	324,7
Fe	259,9
K	769,8
Mg	279,0
Mn	257,6
Mo	202,0
Ni	231,6
Zn	213,8

## 2.6.2. Zink-Speziierungsanalyse mit SEC-ICP-MS und Identifizierung von Liganden mit ESI-TOF-MS

### 2.6.2.1. Speziierungsanalyse von Pflanzenmaterial

Wurzelmaterial von *A. halleri* wurde mit Tris/NaCl extrahiert und für die Speziierungsanalyse nach Persson *et al.* (2009) verwendet. 100 mg frisches Pflanzenmaterial wurden unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff zusammen mit 500 mg säuregewaschenem Quarzsand in 2 ml eisgekühltem 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5) mit einem Mörser homogenisiert. Die Suspension wurde für 5 min bei 11000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in einer Filtersäule (Microcon Ultracel YM-100) erneut für 20 min bei 11000 g und 4°C zentrifugiert, um ein Filtrat zu erhalten, dessen Partikel eine maximale Größe von 100 kDa haben. Das Filtrat wurde bis zur Analyse auf Eis gelagert. Die SEC-ICP-MS Analyse wurde nach Persson *et al.* (2009) durchgeführt, wodurch eine reproduzierbare Quantifizierung von Mineralstoffen möglich ist. Für die SEC (Superdex Peptide 10/300 GL Amersham Biosciences, USA) wurde 50 mM Tris (pH 7,5) bei einer Flussrate von 1 ml min<sup>-1</sup> zum Eluieren verwendet. Die ICP-MS (Agilent 7700, Agilent Technologies, Böblingen) wurde mit Sauerstoff in der Reaktionszelle bedient, um die Schwefelsensitivität zu erhöhen. Zusätzlich zu Zn wurden auch P, S, Mn, Co, Ni, Fe und Cd analysiert. Alle Lösungsmittel wurden vor

der Analyse entgast. Fraktionen unter 1 kDa wurden gesammelt und für die Identifizierung von Liganden direkt in eine ESI-TOF-MS (Micromass LCT, Waters, Saint-Quentin, France) injiziert. Hydrophile Liganden wurden mittels hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) weiter aufgetrennt, um die Salz-Signalunterdrückung zu reduzieren (Lee *et al.*, 2009). Die gesammelten Fraktionen wurden lyophilisiert, in einer 90 %-igen Methanollösung resuspendiert und anschließend auf die HILIC Säule (Atlantis 2.1 ×100 mm, 3 µm Partikelgröße; Waters, Saint-Quentin, France) mit einer Flussrate von 0,2 ml min<sup>-1</sup> injiziert. Die für die Flüssigchromatographie verwendeten Lösungsmittel waren (A) 95 % Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure und (B) 5 % Acetonitril mit 0,2 % Ameisensäure in einem Gradienten von 95 % A/5 % B bis 40 % A/60 % B über 26 min.

#### 2.6.2.2. Speziierungsanalyse von Xylemsaft

Pflanzen des Wildtyps Langelshiem und der starken RNAi-Linie 1-2 wurden in Gegenwart von 10 µM Zn<sup>2+</sup> kultiviert. Nach ca. zwei bis drei Wochen wurde von allen Pflanzen der Spross ca. 0,5 cm oberhalb des Wurzelansatzes abgeschnitten und der Xylemsaft jeweils für 20 min mit einer Mikropipette abgenommen, gesammelt und kühl gelagert. Anschließend wurden die Proben unverdünnt mit SEC-ICP-MS, wie zuvor beschrieben, analysiert

### 2.6.3. Elementanalyse mit Transmissionselektronenmikroskopie

#### 2.6.3.1. Fixierung durch Hochdruckgefrieren

Von für fünf Wochen auf Harz 1-Erde kultivierten *A. halleri* Wildtyp und RNAi 1-2 Pflanzen wurden runde Blattstücke mit einer Handstanze (Harris Uni-Core Handstanze, 2 mm, Plano, Wetzlar) aus den Blättern ausgestanzt und in 8 % Methanol in Leitungswasser (v/v) für 5 min bei 80 mbar evakuiert. Die Blattstanzlinge wurden von überschüssigem Wasser befreit und in einen mit 1-Hexadecen gefüllten Aluminiumträger überführt (0.2 mm Vertiefung des Leica Probenträgers Typ A für den Hochdruckgefrierer HPM100). Der Aluminiumträger wurde dann mit einem weiteren Träger (flache Seite des Leica Probenträgers Typ B) verschlossen, das so aufgebaute Sandwich in die Hochdruckgefriermaschine HPM100 (Leica Microsystems, Wetzlar) eingesetzt und die Probe eingefroren (Müller & Moor, 1984). Nach dem Einfrieren wurde das Sandwich unter flüssigem Stickstoff geöffnet und die Blattstanzlinge mit einem vorgekühlten Pinsel von gefrorenem 1-Hexadecen befreit. Dazu wurden die Blattstanzlinge aus dem Aluminiumträger herauspräpariert und deren Oberflächen mit dem kalten Pinsel so lange leicht überstrichen, bis alles 1-Hexadecen entfernt war.

### 2.6.3.2. Tieftemperaturentwässerung und Einbettung der Proben

Die so behandelten Blattstanzlinge wurden dann mittels einer vorgekühlten Pinzette auf das - 140°C kalte und damit gefrorene Substitutionsmedium (wasserfreies Aceton mit 2 % OsO<sub>4</sub> (w/v)) überführt. Die Tieftemperaturentwässerung erfolgte in einem Leica EM AFS2 Gefriersubstitutionssystem (Leica Microsystems, Wetzlar) nach folgendem Schema: Erwärmung von - 140°C auf - 90°C innerhalb von 24 h (Temperaturanstieg: 2,1 °C/h), - 90°C für 80 h, Erwärmung von - 90°C auf - 70°C innerhalb von 15 h (Temperaturanstieg: 1,3°C/h), - 70°C für 8 h, Erwärmung von - 70°C auf - 50°C innerhalb von 15 h (Temperaturanstieg: 1,3°C/h), - 50°C für 8 h, Erwärmung von - 50°C auf - 30°C innerhalb von 15 h (Temperaturanstieg: 1,3°C/h). Die Proben wurden dann dreimal für jeweils 30 min mit auf -30°C vorgekühltem Aceton gewaschen. Die Infiltrierung und Einbettung der Proben in Glycidether 100 (ehemals Epon 812; Serva, Heidelberg) erfolgte nach Standardprozeduren. Nach Einbringen der Proben in die Brennformen erfolgte die Aushärtung des Glycidethers 100 bei 60 - 65°C für 24 - 48 h.

Zusammensetzung der Glycidether 100 Komponenten:

- Komponente A: 62 ml Glycidether 100, 100 ml DDSA
- Komponente B: 100 ml Glycidether 100, 89 ml MNA
- Komponente C: DMP 30

Zusammensetzung der Glycidether 100-Mischung aus den einzelnen Komponenten:

- 1,5 g Komponente A; 2,3 g Komponente B; 65 µl Komponente C

Glycidether 100 für die Elektronenmikroskopie, Methyladic anhydride pract. (MNA), 2-Dodecenylsuccinicacid anhydride (DDSA) und 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol pract. (DMP 30) stammten von Serva (Heidelberg).

### 2.6.3.3. Ultramikrotomie und Nachkontrastierung

Ultradünnschnitte (~ 60 - 80 nm) wurden mit einem Diamantmesser (Typ Ultra 35°; Diatome, Biel, Schweiz) auf einem Ultramikrotom EM UC6 (Leica Microsystems, Wetzlar) angefertigt. Die Ultradünnschnitte wurden auf mit Pioloform beschichtete Kupfernetzchen (Plano, Wetzlar) aufgebracht und nach (Reynolds, 1963) für 20 min mit 2 % Uranylacetat (w/v in A. dest.) und 3 min mit einer Bleizitratlösung kontrastiert.

#### 2.6.3.4. Transmissionselektronenmikroskopische Analyse der Ultrastruktur und EDX-Analyse

Für die Analyse der Ultrastruktur der Proben wurde ein JEM-2100 Transmissionselektronenmikroskop (JEOL, Tokyo, Japan), betrieben bei 80 kV, eingesetzt. Die Dokumentation erfolgte mit CCD-Kameras mit einer Auflösung von 4,080 x 4,080 oder 1,350 x 1,040 Pixeln (UltraScan 4000 bzw. Erlangshen ES500W, Gatan, Pleasanton, USA) und dem Programm Digital Micrograph (Version 1.70.16, Gatan).

Die analytische Transmissionselektronenmikroskopie (EDX, Energy Dispersive X-Ray Analysis, energiedispersive Röntgenanalyse) wurde an einem analytischen Transmissionselektronenmikroskop CM-20FEG der Firma Philips (jetzt FEI, Eindhoven, Niederlande) ausgerüstet mit einem energiedispersiven Röntgenspektrometer (EDXS, NORAN Ge detector, NORAN Instruments, Middleton, USA) durchgeführt. Für die EDX-Analyse wurde ein stationärer, unfokussierter Elektronenstrahl mit einer spot size von ca. 500 nm verwendet und die Aufnahme der EDX-Spektren erfolgte für 180 sec.

#### 2.6.4. Zinkfärbung mit Zinpyr-1

Aus einer 1 mM Stammlösung von in DMSO gelöstem Zinpyr-1 (Sigma-Aldrich, Steinheim) wurden 20 µM Arbeitslösungen mit 0,9 % Saline hergestellt und bei -20°C gelagert.

Stecklinge von Wildtyp Langelsheim und RNAi 1-2 Pflanzen wurden in hydroponischem Medium kultiviert, welches zusätzlich 1 µM ZnSO<sub>4</sub> enthielt. Unmittelbar nach der Wurzelbildung der Stecklinge wurden die Wurzeln abgeschnitten, dreimal mit Millipore-H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in 20 µM Zinpyr-1 für drei Stunden bei Raumtemperatur, im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Wurzeln erneut mit Millipore-H<sub>2</sub>O gewaschen und für 5 min mit 75 µM Propidiumiodid behandelt, um die Zellwände rot anzufärben. Bevor die Proben in 0,9 % Saline gebracht wurden, wurde ein letztes Mal mit Millipore-H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop des Typs SP5 von Leica (Leica Microsystems, Wetzlar) gemacht, wobei mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm gearbeitet wurde und Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) und Texas Red Filter verwendet wurden.

Um die Zinpyr-1-Signale in Wildtyp und RNAi-Linie vergleichen zu können wurden jeweils die gleichen Einstellungen am Mikroskop beibehalten. Die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale wurde mit dem Computerprogramm IMAGEJ (V 1.43u; (Rasband, 1997-2011) durchgeführt, wobei jeweils die Intensitäten der grünen und der roten Signale als

Pixelzahl innerhalb einer definierten Fläche gemessen wurden und anschließend mit dem Verhältnis aus grüner zu roter Fluoreszenz normalisiert wurde.

## 2.7. Thiolanalyse mit LC-MS

Wurzeln von in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  kultivierten *A. halleri* Wildtyp Langelsheim und RNAi 1-2 Pflanzen wurden geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden die Proben mit einem Mörser zu feinem Pulver homogenisiert und jeweils 200 mg Frischgewicht in ein Eppendorfreaktionsgefäß abgewogen. Nach Zugabe von 600  $\mu\text{l}$  Extraktionspuffer (100  $\mu\text{l}$  0,1 M HCl + 30  $\mu\text{l}$  100  $\mu\text{M}$  N-acetyl-L-cystein) wurde der Ansatz für 30 Sekunden gevortext und anschließend für 15 min bei 4°C und 16000 g zentrifugiert. Für die Derivatisierung (Labelling) wurden 25  $\mu\text{l}$  des Überstandes eingesetzt. Dafür wurden 36  $\mu\text{l}$  EPPS / DTPA - Puffer und 2  $\mu\text{l}$  50 mM Monobrombiman MBrB (in Acetonitril) zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 15  $\mu\text{l}$  1 M Methansulfonsäure wurde der Extrakt angesäuert und die Reaktion abgestoppt. Um eine partikelfreie Lösung für LC-MS-Messungen zu erhalten, wurde der Ansatz für 15 min bei 4°C und 16000 g zentrifugiert. Das komplette Endvolumen von 78  $\mu\text{l}$  wurde in LC-MS-Probengläschen überführt und im positiven Detektionsmodus analysiert.

## 2.8. pH-Wert-Bestimmung von Erdproben

Für die Bestimmung der pH-Werte von Erdproben wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet. Bei der KCl-Methode wurden 5 g getrocknete Erde mit 12,5 ml 1 M KCl versetzt, gevortext und für mehrere Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension für 10 min bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit einer pH-Elektrode vermessen. Bei der  $\text{CaCl}_2$ -Methode wurden 3 g getrocknete Erde mit 7,5 ml 10 mM  $\text{CaCl}_2$  versetzt und anschließend dieselben Schritte durchgeführt, wie für die KCl-Methode beschrieben.

## 2.9. Herstellung eines spezifischen Antikörpers für *AhNAS2*

Für die subzelluläre Lokalisierung von *AhNAS2* wurde der Versuch unternommen, von der Firma Coring System Diagnostix GmbH (Gernsheim a. Rhein) einen polyklonalen Antikörper produzieren zu lassen. Es wurde die codierende Sequenz von *AhNAS2* in den Überexpressionsvektor pJC40 kloniert und anschließend der *E. coli* Expressionstamm BL21 Star mit dem Konstrukt transformiert. Der Test verschiedener Wachstums- und

Induktionsbedingungen ergab, dass das gewünschte Protein immer in der unlöslichen Fraktion vorlag. Die beste Proteinausbeute konnte nach Bakterienwachstum bei 37° und ohne IPTG-Induktion erreicht werden. Da es nicht möglich war, *AhNAS2* in löslicher Form zu erhalten, wurde die unlösliche Proteinfraction unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt (Protokoll aus The QIAexpressionist™, Fifth Edition, Purification of His-tagged proteins from *E. coli* under denaturing conditions; Qiagen, Hilden) und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Anschließend wurden die entsprechenden Proteinbanden ausgeschnitten und die von der Firma angegebenen Mengen für die Immunisierung zweier Kaninchen weggeschickt. Es wurden je Tier etwa 100 µg Protein für die Präimmunisierung und je 30 µg für drei weitere Immunisierungen bereitgestellt. Die Kaninchen wurden anhand eines vorausgehenden Präimmunserentests ausgewählt, wobei gezeigt werden konnte, dass es keine Kreuzreaktionen mit einem Gesamtproteinextrakt aus *A. halleri* gab. Um die *AhNAS2*-Spezifität der Antiseren der immunisierten Tiere zu nachzuweisen, wurden diese ebenfalls mit *A. halleri* Proteinextrakten und zusätzlichen Extrakten aus *AhNAS2*-exprimierenden Hefen getestet.

## 2.10. Generierung von RNAi-Pflanzen für *AhNAS4* und *AhPCS*

Für die Generierung der *AhNAS4*- und *AhPCS*-RNAi Pflanzen wurde die bereits oben für die *AhNAS2* RNAi Pflanzen beschriebene Vorgehensweise angewendet. Es wurden dieselben Vektoren und Enzymmischungen benutzt, wobei es sich bei dem *AhNAS4*-RNAi-Konstrukt um ein 417 Basenpaare langes Fragment mit den Primern *AhNAS4*-RNAi-fw (5'-TAATTTGGTAGCAGCTCGTTTGG-3') und *AhNAS4*-RNAi-rev (5'-caccGAACAGTTACTCGAGATCCG-3') und bei dem für *AhPCS*- um ein 465 Basenpaare langes Fragment mit den Primern *AhPCS*-RNAi-fw (5'-ATCAATGCTGGAATGTTGCGAGCC-3') und *AhPCS*-RNAi-rev (5'-caccGCAATGCTGATCCAGCTCTCATCC-3') handelte.

## 2.11. Verwendete Medien

**Tabelle 6:** Zusammensetzung der verwendeten Bakterienwachstumsmedien

Medium	Zusammensetzung (pro 1 Liter)	Verwendung
LB	10 g Bacto-Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; für Herstellung von Agarplatten 1,5 % Agar	Kultivierung von <i>E. coli</i>
YEP	10 g Pepton; 10 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; Zusatz von Antibiotika: Rifampicin (50 µg/ml); Gentamycin (25 µg/ml); Kanamycin (50 µg/ml)	Kultivierung von <i>A. tumefaciens</i>

## 2.12. Statistische Analysen

Mit den Ergebnissen aller in dieser Arbeit durchgeführter Experimente wurden ANOVA und Tukey-Test Analysen (SigmaPlot 10.0., Systat Software Inc., San Jose, USA) durchgeführt. Den Fehlerbalken in den Abbildungen liegt jeweils die Standardabweichung zugrunde. Die in den Abbildungen mit Sternen gekennzeichneten Signifikanzniveaus beziehen sich auf die in Tabelle 7 gelisteten Werte.

**Tabelle 7:** Signifikanzniveaus der statistischen Analysen.

Anzahl Sterne	p-Wert
*	< 0,05
**	< 0,01
***	< 0,001

## 2.13. Verwendete Chemikalien

Die für die Herstellung von Medien und sonstigen verwendeten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad und stammten, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Duchefa Biochemie (Haarlem, Niederlande), Biozym (Hessisch Oldendorf), Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim) und Merck (Darmstadt). Die in den Experimenten verwendeten Enzyme, wie Restriktionsendonukleasen und *Taq* DNA Polymerasen, stammten von der Firma Fermentas GmbH (St. Leon-Rot). Das für das Ansetzen von Medien und für sämtliche Versuche verwendete Wasser wurde von einer Advantage Milli-Q-Anlage (Millipore, Billerica, USA) entionisiert. Alle neu generierten genspezifischen Primer wurden von der Firma Life Technologies GmbH (Darmstadt) bezogen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Charakterisierung verschiedener *A. halleri* Populationen

##### 3.1.1. *NAS2*-Expression in Wurzeln verschiedener *A. halleri* Populationen

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass der Nicotianamingehalt in den Wurzeln hydroponisch kultivierter *A. halleri* Pflanzen etwa 3,5-fach höher ist, als in *A. thaliana* Wurzeln (Weber *et al.*, 2004). Dieses Ergebnis stammt aus einer Analyse der Population Langelsheim, welche in einem stark metallkontaminierten Gebiet im Harz gesammelt wurde. Da *A. halleri* ein Pseudo-Metallophyt ist und ebenfalls auf nicht kontaminierten Böden wachsen kann, stellte sich die Frage, ob konstitutiv höhere Mengen an *NAS2*-Transkript und an Nicotianamin konservierte Eigenschaften darstellen, die unabhängig vom Kontaminierungsgrad des Bodens in allen *A. halleri* Populationen nachgewiesen werden können. Für die Analysen wurden sechs verschiedene Populationen aus Polen und Deutschland, die sowohl von belasteten als auch von unbelasteten Böden stammen, ausgewählt (Tabelle 8).

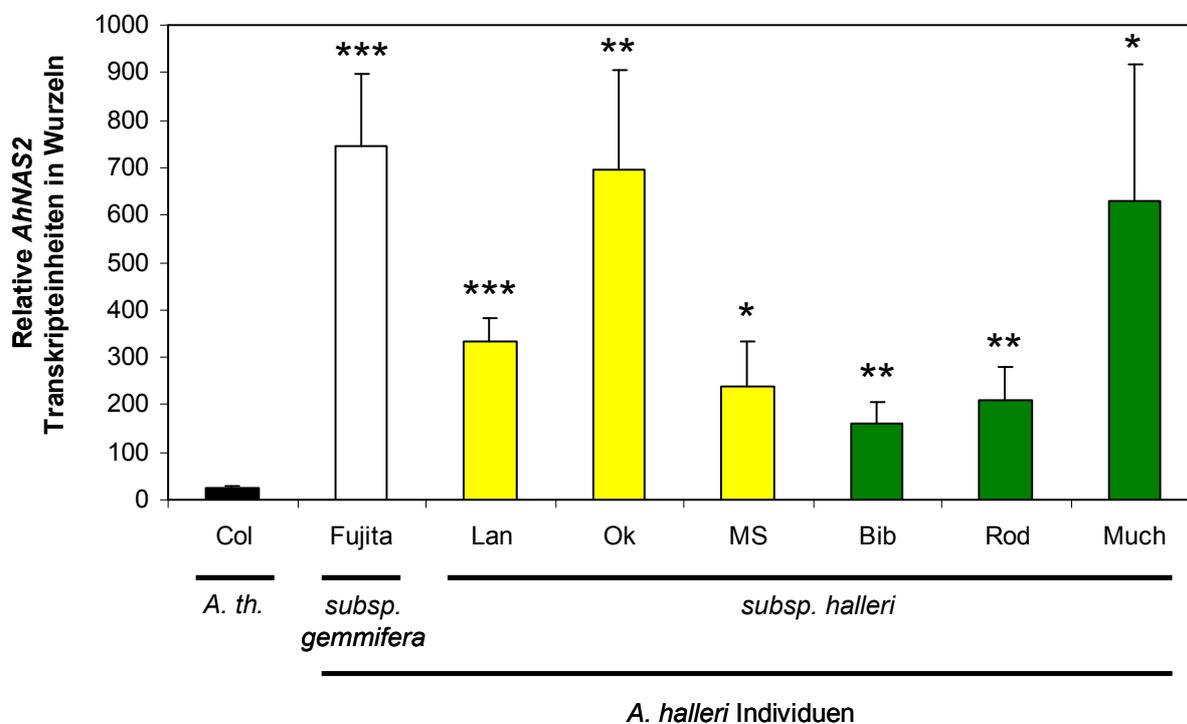
**Tabelle 8:** Gehalte an extrahierbaren Metallen in den Böden der *A. halleri* Standorte und im Blattmaterial der für die Analysen verwendeten Populationen aus Polen (P) und Deutschland (D).

Population (Land)	GPS-Koordinaten	Metallgehalt im Boden [µg/g]		Metallgehalt im Sprossmaterial [µg/g Trockengewicht]	
		Zink	Cadmium	Zink	Cadmium
Oker (D)	N51 53.754 E10 29.009	528,6	6,6	10150	235,2
Langelsheim (D)	N51 56.573 E10 20.942	1178,5	14,5	11560	40,2
Rodacherbrunn (D)	N50 25.610 E11 33.804	3,4	0,1	2800	108,0
Miasteczko Slaskie (P)	N50 30.242 E18 56.415	884,0	37,3	30500	762,5
Bibiela (P)	N50 29.793 E18 59.118	57,2	1,7	9220	202,6
Muchowiec (P)	N50 13.902 E19 1.924	195,0	5,0	12900	251,0

Wie aus Tabelle 8 hervorgeht, schwankten die aus der Erde extrahierbaren Zinkgehalte zwischen 3,4 und 1178 µg/g. Alle Populationen zeigten an den natürlichen Standorten eine starke Zinkakkumulation, wobei die Zinkgehalte im Blattmaterial zwischen 2800 und 30500 µg/g Trockengewicht lagen. Vier der sechs analysierten Pflanzen zeigten Werte, die den Hyperakkumulations-Schwellenwert von 10000 µg/g Trockengewicht deutlich

überschritten. Der in der Population aus Miasteczko Slaskie gemessene Wert von 30500  $\mu\text{g/g}$  liegt im Bereich der in der Literatur beschriebenen Höchstwerte (Daten bereitgestellt von Dr. A. Trąpczyńska, unveröffentlicht; (Deinlein *et al.*, 2012).

Individuen jeder Population wurden ins Labor transferiert und dort vegetativ mittels Stecklingsbildung vermehrt. Zusätzlich wurden *A. halleri subsp. gemmifera* Pflanzen von einem metallkontaminierten Standort in Japan kultiviert und analysiert. Für die Transkriptanalyse wurden Stecklinge hydroponisch angezogen und das Expressionslevel von *AhNAS2* in den Wurzeln bestimmt. Alle *A. halleri* Pflanzen zeigten eine 7- bis 31-fach höhere *NAS2*-Expression im Vergleich zum *A. thaliana* Ökotyp Col-0 (Abb. 5).



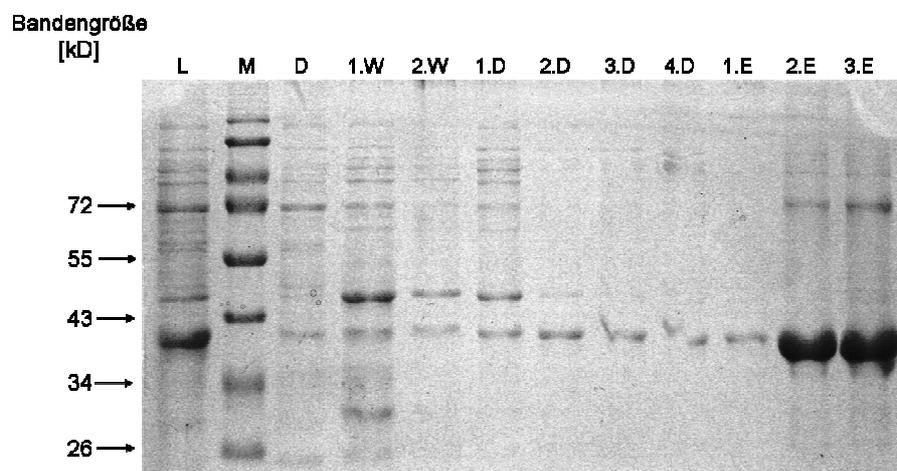
**Abbildung 5:** *Nicotianaminsynthase2*-Expression in Wurzeln von *A. thaliana* Wildtyp Columbia (schwarz), *A. halleri subsp. gemmifera* (weiß) und verschiedener *A. halleri* Individuen. Die Populationen, von denen die untersuchten Klone generiert wurden, stammen von metallkontaminierten (gelb) und unbelasteten (grün) Standorten in Deutschland, Polen und Japan (siehe Tab. 8). Die Pflanzen wurden in drei unabhängigen Experimenten unter Kontrollbedingungen kultiviert.  $n = 3$ , wobei für jeden Datenpunkt drei Pflanzenproben vereint wurden. Fehlerbalken repräsentieren, wie auch in allen folgenden Abbildungen, die Standardabweichung. Signifikanzniveaus sind mit Sternen gekennzeichnet (siehe Material und Methoden 2.12.).

Sowohl in den Populationen von kontaminierten, als auch in denen von nicht kontaminierten Standorten waren die Unterschiede zu Columbia signifikant, wobei die höchsten

Transkriptmengen in den Pflanzen aus Japan und Oker gemessen werden konnten. Somit scheint die Erhöhung der *AhNAS2*-Expression eine konstitutive Eigenschaft zu sein.

### 3.1.2. Herstellung eines spezifischen Antikörpers für AhNAS2

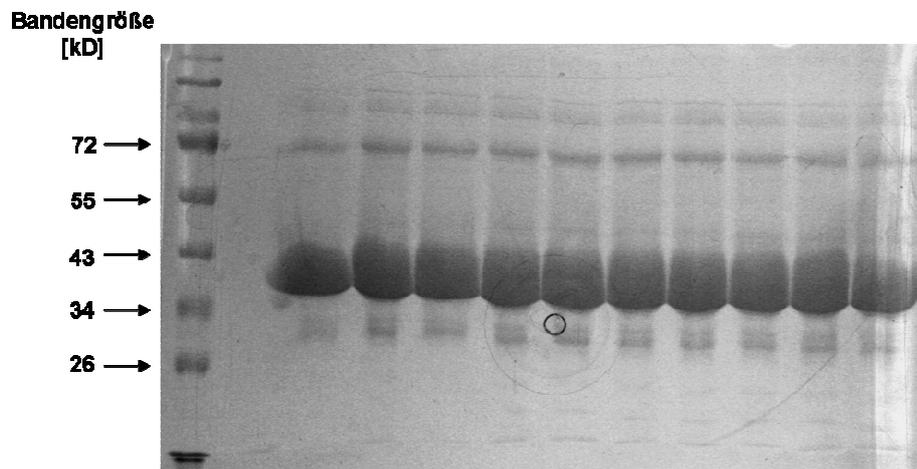
Neben den Expressionsanalysen sollte auch der NAS2-Proteingehalt in den *A. halleri* Pflanzen quantifiziert werden. Da noch kein Antikörper gegen AhNAS2 verfügbar war, sollte ein möglichst spezifischer generiert werden. Neben Proteinkonzentrationsbestimmungen könnte das Antiserum auch für die subzelluläre Lokalisierung von AhNAS2 mittels immunologischer Detektion in *A. halleri* eingesetzt werden. Um für eine Immunisierung von Kaninchen ausreichende Proteinmengen zu erhalten, wurde die kodierende Sequenz von *AhNAS2* in den Überexpressionsvektor pJC40 kloniert und anschließend der *E. coli* Expressionstamm BL21 Star mit dem Konstrukt transformiert. Es wurden verschiedene Wachstums- und Induktionsbedingungen getestet, wobei das Protein immer in der unlöslichen Fraktion vorlag. Es wurde schließlich eine Bakterieninkubationstemperatur von 37°C gewählt und auf eine IPTG-Induktion verzichtet. Da es nicht möglich war, AhNAS2 in löslicher Form zu erhalten, wurde die unlösliche Proteinfraction unter denaturierenden Bedingungen mittels des angehängten His-Tags aufgereinigt und auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 6, 7).



**Abbildung 6:** SDS-Gel eines unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigten AhNAS2-Proteinextrakts. Die einzelnen Gelspuren wurden mit dem Lysat (L), dem Proteinmarker (M), dem 1. Durchfluss (D), den beiden Durchflüssen des Waschpuffers (1.W und 2.W), den einzelnen Durchflüssen des Puffers D (1.D bis 4.D) und den drei Durchflüssen des Elutionspuffers (1.E bis 3.E) beladen.

In Abbildung 6 ist gut zu erkennen, dass nur geringe Mengen des gewünschten Proteins (37,5 kD) in den verschiedenen Waschschrritten verloren ging. Der Großteil wurde in den Elutionsschritten 2 und 3 von der Säule geholt. Da die Aufreinigung gut funktioniert hatte,

wurde als nächstes ein größerer Ansatz der Bakterienkultur hergestellt und die gleiche Vorgehensweise wie oben beschrieben gewählt. Durch die anschließende Aufreinigung konnten große Mengen an AhNAS2 gewonnen werden (Abb. 7).



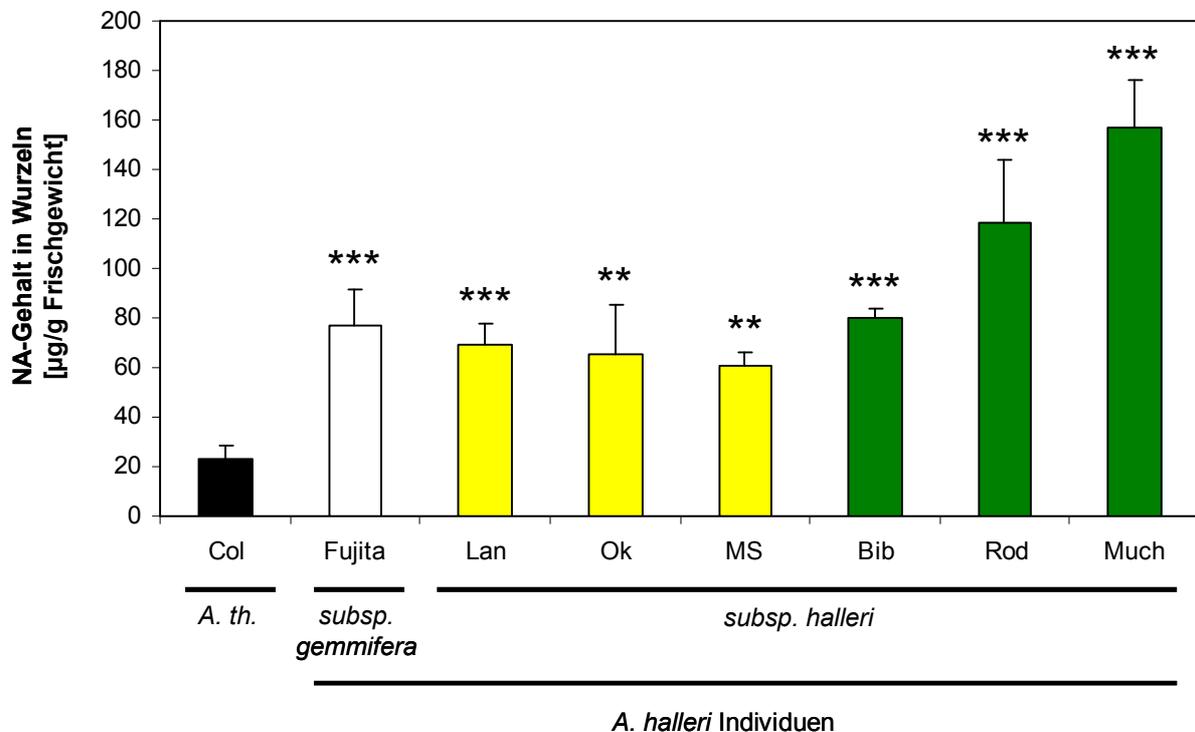
**Abbildung 7:** SDS-Gel mit unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigten AhNAS2-Proteinextrakten. Die Banden der Größe von etwa 37,5 kD (AhNAS2+His-tag) wurden anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und für die Immunisierung der Kaninchen an Coring System Diagnostix GmbH gesendet.

In Abbildung 7 sind deutlich die bei etwa 37,5 kD liegenden starken Banden zu sehen, die AhNAS2 und dem angehängten His-Tag entsprechen. Diese wurden aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend die von der Firma Coring System Diagnostix GmbH angegebenen Mengen für die Immunisierung zweier Kaninchen eingeschickt. Die Tiere waren vorher anhand eines Präimmunserentests ausgewählt worden, wobei keines der Blutseren Kreuzreaktionen mit einem Gesamtproteinextrakt aus *A. halleri* zeigte. Die von der Firma erhaltenen Antiseren wurden ebenfalls mit *A. halleri* Proteinextrakten und zusätzlich mit Proteinextrakten aus *AhNAS2*-exprimierenden Hefen getestet. Für keines der Antiseren konnte ein *AhNAS2*-spezifisches Signal detektiert werden.

### 3.1.3. Messung der Nicotianamingehalte in Wurzeln und Blättern verschiedener *A. halleri* Populationen

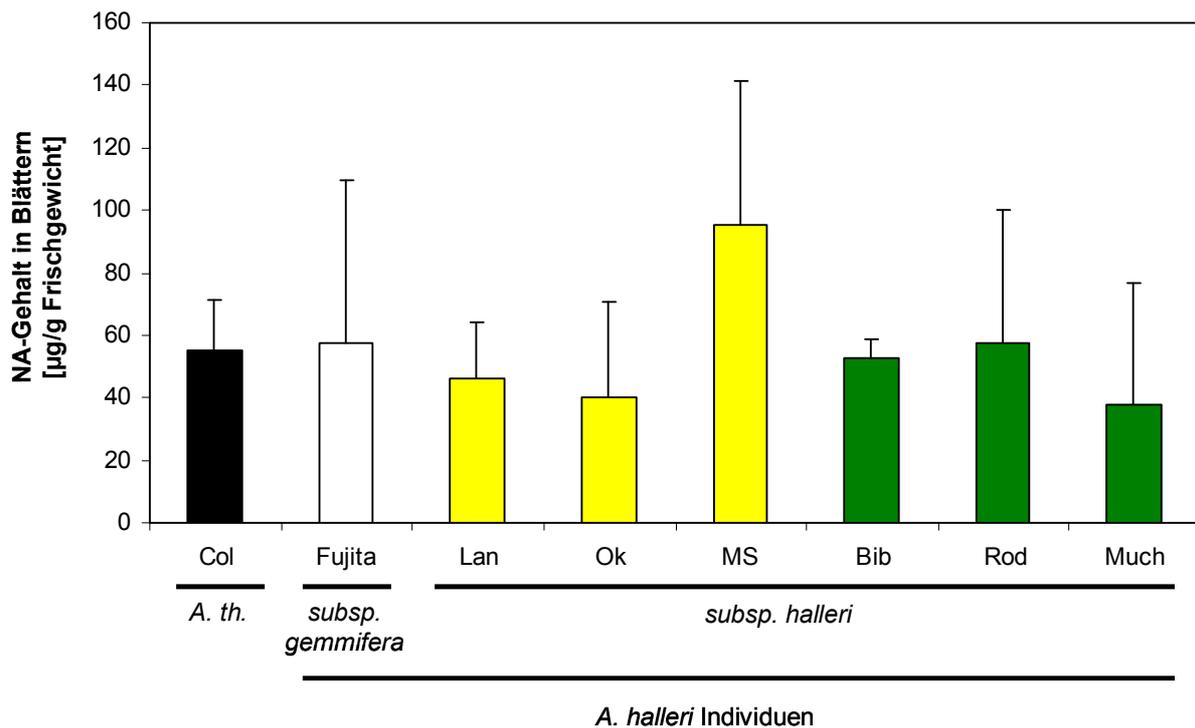
Um zu untersuchen, wie sich die erhöhten *AhNAS2*-Transkriptmengen in den verfügbaren *A. halleri* Populationen auf die Bildung des Metaboliten Nicotianamin auswirken, wurden als nächstes die NA-Gehalte mittels einer verbesserten Analyseverfahren, die auf der Quantifizierung durch einen  $^{15}\text{N}$ -markierten internen Standard basiert (Schmidt *et al.*, 2011), gemessen. Es wurden dieselben Proben untersucht, bei denen auch die Transkriptanalyse durchgeführt wurde. Die Nicotianamingehalte in den Wurzeln der analysierten *A. halleri*

Pflanzen lagen zwischen 60,4 und 156,6  $\mu\text{g/g}$  Frischgewicht. Dies ergab einen um 2,7- bis 6,9-fach höheren Gehalt im Vergleich zu *A. thaliana* Col-0, wobei auch diese Unterschiede signifikant waren (Abb. 8).



**Abbildung 8:** Nicotianamingehalt in Wurzeln von *A. thaliana* Wildtyp Columbia (schwarz), *A. halleri* subsp. *gemmifera* (weiß) und verschiedenen *A. halleri* Individuen. Die Populationen, von denen die untersuchten Klone generiert wurden, stammen von metallkontaminierten (gelb) und unbelasteten (grün) Standorten in Deutschland, Polen und Japan (siehe Tab. 8). Die Pflanzen wurden in drei unabhängigen Experimenten unter Kontrollbedingungen kultiviert. n = 3 bis 8.

Im Gegensatz zu den Wurzeldata waren die NA-Gehalte in den Blättern der analysierten Pflanzen vergleichbar und es wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden (Abb. 9). *A. thaliana* Col-0 enthielt durchschnittlich 55,3  $\mu\text{g/g}$  Frischgewicht, während alle *A. halleri* Individuen im Durchschnitt zwischen 37,7 and 57,6  $\mu\text{g/g}$  Frischgewicht enthielten. Die einzige Ausnahme stellte die polnische Population aus Miasteczko Slaskie dar, die durchschnittlich 95,1  $\mu\text{g/g}$  Frischgewicht enthielt.



**Abbildung 9:** Nicotianamingehalt in Blättern von *A. thaliana* Wildtyp Columbia (schwarz), *A. halleri* subsp. *gemmifera* (weiß) und verschiedenen *A. halleri* Individuen. Die Populationen, von denen die untersuchten Klone generiert wurden, stammen von metallkontaminierten (gelb) und unbelasteten (grün) Standorten in Deutschland, Polen und Japan (siehe Tab. 8). Die Pflanzen wurden in zwei unabhängigen Experimenten unter Kontrollbedingungen kultiviert. n = 2, wobei für jeden Datenpunkt drei Pflanzenproben vereint wurden.

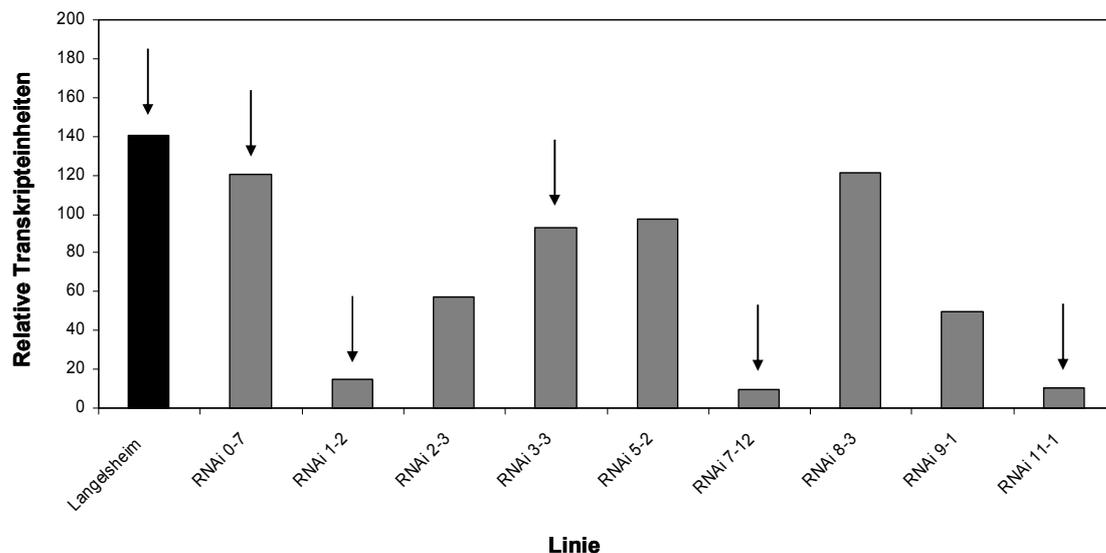
Es konnte somit gezeigt werden, dass alle analysierten Individuen der zinkhyperakkumulierenden *A. halleri*-Populationen sowie *A. halleri* subsp. *gemmifera* verglichen mit *A. thaliana* sowohl eine signifikant höhere *NAS2*-Expression als auch signifikant höhere Nicotianamingehalte in den Wurzeln besitzen.

### 3.2. Charakterisierung von *AhNAS2* RNAi-Linien mit unterschiedlicher Transkriptreduktion

#### 3.2.1. Expressionsanalyse der verschiedenen Isoformen von *Nicotianaminsynthase*

Um eine potentielle Rolle von Nicotianamin in der Zinkhomöostase bzw. -hyperakkumulation zu untersuchen, wurden mit einer neu entwickelten Transformationsmethode für *A. halleri* (Hanikenne *et al.*, 2008), ausgehend von zwei unterschiedlichen Wildtyp Langelsheim Pflanzen, *AhNAS2* RNAi-Linien generiert (Weber, unveröffentlicht). Es konnten neun unabhängige Linien identifiziert werden, mit denen ein realtime PCR-Vorexperiment zur

Bestimmung der *AhNAS2*-Transkriptniveaus durchgeführt wurde (Abb. 10). In den meisten der folgenden Experimente wurden Pflanzen sowohl unter Kontrollbedingungen als auch mit zusätzlichen  $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$  im Wachstumsmedium kultiviert. Diese Zinkkonzentration wurde nach vorausgehenden Experimenten und anhand von Angaben aus der Literatur ausgewählt (Bert *et al.*, 2000; Talke *et al.*, 2006). Talke und Mitarbeiter zeigten, dass Konzentrationen von  $30 \mu\text{M}$  und höher im hydroponischen Medium in einer reduzierten Zinkhyperakkumulation von *A. halleri* resultierten, während das Verhältnis von Spross- zu Wurzelzinkgehalt nach Zugabe von  $1\text{-}5 \mu\text{M Zn}^{2+}$  größer als 1 war. Dieser Wert wird in der Literatur als wichtiges Kriterium für Zink-Hyperakkumulation verwendet (Talke *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben den von Talke und Mitarbeitern angegebenen  $5 \mu\text{M}$  eine Zinkkonzentration von  $10 \mu\text{M}$  im hydroponischen Wachstumsmedium getestet. In Gegenwart von  $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$  zeigten alle analysierten *A. halleri* Wildtyppflanzen eine stärkere Hyperakkumulation als im  $5 \mu\text{M Zn}^{2+}$ -Medium, wodurch die Wahl der Zinkkonzentration für alle Folgeexperimente erklärt wird. Abbildung 10 zeigt die *AhNAS2*-Transkriptmengen aller im realtime PCR-Vorexperiment getesteten Linien.

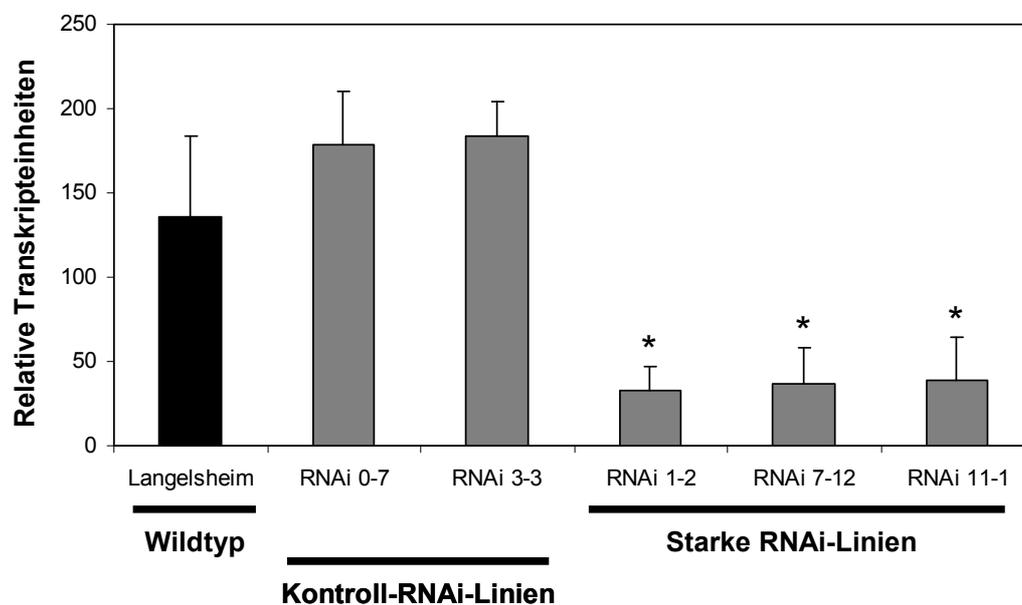


**Abbildung 10:** Expression von *NAS2* in Wurzeln von Wildtyp Langelsheim und neun unabhängigen *NAS2* RNAi-Linien. Die Pflanzen wurden mit zusätzlichen  $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$  im Medium angezogen. Die Pfeile markieren die für weitere Analysen ausgewählten Linien.  $n = 1$ , wobei jeweils drei Pflanzen zu einer Probe vereint wurden.

Zusätzlich zum Wildtyp wurden fünf dieser RNAi-Linien für weitere Analysen ausgewählt (siehe Pfeile in Abb. 10). Die Linien 1-2, 7-12 und 11-1 zeigten mit 81 bis 85 % die stärkste Reduktion in der *AhNAS2*-Expression in Wurzeln, während 0-7 und 3-3 keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen (Abb. 10). Diese beiden Linien mit nur schwachem RNAi-Effekt wurden trotzdem bei allen folgenden Experimenten mitanalysiert, da sie den

gleichen Transformationsprozess wie die anderen RNAi-Linien durchlaufen haben und somit sehr gute Kontrollen darstellen. Wie bereits erwähnt, basieren die RNAi-Linien auf Pflanzen, die aus Kreuzungen von unterschiedlichen Wildtyp Langelsheim Pflanzen stammen. Sie besitzen somit nicht exakt den gleichen genotypischen Hintergrund wie der Wildtyp. Diese Tatsache macht die jeweilige parallele Analyse der beiden Kontroll-RNAi-Linien noch wichtiger.

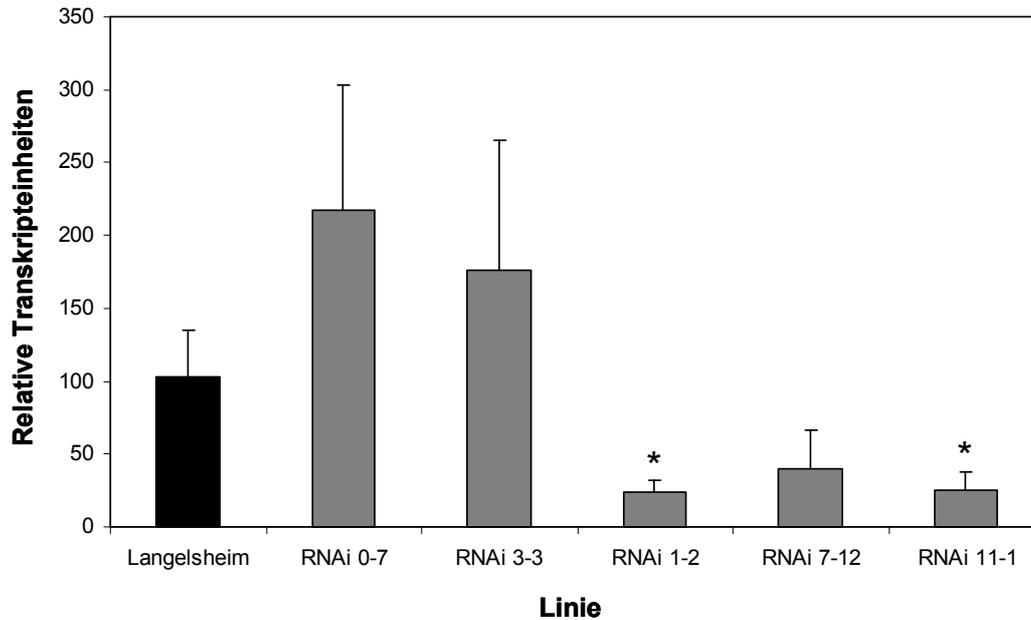
Es wurden drei unabhängige Experimente mit hydroponisch angezogenen Pflanzen durchgeführt und jeweils die *NAS2*-Transkriptmengen sowie die NA-Gehalte in Wurzeln und Blättern bestimmt. Wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, konnte der in den Vorversuchen beobachtete RNAi-Effekt bestätigt werden.



**Abbildung 11:** Expression von *Nicotianaminsynthase2* in Wurzeln von in drei unabhängigen Experimenten unter Kontrollbedingungen gewachsenen *A. halleri* Wildtyp Langelsheim Pflanzen und fünf *NAS2* RNAi-Linien. n = 3, wobei für jeden Datenpunkt drei Pflanzenproben vereint wurden.

Die Reduktion der *AhNAS2*-Expressionsniveaus lag in den drei starken Linien verglichen mit dem Wildtyp bei 71 bis 76 % und war für alle drei Linien signifikant. Im Vergleich zur Kontrolllinie 0-7 waren die Werte sogar um 78 bis 82 % reduziert.

In Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  zeigte *AhNAS2* erneut die höchsten Expressionslevel im Wildtyp und in den schwachen RNAi-Linien, während in den starken Linien, wie bereits unter Kontrollbedingungen, eine deutliche Reduktion des Transkriptes gemessen wurde (Abb. 12).



**Abbildung 12:** Expression von *Nicotianaminsynthase2* in Wurzeln von *A. halleri* Wildtyp Langelsheim Pflanzen und fünf *NAS2* RNAi-Linien. Die Pflanzen wurden in drei unabhängigen Experimenten mit zusätzlichen 10  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  im Medium angezogen.  $n = 3$ , wobei für jeden Datenpunkt drei Pflanzenproben vereint wurden.

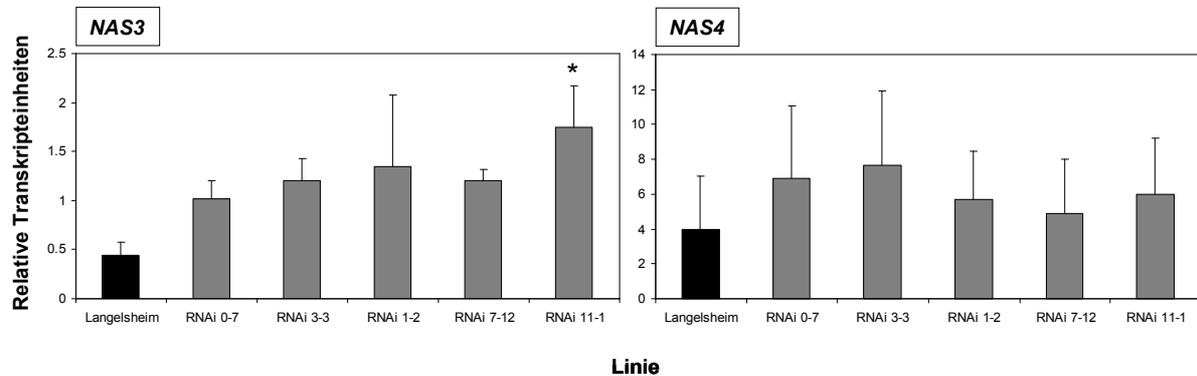
Die *AhNAS2*-Expressionsniveaus der Linien 1-2, 7-12 und 11-1 waren im Vergleich zum Wildtyp um 63 bis 78 % reduziert, wobei verglichen mit der Kontrolllinie 0-7 sogar 82 bis 89 % weniger Transkript akkumulierte.

Vergleicht man die *AhNAS2*-Expression unter Kontrollbedingungen mit der in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  wird deutlich, dass die Unterschiede zwischen den Kontroll- und den starken RNAi-Linien jeweils vergleichbar stark sind.

Da die untersuchten Linien bereits seit mehr als drei Jahren etwa dieselbe Reduktion im *AhNAS2*-Transkriptlevel aufweisen, können sie als stabile Transformanten bezeichnet werden. In *A. thaliana* sind vier *NAS*-Isoformen bekannt, wobei auch jeweils die orthologen Gene in *A. halleri* exprimiert werden (Weber *et al.*, 2004). Von diesen wurden die Volllänge-cDNAs kloniert und auf ihre Funktionalität hin überprüft, wobei die Klonierung jeder einzelnen cDNA dazu führte, dass  $\text{Zn}^{2+}$  hypersensitive *S. pombe zhfΔ* Zellen die Fähigkeit erhielten, NA zu synthetisieren und eine daraus resultierende erhöhte  $\text{Zn}^{2+}$  Toleranz aufwiesen. Somit konnte gezeigt werden, dass die klonierten cDNAs für funktionale NAS-Proteine codieren (Deinlein *et al.*, 2012).

Um die Isoformenspezifität des RNAi-Effekts zu überprüfen, wurden in den drei unabhängigen Experimenten zusätzlich zur Transkripthäufigkeit von *AhNAS2* auch die von *AhNAS1*, *AhNAS3*, und *AhNAS4* in Blättern und in Wurzeln gemessen. Das Expressionsschema dieser Isoformen war in *A. halleri* Wildtyp Pflanzen vergleichbar mit dem

in *A. thaliana*. *AhNAS1* und *AhNAS4* sind sowohl in Wurzeln als auch in Blättern exprimiert, während *AhNAS2* fast ausschließlich in Wurzeln und *AhNAS3* vor allem in Blättern exprimiert ist (Klatte *et al.*, 2009). Im Vergleich zum Wildtyp Langelsheim zeigte in den *AhNAS2* RNAi-Linien lediglich die Linie 11-1 signifikante Unterschiede im Transkriptlevel von *NAS3*, während in der *NAS4*-Expression keine signifikante Veränderung gemessen wurde (Abb. 13).



**Abbildung 13:** Expression von *NAS3* und *NAS4* in Wurzeln von in drei unabhängigen Experimenten unter Kontrollbedingungen gewachsenen *A. halleri* Wildtyp Langelsheim Pflanzen und fünf *NAS2* RNAi-Linien.  $n = 3$ , wobei für jeden Datenpunkt drei Pflanzenproben vereint wurden.

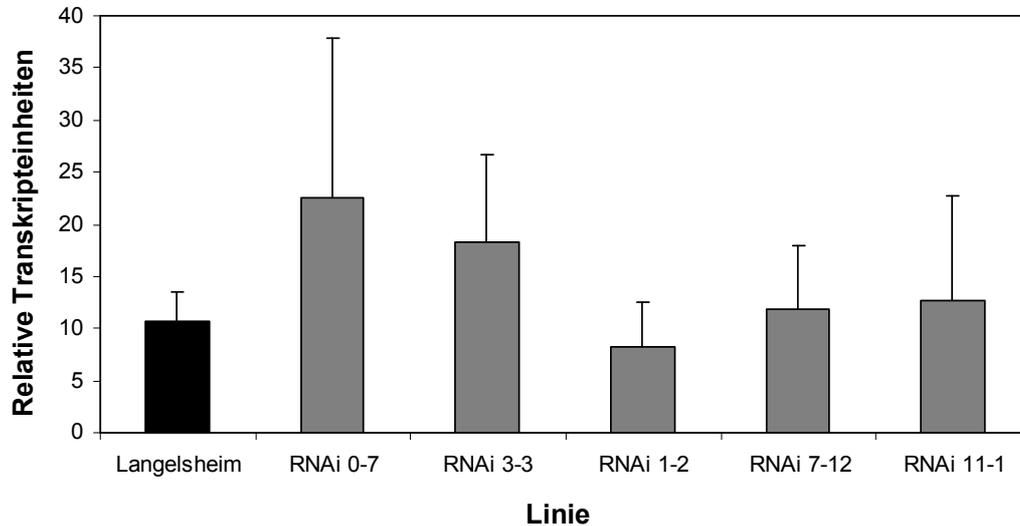
Verglichen mit *AhNAS2* waren *AhNAS3* und *AhNAS4* in den Wurzelproben deutlich niedriger exprimiert. *NAS1* besitzt von allen *NAS*-Isoformen die größte Homologie zu *NAS2*, wobei beide eine Sequenzähnlichkeit von 84,2 % in der Gesamt-Gensequenz und 85,2 % in der Sequenz des verwendeten RNAi-Fragments besitzen. Abbildung 14 zeigt ein Alignment der beiden Isoformen und verdeutlicht die Ähnlichkeit, wobei das letzte Drittel der beiden Gensequenzen am 3'-Ende keinerlei Polymorphismen aufweist und zu 100 % identisch ist.

A. halleri NAS2	ATGGCTTGGC	AGAACAACCT	CGTTGTGAAG	CAAATCATTG	ACTTATACAA	CCAAATCTCA	AACCTCGAGA	GCTTAAAACC
A. halleri NAS1	.....C	.A.....T.	.....	.....G.C.	.....G.	T.....	..G...T..	.....
Identität	*****	* *****	** *****	*****	** *****	* *****	** *****	*****
A. halleri NAS2	ATCCAAGAA	GTCGACACT	TGTTCCGACA	ACTTGTATCC	ACGTGCTTAC	CTACAGACAC	AAACATCGAT	GTCACAGAGA
A. halleri NAS1	T.....A.	.....	.....	...C..G..	.....	..C..G..T..	.....	...A..T..
Identität	*****	*** *****	*****	*** ** *	*****	* ** ** *	*****	***** *
A. halleri NAS2	TACACGATGA	AAAAGTCAA	GACGCGAGAT	CTCATCTCAT	CAAGCTTTGT	GGTGAAGCCG	AAGGTTATTT	AGAGCAACAC
A. halleri NAS1	.GTG---.	.G.....	T..AT....	..A.....	.....	.....	.....	.....
Identität	*	*** *	*****	** *****	** *****	*****	*****	*****
A. halleri NAS2	TTTTCAACAA	TCTTAGGCTC	TTTT---GAA	GAC---AACC	CACTAAACCA	TTTACACATC	TTTCCCTATT	ACAACAAC
A. halleri NAS1	..C..C....	.T..G..A..	...ACAA..	...CAA....	...TG....	.....	.....T..C..	...C.....
Identität	** ** *	* ** ** *	*** ** *	*** ** *	*** ** *	*****	***** ** *	*** *****
A. halleri NAS2	TATCAAGCTA	AGCAAACTCG	AATTCGATCT	CCTAGCACAA	CACACAACCC	ATGTCCCGAC	CAAAGTCGCC	TTTATCGGTT
A. halleri NAS1	CC.....G.	G.....G....	.G.....	...GAGT...	...T...G..	.....C..	...GA..T...	..CG..G...
Identität	*****	*** ** *	*****	*** ** *	*** ** *	*****	*** ** *	*** ** *
A. halleri NAS2	CGGGTCCGAT	GCCACTTACA	TCCATCGCTT	TGGCCAAGTT	CCATCTTCCC	AACACAACGT	TCCACAACCT	TGACATCGAC
A. halleri NAS1	.....	...T..C...	.....	.....	T..C..C..G	.....G..C.	.....	C.....
Identität	*****	*** ** *	*****	*****	** ** *	*****	*****	*****
A. halleri NAS2	TCACAGGCCA	ACACACTCGC	TTCAAACCTC	GTTTCTCGCG	ATTCTGACCT	CTCGAAACGC	ATGGTTTCC	ACACAAC
A. halleri NAS1	.....A.	.....	...A	..C.....	..CC..G....	...A.....	..A..C....	.....G..
Identität	*****	* *****	*****	** *****	* * *****	*** *****	*** * *****	***** **
A. halleri NAS2	TGTGTTAAAC	GCTAAGGAAG	GGTTAGACCA	ATACGATGTT	GTTTCTTGG	CAGCTCTGT	TGGGATGGAT	AAAGAGTCAA
A. halleri NAS1	C..AC....	...CC....	.CC..T....	...T..C..C	.....	.G.....	.....C	.....
Identität	** *****	*** ** *	* ** *	*** ** *	*****	* *****	*****	*****
A. halleri NAS2	AGGTCAAAGC	TATTGAGCAT	TTGGAGAAGC	ATATGGCTCC	TGGAGCTGTG	TTGATGCTAA	GAAGTGCTCA	TGGTCTTAGA
A. halleri NAS1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Identität	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
A. halleri NAS2	GCTTCTTGT	ATCCAATGT	TGACTTGT	GATCTTAAAG	GGTTGAGGT	GTTAACCATT	TATCATCCGT	CCGATGATGT
A. halleri NAS1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Identität	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
A. halleri NAS2	GGTTAATTCG	GTGGTCATCG	CACGTAAGCT	TGGTGGGTCA	AATGGAGCTC	GAGGCAGCCA	GATCGGATGG	TGTGTGGTTA
A. halleri NAS1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Identität	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
A. halleri NAS2	TGCCATGTAA	CTGCTCTAAG	GTCCACGCGA	TCATGAACAA	TCGTGGTATG	AAGAAGAATT	TGATCGAAGA	GTTTAGTGCC
A. halleri NAS1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Identität	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
A. halleri NAS2	ATCGAGTAA							
A. halleri NAS1	.....							
Identität	*****							

**Abbildung 14:** Alignment der Gensequenzen von *AhNAS2* und *AhNAS1*. Bei übereinstimmenden Basen sind für *AhNAS1* ein Punkt und in der Zeile „Identität“ ein Stern angegeben. Angefertigt mit Gentle (V 1.9.4). Die Sequenz des verwendeten RNAi-Konstrukts ist rot markiert.

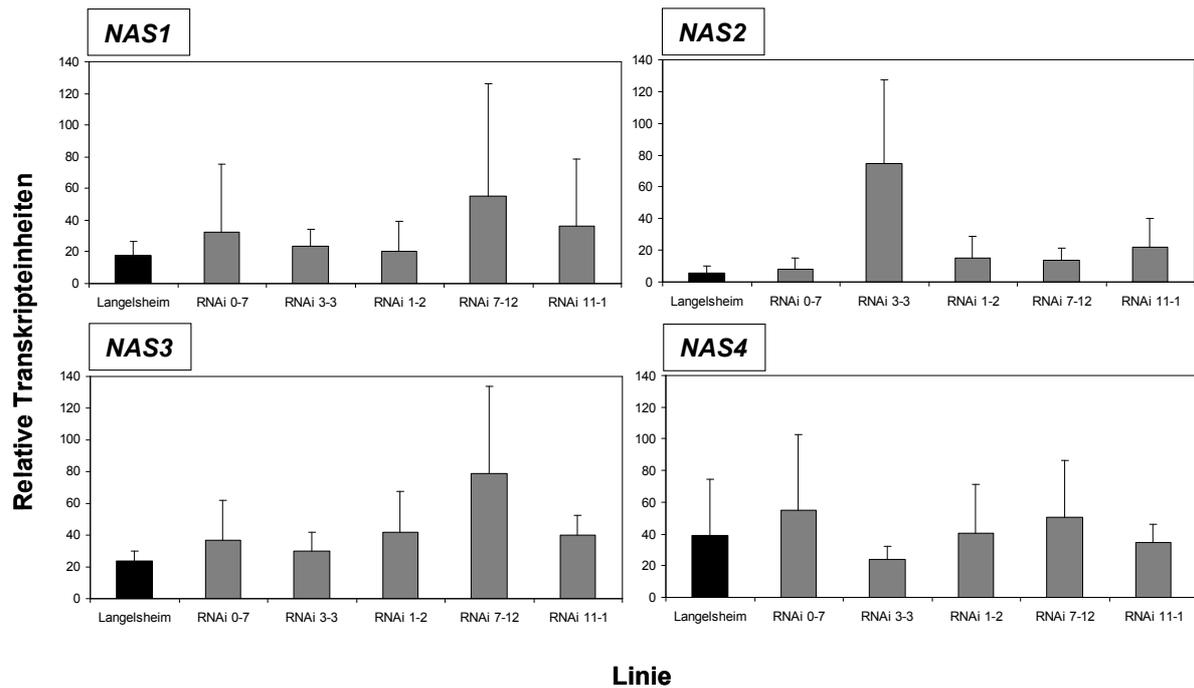
Aufgrund dieser hohen Übereinstimmungen ist es nahezu unmöglich, ein RNAi-Fragment zu generieren, welches nur eine der beiden Isoformen beeinträchtigt, ohne die andere zu beeinflussen. Das für die analysierten RNAi-Linien verwendete Fragment ist in Abbildung 14 rot markiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Sequenz etwa in der Mitte des *AhNAS2*-Gens liegt und möglichst viele Polymorphismen im Vergleich zu *AhNAS1* aufweist. Betrachtet man die Ergebnisse der durchgeführten realtime PCRs, so waren die Transkriptmengen von *NAS1* in den starken *AhNAS2* RNAi-Linien im Vergleich zum Wildtyp und den schwachen Linien um bis zu 50 % reduziert (Abb. 15, 17). Da jedoch das Expressionsniveau von *AhNAS2* in den Wurzeln, sowohl von in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  angezogenen als auch von

Kontrollpflanzen mit etwa Faktor 13 bzw. 14 um ein Vielfaches über dem von *AhNAS1* lag, kann dieser leichte Effekt wohl vernachlässigt werden.



**Abbildung 15:** Expression von *NAS1* in Wurzeln von in drei unabhängigen Experimenten unter Kontrollbedingungen gewachsenen *A. halleri* Wildtyp Langelsheim Pflanzen und fünf *NAS2* RNAi-Linien.  $n = 3$ , wobei für jeden Datenpunkt drei Pflanzenproben vereint wurden.

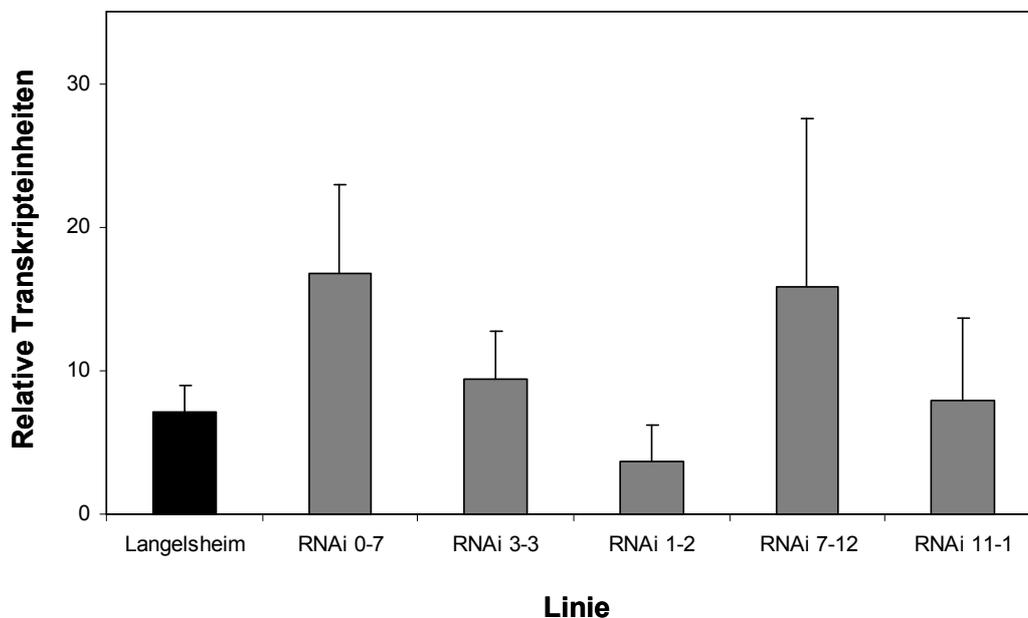
Im Gegensatz zu den Wurzelproben konnten im Spross keine signifikanten Unterschiede im Expressionsmuster der getesteten Linien nachgewiesen werden. Lediglich der *NAS2*-Wert der schwachen Linie 3-3 und der *NAS3*-Wert der Linie 7-12 lagen deutlich über den Werten der restlichen Linien (Abb. 16).



## Linie

**Abbildung 16:** Expression der vier *NAS*-Isoformen im Spross von in drei unabhängigen Experimenten unter Kontrollbedingungen gewachsenen *A. halleri* Wildtyp Langelsheim Pflanzen und fünf *NAS2* RNAi-Linien.  $n = 3$ , wobei für jeden Datenpunkt drei Pflanzenproben vereint wurden.

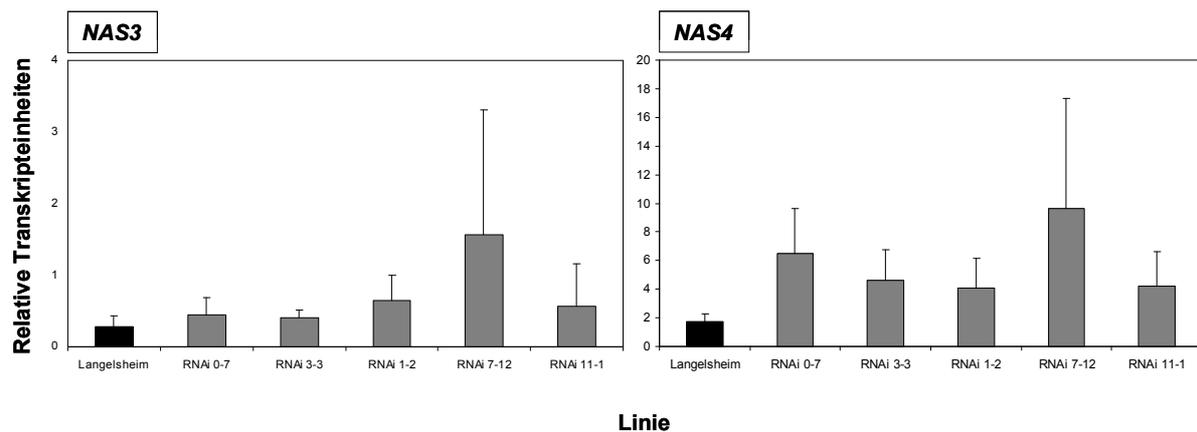
Aus den Abbildungen 17 und 18 geht hervor, dass für die drei anderen *NAS*-Isoformen keine signifikanten Unterschiede in der Transkriptmenge gefunden wurden.



## Linie

**Abbildung 17:** Expression von *Nicotianaminsynthase1* in Wurzeln von *A. halleri* Wildtyp Langelsheim Pflanzen und fünf *NAS2* RNAi-Linien. Die Pflanzen wurden in drei unabhängigen Experimenten mit zusätzlichen  $10 \mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  im Medium angezogen.  $n = 3$ , wobei für jeden Datenpunkt drei Pflanzenproben vereint wurden.

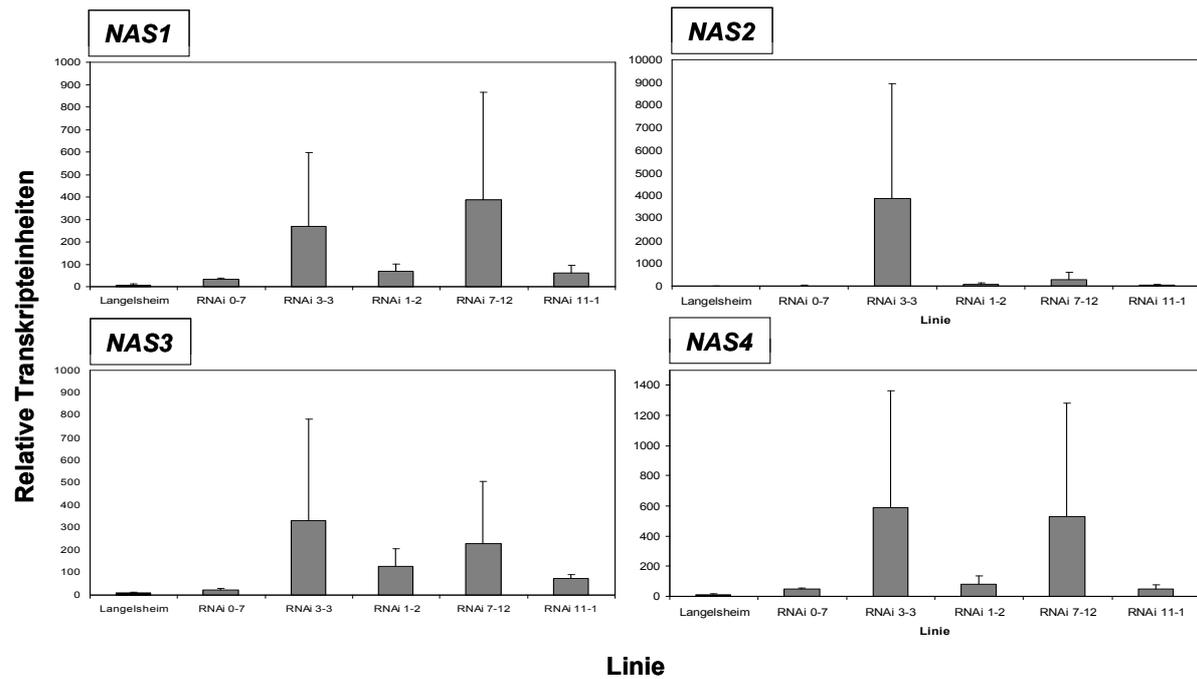
Die RNAi-Linie 1-2 wies im Vergleich zum Wildtyp zwar eine leichte Reduktion des *AhNAS1*-Transkripts auf, in den anderen starken Linien war die Expression jedoch sogar etwas höher. Die Kontrolllinie 0-7 besaß die höchsten Werte, wobei es in der Linie 7-12 starke Schwankungen zwischen den einzelnen Replikaten gab. Aufgrund der deutlich niedrigeren Transkriptniveaus im Vergleich zu *AhNAS2* und der nur sehr geringen und dadurch nicht signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp bzw. Kontrolllinie und den starken RNAi-Linien kann von einer guten Spezifität des RNAi-Effektes für *AhNAS2* ausgegangen werden.



**Abbildung 18:** Expression von *NAS3* und *NAS4* in Wurzeln von *A. halleri* Wildtyp Langelsheim Pflanzen und fünf *NAS2* RNAi-Linien. Die Pflanzen wurden in drei unabhängigen Experimenten mit zusätzlichen  $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$  im Medium angezogen.  $n = 3$ , wobei für jeden Datenpunkt drei Pflanzenproben vereint wurden.  $n = 3$ , wobei für jeden Datenpunkt drei Pflanzenproben vereint wurden.

Wie bereits erwähnt, waren die Transkriptniveaus der *AhNAS*-Isoformen 1, 3 und 4 in Wurzeln um ein Vielfaches niedriger als die von *AhNAS2*. In den in Gegenwart von  $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$  kultivierten Pflanzen waren die *AhNAS3*- und *AhNAS4*-Transkripte jeweils in der starken RNAi-Linie 7-12 am höchsten, wobei die Ergebnisse sehr großen Schwankungen unterlagen. Zwischen den einzelnen Linien konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression von *AhNAS3* und *AhNAS4* nachgewiesen werden.

Im Vergleich der beiden Medien, die niedrige (Kontrolle) bzw. leicht erhöhte ( $10 \mu\text{M}$ ) Zinkkonzentrationen besaßen, ergaben sich keine signifikanten Veränderungen in der Genexpression der verschiedenen *AhNAS*-Isoformen. Die Transkriptmengen der Wildtyppflanzen lagen jeweils in vergleichbaren Bereichen.

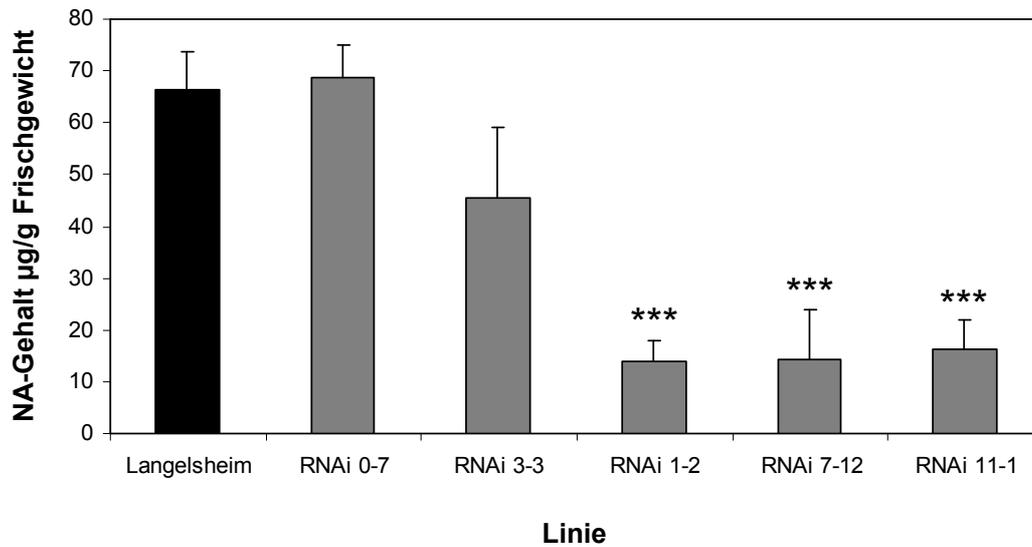


**Abbildung 19:** Expression der vier *NAS*-Isoformen im Spross von *A. halleri* Wildtyp Langelsheim Pflanzen und fünf *NAS2* RNAi-Linien. Die Pflanzen wurden in drei unabhängigen Experimenten mit zusätzlichen  $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$  im Medium angezogen.  $n = 3$ , wobei für jeden Datenpunkt drei Pflanzenproben vereint wurden.

Nach der Bestätigung des für *AhNAS2* spezifischen RNAi-Effektes in den starken Linien 1-2, 7-12 und 11-1 wurden als nächstes, wie schon in den Experimenten mit den verschiedenen *A. halleri* Populationen, die Nicotianamingehalte des Wildtyps Langelsheim und der fünf RNAi-Linien bestimmt.

### 3.2.2. Messungen der NA-Gehalte im Wildtyp Langelsheim und in fünf *AhNAS2* RNAi-Linien

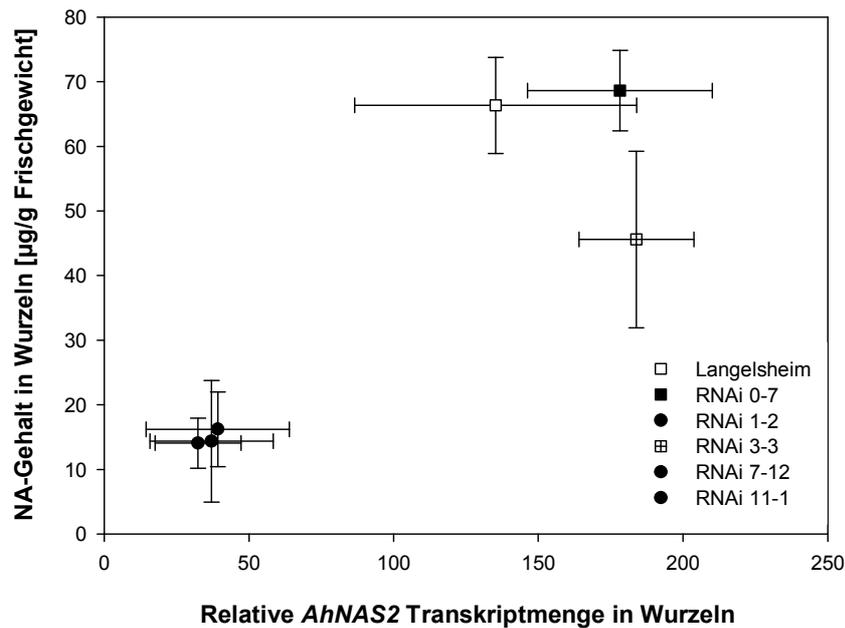
Um die Auswirkungen der Reduktion der *AhNAS2*-Expression in den RNAi-Linien auf den NA-Gehalt zu untersuchen, wurden mit Wildtyppflanzen und den fünf ausgewählten Linien NA-Messungen mittels LC-MS durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Wurzeln der starken Linien 1-2, 7-12 und 11-1 deutlich weniger Nicotianamin enthielten ( $p < 0,001$ ) als die schwachen Linien 0-7 und 3-3 und als der Wildtyp Langelsheim (Abb. 20).



**Abbildung 20:** Nicotianamingehalt in Wurzeln von in drei unabhängigen Experimenten unter Kontrollbedingungen gewachsenen *A. halleri* Wildtyp Langersheim Pflanzen und fünf *NAS2* RNAi-Linien.  $n = 3$ , wobei für jeden Datenpunkt drei Pflanzenproben vereint wurden.

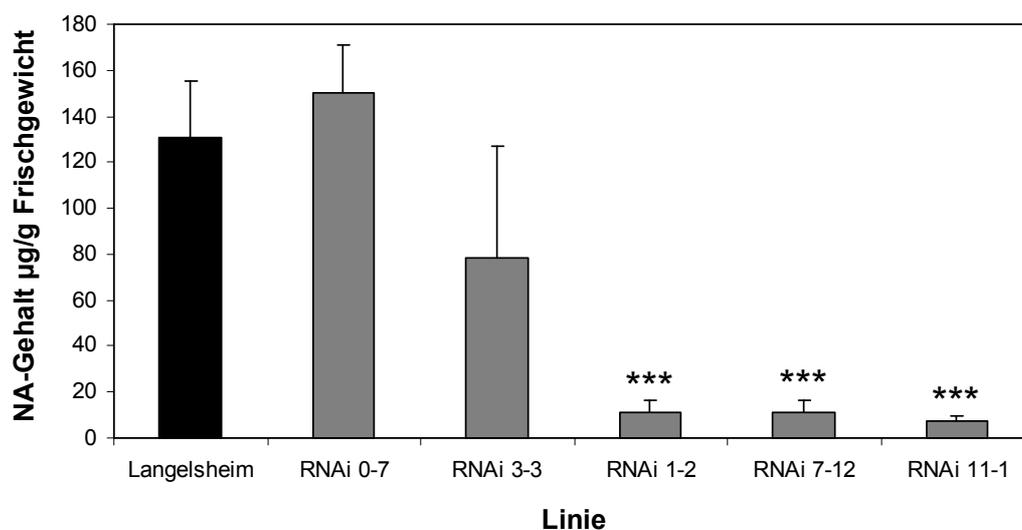
Der NA-Gehalt in den starken Linien betrug lediglich 21,2 bis 24,4 % des im Wildtyp gemessenen Wertes, während zwischen Langersheim und den schwachen Linien kein signifikanter Unterschied messbar war.

Mit den realtime PCR- und LC-MS-Datensätzen wurden Korrelationsanalysen mit SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA) durchgeführt, um zu untersuchen, wie gut die Ergebnisse der Einzelexperimente miteinander verknüpft sind. Für die in Kontrollmedium kultivierten Pflanzen ergab sich ein R-Wert von 0,81 ( $p < 0,001$ ), was für eine sehr gute Korrelation der beiden Datensätze spricht (Abb. 21).



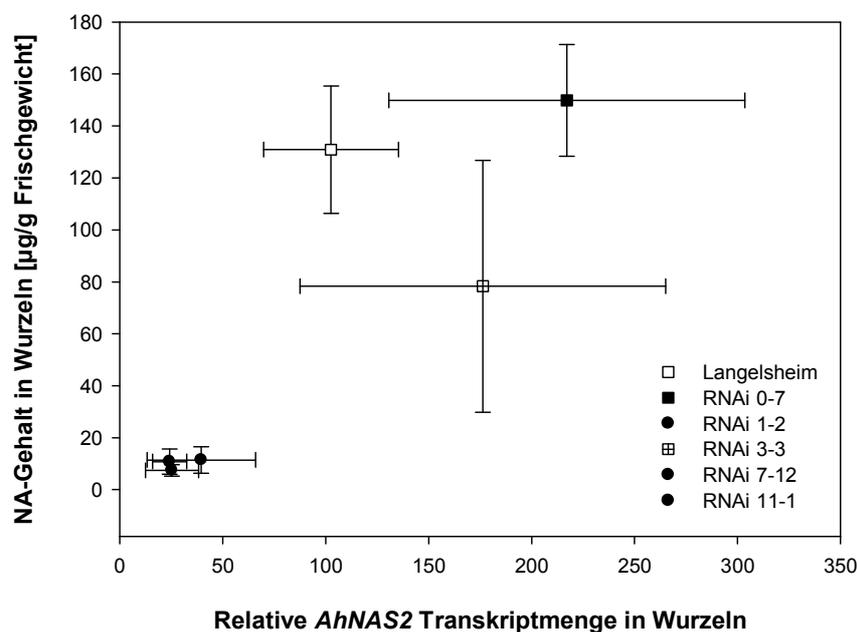
**Abbildung 21:** Korrelation zwischen Ergebnissen der *AhNAS2* Expressionsanalyse und der NA Analytik (Kontrollmedium). Die Experimente wurden jeweils mit Pflanzen des Wildtyps Langelshcim und fünf *AhNAS2* RNAi-Linien durchgeführt. Die Stichprobenzahl lag für beide Datensätze bei  $n = 3$ .

Die bereits unter Kontrollbedingungen beobachtete starke Reduktion des NA-Gehaltes in Wurzeln konnte auch in Pflanzen gezeigt werden, deren hydroponisches Wachstumsmedium mit zusätzlichen  $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$  versetzt wurde (Abb. 22).



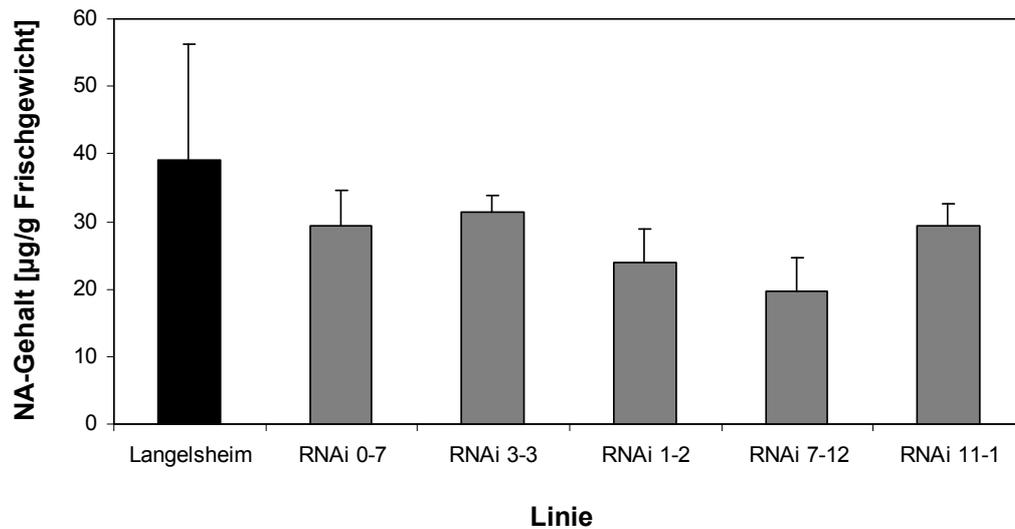
**Abbildung 22:** Nicotamingehalt in Wurzeln von in drei unabhängigen Experimenten in Gegenwart von  $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$  angezogenen *A. halleri* Wildtyp Langelshcim Pflanzen und fünf *NAS2* RNAi-Linien.  $n = 3$ , wobei für jeden Datenpunkt drei Pflanzenproben vereint wurden.

Mit nur noch 5,7 bis 8,7 % des Wildtypwertes waren die NA-Gehalte in den Wurzeln der starken RNAi-Linien hier sogar noch stärker reduziert als in den Kontrollproben. Dieser Effekt ist auch darauf zurückzuführen, dass die Werte der in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  angezogenen Wildtyppflanzen und Kontrolllinien etwa doppelt so hoch waren wie unter Kontrollbedingungen. Erneut wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt, wobei der R-Wert mit 0,75 ( $p < 0,001$ ) ähnlich hoch war wie der für die in Kontrollmedium kultivierten Pflanzen berechnete (Abb. 23).



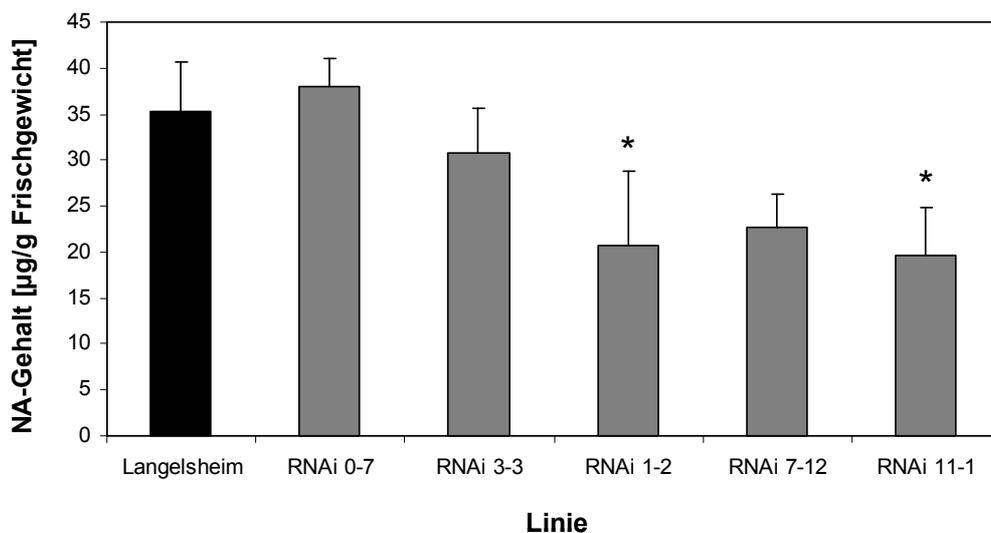
**Abbildung 23:** Korrelation zwischen Ergebnissen der *AhNAS2* Expressionsanalyse und der NA Analytik (zusätzliche 10  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  im Medium). Die Experimente wurden jeweils mit Pflanzen des Wildtyps Langelsheim und fünf *AhNAS2* RNAi-Linien durchgeführt. Die Stichprobenzahl lag für beide Datensätze bei  $n = 3$ .

Die vorangegangene Transkriptanalyse hatte gezeigt, dass es keinen RNAi-Effekt im Blattgewebe der getesteten Pflanzen gab. Nach der Untersuchung der Wurzeln wurden als nächstes auch Blattproben mittels LC-MS vermessen. In den Blatt-NA-Gehalten der Kontrollproben zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, wobei die Konzentrationen zwischen 20 und 39  $\mu\text{g/g}$  Frischgewicht schwankten (Abb. 24). Bisher gab es in der Literatur noch keine Angaben zu NA-Gehalten im Blattgewebe von *A. halleri*. In den vorliegenden Messungen waren die für Wurzeln erhaltenen Werte mindestens vierfach höher als die in Blättern gemessenen Gehalte.



**Abbildung 24:** Nicotianamingehalt in Blättern von in drei unabhängigen Experimenten unter Kontrollbedingungen gewachsenen *A. halleri* Wildtyp Langelsheim Pflanzen und fünf *NAS2* RNAi-Linien.  $n = 3$ , wobei für jeden Datenpunkt drei Pflanzenproben vereint wurden.

Im Gegensatz zu den unter Kontrollbedingungen kultivierten Pflanzen gab es in den in Gegenwart von  $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$  angezogenen leichte NA-Reduktionen in den starken Linien 1-2 und 11-1, die mit 41,5 bzw. 44,7 % sogar signifikant waren (Abb. 25). Der NA-Gehaltsunterschied in der Linie 7-12 von 35,7 % war aufgrund der hohen Variation der Wildtypwerte nicht signifikant.



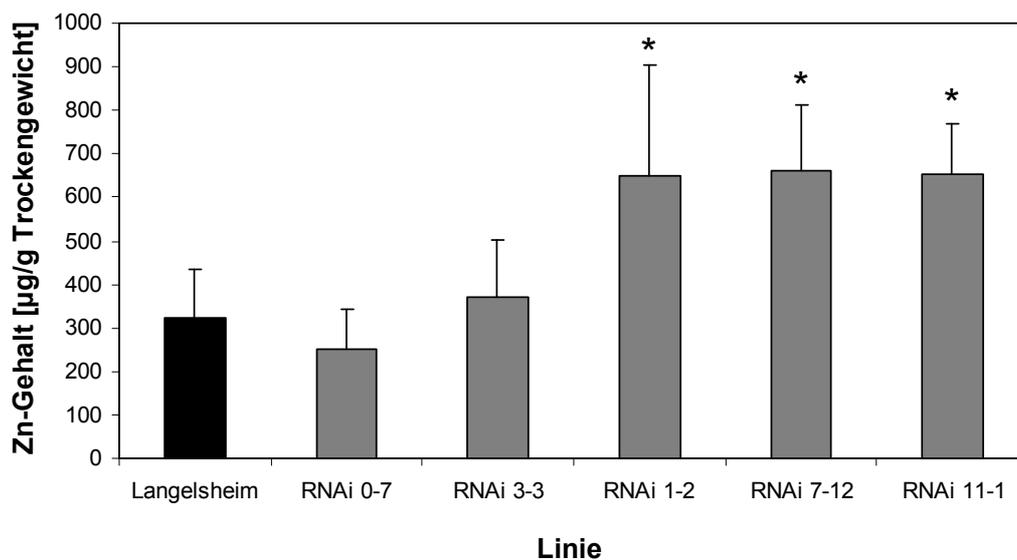
**Abbildung 25:** Nicotianamingehalt in Blättern von in drei unabhängigen Experimenten in Gegenwart von  $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$  angezogenen *A. halleri* Wildtyp Langelsheim Pflanzen und fünf *NAS2* RNAi-Linien.  $n = 3$ , wobei für jeden Datenpunkt drei Pflanzenproben vereint wurden.

Die NA-Gehalte in den Sprossproben der in Gegenwart von  $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$  angezogenen Pflanzen lagen zwischen 20 und  $38 \mu\text{g/g}$  Frischgewicht und damit im selben Bereich wie in den Kontrollproben.

### 3.2.3. Metallprofile von Wildtyp Langelsheim und fünf *AhNAS2* RNAi-Linien

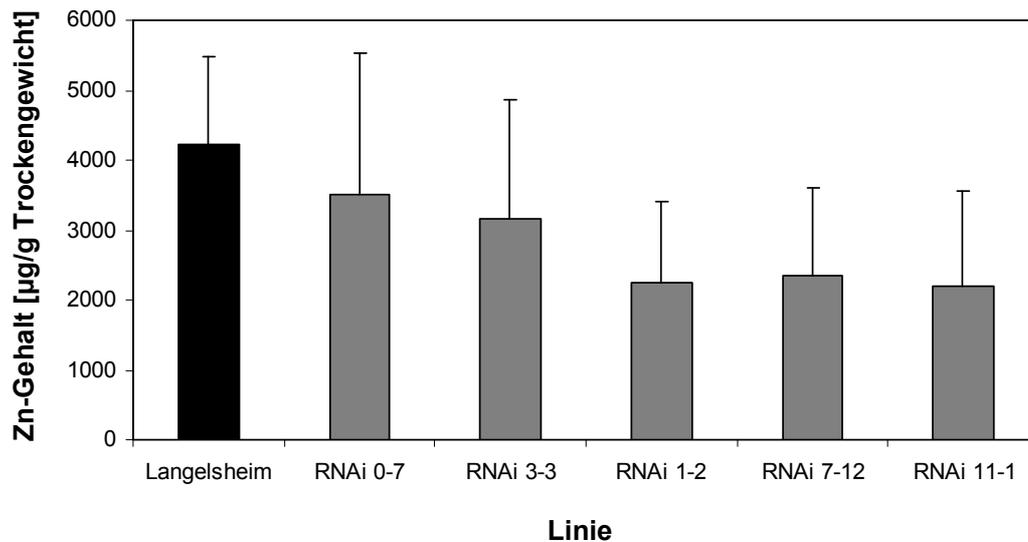
#### 3.2.3.1. Zinkgehalte in Wurzeln und Blättern

Um nun die Auswirkungen des niedrigeren NA-Gehaltes in den Wurzeln der starken RNAi-Linien auf die Metallverteilung innerhalb der Pflanze zu untersuchen, wurde Wurzel- und Blattmaterial der hydroponisch gewachsenen Pflanzen mittels ICP-OES analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Wurzeln der in Gegenwart von  $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$  angezogenen starken RNAi-Linien signifikant mehr Zink enthielten ( $p < 0,05$ ), als der Wildtyp und die schwachen Linien (Abb. 26).



**Abbildung 26:** Wurzelzinkgehalt von in mindestens vier unabhängigen Experimenten in Gegenwart von  $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$  angezogenen *A. halleri* Wildtyp Langelsheim Pflanzen und fünf *NAS2* RNAi-Linien.  $n = 4$  bis  $6$ , wobei für jeden Datenpunkt drei Pflanzenproben vereint wurden.

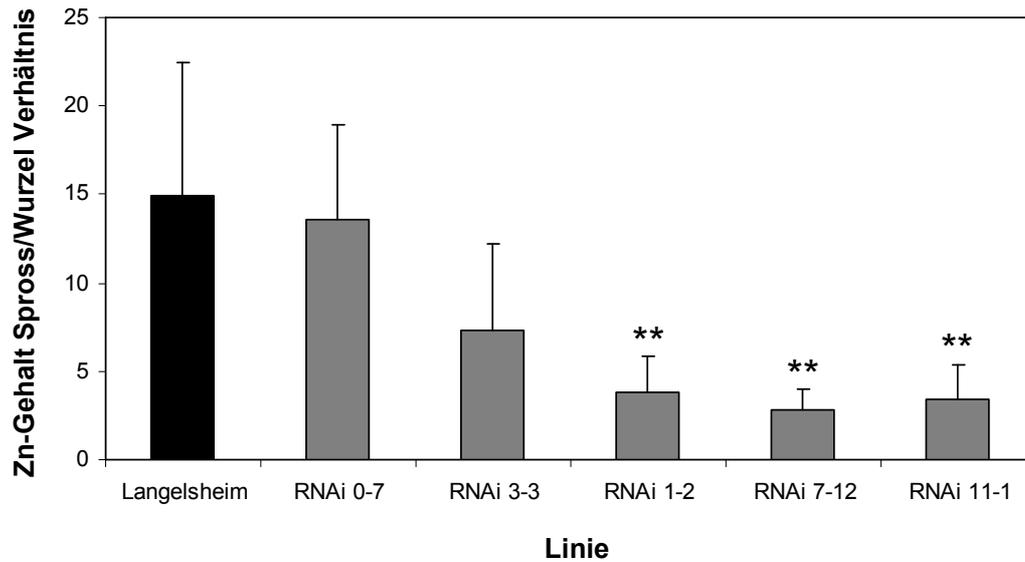
Die gemessenen Werte in den starken Linien waren mehr als doppelt so hoch wie im Wildtyp und der Kontrolllinie 0-7. Eine gegensätzliche Verteilung wurde im Sprossmaterial festgestellt. Hier wurden niedrigere Zinkgehalte in den starken RNAi-Linien als im Wildtyp und in den schwachen Linien gemessen (Abb. 27).



**Abbildung 27:** Sprosszinkgehalt von in mindestens vier unabhängigen Experimenten in Gegenwart von  $10 \mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  angezogenen *A. halleri* Wildtyp Langelshheim Pflanzen und fünf *NAS2* RNAi-Linien.  $n = 4$  bis  $6$ , wobei für jeden Datenpunkt drei Pflanzenproben vereint wurden.

Obwohl die Reduktion der Zinkgehalte in den Blättern der Linien 1-2, 7-12 und 11-1 zwischen 44 und 48 % lag, waren die Unterschiede aufgrund der hohen Variation der Einzelwerte allein betrachtet nicht signifikant. Durch die Berechnung der jeweiligen Verhältnisse von Spross-Zn-Gehalt zu Wurzel-Zn-Gehalt wurde der durch die Herunterregulierung von *NAS2* hervorgerufene Effekt in der Zinkverteilung am deutlichsten.

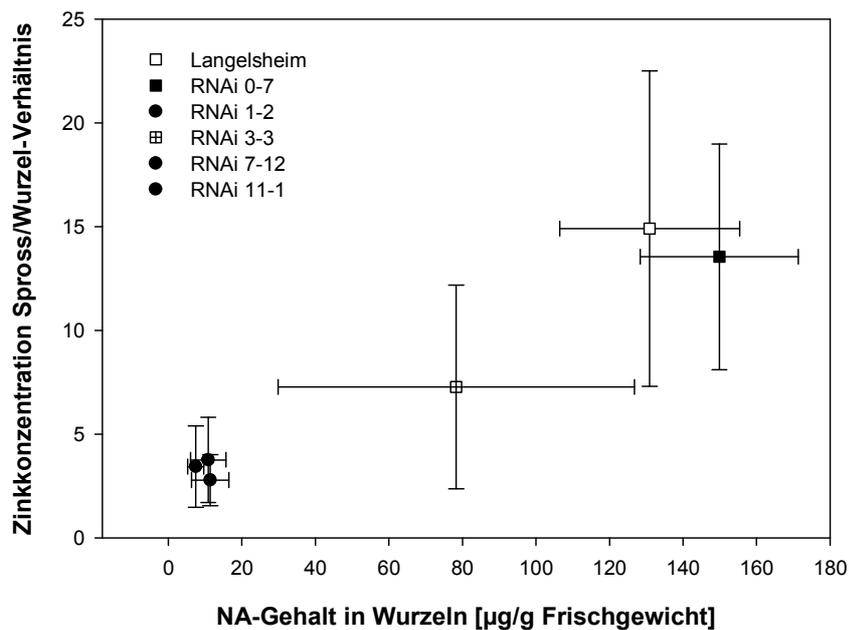
Wie bereits erwähnt, wird in der Literatur ein Verhältnis von Spross-Zn-Gehalt zu Wurzel-Zn-Gehalt, welches größer als 1 ist, als Indikator für Zink-Hyperakkumulation verwendet (Talke *et al.*, 2006). In den analysierten Wildtyppflanzen lag dieser Wert zwischen 15 und 20, während er in allen starken RNAi-Linien unter 4 lag und somit, verglichen mit Langelshheim, mehr als vierfach reduziert war (Abb. 28).



**Abbildung 28:** Spross/Wurzel-Verhältnis des Zinkgehalts von in mindestens vier unabhängigen Experimenten in Gegenwart von  $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$  angezogenen *A. halleri* Wildtyp Langelshheim Pflanzen und fünf *NAS2* RNAi-Linien.  $n = 4$  bis  $6$ , wobei für jeden Datenpunkt drei Pflanzenproben vereint wurden.

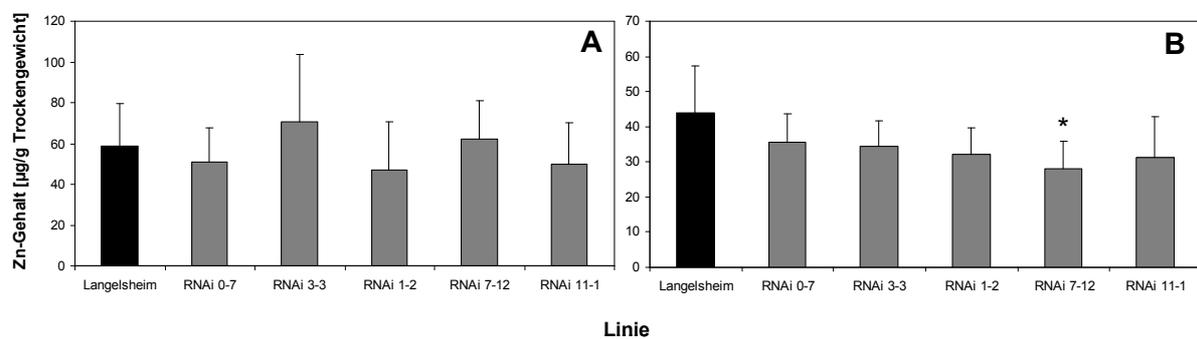
Dies zeigt, dass in *A. halleri*, allein durch das Herunterregulieren von *NAS2*, aus einem Zn-Hyperakkumulierer fast eine nicht-hyperakkumulierende Pflanze gemacht werden kann.

Wie bereits die realtime PCR-Daten wurden auch die Ergebnisse aus den ICP-OES-Messungen in Korrelationsanalysen mit dem LC-MS-Datensatz verglichen. Für die in Gegenwart von  $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$  angezogenen Proben ergab sich ein R-Wert von  $0,82$  ( $p < 0,001$ ) und somit erneut eine sehr gute Korrelation (Abb. 29).



**Abbildung 29:** Korrelation zwischen Ergebnissen der NA Analytik und der Zinkgehalte (in Gegenwart von 10  $\mu\text{M Zn}^{2+}$  angezogenen Proben). Die Experimente wurden jeweils mit Pflanzen des Wildtyps Langelshheim und fünf *AhNAS2* RNAi-Linien durchgeführt.

Im Gegensatz zu den für die Verhältnisse der mit zusätzlichem  $\text{Zn}^{2+}$  angezogenen Proben erhaltenen Werte ( $p < 0,01$ ) konnten in den Kontrollpflanzen, weder in den Einzelmessungen von Blättern und Wurzeln (Abb. 30) noch nach Berechnung der Verhältnisse, signifikante Unterschiede in der Zinkverteilung zwischen Kontrolllinien und starken RNAi-Linien nachgewiesen werden.



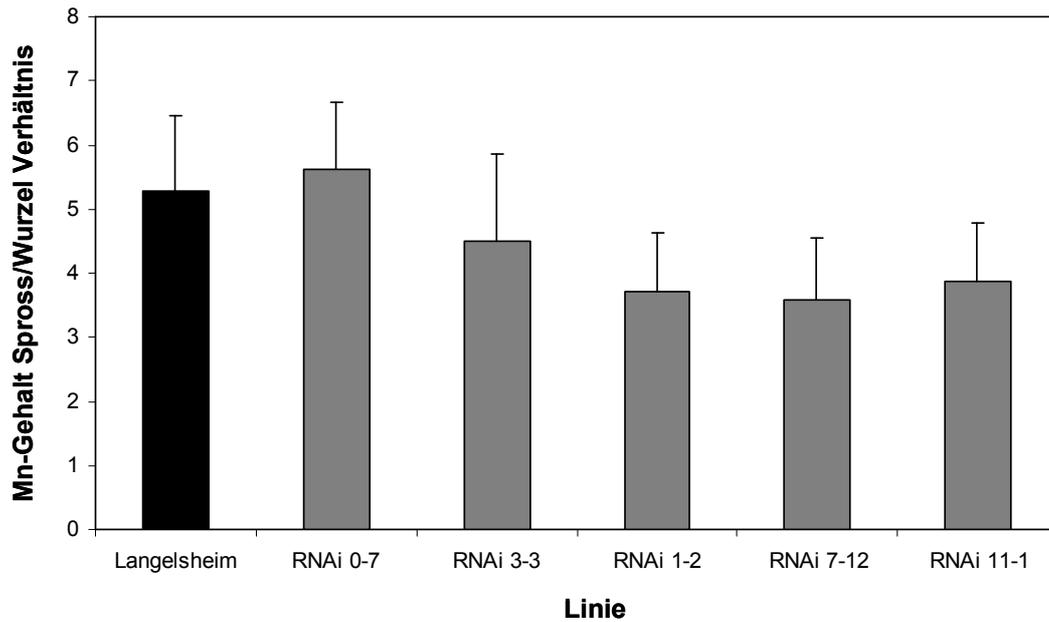
**Abbildung 30:** Zinkgehalt im Spross (A) und in den Wurzeln (B) von in mindestens vier unabhängigen Experimenten unter Kontrollbedingungen gewachsenen *A. halleri* Wildtyp Langelshheim Pflanzen und fünf *NAS2* RNAi-Linien.  $n = 4$  bis  $5$ , wobei für jeden Datenpunkt drei Pflanzenproben vereint wurden.

Sowohl in Wurzeln als auch in Blättern lagen die Gehalte der einzelnen Linien etwa im selben Bereich, wobei nur die leichte Reduktion im Wurzelzinkgehalt der Linie 7-12 signifikant war. Ferner lag das Verhältnis von Spross-Zn-Gehalt zu Wurzel-Zn-Gehalt im Wildtyp Langelshelm unter Kontrollbedingungen durchschnittlich bei lediglich 1,4. Wie aus Abbildung 28 deutlich wird, war es in Gegenwart von  $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$  auf 14,9 erhöht. Dies verdeutlicht, dass unter den im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Kontrollbedingungen mit  $0,077 \mu\text{M Zn}^{2+}$  im Wachstumsmedium nur sehr geringe Zinkhyperakkumulation möglich ist. Die zugegebenen  $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$  führen zu einer deutlichen Erhöhung der Zinkanreicherung im Spross.

#### 3.2.3.2. Mangan- und Eisengehalte in Wurzeln und Blättern

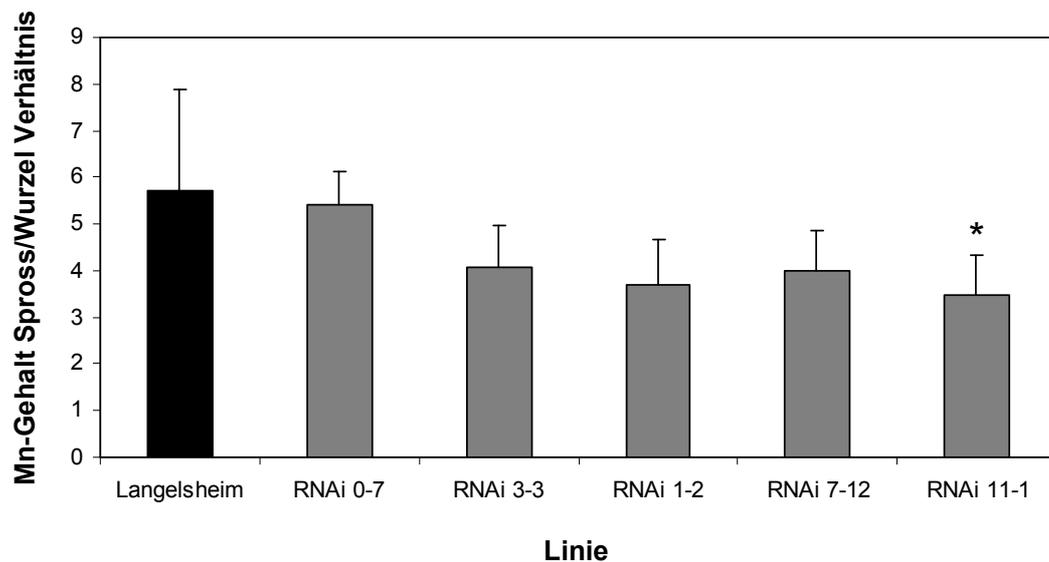
Neben Zink sind Eisen und Mangan weitere essentielle Mikronährstoffe, die *in vitro* Komplexe mit NA formen können (Beneš *et al.*, 1983; von Wiren *et al.*, 1999; Rellán-Álvarez *et al.*, 2008; Curie *et al.*, 2009). Auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass Tabakpflanzen mit niedrigerem NA-Gehalt weniger Eisen in den Blättern enthielten und chlorotisch waren (Takahashi *et al.*, 2003). Durch Zugabe von Eisen in Kombination mit NA konnten die Eisengehalte erhöht werden und die Blätter verloren den chlorotischen Phänotyp. Diese Verbesserung konnte jedoch nicht durch die alleinige Zugabe von Eisen bzw. durch die kombinierte Zugabe von Eisen und Citrat erreicht werden. Dies deutet stark darauf hin, dass NA Komplexe mit Eisen bildet und in den Transport involviert ist (Takahashi *et al.*, 2003).

Um den Einfluss des reduzierten NA-Gehalts in Wurzeln der starken RNAi-Linien auf die Verteilung von Eisen und Mangan in *A. halleri* zu untersuchen, wurden die ICP-OES-Daten wie bereits für Zink ausgewertet. Sowohl die in Kontrollmedium als auch die mit zusätzlichem Zink angezogenen starken RNAi-Linien zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine leichte Reduktion des Mangan-Spross/Wurzel-Verhältnisses, wobei nur der für die Linie 11-1 nach Zinkbehandlung erhaltene Wert signifikant war ( $P < 0,05$ ) (Abb. 31, 32).



**Abbildung 31:** Mangan-Spross/Wurzel Verhältnis von in mindestens vier unabhängigen Experimenten unter Kontrollbedingungen gewachsenen *A. halleri* Wildtyp Langelsheim Pflanzen und fünf *NAS2* RNAi-Linien.  $n = 4$  bis  $5$ , wobei für jeden Datenpunkt drei Pflanzenproben vereint wurden.

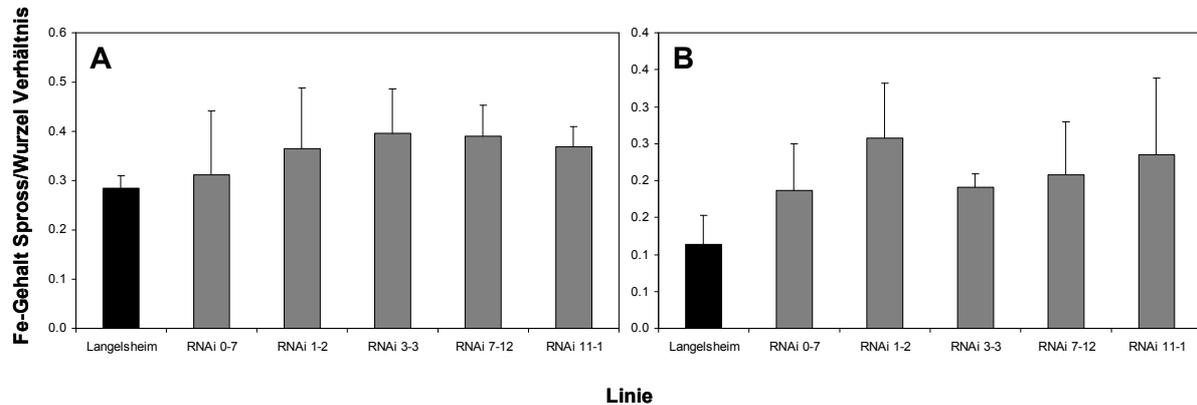
Die Verhältniswerte lagen unter beiden getesteten Bedingungen im gleichen Bereich von 3,4 bis 5,7.



**Abbildung 32:** Mangan-Spross/Wurzel Verhältnis von in mindestens vier unabhängigen Experimenten in Gegenwart von  $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$  angezogenen *A. halleri* Wildtyp Langelsheim Pflanzen und fünf *NAS2* RNAi-Linien.  $n = 4$  bis  $6$ , wobei für jeden Datenpunkt drei Pflanzenproben vereint wurden.

Die p-Werte für den Vergleich der Linien 1-2 und 7-12 zum Wildtyp lagen nach Zinkbehandlung bei 0,88 bzw. 0,179.

Die Eisen-Spross/Wurzel-Verhältnisse waren in den mit zusätzlichem Zink gewachsenen Pflanzen in der Regel niedriger als in den Kontrollpflanzen, wobei keiner der Vergleiche von Wildtyp zu transgenen Linien einen signifikanten Unterschied ergab (Abb. 33).



**Abbildung 33:** Eisen-Gehalt Spross/Wurzel Verhältnisse von in mindestens vier unabhängigen Experimenten unter Kontrollbedingungen gewachsenen (A) bzw. von in Gegenwart von 10 µM Zn<sup>2+</sup> angezogenen (B) *A. halleri* Wildtyp Langelsheim Pflanzen und fünf *NAS2* RNAi-Linien. n = 3.

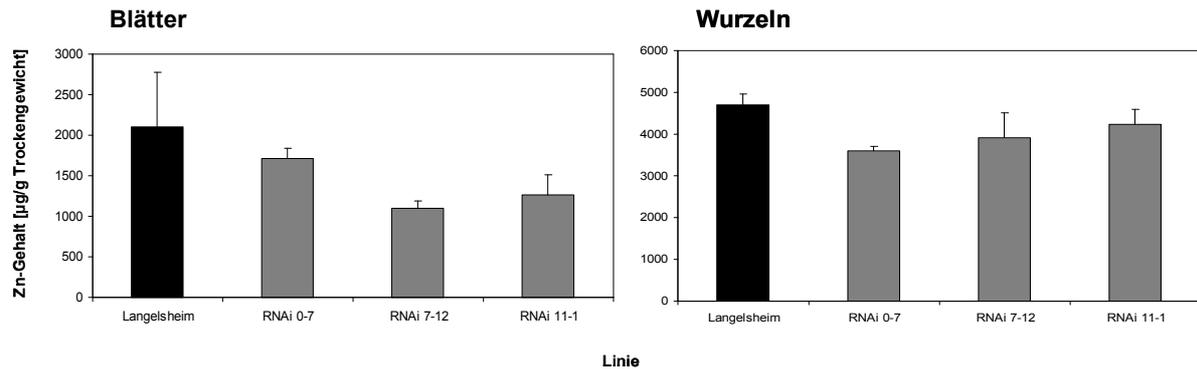
Für die Spross/Wurzel-Verhältnisse von Kupfer ergab sich eine sehr hohe Variation in den Messwerten, wobei ebenfalls keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.4. Toleranzexperimente

#### 3.2.4.1. Kurzzeitexperimente unter Zinküberschussbedingungen

Die Experimente mit zinkhypersensitiven *S. pombe* Zellen von Weber und Mitarbeitern (2004) deuteten darauf hin, dass *NAS*-Expression und die damit verbundene Bildung von NA einen positiven Einfluss auf die Zinkhypertoleranz haben. Diese Hypothese sollte mit den *AhNAS2* RNAi-Linien im hydroponischen Medium getestet werden.

Um zu überprüfen, ob sich das Wachstum der starken RNAi-Linien im Vergleich zum Wildtyp unter Zinküberschussbedingungen verändert, wurde ein Teil der Pflanzen unter Kontrollbedingungen und der andere mit zusätzlichen 300 µM Zn<sup>2+</sup> im Medium kultiviert. Das Pflanzenmaterial wurde diesmal nicht nach drei Wochen, sondern bereits nach zwei Tagen gerntet. Die Vermessung mit ICP-OES ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Linien (Abb. 34).



**Abbildung 34:** Zinkgehalte in Blättern und Wurzeln von Wildtyp Langelsheim Pflanzen und drei *NAS2* RNAi-Linien nach zweitägiger Behandlung mit 300 µM Zn<sup>2+</sup>. n = 3.

Es deuteten sich zwar niedrigere Zinkkonzentrationen im Blattgewebe der beiden starken Linien an, in den Wurzeln konnte jedoch nicht das Gegenteil, also signifikant weniger Zink im Wildtyp, gemessen werden. Im Gegensatz zu den Langzeitexperimenten, bei denen die Pflanzen für drei Wochen kultiviert wurden, waren die Spross/Wurzel-Verhältnisse der Zinkgehalte in allen getesteten Pflanzen kleiner als 1 und die Zinkgehalte im Sprossmaterial lagen nicht über 2700 µg/g Trockengewicht. Dies bedeutet, dass nach der relativ kurzen Kultivierungsphase von zwei Tagen noch keine Hyperakkumulation des Zinks vorliegt. Es muss erwähnt werden, dass der Versuchansatz nur einmal durchgeführt wurde und dass aufgrund der fehlenden Unterschiede zwischen den analysierten Linien auf weitere Replikate verzichtet wurde. In weiteren Zinküberschussversuchen wurden die Pflanzen, wie bereits in den Langzeitexperimenten mit 10 µM Zn<sup>2+</sup> für drei Wochen in Gegenwart von 300 µM Zn<sup>2+</sup> angezogen.

#### 3.2.4.2. Langzeitexperimente unter Zinküberschussbedingungen

In flüssigem Hoaglandmedium kann eine maximale Konzentration von 300 µM Zn<sup>2+</sup> erreicht werden, ohne dass das Zink ausfällt und präzipitiert. Pflanzen des Wildtyps Langelsheim, der Kontroll-RNAi-Linie 0-7 und der starken RNAi-Linie 1-2 wurden für drei Wochen in Kontrollmedium bzw. in Gegenwart von 300 µM Zn<sup>2+</sup> kultiviert. Die unter Zinküberschuss angezogenen Pflanzen zeigten keine Toxizitätssymptome, wobei die Sprosse sogar eine größere Biomasse aufwiesen, als die der Kontrollpflanzen (Abb. 35). Die Wurzellängen und -gewichte der unter Zinküberschuss angezogenen Pflanzen waren in allen getesteten Linien vergleichbar.



**Abbildung 35:** Pflanzen des Wildtyps Langelsheim, die in hydroponischem Medium unter Kontrollbedingungen bzw. mit zusätzlichen 300 µM Zn<sup>2+</sup> kultiviert wurden.

Aus Abb. 35 geht deutlich hervor, dass die mit zusätzlichem Zink kultivierten Pflanzen eine größere Biomasse besaßen als die unter Kontrollbedingungen gewachsenen. Die Tatsache, dass sich im Vergleich der Kontrolllinien mit den starken RNAi-Linien nach Wachstum mit zusätzlichen 300 µM Zn<sup>2+</sup> im Medium keine phänotypischen Unterschiede ergaben, deutet darauf hin, dass eine Reduktion des NA-Gehaltes in Wurzeln keine Auswirkungen auf die Zinktoleranz der Pflanze hat.

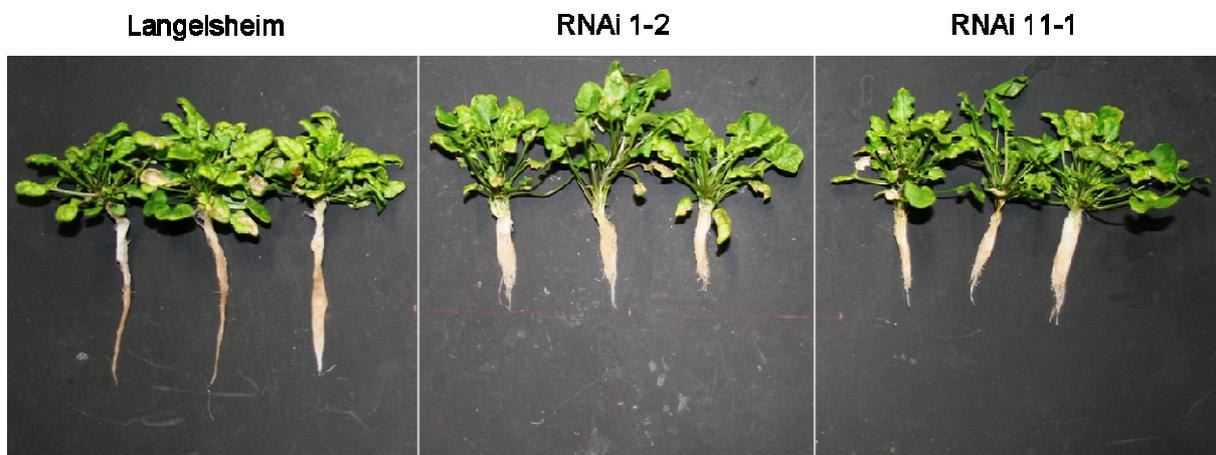
#### 3.2.4.3. Toleranzexperimente mit erhöhten Nickel- und Cadmiumkonzentrationen

Wie bereits erwähnt, ist *A. halleri* in der Lage sowohl Zink als auch Cadmium im Sprossgewebe zu hyperakkumulieren. Des Weiteren wurde in der Literatur bereits ein Zusammenhang zwischen dem NA-Gehalt und der Nickeltoleranz in *A. thaliana* beschrieben (Pianelli *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005). Um den Einfluss der reduzierten Expression von *AhNAS2* auf die Nickel- und Cadmiumverteilung zu untersuchen, wurden Pflanzen des Wildtyps Langelsheim, der schwachen RNAi-Linie 0-7 und der beiden starken Linien 1-2 und 11-1 hydroponisch unter Kontrollbedingungen, mit zusätzlichen 2 µM CdCl<sub>2</sub> bzw. mit zusätzlichen 5 µM NiCl<sub>2</sub> im Wachstumsmedium kultiviert. Unter Kontrollbedingungen und nach Cadmiumzugabe konnten zwischen den getesteten Linien keine Unterschiede im Wurzelwachstum festgestellt werden (Abb. 36, Tab. 9).



**Abbildung 36:** Pflanzen des Wildtyps Langelsheim, der Kontrolllinie RNAi 0-7 und der beiden starken RNAi-Linien 1-2 und 11-1, die in hydroponischem Medium mit zusätzlichen  $2 \mu\text{M Cd}^{2+}$  kultiviert wurden.

Die Wurzeln der Kontroll- und der starken RNAi-Linien hatten vergleichbare Längen und Gewichte, wobei jeweils die Längen nach Zugabe von Cadmium zum Wachstumsmedium verglichen mit den Kontrollen zunahmen und die Wurzelstärken abnahmen, d.h. die Wurzeln dünner wurden (Tab. 9).



**Abbildung 37:** Pflanzen des Wildtyps Langelsheim und der beiden starken RNAi-Linien 1-2 und 11-1, die in hydroponischem Medium mit zusätzlichen  $5 \mu\text{M NiCl}_2$  kultiviert wurden.

Die Zugabe von  $5 \mu\text{M NiCl}_2$  führte zu einer starken Chlorosisausprägung in den Blättern aller getesteten Linien. Außerdem war das Wurzellängenwachstum stark reduziert. Wie aus den Abbildungen 37 und 38 deutlich wird, waren die Wurzellängen der beiden starken RNAi-Linien im Vergleich zum Wildtyp und der schwachen Linie 0-7 noch einmal signifikant verkürzt und die Wurzeln zeigten ein buschigeres Wachstum. Da es in der ersten Durchführung des Versuchsansatzes keine Unterschiede im Sprosswachstum zwischen den unter Kontrollbedingungen und den in Gegenwart von  $2 \mu\text{M Cd}^{2+}$  kultivierten Pflanzen gab, wurde die Cadmiumkonzentration in der zweiten Experimentrunde auf  $10 \mu\text{M}$  erhöht. Des Weiteren wurde für das Folgeexperiment auf die Analyse der starken RNAi-Linie 11-1 verzichtet. Die Erhöhung des Cadmiumgehaltes im Wachstumsmedium resultierte in Toxizitätssymptomen aller getesteten Linien, die denen unter Nickelüberschuss erhaltenen ähnlich waren. So entstanden starke Chlorosen und die Biomasse war im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert. Wie bereits erwähnt, wurden neben den Nickel- und Cadmiumüberschussbedingungen auch Pflanzen in Gegenwart von  $300 \mu\text{M Zn}^{2+}$  kultiviert. Diese Konzentration ist für normale Pflanzen toxisch, wobei alle im Rahmen dieses Experiments getesteten Linien gleich gut und sogar noch besser als unter Kontrollbedingungen wuchsen. In Abb. 38 ist eine Gegenüberstellung von in Gegenwart von  $300 \mu\text{M Zn}^{2+}$ ,  $5 \mu\text{M Ni}^{2+}$  und  $10 \mu\text{M Cd}^{2+}$  angezogenen Pflanzen zu sehen.

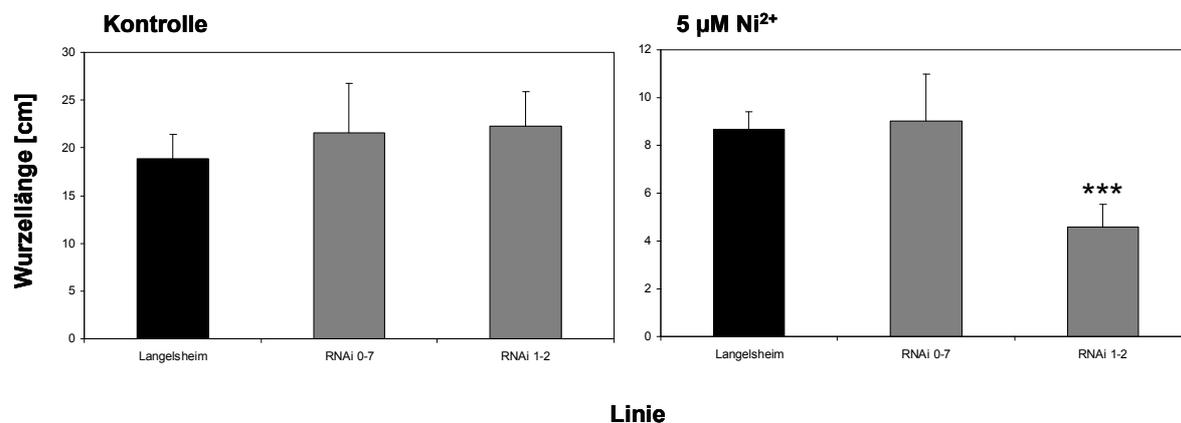


**Abbildung 38:** Pflanzen des Wildtyps Langelsheim, der Kontrolllinie 0-7 und der starken RNAi-Linie 1-2, die in hydroponischem Medium in Gegenwart von  $300 \mu\text{M Zn}^{2+}$ ,  $5 \mu\text{M Ni}^{2+}$ , bzw.  $10 \mu\text{M Cd}^{2+}$  kultiviert wurden.

Sowohl die unter Nickel- als auch die unter Cadmiumüberschuss gewachsenen Pflanzen wiesen starke Toxizitätssymptome auf. Von allen Proben wurden das Wurzelfrischgewicht und die Wurzellänge gemessen. Die Gewichte sind in Tabelle 9 aufgeführt, während in Abbildung 39 der Vergleich zwischen dem Wurzelwachstum unter Kontroll- und unter Nickelüberschussbedingungen graphisch dargestellt ist.

**Tabelle 9:** Wurzelfrischgewichte der in Kontrollmedium (K) und mit zusätzlichen 2  $\mu\text{M Cd}^{2+}$ , 10  $\mu\text{M Cd}^{2+}$ , 5  $\mu\text{M Ni}^{2+}$  bzw. 300  $\mu\text{M Zn}^{2+}$  kultivierten Pflanzen des Wildtyps Langelsheim und der RNAi-Linien 0-7, 1-2 und 11-1. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD. n = 3 bis 6.

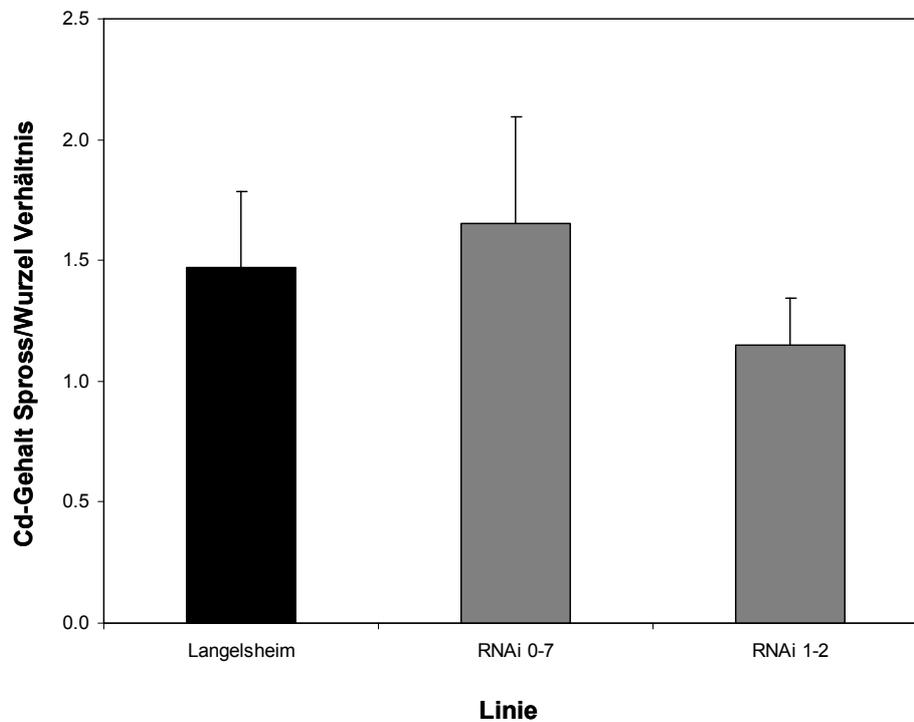
	Wurzelfrischgewicht [g]				
	K	2 $\mu\text{M Cd}^{2+}$	10 $\mu\text{M Cd}^{2+}$	5 $\mu\text{M Ni}^{2+}$	300 $\mu\text{M Zn}^{2+}$
<b>Langelsheim</b>	0,54 $\pm$ 0,25	0,48 $\pm$ 0,14	0,20 $\pm$ 0,06	0,16 $\pm$ 0,04	0,36 $\pm$ 0,13
<b>RNAi 0-7</b>	0,52 $\pm$ 0,28	0,49 $\pm$ 0,16	0,27 $\pm$ 0,10	0,15 $\pm$ 0,05	0,47 $\pm$ 0,12
<b>RNAi 1-2</b>	0,59 $\pm$ 0,25	0,55 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,08	0,11 $\pm$ 0,04	0,28 $\pm$ 0,06
<b>RNAi 11-1</b>	0,67 $\pm$ 0,12	0,45 $\pm$ 0,28	-	0,11 $\pm$ 0,03	-



**Abbildung 39:** Wurzellängen von Pflanzen des Wildtyps Langelsheim und der RNAi-Linien 0-7 und 1-2, die unter Kontrollbedingungen bzw. in Gegenwart von 5  $\mu\text{M Ni}^{2+}$  im Medium kultiviert wurden. n = 6.

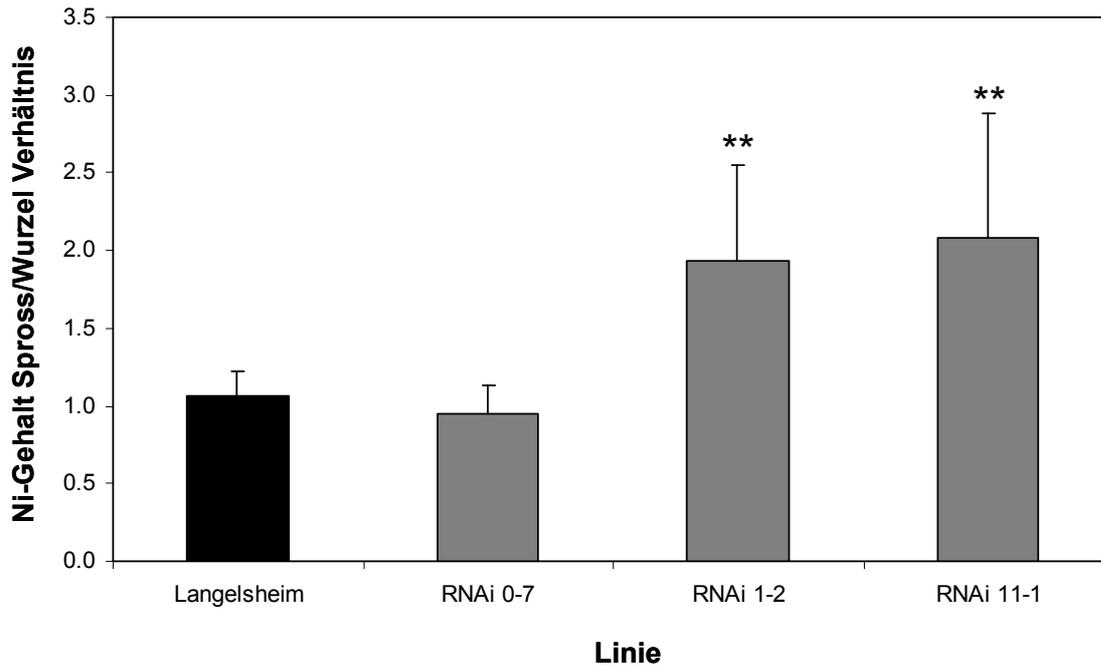
Die Wurzellängen aller getesteten Linien waren unter Kontrollbedingungen und nach Wachstum in Gegenwart von 10  $\mu\text{M Cd}^{2+}$  vergleichbar, während sie nach Kultivierung mit zusätzlichen 2  $\mu\text{M Cd}^{2+}$  deutlich erhöht waren. Die Zugabe von 300  $\mu\text{M Zn}^{2+}$  bewirkte ein verbessertes Sprosswachstum aller Pflanzen, wobei die Wurzeln im Vergleich zu den Kontrollen leicht verkürzt waren. Wie bereits erwähnt, resultierten zusätzliche 5  $\mu\text{M Ni}^{2+}$  in einer starken Wurzelwachstumsreduktion aller getesteten Pflanzen, wobei die Wurzeln der starken RNAi-Linien noch einmal signifikant kürzer waren als die der Kontrolllinien (Abb. 37, 39). Nach der Bestimmung der Wurzellängen und –frischgewichte wurde mit ICP-

OES ein Metallprofil der Pflanzen erstellt. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und starken RNAi-Linien hinsichtlich der Zink- und Cadmiumgehalte in Wurzeln und Blättern. Lediglich nach Kultivierung in Gegenwart von  $10 \mu\text{M Cd}^{2+}$  deutete sich der leichte Trend an, dass das Cadmiumgehalt-Spross/Wurzel-Verhältnis in der starken RNAi-Linie niedriger war als in den Kontrolllinien (Abb. 40).



**Abbildung 40:** Spross/Wurzel-Verhältnis des Cadmiumgehalts von Pflanzen des Wildtyps Langelsheim, der Kontroll-RNAi-Linie 0-7 und der starken RNAi-Linie 1-2, die in Gegenwart von  $10 \mu\text{M Cd}^{2+}$  kultiviert wurden.  $n = 3$ .

Des Weiteren ergaben sich in den Nickelkonzentrationen in Wurzeln signifikante Unterschiede zwischen den getesteten Linien. Die Werte des Wildtyps Langelsheim waren 46 bzw. 86 % höher als die der starken RNAi-Linien, während die Nickelgehalte in den Wurzeln der Kontrolllinie 0-7 sogar um 209 bzw. 266 % erhöht waren. Die Blattnickelgehalte waren in allen Linien vergleichbar. In Abbildung 41 sind die Spross/Wurzel-Verhältnisse der Nickelgehalte aller in Gegenwart von  $5 \mu\text{M Ni}^{2+}$  kultivierten Pflanzen dargestellt.



**Abbildung 41:** Spross/Wurzel-Verhältnis des Nickelgehalts von Pflanzen des Wildtyps Langelsheim, der Kontroll-RNAi-Linie 0-7 und der starken RNAi-Linien 1-2 und 11-1, die in Gegenwart von  $5 \mu\text{M Ni}^{2+}$  kultiviert wurden.  $n = 9$ , nur für Linie 11-1 gilt  $n = 3$ .

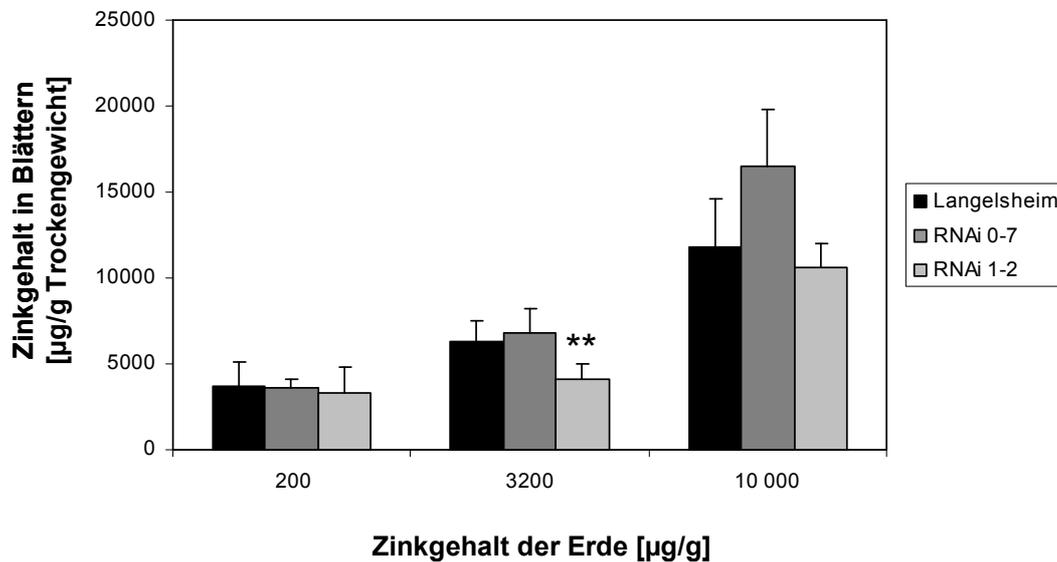
In den beiden starken RNAi-Linien war das Spross/Wurzel-Verhältnis signifikant erhöht, was auf die deutlich niedrigeren Nickelgehalte in den Wurzeln zurückzuführen ist. Die Durchführung der statistischen Analyse der Daten ergab  $p < 0,01$  für beide starken Linien und sogar  $p < 0,001$  für den Vergleich der beiden Kontrolllinien nur mit Linie 1-2 und Vernachlässigung der drei Werte für Linie 11-1. Dies deutet darauf hin, dass die Reduktion des NA-Gehaltes in den Wurzeln der starken RNAi-Linien in einer Veränderung des Nickeltransports resultiert.

### 3.3. Experimente mit kontaminierter Erde

#### 3.3.1. Pflanzenanzucht in artifiziell kontaminierter Erde

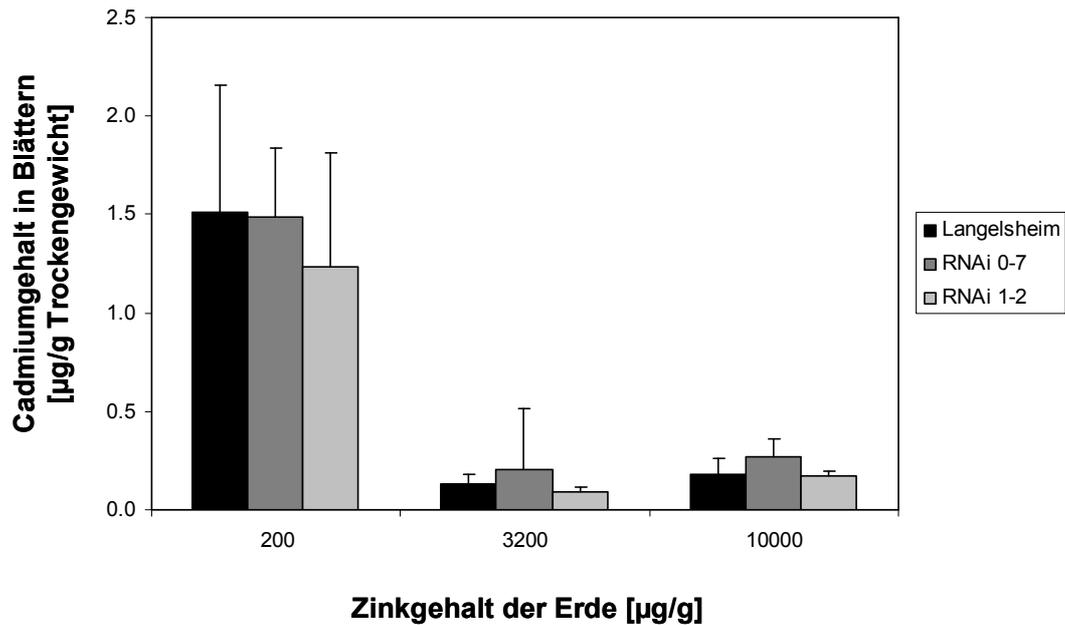
Da das Wachstum im hydroponischen Medium nicht den Bedingungen in der freien Natur entspricht, sollten nun Pflanzen unter natürlicheren Umständen kultiviert werden. Hierfür wurden zwei verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt. Zum einen wurde mineralische Wachstums Erde mit definierten Mengen an Zink artifiziell kontaminiert und diese Erde für die Pflanzenanzucht verwendet. Es wurden Zn-Konzentrationen von  $200 \mu\text{g/g}$  (Kontrolle),  $3200 \mu\text{g/g}$  und  $10000 \mu\text{g/g}$  gewählt, wobei  $3200 \mu\text{g/g}$  eine Konzentration darstellt, bei der die als zusätzliche Kontrollen verwendeten *A. thaliana* Wildtyppflanzen noch überleben können.

Nach einer Kultivierungszeit von etwa vier Wochen wurde vom Blattmaterial der Pflanzen mittels ICP-OES ein Metallprofil erstellt. Die gezeigten Werte basieren auf zwei unabhängigen Experimenten (Abb. 42).



**Abbildung 42:** Zinkgehalte im Spross von Wildtyp Langelsheim Pflanzen und den RNAi-Linien 0-7 und 1-2, die in zwei unabhängigen Experimenten für jeweils einen Monat auf artifiziell kontaminierter Erde kultiviert wurden. n = 6 bis 9.

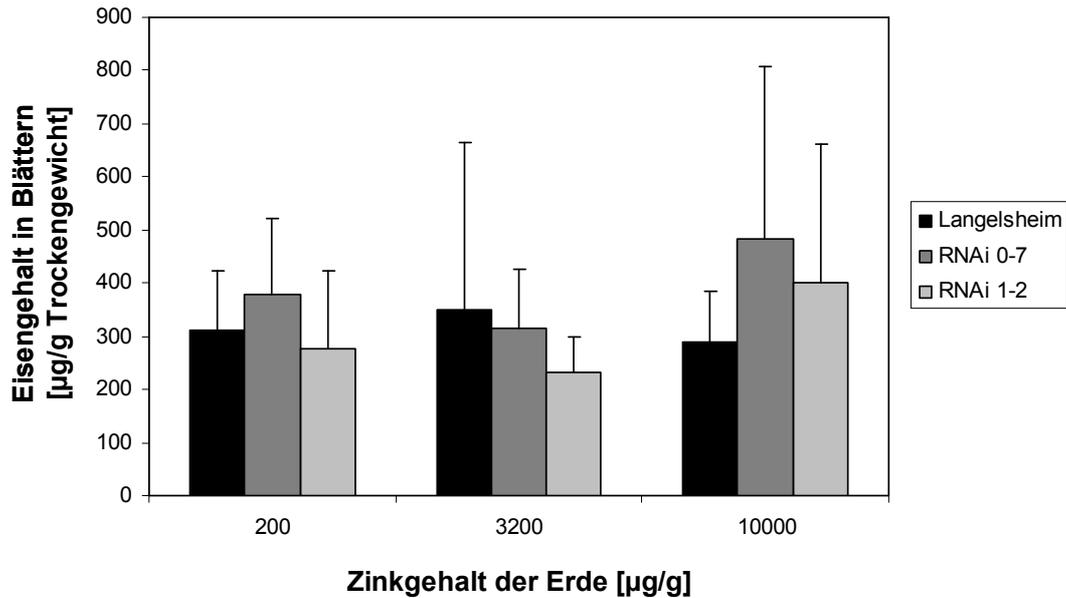
Der Zn-Hyperakkumulationsschwellenwert von 10000 µg/g Trockengewicht im Blattgewebe wurde nur auf der mit 10000 µg/g Zn kontaminierten Erde erreicht. Unter Kontrollbedingungen konnte zwischen den getesteten Linien kein Unterschied im Zinkgehalt der Blätter gemessen werden, während nach Wachstum auf der 3200 µg/g Zn enthaltenden Erde eine signifikante Reduktion um 35 % in der starken RNAi Linie festgestellt wurde. Die Inkubation auf der mit 10000 µg/g Zn sehr stark kontaminierten Erde führte zu keinem Unterschied zwischen Wildtyp und starker RNAi Linie, wobei die Zinkgehalte in der Kontrolllinie 0-7 um 18 bzw. 36 % höher waren als in den anderen beiden Linien. Auf allen drei Erdtypen waren die Cadmiumgehalte der kultivierten Pflanzen sehr niedrig, was darauf zurückzuführen ist, dass die Erde nur Spuren dieses Schwermetalls enthielt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrolllinien und der RNAi-Linie 1-2 gemessen werden (Abb. 43).



**Abbildung 43:** Cadmiumgehalte im Spross von Wildtyp Langelshiem Pflanzen und den RNAi-Linien 0-7 und 1-2, die in zwei unabhängigen Experimenten für jeweils einen Monat auf Kontrollerde kultiviert wurden. n = 7 bis 9.

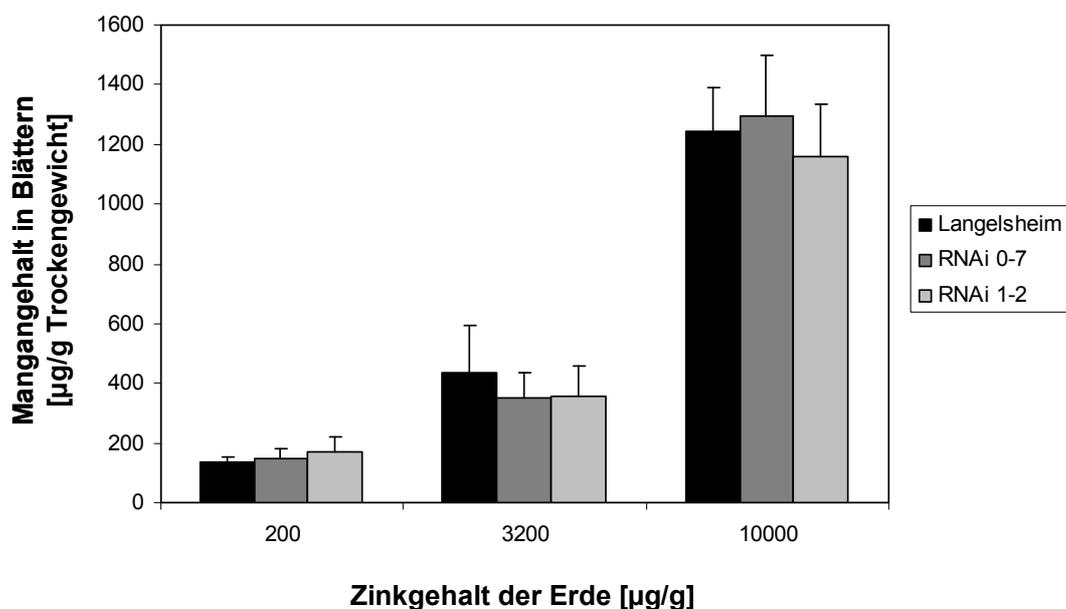
Auf den beiden artifiziell mit  $Zn^{2+}$  kontaminierten Erdtypen akkumulierten alle getesteten Linien noch weniger Cadmium, als auf Kontrollerde. D.h. mit steigender Zinkkonzentration im Boden verringerte sich die Cadmiumkonzentration im Spross der Pflanzen, was für eine selektiv bevorzugte Zinkaufnahme gegenüber der von Cadmium spricht. Folglich lagen die in den Blattproben der auf den beiden kontaminierten Erdtypen gewachsenen Pflanzen gemessenen Cadmiumkonzentrationen größtenteils unter dem kalibrierten Messbereich der ICP-OES.

Die Blattgehalte der Metalle Eisen und Mangan unterschieden sich auf keinem der drei Erdtypen signifikant, wobei die Eisenwerte starken Schwankungen unterlagen (Abb. 44, 45).



**Abbildung 44:** Eisengehalte im Spross von Wildtyp Langelshheim Pflanzen und den RNAi-Linien 0-7 und 1-2, die in zwei unabhängigen Experimenten für jeweils einen Monat auf artifiziell kontaminierter Erde kultiviert wurden. n = 6 bis 9.

Die durchschnittlichen Eisenkonzentrationen waren in allen Linien nach Wachstum auf den verschiedenen Erdtypen vergleichbar hoch. Aufgrund der hohen Schwankungen der einzelnen Werte kann keine Aussage über mögliche Unterschiede in der Akkumulation gemacht werden.



**Abbildung 45:** Mangangehalte von Wildtyp Langelshheim Pflanzen und den RNAi-Linien 0-7 und 1-2, die in zwei unabhängigen Experimenten für jeweils einen Monat auf artifiziell kontaminierter Erde kultiviert wurden. n = 6 bis 9.

Somit zeigten sich in den Wachstumsexperimenten auf artifiziell mit Zink kontaminierter Erde im Vergleich zwischen den Kontrolllinien Langelshem bzw. RNAi 0-7 und der starken RNAi-Linie 1-2 nur signifikante Unterschiede in den Blattzinkgehalten nach Kultivierung auf der mittelstark kontaminierten Erde und keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der Anreicherung von Cadmium, Eisen und Mangan. Die bereits in den hydroponischen Experimenten gezeigte Reduktion der Zinkhyperakkumulation in der starken RNAi-Linie konnte folglich nun auch in einem weniger artifiziellen Versuchsanstz bestätigt werden.

### 3.3.2. Pflanzenanzucht in kontaminierter Erde von *A. halleri*-Standorten aus dem Harz

Um die natürlichen Wachstumsbedingungen noch exakter nachzustellen, wurden bei einer Exkursion in den Harz Erdproben von unterschiedlichen natürlichen Standorten gesammelt und der Grad der Metallkontamination gemessen. Es wurden zwei Bodenproben von stark kontaminierten Böden und eine nicht kontaminierte typisiert. Im Folgenden werden die Erdtypen mit Harz 1, -2 und -3 bezeichnet. Neben einer Salzsäurebehandlung für die Messung der aus der Erde extrahierbaren Metalle wurden auch eine DTPA- und eine CaCl<sub>2</sub>-Extraktion durchgeführt, um die bioverfügbaren Ionen aus der Bodenprobe zu lösen. Die Zink-, Cadmium-, Eisen-, Kupfer und Mangangehalte der einzelnen Erdproben sowie die GPS-Koordinaten der verschiedenen Standorte sind in Tabelle 10 aufgelistet.

**Tabelle 10:** GPS-Koordinaten der drei verschiedenen Standorte im Harz und Gehalte an extrahierbaren Metallen (1) und austauschbaren Ionen (2: DTPA-Extraktion; 3: CaCl<sub>2</sub>-Extraktion) der dort gesammelten Erdproben. n.d. = nicht detektierbar. Die Erde wurde in Hyperakkumulationsexperimenten verwendet.

Position	GPS-Koordinaten	Extraktionsmethode	Metallgehalt der Erde [µg/g]				
			Zn	Cd	Fe	Cu	Mn
Harz 1: nicht kontam.	N51 53.752 E10 29.021	HCl	94	3,8	210	43	178
		DTPA	102	2,5	309	30	53
		CaCl <sub>2</sub>	40	1,5	0,8	1,1	103
Harz 2: kontam.	N51 56.563 E10 20.962	HCl	2075	13	603	206	596
		DTPA	831	4,2	94	26	20
		CaCl <sub>2</sub>	410	2,6	n.d.	1,5	199
Harz 3: stark kontam.	N51 56.574 E10 20.954	HCl	15150	7,7	858	1407	629
		DTPA	864	1,9	33	157	2,3
		CaCl <sub>2</sub>	78	0,3	0,3	1,7	1,3

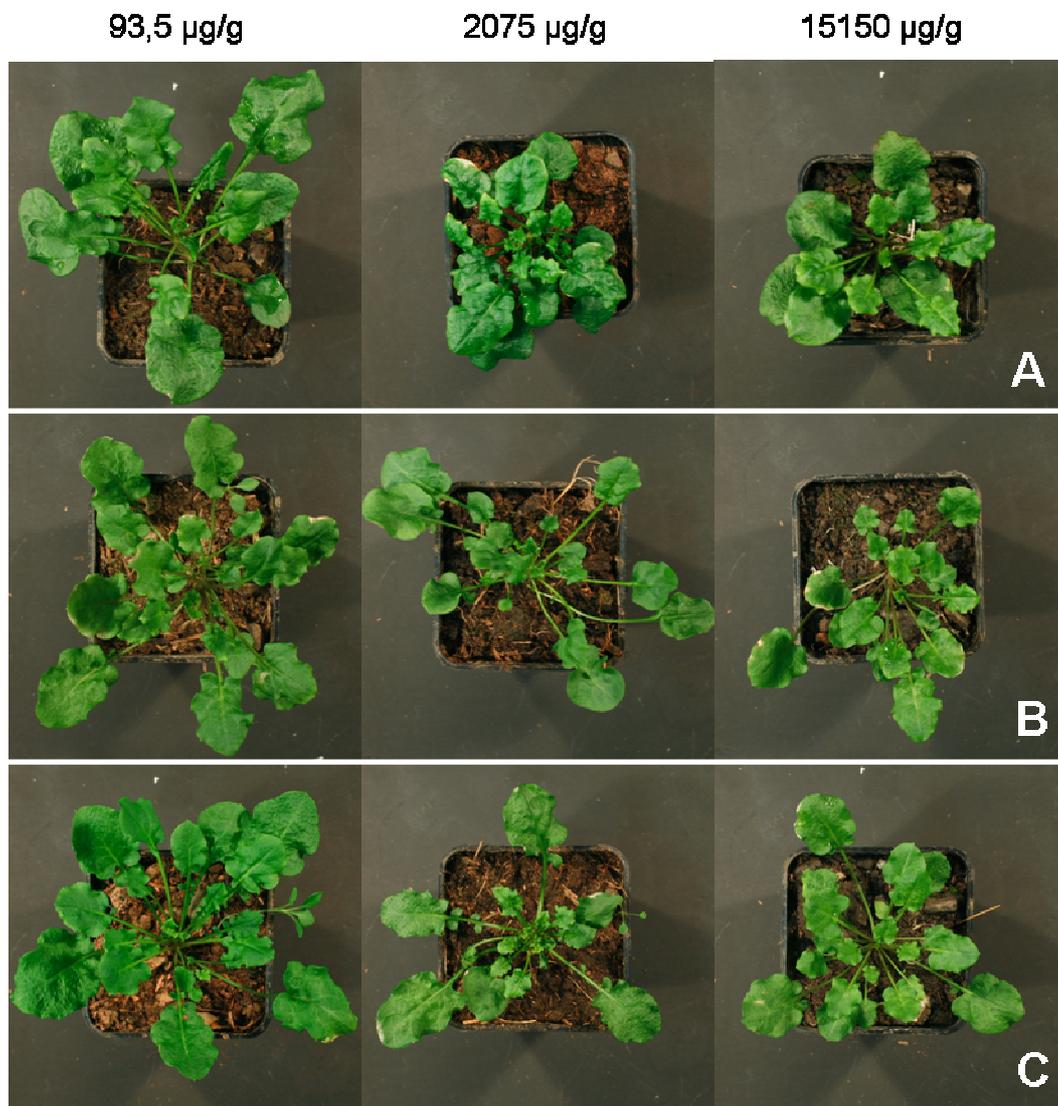
Die Konzentrationen von extrahierbarem Fe, Cu und Mn stiegen jeweils von der Kontroll- bis hin zur am stärksten mit Zink kontaminierten Erde an. Der Cd-Gehalt korrelierte jedoch nicht mit den Gehalten an anderen Metallen. So war in der mittelstark zinkbelasteten Erde Harz 2 am meisten extrahierbares Cadmium enthalten. Die Gehalte an bioverfügbaren Metallen schwankten deutlicher zwischen den drei Erdtypen. Auffällig war, dass neben Zink auch am meisten austauschbares Kupfer in der Erde von Harz 3 enthalten war. Ansonsten ließ sich kein Trend erkennen. In allen Böden war jeweils mindestens eine der bestimmten, austauschbaren Metallkonzentrationen am höchsten. Die Werte der mit  $\text{CaCl}_2$  extrahierten Proben sind im Vergleich mit den beiden anderen Methoden deutlich am niedrigsten. Neben einem Metallprofil der drei verwendeten Erdproben aus dem Harz wurde auch für jede der Proben eine pH-Wert-Bestimmung mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt. In Tabelle 11 sind die pH-Werte aufgeführt, die nach der KCl- bzw.  $\text{CaCl}_2$ -Extraktion der Erde gemessen wurden.

**Tabelle 11:** pH-Werte nach Erdextraktion mit 1 M KCl bzw. 10 mM  $\text{CaCl}_2$ . Es wurden die nativen Erdproben Harz 1-3 gemessen.

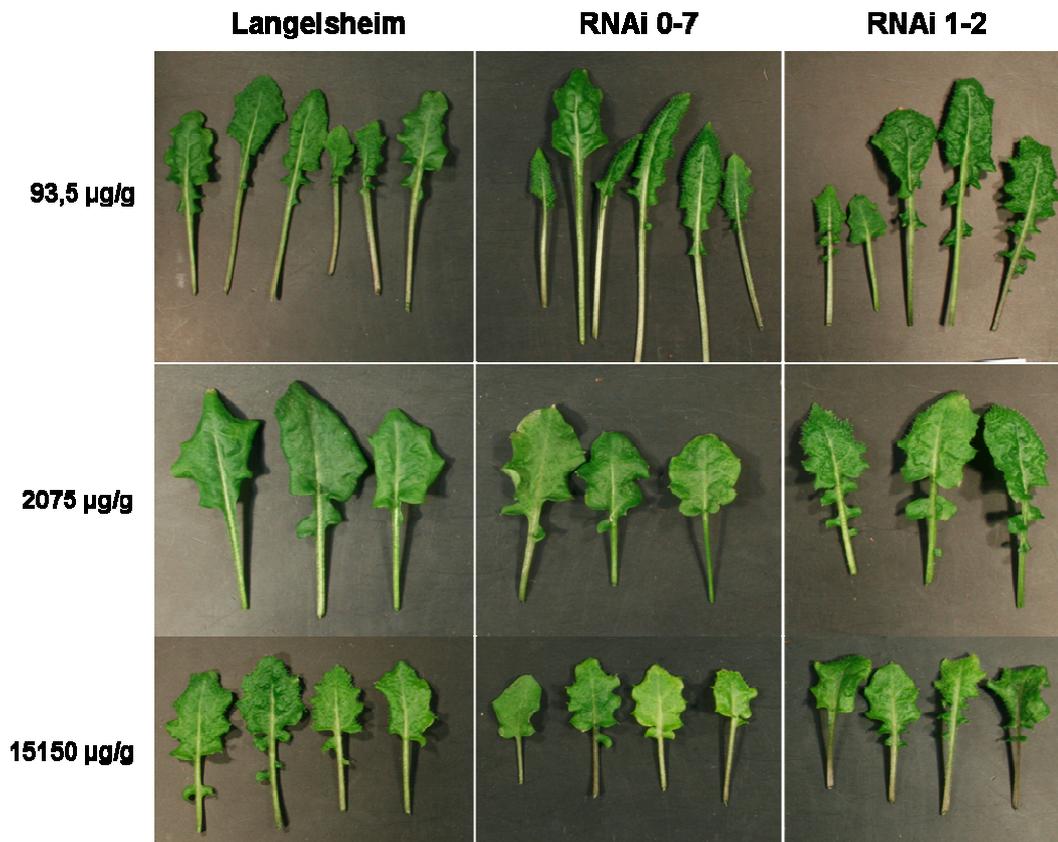
Erde	pH-Wert	
	KCl-Methode	$\text{CaCl}_2$ -Methode
Harz 1	3,80	4,25
Harz 2	4,86	4,82
Harz 3	6,67	6,79

Außer für Harz 2-Erde, wo nach beiden Extraktionen vergleichbare pH-Werte gemessen wurden, lagen die Werte der mit KCl extrahierten Proben jeweils unter den Werten der mit  $\text{CaCl}_2$  extrahierten.

Pflanzen des Wildtyps Langelshem, der Kontrolllinie 0-7 und der drei starken RNAi-Linien wurden in drei unabhängigen Experimenten auf den drei verschieden stark kontaminierten Erdtypen angezogen und für einen Monat kultiviert. Für keine der Linien konnten sichtbare phänotypische Unterschiede festgestellt werden (Abb. 46, 47). Die starken Linien zeigten weder in Bezug auf ihre Blattfläche noch auf ihren Chlorophyllgehalt Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Somit scheint die Reduktion der *AhNAS2*-Expression keinen Einfluss auf die Metallhypertoleranz der Pflanzen zu haben.

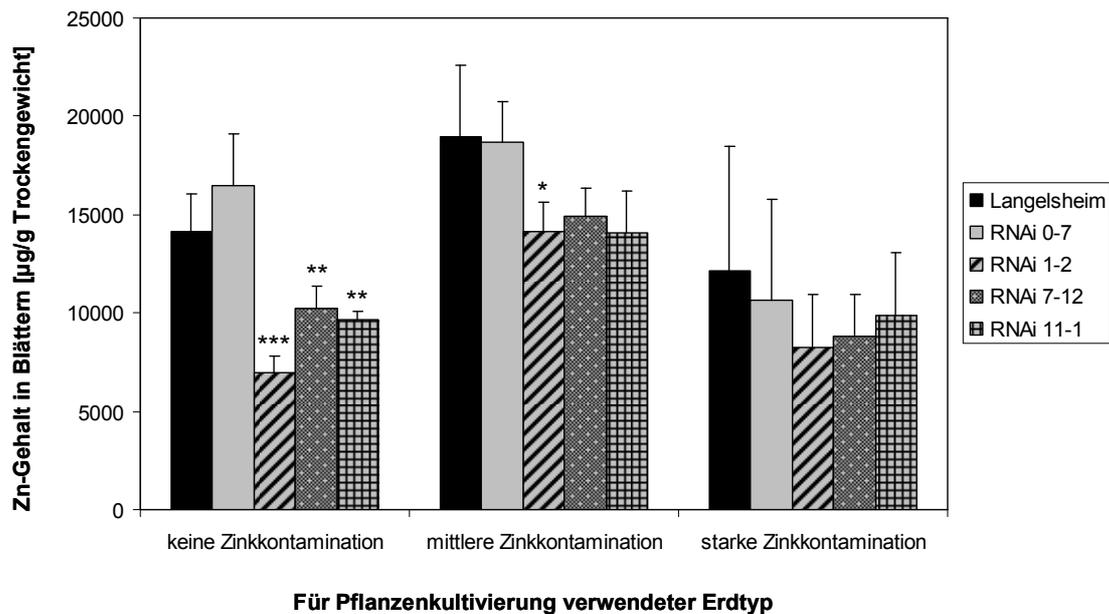


**Abbildung 46:** *A. halleri* Pflanzen, die auf drei verschieden stark kontaminierten Erdtypen aus dem Harz kultiviert wurden. Gezeigt sind repräsentative Bilder der Phänotypen des Wildtyps Langelshem (A), der schwachen Linie 0-7 (B) und der starken *NAS2* RNAi-Linie 11-1 (C).



**Abbildung 47:** *A. halleri* Pflanzen, die auf drei verschieden stark kontaminierten Erdtypen aus dem Harz kultiviert wurden. Gezeigt sind die Blätter des Wildtyps Langelsheim, der schwachen Linie 0-7 und einer starken *NAS2* RNAi-Linie.

Das aufgeschlossene Blattmaterial wurde ebenfalls mittels ICP-OES vermessen, wobei hierbei zwischen alten und jungen, neu gebildeten Blättern unterschieden wurde. Sowohl der Wildtyp als auch die schwache RNAi-Linie 0-7 akkumulierten Zink bis zu Werten von über 10000 µg/g auf allen drei Böden, was den bisher bekannten Felddaten entspricht (Abb. 48). Da zwischen dem jungen und dem älteren Blattgewebe keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Metallgehalte nachgewiesen werden konnten, wurden für die Abbildungen 48 bis 52 die Gesamtgehalte auf Basis der Probenmassen und Einzelkonzentrationen berechnet und dargestellt.

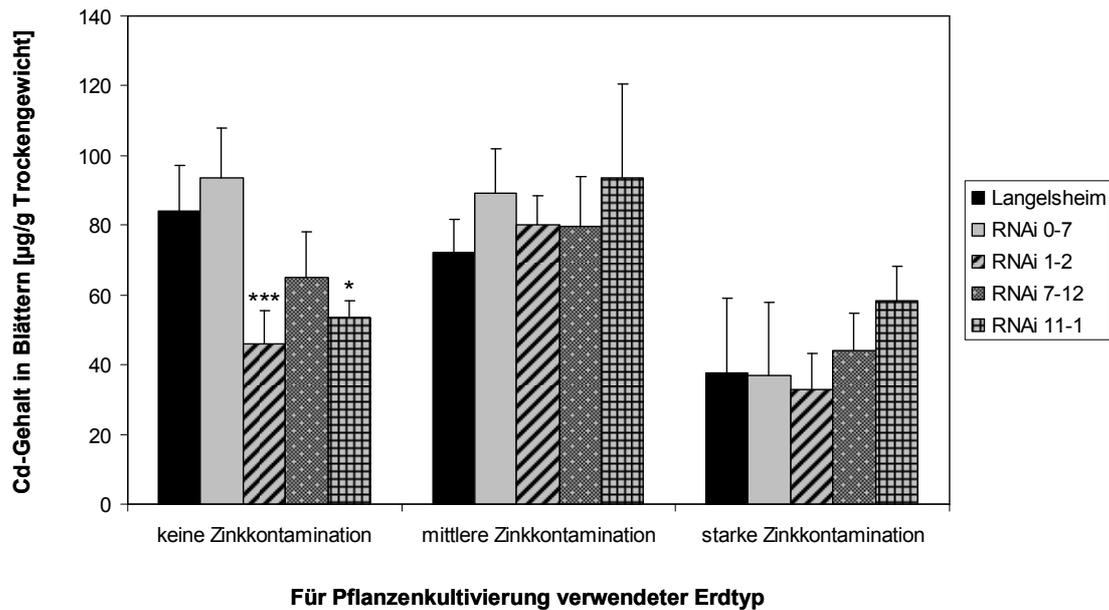


**Abbildung 48:** Zinkgehalte von Pflanzen des Wildtyps Langersheim, der Kontroll-RNAi-Linie 0-7 und der drei starken RNAi-Linien 1-2, 7-12 und 11-1, nachdem sie für vier Wochen auf im Harz gesammelten, unterschiedlich stark kontaminierten Erdtypen kultiviert wurden. n = 3 bis 9.

Auf der nicht kontaminierten und der mittelstark belasteten Erde konnte in den starken Linien, wie schon in den hydroponischen Experimenten, eine Reduktion des Zn-Gehaltes im Blattmaterial gemessen werden. In der unbelasteten Erde erreichte lediglich die starke RNAi-Linie 7-12 mit einer Sprosskonzentration von 10209 µg Zink pro g Trockengewicht den Hyperakkumulations-Schwellenwert von 10000, während die Gehalte der beiden anderen starken Linien mit 6990 bzw. 9650 µg Zink pro g Trockengewicht unter dieser Grenze lagen. Somit waren die Zinkgehalte in den starken RNAi-Linien nach Kultivierung auf der Kontrollerde um durchschnittlich 28 – 51 % im Vergleich zum Wildtyp und sogar um 41 - 58 % verglichen mit der Kontrolllinie 0-7 reduziert. Auch nach Wachstum auf Harz 2-Erde waren die Werte im Durchschnitt um 21 - 26 % niedriger als im Wildtyp und um 20 - 24 % niedriger als in der Kontrolllinie, wobei im Vergleich mit dem Wildtyp die Reduktion in Linie 1-2 und verglichen mit der Kontrolllinie 0-7 die Reduktion in allen drei starken Linien signifikant war. Nach Kultivierung auf der stark kontaminierten Erde waren die Sprosszinkgehalte in der Regel niedriger als nach Wachstum auf den anderen Erdtypen und es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Linien.

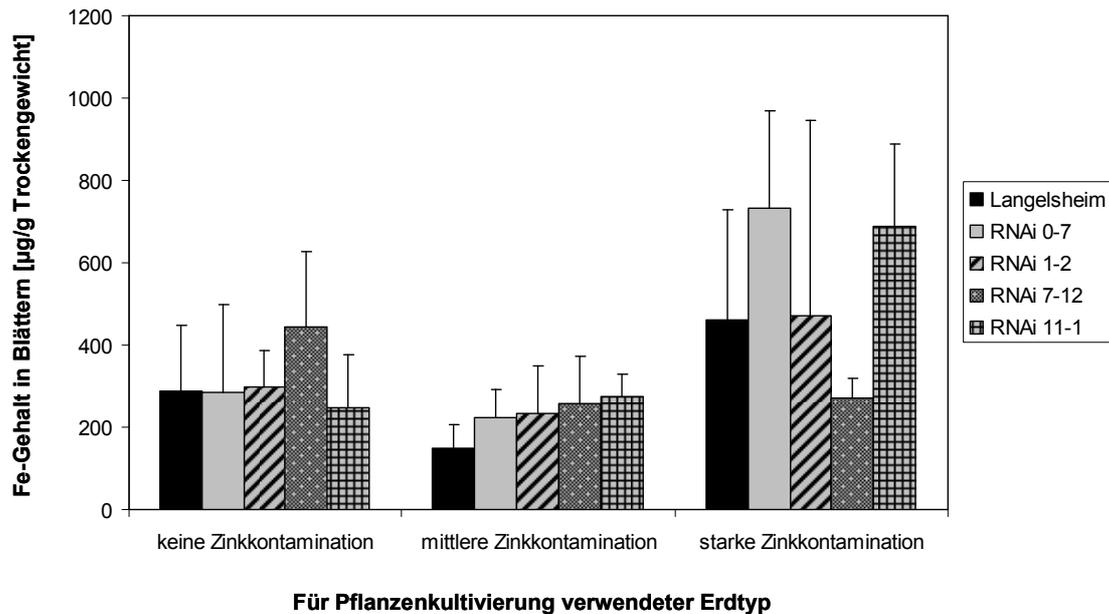
Eine Cadmiumakkumulierung von 100 µg pro g Trockengewicht oder mehr wird als Cadmiumhyperakkumulation definiert (Baker *et al.*, 1994; Dahmani-Muller *et al.*, 2000). Auf keinem der drei Erdtypen überschritten die Gehalte diesen Schwellenwert. Auch diese Ergebnisse stimmen mit den bisherigen Felddaten der Langersheim Population überein.

Obwohl Cadmium nicht hyperakkumuliert wurde, konnten doch signifikante Unterschiede von durchschnittlich 22 - 45 % zwischen den Spross-Cd-Gehalten der starken RNAi-Linien und dem des Wildtyps gemessen werden. Die Reduktion im Vergleich zur Kontrolllinie 0-7 lag im Durchschnitt sogar bei 30 - 51 %. Diese signifikanten Unterschiede trafen jedoch ausschließlich für die auf Kontrollerde gewachsenen Pflanzen zu. Auf den anderen beiden Böden akkumulierten alle getesteten Linien Cadmium etwa in gleichem Maße in ihren Blättern (Abb. 49).



**Abbildung 49:** Cadmiumgehalte von Pflanzen des Wildtyps Langelshheim, der Kontroll-RNAi-Linie 0-7 und der drei starken RNAi-Linien 1-2, 7-12 und 11-1, nachdem sie für vier Wochen auf im Harz gesammelten, unterschiedlich stark kontaminierten Erdtypen kultiviert wurden. n = 3 bis 9.

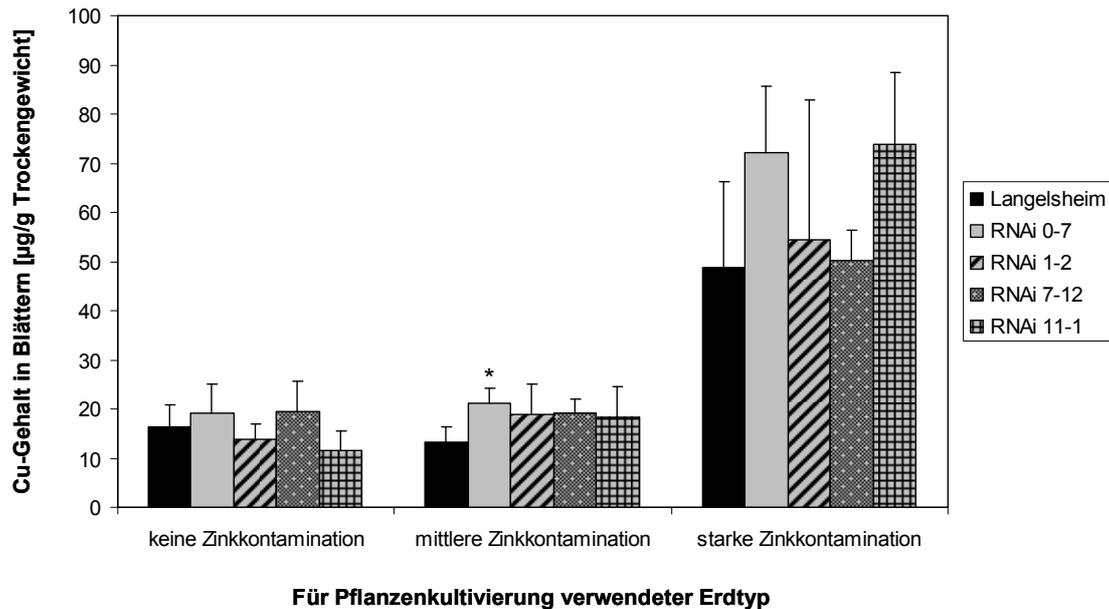
Der auf der nicht-zinkkontaminierten Erde erhaltene Unterschied in der Cadmiumkonzentration deutet auf einen Beitrag von *NAS2* zur Cadmiumakkumulation in *A. halleri* hin. In den Abbildungen 50 bis 52 sind die Blattgehalte der anderen, in Bezug auf Nicotianamin wichtigen Metalle zusammengefasst. Mit einer Ausnahme ergaben sich weder bei den Eisenwerten noch bei denen für Kupfer und Mangan signifikante Unterschiede zwischen den getesteten Linien. Abbildung 50 zeigt die Eisengehalte, wobei die Werte der auf Harz 3-Erde gewachsenen Pflanzen, wie schon in den Experimenten mit artifiziell kontaminierter Erde, stark schwankten.



**Abbildung 50:** Eisengehalte von Pflanzen des Wildtyps Langelshheim, der Kontroll-RNAi-Linie 0-7 und der drei starken RNAi-Linien 1-2, 7-12 und 11-1, nachdem sie für vier Wochen auf im Harz gesammelten, unterschiedlich stark kontaminierten Erdtypen kultiviert wurden. n = 3 bis 9.

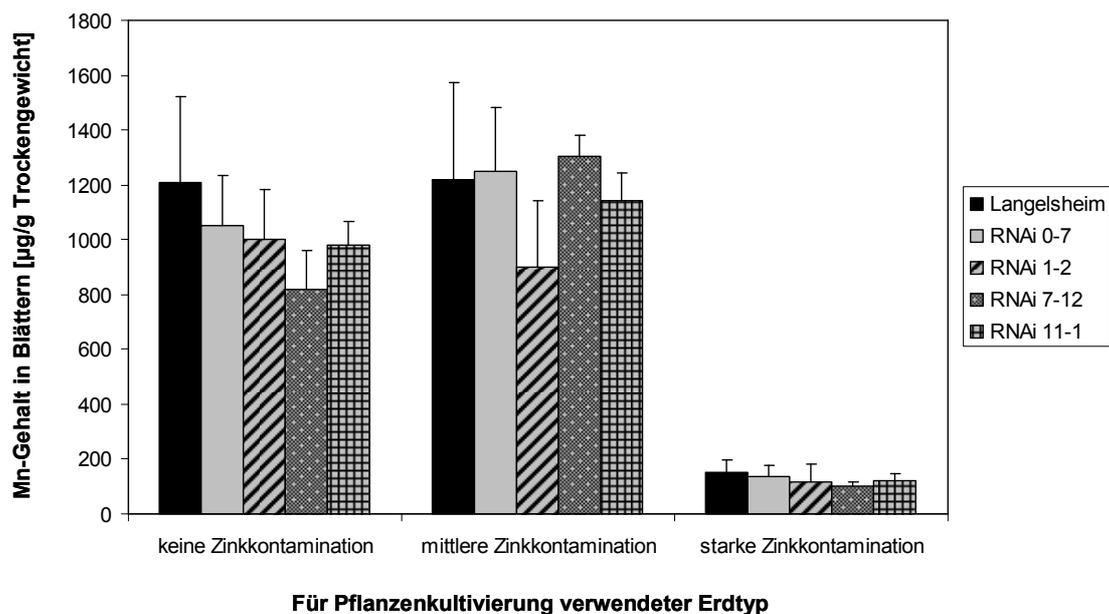
Auf der unbelasteten und mittelstark kontaminierten Erde lagen die Eisengehalte in den Sprossen aller getesteten Genotypen in einem vergleichbaren Bereich, wobei die Werte der auf Harz 2-Erde gewachsenen Wildtyppflanzen etwas niedriger waren als die der anderen Linien. Auch in den auf der stark belasteten Erde kultivierten Pflanzen ließ sich aufgrund der hohen Schwankungen der Werte keine signifikante Veränderung in der Eisenkonzentration feststellen.

Die gleiche Aussage kann für die Kupferwerte gemacht werden, wobei hier der einzige signifikante Unterschied bezüglich der Eisen-, Kupfer- und Manganwerte gemessen werden konnte. Erstaunlicherweise enthielten die auf Harz 2-Erde gewachsenen Wildtyppflanzen signifikant weniger Kupfer als die auf dem gleichen Erdtyp kultivierten RNAi 0-7 Kontrollpflanzen (Abb. 51).



**Abbildung 51:** Kupfergehalte von Pflanzen des Wildtyps Langelsheim, der Kontroll-RNAi-Linie 0-7 und der drei starken RNAi-Linien 1-2, 7-12 und 11-1, nachdem sie für vier Wochen auf im Harz gesammelten, unterschiedlich stark kontaminierten Erdtypen kultiviert wurden. n = 3 bis 9.

Wie bereits die Eisenwerte zeigten auch die Kupferwerte der auf Harz 3-Erde gewachsenen Pflanzen hohe Schwankungen. Im Gegensatz zu den Eisen- und Kupfergehalten waren die Mangangehalte in den auf Harz 3-Erde kultivierten Pflanzen deutlich niedriger als in den auf den anderen beiden Erdtypen angezogenen Pflanzen. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen.



**Abbildung 52:** Mangangehalte von Pflanzen des Wildtyps Langelsheim, der Kontroll-RNAi-Linie 0-7 und der drei starken RNAi-Linien 1-2, 7-12 und 11-1, nachdem sie für vier Wochen auf im Harz gesammelten, unterschiedlich stark kontaminierten Erdtypen kultiviert wurden. n = 3 bis 9.

Es deutete sich zwar an, dass die Mangangehalte in den Blättern der starken RNAi-Linien im Vergleich zum Wildtyp reduziert waren. Dieser vermeintliche Unterschied besaß jedoch aufgrund der Standardabweichung der Langelsheimwerte keine statistische Signifikanz. In den vorangegangenen hydroponischen Experimenten konnte lediglich in einer der drei getesteten RNAi-Linien eine signifikante Reduktion des Spross-Mn-Gehaltes gemessen werden, während in den artifiziellen Erdexperimenten alle getesteten Linien Mangan in gleichem Maße akkumulierten.

### 3.4. Microarrays

Neben *AhHMA4* und *AhNAS2* sind einige weitere Gene im Vergleich zu *A. thaliana* in *A. halleri* stärker exprimiert (Becher *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2004; Talke *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2006). Darunter befinden sich auch mehrere Metallhomöostasegene (Verbruggen *et al.*, 2009; Hanikenne & Nouet, 2011). Aufgrund der Effekte, die durch die Herunterregulierung von *AhHMA4* hervorgerufen wurden, wurde vermutet, dass die erhöhte Expression von einigen dieser Gene in *A. halleri* Wurzeln aus der von *AhHMA4* vermittelten Zinkbeladung des Xylems resultiert, welche zu einer Zinkdefizienzantwort der Wurzelzellen führt (Hanikenne *et al.*, 2008). Beispielsweise waren in den Wurzeln der *AhHMA4* RNAi-Linien die als Zinkdefizienzmarker geltenden Metalltransporter *ZIP4* und *IRT3* signifikant niedriger exprimiert als im Wildtyp (Hanikenne *et al.*, 2008).

Um zu überprüfen, ob auch der Knock-down von *AhNAS2* die Expression anderer Gene in *A. halleri* Wurzeln beeinflusst, wurden Microarray-Experimente durchgeführt. Es wurde in drei unabhängigen Replikaten RNA aus den Wurzeln von hydroponisch kultivierten Langelsheim- und RNAi 1-2 Pflanzen mit einem Affymetrix ATH1-Chip hybridisiert, wobei sowohl Kontroll- als auch in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  angezogene Proben untersucht wurden. Wie aus der folgenden Tabelle ersichtlich wird, zeigten im Vergleich der beiden getesteten Genotypen nur wenige Gene eine signifikante Expressionsänderung um mindestens Faktor 2. Der Signifikanzschwellenwert wurde bei allen Analysen auf  $p$  ("adjusted")  $< 0,05$  festgelegt.

**Tabelle 12:** Gene, die entweder höhere oder niedrigere Expression in den Wurzeln der *AhNAS2* RNAi-Linie im Vergleich zum Wildtyp Langelshiem zeigten. RNA von in hydroponischem Kontrollmedium bzw. in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  kultivierten Pflanzen wurde an einen ATH1-Chip hybridisiert. Die Expressionsveränderungen sind als Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten angegeben, wobei die fettgedruckten Werte signifikant sind (“adjusted“  $p < 0,05$ ). Es sind jeweils die AGI-Codes und die Annotation der korrespondierenden Orthologe aus *A. thaliana* angegeben.

		Kontroll- $\text{Zn}^{2+}$ -Gehalt (0,077 $\mu\text{M}$ )		Erhöhter $\text{Zn}^{2+}$ -Gehalt (10 $\mu\text{M}$ )	
AGI-Code	Beschreibung	x-fache Veränderung	p-Wert	x-fache Veränderung	p-Wert
<b>Höhere <i>AhNAS2</i>-Expression in der RNAi-Linie 1-2 verglichen mit dem Wildtyp</b>					
AT4G18593	dual specificity protein phosphatase-related	<b>7.28</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>5.75</b>	<b>&lt; 0.001</b>
AT1G71695	peroxidase 12 (PER12) (P12) (PRXR6)	2.02	0.1134	<b>3.06</b>	<b>0.0075</b>
AT2G02020	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	<b>1.90</b>	<b>0.0282</b>	1.49	0.1766
AT5G02240	catalytic/ coenzyme binding; Identical to Protein At5g02240	1.52	0.0586	<b>1.69</b>	<b>0.0168</b>
AT3G44280	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana]	1.49	0.1421	<b>1.79</b>	<b>0.0238</b>
AT1G57870	shaggy-related protein kinase kappa	1.34	0.3124	<b>1.78</b>	<b>0.0467</b>
<b>Niedrigere <i>AhNAS2</i>-Expression in der RNAi-Linie 1-2 verglichen mit dem Wildtyp</b>					
AT4G19750 / AT4G19760	glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain	0.75	0.5390	<b>0.33</b>	<b>0.0069</b>
AT5G49560	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana]	<b>0.59</b>	<b>0.0245</b>	0.67	0.0730
AT5G04950	nicotianamine synthase 1 (NAS1)	0.54	0.1707	<b>0.37</b>	<b>0.0297</b>
AT1G09100	subunit shown to interact with gene product of hexokinase1 (ATHXK1)	<b>0.53</b>	<b>0.0152</b>	0.68	0.1351
AT5G47240	AtNUDT8 (Arabidopsis thaliana Nudix hydrolase homolog 8)	0.47	0.0586	<b>0.25</b>	<b>&lt; 0.001</b>
AT1G48750	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	0.36	0.1901	<b>0.17</b>	<b>0.0262</b>
AT1G12010	similar to 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid oxidase	0.29	0.0582	<b>0.20</b>	<b>0.0075</b>
AT5G56080	nicotianamine synthase 2 (NAS2)	0.23	0.0582	<b>0.13</b>	<b>0.0057</b>
AT5G46890 / AT5G46900	bifunctional inhibitor lipid transfer protein / seed-storage 2S albumin superfamily protein	<b>0.13</b>	<b>0.01</b>	<b>0.19</b>	<b>0.02</b>

Nur wenige Gene zeigten Expressionsunterschiede im Vergleich von Wildtyp und *AhNAS2* RNAi-Linie, wobei es mehr Veränderungen bei der externen Zinkkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  gab als im Kontrollmedium. Die meisten unterschiedlich exprimierten Gene zeigten diese Veränderungen unter beiden getesteten Bedingungen, wenn auch nicht immer mit gleicher Stärke. Es kann angemerkt werden, dass die mittels realtime PCR gemessene Reduktion der *AhNAS2*-Transkriptmenge in der RNAi-Linie 1-2 bestätigt werden konnte. Sie lag bei Kultivierung im Kontrollmedium bei 77 % und in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  sogar bei 87 %. Wie auch in den vorherigen Transkriptanalysen zeigten weder *AhNAS3* noch *AhNAS4* signifikante Unterschiede zum Wildtyp (vergleiche Abschnitt 3.2.1.). Die Expression von *AhNAS1* war um ca. 50 % reduziert, was höchstwahrscheinlich auf Kreuzhybridisierungen von *AhNAS2*-Transkripten an *AhNAS1*-Sonden auf dem Chip zurückgeführt werden kann. Keines der bekannten Zinkdefizienzmarkergene, die für mögliche Zinkaufnahmetransporter kodieren und in den Wurzeln von *A. halleri* stark exprimiert sind, zeigte eine Veränderung in der Transkriptmenge. Beispielsweise waren sowohl *IRT3* als auch *ZIP4*, *ZIP9* und *ZIP10* in Wildtyp und RNAi-Linie gleich exprimiert, wobei die *ZIP9*-Daten unabhängig mittels realtime PCR bestätigt werden konnten (Daten nicht gezeigt). Auch andere bekannte Metallhomöostasegene wurden nicht von der *AhNAS2*-Reduktion beeinflusst. Sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach Zinkbehandlung war ein Gen, das ein "dual specificity protein" (At4g18593) codiert, in der RNAi-Linie am stärksten induziert. Desweiteren war die Expression eines Peroxidasegens (AT1G71695) signifikant erhöht. Die größte Transkriptreduktion in der RNAi-Linie zeigten Gene, die für "bifunctional inhibitor lipid transfer / seed-storage"-Proteine (AT5G46890 / AT5G46900, AT1G48750) codieren.

Von den etwa 100 Genen, die unter Kontrollbedingungen in *A. halleri*- im Vergleich zu *A. thaliana* Wurzeln am stärksten (mehr als fünffach,  $p < 0,05$ ) exprimiert sind (Weber *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2006; Talke *et al.*, 2006), war in der RNAi-Linie 1-2 lediglich *NAS2* signifikant verändert. Dies lässt darauf schließen, dass anders als bei *AhHMA4* (Hanikenne *et al.*, 2008), höhere *AhNAS2*-Transkriptmengen in *A. halleri* Wurzeln und der damit verbundene Einfluss auf den Metallhaushalt, auf Expressionsebene keine Sekundäreffekte auf weitere Metallhomöostasegene zur Folge haben.

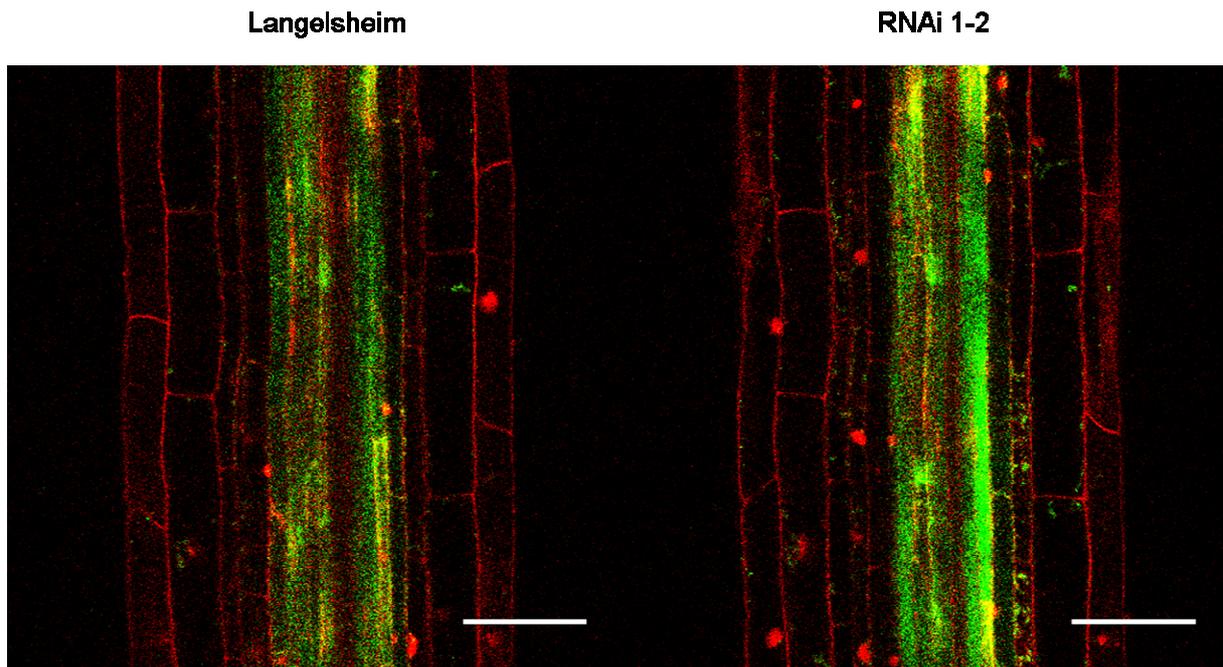
Die bisher genannten Veränderungen beziehen sich auf einen Signifikanzschwellenwert, der auf dem sogenannten "adjusted p-value" basiert. Diese Art der Berechnung ist deutlich strikter als die dem normalen p-Wert zugrunde liegende. Deshalb ergeben sich einige zusätzliche Veränderungen in der Genregulation, wenn man sich nur auf den normalen p-Wert bezieht. Dabei waren sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach Zinkbehandlung ein

Gen, das ein “defensin-like family protein“ (At4g22212) codiert und eines, das ein “dual specificity protein“ (At4g18593) codiert in der RNAi-Linie stark induziert. Mit Veränderungen um Faktor 4,03 bis 8,21 unter beiden getesteten Bedingungen waren diese die am stärksten bzw. am zweitstärksten signifikant hochregulierten Gene in der RNAi-Linie. Des Weiteren waren die Gene, die für folgende Proteine codieren, unter beiden Bedingungen um mindestens Faktor 2 induziert: “mitotic checkpoint family protein“ (At5g49880), L-Asparaginase (At5g08100), “similar to beta-xylosidase“ (At1g02640) und Peroxidase 12 (At1g71695). Der Metalltransporter *IRT1* war unter Kontrollbedingungen um Faktor 3,15 hochreguliert, während nach Zinkbehandlung kein Unterschied gemessen wurde.

Sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach Zinkbehandlung war die Transkriptmenge eines für ein “calmodulin-binding related protein“ (At2g38800) codierendes Gen mit 92 bzw. 95 % am stärksten reduziert. Wie bereits bei den unter beiden getesteten Bedingungen induzierten Genen, waren auch bei denen mit reduziertem Transkriplevel einige sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach Zinkbehandlung verändert. Dies traf neben den bereits genannten für die für folgende Proteine codierenden Gene zu: “bifunctional inhibitor lipid transfer protein“ (At5g46890 / At5g46900), “similar to 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid oxidase“ (At1g12010), “syntaxin-related family protein“ (At1g56610), “similar to Wound-induced protein WI12“ (At5g01740), “DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein“ (At2g21510), “protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein“ (At1g48750), “identical UPF0136 membrane protein“ (At2g26240), “nudix hydrolase homolog 8“ (At5g47240), “DNA gyrase subunit A family protein“ (At3g10690) und “ran GTPase binding / chromatin binding / zinc ion binding“ (At5g12350).

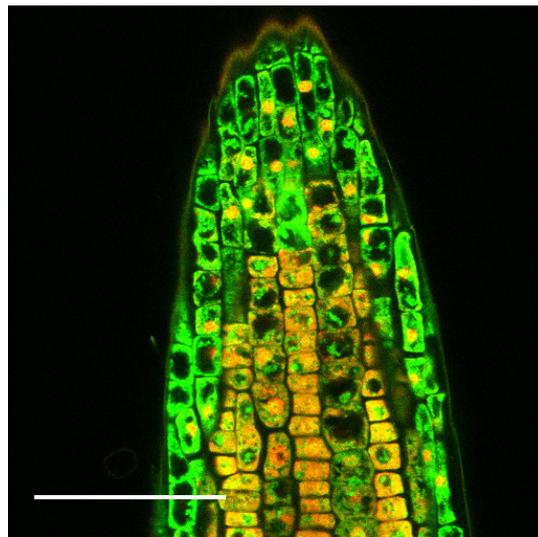
### **3.5. Zinkfärbung mit Zinpyr-1**

Für die Bestätigung der durch die ICP-OES-Messungen erhaltenen Unterschiede im Wurzelzinkgehalt von Wildtyp und der starken RNAi Linie 1-2 und um des Weiteren das Zink auf zellulärer Ebene zu lokalisieren, wurden Analysen mit einem konfokalen Lasermikroskop durchgeführt. Die Zellwände wurden mit Propidiumiodid gefärbt, wodurch nachgewiesen werden konnte, dass die Zellen intakt und unbeschädigt waren, während das in den Wurzeln lokalisierte Zink mit dem fluoreszenten Farbstoff Zinpyr-1 gefärbt wurde (Sinclair *et al.*, 2007) (Abb. 53-55).



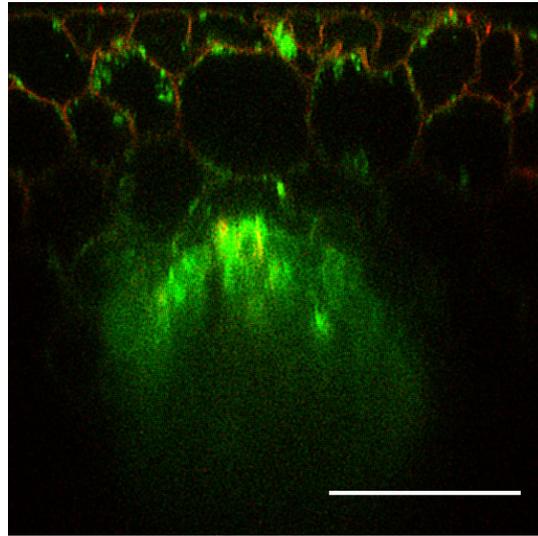
**Abbildung 53:** Wurzelabschnitte von *A. halleri* Wildtyp Langelsheim und RNAi 1-2 Pflanzen, die mit zusätzlichen 1  $\mu$ M Zn im Medium kultiviert wurden. Gezeigt sind mit dem konfokalen Lasermikroskop aufgenommene Bilder nach Zinpyr-1- (grün) und Propidiumiodid (rot) Färbung. Für die Abbildung wurden die grünen und roten Signale übereinandergelegt. Der Maßstab entspricht jeweils 50  $\mu$ m.

Alle Proben zeigten die stärksten Zinpyr-1-Signale in den Wurzelspitzen, wo noch keine Zelldifferenzierung stattfindet (Abb.54). Die Signalintensität war in diesem Bereich sowohl im Wildtyp als auch in der starken RNAi-Linie sehr hoch und es konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden.



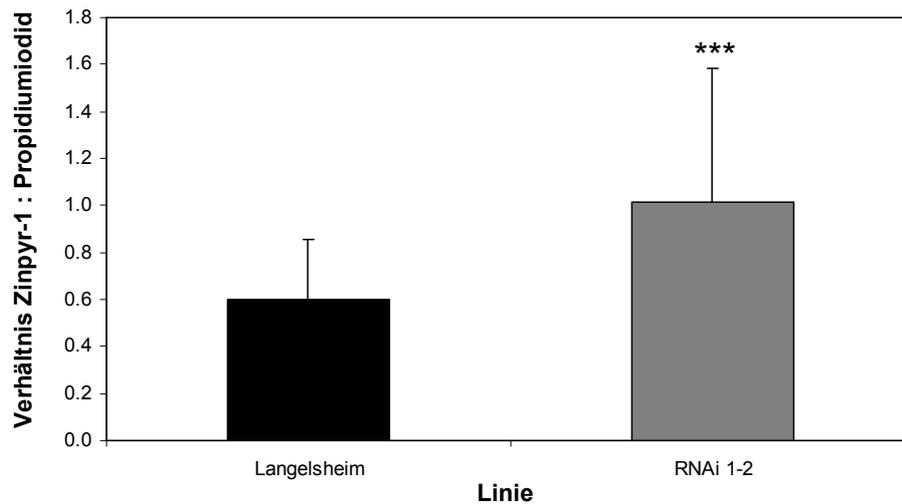
**Abbildung 54:** Wurzelspitze einer RNAi 1-2 Pflanze. Gezeigt sind mit dem konfokalen Lasermikroskop aufgenommene Bilder nach Zinpyr-1- (grün) und Propidiumiodid (rot) Färbung. Für die Abbildung wurden die grünen und roten Signale übereinandergelegt. Der Maßstab entspricht 50  $\mu$ m.

Neben den Spitzen konnten in allen untersuchten Wurzeln die intensivsten Signale im Bereich des Perizykels beobachtet werden (Abb. 53, 55).

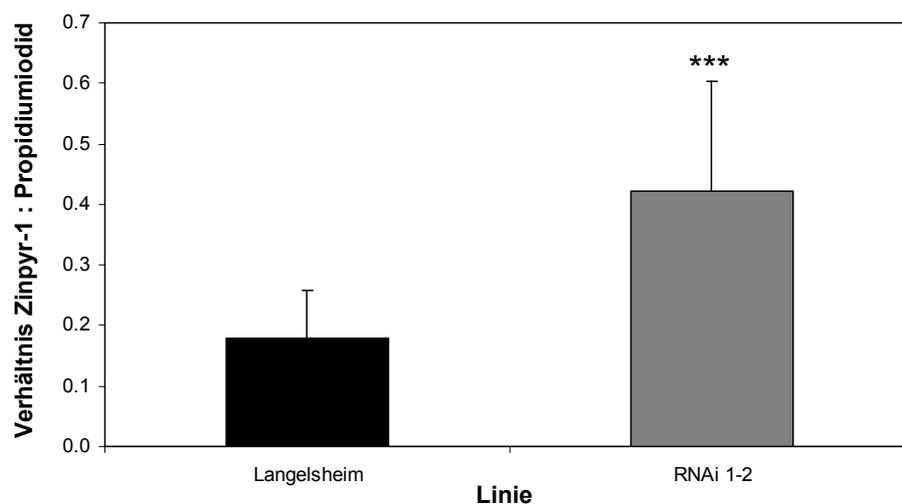


**Abbildung 55:** Wurzelquerschnitt einer RNAi 1-2 Pflanze, die mit zusätzlichen 1  $\mu\text{M}$  Zn im Medium kultiviert wurde. Gezeigt ist ein mit dem konfokalen Lasermikroskop aufgenommenes optisches Querschnittsbild nach Zinpyr-1- (grün) und Propidiumiodid (rot) Färbung. Für die Abbildung wurden die grünen und roten Signale übereinandergelegt. Der Maßstab entspricht 50  $\mu\text{m}$ .

Aufgrund von technischen Limitierungen des verwendeten Mikroskops war keine Erstellung von schärferen optischen Querschnittsbildern, als der in Abbildung 55 dargestellten, möglich. Auch wenn die Signale diffus wirken, ist zu erkennen, dass sich der Großteil des Zinks im Bereich der Perizykelzellen befindet. Der Gesamteindruck von allen untersuchten Proben war, dass die Zinpyr-1-Signale in den Wurzeln der RNAi-Linie deutlich stärker waren als in denen des Wildtyps. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde eine Quantifizierung durchgeführt, wobei mit den roten Propidiumiodidsignalen normalisiert wurde. Die bereits mit ICP-OES gemessenen Unterschiede zwischen Wildtyp und RNAi Linie konnten mittels der Quantifizierung der Zinpyr-1-Signale bestätigt werden, wobei die Signalstärke in den Knock-Down-Linien bei beiden durchgeführten Experimenten jeweils mindestens 1,5-fach höher lag (Abb. 56, 57).



**Abbildung 56:** 1. Durchgang der Quantifizierung der Zinpyr-1-Signale in Wurzeln von *A. halleri* Wildtyp Langelsheim und RNAi 1-2 Pflanzen, die in Kontrollmedium kultiviert wurden. Die Werte wurden mittels der Propidiumiodidsignale normalisiert. n = 96 bis 112.



**Abbildung 57:** 2. Durchgang der Quantifizierung der Zinpyr-1-Signale in Wurzeln von *A. halleri* Wildtyp Langelsheim und RNAi 1-2 Pflanzen, die in Kontrollmedium kultiviert wurden. Die Werte wurden mittels der Propidiumiodidsignale normalisiert. n = 30 bis 61.

Die Verhältnisse beider Experimente liegen nicht im selben Bereich, was durch die Variation in der Effizienz der Färbung erklärt werden kann. Sowohl die Zinpyr-1- als auch die Propidiumiodidfärbung funktionierten nicht bei allen Versuchen gleich gut. Dies hat allerdings keinen Einfluss auf den Unterschied zwischen Wildtyp und starker RNAi-Linie, da die Signalverhältnisse immer nur innerhalb eines Experiments verglichen werden. In beiden

Durchgängen waren die höheren relativen Zinpyr-Signale in der RNAi-Linie hochsignifikant ( $p < 0,001$ ).

### **3.6. Untersuchung der Zink-Speziierung mit SEC-ICP-MS und ESI-TOF-MS**

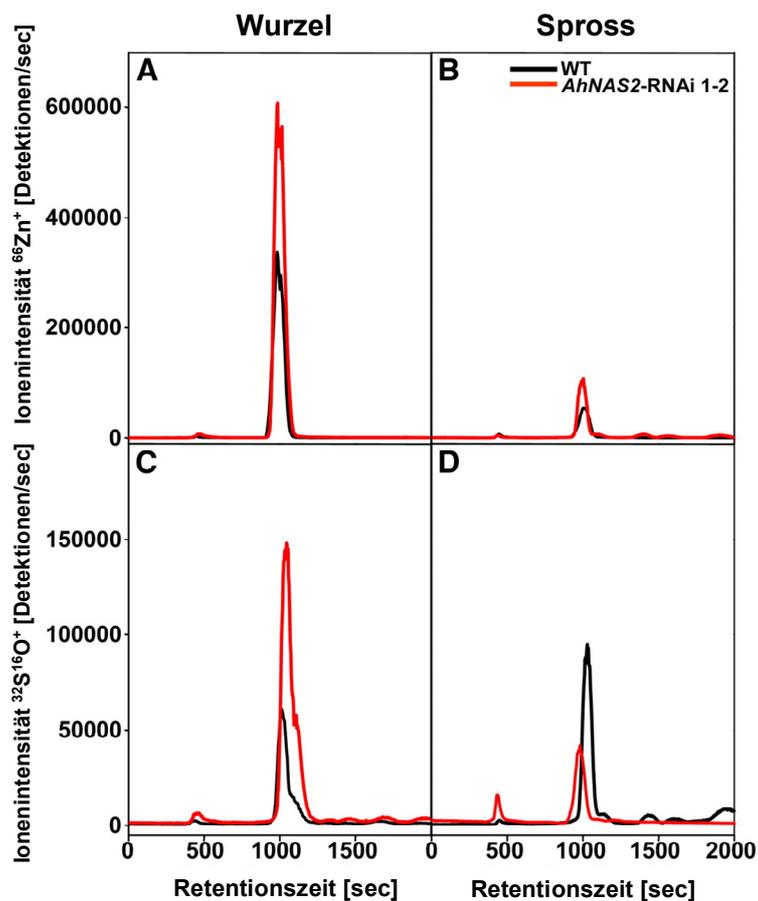
#### **3.6.1. Analyse von Wurzel- und Blattmaterial**

Basierend auf den bisher im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse wurde die Hypothese erstellt, dass Nicotianamin Komplexe mit Zink bildet und infolgedessen in die Hyperakkumulation dieses Schwermetalls involviert ist. Die Existenz derartiger  $Zn^{2+}$ -NA-Komplexe konnte *in vivo* bislang nur in Hefeexperimenten nachgewiesen werden (Trampczynska *et al.*, 2010).

Um zu bestätigen, dass NA einen Einfluss auf die Zinkspeziierung hat und dass es tatsächlich in der Lage ist, in *A. halleri* Komplexe mit  $Zn^{2+}$  zu bilden, wurden Tris/NaCl-Extrakte von Blatt- und Wurzelmaterial von Wildtyp und RNAi 1-2 Pflanzen mittels SEC-ICP-MS analysiert. Die Werte für extrahierbares Zink lagen im Bereich der bereits in den ICP-OES-Messungen erhaltenen Daten für den Gesamtzinkgehalt. Dabei konnte im Vergleich zum Wildtyp etwa 40 % mehr extrahierbares Zink in den Wurzeln der RNAi-Linie gemessen werden, wobei im Sprossgewebe das Gegenteil der Fall war. Hier besaß die Knock-Down-Linie nur etwa 60 % des Zinkgehaltes der Langelsheimproben (Tab. 13, Abb. 58). Sowohl im Wildtyp als auch in der RNAi-Linie war nur sehr wenig freies, ungebundenes Zink in den Wurzeln detektierbar. Die Speziierungsanalyse zeigte, dass mehr als 97 % des gesamten aus Wurzelgewebe extrahierbaren Zinks aus Spezies mit niedrigem Molekulargewicht von unter 1000 Da bestanden. Im Gegensatz zu den Wurzeln lag mit ca. 98 % der Großteil des extrahierbaren Zinks im Spross ungebunden vor (Tab. 13, Abb. 58).

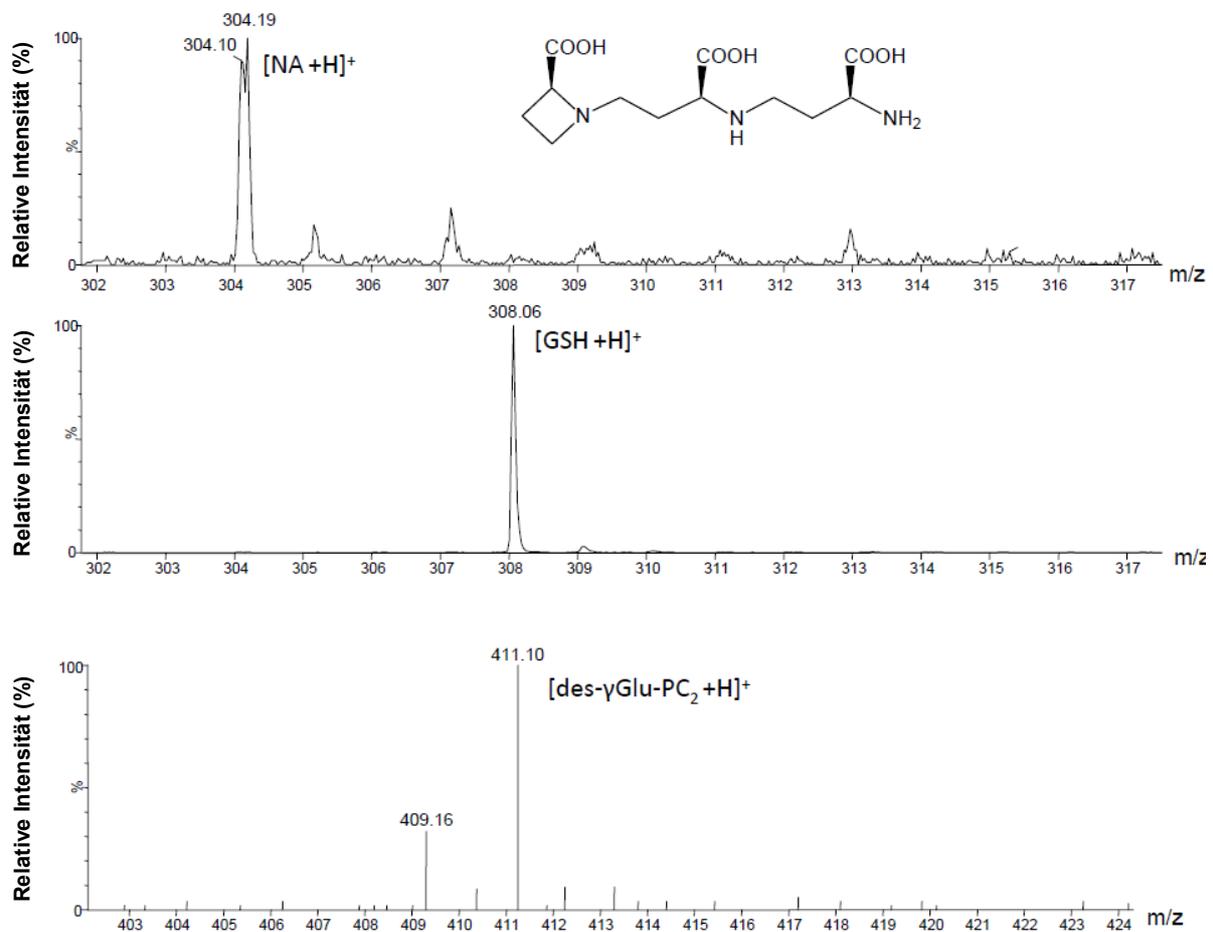
**Tabelle 13:** Quantitative Analyse von Zink- und Schwefelspezies mit niedrigem Molekulargewicht (LMW = “low molecular weight“), die eine Masse von weniger als 1000 Da haben in Wurzel- und Blattproben von Wildtyp Langelsheim und RNAi 1-2 Pflanzen. Die Quantifizierung erfolgte mittels Peakintegration. Freies Zink wurde mit fünf aufeinanderfolgenden EDTA-Injektionen von der Säule gewaschen. n = 3, wobei für jeden Datenpunkt drei unabhängige Replikate zusammengefasst wurden.

	Wildtyp		RNAi 1-2	
	Wurzel	Spross	Wurzel	Spross
<b>Extrahiertes Zn</b>				
LMW Zn-Spezies	39 ± 5	4 ± 3	54 ± 4	3 ± 3
Freies Zn <sup>2+</sup>	1 ± 1	216 ± 24	0 ± 0	129 ± 50
<b>Extrahierter S</b>				
LMW S-Spezies	409 ± 70	835 ± 351	763 ± 37	699 ± 49



**Abbildung 58:** Zinkspezifizierung in Wurzeln und Sprossen von Wildtyp Langelsheim (WT, schwarze Linien) und *AhNAS2-RNAi 1-2* (rote Linien) Pflanzen. Gezeigt sind die in SEC-ICP-MS-Messungen erhaltenen Ionenintensitäten von Zink (A, B) und Schwefel (C, D) eines Experiments, welches für drei unabhängige Replikate repräsentativ ist. Die Pflanzen wurden mit zusätzlichen 10 µM Zn<sup>2+</sup> im Wachstumsmedium kultiviert.

Die mittels SEC-ICP-MS erhaltenen Fraktionen der Zn-Spezies mit niedrigem Molekulargewicht wurden als nächstes mit ESI-TOF-MS analysiert, um die gebundenen Liganden zu identifizieren. Hierbei konnte bestätigt werden, dass Nicotianamin zusammen mit GSH und des- $\gamma$ Glu-PC<sub>2</sub> zu den wichtigsten Zn-Liganden gehört. Auffallend war, dass das Schwefelsignal, welches mit Zink co-eluierte, in den Wurzeln der RNAi-Linie fast doppelt so stark war wie im Wildtyp (Abb. 58, Tab. 13). Dies deutet auf eine Induktion der Synthese von Schwefelliganden hin, zu denen, wie bereits erwähnt, Glutathion (308,0916; nach 2-3 min eluiert; Abb. 59) und auch Phytochelatine gehören.



**Abbildung 59:** HILIC-ESI-TOF-MS-Analyse (positiver Modus) von Zinkfraktionen mit niedrigem Molekulargewicht, die in den SEC-ICP-MS-Experimenten mit der RNAi-Linie 1-2 erhalten worden waren. Die Spektren wurden für die von der SEC-Säule gesammelten Proben aufgezeichnet.

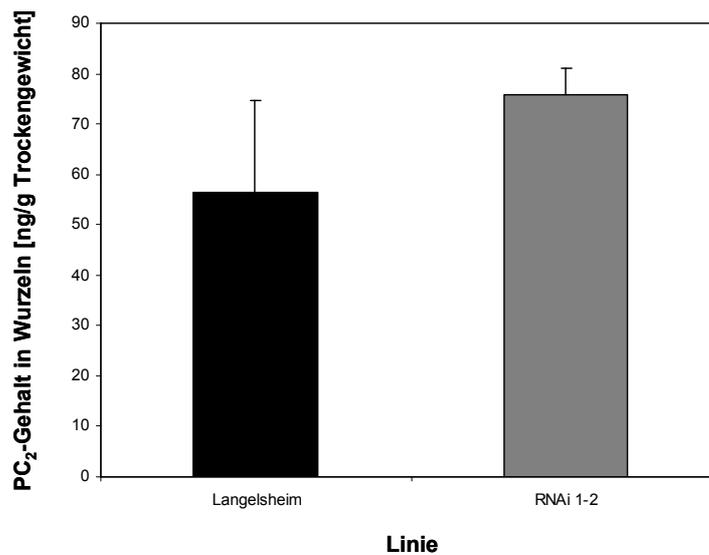
Für die Massenkalkulation und zur Verifizierung der Elutionszeit wurden ein interner NA-Standard (Lee *et al.*, 2011) und eine kommerzielle GSH-Probe verwendet.

Anders als im Wildtyp konnten in der starken RNAi-Linie lediglich Spuren von NA detektiert werden (304,1509; nach etwa 18,6 min eluiert; Abb. 59), was gut zu den Ergebnissen der LC-MS-Messungen passt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Identifizierung von NA als einer der potentiellen Zinkliganden einen weiteren wichtigen Hinweis bezüglich der aufgestellten Hypothese, dass *AhNAS2* eine entscheidende Rolle in der Zinkhyperakkumulation in *A. halleri* spielt, darstellt. Nach der bereits erwähnten, *in vivo* in Hefezellen gezeigten  $Zn^{2+}$ -NA-Komplexbildung liefern die vorliegenden Ergebnisse der Speziierungsanalysen von *A. halleri*-Gewebe einen wichtigen Hinweis für die Existenz derartiger Komplexe in Pflanzen. Auch der Nachweis von des- $\gamma$ Glu-PC2 als möglicher Zinkbindungspartner ist für die Bestätigung der bereits formulierten Theorie, dass Phytochelatine in *Arabidopsis*-Wurzeln  $Zn^{2+}$  chelatieren (Tennstedt *et al.*, 2009), von großer Bedeutung.

### 3.6.2. Thiolanalyse des Wurzelmaterials mit LC-MS

In den SEC-ICP-MS-Messungen konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der Zinkfraktionen mit Schwefel coeluiert. Dies könnte auf eine kompensatorische Synthese von Thiolliganden zurückzuführen sein, die aus der Reduktion des NA-Gehaltes in der Wurzel resultiert. Um dieser Vermutung nachzugehen, sollten als nächstes Wurzeln von mit zusätzlichen 10  $\mu$ M  $Zn^{2+}$  im Wachstumsmedium angezogenen Wildtyp Langelsheim und RNAi 1-2 Pflanzen mit LC-MS analysiert werden. Die Auswertung dieser Experimente ergab, dass es methodisch nicht möglich war, Glutathion und  $\gamma$ -EC sauber zu quantifizieren. Beide Metaboliten coeluierten und interferierten somit in der Analyse des jeweils anderen. Im Gegensatz dazu war es möglich, die Konzentrationen von PC2 (Phytochelatin mit der Kettenlänge 2) zu bestimmen. Es deuteten sich höhere PC2-Gehalte in den Wurzeln der starken RNAi-Linie an, wobei die gemessenen Unterschiede nicht signifikant waren (Abb. 60).



**Abbildung 60:** PC<sub>2</sub>-Gehalt in Wurzeln von Wildtyp Langelsheim und RNAi 1-2 Pflanzen, die in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  kultiviert wurden. n = 3.

### 3.6.3. Speziierungsanalyse des Xylemsaftes mit SEC-ICP-MS

Da dem Chelator Nicotianamin eine Rolle in der Zinkmobilisierung innerhalb der Pflanze und damit im Transport zugesprochen wird, wurde neben den Wurzeln und Blättern auch der Xylemsaft verschiedener Linien mit SEC-ICP-MS analysiert. Pflanzen des Wildtyps Langelsheim und der starken RNAi-Linie 1-2 wurden in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  kultiviert. Nach ca. zwei bis drei Wochen wurde von allen Pflanzen der Spross ca. 0,5 cm oberhalb der Wurzel abgeschnitten und der Xylemsaft jeweils für 20 min mit einer Mikropipette abgenommen und gesammelt. Die anschließende Analyse mittels SEC-ICP-MS zeigte, dass ein Teil des im Xylemsaft enthaltenen Zinks mit NA coeluiert, was auf  $\text{Zn}^{2+}$ -NA-Komplexe hindeutet. Eine Quantifizierung der Metallgehalte wurde nicht durchgeführt.

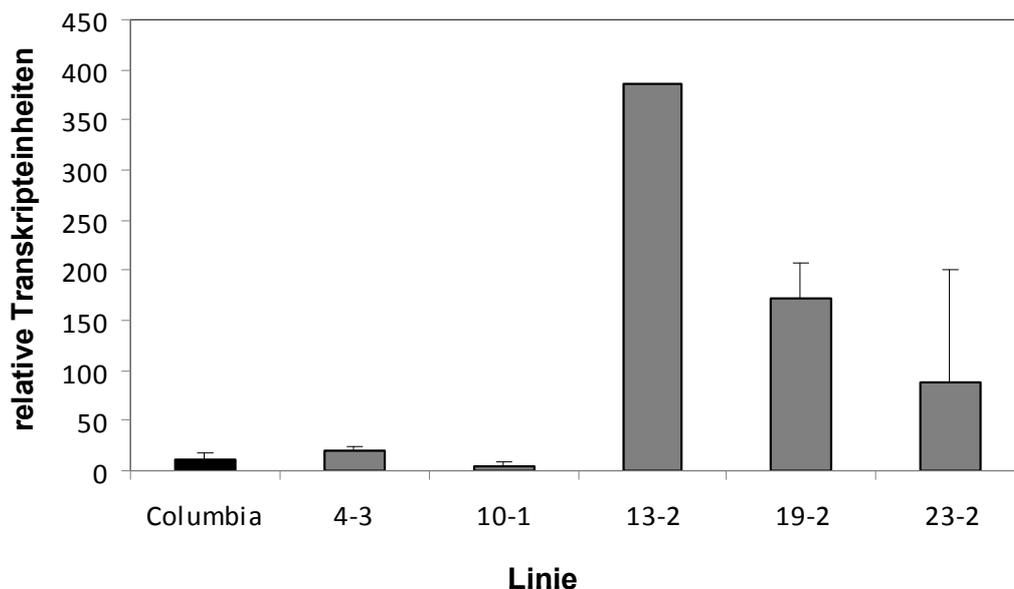
### 3.7. Zinklokalisierung im Blattgewebe durch Elektronenmikroskopie

Langelsheim und RNAi 1-2 Pflanzen wurden auf Kontrollerde aus dem Harz angezogen. Nach einem Monat wurde Blattmaterial geerntet und unter Hochdruck kryofixiert, um möglichst alle Zellschichten intakt zu halten und das Gewebe nicht zu beschädigen. Mit Ultrastruktur- und EDX-Analysen sollte im Transmissionselektronenmikroskop das in den Blättern gespeicherte Zink lokalisiert und gegebenenfalls quantifiziert werden, wobei die Zinkanteile der Proben bei mindestens 2 % liegen müssen, damit die Signale im EM detektiert werden können. Auf Harzerde gewachsene *A. halleri* Wildtyp Langelsheim Pflanzen hatten in Vorversuchen Werte von bis zu 2,5 % im Blattgewebe erreicht, was für eine Lokalisierung

bzw. Quantifizierung mittels Elektronenmikroskopie ausreichend wäre. Da bei der Analyse jedoch keine Zinksignale gemessen werden konnten, wurde das Detektionslimit in den getesteten Pflanzen offenbar unterschritten, weshalb auch keine Aussagen über die subzelluläre Zinklokalisierung oder über eventuelle Unterschiede zwischen Wildtyp und starker RNAi-Linie gemacht werden konnten.

### 3.8. *A. thaliana*-*NAS2*-Überexpressionslinien

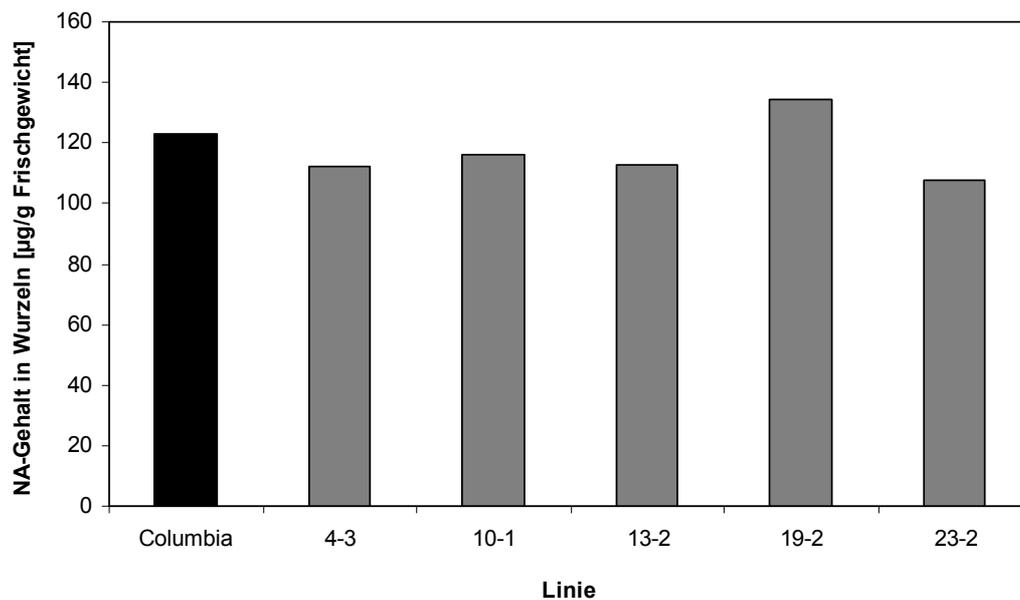
Hanikenne und Mitarbeiter konnten zeigen, dass das genomische *HMA4*-Fragment aus *A. halleri* in transgenen *A. thaliana* Pflanzen funktional ist und zu einer erhöhten *HMA4*-Expression führt (Hanikenne *et al.*, 2008). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob auch mit *AhNAS2* ein derartiger “Gain-of-function“ Effekt erreicht werden kann und welchen Einfluss dieser auf die NA-Gehalte und die Zinkverteilung in *A. thaliana* hat. Wildtyp Columbia Pflanzen wurden mit dem genomischen *NAS2* Fragment aus *A. halleri* transformiert. Dieses enthält ca. 1500 bp Promotorsequenz, das etwa 1000 bp lange *NAS2* Gen und ca. 500 bp Terminatorsequenz. Es wurden fünf unabhängige Linien generiert, die zusammen mit dem Wildtyp Columbia hydroponisch einerseits unter Kontrollbedingungen, andererseits mit zusätzlichen 5  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  im Medium kultiviert wurden. Die *NAS2*-Expressionsstärke der Kontrollproben wurde mittels realtime PCR ermittelt, wobei zwei unabhängige Experimente durchgeführt wurden (Abb. 61).



**Abbildung 61:** *AhNAS2* realtime PCR mit Wurzeln von *A. thaliana* Wildtyp Col-0 und den verschiedenen Nas planta Linien 4-3, 10-1, 13-2, 19-2 und 23-2. Die Pflanzen wurden unter Kontrollbedingungen kultiviert.  $n = 2$ , wobei jeweils fünf Wurzelproben für einen Datenpunkt vereint wurden.

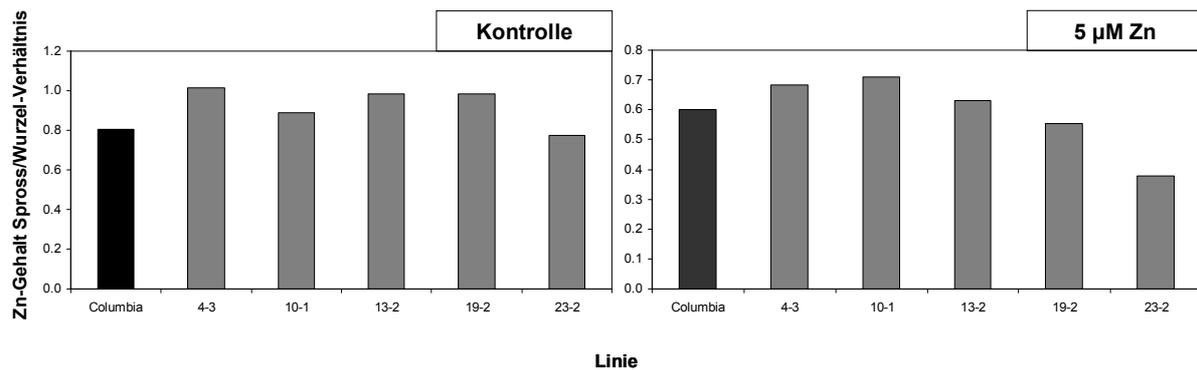
Zwei der fünf getesteten Linien zeigten ein im Vergleich zu Columbia signifikant erhöhtes *NAS2*-Transkript (13-2; 19-2), wobei die Linie 13-2 nur in einem der beiden unabhängigen Replikate analysiert wurde und der Wert somit unter Vorbehalt betrachtet werden muss. Die Linie 23-2 wies ebenfalls eine deutlich erhöhte *NAS2*-Expression auf, wobei die Werte der beiden Replikate stark variierten.

Wie auch schon bei den *AhNAS2* RNAi-Linien wurde der Nicotianamingehalt der Wurzeln mittels LC-MS gemessen. Dabei besaß keine der analysierten Linien im Vergleich zu Columbia erhöhte NA-Gehalte in den Wurzeln.



**Abbildung 62:** Na-Gehalte in Wurzeln von *A. thaliana* Wildtyp Col-0 und den verschiedenen Nas planta Linien 4-3, 10-1, 13-2, 19-2 und 23-2. Die Pflanzen wurden unter Kontrollbedingungen kultiviert. n = 1, wobei jeweils fünf Wurzelproben für einen Datenpunkt vereint wurden.

Im Gegensatz zu den bisher durchgeführten Experimenten mit *A. halleri* Pflanzen hatte die Erhöhung des *NAS2*-Transkriptes keine Steigerung des Nicotianamingehaltes in den Wurzeln der Nas planta Linien zur Folge. Um zu überprüfen, ob die Zinkakkumulation in den Blättern ebenfalls unverändert war, wurde mittels ICP-OES ein Metallprofil der verschiedenen Nas planta Linien erstellt. Wie bereits bei den NA-Gehalten der Wurzeln konnten auch in den Zinkgehalten der Blätter der Nas planta Linien keine signifikanten Unterschiede zu Columbia gemessen werden.



**Abbildung 63:** Zn-Gehalt Spross/Wurzel-Verhältnisse von *A. thaliana* Wildtyp Col-0 und den verschiedenen Nas planta Linien 4-3, 10-1, 13-2, 19-2 und 23-2. Die Pflanzen wurden unter Kontrollbedingungen bzw. in Gegenwart von 5 µM Zn<sup>2+</sup> kultiviert. n = 1, wobei für jede Bedingung fünf Blattproben zu einem Datenpunkt und fünf Wurzelproben zu einem Datenpunkt vereint wurden und aus den Werten das Verhältnis gebildet wurde.

Da weder in den NA-Gehalten noch in der Zinkverteilung signifikante Unterschiede zwischen Columbia und den Nas planta-Linien gemessen werden konnten, wurde auf weitere Replikate des Versuchsansatzes verzichtet.

### 3.9. Analyse einer BAC-Bibliothek zur Bestimmung der Kopienzahl von *AhNAS2*

Wie bereits beschrieben, konnte in vergleichenden Transkriptomanalysen gezeigt werden, dass *NAS2* in *A. halleri* um den Faktor 73 höher exprimiert ist als in *A. thaliana* (Weber *et al.*, 2004). Um die Ursache dieses Unterschieds zu klären, wurden Promotoranalysen mit einem neu entwickelten GUS-Luciferase-Experiment durchgeführt (Höreth, 2011, Masterarbeit, nicht publiziert). Es wurde eine etwa 2,5-fach erhöhte Aktivität des *AhNAS2*-Promotors gemessen, die allein jedoch nicht für die enorme Induktion in *A. halleri* verantwortlich sein kann. Alternative Veränderungen sind die Transkriptstabilität, die Anwesenheit zusätzlicher regulatorischer Elemente und die Genkopienzahl, wobei die Regulation der Transkriptniveaus von Metallhomöostasegenen eine wichtige Rolle in hyperakkumulierenden Pflanzen spielt (Pence *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2004). In *A. halleri* ist die Existenz von mehr als einer Genkopie im Genom ein wesentliches Merkmal mehrerer stark exprimierter Kandidatengene mit möglichen Funktionen in der Metallhyperakkumulation und Metallhypertoleranz (Talke *et al.*, 2006). Die prominentesten Beispiele hierfür sind *AhHMA4* und *AhMTP1* (Hanikenne *et al.*, 2008; Shahzad *et al.*, 2010). Diese Eigenschaft trifft jedoch nicht generell zu, wobei die Gene *FRD3*, *ZIP4* und *MTP8* ebenfalls höher in *A. halleri* exprimiert sind, aber nur in einer

Kopie vorzuliegen scheinen (Talke *et al.*, 2006). Da das Genom von *A. halleri* im Gegensatz zu denen von *A. thaliana* und *A. lyrata* noch nicht komplett durchsequenziert ist, ist die Genkopienzahl von *AhNAS2* nicht bekannt. Um eine mögliche Vervielfachung von *AhNAS2* nachzuweisen, wurde eine BAC-Bibliothek, die das Genom von *A. halleri* repräsentiert, analysiert. Diese wurde freundlicherweise von Dr. Juergen Kroymann von der Université Paris-Sud gescreent. Zunächst führte er einen Vorversuch mit einer *AhNAS2*-Sonde durch, in dem 13 verschiedene BACs identifiziert werden konnten, die alle potentiell *AhNAS2* trugen. Diese 13 Klone wurden für weitere Analysen nach Bayreuth transferiert. Dort wurden mehrere Southern Blots mit verschiedenen Sonden durchgeführt, die entweder für *AhNAS2* oder für *AhNAS1* spezifisch sind (Höreth, 2011, Masterarbeit, nicht publiziert). Anhand dieser Experimente konnten verschiedene Klone identifiziert werden, die nur *AhNAS2* tragen. Anschließend wurde anhand von Restriktionsanalysen eine Gruppierung in die unterschiedlichen Bandenmuster vorgenommen (Höreth, 2011, Masterarbeit, nicht publiziert). Aus jeder der vier erhaltenen Untergruppen wurde ein BAC ausgewählt und sequenziert. Aus einem Sequenzabgleich dieser vier BACs wurde gefolgert, dass möglicherweise drei unterschiedliche *NAS2*-Kopien in *A. halleri* vorhanden sind. Diese wurden im Anschluss mit BAC-DNA als Matrize amplifiziert und in den Hefevektor pSGP72 kloniert. Nach der jeweiligen Kontrolle durch Sequenzierung der Konstrukte wurden Transformanten des zinksensitiven *Schizosaccharomyces pombe* Stammes  $\Delta zhf$  generiert. Mit diesen wurden anschließend Toleranzexperimente unter der Verwendung verschiedener Zinkkonzentrationen im Wachstumsmedium durchgeführt (Michael Kosian, nicht publiziert). Wie schon in vorangegangenen Experimenten (Weber *et al.*, 2004) verlieh das *NAS2.1*-Konstrukt dem Hefestamm eine erhöhte Zinktoleranz bis zu einer externen Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu waren weder die mit dem *NAS2.2*- noch die mit dem *NAS2.3*-Konstrukt transformierten Hefen zinktoleranter als die Kontrolle mit leerem Vektor.

### 3.10. Analyse von *AhNAS4* RNAi-Linien

Neben *AhNAS2* wird auch *AhNAS4* eine Rolle im Metallhaushalt von *Arabidopsis halleri* zugeschrieben und es ist im Vergleich zu *A. thaliana* ebenfalls höher exprimiert. Um den potentiellen Einfluss einer reduzierten *AhNAS4*-Expression auf die Zink- und Cadmiumverteilung in *A. halleri* zu untersuchen, wurden auf die gleiche Weise, wie schon für *AhNAS2*, auch *AhNAS4* RNAi-Linien generiert und im hydroponischen System kultiviert. Neben den Standardbedingungen mit niedrigem Zinkgehalt und mit 10  $\mu\text{M}$  zusätzlichem  $\text{Zn}^{2+}$

im Wachstumsmedium wurden auch Pflanzen in Gegenwart von  $1 \mu\text{M Cd}^{2+}$  angezogen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur eine Runde des Versuchsansatzes mit ICP-OES analysiert, wobei sich Unterschiede in den Metallgehalten von Wildtyp und RNAi-Linien andeuteten. Um diese zu bestätigen, müssen zwei weitere Experimentrunden durchgeführt werden, was über den Rahmen dieser Arbeit hinausging. Die NA-Gehalte und NAS-Transkriptmengen des ersten Versuchsreplikats wurden noch nicht bestimmt.

## 4. Diskussion

### 4.1. Zinkhyperakkumulation in *A. halleri*

Metallhyperakkumulation ist ein vorwiegend in Brassicaceen verbreitetes Phänomen (Krämer, 2010). Etwa 0,2 % aller angiospermen Pflanzenspezies besitzen die Fähigkeit, mindestens ein Metall selektiv zu hyperakkumulieren. Beispielsweise werden Zinkkonzentrationen ab einem Schwellenwert von 10000 µg/g Trockengewicht im Blattgewebe als Hyperakkumulation definiert (Baker & Brooks, 1989; Krämer, 2010). Dies setzt spezielle Anpassungen der Pflanzen voraus, wobei die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen noch nicht hinreichend geklärt sind. Hinsichtlich der in der Einleitung angesprochenen Biofortifikation könnte ein umfassenderes Verständnis des pflanzlichen Metallhaushaltes die Entwicklung nährstoffreicherer Getreidesorten erleichtern (Palmgren *et al.*, 2008). Wie ebenfalls bereits in der Einleitung näher behandelt, wurden durch genetische Untersuchungen Genomabschnitte identifiziert, die direkt mit der pflanzlichen Metalltoleranz bzw. -akkumulation verknüpft zu sein scheinen. In diesen QTL-Regionen liegen somit Kandidatengene mit potentiellen Funktionen in der Metallhomöostase, wobei eine Feinkartierung dieser Gene und ihre nähere Charakterisierung nötig sind, um weitere Teilbereiche des pflanzlichen Metallhaushalts aufklären zu können. Analysen, besonders hinsichtlich der Regulationsunterschiede in den verschiedenen Taxa und der Fähigkeit, basistoleranten Pflanzen eine erhöhte Schwermetalltoleranz zu verleihen, sind dabei von essentieller Bedeutung. Da QTLs hunderte bis tausende Gene beinhalten können und die verfügbaren Sequenzinformationen in verschiedenen Spezies, wie beispielsweise *A. halleri*, oft noch sehr begrenzt sind, gestaltet sich dies augenblicklich kompliziert (Roosens *et al.*, 2008). Die hohe Syntenie mit dem komplett annotierten Genom von *A. thaliana* erlaubt es jedoch, QTL-Regionen von der einen auf die andere Art zu übertragen (Roosens *et al.*, 2007).

Durch vergleichende Transkriptomanalysen wurde nachgewiesen, dass ein Teil der bereits identifizierten Metallhomöostasegene in hyperakkumulierenden Pflanzen höher exprimiert ist als in nahe verwandten Nicht-Hyperakkumulierern. Einige der Gene, wie zum Beispiel *HMA4* oder *MTPI*, konnten bereits näher charakterisiert und hinsichtlich ihrer Wirkungsweise analysiert werden. Mehrere Autoren postulieren eine veränderte Regulation von Metallhomöostasefaktoren als Ursache des Hyperakkumulationsphänomens (Verbruggen *et al.*, 2009), was durch die größtenteils vergleichbare Genregulation in den Hyperakkumulierern *A. halleri* und *N. caerulescens*, aber auch durch die Erkenntnisse aus

Experimenten mit Genen, wie den oben genannten *HMA4* (Hanikenne *et al.*, 2008) oder *MTPI* (Shahzad *et al.*, 2010) begründet wird. Zum tieferen Verständnis müssen weitere potenzielle Schlüsselproteine der Metallhomöostase, deren Regulation in hyperakkumulierenden bzw. toleranten Pflanzen und in ihren nicht-hyperakkumulierenden nahen Verwandten unterschiedlich ist, im Detail analysiert werden.

*NAS2* gehört zu den Genen, deren Expression, verglichen mit *A. thaliana*, in den zinkhyperakkumulierenden Spezies *A. halleri* und *N. caerulescens* am stärksten erhöht ist (Verbruggen *et al.*, 2009). Auf mögliche Erklärungen für die Tatsache, dass es nicht in einer der bislang kartierten QTL-Regionen liegt, wird in Abschnitt 4.4. eingegangen. Die Ursache für die ca. 73-fache Expressionserhöhung in *A. halleri* (Weber *et al.*, 2004) konnte noch nicht gefunden werden. In, auf Protoplastentransformation basierenden, Vergleichsanalysen wurden jeweils die Promotoren von *AtNAS2* bzw. *AhNAS2* in einen Expressionsvektor kloniert, der ein *GUS*-Reportergen und ein Luciferasegen für die Normalisierung der GUS-Signale coexprimierte (Stephan Höreth, 2011, Masterarbeit, nicht publiziert). Dabei konnte zwar gezeigt werden, dass der Promotor von *AhNAS2* stärker ist als der von *AtNAS2*, aber durch diesen Unterschied allein kann die enorme, 73-fache Induktion nicht erklärt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre eine erhöhte *NAS2*-Kopienzahl in *A. halleri*, wie sie bereits für *AhHMA4* oder auch *AhMTPI* gezeigt werden konnte (Hanikenne *et al.*, 2008; Shahzad *et al.*, 2010). Auch dieser Vorschlag soll in Abschnitt 4.4. näher behandelt werden.

Die ersten im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente dienten zur Charakterisierung verschiedener *A. halleri* Populationen von sowohl unbelasteten als auch kontaminierten Standorten aus Deutschland, Polen und Japan. Es sollte die grundlegende Fragestellung bearbeitet werden, ob die Expression von *AhNAS2* in hyperakkumulierenden Pflanzen konstitutiv erhöht ist und wie sich potentielle Veränderungen in den Transkriptmengen auf den Nicotianamingehalt in den Wurzeln auswirken.

## 4.2. Analyse von Individuen verschiedener *A. halleri* Populationen

Alle getesteten, hydroponisch kultivierten Individuen von verschiedenen *A. halleri* Populationen, egal ob sie ursprünglich von kontaminierten oder unbelasteten Standorten stammten, wiesen im Vergleich zu *A. thaliana* erhöhte *AhNAS2*-Expression und eine daraus resultierende Erhöhung der Nicotianamingehalte in Wurzeln auf. Diese physiologischen Charakteristika gehen mit dem speziesübergreifenden Merkmal der Zn-Hyperakkumulation einher. Alle untersuchten Pflanzen zeigten eine starke Zinkakkumulation im Blattgewebe, wobei die gemessenen Zinkkonzentrationen zwischen 2800 und 30500 µg/g Trockengewicht

lagen. Transplantationsversuche mit diesen Populationen könnten Auskunft darüber geben, ob sich die Zinkhyperakkumulation in von einem kontaminierten Standort stammenden Pflanzen auf unbelasteter Erde verändert und umgekehrt (siehe Abschnitt 4.3.2.2.). Wie bereits erwähnt, ist die biologische Funktion der Hyperakkumulation von Schwermetallen noch unbekannt. Eine Hypothese ist, dass sie als pflanzlicher Abwehrmechanismus gegen Fressfeinde dienen könnte. Dies kann anhand von Fütterungsversuchen mit Herbivoren untersucht werden, wobei auch hier die Tatsache von Vorteil wäre, dass die verschiedenen Populationen zum einen von nicht bis hin zu stark kontaminierten Böden stammen und zum anderen auch eine unterschiedlich stark ausgeprägte Zinkhyperakkumulation aufweisen. Derartige Versuchsansätze wurden bereits mit verschiedenen Pflanzen, wie beispielsweise dem arsenhyperakkumulierenden Farn *Pteris vittata* durchgeführt (Rathinasabapathi *et al.*, 2007). Nymphen des Grashüpfers *Schistocerca americana* nutzten fast ausschließlich Kontrollpflanzen, die nur sehr niedrige Arsenkonzentrationen besaßen, als Nahrungsquelle, während die ebenfalls verfügbaren arsenhaltigen Farne kaum oder gar keine Fraßspuren aufwiesen (Rathinasabapathi *et al.*, 2007). Auch in Studien mit der Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria*, der *N. caerulea* Pflanzen mit unterschiedlich hohem Zinkgehalt als Nahrungsquelle angeboten wurden, zeigte sich ein ähnliches Verhalten. Je höher die Zinkkonzentration war, desto eher wurden die Pflanzen von den Heuschrecken gemieden. Bei Zusatzversuchen mit künstlichem Futter, das ebenfalls unterschiedliche Zinkgehalte besaß, wurde erneut die Niedrigzinknahrung bevorzugt (Behmer *et al.*, 2005). In den meisten der bisher durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass invertebrate Herbivoren schwermetallhyperakkumulierende Pflanzen als Nahrungsquelle mieden (Pollard & Baker, 1997; Jhee *et al.*, 1999) und dass kontinuierliches Fressen von Pflanzen mit stark erhöhtem Metallgehalt negative Auswirkungen auf Wachstum und Überleben der Herbivoren hatte (Boyd & Moar, 1999; Behmer *et al.*, 2005). Des Weiteren stellten Behmer und Mitarbeiter die Theorie auf, dass die Tiere nicht beim ersten Kontakt die erhöhten Zinkkonzentrationen in den Pflanzen schmecken können, sondern dass sich vielmehr eine Abneigung durch assoziatives Lernen entwickelt.

Alle genannten Beispiele untermauern die Theorie, dass Schwermetallhyperakkumulation einen Abwehrmechanismus gegen herbivore Insekten darstellt, wobei weitere ähnlich angeordnete Experimente nötig sind, um sie zu erhärten. Die hauptsächlichen Kritikpunkte sind, dass die bisher durchgeführten Studien nur unter kontrollierten Laborbedingungen mit einer kleinen Zahl an Herbivoren abgelaufen sind und dass nur wenige Elemente und Taxa getestet wurden (Boyd, 2007; Rascio & Navari-Izzo, 2011).

### 4.3. Analyse von RNAi Linien mit unterschiedlichen *AhNAS2*-Transkriptniveaus

#### 4.3.1. Transkriptanalyse und NA-Analytik

Durch die Transformation mit einem RNAi-Konstrukt konnten drei transgene Pflanzenlinien erzeugt werden, die im Vergleich zu *A. halleri* Wildtyp Langelsheim eine sehr starke und stabile Reduktion in der *AhNAS2*-Transkriptmenge aufweisen. Mit dem gleichen Konstrukt transformierte Pflanzen, die jedoch keinen signifikanten bzw. einen nur schwachen RNAi-Effekt zeigten, wurden zusätzlich zum Wildtyp als Kontrollpflanzen verwendet. Die niedrigere *NAS2*-Expression führte in den Linien 1-2, 7-12 und 11-1 zu einer signifikanten Reduktion des NA-Gehaltes in Wurzeln. In allen mit den Wurzelproben der RNAi-Linien durchgeführten Experimenten konnte dabei eine hohe Korrelation zwischen *AhNAS2*-Transkriptmenge und NA-Gehalt gemessen werden, woraus geschlossen werden kann, dass *NAS* den limitierenden Faktor für die NA-Biosynthese darstellt und hauptsächlich transkriptionell reguliert ist. Diese Hypothese wird durch Experimente mit *OsNAS3* überexprimierendem Reis gestützt, obwohl in monokotylen Pflanzen NA zu Phytosiderophoren weitermetabolisiert werden kann. Die NA-Gehalte in den Samen der transgenen Reispflanzen waren 30-fach erhöht und resultierten in einem 10-fach höheren NA-Gehalt (Lee *et al.*, 2009). Ferner konnten Talke und Kollegen in vergleichenden Transkriptomanalysen zeigen, dass die *S-Adenosyl-Methionin Synthetasen1-3* in *A. halleri* ebenfalls konstitutiv höher exprimiert sind als in *A. thaliana* (Talke *et al.*, 2006). Wie bereits in Abschnitt 1.6. beschrieben, katalysieren diese Enzyme die Bildung von S-Adenosyl-Methionin, welches als Vorstufe von Nicotianamin dient (Abb. 2). Somit zeigen mehrere Gene des NA-Biosynthesewegs in *A. halleri* konstitutiv erhöhte Transkriptmengen, was zusätzlich auf eine transkriptionelle Regulation der NA-Bildung hinweist.

Die *NAS*-Genfamilie ist innerhalb der Gattung *Arabidopsis* konserviert, wobei die Klonierung aller vier *NAS* Isoformen aus *A. halleri* und die anschließende Transkriptanalyse zeigte, dass das Expressionsmuster und auch die Gewebsspezifität der einzelnen Gene in *A. thaliana* und *A. halleri* vergleichbar sind. Des Weiteren existieren orthologe Gene zu *NAS1*, -2, -3 und -4 auch im bereits komplett sequenzierten Genom der nahe mit *A. halleri* verwandten, aber nicht hyperakkumulierenden Art *Arabidopsis lyrata* (Hu *et al.*, 2011).

In zwei der starken RNAi-Linien konnte, wie bereits in den Wurzeln, auch im Blattgewebe eine leichte Reduktion der NA-Gehalte gemessen werden. Dies könnte zum einen durch den schwachen Effekt des RNAi-Konstruktes auf das *AhNAS1*-Transkriptlevel und zum anderen

durch einen möglichen Transport von NA im Xylem erklärt werden. Auf die zweite dieser beiden potentiellen Erklärungen soll in Abschnitt 4.3.3.2. näher eingegangen werden. Vergleicht man die *AhNAS1*-Expression in Linie 0-7 mit der in den Linien mit starkem RNAi-Effekt, so kann eine leichte Reduktion festgestellt werden. Die Tatsache, dass das RNAi-Konstrukt nicht zu 100 % spezifisch für *AhNAS2* ist, kann mit der bereits erwähnten Sequenzhomologie von 85 % zwischen *AhNAS1* und *AhNAS2* begründet werden. Außerdem wurde in den realtime PCR Analysen gezeigt, dass die Isoformen *AhNAS3* und *AhNAS4* nicht beeinflusst werden, wobei diese nur 68 % Sequenzhomologie zu *AhNAS2* besitzen (siehe Anhang I: Alignment der vier *AhNAS*-Isoformen). *NAS2* ist fast ausschließlich in Wurzeln exprimiert, weshalb die Expression im Blattgewebe nur knapp über dem Detektionslimit liegen sollte. Erstaunlicherweise zeigte die *AhNAS2* RNAi-Linie 3-3 eine sehr hohe *NAS2*-Expression in den Blättern. Bislang konnten erhöhte *NAS2*-Transkripte im Spross nur bei Zinkdefizienz nachgewiesen werden (Talke *et al.*, 2006). Somit könnte eine Erklärung für diese unnormal hohen Werte in Linie 3-3 sein, dass die Pflanzen zum Zeitpunkt der Probennahme unter Zinkmangel litten. Gegen diese Theorie spricht jedoch zum einen, dass die *NAS2*-Transkriptmengen sowohl unter Kontrollbedingungen als auch in Gegenwart von 10  $\mu\text{M Zn}^{2+}$  stark erhöht waren und zum anderen, dass innerhalb eines Experiments immer verschiedene Pflanzenlinien in einem Topf angezogen wurden und somit auch die anderen, mit der Linie 3-3 kokultivierten Pflanzen, zinkdefizient gewesen sein müssten. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es keine plausible Erklärung für eine derart starke Induktion der *NAS2*-Expression in Blättern gibt. Des Weiteren war auffällig, dass die NA-Gehalte in den Wurzeln der in Gegenwart von 10  $\mu\text{M Zn}^{2+}$  kultivierten Wildtyp- und RNAi 0-7 Pflanzen etwa doppelt so hoch waren wie die der unter Kontrollbedingungen gewachsenen. Da die *AhNAS2*-Transkripte jedoch keiner Regulation durch die externe Zinkkonzentration unterlagen, kann dieser Effekt nicht erklärt werden.

#### 4.3.2. ICP-OES-Messungen

##### 4.3.2.1. Pflanzenanzucht im hydroponischen System

Der Wert für das Verhältnis von Spross-Zinkgehalt zu Wurzel-Zinkgehalt ist in Hyperakkumulierern deutlich erhöht und in der Regel größer als eins (Krämer, 2010). Um Faktor 10 erhöhte Werte sind für hyperakkumulierende Pflanzen ein normales Charakteristikum, hängen jedoch von der Zinkverfügbarkeit im Wachstumsmedium bzw. des Bodens ab (Shen *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden in den hydroponischen Experimenten bei einer Zinkkonzentration im Wachstumsmedium von

10  $\mu\text{M}$  Verhältniswerte von durchschnittlich etwa 15 für Wildtyppflanzen erreicht, während sie in allen drei starken RNAi-Linien unter dem Wert 4 lagen. Diese deutliche Reduktion kann allein auf die geringere *AhNAS2*-Expression zurückgeführt werden, wodurch die These unterstützt wird, dass Nicotianamin nicht nur für den pflanzlichen Eisenhaushalt, sondern auch für die Mobilität weiterer Mikronährstoffe wichtig ist (Takahashi *et al.*, 2003). Auch in den bereits angesprochenen transgenen Reispflanzen, in denen die Überexpression sowohl von *OsNAS2* als auch von *OsNAS3* zu einer signifikanten Erhöhung des NA-Gehaltes führte, war der Zinkgehalt in Samen erhöht (Lee *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011). Dabei zeigten die *NAS*-Überexpressionslinien sowohl erhöhte Toleranz gegenüber Zinkmangel als auch gegenüber Zinkstress, während nach der Ausschaltung von *OsNAS3* gegensätzliche Phänotypen beobachtet werden konnten (Lee *et al.*, 2009). Die Überexpression von *OsNAS1* im Endosperm von Reis resultierte ebenfalls in erhöhten Zinkkonzentrationen (Zheng *et al.*, 2010) und transgene Reiskörner, die *NAS* aus Gerste unter der Kontrolle des *Actin1*-Promotors exprimierten, enthielten 30 % mehr Zink (Masuda *et al.*, 2009). Ferner konnten durch Coexpression von *NAS* und *Ferritin* um 50 % erhöhte Zinkgehalte im Reisendosperm erreicht werden (Wirth *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011).

Die signifikant höheren Zinkgehalte in Wurzeln und die niedrigeren Zinkgehalte in Blättern der starken *AhNAS2* RNAi-Linien weisen auf eine Störung der Wurzel-Spross-Translokation hin. NA könnte somit für die Zinkchelatierung im Wurzelgewebe und die symplastische Mobilität von  $\text{Zn}^{2+}$  zum Xylem hin verantwortlich sein. Die Unterdrückung der vakuolären Sequestrierung in Wurzelzellen wurde bereits als für die Hyperakkumulation wichtiger Mechanismus diskutiert (Clemens *et al.*, 2002; Verbruggen *et al.*, 2009). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die ektopische Expression von *AtNAS1* in Tabak zu einer erhöhten Akkumulation von Zink und Mangan in den Blättern führt (Douchkov *et al.*, 2005). Vergleichbare Effekte konnten auch in anderen Experimenten mit *AtNAS1*-exprimierenden Tabakpflanzen gezeigt werden. Erneut waren die Eisen-, Mangan- und Zinkgehalte im Spross der transgenen Linien höher als im Wildtyp (Kim *et al.*, 2005), während in nicotianamindefizientem Tabak nicht nur die Eisen-, sondern auch die Zinkgehalte in den Blättern reduziert waren (Takahashi *et al.*, 2003).

Aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften kann NA sehr effizient als symplastischer Metallchelator fungieren (Curie *et al.*, 2009). So kann es bei neutralem pH-Wert stabile Komplexe mit verschiedenen zweiwertigen Kationen, wie zum Beispiel  $\text{Zn}^{2+}$ , bilden (von Wiren *et al.*, 1999; Curie *et al.*, 2009). In *S. pombe* Zellen konnte auch *in vivo* die Bildung von  $\text{Zn}^{2+}$ -NA-Komplexen mittels x-ray absorption spectroscopy (XAS) nachgewiesen werden

(Trampczynska *et al.*, 2010). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Zink-Speziierungsexperimente werden in Abschnitt 4.3.3. getrennt diskutiert.

Alle vorher genannten Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Nicotianamin eine wichtige Rolle im pflanzlichen Zinkhaushalt spielt. Die von den hydroponisch gewachsenen *AhNAS2* RNAi-Linien erstellten Metallprofile gaben jedoch keinen Hinweis darauf, dass die Verteilung der Metalle Eisen und Kupfer, im Vergleich zum Wildtyp, verändert war. In den Daten für Mangan hingegen ließ sich der Trend erkennen, dass die Sprossgehalt/Wurzelgehalt-Verhältnisse in den starken RNAi-Linien etwas niedriger waren, als in den Kontrolllinien, wobei der Unterschied zu Linie 11-1 sogar leicht signifikant war (Abb. 32). Über die Verteilung von Nickel und Cadmium konnte anhand dieses Wachstumsexperiments keine Aussage gemacht werden, da beide Metalle nur in Spuren im hydroponischen 1/10 Hoaglandmedium enthalten sind. Um zu untersuchen, ob reduzierte NA-Gehalte in Wurzeln auch den Ni- und Cd-Transport in *A. halleri* beeinflussen, wurden deshalb hydroponische Toleranzexperimente durchgeführt. Während in *A. thaliana* bereits eine Cadmiumkonzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  zu Wachstumsstörungen führt (Van Belleghem *et al.*, 2007), wurde das Wurzellängenwachstum aller getesteten *A. halleri* Pflanzen durch Zugabe von 2  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  zum Medium stimuliert und auch in der Ausprägung der Blattrosetten gab es keine Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollbedingungen, während alle getesteten Linien nach Wachstum in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  starke Toxizitätssymptome aufwiesen. Aus der Tatsache, dass sich zwischen den einzelnen Linien keinerlei phänotypische Unterschiede zeigten, kann geschlossen werden, dass ein reduzierter NA-Gehalt in Wurzeln von *A. halleri* bei Cadmiumkonzentrationen bis 2  $\mu\text{M}$  im hydroponischen Medium keine zusätzliche Beeinträchtigung des Pflanzenwachstums nach sich zieht. In der Cadmiumakkumulation konnten nach Kultivierung mit zusätzlichen 2  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp, Kontroll-RNAi-Linie 0-7 und starker RNAi-Linie 1-2 gemessen werden. Die Konzentrationen schwankten stark und lagen in Wurzeln im Bereich von 161 bis 935  $\mu\text{g/g}$  Trockengewicht und in Blättern zwischen 550 und 1366  $\mu\text{g/g}$  Trockengewicht. Die Erhöhung der Cadmiumkonzentration im Medium auf 10  $\mu\text{M}$  resultierte auch in einer Erhöhung der mit ICP-OES gemessenen Werte, die dann in Wurzeln zwischen 1368 und 2370  $\mu\text{g/g}$  Trockengewicht und in Blättern zwischen 2234 und 3032  $\mu\text{g/g}$  Trockengewicht lagen. Der von Ueno und Mitarbeitern nach Pflanzenkultivierung in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  gemessene Höchstwert von ca. 1500  $\mu\text{g/g}$  Trockengewicht war eher mit dem in der vorliegenden Arbeit nach Wachstum mit zusätzlichen 2  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  erhaltenen Maximalwert vergleichbar, wobei, wie bereits erwähnt, in der vorliegenden Arbeit

Cadmiumkonzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  im hydroponischen Medium bereits zu deutlich sichtbaren Toxizitätssymptomen der Pflanzen führten und die Gruppe um Ueno bei dieser Konzentration keine phänotypischen Unterschiede zu den Kontrollpflanzen beobachten konnten (Ueno *et al.*, 2008). Dies könnte auf die unterschiedliche Zusammensetzung der jeweils eingesetzten hydroponischen Wachstumsmedien zurückzuführen sein. Offenbar ist in dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten 1/10 Hoaglandmedium ein größerer Anteil des zugegebenen Cadmiums für die Pflanzen bioverfügbar, als in dem von Ueno und Kollegen verwendeten Flüssigmedium. Des Weiteren könnte in 1/10 Hoaglandmedium weniger Konkurrenz für das zugegebene  $\text{Cd}^{2+}$  herrschen, da andere Kationen nur in niedrigen Konzentrationen vorliegen. Auch Küpper und seine Mitarbeiter und Zhao und Kollegen zeigten, dass hydroponisch gewachsene *A. halleri* Pflanzen Cadmiumgehalte von mehr als 1000  $\mu\text{g/g}$  Trockengewicht in den Blättern anreichern können, wobei das Pflanzenwachstum reduziert war, wenn die Cadmiumsprossgehalte einen Wert von 230  $\mu\text{g/g}$  Trockengewicht überschritten (Küpper *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2006). Die Arbeitsgruppe um Bert erhielt Werte für das Spross/Wurzel-Verhältnis der Cadmiumgehalte, die nach Kultivierung der Pflanzen in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  bei lediglich 0,23 lagen (Bert *et al.*, 2000). Auch in den Experimenten von Zhao und Mitarbeitern waren nur die Verhältnisse der Pflanzen  $> 1$ , die in Gegenwart der geringen Cadmiumkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  angezogen wurden (Zhao *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu waren die im Rahmen dieser Arbeit bei Konzentrationen von 2 bzw. 10  $\mu\text{M}$  erhaltenen Verhältniswerte für alle getesteten Pflanzen  $\geq 1$ . Interessanterweise deutete sich an, dass nach Wachstum mit zusätzlichen 10  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  das Spross/Wurzel-Verhältnis der Cadmiumgehalte in der starken RNAi-Linie 1-2 niedriger war als in den beiden Kontrolllinien. Dieses Ergebnis weist auf eine potentielle Rolle von Nicotianamin in der Cadmiumtranslokation von der Wurzel ins Blattgewebe hin. Für das erwähnte induzierte Wurzelwachstum bei erhöhter Cadmiumkonzentration im Medium existiert ein möglicher Erklärungsansatz. Für Cadmium, welches schon in geringen Mengen toxisch wirkt und als eines der giftigsten Schwermetalle bekannt ist, wurde bereits eine biologische Rolle in lebenden Organismen vorgeschlagen. In *Thalassiosira weissflogii* übernimmt Cd die Rolle von Zink unter zinklimitierenden Bedingungen und stimuliert das Wachstum zinkdefizienter Algen (Lane *et al.*, 2005). *T. weissflogii* exprimiert eine cadmiumspezifische Carboanhydrase, die speziell unter zinklimitierenden Bedingungen die Funktion einer zinkabhängigen Carboanhydrase ersetzt (Lane *et al.*, 2005). Ein ähnlicher Mechanismus könnte in *A. halleri* dazu führen, dass niedrige Cadmiumkonzentrationen, wie die angewendeten 2  $\mu\text{M}$ , zu einer Stimulation des Wurzelwachstums führen. Um den Schwellenwert zu ermitteln, ab dem

Cadmium sich auch auf das Wurzelwachstum von *A. halleri* toxisch auswirkt, müssen weitere Toleranzexperimente mit ansteigenden Konzentrationen im Wachstumsmedium durchgeführt werden. In Pflanzen des französischen Ganges-Ökotyps von *N. caerulea*, die in ihrem Blattgewebe sehr hohe Cadmiumkonzentrationen hyperakkumulieren, wurde die Cadmiumaufnahme nicht durch Zink inhibiert, was auf die Existenz eines spezifischen und effizienten Cadmiumaufnahmesystems in Wurzelzellen hinweist (Lombi *et al.*, 2001). Auch waren bei einer externen Zinkzufuhr, die zehnmal höher war als die Cadmiumzugabe, die Cadmiumkonzentrationen im Xylemsaft von *A. halleri* immer noch fünfmal höher als im externen Wachstumsmedium, was ebenfalls auf einen spezifischen Transporter schließen lässt (Ueno *et al.*, 2008). Falls es einen derartigen, für die Aufnahme von Cadmium spezifischen Mechanismus geben sollte, so würde dies die Hypothese einer physiologischen Rolle von Cadmium in der Pflanze unterstützen (Rascio & Navari-Izzo, 2011). Tatsächlich gab es eine positive Korrelation zwischen Cadmiumkonzentration und Carboanhydraseaktivität im Spross des Ganges-Ökotyps (Liu *et al.*, 2008). Neben Cadmium wurden auch Versuche mit erhöhter Nickelkonzentration im hydroponischen System unternommen. In den Nickelgehalten der Blattproben konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolllinien und starken RNAi-Linien gemessen werden, während sich für die Wurzelproben ein deutlicher Trend ergab. Sowohl im Wildtyp als auch in der schwachen RNAi-Linie 0-7 waren die Nickelkonzentrationen höher als in den beiden getesteten starken RNAi-Linien. Außerdem wuchsen bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  alle getesteten Pflanzen deutlich schlechter als unter Kontrollbedingungen und bildeten starke Chlorosen aus. Diese Toxizitätssymptome waren mit denen vergleichbar, die nach Kultivierung in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  beobachtet werden konnten. Im Gegensatz zum Cadmiumexperiment war jedoch das Wurzelwachstum aller Linien signifikant inhibiert. Diese Beobachtungen entsprechen den Erwartungen, da Chlorosen und vermindertes Wurzelwachstum bereits als Symptome für Nickeltoxizität in Pflanzen bekannt waren (Brune & Dietz, 1995). Ein weiterer Unterschied zum Cadmiumexperiment war, dass nach Nickelzugabe die Wurzeln der starken RNAi-Linien im Vergleich zum Wildtyp und der Kontrolllinie 0-7 signifikant verkürzt waren. Dies bestätigt die bereits in der Literatur diskutierte Rolle von Nicotianamin in der pflanzlichen Nickelhomöostase. So führte die Expression von *NASI* aus *N. caerulea* in *A. thaliana* zu einer deutlich erhöhten Nickeltoleranz. Der NA-Gehalt der transgenen Pflanzen war bis zu 100 mal höher als der von Wildtyppflanzen und führte neben dem bereits erwähnten Toleranzeffekt auch zu einer erhöhten Nickelakkumulation in auf nickelhaltiger Erde kultivierten Pflanzen (Pianelli *et al.*, 2005). Zusätzlich konnte bereits gezeigt werden, dass

Nicotianamin als Antwort auf toxische externe Nickelkonzentrationen im Xylem von *N. caerulescens* Nickel chelatiert (Vacchina *et al.*, 2003). In Tabak wiesen *HvNAS1* Überexpressionslinien eine deutliche Toleranz gegenüber 200  $\mu\text{M}$  Ni auf, wobei Wildtyppflanzen bei dieser Konzentration starke Toxizitätssymptome zeigten (Kim *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die ektopische Expression von *AtNAS1* in Tabak in einer erhöhten Nickeltoleranz der Keimlinge resultierte (Douchkov *et al.*, 2005).

Alle genannten Experimente zeigen die Verbindung zwischen NA und Nickel in Pflanzen auf und unterstreichen die Tatsache, dass die Fähigkeit von NA, Metalle zu komplexieren und damit die Mobilisierung der Metalle und auch die Metalltoleranz der Pflanzen zu beeinflussen, nicht auf nur ein bestimmtes Element beschränkt ist. Interessanterweise zeigten die *AhNAS2* RNAi-Linien einen für die Zinktranslokation spezifischen Phänotyp, wobei sich auch eine Störung in der Cadmiumakkumulation im Spross andeutete. Im Gegensatz dazu war der beobachtete Toleranzeffekt spezifisch für Nickel. Dass nach Kultivierung in Gegenwart von 5  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  auch das Spross/Wurzel-Verhältnis des Nickelgehalts in den starken RNAi-Linien signifikant höher war als in den Kontrolllinien, war nur auf Unterschiede im Wurzelnickelgehalt zurückzuführen, während die Blattnickelgehalte vergleichbar waren. Dies weist auf eine mögliche Rolle von NA in der Nickelsequestrierung hin. Bei reduzierter NA-Konzentration könnte somit weniger Nickel in die Wurzelvakuole sequestriert und gespeichert werden. Damit wäre auch die Entgiftung der überschüssigen Metallionen gestört, was den Nickelhypersensitivitätsphänotyp der starken *AhNAS2* RNAi-Linien mit stark verküzztem Wurzellängenwachstum erklären würde. Auch die deutlich höheren Nickelgehalte in den Wurzeln der beiden Kontrolllinien unterstützen diese Hypothese. Weitere Experimente mit diesen Linien im hydroponischen System bzw. mit kontaminierter Erde, bei denen sowohl erhöhte Zink- als auch höhere Nickel- und Cadmiumkonzentrationen in verschiedenen Verhältnissen zugegeben werden, könnten einerseits den bereits gezeigten Hyperakkumulationseffekt und andererseits den Hypersensitivitätsphänotyp verstärken. Außerdem könnte somit die Frage behandelt werden, inwiefern Zink-, Cadmium- und Nickeltransport in *A. halleri* miteinander verknüpft sind.

Neben den bereits behandelten Cadmium- und Nickeltoleranzexperimenten wurden auch Versuche mit hohem Zinküberschuss im hydroponischen Medium durchgeführt. Dafür wurde eine Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  ausgewählt, da bei dieser normale, nicht zinktolerante Pflanzen nicht mehr überleben können. Die Tatsache, dass alle getesteten Linien in Gegenwart von 300  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  deutlich besser wuchsen als unter Kontrollbedingungen, lässt darauf schließen, dass das verwendete Kontrollmedium mit einer sehr niedrigen

Zinkkonzentration von 0,077  $\mu\text{M}$  bereits zu einer Zinkdefizienz der Pflanzen führt. Nach Ueno benötigt der fakultative Metallophyt *A. halleri* mindestens eine Zinkkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  im Medium, um ein gesundes Wachstum erreichen zu können (Ueno *et al.*, 2008). Da *A. halleri* Pflanzen auch sehr hohe Zinkkonzentrationen tolerieren können, resultierten die im hydroponischen Toleranzversuch angewendeten 300  $\mu\text{M}$  lediglich in einer schwachen Reduktion des Wurzellängenwachstums, während das Sprosswachstum sogar gefördert wurde. Die Tatsache, dass in den starken RNAi-Linien unter Kontrollbedingungen kein Zinkhyperakkumulationsphänotyp nachgewiesen werden konnte, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Pflanzen den bei normaler Zinkversorgung erhöhten Zinktransport ins Blattgewebe reduzierten, um Zinkdefizienz in den Wurzeln entgegenzuwirken.

#### 4.3.2.2. Kultivierung auf artifiziell kontaminierter Erde und auf belasteten Böden von nativen *A. halleri*-Standorten

Um die Wachstumsbedingungen der Pflanzen naturnaher zu gestalten, als es in hydroponischem Medium der Fall ist, wurden Wachstumsexperimente mit artifiziell kontaminierter Mineralerde durchgeführt. Auf der mit 3200  $\mu\text{g/g}$  mittelstark mit Zink kontaminierten Erde konnte der in den hydroponischen Experimenten beobachtete Hyperakkumulationsphänotyp reproduziert werden. Die Blattzinkgehalte der starken RNAi-Linie 1-2 waren im Vergleich zu den beiden Kontrolllinien signifikant um 35 % reduziert. Die exakten Cadmiumgehalte konnten nur in den auf Kontrollerde gewachsenen Pflanzen bestimmt werden, da mit steigender Zinkkonzentration in der Erde die Cadmiumkonzentrationen in den Blättern niedriger wurden. Zhao und Mitarbeiter konnten bereits zeigen, dass die Aufnahmeraten von Zink höher sind als die von Cadmium und dass Zinküberschuss im Wachstumsmedium die Cadmiumaufnahme verringert (Zhao *et al.*, 2006). Diese Korrelationen deuten darauf hin, dass Cadmiumionen zumindest teilweise über Zinkaufnahme- bzw. -transportmechanismen in die Pflanze gelangen und verteilt werden (Ueno *et al.*, 2008). Die in den Blättern der auf Kontrollerde gewachsenen Pflanzen gemessenen Cadmiumgehalte lagen im Bereich von 2  $\mu\text{g/g}$  Trockengewicht, wobei sich wie schon im hydroponischen Cadmiumtoleranzexperiment ein Unterschied zwischen den Kontrolllinien und der starken RNAi-Linie andeutete. Die Cadmiumkonzentrationen in den Blättern der Linie 1-2 waren signifikant um 42 % reduziert, was erneut eine Rolle von NA im pflanzlichen Cadmiumtransport nahe legt. Wie erwähnt, gab es auf keiner der artifiziell kontaminierten Erdtypen signifikante Veränderungen in der Akkumulation von Mangan, Kupfer oder Eisen.

Um die Kultivierungsbedingungen der Pflanzen noch natürlicher zu gestalten, als es mit der artifiziiell kontaminierten Erde möglich ist, wurden bei einer Exkursion in den Harz Bodenproben mit verschiedenen starken Schwermetallkontaminierungsgraden gesammelt. Dabei handelte es sich um eine Erde ohne erhöhte Metallkonzentrationen und zwei zinkbelastete Erdtypen. Es ergab sich keine Korrelation zwischen Metallgehalt der Erde und Metallgehalt der Pflanzen, die auf dieser wuchsen. Die Verfügbarkeit eines Metalls für die pflanzliche Aufnahme hängt von mehreren Faktoren, wie den chemischen Eigenschaften der Metallkationen, der Zusammensetzung der Erde, der mikrobiellen Aktivität und der Pflanzenwurzel ab (Antunes *et al.*, 2006; Palmgren *et al.*, 2008). Da die Bioverfügbarkeit der Metalle stark schwanken kann, wurden drei verschiedene Extraktionsmethoden angewendet, um die einzelnen Erdtypen bestmöglich zu charakterisieren. Es wurde mit Salzsäure extrahiert, um die Gesamtheit an extrahierbaren Metallen messen zu können. Für die Analyse der bioverfügbaren Metalle wurde mit einer Calciumchloridlösung und einem weiteren Ansatz mit einer Suspension aus DTPA, Calciumchlorid und Triethanolamin extrahiert. Die drei nativen Böden aus dem Harz unterschieden sich stark in ihren Metallgehalten. Erwartungsgemäß lagen die Konzentrationen an freien Metallen in der Erde im unteren mikromolaren bis niedrigen nanomolaren Bereich (Krämer & Clemens, 2006). In normalen Böden liegt Zink zu über 90 % in unlöslicher Form vor und ist somit für die pflanzliche Aufnahme nicht verfügbar (Barber, 1995). Während die mit der HCl-Methode extrahierbaren Zinkkonzentrationen in den drei Erdtypen bei etwa 100, 2000 und 15000 µg/g lagen, so waren die mit der DTPA-Methode austauschbaren Konzentrationen mit ca. 100, 830 und 860 µg/g zumindest in den beiden kontaminierten Böden deutlich niedriger. Den Erwartungen entsprechend waren die mittels einfacher CaCl<sub>2</sub>-Extraktion erhaltenen Ionenkonzentrationen noch einmal signifikant reduziert, da bei der alternativen Methode mit zusätzlichem DTPA ein Chelator die Wirkung von CaCl<sub>2</sub> verstärkte. Somit wurden sowohl mit der HCl- als auch mit der DTPA-Methode aus den Böden Harz 1 und Harz 2 Zinkkonzentrationen extrahiert, die deutlich über dem definierten Kontaminationsschwellenwert von 300 µg/g lagen, während Harz 1 mit etwa 100 µg/g als Kontrollerde fungierte. Alle getesteten Linien wuchsen auf Harz 1-Boden gleich gut, während mit steigendem Zinkgehalt in der Erde eine leichte Wachstumsreduktion zu beobachten war. Zwischen den einzelnen Linien waren jedoch keine sichtbaren Unterschiede zu erkennen. Da die bioverfügbaren Zinkkonzentrationen in den Erdtypen Harz 2 und Harz 3 mit ca. 830 und 860 µg/g etwa im selben Bereich lagen, kann die Wachstumsreduktion der auf Harz 3-Erde kultivierten Pflanzen nicht anhand des Zinkgehaltes erklärt werden. Das einzige Metall, welches in Harz 3 in deutlich höheren Konzentrationen

vorlag als in den anderen beiden Böden, war Kupfer. Der Wert von ca. 160  $\mu\text{g/g}$  gegenüber denen im Bereich von 30  $\mu\text{g/g}$  stellt eine drastische Erhöhung dar und könnte die leichten phänotypischen Unterschiede der auf Harz 3-Erde gewachsenen im Gegensatz zu den auf Harz 1 und Harz 2 kultivierten Pflanzen verursacht haben. Im Hinblick auf die Metallakkumulation im Sprossgewebe konnten nur Unterschiede für Zink und Cadmium festgestellt werden. Während die Zink- und Cadmiumgehalte der in freier Natur gewachsenen *A. halleri* Pflanzen in unseren Messungen bei etwa 11500 bzw. 40  $\mu\text{g/g}$  Trockengewicht lagen, erreichten die auf der nativen Harzerde gewachsenen Konzentrationen von etwa 12000 bzw. 40  $\mu\text{g/g}$  Trockengewicht. Diese sehr gut vergleichbaren Werte zeigen, dass es gelang, natürliche Wachstumsbedingungen im Hinblick auf die Hyperakkumulation nachzustellen.

Pflanzen des Wildtyps, der schwachen RNAi-Linie 0-7 und der starken Linien zeigten auf dem Kontrollboden Harz 1 und der mittelstark kontaminierten Erde Harz 2 hochsignifikante ( $p < 0,001$ ) Unterschiede in den Zinkgehalten im Sprossmaterial. So war der Gehalt in der starken RNAi-Linie deutlich reduziert und lag unter dem Schwellenwert von 10000  $\mu\text{g/g}$  Trockengewicht, wobei Blattgehalte über diesem Wert das wichtigste Merkmal einer zinkhyperakkumulierenden Pflanze darstellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass Pflanzen mit reduziertem NA-Gehalt auch unter annähernd natürlichen Bedingungen weniger Zink in ihrem oberirdischen Gewebe speichern können und dass dies nicht nur in einem artifiziellen System der Fall ist. Des Weiteren hyperakkumulierten Pflanzen des Wildtyps und der Kontrolllinie 0-7 auf allen drei Erdtypen Zink. Dies bestätigt die Angaben in der Literatur, dass *A. halleri* unabhängig vom Kontaminierungsgrad der Erde Zink im Sprossgewebe anreichert. *A. halleri* Populationen, die ursprünglich von zinkkontaminierten Böden stammen sind in der Regel zinktolanter als solche von unbelasteten Standorten. Unter den gleichen experimentellen Bedingungen akkumulieren dabei die Populationen von Böden mit erhöhten Zinkkonzentrationen weniger Zn als solche von unkontaminierten (Pauwels *et al.*, 2006; Bert *et al.*, 2000; Bert *et al.*, 2002; Broadley *et al.*, 2007). Ein dementsprechendes Transplantationsexperiment mit den verschiedenen verfügbaren *A. halleri* Populationen aus Deutschland, Polen und Japan wurde im Rahmen dieser Arbeit noch nicht durchgeführt, könnte aber neue Erkenntnisse hinsichtlich der Anpassung der Pflanzen an extreme Umweltbedingungen liefern.

Aufgrund der Ergebnisse heterologer Expressionsexperimente von *Nicotianaminsynthasen* in *Schizosachcaromyces pombe* wurde bereits angenommen, dass NA eine mögliche Rolle in der Zinkhypertoleranz von Metallophyten spielt (Weber *et al.*, 2004; Becher *et al.*, 2004). In den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen konnten jedoch keine phänotypischen

Toxizitätssymptome in den *AhNAS2* RNAi-Linien beobachtet werden. So war die Wurzellänge im hydroponischen Wachstumsmedium, das bis zu 300  $\mu\text{M}$  Zn enthielt, im Vergleich zum Wildtyp nicht verkürzt und auch auf der kontaminierten Erde aus dem Harz zeigten die Blätter der starken Linien keine sichtbaren Unterschiede zu den Kontrollpflanzen (Abb. 46, 47). Somit kann gefolgert werden, dass ein erhöhter NA-Wurzelgehalt hauptsächlich wichtig für die Zinkhyperakkumulation ist und keine tragende Rolle bei der Hypertoleranz gegenüber Zinkionen spielt. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse einer Analyse von *A. thaliana nas* Vierfachmutanten unterstützt. In diesen Linien konnte keine Veränderung des Phänotyps bei Zinküberschuss im Wachstumsmedium beobachtet werden (Klatte *et al.*, 2009).

Auf Basis der erhaltenen Ergebnisse kann gefolgert werden, dass hohe Expressionsniveaus von *AhNAS2* nötig sind, um unter natürlichen Wachstumsbedingungen den Hyperakkumulationsschwellenwert von 10000  $\mu\text{g/g}$  Zn zu erreichen. Somit kann *AhNAS2* neben *AhHMA4* als zweiter bestätigter Zink-Hyperakkumulationsfaktor angesehen werden und als erster, dessen Bedeutung unter naturnahen Bedingungen gezeigt werden konnte.

Da Cadmium ein nicht-essentielles Schwermetall ist, wurde ursprünglich angenommen, dass Pflanzen keinen spezifischen Aufnahmemechanismus für dieses Kation besitzen. In Abschnitt 1.3.2.1. wurden bereits eine mögliche biologische Funktion von  $\text{Cd}^{2+}$  und auch die potentielle Existenz eines derartigen Transporters diskutiert. Schon seit langem wird angenommen, dass  $\text{Cd}^{2+}$ , wie auch andere toxische Ionen, über Aufnahmesysteme für essentielle Metalle in die Pflanzenzellen gelangt (Perfus-Barbeoch *et al.*, 2002; Clemens *et al.*, 1998). Somit kann der Transport von nicht-essentiellen, toxischen Schwermetallen in Pflanzen als Nebeneffekt des normalen Metalltransports auftreten. Die Ursachen hierfür können bei ähnlichen ionischen Eigenschaften eines essentiellen und eines giftigen Metalls oder bei der unspezifischen Substrataufnahme durch Metalltransporter liegen (Wong & Cobbett, 2009). Weitere Möglichkeiten sind, dass ein Transporter an der direkten Schwermetalldetoxifizierung oder an der Hyperakkumulation beteiligt ist (Wong & Cobbett, 2009). In der Literatur gab es bisher noch keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Nicotianamin und der Cadmiumverteilung innerhalb der Pflanze. Beispielsweise wurden in unter Cadmiumüberschuss kultiviertem Wildtypreis und *NAS*-Überexpressionslinien keine Unterschiede hinsichtlich Wachstum und Cadmiumkonzentrationen in Spross, Wurzeln und Körnern gefunden (Lee *et al.*, 2011). Wie in Abschnitt 1.3.2.1. zusammengefasst, deuteten sich in den, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten, hydroponischen Toleranzexperimenten niedrigere Spross/Wurzel-Verhältnisse der Cadmiumgehalte in der starken *AhNAS2* RNAi-

Linie an. Interessanterweise konnten auch in den auf der natürlichen, nicht kontaminierten Erde aus dem Harz kultivierten starken Linien ähnliche Reduktionen des Sprossgehaltes für Cadmium beobachtet werden wie für Zink. Die Blätter der Wildtyppflanzen und die der Kontroll-RNAi-Linie hatten Cadmiumkonzentrationen, die im Vergleich zur RNAi-Linie 1-2 um 37 bzw. 44 % höher waren. Diese Tatsache und die Tendenz in den hydroponischen Toleranzexperimenten lassen einen möglichen Einfluss des NA-Gehaltes in den Wurzeln auf die Cadmiumakkumulation im Sprossgewebe vermuten. Offensichtlich kann dieser Hyperakkumulationseffekt, genau wie bei der Zinkakkumulation, nur bei bestimmten Konzentrationen an verfügbarem Cadmium nachgewiesen werden. Dies würde erklären, warum nur in auf Erdtyp Harz 1 gewachsenen Pflanzen und nicht in solchen, die auf Harz 2 oder Harz 3 kultiviert wurden, Unterschiede in der Cadmiumakkumulation zwischen Wildtyp und starken RNAi-Linien gemessen wurden. Interessant wären in diesem Kontext Wachstumsexperimente mit Reis, der durch die Überexpression von *NAS* mit NA, Fe und Zn angereichert ist (Lee *et al.*, 2009). Diese Pflanzen könnten auf nativer Erde von agrarischen Anbauflächen sowie auf mit Cadmium kontaminierter Erde in Bezug auf ihre potentielle, mit erhöhter Zinkakkumulation einhergehende Cadmiumanreicherung getestet werden. In *A. thaliana* wird der Cd-Transport von den Wurzeln in die Blätter hauptsächlich von HMA P-Typ ATPasen übernommen (Wong & Cobbett, 2009). Diese sind somit neben dem Zink- (Hussain *et al.*, 2004) auch für den Cadmiumtransport verantwortlich. In *A. halleri* konnte *HMA4* mit einer QTL-Region colokalisiert werden, die sowohl mit Cd-Hyperakkumulation als auch –Toleranz verknüpft ist (Courbot *et al.*, 2007) und es konnte gezeigt werden, dass *HMA4* eine wichtige Rolle in der Zinkhyperakkumulation sowie der Zn- und Cd-Toleranz spielt (Hanikenne *et al.*, 2008).

In den Blättern von *A. halleri* können die höchsten Zink- und Cadmiumkonzentrationen in den Trichomen gemessen werden. Innerhalb der Trichome existiert eine subzelluläre Kompartimentierung, wobei fast die Gesamtmengen an Zink und Cadmium in einem schmalen Ring an der Trichombasis akkumuliert wird (Küpper *et al.*, 2000). Es wurde gezeigt, dass die Zink- und Cadmiumakkumulation in den Mesophyllzellen mit erhöhten Konzentrationen im Wachstumsmedium ebenfalls anstiegen. Daraus kann gefolgert werden, dass das Mesophyll in den Blättern von *A. halleri* das Hauptspeichergewebe für Zn und Cd darstellt und somit eine entscheidende Rolle in der Hyperakkumulation spielt (Küpper *et al.*, 2000). Wo im Detail NA in die pflanzliche Cadmiumverteilung involviert ist, kann momentan noch nicht beantwortet werden. Zusammenfassend kann nur angemerkt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse darauf hindeuten, dass NA eine Rolle in der

Cadmiumakkumulation in *A. halleri* zu spielen scheint. Falls es sich bei diesem Effekt nicht nur um ein experimentelles Artefakt handelt, so würde dies ein großes Problem für die Verwendung von NA hinsichtlich der Biofortifikation von Nutzpflanzen darstellen. Aus diesem Grund muss durch Folgeexperimente die Frage nach NA-Cd<sup>2+</sup>-Interaktionen eindeutig beantwortet werden.

### 4.3.3. Speziierungsanalyse mit SEC-ICP-MS und ESI-TOF-MS

#### 4.3.3.1. Analyse von Pflanzenwurzeln

Studien der Metallbindungsaffinitäten von Apo-Metalloproteinen und Metallsensoren zeigten, dass die cytoplasmatischen Konzentrationen freier Zinkionen im Bereich von 10<sup>-21</sup> M liegen (Finney & O'Halloran, 2003; Outten & O'Halloran, 2001). Daraus wurde geschlossen, dass keine freien Übergangsmetallionen ständig verfügbar sind, die von intrazellulären Metalltransportern gebunden werden könnten (O'Halloran & Culotta, 2000). Außerdem sind bis zu 80 % des zellulären Zinks in Vakuolen sequestriert (Lanquar *et al.*, 2010), wobei als wichtigste vakuoläre Chelatoren Phytochelatine, Phytat, Phosphat und Anionen organischer Säuren angenommen werden (Callahan *et al.*, 2005; Haydon & Cobbett, 2007a). Für die Zinksequestrierung in die Wurzelvakuole ist ZIF1 von großer Bedeutung (Haydon *et al.*, 2012). So wird vorgeschlagen, dass freies NA durch ZIF1 vom Cytosol in die Vakuole transportiert wird (Haydon *et al.*, 2012). Es konnte gezeigt werden, dass der Zinkgehalt in Wurzeln *ZIF1*-überexprimierender *A. thaliana* Pflanzen höher und der im Spross niedriger war als im Wildtyp. Für die Bindung von Zink konnten bislang noch keine Metallochaperone identifiziert werden, wobei in Pflanzen Chelatoren mit niedrigem Molekulargewicht, wie beispielsweise Nicotianamin, Glutathion, Phytochelatine, Histidin oder Citrat für den Langstreckentransport, den interzellulären Transport von Metallen und die subzelluläre Verteilung sehr wichtig sind (Krämer & Clemens, 2006; Clemens *et al.*, 2002). In den oben beschriebenen *ZIF1*-Überexpressionslinien war auch der NA-Wurzelgehalt signifikant höher, als in Wildtyppflanzen, wobei NA überwiegend in der Wurzelvakuole und nicht im Cytosol lokalisiert war (Haydon *et al.*, 2012). Da die Sprosszinkgehalte der transgenen Linien stark reduziert waren wurde angenommen, dass die Bildung von Zn<sup>2+</sup>-NA-Komplexen in den Wurzeln ein wichtiger Faktor für Mobilität und Sprossakkumulation von Zn<sup>2+</sup> ist und aufgrund der geringen verfügbaren Mengen an freiem NA im Cytosol der *ZIF1*-überexprimierenden Pflanzen inhibiert ist (Haydon *et al.*, 2012). Sowohl durch simulierte Metallchelatierungsmodelle als auch in Experimenten mit ESI-MS konnte bereits gezeigt werden, dass NA bei vakuolären und noch besser bei cytosolischen pH-Werten dazu in der

Lage ist,  $Zn^{2+}$  zu komplexieren (von Wiren *et al.*, 1999; Rellán-Álvarez *et al.*, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Speziierungsanalysen von *A. halleri* Pflanzen des Wildtyps Langelsheim und der starken RNAi-Linie 1-2 mittels SEC-ICP-MS unterstützen diese Hypothese. So lag ein großer Teil des extrahierten Zinks in Komplexen mit niedrigem Molekulargewicht vor. Durch anschließende Analysen mit ESI-MS konnte eindeutig gezeigt werden, dass NA ein Bestandteil dieser mit Zink coeluiierenden Fraktionen ist. Dies ist nach der Detektion von  $Zn^{2+}$ -NA-Komplexen in *S. pombe in vivo* (Tramczynska *et al.*, 2010) ein sehr deutlicher Hinweis auf die Existenz derartiger Komplexe in pflanzlichem Gewebe. Zusammen mit der Tatsache, dass, im Gegensatz zu den Wildtypwurzelproben, in den Wurzeln der starken RNAi-Linie nur Spuren von NA nachgewiesen werden konnten, untermauert dieses Ergebnis die aufgestellte Theorie, dass die zinkkomplexierende Funktion von NA einen wichtigen Faktor für die Zinkhyperakkumulation in *A. halleri* darstellt. Die bereits mit ICP-OES gemessenen, im Vergleich zum Wildtyp höheren Zinkkonzentrationen in den Wurzeln der *AhNAS2*-Knock-Down-Linie, enthielten auch höhere Gehalte an chelatiertem  $Zn^{2+}$ . In den Wurzelextrakten coeluierte Zink mit Schwefel, wobei diese Schwefelsignale in der RNAi-Linie deutlich höher waren als im Wildtyp. In Verbindung mit dem Ergebnis, dass Zink größtenteils in den Komplexen mit niedrigem Molekulargewicht vorlag und dass in diesen mittels ESI-MS Glutathion und des- $\gamma$ Glu-PC2 detektiert werden konnten, deutet dies auf eine im Zuge der NA-Reduktion induzierte, kompensatorische Synthese von Thiolliganden hin. Eine mögliche Erklärung wäre, dass aufgrund der reduzierten NA-Bildung in den RNAi-Linien weniger freies Zink von NA chelatiert und ins Xylem geleitet werden kann. Um das Zink in anderer Form binden zu können, müssen dann in erhöhtem Maße Schwefelliganden gebildet werden. Da diese jedoch im Vergleich mit NA nicht so effizient darin sind, Zink in der Pflanze mobil zu halten, verbleiben die Komplexe in der Wurzel und werden nicht, wie im Wildtyp mit einer erhöhten NA-Konzentration, ins Sprossgewebe transportiert. Als Folge waren die Zinkgehalte in den Wurzeln der starken RNAi-Linien höher als im Wildtyp, wobei im Spross das Gegenteil der Fall war. Der Nachweis von des- $\gamma$ Glu-PC2 unter den potentiellen Zinkliganden stützt indessen die bereits diskutierte Annahme, dass  $Zn^{2+}$  in Arabidopsis von Phytochelatinen chelatiert wird (Tennstedt *et al.*, 2009).

#### 4.3.3.2. Analyse des Xylemsaftes

Für den Langstreckentransport im Xylem liegen Metalle entweder in der hydratisierten Ionenform vor oder werden von mobilen Liganden mit niedrigem Molekulargewicht im

Xylemsaft chelatiert (Krämer & Clemens, 2006; Kramer *et al.*, 1996; Palmgren *et al.*, 2008). Es wird angenommen, dass organische Säuren, wie zum Beispiel Phytosiderophore, als solche Liganden für Zn und Cd im Xylem fungieren (White *et al.*, 1981; Clemens *et al.*, 2002), wobei Asparagin und Phytochelatine weitere Kandidaten für den Xylemtransport von Cadmium darstellen (Callahan *et al.*, 2007; Gong *et al.*, 2003).

Um potentielle Zinkliganden, die für den Xylemtransport wichtig sind, zu identifizieren, wurde der Xylemsaft von in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  angezogenen Wildtyp Langelshiem und RNAi 1-2 Pflanzen mit SEC-ICP-MS analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass ein kleiner Teil des Zinks mit Nicotianamin coeluiert. Diese Tatsache deutet auf die Existenz von  $\text{Zn}^{2+}$ -NA-Komplexen im Xylem hin. Da im Xylemsaft von *A. halleri* ein pH-Wert im Bereich von 5,5 herrscht und  $\text{Zn}^{2+}$ -NA-Komplexe bei neutralem bis alkalischem pH am stabilsten sind (Salt *et al.*, 1999; Ueno *et al.*, 2008), entsprach eine derartige Detektion nicht den Erwartungen. Es muss aber betont werden, dass die Mengen an mit NA coeluiierendem Zink sehr niedrig waren. Salt und Kollegen konnten zeigen, dass etwa 20 % des im Xylemsaft enthaltenen Zinks von Citrat komplexiert werden, während die restlichen 80 % in freier, hydratisierter Ionenform vorliegen (Salt *et al.*, 1999). In *N. caerulea* konnten im Xylemsaft 10- bis 50-fach höhere Zinkkonzentrationen gemessen werden als im externen Wachstumsmedium (Lasat *et al.*, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurde keine Quantifizierung der Zinkgehalte durchgeführt, wobei der Vergleich der Xylemsaftkonzentrationen von Zink und Nicotianamin in Wildtyp Langelshiem und starker RNAi-Linie 1-2 Aufschluss darüber geben könnte, ob Nicotianamin hauptsächlich in der Wurzel für den symplastischen Metalltransport zum Xylem hin und somit für die Mobilität der Metalle verantwortlich ist, oder ob es evtl. auch eine direkte Rolle im Langstreckentransport von Mikronährstoffen im Xylem spielt. Die in zwei der drei starken RNAi-Linien gemessenen, niedrigeren Spross-NA-Gehalte, könnten durch einen möglicherweise vorhandenen NA-Transport im Xylem erklärt werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der in zukünftigen Analysen behandelt werden muss, ist die Reinheit des gesammelten Xylemsaftes. Die Proben müssen auf potentielle Kontaminationen aus dem Cytosol bzw. aus dem Phloem untersucht werden. Eine mögliche Methode wäre hierfür die Messung der Zuckerkonzentration, da im Xylem keine Zucker transportiert werden. Für eine Normalisierung von im Xylemsaft gemessenen Werten für Zink oder auch Nicotianamin könnte die Bestimmung des Kaliumgehaltes der Proben dienen, da  $\text{K}^+$  zu den häufigsten Ionen in den pflanzlichen Leitbündeln gehört. Sollte sich herausstellen, dass die gesammelten Proben stark verunreinigt sind, so sollte eine alternative Methode zur

Gewinnung des Xylemsaftes von *A. halleri* in Erwägung gezogen werden. Ueno und Mitarbeiter wendeten eine vergleichbare Vorgehensweise an, indem sie den Spross der zu analysierenden Pflanze ca. 1 cm oberhalb des Wurzelansatzes abschnitten und den Xylemsaft mit einer Mikropipette innerhalb eines definierten Zeitraums abnahmen (Ueno *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu verwendete die Gruppe um Lombi eine Hochdruckkammer, um größere Volumina an Xylemsaft sammeln zu können (Lombi *et al.*, 2001). Da diese Methode allerdings die Durchflussrate erhöht könnten die im Xylem befindlichen Metallionen auf diese Weise verdünnt werden (Ueno *et al.*, 2008). Aus diesem Grund ist das im Rahmen dieser Arbeit gewählte Protokoll besser für die Bestimmung der tatsächlichen Metallgehalte geeignet.

#### 4.3.4. Microarrays

Die Analyse von *AhHMA4* RNAi-Pflanzen deutete darauf hin, dass die Höhe der Expressionslevel der in *A. halleri* im Vergleich zu *A. thaliana* konstitutiv induzierten Gene, wie beispielsweise der beiden Zinktransporter *ZIP4* und *IRT3*, als Auswirkung der effizienten Zinktranslokation angesehen werden kann (Hanikenne *et al.*, 2008). In den RNAi-Linien waren diese Gene weniger aktiv, da der Zinkgehalt in den Wurzeln aufgrund der *AhHMA4*-Herunterregulierung erhöht war. Auch wenn die Erhöhung des Zinkgehaltes in den Wurzeln der *AhNAS2* RNAi-Linien nicht so stark war wie in den *AhHMA4* RNAi-Linien, sollte eine Transkriptomanalyse Aufschluss über mögliche Sekundäreffekte in Bezug auf die Genregulation in den Wurzeln geben. Hierfür wurde RNA aus hydroponisch, sowohl in Kontrollmedium als auch mit zusätzlichen 10  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  angezogenen Wildtyp Langelsheim und RNAi 1-2 Pflanzen aus drei unabhängigen Experimenten mit einem ATH1 Microarray hybridisiert. Nur eine geringe Zahl von Genen zeigte eine signifikante, mehr als zweifache Expressionsänderung im Vergleich von Wildtyp und RNAi-Linie. Ein wichtiges Ergebnis war hierbei die Bestätigung des in den realtime PCR-Experimenten gezeigten *AhNAS2* RNAi-Effektes in den starken Linien. Die Isoformen *NAS3* und *NAS4* zeigten keine Unterschiede, während die Transkriptmenge von *NAS1* um ca. 50 % reduziert war. Da keine weiteren bekannten Zinkhomöostasegene eine Expressionsänderung in den starken RNAi-Linien zeigten, kann das verringerte Spross/Wurzel-Verhältnis der Zinkgehalte ausschließlich auf die Herunterregulierung von *AhNAS2* zurückgeführt werden. Keiner der bekannten vorgeschlagenen Zinktransporter, die in *A. halleri* konstitutiv höhere Transkriptmengen besitzen als in *A. thaliana*, zeigte eine veränderte Expression in der starken RNAi-Linie. So waren *IRT3*, *ZIP4*, *ZIP9* und *ZIP10* (Talke *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2004) in beiden

getesteten Linien gleichmäßig exprimiert. Zusammenfassend kann angemerkt werden, dass anders als für *HMA4* berichtet, der Knock-Down von *AhNAS2* in der RNAi Linie 1-2 offenbar keine Sekundäreffekte auf weitere Metallhomöostasegene zur Folge hat. Dies könnte verschiedene Gründe haben. Zum einen könnte der Zinkgehalt in den Wurzeln der starken RNAi-Linie den Schwellenwert nicht erreicht haben, ab dem die Expression von Zinktransportern abgeschwächt wird. Zum anderen könnte die *AhNAS2*-Suppression auf eine kleinere Zahl an Zelltypen beschränkt sein als die von *AhHMA4*.

Es kann angemerkt werden, dass einige Gene unter Berücksichtigung des sogenannten "adjusted p-value", d.h. einer sehr strikten Berechnung des Signifikantsschwellenwertes statistisch nicht signifikant verändert waren, während sie bei Verwendung eines weniger strikt berechneten p-Werts als Grundlage der Analyse eine signifikante Änderung zeigten. Unter ihnen war beispielsweise ein Gen (*At4g22212*), welches für ein defensinähnliches Protein codiert und sowohl unter Kontrollbedingungen als auch in Gegenwart von  $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$  in der starken RNAi-Linie signifikant induziert war. Mit einer über achtfach erhöhten Transkriptmenge in Kontrollmedium bzw. vierfach höheren Expression in Medium mit zusätzlichen  $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$  zeigte dieses Gen die zweitstärksten Veränderungen. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass pflanzliche Defensingene durch heterologe Expression in Hefe zu Zinktoleranz und -akkumulation beitragen und möglicherweise Kationenkanäle für divalente Metalle blockieren (Mirouze *et al.*, 2006). Die höheren Transkriptmengen in den Wurzeln der RNAi-Linie könnten somit die Folge der erhöhten Zinkkonzentrationen und der damit verbundenen Antwort des pflanzlichen Toleranzsystems sein. Für weitere Analysen könnte das Defensingen (*At4g22212*) kloniert und in den zinksensitiven Hefestamm *Azhf* gebracht werden. Mit den Transformanten könnten dann Toleranzversuche mit verschiedenen Zinkkonzentrationen durchgeführt werden.

#### 4.3.5. Versuch der Zinklokalisierung mittels Elektronenmikroskopie

Der Versuch, Zink in den Blättern von *A. halleri* subzellulär mittels Elektronenmikroskopie zu lokalisieren, oder gar potentielle Unterschiede zwischen den Zinkgehalten in Wildtyp und starker RNAi-Linie zu quantifizieren, scheiterte am Detektionslimit des Transmissionselektronenmikroskops. Aus Vorversuchen war bekannt, dass Zinkkonzentrationen ab etwa 1 - 2 % ausreichen können, um mit einem TEM detektiert zu werden. Die im Rahmen dieser Arbeit auf der nativen Harzerde gewachsenen *A. halleri* Pflanzen akkumulierten Konzentrationen von bis zu etwa 25000  $\mu\text{g/g}$  Trockengewicht in ihrem Sprossgewebe. Dieser Wert entspricht folglich 2,5 % der Trockenmasse und liegt somit

ungefähr im Bereich der detektierbaren Zinkgehalte. Da mit dem TEM keine verlässlichen Signale gemessen werden konnten, war es nicht möglich, eine Aussage über die Zinklokalisierung zu geben.

Ein weiterer, sensitiverer Ansatz zur Bestimmung des subzellulären Zinks ist die Färbung mit dem fluoreszenten Farbstoff Zinpyr-1 und die anschließende Analyse der Proben mit einem konfokalen Lasermikroskop.

#### 4.3.6. Zinkfärbung mit Zinpyr-1

Wurzeln des Wildtyps und der starken RNAi-Linie 1-2 wurden mit Zinpyr-1 inkubiert. Danach wurde für die Kontrolle der Zellvitalität und für die spätere Normalisierung der Zinpyr-1-Signale eine weitere Färbung mit Propidiumiodid angewendet. Im konfokalen Mikroskop konnten die stärksten Zinksignale im Bereich des Perizykels detektiert werden (Abb. 53, 55), wobei der bereits mit ICP-OES gemessene Unterschied zwischen Wildtyp und RNAi-Linie durch die Quantifizierung der Signale bestätigt werden konnte. In zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens fünf Pflanzen pro Linie wurden 1,7- bzw. 2,4-fach stärkere Zinksignale in der RNAi-Linie gemessen. Diese Ergebnisse korrelieren sehr gut mit denen aus den ICP-OES-Analysen und aus den SEC-ICP-MS-Analysen. Die Zinklokalisierung bestätigt die bereits in der Literatur vorhandenen Angaben (Hanikenne *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2010). In Experimenten mit *HMA4* RNAi-Linien wurden nach Zinpyr-1-Behandlung ebenfalls die stärksten Signale in den Perizykelzellen erhalten, wenngleich die Unterschiede in der Signalstärke zwischen *HMA4* RNAi-Linien und Wildtyp deutlich größer waren als die in den *NAS2*-Experimenten der vorliegenden Arbeit. In Wildtypwurzeln war am meisten Zink in den Xylemgefäßen, innerhalb der Perizykelzellschicht, lokalisiert, während in der RNAi-Linie die stärksten Signale direkt in den Perizykelzellen detektierbar waren. Dies deutet darauf hin, dass von den Wurzeln der *HMA4*-RNAi-Linie aufgenommenes Zink nicht vom symplastischen Teil der Wurzel in die apoplastischen Xylemzellen, welche den hauptsächlichen Transportweg ins Sprossgewebe darstellen, abgegeben werden kann (Hanikenne *et al.*, 2008). Somit verbleibt deutlich mehr Zink in den Wurzeln und weniger gelangt ins Sprossgewebe, was durch die Elementprofile bestätigt werden konnte. In Reis konnte bereits gezeigt werden, dass *NAS*-Gene überwiegend im Perizykel der Wurzel und in den das Phloem umgebenden Zellen exprimiert werden (Inoue *et al.*, 2003), was ebenfalls die Theorie einer Rolle von NA in der Xylembeladung unterstützt.

#### 4.4. Kopienzahl von *AhNAS2*

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen eindeutig, dass *NAS2* sehr wichtig für die Zinkhyperakkumulation in *A. halleri* ist. Dass dieses Gen jedoch nicht in einer der bereits kartierten QTL-Regionen liegt, könnte durch die fehlenden Informationen bezüglich der Genkopienzahl erklärt werden. Ergebnisse aus Vorversuchen deuteten darauf hin, dass mehr als eine Kopie von *NAS2* in *A. halleri* vorhanden ist. Neben der bereits bekannten könnte jede weitere auch zur im Vergleich zu *A. thaliana* erhöhten Transkriptmenge und somit zu höheren Nicotianamingehalten in den Wurzeln beitragen. Der Metalltransporter *HMA4* beispielsweise besitzt drei Kopien in *A. halleri*, von denen jede zur starken Expression des Gens und damit zur Zinkhyperakkumulation beiträgt (Hanikenne *et al.*, 2008). Diese Zn/Cd-Pumpe stellt den ersten identifizierten Faktor für Hyperakkumulation dar, dessen Wirkungsweise mittels RNAi-knock-down Pflanzen nachgewiesen werden konnte (Hanikenne *et al.*, 2008). Auch der im Vergleich zu *A. thaliana* stärker exprimierte Metalltransporter *AhMTP1* liegt in *A. halleri* in mindestens vierfacher, in manchen Fällen sogar fünffacher Ausführung vor (Shahzad *et al.*, 2010), während in *A. thaliana* nur eine Genkopie existiert. Somit ist es von essentieller Bedeutung, die bereits angefangene Analyse der das *A. halleri*-Genom enthaltenden BAC-Bibliothek abzuschließen und somit die Frage der Kopienzahl von *AhNAS2* zu beantworten. Die bisher erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass mindestens zwei verschiedene Genkopien in *A. halleri* vorliegen, wobei es Hinweise auf die Existenz einer dritten gibt. Für *AhHMA4* wurde gezeigt, dass das Vorhandensein der drei Kopien einen selektiven Vorteil darstellt. Eventuell könnte dies auch für *AhNAS2* der Fall sein. Möglicherweise kann die Expressionsstärke verschiedener Genkopien je nach externer Schwermetallkonzentration reguliert werden. Somit sollten sich die *AhNAS2*-Transkriptniveaus von auf Kontrollböden kultivierten Pflanzen von denen auf kontaminierten Böden angezogenen unterscheiden. Mit den bereits angesprochenen Transplantationsexperimenten mit unterschiedlichen *A. halleri* Populationen könnte diese Fragestellung behandelt werden. In den bislang mit dem zinksensitiven *S. pombe* Stamm *Δzhf* durchgeführten Wachstumsexperimenten konnte lediglich der toleranzerhöhende Effekt des *NAS2.1*-Konstruktes bestätigt werden. Die beiden anderen Konstrukte führten nicht zu einer Wachstumsverbesserung der Hefen bei erhöhten externen Zinkkonzentrationen, was darauf hindeutet, dass sie eventuell nicht funktional sind bzw. nur einen sehr geringen Einfluss auf die Zinkhomöostase besitzen. Es ist sehr wichtig, die Existenz dieser beiden zusätzlichen Versionen von *AhNAS2* zu bestätigen und zu beweisen, dass es sich tatsächlich um weitere Genkopien und nicht nur um allelische Varianten handelt. Die Tatsache, dass die Genfragmente mit jeweils variantenspezifischen

Primerpaaren mittels genomischer *A. halleri* DNA als Template amplifiziert werden konnten, spricht für das Vorhandensein dieser verschiedenen Versionen. Um die Existenz jedoch endgültig zu beweisen, müssen die jeweiligen Genomumgebungen sequenziert und dort lokalisierte Unterschiede identifiziert werden.

#### **4.5. Versuch der Gewinnung eines *AhNAS2*-spezifischen Antikörpers**

*AhNAS2* wurde bakteriell exprimiert, anschließend unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und die Proteinbanden aus einem SDS-Gel ausgeschnitten. Die nach der Immunisierung zweier Kaninchen mit dem Protein erhaltenen Antiseren wurden hinsichtlich ihrer Spezifität für *AhNAS2* getestet, wobei jedoch ein negatives Ergebnis erhalten wurde. In keinem der durchgeführten Test-Western Blots mit Proteinextrakten aus *A. halleri* erkannte eines der beiden Antiseren NAS2.

Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass mit unlöslichen Proteinfractionen gearbeitet wurde. Dass das Protein nicht löslich ist, liegt vermutlich daran, dass es in sogenannte „inclusion bodies“ eingeschlossen ist. In einem neuen Versuch, einen funktionellen Antikörper zu produzieren, sollten die inclusion bodies aufgereinigt und anschließend lösliches Protein für die Immunisierung verwendet werden. Da ein gut funktionierender Antikörper von essentieller Bedeutung für den proteinbiochemischen Nachweis von NAS2 ist, ist dieser Versuchsansatz einer der wichtigsten Punkte, die im Anschluss an die vorliegende Arbeit noch behandelt werden müssen.

#### **4.6. Nas planta Linien**

Hanikenne und Mitarbeiter konnten mit der Überexpression von *HMA4* in *A. thaliana* erreichen, dass dieser Nicht-Hyperakkumulierer mehr Zink im Spross anreicherte (Hanikenne *et al.*, 2008). Ein vergleichbarer Effekt konnte in Bezug auf *NAS2* nicht gezeigt werden.

Durch die Transformation von *A. thaliana* Wildtyp Pflanzen mit dem genomischen *NAS2*-Fragment aus *A. halleri* sollte versucht werden, den Zinktransport ins Blattgewebe zu erhöhen. Es wurden fünf Linien generiert, die unterschiedlich hohe *NAS2*-Transkriptlevel aufweisen, wobei selbst in den Linien mit um ein Vielfaches erhöhter Expression keine Unterschiede im NA-Gehalt der Wurzeln gemessen werden konnten. Auch in der Zinkverteilung im Spross dieser Pflanzen zeigte sich keine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp Columbia. In *A. thaliana* könnte verglichen mit *A. halleri* ein für die Zinkakkumulation wichtiger Faktor verändert sein. Offenbar reicht ein erhöhtes *NAS2*-Transkriptlevel nicht aus, um auch den NA-Gehalt im Wurzelgewebe zu steigern. Somit

entsprach es durchaus den Erwartungen, dass in den transformierten Pflanzen keine höheren Blatt-Zinkgehalte gemessen werden konnten, da offenbar NA die entscheidende Rolle für die Mobilisierung von Zink in den Wurzeln spielt. Eine mögliche Erklärung dafür, dass die NA-Gehalte trotz erhöhter *NAS*-Expression nicht anstiegen, könnte im Zusammenhang mit SAM, der Vorstufe von NA, gefunden werden. Wie bereits erwähnt, sind die *SAM Synthetasen1-3* in *A. halleri* konstitutiv höher exprimiert als in *A. thaliana* (Talke *et al.*, 2006). Da in den *Nas* planta Linien nur *NAS2* überexprimiert wird und nicht die *SAM Synthetasen*, könnte sich der Gehalt an SAM als limitierender Faktor negativ auf die NA-Bildung auswirken. Um diese Hypothese zu untersuchen müssten Pflanzenlinien generiert werden, in denen neben *NAS2* auch *SAM Synthetasen* überexprimiert werden.

#### 4.7. *AhNAS4* RNAi-Linien

*AhNAS4* liegt in einer QTL-Region, die für den Eisenhaushalt wichtig ist (Willems *et al.*, 2010) und ist, ebenso wie die Isoform *AhNAS2*, in *A. halleri* konstitutiv höher exprimiert als in *A. thaliana* (Weber *et al.*, 2004; Talke *et al.*, 2006). Diese Eigenschaften machen *AhNAS4* zu einem weiteren wichtigen Kandidatengen, dessen Charakterisierung neue Erkenntnisse hinsichtlich der Mechanismen der pflanzlichen Schwemetallhyperakkumulation liefern könnte. Deshalb wurden *AhNAS4*-RNAi-Linien generiert, die auf die gleiche Weise wie die *AhNAS2* RNAi-Linien in Bezug auf *NAS*-Transkripte, NA-Gehalte und Metallprofile untersucht werden sollen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten lediglich die ICP-OES-Messungen der Proben der ersten Versuchsrunde durchgeführt werden. Aus diesem Grund können noch keine Aussagen über potentielle, auf einer reduzierten *AhNAS4*-Expression basierende Veränderungen im Vergleich zu Wildtyppflanzen gemacht werden.

#### 4.8. Fazit und Ausblick

Ein zentraler Punkt der zukünftigen Forschung an pflanzlicher Metallhyperakkumulation ist die Identifikation weiterer Proteine und Chelatoren mit niedrigem Molekulargewicht, die in die Metallverteilung involviert sind und ihre Charakterisierung hinsichtlich molekularer Interaktionen mit Übergangsmetalltransportern (Krämer *et al.*, 2007). Nur so können die einzelnen Faktoren dieses komplexen Netzwerks Stück für Stück entschlüsselt werden. Mit jedem Gen bzw. Mechanismus, dessen genaue Funktion in der Metallhyperakkumulation charakterisiert werden kann, steigen auch die Chancen darauf, hinsichtlich der Biofortifikation von Nahrungspflanzen oder der Phytoremediation mittels Anwendung transgener Pflanzen entscheidende Fortschritte erzielen zu können. In Bezug auf die

Verbesserung von Nutzpflanzen stellen Anwendungen, die die Erhöhung der pflanzlichen Mikronährstoffaufnahme zum Ziel haben und die auf der Veränderung von Nahrungsmitteln basieren, die beste Methode dar, um Spurenelementunterversorgung vorzubeugen (Mayer *et al.*, 2008). Um dies zu erreichen sind die bereits erwähnte Identifizierung von weiteren wichtigen Metallhomöostasegenen und deren detaillierte Charakterisierung unerlässlich. Ein limitierender Faktor bei der Biofortifikation von Anbaupflanzen ist die Bioverfügbarkeit der Metalle für den Menschen (Hoppler *et al.*, 2008). Es können noch so hohe Konzentrationen in Lebensmitteln erreicht werden, sind die Mikronährstoffe nach der Nahrungsaufnahme nicht bioverfügbar, so bleibt das eigentliche Problem bestehen. Die Bioverfügbarkeit eines Elements wird zum einen von seiner Gesamtkonzentration und zum anderen von seiner Verteilung auf verschiedene chemische Spezies bestimmt (Zhu *et al.*, 2007; S. Lee *et al.*, 2011). Aus diesem Grund könnten Chelatoren wie Nicotianamin, welches für die Zinkmobilisierung wichtig ist, einen entscheidenden Beitrag dazu leisten, Mikroelemente besser verfügbar zu machen. Ein positives Beispiel hierfür sind die bereits in Abschnitt 1.4. der Einleitung angesprochenen Fütterungsversuche mit Mäusen. Die Überexpression von *OsNAS3* in Reis führte zu einer Erhöhung des Zinkgehaltes in den Samen, die als Nahrungsquelle für die anämischen Tiere verwendet wurden. Die Mäuse, die mit Kontrollreissamen gefüttert wurden, waren nach zwei Wochen immer noch eisendefizient, während sich die mit den transgenen Reiskörnern gefütterten Tiere innerhalb dieser Zeitspanne wieder erholten (Lee *et al.*, 2009). Allein diese Ergebnisse zeigen bereits das Potential von Nicotianamin in der Verbesserung von Nahrungsmitteln deutlich auf. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Reispflanzen, in denen *OsNAS2* überexprimiert wurde, signifikant mehr NA, deutlich höhere Konzentrationen an Zink, Kupfer, Nickel und Cobalt enthielten und überdies auch toleranter gegenüber diesen Metallen waren (Lee *et al.*, 2011). Das bedeutet, dass die transgenen Pflanzen effektiver in der Komplexierung von Schwermetallen waren und dabei die Wirkung der freien Ionen und die begleitenden phytotoxischen Effekte verringerten. Ein weiterer wichtiger Vorteil dieser Überexpressionslinien war, dass sie keine erhöhten Konzentrationen an Cadmium und Blei aufwiesen. Dies deutete darauf hin, dass NA in Pflanzen keine Komplexe mit diesen sehr toxischen Metallen bildet. Es bestand also die Möglichkeit, die Reiskörner hinsichtlich ihres Zinkgehaltes zu verbessern, ohne dass sie in erhöhtem Maße das dem Zink sehr ähnliche Cadmium oder auch Blei anreichern, wodurch erhebliche gesundheitliche Risiken für den Menschen umgangen werden können (Lee *et al.*, 2011). Wie bereits in Abschnitt 1.3.2.2. diskutiert, ergaben sich, im Gegensatz zu den Ergebnissen von Lee und Mitarbeitern, in der

vorliegenden Arbeit Hinweise auf eine mögliche Interaktion zwischen NA und Cadmium. Die auf unbelasteter Erde von natürlichen *A. halleri*-Standorten im Harz kultivierten starken *AhNAS2* RNAi-Linien akkumulierten signifikant weniger Cadmium im Spross als Pflanzen des Wildtyps und der Kontroll-RNAi-Linie. Ein ähnlicher Trend zeichnete sich auch in den hydroponischen Toleranzversuchen in Gegenwart von  $10 \mu\text{M Cd}^{2+}$  ab, obgleich die Unterschiede keine statistische Signifikanz besaßen. Da die Bildung von NA- $\text{Cd}^{2+}$ -Komplexen ein großes Problem hinsichtlich des Einsatzes von *NAS* für Biofortifikationsanwendungen darstellen würde, ist es von essentieller Bedeutung, diese Fragestellung näher zu untersuchen. Ein wichtiger Punkt, der sich mit demselben Problem beschäftigt und in der zukünftigen Forschung adressiert werden muss, ist die Cadmiumsequestrierung in Wurzelvakuolen. Bei besserem Verständnis der molekularen Grundlagen könnte die Mobilisierung und der Transport von Cd in die Teile von Anbaupflanzen, die später geerntet werden, verhindert werden. Somit könnte der Eintritt von Cd in die menschliche Nahrungskette und die damit verbundenen Gefahren erheblich reduziert werden. Als alternative Möglichkeit zur Reduktion der Cd-Konzentration in Pflanzen könnte auch die Expression von Cd-Exportern in der Wurzel angewendet werden (Lee *et al.*, 2003).

Obwohl auch die Verwendung von Zinkdüngern die Cd-Konzentrationen in Getreidekörnern verringern kann, so hängt dies trotzdem von den Cd-Konzentrationen in den Düngern selbst ab, die neben Phosphatdüngern immer noch die hauptsächliche Aufnahmequelle von Cd in Pflanzen darstellen (Grant & Bailey, 1997; Grant & Sheppard, 2008; Grant *et al.*, 2008; Palmgren *et al.*, 2008). Somit wirken Dünger nur sehr begrenzt der Cadmiumaufnahme von Pflanzen entgegen und können nicht als adäquate Lösung des Problems angesehen werden.

Hinsichtlich der Verbesserung von Nahrungspflanzen in Bezug auf ihren Zinkgehalt sollte in zukünftigen Experimenten auch versucht werden, Pflanzen zu generieren, die sowohl *NAS2* als auch *HMA4* überexprimieren. Die transgenen Linien sollten eine deutlich erhöhte Anreicherung von Zink im Sprossgewebe zeigen als Wildtyppflanzen. Derartige Experimente könnten durchaus auch mit Reis- oder ähnlichen Getreidearten durchgeführt werden, mit denen Fütterungsversuche mit Säugetieren vorgenommen werden könnten. Letztere stellen eine Limitierung in der Arbeit mit Modellpflanzen wie *A. halleri* dar.

Neben der Biofortifikation stellt die Phytoremediation einen wichtigen Anwendungsbereich für die molekularen Mechanismen der Schwermetallhyperakkumulation durch Pflanzen dar. Der aktuelle Stand ist, dass selbst die effizientesten Metallakkumulierer, wie beispielsweise *Noccaea caerulescens*, relativ lange (13-14 Jahre) brauchen, um einen mit Nickel oder Zink

kontaminierten Boden, zu entgiften (Salt *et al.*, 1995). Die hauptsächlichen Probleme sind dabei die Biomasse der für die Entgiftung einsetzbaren Pflanzen und die Tiefe, die ihre Wurzeln im Boden erreichen können. *A. halleri* Pflanzen sind beispielsweise viel zu klein und besitzen deutlich zu kurze Wurzeln, um ernsthaft für die Bodensanierung in Frage zu kommen. Somit wäre es erstrebenswert, größere Pflanzen oder gar Bäume genetisch so zu manipulieren, dass sie die gleichen Fähigkeiten hinsichtlich Metallaufnahme und Speicherung besitzen wie bereits bekannte Hyperakkumulierer. Ein vielversprechender Ansatz ist auch, die Wachstumsrate von Hyperakkumulierern über selektive Züchtung zu erhöhen (Rascio & Navari-Izzo, 2011). Zum Beispiel wurden somatische Hybridisierungen zwischen *N. caerulescens* und *B. napus* durchgeführt, um das Problem der geringen Biomasse des Hyperakkumulierers zu umgehen. Aus diesem Ansatz hervorgegangene Hybriden waren zinktolerant und akkumulierten Zinkmengen, die für *B. napus* normalerweise toxisch wären (Brewer *et al.*, 1999). Auch der bereits in der Einleitung angesprochene Farn *Pteris vittata* besitzt ein großes Potential für Anwendungen in der Phytoremediation. Seine Biomasse ist deutlich größer als die anderer hyperakkumulierender Pflanzen und es konnte bereits gezeigt werden, dass der Einsatz von *P. vittata* Pflanzen durchaus erfolgreich Arsenkontaminationen im Boden verringern kann (Ma *et al.*, 2001).

In einem abschließenden Satz soll noch einmal darauf hingewiesen werden, dass mit *NAS2* ein wichtiger Faktor für die Zinkhyperakkumulation in *A. halleri* identifiziert werden konnte, dass aber noch viele weitere Gene aufgeklärt und charakterisiert werden müssen, um das komplexe Netzwerk der pflanzlichen Zinkhomöostase verstehen zu können.

## 5. Zusammenfassung

Sowohl die *AhNAS2*-Transkriptniveaus als auch die Nicotianamingehalte waren in den Wurzeln aller getesteten Individuen der verschiedenen *Arabidopsis halleri* Populationen signifikant höher als in *Arabidopsis thaliana*. In Experimenten mit *AhNAS2* RNAi Pflanzen konnte gezeigt werden, dass diese erhöhte *AhNAS2*-Expression und daraus resultierende höhere NA Gehalte in den Wurzeln zur Hyperakkumulation von Zink beitragen. In Linien mit starkem *AhNAS2* RNAi-Effekt wurden im Vergleich zum Wildtyp signifikant höhere Zinkkonzentrationen in den Wurzeln gemessen, wobei im Spross das Gegenteil der Fall war. Das Verhältnis von Sprosszinkgehalt zu Wurzelzinkgehalt ist in einer hyperakkumulierenden Pflanze größer als 1 und lag in der vorliegenden Arbeit in Wildtyppflanzen und Kontroll-RNAi-Linien jeweils über dem Wert 15. In den starken RNAi-Linien konnte dieser Wert einzig durch die Herunterregulierung der *AhNAS2*-Transkriptmengen unter 4 gesenkt werden. Dieses Ergebnis untermauert die Hypothese, dass NA eine wichtige Rolle in der Zinkhyperakkumulation in *A. halleri* spielt. In Zinklokalisierungsexperimenten mit dem fluoreszenten Farbstoff Zinpyr-1 konnten die in den ICP-OES-Analysen erhaltenen Unterschiede zwischen Wurzelzinkgehalt im Wildtyp und der starken Linie 1-2 bestätigt werden. Die höheren Zinkgehalte im Sprossgewebe des Wildtyps waren sowohl im hydroponischen Wachstumsmedium als auch in Experimenten mit artifiziell kontaminierter Erde und unter fast natürlichen Bedingungen mit nativer kontaminierter Erde aus dem Harz konsistent. Analysen zur Speziierung und Zinkverteilung zeigten, dass in den Wurzeln von *A. halleri* Zink-Nicotianamin-Komplexe gebildet werden, welche die Xylembeladung erleichtern. Diese Entdeckung besitzt hohe Relevanz für die Entwicklung von Biofortifikationsanwendungen. In Toleranzexperimenten konnte gezeigt werden, dass Cadmiumkonzentrationen bis 2  $\mu\text{M}$  im hydroponischen Wachstumsmedium keine toxischen Effekte, weder auf *A. halleri* Wildtyp- noch auf *AhNAS2* RNAi-Pflanzen hatten. Im Gegensatz dazu bildeten alle getesteten Linien nach Zugabe von 10  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  bzw. 5  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  zum Medium starke Chlorosen aus. Die Wurzellängen der getesteten Linien unterschieden sich nach Cadmiumzugabe nicht, während das Wurzellängenwachstum in Gegenwart von zusätzlichem  $\text{Ni}^{2+}$  in den starken RNAi-Linien verglichen mit dem Wildtyp signifikant reduziert war. Unter den getesteten Konzentrationen zeigte sich somit die Verbindung von NA zur Nickeltoleranz, nicht jedoch zur Cadmiumtoleranz. Des Weiteren wurden hydroponische Toxizitätsexperimente mit einer externen Zinkkonzentration von 300  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Im Vergleich zu den Kontrollbedingungen führte dieser erhebliche

Zinküberschuss zu einem deutlich verbesserten Sprosswachstum aller Pflanzen, wobei keine der getesteten Linien Toxizitätssymptome aufwies. In Microarrayanalysen konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der NA-Gehalte in *A. halleri* Wurzeln keine Sekundäreffekte auf andere Metallhomöostasegene zur Folge hat. Nur wenige Gene waren verglichen mit dem Wildtyp in der starken RNAi-Linie induziert, wobei ein für ein “defensin-like protein“ codierendes und eines, welches für die Bildung eines “dual specificity protein“ verantwortlich ist, sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach Zinkbehandlung mindestens vierfach hochreguliert waren.

## 6. Summary

Both the *AhNAS2* transcript levels and the NA contents were significantly higher in the roots of all tested *Arabidopsis halleri* populations compared with *Arabidopsis thaliana*. Experiments with *AhNAS2* RNAi plants showed that this upregulation of the *AhNAS2* expression and the subsequent higher NA contents in roots contribute to hyperaccumulation of zinc in the aerial plant tissues. Compared to wildtype plants significantly higher zinc values were measured in roots of lines with strong *AhNAS2* RNAi effect whereas in leaves the opposite pattern was observed. The shoot/root ratio of zinc concentrations in a hyperaccumulating plant is normally above unity. In this work these values were higher than 15 in the control lines and could be reduced to below 4 in the strong RNAi lines only by suppressing the *AhNAS2* expression. This result strongly supports the hypothesis that NA plays an important role in zinc hyperaccumulation of *A. halleri*. The differences in root zinc content between wildtype and the strong RNAi line 1-2 measured with ICP-OES could be confirmed via zinc localization experiments using the fluorescent dye zinpyr-1. Higher zinc contents in leaf tissue of wildtype *A. halleri* were consistent both in plants grown in hydroponic medium and on artificially contaminated respectively native soil. This shows that the hyperaccumulation phenotype of strong *AhNAS2* RNAi lines is also existent under almost natural conditions. Analysis of zinc speciation and distribution showed that  $Zn^{2+}$ -NA complexes are formed in the roots of *A. halleri* facilitating the xylem loading with zinc. This finding is highly relevant for the development of biofortification approaches. In tolerance studies it could be shown that a cadmium concentration of 2  $\mu$ M in hydroponic medium does not cause any toxic effects neither on *A. halleri* wildtype nor on *AhNAS2* RNAi plants. In contrast all tested lines showed strong chlorosis after growing with 10  $\mu$ M  $Cd^{2+}$  or 5  $\mu$ M  $Ni^{2+}$  respectively. The root lengths did not differ between lines after cadmium treatment whereas the roots of strong RNAi lines were significantly shorter than those of control lines after growing under excess  $Ni^{2+}$ . Therefore a connection between NA content and  $Ni^{2+}$  tolerance but no link to cadmium tolerance could be shown under the tested conditions. Furthermore hydroponic toxicity experiments with an external zinc concentration of 300  $\mu$ M were performed. In comparison to control conditions this high zinc excess lead to an improved shoot growth of all lines without any toxicity symptoms. Microarray analysis proved that the knock down of *AhNAS2* and the concomitant reduced NA contents in roots did not cause any secondary effects on the transcriptional basis. None of the known metal homeostasis genes were significantly changed in expression and only very few genes showed different transcript

levels at all. Genes coding for a defensin like protein and a dual specificity protein were significantly induced in the strong RNAi line both under control conditions and in the presence of 10  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$ .

## 7. Literaturverzeichnis

- Alloway, B.J.** (1995). *Heavy metals in soils*. Ed. 2. Blackie Academic & Professional, London.
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I. and Rosato, A.** (2006). Zinc through the Three Domains of Life. *Journal of Proteome Research* **5**: 3173–3178.
- Antonovics, J., Bradshaw, A.D. and Turner, R.G.** (1971). Heavy Metal Tolerance in Plants. *Advances in Ecological Research* **7**: 1–85.
- Antunes, P., Berkelaar, E.J., Boyle, D., Hale, B.A., Hendershot, W. and Voigt, A.** (2006). The biotic ligand model for plants and metals: technical challenges for field application. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**: 875–882.
- Assunção, A.G.L., Schat and H. Aarts, M.G.M.** (2003). *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* **159**: 351–360.
- Assunção, A.G.L., Herrero, E., Lin, Y.-F., Huettel, B., Talukdar, S., Smaczniak, C. and Immink, R.G.H.** (2010a). *Arabidopsis thaliana* transcription factors bZIP19 and bZIP23 regulate the adaptation to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 10296–10301.
- Assunção, A.G.L., Schat, H. and Aarts, M.G.M.** (2010b). Regulation of the adaptation to zinc deficiency in plants. *Plant Signaling & Behavior* **5**: 1553–1555.
- Axelsen, K.B. and Palmgren, M.G.** (2001). Inventory of the Superfamily of P-Type Ion Pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**: 696–706.
- Baker, A.J.M. and Brooks, R.R.** (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* **1**: 81–126.
- Baker, A.J.M., Reeves, R.D. and McGrath, S.P.** (1991). *In situ* decontamination of heavy metal polluted soils using crops of metal-accumulating plants - a feasibility study. *In situ bioreclamation*. 600–605. Butterworth-Heinemann, Boston.
- Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Sidoli, C.M.D. and Reeves, R.D.** (1994). The possibility of *in situ* heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Resources, Conservation and Recycling* **11**: 41–49.
- Barak, P. and Helmke, P.A.** (1993). The Chemistry of Zinc. In: **Robson, A.** (eds.) *Zinc in Soils and Plants*. 1-13. Proc. International Symposium on Zinc in Soils and Plants, Perth, Australia. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- Barber, S.A.** (1995). *Soil Nutrient Bioavailability: a Mechanistic Approach*. John Wiley and Sons, New York.
- 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**: 251–268.
- Becker, R., Fritz, E. and Manteuffel, R.** (1995). Subcellular localization and characterization of excessive iron in the nicotianamine-less tomato mutant chloronerva. *Plant Physiology* **108**: 269–275.
- Behmer, S.T., Lloyd, C.M., Raubenheimer, D., Stewart-Clark, J., Knight, J., Leighton, R.S., Harper, F.A. and Smith, J.A.C.** (2005). Metal hyperaccumulation in plants: mechanisms of defence against insect herbivores. *Functional Ecology* **19**: 55–66.
- Van Belleghem, F., Cuypers, A., Semane, B., Smeets, K., Vangronsveld, J., D’Haen, J. and Valcke, R.** (2007). Subcellular localization of cadmium in roots and leaves of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **173**: 495–508.
- Beneš, I., Schreiber, K., Ripperger, H. and Kircheiss, A.** (1983). Metal complex formation by nicotianamine, a possible phytosiderophore. *Experientia* **39**: 261–262.
- Bert, V., Macnair, M.R., de Laguerie, P., Saumitou-Laprade, P. and Petit, D.** (2000). Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *New Phytologist* **146**: 225–233.
- Bert, V., Bonnin, I., Saumitou-Laprade, P., de Laguerie, P. and Petit, D.** (2002). Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations?. *New Phytologist* **155**: 47–57.
- Bertin, G. and Averbek, D.** (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* **88**: 1549–1559.
- Blindauer, C.A. and Schmid, R.** (2010). Cytosolic metal handling in plants: determinants for zinc specificity in metal transporters and metallothioneins. *Metallomics* **2**: 510–529.
- Bouis, H.E. and Welch, R.M.** (2010). Biofortification – A Sustainable Agricultural Strategy for Reducing Micronutrient Malnutrition in the Global South. *Crop science* **50**, suppl.1, S20-S32.
- Boyd, R.S. and Martens, S.N.** (1992). The raison d’être for metal hyperaccumulation by plants. *The vegetation of ultramafic (serpentine) soils*: 279–289.

- Boyd, R.S. and Martens, S.N.** (1998). Nickel hyperaccumulation by *Thlaspi montanum* var. *montanum* (Brassicaceae): a constitutive trait. *American Journal of Botany* **85**: 259-265.
- Boyd, R.S.** (2007). The defense hypothesis of elemental hyperaccumulation: status, challenges and new directions. *Plant and Soil* **293**: 153–176.
- Boyd, R.S. and Moar, W.J.** (1999). The defensive function of Ni in plants: response of the polyphagous herbivore *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to hyperaccumulator and accumulator species of *Streptanthus* (Brassicaceae). *Oecologia* **118**: 218–224.
- Brewer, E.P., Saunders, J.A., Scott Angle, J., Chaney, R.L. and McIntosh, M.S.** (1999). Somatic hybridization between the zinc accumulator *Thlaspi caerulescens* and *Brassica napus*. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **99**: 761–771.
- Broadhurst, C.L., Chaney, R.L., Scott Angle, J., Erbe, E.F. and Maugel, T.K.** (2004). Nickel localization and response to increasing Ni soil levels in leaves of the Ni hyperaccumulator *Alyssum murale*. *Plant and Soil* **265**: 225–242.
- Broadley, M.R., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I. and Lux, A.** (2007). Zinc in plants. *New Phytologist* **173**: 677–702.
- Brooks, R.R., Chambers, M.F., Nicks, L.J. and Robinson, B.H.** (1998). Phytomining. *Trends in Plant Science* **3**: 359–362.
- Brown, S. L., Chaney, R.L., Angle, J.S. and Baker, A.J.M.** (1994) Phytoremediation Potential of *Thlaspi caerulescens* and bladder campion for zinc- and cadmium-contaminated soil. *Journal of Environmental Quality* **23**: 1151-1157.
- Brown, S.L., Chaney, R.L., Scott Angle, J. and Baker, A.J.M.** (1995). Zinc and cadmium uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and metal tolerant *Silene vulgaris* grown on sludge-amended soils. *Environmental Science & Technology* **29**: 1581–1585.
- Brune, A. and Dietz, K.-J.** (1995). A comparative analysis of element composition of roots and leaves of barley seedlings grown in the presence of toxic cadmium, molybdenum, nickel, and zinc concentrations. *Journal of Plant Nutrition* **18**: 853–868.
- Cakmak, I., Öztürk, L., Karanlik, S., Marschner and H., Ekiz, H.** (1996a) Zinc-efficient wild grasses enhance release of phytosiderophores under zinc deficiency. *Journal of Plant nutrition* **19**: 551–563.

- Cakmak, I., Sari, N., Marschner, H., Ekiz, H., Kalayci, M., Yilmaz, A. and Braun, H.J.** (1996b). Phytosiderophore release in bread and durum wheat genotypes differing in zinc efficiency. *Plant and Soil* **180**: 183–189.
- Cakmak, I.** (2007). Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification?. *Plant and Soil* **302**: 1–17.
- Callahan, D.L., Kolev, S.D., O’Hair, R.A.J., Salt, D.E. and Baker, A.J.M.** (2007). Relationships of nicotianamine and other amino acids with nickel, zinc and iron in *Thlaspi* hyperaccumulators. *New Phytologist* **176**: 836–848.
- Callahan, D.L., Baker, A.J.M., Kolev, S.D. and Wedd, A.G.** (2005). Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **11**: 2–12.
- Chaney, R. L.** (1983). Plant uptake of inorganic waste constituents. *Land treatment of hazardous wastes* **5**: 50–76.
- Clemens, S., Palmgren, M.G. and Krämer, U.** (2002). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* **7**: 309–315.
- Clemens, S.** (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* **88**: 1707–1719.
- Clemens, S.** (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**: 475–486.
- Clemens, S., Antosiewicz, D.M., Ward, J.M., Schachtman, D.P. and Schroeder, J.I.** (1998). The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 12043 –12048.
- Clough, S.J. and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**: 735–743.
- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B. and Pang, E.C.K.** (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* **142**: 169–196.
- Collins, Y.E. and Stotzky, G.** (1989). *Factors affecting the toxicity of heavy metals to microbes*. Bd. 31. John Wiley and Sons, New York.
- Colvin, R.A., Holmes, W.R., Fontaine, C.P. and Maret, W.** (2010). Cytosolic zinc buffering and muffling: their role in intracellular zinc homeostasis. *Metallomics* **2**: 306–317.
- Courbot, M., Willems, G., Motte, P., Arvidsson, S., Roosens, N., Saumitou-Laprade, P. and Verbruggen, N.** (2007). A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in

- Arabidopsis halleri* colocalizes with *HMA4*, a gene encoding a heavy metal ATPase. *Plant Physiology* **144**: 1052–1065.
- Cunningham, S.D. and Berti, W.R.** (1993). Remediation of contaminated soils with green plants: An overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **29**: 207–212.
- Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M., Misson, J., Schikora, A., Czernic, P. and Mari, S.** (2009). Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of Botany* **103**: 1–11.
- Dahmani-Müller, H., van Oort, F., Gélie, B. and Balabane, M.** (2000). Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution* **109**: 231–238.
- Deinlein, U., Weber, M., Schmidt, H., Rensch, S., Trampczynska, A., Hansen, T.H., Husted, S., Schjoerring, J.K., Talke, I.N., Krämer, U. and Clemens, S.** (2012). Elevated Nicotianamine Levels in *Arabidopsis halleri* Roots Play a Key Role in Zinc Hyperaccumulation. *The Plant Cell* **24**: 708–723.
- Deniau, A.X., Pieper, B., Ten Bookum, W.M., Lindhout, P., Aarts, M.G.M. and Schat, H.** (2006). QTL analysis of cadmium and zinc accumulation in the heavy metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Theoretical and Applied Genetics* **113**: 907–920.
- Douchkov, D., Gryczka, C., Stephan, U.W., Hell, R. and Baumlein, H.** (2005). Ectopic expression of nicotianamine synthase genes results in improved iron accumulation and increased nickel tolerance in transgenic tobacco. *Plant, Cell and Environment* **28**: 365–374.
- Dräger, D.B., Desbrosses-Fonrouge, A.-G., Krach, C., Chardonnens, A.N., Meyer, R.C., Saumitou-Laprade, P. and Krämer, U.** (2004). Two genes encoding *Arabidopsis halleri* MTP1 metal transport proteins co-segregate with zinc tolerance and account for high *MTP1* transcript levels. *The Plant Journal* **39**: 425–439.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J. and Guerinot, M.L.** (1996). A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 5624–5628.
- Filatov, V., Dowdle, J., Smirnoff, N., Ford-Lloyd, B., Newbury, H.J. and Macnair, M.R.** (2006). Comparison of gene expression in segregating families identifies genes and genomic regions involved in a novel adaptation, zinc hyperaccumulation. *Molecular Ecology* **15**: 3045–3059.

- Filatov, V., Dowdle, J., Smirnov, N., Ford-Lloyd, B., Newbury, H.J. and Macnair, M.R.** (2007). A quantitative trait loci analysis of Zinc hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist* **174**: 580–590.
- Finney, L.A. and O'Halloran, T.V.** (2003). Transition Metal Speciation in the Cell: Insights from the Chemistry of Metal Ion Receptors. *Science* **300**: 931–936.
- Friedland, A.J.** (1989). The movement of metals through soils and ecosystems. In: **Shaw, A.J.** (eds.). Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects. 7-20. CRC Press, Inc., Boca Raton.
- Frérot, H., Faucon, M.-P., Willems, G., Godé, C., Courseaux, A., Darracq, A., Verbruggen, N. and Saumitou-Laprade, P.** (2010). Genetic Architecture of Zinc Hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*: The Essential Role of QTL × Environment Interactions. *New Phytologist* **187**: 355–367.
- Garbisu, C. and Alkorta, I.** (2001). Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology* **77**: 229–236.
- Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B.M. and Irizarry, R.A.** (2004). affy—analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* **20**: 307–315.
- Gendre, D., Czernic, P., Conéjéro, G., Pianelli, K., Briat, J.-F., Lebrun, M. and Mari, S.** (2006). *TcYSL3*, a member of the *YSL* gene family from the hyper-accumulator *Thlaspi caerulescens*, encodes a nicotianamine-Ni/Fe transporter. *The Plant Journal* **49**: 1–15.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A.J., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J.Y. and Zhang, J.** (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology* **5**: R80.
- Godbold, D.L., Horst, W.J., Collins, J.C., Thurman, D.A., Marschner, H.** (1984). Accumulation of zinc and organic acids in roots of zinc tolerant and non-tolerant ecotypes of *Deschampsia caespitosa*. *Journal of Plant Physiology* **116**: 59-59.
- Gong, J.-M., Lee, D.A. and Schroeder, J.I.** (2003). Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatins and cadmium in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 10118–10123.

- Grant, C.A. and Bailey, L.D.** (1997). Effects of Phosphorus and Zinc Fertiliser Management on Cadmium Accumulation in Flaxseed. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **73**: 307–314.
- Grant, C.A. and Sheppard, S.C.** (2008). Fertilizer Impacts on Cadmium Availability in Agricultural Soils and Crops. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* **14**: 210–228.
- Grant, C.A., Clarke, J.M., Duguid, S. and Chaney, R.L.** (2008). Selection and breeding of plant cultivars to minimize cadmium accumulation. *Science of The Total Environment* **390**: 301–310.
- Grill, E., Winnacker, E.-L. and Zenk, M.H.** (1985). Phytochelatins: The principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* **230**: 674–676.
- Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M.L. and Eide, D.** (1998). Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 7220–7224.
- Guerinot, M.L.** (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1465**: 190–198.
- Guerinot, M.L. and Salt, D.E.** (2001). Fortified Foods and Phytoremediation. Two Sides of the Same Coin. *Plant Physiology* **125**: 164–167.
- Gustin, J.L., Loureiro, M.E., Kim, D., Na, G., Tikhonova, M. and Salt, D.E.** (2009). MTP1-dependent Zn sequestration into shoot vacuoles suggests dual roles in Zn tolerance and accumulation in Zn-hyperaccumulating plants. *The Plant Journal* **57**: 1116–1127.
- Gómez-Galera, S., Rojas, E., Sudhakar, D., Zhu, C., Pelacho, A.M., Capell, T. and Christou, P.** (2009). Critical evaluation of strategies for mineral fortification of staple food crops. *Transgenic Research* **19**: 165–180.
- Hanikenne, M. and Nouet, C.** (2011). Metal hyperaccumulation and hypertolerance: a model for plant evolutionary genomics. *Current opinion in plant biology* **14**: 252–259.
- Hanikenne, M., Talke, I.N., Haydon, M.J., Lanz, C., Nolte, A., Motte, P., Kroymann, J., Weigel, D. and Krämer, U.** (2008). Evolution of metal hyperaccumulation required *cis*-regulatory changes and triplication of *HMA4*. *Nature* **453**: 391–395.
- Haydon, M.J. and Cobbett, C.S.** (2007a). Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytologist* **174**: 499–506.

- Haydon, M.J., Kawachi, M., Wirtz, M., Hillmer, S., Hell, R. and Krämer, U.** (2012). Vacuolar Nicotianamine Has Critical and Distinct Roles under Iron Deficiency and for Zinc Sequestration in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **24**: 724–737.
- Haydon, M.J. and Cobbett, C.S.** (2007b). A Novel Major Facilitator Superfamily Protein at the Tonoplast Influences Zinc Tolerance and Accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **143**: 1705–1719.
- Higuchi, K., Nishizawa, N., Romheld, V., Marschner, H. and Mori, S.** (1996a). Absence of *nicotianamine synthase* activity in the tomato mutant 'chloronerva'. *Journal of plant nutrition* **19**: 1235–1239.
- Higuchi, K., Kanazawa, K., Nishizawa, N.-K., Chino, M. and Mori, S.** (1994). Purification and characterization of nicotianamine synthase from Fe-deficient barley roots. *Plant and Soil* **165**: 173–179.
- Higuchi, K., Kanazawa, K., Nishizawa, N.-K. and Mori, S.** (1996b). The role of nicotianamine synthase in response to Fe nutrition status in Gramineae. *Plant and Soil* **178**: 171–177.
- Hoppler, M., Schönbächler, A., Meile, L., Hurrell, R.F. and Walczyk, T.** (2008). Ferritin-Iron Is Released during Boiling and *In Vitro* Gastric Digestion. *The Journal of Nutrition* **138**: 878–884.
- Höreth, S.** (2011). Masterarbeit. Vergleichende Analyse der Nicotianaminsynthase 2 Promotoren von *Arabidopsis thaliana* und *A. halleri*. Universität Bayreuth. Nicht publiziert.
- Hotz, C. and Brown, K.H.** (2004). *Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control*. International nutrition foundation: for UNU.
- Howden, R., Goldsbrough, P.B., Andersen, C.R., Cobbett, C.S.** (1995). Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatins deficient. *Plant Physiology* **107**: 1059–1066.
- Hu, T.T., Pattyn, P., Bakker, E.G., Cao, J., Cheng, J.-F., Clark, R.M., Fahlgren, N., Fawcett, J.A., Grimwood, J., Gundlach, H., Haberer, G., Hollister, J.D., Ossowski, S., Ottillar, R.P., Salamov, A.A., Schneeberger, K., Spannagl, M., Wang, X., Yang, L., Nasrallah, M.E., Bergelson, J., Carrington, J.C., Gaut, B.S., Schmutz, J., Mayer, K.F.X., Van de Peer, Y., Grigoriev, I.V., Nordborg, M., Weigel, D. and Guo, Y.-L.** (2011). The *Arabidopsis lyrata* genome sequence and the basis of rapid genome size change. *Nature Genetics* **43**: 476–481.

- 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*. *The Plant Cell* **16**: 1327–1339.
- Inoue, H., Higuchi, K., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. and Nishizawa, N.K.** (2003). Three rice nicotianamine synthase genes, *OsNAS1*, *OsNAS2*, and *OsNAS3* are expressed in cells involved in long-distance transport of iron and differentially regulated by iron. *The Plant Journal* **36**: 366–381.
- Intawongse, M. and Dean, J.R.** (2006). Uptake of heavy metals by vegetable plants grown on contaminated soil and their bioavailability in the human gastrointestinal tract. *Food Additives and Contaminants* **23**: 36–48.
- Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U. and Speed, T.P.** (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**: 249–264.
- Jhee, E.M., Dandridge, K.L., Christy Jr., A.M. and Pollard, A.J.** (1999). Selective herbivory on low-zinc phenotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae). *Chemoecology* **9**: 93–95.
- Kanazawa, K., Nishizawa, N.K., Chino, M., Mori, S. and Higuchi, K.** (1994). Purification and characterization of nicotianamine synthase from Fe-deficient barley roots. *Plant and Soil* **165**: 173–179.
- Kim, S., Takahashi, M., Higuchi, K., Tsunoda, K., Nakanishi, H., Yoshimura, E., Mori, S. and Nishizawa, N.K.** (2005). Increased nicotianamine biosynthesis confers enhanced tolerance of high levels of metals, in particular nickel, to plants. *Plant & Cell Physiology* **46**: 1809–1818.
- Klatte, M., Schuler, M., Wirtz, M., Fink-Straube, C., Hell, R. and Bauer, P.** (2009). The Analysis of *Arabidopsis Nicotianamine Synthase* Mutants Reveals Functions for Nicotianamine in Seed Iron Loading and Iron Deficiency Responses. *Plant Physiology* **150**: 257–271.
- Korshunova, Y.O., Eide, D., Gregg Clark, W., Guerinot, M.L. and Pakrasi, H.B.** (1999). The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant molecular biology* **40**: 37–44.
- Krämer, U. and Chardonnens, A.N.** (2001). The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements. *Applied Microbiology and Biotechnology* **55**: 661–672.

- Krämer, U.** (2005). Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current Opinion in Biotechnology* **16**: 133–141.
- Krämer, U. and Clemens, S.** (2006). Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants. In: **Tamas, M.J. and Martinoia, E.** *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification* **14**: 216–271. Springer, Berlin/Heidelberg.
- Krämer, 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**: 635–638.
- Krämer, U, Talke, I.N. and Hanikenne, M.** (2007). Transition metal transport. *FEBS Letters* **581**: 2263–2272.
- Krämer, U.** (2010). Metal hyperaccumulation in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 517–534.
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F.J. and McGrath, S.P.** (2000). Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta* **212**: 75–84.
- Küpper, H., Zhao, F.J. and McGrath, S.P.** (1999). Cellular Compartmentation of Zinc in Leaves of the Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* **119**: 305–312.
- Lane, B., Kajioka, R., Kennedy, T.** (1987). The wheat-germ E<sub>c</sub> protein is a zinc-containing metallothionein. *Biochemistry and Cell Biology* **65**: 1001-1005.
- Lane, T.W., Saito, M.A., George, G.N., Pickering, I.J., Prince, R.C. and Morel, F.M.M.** (2005). Biochemistry: A cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* **435**: 42.
- Lanquar, V., Schnell Ramos, M., Lelièvre, F., Barbier-Brygoo, H., Krieger-Liszkay, A., Krämer, U. and Thomine, S.** (2010). Export of Vacuolar Manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 Is Required for Optimal Photosynthesis and Growth Under Manganese Deficiency. *Plant Physiology* **152**: 1986–1999.
- Lasat, M.M., Baker, A.J.M. and Kochian, L.V.** (1998). Altered Zn Compartmentation in the Root Symplasm and Stimulated Zn Absorption into the Leaf as Mechanisms Involved in Zn Hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* **118**: 875–883.
- Lasat, M.M., Pence, N.S., Garvin, D.F., Ebbs, S.D. and Kochian, L.V.** (2000). Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany* **51**: 71–79.

- Lee, J., Bae, H., Jeong, J., Lee, J.-Y., Yang, Y.-Y., Hwang, I., Martinoia, E. and Lee, Y.** (2003). Functional Expression of a Bacterial Heavy Metal Transporter in *Arabidopsis* Enhances Resistance to and Decreases Uptake of Heavy Metals. *Plant Physiology* **133**: 589–596.
- Lee, S., Jeon, U.S., Lee, S.J., Kim, Y.-K., Persson, D.P., Husted, S., Schjørring, J.K., Kakei, Y., Masuda, H., Nishizawa, N.K. and An, G.** (2009). Iron fortification of rice seeds through activation of the *nicotianamine synthase* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 22014–22019.
- Lee, S., Persson, D.P., Hansen, T.H., Husted, S., Schjørring, J.K., Kim, Y.-S., Jeon, U.S., Kim, Y.-K., Kakei, Y., Masuda, H., Nishizawa, N.K., An, G.** (2011). Bio-available Zinc in Rice Seeds Is Increased by Activation Tagging of *Nicotianamine Synthase*. *Plant Biotechnology Journal* **9**: 865–873.
- 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**: 392–404.
- Ling, H.Q., Koch, G., Bäumlein, H. and Ganai, M.W.** (1999). Map-based cloning of *chloronerva*, a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 7098–7103.
- Liu, M.-Q., Yanai, J., Jiang, R.-F., Zhang, F., McGrath, S.P. and Zhao F.-J.** (2008). Does cadmium play a physiological role in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*?. *Chemosphere* **71**: 1276–1283.
- Liu, W.-m., Mei, R., Di, X., Ryder, T.B., Hubbell, E., Dee, S., Webster, T.A., Harrington, C.A., Ho, M.-h., Baid, J., Smeekens, S.P.** (2002). Analysis of high density expression microarrays with signed-rank call algorithms. *Bioinformatics* **18**: 1593–1599.
- Lombi, E., Zhao, F.J., McGrath, S.P., Young, S.D. and Sacchi, G.A.** (2001). Physiological Evidence for a High-affinity Cadmium Transporter Highly Expressed in a *Thlaspi caerulescens* Ecotype. *New Phytologist* **149**: 53–60.
- Ma, L.Q., Komar, K.M., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y. and Kennelley, E.D.** (2001). A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* **409**: 579.
- Macnair, M.R., Bert, V., Huitson, S.B., Saumitou-Laprade, P. and Petit, D.** (1999). Zinc tolerance and hyperaccumulation are genetically independent characters. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **266**: 2175–2179.

- Macnair, M.R.** (2003). The hyperaccumulation of metals by plants. *Advances in Botanical Research* **40**: 63–105.
- Marschner, P.** (2011). *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, Salt Lake City.
- Martelli, A., Rousselet, E., Dycke, C., Bouron, A. and Moulis, J.-M.** (2006). Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie* **88**: 1807–1814.
- Masters, B.A., Kelly, E.J., Quaife, C.J., Brinster, R.L., Palmiter, R.D.** (1994). Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 584–588.
- Masuda, H., Usuda, K., Kobayashi, T., Ishimaru, Y., Kakei, Y., Takahashi, M., Higuchi, K., Nakanishi, H., Mori, S. and Nishizawa, N.K.** (2009). Overexpression of the Barley *Nicotianamine Synthase* Gene *HvNAS1* Increases Iron and Zinc Concentrations in Rice Grains. *Rice* **2**: 155–166.
- Mathys, W.** (1977). The role of malate, oxalate, and mustard oil glucosides in the evolution of zinc-resistance in herbage plants. *Physiologia Plantarum* **40**: 130–136.
- Mayer, J.E., Pfeiffer, W.H. and Beyer, P.** (2008). Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 166–170.
- Mirouze, M., Sels, J., Richard, O., Czernic, P., Loubet, S., Jacquier, A., François, I. E. J.A., Cammue, B.P.A., Lebrun, M., Berthomieu, P. and Marquès, L.** (2006). A putative novel role for plant defensins: a defensin from the zinc-hyperaccumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance. *The Plant Journal* **47**: 329–342.
- van de Mortel, J.E., Schat, H., Moerland, P.D., van Themaat, E.V.L., van der Ent, S., Blankestijn, H., Ghandilyan, A., Tsiatsiani, S. and Aarts, M.G.M.** (2008). Expression differences for genes involved in lignin, glutathione and sulphate metabolism in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana* and the related Zn/Cd-hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell & Environment* **31**: 301–324.
- van de Mortel, J.E., Villanueva, L.A., Schat, H., Kwekkeboom, J., Coughlan, J., Moerland, P.D., van Themaat, E.V.L., Koornneef, M. and Aarts, M.G.M.** (2006). Large Expression Differences in Genes for Iron and Zinc Homeostasis, Stress Response, and Lignin Biosynthesis Distinguish Roots of *Arabidopsis thaliana* and the Related Metal Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* **142**: 1127–1147.

- Mäser, 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., Tchieu, J., Gribskov, M., Persans, M.W., Salt, D.E., Kim, S.A. and Guerinot, M.L.** (2001). Phylogenetic Relationships within Cation Transporter Families of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**: 1646–1667.
- Müller, M. and Moor, H.** (1984). Cryofixation of thick specimens by high pressure freezing. In: **Müller, M., Becker, R.P., Boyde, A., Wolosewick, J.J.** (eds.). *The Science of Biological Specimen Preparation, Scanning Electron Microscopy*. 131-138. AFM O'Hare, Chicago.
- Noma, M., Noguchi, M. and Tamaki, E.** (1971). A new amino acid, nicotianamine, from tobacco leaves. *Tetrahedron Letters* **12**: 2017–2020.
- Noma, M. and Noguchi, M.** (1976). Occurrence of nicotianamine in higher plants. *Phytochemistry* **15**: 1701–1702.
- Ortiz-Monasterio, J.I., Palacios-Rojas, N., Meng, E., Pixley, K., Trethowan, R. and Peña, R.J.** (2007). Enhancing the mineral and vitamin content of wheat and maize through plant breeding. *Journal of Cereal Science* **46**: 293–307.
- Outten, C.E. and O'Halloran, T.V.** (2001). Femtomolar Sensitivity of Metalloregulatory Proteins Controlling Zinc Homeostasis. *Science* **292**: 2488–2492.
- Ow, D.W.** (1996). Heavy metal tolerance genes: prospective tools for bioremediation. *Resources, Conservation and Recycling* **18**: 135–149.
- O'Halloran, T.V. and Cizewski Culotta, V.** (2000). Metallochaperones, an Intracellular Shuttle Service for Metal Ions. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 25057–25060.
- Palmer, C.M. and Guerinot, M.L.** (2009). Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nat Chem Biol* **5**: 333–340.
- Palmgren, M.G., Clemens, S., Williams, L.E., Krämer, U., Borg, S., Schjørring, J.K. and Sanders, D.** (2008). Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. *Trends in Plant Science* **13**: 464–473.
- Pauwels, M., Frérot, H., Bonnin, I. and Saumitou-Laprade, P.** (2006). A broad-scale analysis of population differentiation for Zn tolerance in an emerging model species for tolerance study: *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *Journal of Evolutionary Biology* **19**: 1838–1850.
- Pauwels, M., Willems, G., Roosens, N., Frérot, H. and Saumitou-Laprade, P.** (2008). Merging methods in molecular and ecological genetics to study the adaptation of

- plants to anthropogenic metal-polluted sites: Implications for Phytoremediation. *Molecular Ecology* **17**: 108–119.
- Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Letham, D.L.D., Lasat, M.M., Garvin, D.F., Eide, D. and Kochian, L.V.** (2000). The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 4956–4960.
- Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A. and Forestier, C.** (2002). Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *The Plant Journal* **32**: 539–548.
- Persson, D.P., Hansen, T.H., Laursen, K.H., Schjoerring, J.K. and Husted, S.** (2009). Simultaneous iron, zinc, sulfur and phosphorus speciation analysis of barley grain tissues using SEC-ICP-MS and IP-ICP-MS. *Metallomics* **1**: 418–426.
- Pianelli, K., Mari, S., Marquès, L., Lebrun, M. and Czernic, P.** (2005). Nicotianamine over-accumulation confers resistance to nickel in *Arabidopsis thaliana*. *Transgenic Research* **14**: 739–748.
- Pich, A. and Scholz, G.** (1991). Nicotianamine and the Distribution of Iron into Apoplast and Symplast of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): II. Uptake of iron by protoplasts from the variety bonner beste and its nicotianamine-less mutant *chloronerva* and the compartmentation of iron in leaves. *Journal of Experimental Botany* **42**: 1517–1523.
- Pollard, A.J. and Baker, A.J.M.** (1997). Deterrence of herbivory by zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae). *New Phytologist* **135**: 655–658.
- Rasband, W.S.** (1997–2011). ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, <http://imagej.nih.gov/ij/>.
- Rascio, N. and Navari-Izzo, F.** (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting?. *Plant Science* **180**: 169–181.
- Raskin, I., Smith, R.D. and Salt, D.E.** (1997). Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology* **8**: 221–226.
- Rathinasabapathi, B., Rangasamy, M., Froeba, J., Cherry, R.H., McAuslane, H.J., Capinera, J.L., Srivastava, M. and Ma, L.Q.** (2007). Arsenic Hyperaccumulation in the Chinese Brake Fern (*Pteris vittata*) Deters Grasshopper (*Schistocerca americana*) Herbivory. *New Phytologist* **175**: 363–369.

- Reeves, P.G. and Chaney, R.L.** (2008). Bioavailability as an issue in risk assessment and management of food cadmium: A review. *Science of The Total Environment* **398**: 13–19.
- Reeves, R.D. and Baker, A.J.M.** (2000). Metal-accumulating plants. In: **Raskin, I. and Ensley, B.D.** (e.d). *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment*. 193-229. John Wiley and Sons, New York.
- Reeves, R.D., Brooks, R.R. and Macfarlane, R.M.** (1981). Nickel uptake by californian *Streptanthus* and *Caulanthus* with particula reference to the hyperaccumulator *S. polygaloides* Gray (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **68**: 708–712.
- Rellán-Álvarez, R., Abadía, J. and Álvarez-Fernández, A.** (2008). Formation of metal-nicotianamine complexes as affected by pH, ligand exchange with citrate and metal exchange. A study by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22**: 1553–1562.
- Reynolds, E.S.** (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* **17**: 208–212.
- Ribaut, J.-M. and Betrán, J.** (1999). Single large-scale marker-assisted selection (SLS-MAS). *Molecular Breeding* **5**: 531–541.
- Ribaut, J.-M. and Hoisington, D.** (1998). Marker-assisted selection: new tools and strategies. *Trends in Plant Science* **3**: 236–239.
- Robson, A.D.** (1993). *Zinc in soils and plants*: 27–28. Springer, Berlin/Heidelberg. International Symposium on Zinc in Soils and Plants, Perth, Australia. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Rogers, E.E. and Guerinot, M.L.** (2002). FRD3, a Member of the Multidrug and Toxin Efflux Family, Controls Iron Deficiency Responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **14**: 1787–1799.
- Roosens, N.H.C.J., Willems, G. and Saumitou-Laprade, P.** (2008). Using *Arabidopsis* to explore zinc tolerance and hyperaccumulation. *Trends in Plant Science* **13**: 208–215.
- Roosens, N.H.C.J., Willems, G., Godé, C., Courseaux, A. and Saumitou-Laprade, P.** (2007). The use of comparative genome analysis and syntenic relationships allows extrapolating the position of Zn tolerance QTL regions from *Arabidopsis halleri* into *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil* **306**: 105–116.
- Rosado, J.L.** (2003). Zinc and Copper: Proposed Fortification Levels and Recommended Zinc Compounds. *The Journal of Nutrition* **133**: 2985S–2989S.

- Rozen, S. and Skaletsky, H.J.** (1999). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: **Krawetz, S. and Misener, S.** (eds.). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* **132**: 365–386.
- Rudolph, A., Becker, R., Scholz, G., Procházka, Z., Toman, J., Macek, T. and Herout, V.** (1985). The occurrence of the amino acid nicotianamine in plants and microorganisms. A reinvestigation. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **180**: 557–563.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I. and Raskin, I.** (1995). Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Nature Biotechnology* **13**: 468–474.
- Salt, D. E., R. D. Smith, und I. Raskin.** (1998). PHYTOREMEDIATION. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 643–668.
- Salt, D.E., Prince, R.C., Baker, A.J.M., Raskin, I. and Pickering, I.J.** (1999). Zinc Ligands in the Metal Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* As Determined Using X-ray Absorption Spectroscopy. *Environmental Science & Technology* **33**: 713–717.
- Sambrook, J. and Russell, D.W.** (2001). Molecular cloning: A laboratory manual **3**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schaaf, G., Schikora, A., Häberle, J., Vert, G., Ludewig, U., Briat, J.-F., Curie, C. and von Wirén, N.** (2005). A Putative Function for the *Arabidopsis* Fe–Phytosiderophore Transporter Homolog AtYSL2 in Fe and Zn Homeostasis. *Plant and Cell Physiology* **46**: 762–774.
- Schmidt, H., Böttcher, C., Tramczynska, A. and Clemens, S.** (2011). Use of recombinantly produced <sup>15</sup>N<sub>3</sub>-labelled nicotianamine for fast and sensitive stable isotope dilution ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **399**: 1355–1361.
- Shahzad, Z., Gosti, F., Frérot, H., Lacombe, E., Roosens, N., Saumitou-Laprade, P. and Berthomieu, P.** (2010). The Five *AhMTP1* Zinc Transporters Undergo Different Evolutionary Fates towards Adaptive Evolution to Zinc Tolerance in *Arabidopsis halleri*. *PLoS Genetics* **6**: e1000911.
- Shen, Z.G., Zhao, F.J. and McGRATH, S.P.** (1997). Uptake and transport of zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and the non-hyperaccumulator *Thlaspi ochroleucum*. *Plant, Cell & Environment* **20**: 898–906.

- Shojima, S., Nishizawa, N.K., Fushiya, S., Nozoe, S., Irifune, T. and Mori, S.** (1990). Biosynthesis of Phytosiderophores: In Vitro Biosynthesis of 2'-Deoxymugineic Acid from L-Methionine and Nicotianamine. *Plant Physiology* **93**: 1497–1503.
- Sinclair, S.A., Sherson, S.M., Jarvis, R., Camakaris, J. and Cobbett, C.S.** (2007). The use of the zinc-fluorophore, Zinpyr-1, in the study of zinc homeostasis in *Arabidopsis* roots. *New Phytologist* **174**: 39–45.
- Smyth, G.K., Michaud, J. and Scott, H.S.** (2005). Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* **21**: 2067–2075.
- 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.
- Stephan, U.W. and Scholz, G.** (1993). Nicotianamine: mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem?. *Physiologia Plantarum* **88**: 522–529.
- Stephan, U.W., Schmidke, I., Stephan, V.W. and Scholz, G.** (1996). The nicotianamine molecule is made-to-measure for complexation of metal micronutrients in plants. *Biometals* **9**: 84–90.
- Stomp, A.M., Han, K.H., Wilbert, S., Gordon, M.P. and Cunningham, S.D.** (1994). Genetic strategies for enhancing phytoremediation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **721**: 481–491.
- Takagi, S.-i.** (1976). Naturally occurring iron-chelating compounds in oat - and rice-root washings: I. Activity Measurement and Preliminary Characterization. *Soil science and plant nutrition* **22**: 423–433.
- Takahashi, M., Terada, Y., Nakai, I., Nakanishi, H., Yoshimura, E., Mori, S. and Nishizawa, N.K.** (2003). Role of Nicotianamine in the Intracellular Delivery of Metals and Plant Reproductive Development. *The Plant Cell* **15**: 1263–1280.
- Talke, I.N., Hanikenne, M. and Krämer, 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 Physiology* **142**: 148–167.
- Tennstedt, P., Peisker, D., Böttcher, C., Trampczynska, A. and Clemens, S.** (2009). Phytochelatin Synthesis Is Essential for the Detoxification of Excess Zinc and

- Contributes Significantly to the Accumulation of Zinc. *Plant Physiology* **149**: 938–948.
- Tramczynska, A., Küpper, H., Meyer-Klaucke, W., Schmidt, H. and Clemens, S.** (2010). Nicotianamine forms complexes with Zn(II) *in vivo*. *Metallomics* **2**: 57–66.
- Uauy, C., Distelfeld, A., Fahima, T., Blechl, A. and Dubcovsky, J.** (2006). A NAC Gene Regulating Senescence Improves Grain Protein, Zinc, and Iron Content in Wheat. *Science* **314**: 1298–1301.
- Ueno, D., Iwashita, T., Zhao, F.-J. and Ma, J.F.** (2008). Characterization of Cd Translocation and Identification of the Cd Form in Xylem Sap of the Cd-Hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant and Cell Physiology* **49**: 540–548.
- Vacchina, V., Mari, S., Czernic, P., Marquès, L., Pianelli, K., Schaumlöffel, D., Lebrun, M. and Lobiński, R.** (2003). Speciation of nickel in a hyperaccumulating plant by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray MS/MS assisted by cloning using yeast complementation. *Analytical Chemistry* **75**: 2740–2745.
- Verbruggen, N., Hermans, C. and Schat, H.** (2009). Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* **181**: 759–776.
- Vert, G., Grotz, N., Dédaldéchamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M.L., Briat, J.-F. and Curie, C.** (2002). IRT1, an *Arabidopsis* Transporter Essential for Iron Uptake from the Soil and for Plant Growth. *The Plant Cell* **14**: 1223–1233.
- Wagner, G.J.** (1993). Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Advances in agronomy* **51**: 173–212.
- Waters, B.M. and Grusak, M.A.** (2008). Whole-plant mineral partitioning throughout the life cycle in *Arabidopsis thaliana* ecotypes Columbia, Landsberg *erecta*, Cape Verde Islands, and the mutant line *ysl1ysl3*. *New Phytologist* **177**: 389–405.
- Webb, E.C.** (1992). *International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Nomenclature Committee. Enzyme nomenclature, 1992: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes*. Academic Press, Salt Lake City.
- Weber, M., Harada, E., Vess, C., v. Roepenack-Lahaye, E. and Clemens, S.** (2004). Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *The Plant Journal* **37**: 269–281.

- Weber, M., Trampczynska, A. and Clemens, S.** (2006). Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd<sup>2+</sup>-hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri*. *Plant, Cell & Environment* **29**: 950–963.
- White, M.C., Baker, F.D., Chaney, R.L. and Morris Decker, A.** (1981). Metal Complexation in Xylem Fluid. *Plant Physiology* **67**: 301–310.
- White, P.J. and Broadley, M.R.** (2009). Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist* **182**: 49–84.
- White, P.J. and Broadley, M.R.** (2005). Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends in Plant Science* **10**: 586–593.
- WHO - World Health Organisation.** (2010). The world health report - Health systems financing: the path to universal coverage.
- Willems, G., Dräger, D.B., Courbot, M., Godé, C., Verbruggen, N. and Saumitou-Laprade, P.** (2007). The Genetic Basis of Zinc Tolerance in the Metallophyte *Arabidopsis halleri* ssp. *halleri* (Brassicaceae): An Analysis of Quantitative Trait Loci. *Genetics* **176**: 659-674.
- Willems, G., Frérot, H., Gennen, J., Salis, P., Saumitou-Laprade, P. and Verbruggen, N.** (2010). Quantitative trait loci analysis of mineral element concentrations in an *Arabidopsis halleri* × *Arabidopsis lyrata petraea* F2 progeny grown on cadmium-contaminated soil. *New Phytologist* **187**: 368–379.
- von Wiren, N., Klair, S., Bansal, S., Briat, J.-F., Khodr, H., Shioiri, T., Leigh, R.A. and Hider, R.C.** (1999). Nicotianamine chelates both FeIII and FeII. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiology* **119**: 1107–1114.
- von Wiren, N., Marschner, H. and Römheld, V.** (1996). Roots of Iron-Efficient Maize also Absorb Phytosiderophore-Chelated Zinc. *Plant Physiology* **111**: 1119 –1125.
- Wirth, J., Poletti, S., Aeschlimann, B., Yakandawala, N., Drosse, B., Osorio, S., Tohge, T., Fernie, A.R., Günther, D., Gruissem, W., and Sautter, C.** (2009). Rice endosperm iron biofortification by targeted and synergistic action of nicotianamine synthase and ferritin. *Plant Biotechnology Journal* **7**: 631–644.
- Witcombe, J.R. and Virk, D.S.** (2001). Number of crosses and population size for participatory and classical plant breeding. *Euphytica* **122**: 451–462.
- Wong, C.K.E. and Cobbett, C.S.** (2009). HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **181**: 71–78.

- Yogeeswaran, K., Frary, A., York, T.L., Amenta, A., Lesser, A.H., Nasrallah, J.B., Tanksley, S.D. and Nasrallah, M.E.** (2005). Comparative genome analyses of *Arabidopsis* spp.: Inferring chromosomal rearrangement events in the evolutionary history of *A. thaliana*. *Genome Research* **15**: 505–515.
- Zhao, F.J., Jiang, R.F., Dunham, S.J. and McGrath, S.P.** (2006). Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist* **172**: 646–654.
- Zhao, F.J., Lombi, E., Breedon, T. and McGrath, S.P.** (2000). Zinc Hyperaccumulation and Cellular Distribution in *Arabidopsis halleri*. *Plant, Cell & Environment* **23**: 507–514.
- Zhao, F.J., Lombi, E. and McGrath, S.P.** (2003). Assessing the potential for zinc and cadmium phytoremediation with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant and Soil* **249**: 37–43.
- Zheng, L., Cheng, Z., Ai, C., Jiang, X., Bei, X., Zheng, Y., Glahn, R.P., Welch, R.M., Miller, D.D., Lei, X.G., Shou, H.** (2010). Nicotianamine, a novel enhancer of rice iron bioavailability to humans. *PloS One* **5**: e10190.
- Zhu, C., Naqvi, S., Gomez-Galera, S., Pelacho, A.M., Capell, T. and Christou, P.** (2007). Transgenic strategies for the nutritional enhancement of plants. *Trends in Plant Science* **12**: 548–555.
- Zuker, M.** (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* **31**: 3406–3415.

## Anhang

A. Alignment der vier Isoformen von *AhNAS*

A. halleri NAS1	ATGGCTTG--	--CCAAAACAA	TCTCGTTGTG	AAGCAAATCG	TCGACTTATA	CGATCAAATC	TCAAAGCTCG	TGAGCTTAAA
A. halleri NAS2	.....	-.G.G.....	C.....	.....A	.T.....	.A.C.....	.....C...	A.....
A. halleri NAS3	...G..A--	...G..G..	A.AAT.G..	C.AAC...AT	G...TC.C..	...AA.G...	.....A...	...TC....
A. halleri NAS4	...G..ATT	G...G..G..	C.AAC.C..A	..CA.R...T	G...TC...T	...AA.G...	...G.....	AS.CGC...
Identität	*****	**	* * * * *	* * * * *	*	**	** * * * * *	* * * * * *
A. halleri NAS1	ACCTTCCAAA	AATGTCGACA	CTTTGTTCGG	ACAACCTCGTG	TCCACGTGCT	TACCCACGGA	TACAAACATC	GATGTCACAA
A. halleri NAS2	...A.....G	.....	.....T..A	.....	.....T..A..	.....C.....	.....	.....G
A. halleri NAS3	...A...G..	G.....A...	T.C.C...AA	G..G..T..T	...A...A	.C..AC.AA.	CC.T.....	..C.....C.
A. halleri NAS4	G...GTG..	G.....	S.C.C...AA	G..G.....	...A...A	...AC.AA.	CC.T.....	..C.....C.
Identität	** * *	*****	** * * * *	** * * * *	*****	** * * * *	* * * * * *	* * * * * *
A. halleri NAS1	ATATGTG--	TGAAGAAGTC	AAATACATGA	GATCTAATCT	CATCAAGCTT	TGTGGTGAAG	CCGAAGGTTA	TTTAGAGCAA
A. halleri NAS2	.G..ACACGA	...A.....	...G..GC..	.....C...	.....	.....	.....	.....
A. halleri NAS3	.G.....	...AC...C	C..G..G..TC	..CT...C..	...S...A.C	...C..T...	.T.....C.	C.....A..T
A. halleri NAS4	.A...C---	...A.CA..	...G.G.....	...A..C..	...S...AA.C	...A.....	.T.....	C.....T
Identität	* * *	*****	** * *	** * * * *	** * * * *	** * * * *	* * * * * *	* * * * * *
A. halleri NAS1	CACCTTCTCCA	CAATTTTGGG	ATCTTTACAA	GAAGACCAA	ACCCACTTGA	CCATTT-ACA	CATCTTTCTT	TACTACACCA
A. halleri NAS2	...T..A..	...C..A..	C.....T---	.....	.....AA.	.....	.....C	..T...A..
A. halleri NAS3	..T.....TT	.G..C...AC	C.....C---	C.....	C.C.A...	.A...CT.	.ATG..TT.	..T...C..
A. halleri NAS4	...TT	...C..AAC	C.....T---	.....	.....C.	T...K.G.AV	TC.T.....	...A..
Identität	** * * * *	* * * * *	*****	*****	* * * * * *	* * * * *	* * * * * *	* * * * * *
A. halleri NAS1	ACTACCTCAA	GCTAGGCAAG	CTCGAGTTCG	ATCTCCTGAG	TCAACACTCA	A---GCCATG	TCCCACCAA	GATGTCCTTC
A. halleri NAS2	...TA...	...A...A	...A...	...AGC	A...A..	---C...	...G...	AG.C...T
A. halleri NAS3	...TT.A..	A...A...	...A...	...C.C.C	A...A..CT.	.ATG..TT.	...A.AG.G	TG.G...
A. halleri NAS4	...T...	A...A...	...CGA	A..GA.TCT.	.ACG.TTC..	.T..A.AG.C	TG.A..T..	
Identität	*****	* * *	* * * * *	*****	** * * * *	* * * * *	* * * * * *	* * * * *
A. halleri NAS1	GTGGGTTTCGG	GTCCGATGCC	TCTCACATCC	ATCGTCTTGG	CAAAGTTTCA	CCTCCCGAAC	ACGACCTTCC	ACAACCTCGA
A. halleri NAS2	A.C.....	.....	A..T.....	.....C..T	...C..	T..T..C..	..A..G...	...T...
A. halleri NAS3	A.T..A..T.	...TC.T..	...T...T..	...TC.T..	TTCA..A..	T...AAAG..	..A.T...T.	...T...
A. halleri NAS4	A.T..C..T.	...TC.T..	...T...T..	G...AC.T.	...TCC.CC..	T..TAAAG..	T...K...T.	...T...
Identität	* * * * *	*****	* * * * *	*****	* * *	* * * * *	* * * * *	*****
A. halleri NAS1	CATCGACTCA	CACGCAACA	CACCTCGTTC	AAACCTAGTC	TCTCGCGACC	CGGACCTCTC	AAAAAGCATG	ATCTTCCACA
A. halleri NAS2	...C.....	.....	.....C..T	.....	...TT	.T...TT	...G...T	...G.T...
A. halleri NAS3	...C...	TCA..G...T	...CCTT..G..T	...CCT..T.	.A..A...	TC...G...	T.....	...
A. halleri NAS4	...C...	TCA..T..TT	TGG..A..AG.	TCGTT..G..T	GTCT..T.	T..T..T..	TC...T...	T..T...T.
Identität	*****	** * * *	* * * * *	* * * * *	** * * * *	* * * * *	*****	* * * * * *
A. halleri NAS1	CAACGGACGT	ACTAAACGCT	ACCGAAGGCC	TTGACCAATA	TGACGTCGTT	TTCTTGGCGG	CTCTTGTGG	GATGGACAAA
A. halleri NAS2	...T..T..	GT.....	.AG...GT	.A.....	C..T...T.	...A...	...T...	...T...
A. halleri NAS3	.CGTT..TA.	.A.GG..TG	.A.GA..T	.GAGGAGC.T	C..T...G	.TC.A..T.	...A..A...	...G
A. halleri NAS4	.CGTT..T..	.A.GG..T.G	.AR.GGGC.T	C...T..G	...T...T.	...C..	...A..T..	
Identität	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	** * * * *	** * * * *	*****	* * * * *
A. halleri NAS1	GAGTCAAAGG	TCAAAGCTAT	TGAGCATTGG	GAGAAGCATA	TGGCTCCTGG	AGCTGTGTTG	ATGCTAAGAA	GTGCTCATGG
A. halleri NAS2	...GAG..A..	...T...TG..	C.....C..	C...A..C.	...T.....	...C..C	...T..G.	.....
A. halleri NAS3	...GAG...	...T...TG..	C.....C..T	...A..C.	...T.....	...T..T..C.C	...T.GC.	.....
A. halleri NAS4	A..GAG...	...T...TG..	C.....C..T	...A..C.	...T.....	...T..T..C.C	...T.GC.	.....
Identität	** * * * *	* * * * *	*****	* * * * *	** * * * *	*****	* * * * *	*****
A. halleri NAS1	TCTTAGAGCT	TTCTTGTATC	CAATTGTTGA	CTCTTGTGAT	CTTAAAGGGT	TTGAGGTGTT	AACCATTAT	CATCCGTCCG
A. halleri NAS2	...CG.....A	...TC.T...	...G..C.C..	GC.G.....	...C.G...	...C...T..	GT.T.....	..C..AA.A.
A. halleri NAS3	A.C.....G	...TC.C...	...C..C.KC..	GC..W.....	...CC...T.	...CC.A..T..	...T.GG...	..C..TA..
Identität	* * * * *	** * * * *	* * * * *	* * * * *	** * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
A. halleri NAS1	ATGATGTGGT	TAATTCCGGT	GTCATCGCAC	GTAAGCTTGG	TGGGTCAAAT	GGAGCTCGAG	GCAGCCAGAT	CGGATGGTGT
A. halleri NAS2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A. halleri NAS3	...GAG...TA.	C..C..C...	...G...T.TA	AA...A.CC	..TGTTTCA	ACT.GGAAT.	TTG.TGGACC	TAAT.CA..C
A. halleri NAS4	...A..TA.	C..C..CA.T	...A...T..A	.G...C...	...AGA.G..	..TT.G.AAT.	.TGTGTTCA	T.AT-CA..A-
Identität	*****	** * * *	* * * * *	*****	**	*	*	*
A. halleri NAS1	GTGGTTATGC	CA-----	---TGTAACT	GCTCTAAGGT	CCACGCGATC	ATGAACAATC	GTGGTATGAA	GAAGAATTGG
A. halleri NAS2	...C.C.A..	...T-----	...C...	...T..C..A.	...A.....	.....	.....	...C.T....
A. halleri NAS3	T.A.C.A..	TTCGGATCTC	GAG.....	...T..C..A.	...T...T	-----	.....GCA.T	
Identität	* * * * *		** * * * *	* * * * *	*****	*****	*****	** * * *
A. halleri NAS1	ATCGAAGAGT	TTAGT---GC	CATCGAGTAA	-----	---			
A. halleri NAS2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A. halleri NAS3	...G.A...CG	A---..T.GG..	AG..CAGTGTCTT	AA				
A. halleri NAS4	...G...CG	CAGGT..T.AT..	AG..CAACTTACT	AG				
Identität	*****	***	*	**	* * * * *			

Abbildung 64: Alignment der vier *AhNAS*-Isoformen. Anfertigt mit Gentle (V 1.9.4).

## B. Primerliste

**Tabelle 14:** Liste der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer. An die Primer angefügte Restriktionsschnittstellen sind fett markiert.

Primername	Primersequenz [5' → 3']
<i>AhNAS2</i> RNAi fw.	TTGGCCAAGTCCATCTTCC
<i>AhNAS2</i> RNAi rev.	GCGATGACCACCGAATTAACC
<i>AhNAS4</i> RNAi fw.	TAATTTGGTAGCAGCTCGTTTGG
<i>AhNAS4</i> RNAi rev.	<b>CACCGAACAGTTACTCTCGAGATCCG</b>
<i>AhPCS</i> RNAi fw.	ATCAATGCTGGAATGTTGCGAGCC
<i>AhPCS</i> RNAi rev.	<b>CACCGCAATGCTGATCCAGCTCTCATCC</b>
Realtime <i>AhNAS1</i> fw.	TGATCTTCCACACAACGGACGTAC
Realtime <i>AhNAS1</i> rev.	AACGACGTCATATTGGTCAAGGC
Realtime <i>AhNAS2</i> fw.	ACAACCTGATGTGTTAAACGCTAAG
Realtime <i>AhNAS2</i> rev.	GCTTTGACCTTTGACTCTTTATCC
Realtime <i>AhNAS3</i> fw.	TCTGATCCAGACATCTCTCAACGG
Realtime <i>AhNAS3</i> rev.	TCTGTCACGTCCATTATATCAACGG
Realtime <i>AhNAS4</i> fw.	TGGACCTAGAGCGTTTCTCTATCCC
Realtime <i>AhNAS4</i> rev.	ACCGATAAAACTTGGAAACCTTGG
Realtime EF-1 $\alpha$ fw.	TGAGCACGCTCTTCTTGCTTTCA
Realtime EF-1 $\alpha$ rev.	GGTGGTGGCATCCATCTTGTTACA
Realtime <i>AhIRT1</i> fw.	CCCCGCAAATGATGTTACCTT
Realtime <i>AhIRT1</i> rev.	GGTATCGCAAGAGTTGTGCAT
Realtime <i>AhIRT3</i> fw.	AGTCACCCTCCTGGTCATGGTT
Realtime <i>AhIRT3</i> rev.	GCCCATGCCCAATGTCAAT
Realtime <i>AhZIP4</i> fw.	AGCAAGAGAGGAATCAGGCTGC
Realtime <i>AhZIP4</i> rev.	CCAACCACGGGAACAACAGCA
Realtime <i>AhZIP9</i> fw.	CCATCACTACTCCCATCGGTGT
Realtime <i>AhZIP9</i> rev.	CACCAATGACGCAACGCTATAA
pJC40 fw.	<b>GGATCCCGATGGCTTGCAGAGAACAACC</b>
pJC40 rev.	<b>GGGCCCTTACTCGATGGCACTAAACTC</b>

## Danksagung

Als Erstes möchte ich Prof. Dr. Stephan Clemens für die Bereitstellung dieses sehr interessanten Themas und für die Möglichkeit, die Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl anfertigen zu können, danken. Die durchweg sehr gute Betreuung, die vielen wichtigen Anregungen und guten Ideen trugen in großem Maße zum Gelingen der Dissertation bei.

Dr. Michael Weber möchte ich dafür danken, dass er mir die von ihm generierten *AhNAS2* RNAi-Linien überlassen hat, die die Basis der im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Experimente darstellen. Auch an ihn ein großes Danke für all die Hilfen, Ratschläge und die immer gegebene Diskussionsbereitschaft.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft möchte ich für die Finanzierung dieser Arbeit danken.

Bei meinen Kollegen, insbesondere Blen Beyene, Ursula Ferrera, Dr. Holger Schmidt, Prof. Dr. Angelika Mustruph, Tanja Kühnlenz, Sina Fischer, Stefan Rensch und Stephan Höreth, möchte ich mich für die Unterstützung und alle Hilfen bedanken. Auch an alle anderen Mitarbeiter des Lehrstuhls geht ein großes Lob für die Hilfsbereitschaft und tolle Arbeitsatmosphäre.

Den technischen Assistentinnen Christiane Meinen, Angelika Fischbach, Carmen Günther, Pia Schuster und Silke Haala gilt mein Dank in Bezug auf die kleinen Hilfen im Laboralltag und auch hinsichtlich der Kultivierung meiner *A. halleri* Pflanzen, die ein Doktorand ohne fremde Hilfe allein nicht bewältigen könnte.

Ferner möchte ich PD Dr. Stefan Geimer für die Hilfe bei allen, die Elektronenmikroskopie betreffenden, Experimenten danken.

Ein weiteres Dankeschön geht an Prof. Dr. Olaf Stemmann und den Lehrstuhl Genetik für die Möglichkeit zur Nutzung des konfokalen Lasermikroskops. Besonderer Dank gilt dabei Markus Hermann für die Unterstützung bei der Bedienung des Mikroskops.

Vielen Dank auch an die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Jan K. Schjöring, Prof. Dr. Søren Husted, Thomas H. Hansen und Dr. Daniel P. Persson aus Kopenhagen, für all die Hilfe bezüglich der Speziierungsanalysen.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, danke ich für die kontinuierliche Unterstützung und die Liebe, die mir mein Studium und die Anfertigung dieser Doktorarbeit ermöglicht haben. Vielen Dank auch an Nadine für all die Hilfe und uneingeschränkte moralische Unterstützung.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich anderweitig mit oder ohne Erfolg nicht versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, 11. April 2012

Ulrich Deinlein