

**Physiologische Charakterisierung und
molekulare Analyse von Zink-hypersensitiven
Arabidopsis thaliana Mutanten**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

in der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften
(BayNAT)

der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Nicole Nagler

Bayreuth, 2020

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von 01/2016 bis 11/2020 in Bayreuth am Lehrstuhl Pflanzenphysiologie unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Stephan Clemens angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 26.11.2020

Zulassung durch das Leitungsgremium: 07.12.2020

Wissenschaftliches Kolloquium: 21.06.2021

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Markus Lippitz

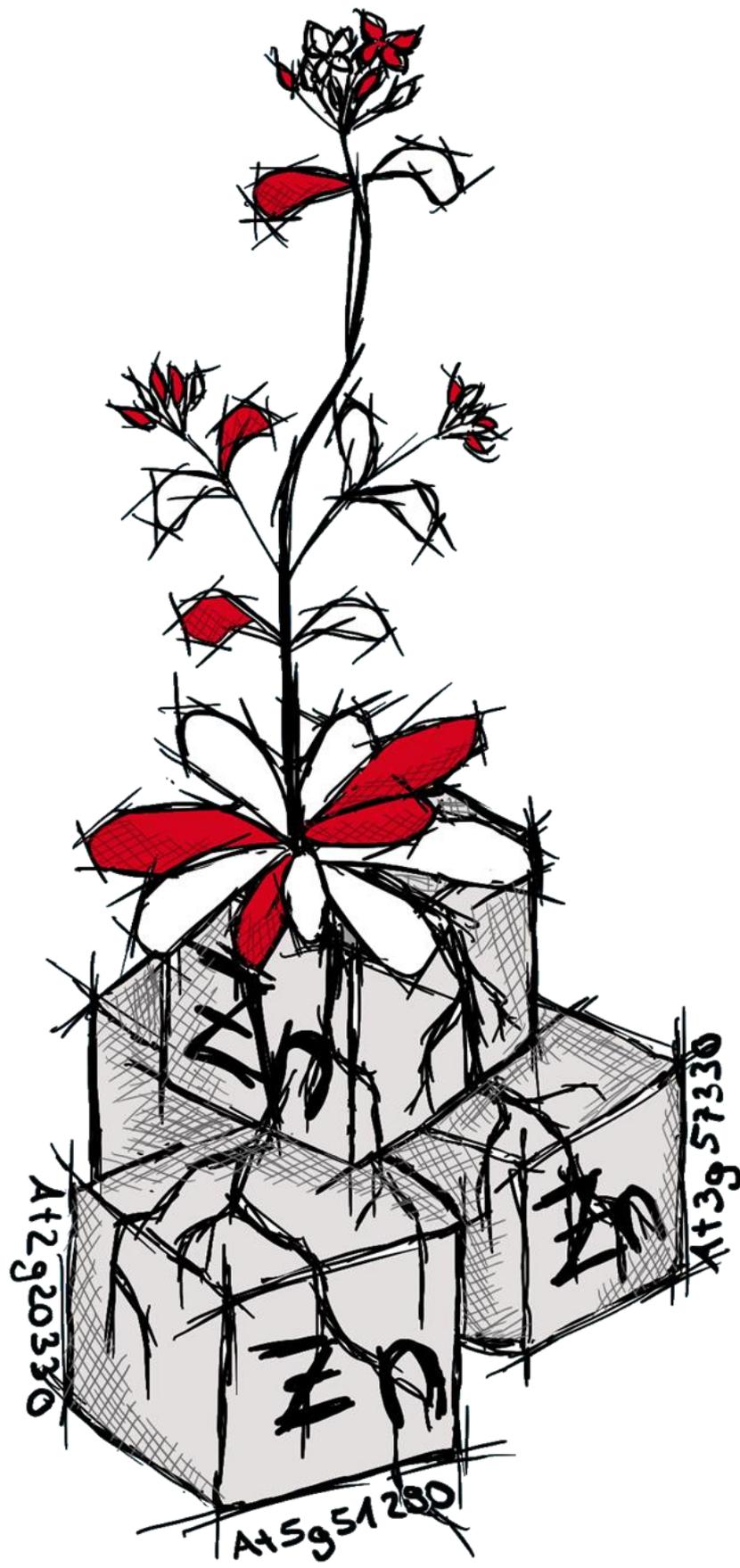
Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Stephan Clemens (Gutachter)

Prof. Dr. Angelika Mustroph (Gutachterin)

Prof. Dr. Dirk Schüler (Vorsitz)

Prof. Dr. Benedikt Westermann



Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Zusammenfassung..... | 7 |
| Summary | 9 |
| Abkürzungsverzeichnis | 10 |
| 1. Einleitung | 12 |
| 1.1 Der Einfluss von Schwermetallen auf Pflanzen | 12 |
| 1.2 Der Einfluss von Zink | 13 |
| 1.2.1 Zink-Überschuss | 13 |
| 1.2.2 Zink-Mangel..... | 14 |
| 1.3 Zink-Homöostase..... | 14 |
| 1.4 <i>ozs11</i> | 16 |
| 1.4.1 Vorarbeit (Masterarbeit) | 16 |
| 1.4.2 Ceramide und Ceramid-Kinase | 17 |
| 1.4.3 <i>acd5-1</i> | 18 |
| 1.5 <i>ozs3</i> | 19 |
| 1.5.1 CUL4-E3-Ligase-Komplex..... | 19 |
| 1.5.2 <i>OZS3</i> als potentieller Substratrezeptor | 20 |
| 1.6 <i>ozs1</i> | 21 |
| 1.6.1 Mutation in <i>MTP1</i> als Ursache der Zink-Hypersensitivität..... | 21 |
| 1.6.2 Suche nach Suppressor-Linien..... | 21 |
| 1.6.3 Mögliche Ursachen für eine erhöhte Zink-Toleranz in <i>ozs1</i> -Suppressor-Mutanten | 22 |
| 1.1.1 Bestimmung der Mutation in Suppressor-Mutanten mittels QTL-Seq | 23 |
| 1.2 Zielsetzung..... | 26 |
| 1.2.1 <i>ozs11</i> | 26 |
| 1.2.2 <i>ozs3</i> | 27 |
| 1.2.3 <i>ozs1</i> | 27 |
| 2. Material und Methoden | 28 |
| 2.1 Chemikalien | 28 |
| 2.2 Geräte..... | 28 |
| 2.3 Medien | 28 |
| 2.4 Stämme, Vektoren und Konstrukte..... | 29 |
| 2.5 Samensterilisation | 30 |
| 2.5.1 Mittels Chlorgases | 30 |
| 2.5.2 Mittels Natriumhypochlorid..... | 31 |
| 2.6 Pflanzenanzucht | 31 |
| 2.6.1 Anzucht auf Erde | 31 |
| 2.6.2 Anzucht auf Hoagland-Platten..... | 31 |
| 2.6.3 6-well Assay | 32 |
| 2.6.4 ½ MS Platten..... | 32 |
| 2.6.5 Hydroponisches System | 33 |
| 2.7 Element Analyse | 33 |
| 2.7.1 Probenvorbereitung für Mikrowellenaufschluss..... | 33 |
| 2.7.2 Mikrowellenaufschluss..... | 34 |
| 2.7.3 Vermessung mittels ICP-OES (induced coupled plasma – optical emission spectrometry)..... | 34 |
| 2.8 Molekularbiologische Methoden | 34 |
| 2.8.1 Quick DNA Extraktion (genomische DNA) | 34 |
| 2.8.2 DNA-Extraktion für Resequenzierung von <i>ozs1</i> Suppressor-Mutanten | 35 |
| 2.8.3 Polymerasekettenreaktion | 36 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.8.4 | Agarose-Gel | 36 |
| 2.8.5 | Spezial-Agarose-Gel..... | 36 |
| 2.8.6 | Enzymatischer Verdau..... | 37 |
| 2.8.7 | RNA Methoden..... | 37 |
| 2.9 | Klonierung | 39 |
| 2.9.1 | Gateway..... | 39 |
| 2.9.2 | Erstellung von <i>ozs3</i> knockout mittels CRISPR/Cas9 | 39 |
| 2.9.3 | pGEM-T..... | 40 |
| 2.10 | Transformation..... | 40 |
| 2.10.1 | <i>E. coli</i> | 40 |
| 2.10.2 | <i>A. tumefaciens</i> | 40 |
| 2.10.3 | <i>A. thaliana</i> | 41 |
| 2.10.4 | <i>N. bethamiana</i> | 41 |
| 2.11 | EMS-Mutagenese | 41 |
| 2.12 | Identifizierung von Mutanten | 42 |
| 2.12.1 | CRISPR/Cas9 Linien..... | 42 |
| 2.12.2 | <i>nahG</i> x <i>acd5-1</i> Doppelmutante | 42 |
| 2.12.3 | <i>nahG</i> x <i>acd5-2</i> Doppelmutanten | 42 |
| 2.12.4 | <i>ozs1</i> Suppressor-Screen..... | 43 |
| 2.13 | QTL-Seq-Analyse..... | 43 |
| 2.14 | RNA-Seq-Analyse..... | 44 |
| 2.15 | Proteinanalyse..... | 44 |
| 2.15.1 | Co-Immunpräzipitation | 44 |
| 2.15.2 | Proteinextraktion für Ceramid-Kinase..... | 45 |
| 2.15.3 | SDS-Gelelektrophorese | 45 |
| 2.15.4 | Western Blot..... | 45 |
| 2.15.5 | Immunodetektion..... | 46 |
| 2.15.6 | Protein Co-Lokalisation | 46 |
| 2.15.7 | Ceramid-Kinase Aktivitäts-Messung..... | 46 |
| 2.15.8 | Bestimmung der Proteinkonzentration über Bradford | 47 |
| 2.16 | Färbungen..... | 47 |
| 2.16.1 | ROS Färbung | 47 |
| 2.16.2 | Trypan-Blau-Färbung..... | 47 |
| 3. | Ergebnisse | 49 |
| 3.1 | <i>ozs11 (acd5-2)</i> | 49 |
| 3.1.1 | <i>ACD5 (accelerated cell death 5)</i> | 49 |
| 3.1.2 | Metallverteilung in Keimlingen | 52 |
| 3.1.3 | Messung von ROS unter Zink-Stress..... | 54 |
| 3.1.4 | Auswirkung von Zink-Stress auf die Transkription von <i>ACD5</i> , <i>PR1</i> und <i>WIN3</i> | 55 |
| 3.1.5 | Verbindung von Zink und Salicylsäure (SA) | 58 |
| 3.1.5.1 | Auswirkung der SA-Konzentration auf die Zink-Toleranz..... | 58 |
| 3.1.5.2 | Abhängigkeit der Zink-Hypersensitivität in <i>acd5-Mutanten</i> von der SA-Akkumulation..... | 59 |
| 3.1.6 | Spontaner Zelltod in <i>acd5-Mutanten</i> | 61 |
| 3.1.7 | Unabhängigkeit der Zink-Hypersensitivität von der Eisen-Verfügbarkeit..... | 63 |
| 3.1.7.1 | Eisen-Rettungsexperiment | 63 |
| 3.1.7.2 | Eisen-Transferexperiment | 65 |
| 3.1.8 | Kältehypersensitivität von <i>acd5-2</i> | 67 |
| 3.1.8.1 | Reduktion des Wurzelwachstums unter Kälte-Stress | 67 |
| 3.1.8.2 | Verbindung zwischen Zink- und Kälte-Hypersensitivität..... | 67 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.1.8.3 | Einfluss von Kälte auf die Keimungsrate | 69 |
| 3.1.9 | Relatives Transkriptlevel von <i>ACD5</i> | 69 |
| 3.1.10 | Lokalisation von <i>ACD5</i> | 71 |
| 3.1.11 | Ceramid-Kinase-Aktivität der <i>acd5</i> -Mutanten | 73 |
| 1.1.1 | RNA-Seq-Analyse | 74 |
| 3.2 | <i>ozs3</i> | 86 |
| 3.2.1 | Nachweis der Interaktion von <i>OZS3</i> mit <i>DDB1a</i> | 86 |
| 3.2.2 | <i>OZS3</i> ist ein essentielles Gen | 87 |
| 3.2.3 | ROS-Produktion unter Zink-Stress | 89 |
| 3.2.4 | ROS-Produktion unter Kälte-Stress | 90 |
| 3.3 | <i>ozs1</i> | 91 |
| 3.3.1 | Verbesserte Zink-Toleranz von <i>ozs1</i> Suppressor-Mutanten | 91 |
| 3.3.2 | <i>IRT1</i> in <i>ozs1</i> Suppressor-Mutanten | 92 |
| 3.3.3 | Metall-Verteilung in <i>ozs1</i> Suppressor-Mutanten | 93 |
| 3.3.3.1 | Metall-Verteilung in Keimlingen | 93 |
| 3.3.3.2 | Metall-Verteilung in adulten Pflanzen | 97 |
| 3.3.4 | QTL-Seq Analyse der <i>ozs1</i> -Suppressor-Mutanten | 100 |
| 3.3.4.1 | Erbgang | 100 |
| 3.3.4.2 | Bestimmung der Mutation mittels QTL-Seq-Analysemethode | 101 |
| 4. | Diskussion | 105 |
| 4.1 | <i>ozs11</i> | 105 |
| 4.1.1 | Unabhängigkeit der Kälte-Hypersensitivität von der Mutation in <i>ACD5</i> | 106 |
| 4.1.2 | Teilweise Abhängigkeit der Zink-Hypersensitivität von der SA-Akkumulation | 107 |
| 4.1.3 | Lage der Mutation als Ursache der Bildung von Läsionen in <i>acd5-1</i> | 109 |
| 4.1.4 | Zink-Stress-Kern-Antwort | 112 |
| 4.1.5 | Zink-Stress führt zur Eisen-Defizienz | 113 |
| 4.1.6 | GO-Term-Analyse der in <i>acd5-2</i> unter Zink-Stress induzierten Gene | 113 |
| 4.1.7 | Unveränderte SA- und Pathogen-Antwort in <i>acd5-2</i> | 116 |
| 4.1.8 | <i>ZAT7</i> und <i>DRRP</i> als Verbindung zwischen Ceramid-Stoffwechsel und Zink-Homöostase 116 | |
| 4.2 | <i>ozs3</i> | 121 |
| 4.2.1 | Interaktion zwischen <i>DDB1a</i> und <i>OZS3</i> | 121 |
| 4.2.2 | Nachweis von <i>OZS3</i> als essentielles Gen | 122 |
| 4.2.3 | Unabhängigkeit der erhöhten ROS-Produktion unter Zink-Stress von der generellen Antwort auf oxidativen Stress | 123 |
| 4.2.4 | Funktionen von DCAF-Proteinen in <i>A. thaliana</i> | 124 |
| 4.2.5 | Funktion von <i>OZS3</i> -Orthologen | 125 |
| 4.3 | <i>ozs1</i> -Suppressor-Screen | 126 |
| 4.3.1 | Zink-Aufnahme in den Suppressor-Mutanten | 126 |
| 4.3.2 | Ermittlung möglicher Gene mit Beteiligung an der Zink-Homöostase | 127 |
| 4.3.3 | <i>ACA11</i> und die Calcium-Homöostase | 130 |
| 4.3.4 | Mögliche Ursache der gesteigerten Zink-Toleranz in <i>suo1</i> | 131 |
| | Literaturverzeichnis | 134 |
| 5. | Anhang | 151 |
| 5.1 | Tabellen | 151 |
| 5.2 | Abbildungen | 175 |
| | Danksagung | 178 |
| | (Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen | 179 |

Zusammenfassung

Zink ist sowohl für den Menschen als auch für Pflanzen ein essenzielles Schwermetall. Dabei kommt es aber vor allem auf die richtige Konzentration an. Zu hohe, aber auch zu geringe Mengen an Zink können sich negativ auswirken. Da Pflanzen sessile Organismen sind, müssen sie sich an fluktuierende Zink-Konzentrationen in ihrer Umgebung anpassen können. Um zu verstehen, wie dies funktioniert, ist es wichtig die Zink-Homöostase aufzuklären. Dabei soll nicht nur herausgefunden werden, wie die Zink-Konzentration innerhalb der Pflanze optimal gehalten werden kann, sondern auch welche zellulären Funktionen Zink ausübt. Bisher sind einige Aspekte der Zink-Homöostase bekannt, dennoch gibt es noch immer viele offene Fragen. Deshalb wurde hier mittels Zink-hypersensitiver *ozs* (*overly zinc sensitive*)-Mutanten an der Aufdeckung weiterer Mechanismen und Bestandteile der Zink-Homöostase gearbeitet. Eine dieser *ozs*-Mutanten weist eine Mutation in *ACD5* (*Accelerated cell death5*) auf. Mit Hilfe dieser Mutante konnte eine Verbindung zwischen dem Sphingolipid-Stoffwechsel und der Zink-Toleranz aufgezeigt werden. Durch die Mutation kommt es in *acd5-1* (bereits beschriebene Mutante; Greenberg et al. 2000) zur Akkumulation von Ceramiden, was unter Zink-Stress wahrscheinlich zu einer Reduktion der Fitness führt. Mittels RNA-Seq-Analyse konnte zum einen gezeigt werden, dass Zink-Stress einen Eisen-Mangel auslöst, wodurch höchstwahrscheinlich die Expression von Hypoxie-responsiven Genen induziert wird. Zum anderen konnte in *acd5-2* (*ozs11*) unter Zink-Stress eine stark erhöhte *ZAT7*-Expression beobachtet werden. Eventuell wird die *ZAT7*-Expression durch verringerte Cer1P (Ceramid-1-Phosphat)-Konzentrationen zusammen mit erhöhten SA (Salicylsäure)-Gehalten unter Zink-Stress induziert.

Eine weitere Zink-hypersensitive Mutante ist *ozs3*. Hier liegt die Mutation in einem Protein mit WD40-Domäne. Die Interaktion von *OZS3* mit *DDB1a* wurde mittels Co-Immunopräzipitation nachgewiesen. Dadurch wurde die Hypothese gestützt, dass *OZS3* als Substratrezeptor in einem *CUL4-E3*-Ligase-Komplex dient. Durch CRISPR/Cas9 konnte zudem gezeigt werden, dass *OZS3* ein essenzielles Gen ist. Die genaue Funktion von *OZS3* und die Verbindung zur Zink-Homöostase konnte bisher noch nicht geklärt werden. Eine Hypothese ist, dass es an der DNA-Reparatur beteiligt ist. Sollte ein Zink-Überschuss zu DNA-Schäden führen, könnten diese durch *OZS3* repariert werden.

Die dritte untersuchte Mutante war *ozs1*. Hier wurde mittels Suppressorscreen versucht, neue Erkenntnisse der Zink-Homöostase zu erlangen. Es konnte eine Mutante *Suppressor of ozs1 1* (*suo1*) gefunden werden, welche ein signifikant besseres Wurzelwachstum als *ozs1* unter Zink-Stress zeigte. Der Zink-Gehalt und die Verteilung war im Vergleich zu *ozs1* in dieser Mutante sowohl in Keimlingen als auch in adulten Pflanzen unverändert. Mittels QTL (Quantitative Trait Locus)-Seq-Methode konnten mehrere mögliche Mutationen gefunden werden, welche für die gesteigerte Zink-Toleranz

verantwortlich sein könnten. Die wahrscheinlichste Ursache ist die Mutation in *ACA11* (*Autoinhibited Ca²⁺-ATPase 11*). *ACA11* ist ein Ca²⁺-Transporter und transportiert Ca²⁺ vom Cytosol in die Vakuole. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass es in *suo1* zu einer verstärkten und verlängerten Erhöhung der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration kommt, wodurch die Zink-Toleranz erhöht wird.

Summary

Zinc is an essential heavy metal for humans as well as for plants. Especially the correct concentration is important. Too high but also too low zinc contents could lead to negative effects. Because plants are sessile organisms, they have to adapt to fluctuating zinc concentrations of their environment. To understand how this could function it is important to understand the zinc homeostasis. It should be uncovered how the zinc concentration could be kept constant in the plant and which cellular functions zinc carries out. Until now some aspects of the zinc homeostasis are known, but there are still a lot of open questions. That is why we work with zinc hypersensitive *ozs* (*overly zinc sensitive*) mutants to uncover further mechanisms and components of the zinc homeostasis. One of these mutants carries a mutation in *ACD5* (*Accelerated cell death5*). With this mutant a link between sphingolipide metabolism and zinc tolerance could be established. The mutation causes in *acd5-1* (already described mutant; Greenberg et al. 2000) the accumulation of ceramids. This leads to a reduced fitness under zinc stress. Using an RNA-Seq analysis, it could be shown that on the one hand zinc stress causes iron deficiency. Most likely of this the expression of hypoxia responsive genes is induced. On the other hand, a strongly increased *ZAT7* expression was observed in *acd5-2* (*ozs11*) under zinc stress. Eventually the *ZAT7* expression is caused by decreased Cer1P (Ceramide-1-phosphate) concentrations together with increased SA-levels under zinc stress.

Another zinc hypersensitive mutant is *ozs3*. The mutation is located in a protein with a WD40 domain. The interaction between *OZS3* and *DDB1a* was shown by CoIP. This confirms the hypothesis, that *OZS3* works as substrate receptor in a *CUL4* E3 ligase complex. By using CRISPR/Cas9 it was shown, that *OZS3* is an essential gene. The exact function of *OZS3* and the link to the zinc homeostasis is yet unclear. A hypothesis would be, that it is part of a DNA repair mechanism. If a zinc excess leads to DNA damage *OZS3* could be involved in repairing it.

The third project was *ozs1*. With the help of a suppressor screen we tried to gain new insights into zinc homeostasis. A mutant *suo1* could be found, which shows a significant better root growth under zinc stress than *ozs1*. The zinc content and distribution in seedlings and adult plants of this mutant was the same as in *ozs1*. By using a QTL (Quantitative Trait Locus) Seq method, some mutations, which could be responsible for the increased zinc tolerance, could be identified. The most likely cause is the mutation in *ACA11* (*Autoinhibited Ca²⁺-ATPase 11*). *ACA11* is a Ca²⁺ transporter and transports Ca²⁺ from the cytosol into the vacuole. The hypothesis is that the magnitude and duration of cytosolic Ca²⁺ elevation is stronger and longer in *suo1*. This could increase the zinc tolerance.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|--|
| <i>A. thaliana</i> | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| <i>A. tumefaciens</i> | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> |
| ABA | Abscisinsäure |
| Abb. | Abbildung |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BiFC | Bimolekulare-Fluoreszenz-Komplementation |
| CaM | Calmodulin |
| Cas | CRISPR-associated |
| cDNA | Complementary DNA |
| Cer | Ceramid |
| Cer1P | Ceramid-1-Phosphat |
| CerK | Ceramid-Kinase |
| Chl | Chlorophyll |
| CoIP | Co-Immunopräzipitation |
| Col-0 | Columbia |
| CRISPR | Clustered regularly interspaced short palindromic repeat |
| DAB | Diaminobenzidin |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EMS | Ethylmethansulfonat |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| gDNA | Genomische DNA |
| GFP | Grün fluoreszierendes Protein |
| GO | Gen-Ontologie |
| HA | Hämagglutinin |

| | |
|-----------------------|---|
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| ICP-OES | Inductively Coupled Plasma- Optical Emission Spectrometry |
| KP | RNA-Seq Pool mit kurzen Wurzeln |
| LP | RNA-Seq Pool mit langen Wurzeln |
| MES | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure |
| MT | Metallothioneneine |
| NA | Nicotianamin |
| <i>N. benthamiana</i> | <i>Nicotiana benthamiana</i> |
| NBT | Nitroblautetrazoliumchlorid |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PAM | Protospacer Adjacent Motif |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| ppm | Parts per million |
| QTL | Quantitative Trait Locus |
| QTL-Seq | QTL-Sequenzierung |
| RK | Rückkreuzungslinien |
| RNA-Seq | RNA-Sequenzierung |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies |
| RT | Raumtemperatur |
| RTL | Relatives Transkriptlevel |
| SA | Salycilsäure |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SNP | Single Nucleotide Polymorphism |
| StAbw | Standardabweichung |
| Tab. | Tabelle |
| T-DNA | Transfer-DNA |
| UTR | Untranslatierte Region |
| WS | <i>Wassilewskija</i> |
| WT | Wildtyp |
| Y2H | Hefe-2-Hybrid |

1. Einleitung

„Die Dosis macht das Gift“ ist ein Ausspruch, der im Alltag oft genutzt wird. Er gründet auf der Aussage des Schweizer Arztes und Philosophen Theophrastus Bombast von Hohenheim (Paracelsus): „Alle Dinge sind Gift, und nichts ist ohne Gift; allein die Dosis machts, dass ein Ding kein Gift sei.“ Paracelsus erkannte also bereits 1538, dass es bei vielen Dingen auf das richtige Maß ankommt. So beinhalteten seine Medikamente Bestandteile, die damals als Gift betrachtet wurden, aber in der richtigen Konzentration der Gesundheit förderlich waren. Dass es häufig auf die Dosierung ankommt, lässt sich aber nicht nur auf die Humanmedizin beziehen, sondern auch auf die Fitness von Pflanzen.

1.1 Der Einfluss von Schwermetallen auf Pflanzen

Pflanzen sind sessile Lebewesen. Dies stellt sie vor besondere Herausforderungen. Im Gegensatz zu anderen Lebewesen, die nachteiligen Umweltbedingungen durch Bewegung an andere Orte vermeiden können, steht Pflanzen diese Option nicht offen. Sie müssen einen Weg finden, die gegebenen Umstände bestmöglich zu nutzen. Ein Beispiel hierfür ist die Nährstoffverfügbarkeit. Findet ein Tier keine Nahrung mehr, kann es diesem Mangel durch einen Ortswechsel entgegenwirken, Pflanzen nicht. Sie nehmen ihre benötigten Nährstoffe über die Wurzel aus dem Boden auf. Unter anderem benötigen Pflanzen essentielle Mikroelemente wie Eisen, Kupfer, Kobalt, Mangan, Nickel und Zink. All diese Spurenelemente sind Schwermetalle. Im Boden befinden sich aber auch andere Schwermetalle bzw. Übergangsmetalle, welche nicht essentiell sind, wie Blei, Arsen oder Cadmium. Die Pflanze steht nun vor der Herausforderung, ausreichend essentielle Schwermetalle aus dem Boden aufzunehmen, ohne gleichzeitig nichtessentielle Schwermetalle in zu hohen Konzentrationen zu akkumulieren. Nichtessentielle Schwermetalle können zwar in geringen Mengen toleriert werden, zu hohe Konzentrationen führen allerdings schnell zu toxischen Effekten.

Aber auch bei der Aufnahme der essentiellen Spurenelemente muss auf die Konzentration geachtet werden (Abb. 1). Es gibt eine optimale Konzentration dieser Metalle, bei der die Pflanze die größte Fitness zeigt. Wie aber bereits anfangs erwähnt, macht die Dosis das Gift. Nimmt eine Pflanze zu wenig essentielle Schwermetalle auf, kommt es zu Mangelercheinungen, wie der Chlorose junger Blätter, verfrühter Seneszenz älterer Blätter, verringerter Blattgröße und Biomasse und reduziertem Internodienwachstum (Clemens 2010; Yadav 2010). Wird die Konzentration zu hoch, wirkt sie wiederum toxisch.

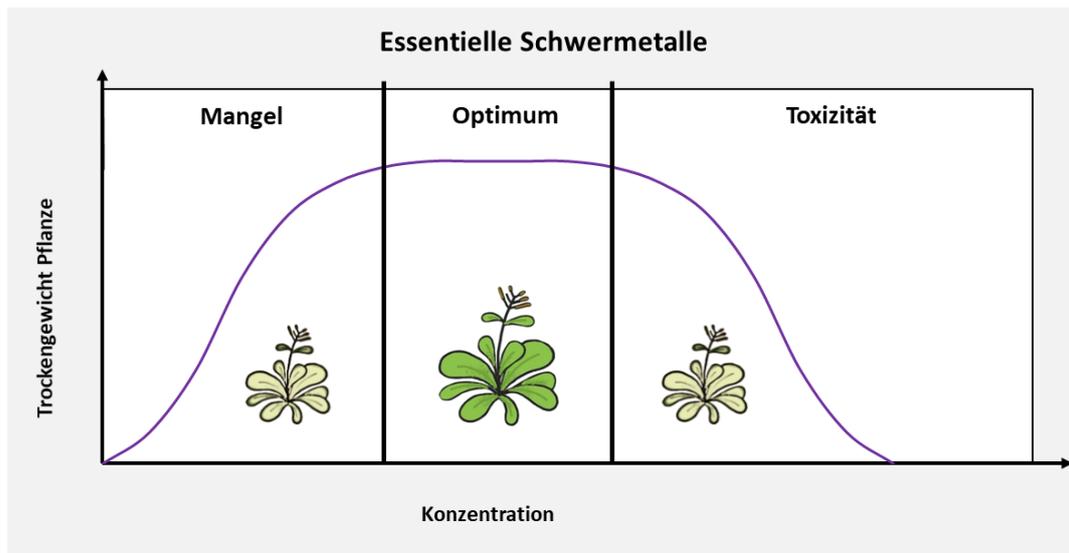


Abb. 1: Konzentrationsabhängiges Wachstum von Pflanzen. Die Menge an Schwermetallen beeinflusst das Wachstum von Pflanzen. Die Konzentrationsabhängigkeit ist gezeigt als Trockengewicht der Pflanze gegen die Konzentration an essentiellen Schwermetallen. Zu geringe Konzentrationen führen zu Mangelerscheinungen, wohingegen zu hohe Konzentrationen toxisch wirken (Veränderte Abbildung nach (Lin et al. 2012)).

1.2 Der Einfluss von Zink

Für die folgende Arbeit ist vor allem Zink von Bedeutung, weshalb näher auf dieses Schwermetall eingegangen wird. Zink ist das einzige Metall, welches in allen sechs Enzymklassen (Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen, Ligasen) zu finden ist (Coleman 1992; Christianson 1991). Damit ist Zink nach Eisen das am häufigsten vorkommende Übergangsmetall in Organismen. Für die Pflanze ist Zink als Zn^{2+} verfügbar. Zn^{2+} ist besonders gut als Co-Faktor geeignet, da es redoxstabil ist und somit nicht die Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (engl. reactive oxygen species = ROS) begünstigt. Des Weiteren hat Zink die Eigenschaft einer Lewis-Säure. Dadurch kann es starke kovalente Bindungen vor allem mit S, N und O eingehen (Barak und Helmke 1993).

1.2.1 Zink-Überschuss

Wie zu Beginn erwähnt, führen zu hohe Zink-Konzentrationen zur Toxizität. Solche Konzentrationen werden durch das Wachsen auf kontaminierten Böden hervorgerufen. Eine erhöhte Kontamination von Böden mit Zink wird meist von Menschen verursacht. Durch den Bergbau und Metallverarbeitung (Chaney 2010) oder das Düngen in der Landwirtschaft mit zinkreichem Tierkot und Klärschlamm wird die Erde mit Zink angereichert (Lindsay 1972; Zhao et al. 2015). Ein toxischer Effekt von zu hohen Zink-Konzentrationen kann zum Beispiel ein Eisen-Mangel sein. Ist im Vergleich zu Eisen relativ viel Zink vorhanden, kann dieses Eisen aus Eisen-bindenden Proteinen verdrängen (Arrivault et al. 2006). Nach der Irving-Williams-Reihe kann Zink nicht nur Eisen verdrängen, sondern auch weitere zweiwertige Kationen, wie Mangan, Magnesium oder Kobalt (Irving und Williams 1953). Dies stellt zum Beispiel ein Problem für die Fotosynthese dar. Hier kann Zink das im Chlorophyll (Chl)

befindliche Magnesium verdrängen (Wettstein et al. 1995). Dadurch verändert sich die Struktur von Chl, was einen Einfluss auf die Funktionalität des Lichtsammelkomplexes II hat (Küpper et al. 2002). Erhöhte Zink-Konzentrationen können zudem auch zu einer Reduktion des Gehaltes an Chl *a* und *b* führen (Khudsar et al. 2004).

1.2.2 Zink-Mangel

Da Zink ein essentielles Schwermetall ist, kann auch ein Mangel zur Reduktion der Fitness führen. Betrachtet man die Tatsache, dass schätzungsweise 8 - 10% der Proteine in Eukaryoten und 5 - 6% der Proteine in Bakterien und Archaea mit Zink interagieren, wird die Tragweite eines solchen Mangels ersichtlich (Andreini et al. 2006). Eine wichtige Rolle spielt Zink dabei bei der Stabilisierung von Proteinen, wie zum Beispiel in Zink-Finger-Proteinen. Es übt aber auch katalytische Funktionen aus, zum Beispiel als Co-Faktor der Alkohol-Dehydrogenase oder Carboanhydrase (Eklund et al. 1976; Keilin et al. 1940). Zink dient auch der Superoxiddismutase als Co-Faktor. Ein Zink-Mangel führt dabei zu einer verminderten Aktivität, wodurch es vermehrt zur Bildung von ROS kommt (Wang et al. 2007). Zusätzlich dazu konnte in Säugetieren eine Beteiligung von Zink an der Signalweiterleitung gezeigt werden (Kambe et al. 2015; Velázquez-Delgado et al. 2012; Hirano et al. 20011). Eine unzureichende Versorgung mit Zink könnte also auch die Signaltransduktion stören. Bei Diabetes mellitus zeigen sich zum Beispiel verringerte Konzentrationen an zirkulierendem Zink. Dabei ist Zink in pankreatischen β -Zellen an der Speicherung von Insulin in sekretorischen Granula beteiligt. Genetische Variationen des Diabetes-assoziierten Granula-lokalisierten Zink-Transporters ZnT8 verändern dementsprechend das Risiko für Diabetes Typ 2 (Rutter et al. 2016).

1.3 Zink-Homöostase

All dies zeigt, dass eine strenge Kontrolle über den Zink-Haushalt vorliegen muss, um eine optimale Fitness zu gewährleisten. Betrachtet man nun den Zink-Gehalt im Boden, kann man sehen, dass sich dieser immer wieder abrupt ändern kann. Die Zink-Konzentration in der Pflanze hingegen bleibt mit 15 - 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ Trockengewicht sehr stabil (Hänsch et al. 2009). Dies veranschaulicht, dass es verschiedene Mechanismen geben muss, die die Zink-Homöostase steuern. Dabei müssen die Aufnahme, Verteilung und Speicherung von Zink reguliert werden. Ebenfalls muss die unkontrollierte Interaktion mit anderen Proteinen verhindert werden. Einige Bestandteile der Zink-Homöostase konnten bereits aufgedeckt werden.

Zunächst muss Zink in die Pflanze aufgenommen werden. Dazu dienen Proteine aus der ZIP-Familie (*ZRT*, *IRT* related proteins) (Sinclair et al. 2012). Diese können Fe^{2+} und Zn^{2+} transportieren (Fox et al. 1998). Iron-Regulated Transporter 1 (*IRT1*) war dabei das erste Protein, das entdeckt wurde. Die Transkription von *IRT1* wird unter Eisen-Mangel-Bedingungen aktiviert. Neben Fe^{2+} kann *IRT1* auch

die Aufnahme weiterer Schwermetalle, wie Zink und Cadmium, vermitteln (Sinclair et al. 2012). Für ZIP4 wird vermutet, dass es als Zink-Transporter fungiert. Erste Hinweise darauf lieferte zum einen die erhöhte Expression von *ZIP4* unter Zink-Mangel und zum anderen die Komplementation der *Saccharomyces cerevisiae* Mutante *zrt1zrt2*. Diese weist einen erhöhten Zinkbedarf auf und konnte mittels *ZIP4* komplementiert werden (Assunção et al. 2010). Für *ZIP9* aus Reis konnte gezeigt werden, dass es unter Zinkmangel induziert wird. Es ist an der Exodermis und Endodermis der Wurzel lokalisiert. Pflanzen, die einen Funktionsverlust von OsZIP9 aufweisen, zeigen verringerte Zink-Konzentrationen in der Wurzel und im Spross. Auch die Zink-Aufnahmerate war in diesen Pflanzen verringert. Somit wird vermutet, dass OsZIP9 ein Influx-Transporter für Zink ist und zur Zink-Aufnahme unter Zink-Mangel beiträgt (Huang et al. 2020). Für OsZIP1 wird vermutet, dass es ein Transporter ist, welcher für die Detoxifizierung von erhöhten Zink-, Kupfer- und Cadmium-Konzentrationen benötigt wird. Es konnte gezeigt werden, dass OsZIP1 in der Wurzel im Endoplasmatischen Reticulum (ER) und in der Plasmamembran lokalisiert ist. Überexpressionslinien akkumulieren unter erhöhten Metallkonzentrationen geringere Mengen dieser Metalle, wohingegen die *oszip1*-Mutante und RNAi-Linien vermehrt Metalle aufnehmen (Liu et al. 2019).

Wurde Zink aufgenommen, muss eine unkontrollierte Interaktion mit anderen Proteinen verhindert werden. Dazu dienen Metall-Liganden, deren Aufgabe unter anderem die intrazelluläre Pufferung und die Gewährleistung des Langstreckentransports von Metallen ist (Clemens et al. 2019). Zu diesen hoch affinen Metall-Chelatoren zählt zum Beispiel Nicotianamin (NA). Neben der Beteiligung an der Eisen- und Kupfer-Homöostase ist NA auch für die Zink-Verteilung innerhalb der Pflanze wichtig. Dabei gewährleistet NA den Transport von Zink von Zelle zu Zelle und die Mobilität im Phloem (Sinclair et al. 2012). NA wird durch Nicotianamine-Synthase (NAS) gebildet (Curie et al. 2009). Die NA-Konzentration korreliert dabei mit der NAS-Transkriptmenge. Diese wird wiederum unter Eisen- und Zink-Defizienz sowie kontinuierlich in Zink hyperakkumulierenden Pflanzen, wie *A. halleri*, hoch reguliert (Haydon et al. 2012; Weber et al. 2004). Auch Phytochelatine (PCs) tragen zur Detoxifizierung von Zink bei. PCs sind von Glutathion abgeleitete metallbindende Proteine und werden durch die PC-Synthase (PCS) gebildet (Clemens et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die PC-Bildung zur Zink-Toleranz beiträgt und zu einer erhöhten Akkumulation von Zink führt (Tennstedt et al. 2009).

Anschließend muss Zink in der Pflanze verteilt werden. Dabei helfen Heavy Metal ATPases (HMAs) und Metal Tolerance Protein2 (MTP2). Sinkt die Zink-Konzentration im Spross, steigt die Transkriptionsrate von *MTP2* und *HMA2*. MTP2 und HMA2 tragen dann zur Translokation von Zink zwischen Wurzel und Spross bei. Dabei transportiert HMA2 Zink in das Wurzel-Xylem, wo es anschließend in den Spross geleitet wird. Für MTP2 wird vermutet, dass es die nach innen gerichtete Bewegung von Zink von der Epidermis zum Xylem erleichtert (Sinclair et al. 2018). Zink wird aber

nicht nur von der Wurzel in den Spross transportiert. So sind die Exporter HMA2 und HMA4 im Gefäßgewebe der Wurzeln, Stängel und Blätter zu finden. Zum einen sind sie in der Plasmamembran der Xylemparenchymzellen lokalisiert und können Zn^{2+} aus den angrenzenden Wurzelzellen in das Xylem pumpen. Damit kann Zink von den Wurzeln in den Spross transportiert werden. Zum anderen befinden sie sich aber auch im Phloem-Gewebe. Dies deutet darauf hin das Zink auch vom Spross zur Wurzel remobilisiert werden kann (Hussain et al. 2004).

Ist Zink in der Pflanze verteilt, muss dafür Sorge getragen werden, dass die Konzentrationen nicht zu hoch werden, um toxische Effekten auszulösen. Dazu muss Zink sequestriert werden. MTPs (metal tolerance proteins) und ZIF1 (zinc-induced facilitator 1) dienen dieser Speicherung und somit der Detoxifizierung von Zink. MTP1 und MTP3 befinden sich in der vakuolären Membran und transportieren Zink in die Vakuole (Arrivault et al. 2006; Desbrosses-Fonrouge et al. 2005; Kobae et al. 2004). Zinc Induced Facilitator 1 (ZIF1) ist in der gesamten Pflanze zu finden und ebenfalls in der vakuolären Membran lokalisiert. Es transportiert NA in die Vakuole. In *ZIF1* Überexpressionslinien konnte beobachtet werden, dass es zur Akkumulation von NA kommt, gefolgt von einer stark erhöhten Anreicherung von Zink in der Vakuole (Haydon et al. 2012).

Der Verlust einer dieser Funktionen führt unter Zink-Überschuss zu einer Zink-Hypersensitivität, welche z.B. durch eine Reduktion des Wurzelwachstums sichtbar gemacht werden kann. Eine Veränderung in der Zink-Toleranz zeigt demnach häufig eine Veränderung der Zink-Homöostase an. Da eine Veränderung in der Zink-Toleranz leichter zu messen ist, zum Beispiel durch einfache Plattenassays, sollten im folgenden Pflanzen untersucht werden, die eine Hypersensitivität gegenüber Zink zeigen. Dadurch kann über die Untersuchung der Zink-Toleranz die Zink-Homöostase weiter aufgeklärt werden.

Um solche Pflanzen zu generieren, wurden im Vorfeld *Arabidopsis thaliana* Col-0 Samen mit Ethylmethansulfonat (EMS) mutagenisiert, und auf Zink-Hypersensitivität selektiert. Dadurch konnten mehrere Zink-hypersensitive *overly zinc sensitive* (*ozs*) Mutanten identifiziert werden (Weber et al. 2013). In der nachfolgenden Arbeit werden drei dieser Mutanten (*ozs1*, *ozs3*, *ozs11*) näher untersucht.

1.4 *ozs11*

1.4.1 Vorarbeit (Masterarbeit)

Im Rahmen der eigenen Masterarbeit konnte die Mutation von *ozs11* als Punktmutation in *ACD5* (*accelerated cell death 5*) (*At5g51290*) lokalisiert werden. Da es bereits eine beschriebene *acd5*-Mutante gibt (Greenberg et al. 2000), wurde *ozs11* auch als *acd5-2* bezeichnet. In *acd5-2* liegt eine Mutation der DNA von Leucin zu Phenylalanin im achten Exon (L324F) vor. Die Mutation ist rezessiv

für die Ausprägung des Phänotyps verantwortlich. Der Einfluss anderer abiotischer Stressfaktoren auf *acd5-2* wurde ebenfalls untersucht. Dabei wurden weitere Schwermetalle (Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} und Mn^{2+}) getestet. Zudem wurde die Reaktion auf osmotischen Stress (Mannitol), Salzstress (NaCl) und Kälte (4°C) überprüft. Während sich bei den Schwermetallen und unter Salzstress kein Unterschied im Wurzelwachstum im Vergleich zu Col-0 beobachten ließ, zeigten Mannitol und Kälte einen Effekt bei *acd5-2*. Unter osmotischem Stress zeigt *acd5-2* ein leicht erhöhtes Wurzelwachstum, wohingegen Kälte zu einer Reduktion des Wurzelwachstums führte.

Zudem wurde die Metallverteilung in adulten Pflanzen mittels ICP-OES untersucht. Hierzu wurden die Pflanzen im hydroponischen System kultiviert. Anschließend wurde die Metallverteilung für Wurzel und Spross getrennt untersucht. Hierbei konnte kein Unterschied in der Verteilung zwischen *acd5-2* und Col-0 gefunden werden.

1.4.2 Ceramide und Ceramid-Kinase

Wie bereits erwähnt, codiert *ACD5* für eine Ceramid-Kinase (CerK). Das heißt es phosphoryliert Ceramide (Abb. 2A). Ceramide sind Lipide des Sphingolipid-Stoffwechsels. Betrachtet man die Lipide der Plasma-Membran, kann man erkennen, dass etwa 40 % dieser Lipide Sphingolipide sind (Chen et al. 2009). In Säugetieren konnte gezeigt werden, dass sie als Signal-Moleküle dienen und so zum Beispiel die Apoptose, Zellproliferation oder Seneszenz regulieren (Hannun et al. 2000; Hannun et al. 2008). In Pflanzen konnte beobachtet werden, dass sie eine wichtige Rolle für das Wachstum, die Entwicklung und auch die Antwort auf Stress spielen (Huby et al. 2020; Ali et al. 2018; Berkey et al. 2012; Pata et al. 2010). Sphingolipide sind ebenfalls an der Pathogenabwehr und dem programmierten Zelltod beteiligt (Abbas et al. 1994; Asai et al. 2000; Liang et al. 2003).

Durch die CerK wird Ceramid (Cer) zu Ceramid-1-Phosphat (Cer1P) phosphoryliert (Abb. 2A). Cer1P kann wiederum durch die Ceramid-Phosphatase zu Ceramid dephosphoryliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese dynamische Balance zwischen Cer und Cer1P wichtig für die Regulation des programmierten Zelltodes ist (Liang et al. 2003). Betrachtet man die Expression des für die CerK codierenden *ACD5*-Gens, kann man sehen, dass die Expression im Laufe der Entwicklung immer weiter zunimmt. Lokalisiert ist die CerK hauptsächlich im ER und dem Golgi-Apparat, aber auch in den Mitochondrien (Bi et al. 2014). Möglicherweise kann die CerK zwischen diesen Kompartimenten transloziert werden und so unter unterschiedlichen Stress-Bedingungen zur Signal-Weiterleitung dienen. In tierischen Zellen konnte eine solche Translokation bereits gezeigt werden und auch dass die CerK Signal-Funktion übernimmt (Arana et al. 2010; van Overloop et al. 2006; Rovina et al. 2009).

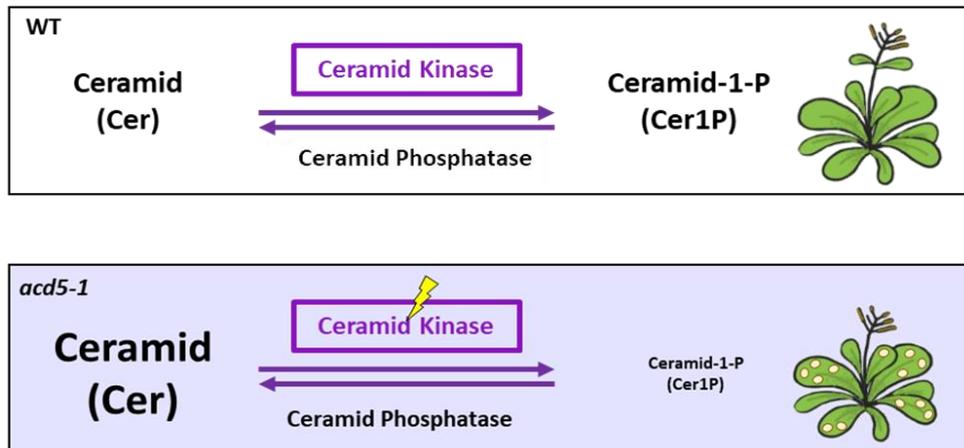


Abb. 2: Das Gleichgewicht zwischen Ceramid und Ceramid-1-Phosphat ist entscheidend. Ceramid-Kinase ist verantwortlich für die Phosphorylierung von Cer. Als Antagonist dephosphoryliert die Ceramid-Phosphatase Cer1P zu Cer. Das Gleichgewicht zwischen Cer und Cer1P reguliert den programmierten Zelltod. **(A)** Gezeigt ist das Gleichgewicht in einer WT-Pflanze. Hier liegen Cer und Cer1P in äquivalenten Mengen vor. **(B)** In der *acd5-1* Mutante ist die Ceramid-Kinase-Aktivität stark vermindert, wodurch es zur Akkumulation von Ceramiden kommt, was die Bildung von Läsionen verursacht.

1.4.3 *acd5-1*

Die *acd5-1* Mutante weist nun eine Mutation in der CerK auf. Es handelt sich dabei um eine Punktmutation im zehnten Exon, welche zu einem Aminosäure-Austausch von Glycin zu Arginin (G412R) führt (Greenberg et al. 2000). Ist die CerK in ihrer Funktion beeinträchtigt, kommt es zur Akkumulation von Cer (Abb. 2B). Die *acd5-1*-Mutante zeigt eine zehnfach geringere CerK-Aktivität als der WT, einhergehend mit einer vierfach höheren Konzentration an Ceramiden (Bi et al. 2014). Die daraus resultierende Verschiebung des Gleichgewichtes führt dazu, dass sich in diesen Pflanzen nach etwa fünf Wochen Läsionen ausbilden. Es kommt also zum programmierten Zelltod. Cer und Cer1P wirken dabei als Antagonisten. Eine erhöhte Cer1P-Konzentration kann den Zelltod teilweise blockieren (Liang et al. 2003). Auf dem Phänotyp der verfrühten Bildung von Läsionen gründet sich auch der Name der Mutante *acd5* (*accelerated cell death 5*), also verfrühter Zelltod. Pflanzen mit Läsionen weisen zudem eine erhöhte Salicylsäure-(SA)-Konzentration auf und bilden vermehrt Ethylen. Auch das Transkriptlevel des *Pathogenesis Related Gene 1* (*PR1*) ist erhöht. Die erhöhte SA-Menge führt dazu, dass adulte Pflanzen kleiner sind als WT-Pflanzen und eine reduzierte Fitness aufweisen. Mittels *acd5-1* x *nahG*-Doppelmutanten wurde untersucht, ob auch der Zelltod-Phänotyp SA-abhängig ist. *nahG*-Mutanten überexprimieren eine SA-Hydroxylase, welche SA abbaut. In *acd5-1* x *nahG*-Doppelmutanten wird die Akkumulation von SA also durch die vermehrte Bildung von SA-Hydroxylase unterdrückt. Da diese Doppelmutanten keine Bildung von Läsionen mehr zeigten, kann also gesagt werden, dass der Zelltod-Phänotyp von SA abhängig ist. *acd5-1*-Mutanten zeigen zudem eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber den Pathogenen *Pseudomonas syringae* und *Botrytis cinerea* (Greenberg et al. 2000; van Baarlen et al. 2004).

1.5 *ozs3*

1.5.1 CUL4-E3-Ligase-Komplex

Eine weitere *ozs*-Mutante, die identifiziert wurde, ist *ozs3* (Weber et al. 2013). Hier liegt eine Mutation in *At2g20330* vor. Dieses Gen codiert für ein DWD-(DDB1 binding WD40)-Protein. Es konnte gezeigt werden, dass Proteine mit DWD-Domänen mit dem Cullin-Typ CUL4 interagieren (Biedermann et al. 2011). Cullin ist Bestandteil eines Cullin-RING-Ubiquitin-Ligase-Komplexes (CRLs). Dabei befinden sich am N-Terminus von Cullin Proteine, die an der Substratbindung beteiligt sind, und am C-Terminus das RING-Finger Protein RBX1 (Regulator of Cullins 1) (Abb. 3). CRLs stellen die größte Gruppe an E3-Ligasen dar. In *A. thaliana* gibt es mehr als 800 verschiedene Proteine, die mit diesem E3-Komplex interagieren. Insgesamt gibt es mehr als 1500 verschiedene E3-Ligasen (Hua et al. 2011). E3-Ligasen sind an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt, darunter auch an der Antwort von Pflanzen auf abiotischen Stress (Chen et al. 2013). Sie markieren Zielproteine durch Anlagerung von Ubiquitin für den Abbau mittels Proteasomen.

Bei der Interaktion zwischen CUL4 und der DWD-Domäne kommt es jedoch nicht zum direkten Kontakt zwischen den beiden Proteinen. Die Interaktion kommt durch DDB1 (Damaged DNA Binding 1) zustande, welches als Adapter für die beiden Proteine dient (Lee et al. 2007). Hierin begründet sich auch der alternative Name für DWD Proteine, DCAF, was für „DDB1-CUL4 ASSOCIATED FACTOR“ steht. In *A. thaliana* gibt es DDB1a und DDB1b (Bernhardt et al. 2010). DWD Proteine besitzen eine für sie charakteristische DWD-Box. Dies ist eine konservierte 16 - 17 Aminosäuren lange Sequenz, die mit einem Aspartat-Arginin-Motiv (WDxR) endet (Biedermann et al. 2011). Dieses Motiv ist entscheidend für die Interaktion mit DDB1 (Angers et al. 2006; He et al. 2006).

Aber auch bei der Antwort auf Metall-Stress konnte eine Beteiligung der Interaktion zwischen DWD und CUL4-E3-Ligase-Komplexen nachgewiesen werden. *alt2*- (*Aluminum Tolerant 2*) Mutanten haben einen Funktionsverlust in dem TANMEI-Protein, welches eine DWD-Domäne besitzt. Die Mutanten zeigen im Vergleich zum WT eine erhöhte Aluminiumtoleranz (Nezames et al. 2012).

Dass Interaktionen zwischen DWD-Proteinen und CUL4-E3-Ligasen-Komplexen unter abiotischem Stress regulatorische Funktionen übernehmen, konnte bereits gezeigt werden. DWA1 und DWA2 (DWD Hypersensitive to ABA) sind DWD-Proteine und interagieren mit CUL4-basierenden E3-Ligasen. Da Abscisinsäure (ABA) wichtig für die Antwort auf Trocken- und Salz-Stress ist (Seki et al. 2002), führen Mutationen in diesen Genen zu ABA- und Salz-Hypersensitivität (Lee et al. 2010).

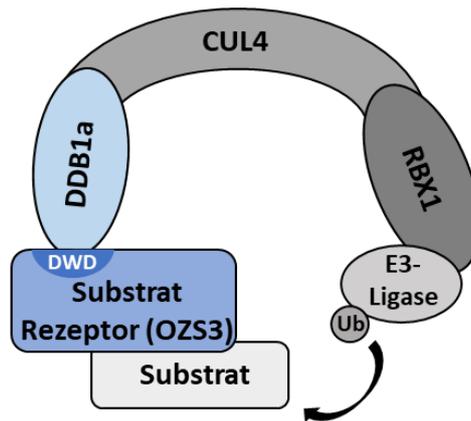


Abb. 3: Schematische Darstellung des CUL4-E3 Ligasen Komplexes. OZS3 agiert dabei höchstwahrscheinlich als Substratrezeptor. DDB1a interagiert über die DWD-Domäne mit OZS3 und stellt damit die Verbindung zu CUL4 her und dadurch zu RBX1 und einer E3-Ligase. Diese kann dann das Substrat ubiquitinieren und somit für den proteasomalen Abbau markieren.

1.5.2 OZS3 als potentieller Substratrezeptor

OZS3 enthält ebenfalls eine DWD-Domäne. Die Mutation in *ozs3*, die zur Zink-Hypersensitivität führt, ist eine Punktmutation in der WD40-Domäne. WD40-Domänen enthalten Wiederholungen von 40 Aminosäuren langen Motiven, welche mit einem Tryptophan-Asparaginsäure-(WD)-Dipeptid enden. Die Punktmutation verursacht einen Aminosäure-Austausch von Threonin zu Isoleucin (T377I). Bei *ozs3* zeigt sich bereits unter Kontroll-Bedingungen eine Reduktion des Wurzelwachstums im Vergleich zu Col-0. Gegenüber anderen Schwermetallen konnte keine Hypersensitivität festgestellt werden. Der Effekt von Salz, osmotischem und oxidativem Stress wurde ebenfalls getestet. Während Salz auf *ozs3* im Vergleich zu Col-0 keinen Einfluss auf das Wurzelwachstum aufweist, führen die anderen beiden Stressapplikationen zu einer weniger starken Reduktion des Wurzelwachstums im Vergleich zu Col-0. Ist der Effekt hier zwar sichtbar, aber nicht sehr stark ausgeprägt, zeigt eine Kältebehandlung (4°C) eine massive Reduktion des Wurzelwachstums. Bei 4°C können die Samen zwar noch keimen, aber nicht mehr wachsen. Werden gekeimte Samen von Raumtemperatur (RT) auf 4°C umgestellt, wird das Wachstum sofort eingestellt, wobei die Pflanzen jedoch nicht sterben (Chichaibelu 2013). Betrachtet man *ozs3* unter Kontroll-Bedingungen im Vergleich zu Col-0, kann man sehen, dass bei *ozs3* das Wachstum der Primärwurzel reduziert ist. Dagegen ist die Dichte an lateralen Wurzeln erhöht. Zudem blühen *ozs3*-Mutanten eher als Col-0 und zeigen kürzere Petiolen (Chichaibelu 2013).

Da OZS3 eine DWD-Domäne hat, wurde vermutet, dass es ein Bestandteil des CUL4-E3-Ligase-Komplexes ist und in diesem als Substratrezeptor fungiert. Zunächst wurde festgestellt, dass OZS3 im Nukleus und DDB1a im Cytosol und ebenfalls im Nukleus lokalisiert sind. Die Interaktion zwischen OZS3 und DDB1a konnte bereits durch Hefe-2-Hybrid-(Y2H)-Ansatz und Bimolekulare-Fluoreszenz-Komplementation (BiFC) nachgewiesen werden (Weber et al. 2020).

1.6 *ozs1*

1.6.1 Mutation in *MTP1* als Ursache der Zink-Hypersensitivität

In *ozs1* kommt es zu einem Funktionsverlust von *MTP1* ausgelöst durch eine Punktmutation, die zu einem Aminosäureaustausch von Aspartat zu Asparagin (D293N) führt. Durch Komplementation von *ozs1* mit *MTP1* konnte gezeigt werden, dass diese Mutation für den Zink-hypersensitiven Phänotyp verantwortlich ist. Zudem ist die Mutation rezessiv und es ist nur ein Locus für die Ausprägung des Phänotyps verantwortlich (Weber et al. 2013). *MTP1* ist in der Membran von Vakuolen lokalisiert. Dort kann es Zink in die Vakuole transportieren (Abb. 4A). Dadurch können Schäden durch zu hohe Zink-Konzentrationen in der Pflanze vermieden werden. Durch den Funktionsverlust in *ozs1* zeigen sich unter Zink-Überschuss vermehrt toxische Effekte (Abb. 4B) (Kobae et al. 2004).

1.6.2 Suche nach Suppressor-Linien

Um weitere wichtige Komponenten des Zink-Homöostase-Netzwerkes aufzudecken, wurde *ozs1* mittels EMS mutagenisiert. Anschließend wird ein Suppressor-Screen durchgeführt. Es wird also nach Pflanzen gesucht, die unter erhöhter Zink-Zufuhr ein besseres Wurzelwachstum als *ozs1* zeigen.

Dieser Ansatz zeigte schon in anderen Bereichen Erfolge. Es wurden neue Mechanismen der Antwort auf Salzstress aufgezeigt. Eine salzsensitive Mutante *sos3-1* (*salt overly sensitive3-1*), die eine stark erhöhte Anthozyan-Bildung zeigt, wurde mutagenisiert. Anschließend konnte eine Mutante *air1* (*anthocyanin-impaired-response-1*) selektiert werden, die eine geringere Anthozyan-Konzentration aufweist als *sos3-1*. Die verminderte Anthozyan-Bildung ist spezifisch bei Salz-Stress zu beobachten und tritt nicht bei zum Beispiel hohen Temperaturen, Starklicht oder Trockenheit auf. Somit kann gesagt werden, dass nicht die Anthozyan-Biosynthese gestört ist, sondern ein Defekt in der Regulation der Salz-Stress-Antwort vorliegt. *air1*-Mutanten zeigen damit eine höhere Überlebensrate unter oxidativem Stress als Col-0 (van Oosten et al. 2013).

Auch bei der Aufklärung von Metall-Homöostasen zeigten Suppressor-Screens neue Mechanismen und Bestandteile auf. So konnten mit Hilfe von Suppressor-Mutanten neue Bestandteile der Al-Toleranz aufgedeckt werden. *Aluminum Sensitive 3* (*ALS3*) ist für die Translokation von Aluminium aus den Wurzeln in Gewebe verantwortlich, welche weniger sensitiv für Al^{2+} sind. Die Al-sensitive Mutante (*als3-1*) wurde mittels EMS mutagenisiert. Anschließend wurde nach Mutanten gesucht, welche eine erhöhte Al-Resistenz gegenüber *als3-1* aufwiesen. Dadurch konnte herausgefunden werden, dass *ATR* (*ataxia telangiectasia-mutated and Rad3-related*), welches für die Antwort auf DNA-Schäden verantwortlich ist, wichtig für die Al-Toleranz ist (Gabrielson et al. 2006; Rounds et al. 2008).

1.6.3 Mögliche Ursachen für eine erhöhte Zink-Toleranz in *ozs1*-Suppressor-Mutanten

Mit Hilfe von *ozs1*-Suppressor-Mutanten könnten neue Mechanismen der Zink-Homöostase aufgedeckt werden. Eine erhöhte Zink-Toleranz in EMS-mutagenisierten *ozs1*-Pflanzen kann theoretisch mehrere Ursachen haben. Die einfachste Erklärung wäre, dass es eine generelle Veränderung im Wachstum von Suppressor-Mutanten gibt. Dies würde bedeuten, dass die Mutanten sowohl unter Zink-Stress als auch unter Kontroll-Bedingungen besser wachsen würden.

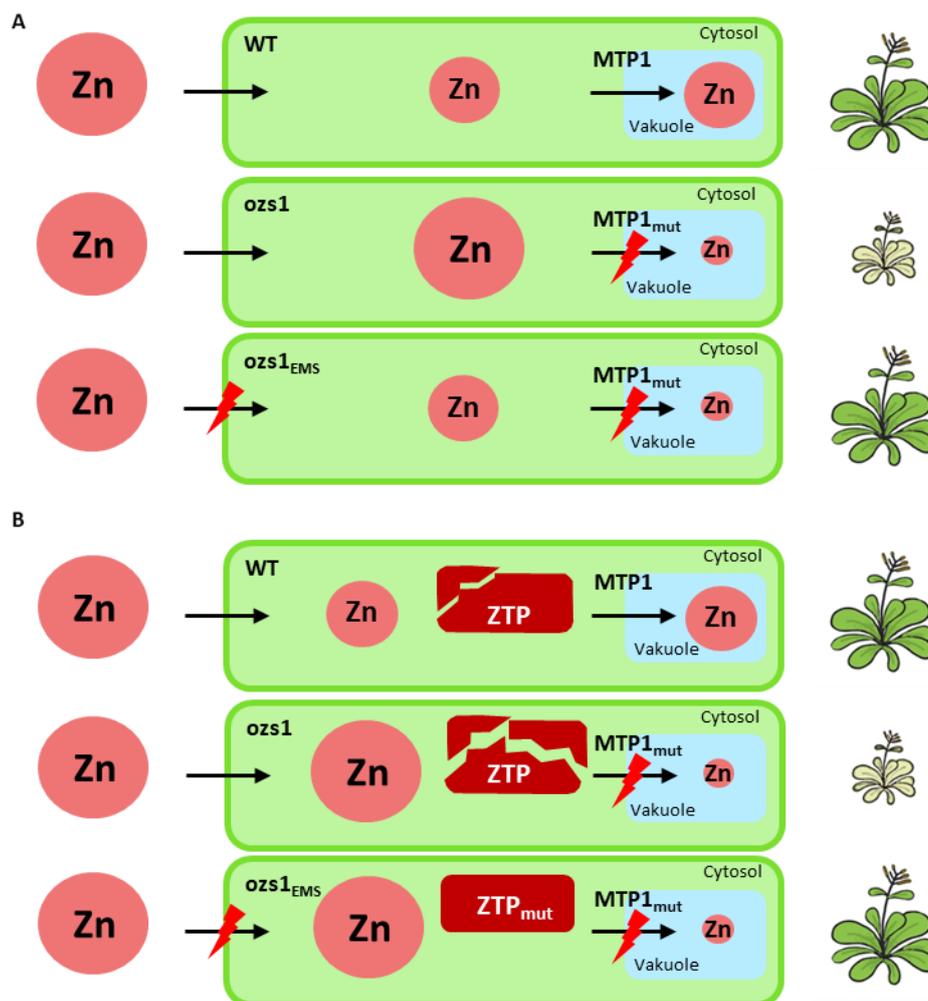


Abb. 4: Mögliche Mechanismen zur erhöhten Zink-Toleranz in *ozs1*. Gezeigt sind zwei mögliche Mechanismen, die in *ozs1* zu einer Reduktion der Zink-Hypersensitivität führen könnten. **(A)** Ist ein Transporter mutiert, welcher für die Aufnahme von Zink mit verantwortlich ist, wird weniger Zink aufgenommen. Dadurch ist die Zink-Konzentration in der Pflanze geringer und die toxischen Auswirkungen, welche durch den Funktionsverlust von MTP1 ausgelöst werden, sind verringert. **(B)** Eine weitere Möglichkeit wäre eine Stabilisierung von Proteinen, welche zur Zink-Toleranz beitragen. Sollten erhöhte Zink-Konzentrationen dazu führen, dass solche Proteine abgebaut werden, würde ihre Stabilisierung zur Toleranz beitragen.

Eine andere Möglichkeit wäre eine Mutation in einem Transporter für die Zink-Aufnahme. In *A. thaliana* konnte noch immer nicht sicher der Zink-Aufnahmetransporter identifiziert werden. Käme es zum Funktionsverlust eines solchen Transporters, würde weniger Zink in die Pflanzenzellen gelangen und der Effekt des Funktionsverlustes von MTP1 abgeschwächt. Zwar kann Zink noch immer nicht zur Entgiftung in die Vakuole gepumpt werden. Dies ist aber auch nicht mehr von so großer Bedeutung, wenn bereits weniger Zink, ausgelöst durch einen defekten Aufnahme-Transporter, in die Zelle gelangt (Abb. 4A).

Eine weitere mögliche Erklärung für eine gesteigerte Zink-Toleranz wäre die Stabilisierung von Proteinen, die dabei helfen, den toxischen Effekten von Zink entgegenzuwirken. Eventuell führt ein Zink-Überschuss in der Pflanze dazu, dass Proteine abgebaut werden, welche für die Fitness wichtig sind. Eine Mutation solcher Proteine könnte nun zum Beispiel ihre Stabilität erhöhen, wodurch sie auch bei erhöhten Zink-Konzentrationen nicht degradiert würden. Somit könnte auch eine erhöhte Proteinstabilität zur Zink-Toleranz beitragen (Abb. 4B).

Es könnte aber auch die Reduktion des Wachstums unter Stress gestört sein. Es konnte gezeigt werden, dass die durch DELLA-Proteine vermittelte Reduktion des Wachstums wichtig ist für die Stress-Toleranz. Durch die Reduktion des Wachstums wird die Überlebensrate unter Stress erhöht (Achard et al. 2008). Dass ein Funktionsverlust von DELLA-Proteinen ein unter Stress verbessertes Wachstum zeigt, konnte bereits beobachtet werden. So wies eine DELLA-Quadrupelmutante unter Salz-Stress ein besseres Wachstum als der WT auf (Achard et al. 2006).

1.1.1 Bestimmung der Mutation in Suppressor-Mutanten mittels QTL-Seq

Eine Herausforderung des Suppressor-Screens wird sein, die Mutation zu finden, welche für die erhöhte Zink-Toleranz der Suppressor-Mutanten verantwortlich ist. Vermutlich wird es in *Suppressor of ozs1 1(suo)* nicht zu einer kompletten Aufhebung der Hypersensitivität kommen, da der MTP1-Effekt sehr stark ist. Das mutierte Gen in *suo1* soll mittels QTL-Seq-Methode (Abb. 5) gefunden werden. Zu Beginn werden zwei Kultivare gekreuzt, welche sich in dem Phänotyp von Interesse unterscheiden. Für *suo1* wäre es das Wurzelwachstum unter Zink-Stress. Da die Mutation hier an *ozs1* vorgenommen wurde, werden gefundene Suppressor-Mutanten mit dieser gekreuzt. Die F2-Generation wird dann entsprechend ihrem Phänotyp in zwei Pools aufgeteilt (Abb. 5A).

Danach wird die DNA der Pools resequenziert. Die beiden DNA-Pools sollten Teile des Genoms von beiden Eltern besitzen. Die Verteilung sollte dabei bei etwa 1:1 liegen. Anders in den Regionen, in denen die gesuchte Mutation liegt, welche für den Phänotyp verantwortlich ist. Da dieser Phänotyp nur von einem Elter ausgeht, sollten sich an dieser Stelle die Genome von diesem Elter häufen. Um diese Häufung sichtbar zu machen, wird ein SNP-Index berechnet (Abb. 5B). Liegt der Wert bei etwa

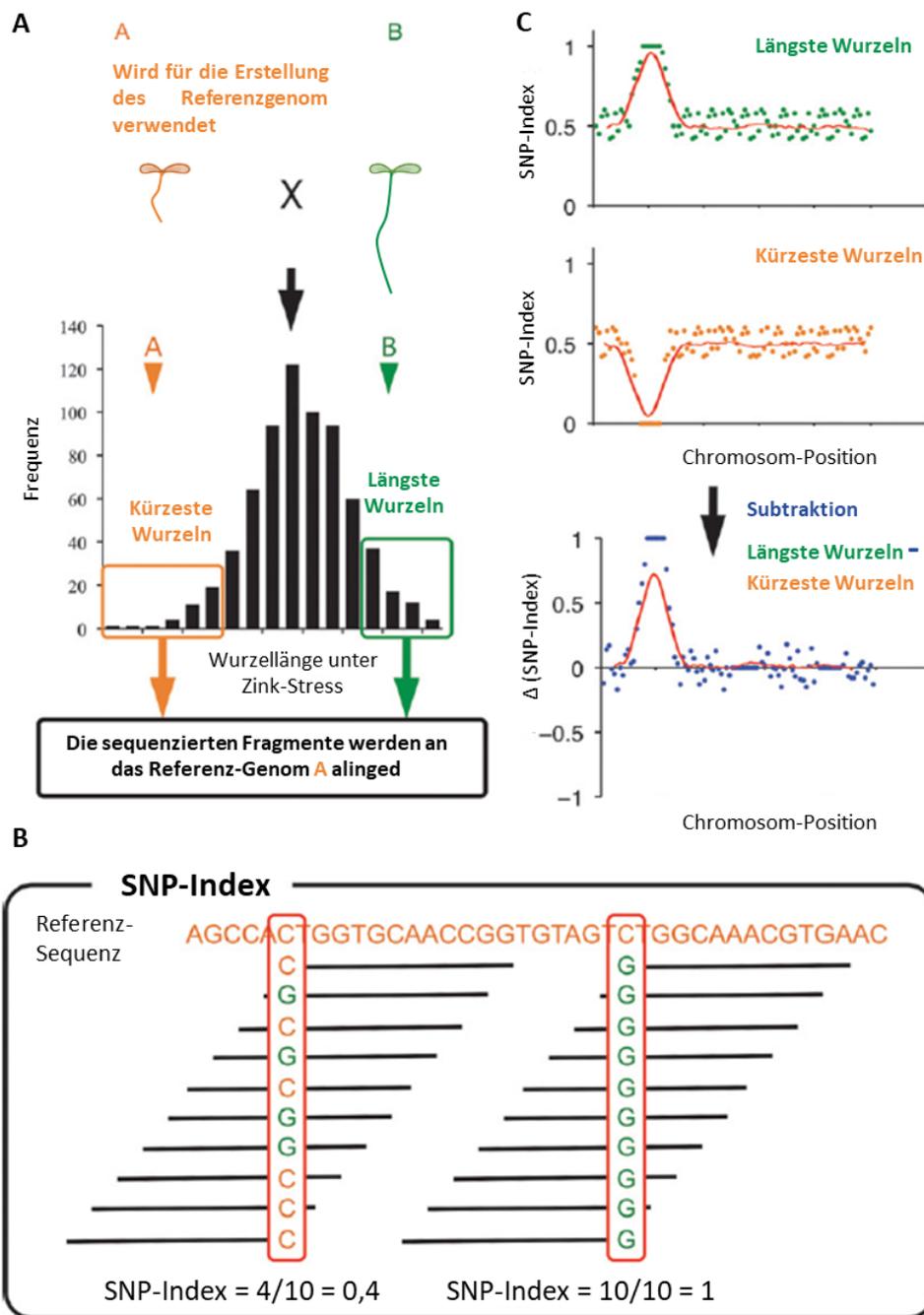


Abb. 5: Schematische Darstellung der QTL-Seq-Methode. Dargestellt ist die Theorie hinter der Identifizierung von Mutationen mittels QTL-seq. **(A)** Zwei Kultivare mit Unterschied in ihrer Zink-Toleranz (Wurzellänge) werden miteinander gekreuzt. Die F2-Generation wird in zwei Pools aufgeteilt. Pool A beinhaltet Pflanzen, die unter Zink-Stress kein gesteigertes Wurzelwachstum zu dem Elter A zeigen. Pool B beinhaltet Pflanzen, die unter Zink-Stress ein gesteigertes Wurzelwachstum zu dem Elter A zeigen. Die DNA dieser Pools wurde isoliert, sequenziert und an das Referenz-Genom von A aligned. **(B)** Erstellung des SNP-Indexes. Dazu wurde ermittelt, wie viele Sequenzen einen Genomabschnitt abdecken. Danach werden die SNPs an dieser Stelle gezählt und durch die Gesamtanzahl geteilt. Daraus ergibt sich der SNP-Index. **(C)** Beispielhafte Darstellung der SNP-Index-Werte eines Genomabschnittes. Der oberste Graf zeigt die Werte des Pools mit den längsten Wurzellängen. Der Graf darunter die Werte des Pools mit den kürzesten Wurzellängen. Der unterste Graf zeigt die Differenz Δ (SNP-Index) der beiden oberen SNP-Index-Werte. Jeder Punkt steht für einen SNP. Die X-Achse gibt die Position auf dem Chromosom an. Abbildung verändert nach (Takagi et al. 2013).

0,5 liegen die Genome beider Eltern zu gleichen Teilen vor. Nähert sich der Wert 0 oder 1 an, kann davon ausgegangen werden, dass hier die gesuchte Mutation zu finden ist. Im hier durchgeführten Screen diente *ozs1* als Referenzgenom. Der Pool, welcher kein verbessertes Wurzelwachstum unter Zink zeigt, sollte an der Stelle des verantwortlichen QTLs einen Wert von etwa 0 aufweisen. Der Pool mit verbessertem Wurzelwachstum hingegen sollte einen Wert von etwa 1 zeigen.

Als letztes werden die SNP-Index-Werte der beiden Pools untereinander verglichen. Es kann sein, dass auch andere Faktoren als die Selektion auf den Phänotyp zu einer Verzerrung der SNP-Index-Werte führen. Ein Meiotic Drive kann zum Beispiel eine solche Verzerrung hervorrufen (Takagi et al. 2013). Dabei zeigen jedoch beide Pools einen Ausschlag der SNP-Indexwerte in die gleiche Richtung. Aus diesem Grund werden die Index-Werte der beiden Pools voneinander subtrahiert, $\Delta(\text{SNP-Index})$. Liegt der resultierende Wert bei 0, zeigen beide Eltern den gleichen SNP-Index-Wert. Liegt er bei -1, kommt an dieser Stelle nur das Genom der Referenz-Pflanze vor. Bei einem Wert von 1 zeigen sich nur Sequenzen der Pflanze, auf dessen Phänotyp selektiert wurde, in diesem Beispiel also auf eine erhöhte Zink-Toleranz. Kann man im Genom also eine Stelle finden, die einen $\Delta(\text{SNP-Index})$ -Wert von etwa 1 zeigt, wurde das mutierte Gen gefunden (Takagi et al. 2013).

1.2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, weitere Bestandteile und Mechanismen der Zink-Homöostase aufzudecken. Dazu werden hier drei durch EMS-Mutagenese erzeugte Zink-hypersensitive *ozs*-Mutanten physiologisch charakterisiert und molekular analysiert.

1.2.1 *ozs11*

Die erste *ozs*-Mutante, die genauer betrachtet werden soll, ist *ozs11*, im Folgenden als *acd5-2* bezeichnet. Zunächst soll die *acd5-2* Mutante weiter charakterisiert werden. Um die Auswirkungen der Mutation auf die Zink-Toleranz zu klären, sollen dafür die Metallverteilungen in der Pflanze gemessen werden. Zudem sollen weitere *acd5* Allele untersucht werden. Dabei soll geprüft werden, ob diese Allele ebenfalls Zink-hypersensitiv sind. Auch die in *acd5-2* beobachtete Kälte-Sensitivität soll genauer betrachtet werden. Für *acd5-1* konnte unter Kälteeinwirkung bisher kein Unterschied im Wurzelwachstum zu Col-0 gezeigt werden (Dutilleul et al. 2015). Anders als in dem zuvor durchgeführten Experiment, bei dem der Effekt der Kälte-Sensitivität von *acd5-2* bei 4°C zu beobachten war, untersuchten Dutilleul et al. das Wurzelwachstum bei 12°C. Auch die Keimfähigkeit wurde dabei untersucht. Dabei zeigte sich bei *acd5-1* bei 12°C eine leicht verschlechterte Keimungsrate, welche bei 4°C noch weiter abnahm. Da sich 4°C stärker auf die Kälte-Sensitivität von *acd5-1* auswirken als 12°C, sollen sowohl das Wurzelwachstum wie auch die Keimfähigkeit der *acd5*-Allele unter 4°C untersucht werden. Ebenfalls überprüft werden soll, ob der beobachtete Phänotyp durch einen Eisen-Mangel oder durch eine Zink-Hypersensitivität ausgelöst wird. Es ist bekannt, dass Zink Eisen aus Eisen-bindenden Proteinen verdrängen kann (Arrivault et al. 2006). Dadurch kann in der Pflanze ein physiologischer Eisen-Mangel entstehen, der ebenfalls zu einer Reduktion des Wachstums führen könnte. Im Folgenden soll geklärt werden, was das verkürzte Wurzelwachstum verursacht. Dabei sollen nicht nur *acd5-2*, sondern auch weitere *ozs*-Mutanten getestet werden.

Im Anschluss soll die Ceramid-Kinase näher untersucht werden. Da in *acd5-1* die CerK-Aktivität reduziert ist (Bi et al. 2014), soll die Aktivität auch in *acd5-2* gemessen werden. Zudem soll überprüft werden, ob die Mutationen in *acd5-1* und *acd5-2* einen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins haben. Da in *acd5-1* gezeigt werden konnte, dass der Phänotyp des spontanen Zelltods auf einer Akkumulation von SA beruht (Greenberg et al. 2000), ist es zudem von Interesse herauszufinden, ob der Phänotyp der Zink-Hypersensitivität ebenfalls SA-abhängig ist. Dazu sollen Doppelmutanten mit *nahG* und *acd5-1* und *acd5-2* erzeugt und auf ihre Zink-Toleranz hin getestet werden.

Letztlich soll eine RNA-Seq-Analyse vorgenommen werden. Damit soll zum einen die allgemeine Veränderung des Transkriptoms unter Zink-Stress untersucht werden und zum anderen die Unterschiede in der Expression zwischen Col-0 und *acd5-2* herausgefunden werden.

1.2.2 *ozs3*

Bei *ozs3* wurde bereits viel Vorarbeit geleistet. Hierbei konnte mittels Y2H- und BiFC-Analyse gezeigt werden, dass OZS3 mit DDB1a interagiert. Um diese Ergebnisse weiter zu bekräftigen, soll die Interaktion mit Hilfe einer Co-Immunopräzipitation (CoIP) nachgewiesen werden. Was ebenfalls bereits beobachtet wurde, ist, dass es in den gängigen Samenbanken keine vollständigen KO-Allele gibt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei OZS3 um ein essentielles Gen handelt. Um dies zu überprüfen, sollen mittels CRISPR/Cas9 Nullmutanten generiert werden. Zudem soll die *ozs3*-Mutante weiter charakterisiert werden. Da ROS-Bildung eine bekannte Gefahr für Pflanzen unter Metall-Überschuss darstellt, soll deren Bildung untersucht werden.

1.2.3 *ozs1*

Um mittels Suppressor-Screens neue Mechanismen und Bestandteile der Zink-Homöostase aufdecken zu können, soll *ozs1* mit EMS mutagenisiert werden. Anschließend wird nach Mutanten mit einer verbesserten Zink-Toleranz gegenüber *ozs1* gesucht. Bei diesen Mutanten soll anschließend die Mutation mit Hilfe der QTL-Seq-Methode (siehe oben) identifiziert werden. Zusätzlich soll die Metall-Verteilung in adulten Pflanzen sowie in Keimlingen untersucht werden. Sollte wie bereits zuvor erwähnt, eventuell ein Zink-Aufnahme-Transporter in seiner Funktion beeinträchtigt sein, sollte sich eine Veränderung in der Zink-Konzentration in der Pflanze zeigen.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Roth, Merck, Duchefa, VWR, Thermo Fisher Scientific und Fisher Chemical bezogen.

2.2 Geräte

Wenn nicht anders angegeben, wurden folgende Geräte verwendet. Zentrifugationsschritte wurden mit Eppendorf-Zentrifugen (Centrifuge 5415 R, 5810 R) durchgeführt. Fotometrische Messungen wurden an einem Specord 200 Plus (Analytik Jena) durchgeführt. Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Leica MZ10F Mikroskop gemacht.

2.3 Medien

Alle Medien (Tab. 1) wurden vor der Verwendung sterilisiert. Falls Antibiotika (Tab. 2) benötigt wurden, wurden diese zugegeben, wenn das Medium auf etwa 40°C abgekühlt war. Metalle wurden bereits vor dem Autoklavieren zugegeben.

Tab. 1: Zusammensetzung der Nährmedien. Gezeigt sind die Zusammensetzungen der Nährmedien sowohl für die Verwendung in flüssiger Form als auch als Festmedium. Ebenfalls angegeben sind die zugehörigen Organismen.

| | | flüssig Medium | fest Medium | Organismus |
|-----------------|--------------------------|--|----------------|-----------------------|
| Hoagland-Medium | Platten/ 6-well Assay | 0,28 mM Ca(NO ₃) ₂ , 0,60 mM KNO ₃ , 0,20 mM MgSO ₄ , 0,1 mM (NH ₄)H ₂ PO ₄ , 5 µM Fe-HBED, 5 mM MES, 1 % (m/v) Saccharose, pH 5,7 | 1 % Agar Typ E | <i>A. thaliana</i> |
| | Hydroponisches System | 0,28 mM Ca(NO ₃) ₂ , 0,60 mM KNO ₃ , 0,20 mM MgSO ₄ , 0,1 mM (NH ₄)H ₂ PO ₄ , 5 µM Fe-HBED, 5 mM MES, 0,9125 µM MnCl ₂ , 0,077 µM ZnSO ₄ , 0,011 µM MO ₃ , 4,63 µM H ₃ BO ₃ , 0,032 µM CuSO ₄ , pH 5,7 | – | <i>A. thaliana</i> |
| | 1/2 MS | 2,2 g/l Murashige & Skoog Medium, 2,5 mM MES, 1 % (m/v) Saccharose, pH 5,7 | 1 % Plant Agar | <i>A. thaliana</i> |
| | LB | 25 g/l LB Broth High Salt | 1 % Plant Agar | <i>E. coli</i> |
| | YEPII | 10 g/l Pepton, 1 g/l Hefeextrakt, 0,2 mM MgSO ₄ , 0,5 % (m/v) Saccharose | 1 % Plant Agar | <i>A. tumefaciens</i> |

Tab. 2: Verwendete Antibiotika. Angegeben sind die verwendeten Antibiotika mit entsprechenden Konzentrationsangaben für den jeweiligen Organismus.

| Antibiotika | Konzentration |
|-----------------|---------------|
| Mikroorganismen | |
| Ampicillin | 100 µg/ml |
| Kanamycin | 50 µg/ml |
| Gentamycin | 25 µg/ml |
| Rifampicin | 50 µg/ml |
| Pflanzen | |
| Hygromycin | 20 µg/ml |
| Kanamycin | 50 µg/ml |
| Cefotaxim | 300 µg/ml |
| Basta | 25 µg/ml |

2.4 Stämme, Vektoren und Konstrukte

Tab. 3: Verwendete Vektoren. Angegeben sind maßgebliche Spezifikationen der Vektoren und die Herkunft.

Amp^r = Ampicillin Resistenz; Hyg^r = Hygromycin Resistenz; Basta^r = Basta Resistenz; Km^r = Kanamycin Resistenz; MCS = multiple cloning site; nos T = nos Terminator; N-ter = N-terminal; C-ter = C-terminal

| Vektor | Spezifikation | Herkunft |
|----------|---|--------------------------------|
| pGEM®-T | SP6- und T7-Promotor, f1 ori, <i>colE1</i> ori, <i>lacZ</i> , MCS, Amp ^r | Promega |
| pMDC32 | 2 x 35S Promotor, attR1, attR2, <i>ccdB</i> , nos T, Hyg ^r | (Curtis und Grossniklaus 2003) |
| pMDC43 | 2 x 35S Promotor, attR1, attR2, <i>ccdB</i> , nos T, Hyg ^r , N-ter GFP | |
| pMDC83 | 2 x 35S Promotor, attR1, attR2, <i>ccdB</i> , nos T, Hyg ^r , C-ter GFP | |
| pMDC123 | attR1, attR2, <i>ccdB</i> , Basta ^r | |
| pKSE401 | U6-26 Promotor, U6-26 Terminator, <i>zCas9</i> , Km ^r | (Xing et al. 2014) |
| CD3-959 | 2 x 35S Promotor, (nos) 3' polyA, ER marker, mCherry, Km ^r | (Nelson et al. 2007) |
| CD3-967 | 2 x 35S Promotor, (nos) 3' polyA, Golgi marker, mCherry, Km ^r | |
| CD3-991 | 2 x 35S Promotor, (nos) 3' polyA, Mitochondrien marker, mCherry, Km ^r | |
| pDONR221 | M13 forward und M13 reverse Stellen, <i>rrnB</i> T1 und T2 Terminator, <i>ccdB</i> , attP1, attP2, pUC ori, Km ^r | Thermo Fisher Scientific |

Tab. 4: Verwendete Stämme. Angegeben sind maßgebliche Spezifikationen der Stämme und die Herkunft. Gm^r = Gentamycin-Resistenz; Rif^r = Rifampicin-Resistenz

| Stamm | Spezifikation | Herkunft |
|------------------------------|---|--|
| <i>E. coli</i> | | |
| DH10β | F- <i>araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 Δ <i>lacX74 galU galK rpsL deoR</i> φ80Δ <i>lacZ</i> Δ <i>M15 endAI nupG recAI</i> <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr hsdRMS mcrBC</i>) | (Grant et al. 1990) |
| DB3.1 | <i>gyrA462</i> _{Arg→Cys} | Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany |
| <i>A. tumefaciens</i> | | |
| GV3101 | Gm ^r , Rif ^r | (Koncz und Schell 1986) |

Tab. 5: Verwendete Konstrukte. Angegeben sind die Konstrukte und die jeweiligen Hersteller.

| Konstrukt | Hersteller |
|--|--|
| Komplementation von <i>acd5-2</i> | |
| 35S:: <i>GFP:ACD5WT_pMDC43</i> 35S:: <i>ACD5WT:GFP_pMDC83</i> <i>ACD5_{Pro}::acdWT:GFP_pMDC123</i> | selbst hergestellt |
| Lokalisation von <i>ACD5</i> in Tabak; Ceramid-Kinase-Assay | |
| 35S:: <i>GFP:ACD5WT_pMDC43</i> 35S:: <i>GFP:acd5-1_pMDC43</i> 35S:: <i>GFP:acd5-2_pMDC43</i> | selbst hergestellt |
| Co-Immunopräzipitation | |
| 35S:: <i>sGFP_pMDC32</i> 288-WT_ <i>barII-UT-mT_n</i> 35S:: <i>3 x HA:DDB1a_pMDC32</i> | Dr. Shimpei Uraguchi Prof. Dr. Stephan Clemens Dr. Michael Weber |
| Herstellung von <i>ozs3</i> knockout Linien | |
| <i>OZS3_{ZS1}_pKSE</i> <i>OZS3_{ZS2}_pKSE</i> | selbst hergestellt |

2.5 Samensterilisation

2.5.1 Mittels Chlorgases

Die Samen wurden mittels Chlorgases sterilisiert. Dazu wurde die benötigte Menge an Samen zunächst in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß gefüllt. In die Kristallisierschale eines Exsikkators wurden 10 ml Natriumhypochlorid gegeben. Die Reaktionsgefäße mit den Samen wurden anschließend mit geöffnetem Deckel in den Exsikkator gestellt. Danach wurden 5 ml 37%ige

Salzsäure in die Kristallisierschale gegeben. Die Samen wurden 45 min im Chlorgas sterilisiert. Anschließend wurde mit einer Vakuum-Pumpe das Chlorgas abgepumpt.

2.5.2 Mittels Natriumhypochlorid

Die Samen wurden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben und es wurden 10 ml Ethanol (70 %) zugegeben. Die Samen schüttelten in einem Kipp-Roll-Schüttler für 10 min. Anschließend wurde das Ethanol entfernt und durch 10 ml NaOCl-Lösung (4 % (v/v) Natriumhypochlorid, 0,08 % Triton x-100) ersetzt. Es folgten erneut 10 min Schütteln. Danach wurde die NaOCl-Lösung durch 10 ml ddH₂O ersetzt und kurz geschüttelt. Das Wasser wurde erneut durch frisches ddH₂O ersetzt und geschüttelt. Insgesamt wurde dies 4-mal gemacht, wobei das letzte Mal 10 min geschüttelt wurde. Nachdem die 10 ml Wasser abgegossen waren, wurden erneut 5 ml ddH₂O zugegeben und die Samen darin bei 4 °C gelagert oder gleich ausgelegt.

2.6 Pflanzenanzucht

2.6.1 Anzucht auf Erde

Pasteurisierte Erde, bestehend aus Pikiererde, Blumenerde, Vermiculit (3:3:1) wurde in Pflanztöpfe gefüllt und zwei bis drei Körner Schädlingfrei CARGO® Combi-Granulat (Wirkstoff: 40g/kg Acetamiprid) wurden darauf gestreut. Anschließend wurde die Erde gut gewässert, die Samen (ca. 20) auf die Erde gestreut und noch einmal befeuchtet. Die gesäten Pflanzen wurden für zwei Tage bei 4°C stratifiziert. Danach wurden die Töpfe ins Licht gestellt. Zur schnellen Gewinnung von Pflanzenmaterial wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht bei 22°C und 8 Stunden Dunkelheit bei 17°C) angezogen. Zur Samengewinnung wurden die Pflanzen zunächst unter Kurztagbedingungen (8 Stunden Licht bei 22°C und 16 Stunden Dunkelheit bei 17°C) angezogen. Nach 2-3 Wochen wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen bis zur Samenreife weiter kultiviert.

2.6.2 Anzucht auf Hoagland-Platten

Sterilisierte Samen wurden auf Platten mit Hoagland-Medium mit oder ohne entsprechende Metalle ausgelegt. Die ausgelegten Plattenassays wurden mit Leucopor-Band verschlossen und zunächst zwei Tage bei 4°C stratifiziert. Danach wurden die Platten vertikal unter Langtagbedingungen 12 – 14 Tage inkubiert. Bei Transferexperimenten wurden die Pflanzen mit Hilfe einer Federstahlpinzette auf neue Platten transferiert. Wurde das Transkriptlevel der Pflanzen bestimmt, wuchsen diese nur 7 Tage. Wurde die Auswirkung von Kälte-Stress untersucht, wurden die Platten nach 4 Tagen auf 4°C ins Licht gestellt und nach 6 Wochen vermessen.

2.6.2.1 Transferexperimente

2.6.2.1.1 Eisen/Zink Transfer

Die Pflanzen wurden zunächst für 4 Tage entweder unter Kontrollbedingungen oder bei 100 μM Fe auf Hoagland-Platten angezogen. Anschließend wurden die Pflanzen beider Bedingungen auf 100 μM Zn umgesetzt und wuchsen weitere 8 – 10 Tage.

2.6.2.1.2 RNA-Seq Analyse

Die Pflanzen wurden zunächst für 5 Tage unter Kontrollbedingungen auf Hoagland-Platten angezogen. Anschließend wurden die Pflanzen für 24 h auf 100 μM Zn^{2+} umgesetzt und anschließend getrennt in Wurzel und Spross geerntet.

2.6.2.1.3 NBT-Färbung

Die Pflanzen wurden zunächst für 7 Tage unter Kontrollbedingungen auf Hoagland-Platten angezogen. Anschließend wurden die Pflanzen für 24 h auf 150 μM Zn^{2+} umgesetzt und anschließend gefärbt.

2.6.3 6-well Assay

Für die Anzucht von Pflanzen in 6-well Assays wurde zunächst 5 ml Hoagland-Medium in jedes well gefüllt. Dazu wurden je 6 Samen gegeben. Die Platten wurden mit Leukopor-Band verschlossen und 2 Tage bei 4°C stratifiziert. Danach wurden sie für 7 Tage auf einem Schüttler bei 100 rpm unter Langtag-Bedingungen wachsen gelassen. Wurde das Wurzelwachstum unter Zn^{2+} -Stress untersucht, wurden die Pflanzen im Anschluss sofort vermessen. Wurde Kurzzeitstress untersucht, wurde nach 7 Tagen das Medium abgenommen und durch neues Medium, angereichert mit 200 μM Zn^{2+} , ersetzt. Die Platten wurden erneut verschlossen und bis zur Ernte wieder unter Schütteln ins Licht gestellt.

2.6.4 ½ MS Platten

2.6.4.1 Selektion

½ MS-Platten dienen zur Selektion transformierter Samen. Mit Chlorgas sterilisierte Samen wurden auf die Platten mit entsprechenden Antibiotika ausgelegt und unter Langtag-Bedingungen für 7–9 Tage kultiviert.

2.6.4.2 Überprüfung der Keimfähigkeit von Samen

Um die Keimfähigkeit zu überprüfen, wurden durch Chlorgas sterilisierte Samen auf ½ MS Platten ausgelegt. Die Keimung wurde unter Kälteeinwirkung überprüft. Dazu wurden zur Kontrolle Platten für 7 Tage unter Langtag-Bedingungen gestellt. Für die Kältebehandlung wurden die restlichen Platten für 3 Wochen bei 4°C im Dunkeln kultiviert.

2.6.5 Hydroponisches System

Für die Anzucht im hydroponischen System wurden PCR-Reaktionsgefäße mit je 300 µl Hoagland-Kanister-Medium und 0,5 % (v/v) Agar E gefüllt. Anschließend wurden die Spitzen der PCR-Reaktionsgefäße abgeschnitten und die Gefäße in einen Kasten gestellt, der mit 1/10 Hoagland-flüssig-Medium gefüllt war, sodass die abgeschnittenen Spitzen ins Medium reichten. Danach wurde auf jedes PCR-Reaktionsgefäß ein Samen gelegt, die Kästen mit einem lichtdurchlässigen Deckel und Leucopor-Band verschlossen. Das 1/10 Hoagland-flüssig-Medium wurde alle sieben Tage gewechselt. Nach 28-30 Tagen wurden die Pflanzen von den Spitzenkästen in 50 ml Falcons, gefüllt mit 1/10 Hoagland-Kanister-Medium, überführt. Nach drei bis vier Tagen wurde erneut das Medium gewechselt. Nach sieben Tagen begann die Stressbehandlung mit Zn²⁺. Pro Bedingung und Allel wurden je 6 Pflanzen kultiviert. Das Medium wurde nun alle zwei bis drei Tage gewechselt. Nach 14 Tagen Stress-Behandlung wurden die Pflanzen geerntet. Die gesamte Anzucht erfolgte unter Kurztag-Bedingungen.

2.7 Element Analyse

2.7.1 Probenvorbereitung für Mikrowellenaufschluss

Die Pflanzen wurden jeweils in Wurzel und Blätter getrennt. Dabei wurden je drei Pflanzenproben gleicher Bedingung zu einer Probe vereint. Bei den Pflanzen der Platten wurden sowohl Blätter als auch die Wurzeln gewaschen. Bei den Pflanzen, die im hydroponischen System angezogen wurden, erfolgte dies lediglich bei den Wurzeln. Die Blätter wurden hier gleich bei 50°C im Trockenschrank getrocknet. Die übrigen Proben wurden zuvor gewaschen. Alle Waschschriffe erfolgten bei 4°C. Die Wasch-lösungen wurden zuvor auf 4°C heruntergekühlt. Zunächst wurden die Proben für 10 min unter ständigem Schütteln in einem Überkopf-Rotator mit ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Proben wurden mit einer 20 mM CaCl₂-Lösung weitere 10 min unter Schütteln gewaschen. Der Überstand wurde erneut verworfen und die Proben noch einmal mit 20 mM CaCl₂ gewaschen. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Proben mit einer 10 mM EDTA-Lösung wieder 10 min gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die Proben ein

letztes Mal mit ddH₂O gewaschen. Dann wurden die Proben mit Papiertüchern gründlich getrocknet. Alle Proben wurden mindestens drei Tage bei 50°C im Trockenschrank getrocknet.

2.7.2 Mikrowellenaufschluss

Als Vorbereitung für die ICP-OES-Messung wurden die Proben mittels Mikrowellensystem Start 1500 mit HPR-1000/10 S-Hochdruck Segmentrotor und MPV 100 Behältern (MLS GmbH, Leutkirchen; Deutschland) aufgeschlossen. Dazu wurden die getrockneten Proben zunächst grob zerkleinert. Danach wurden pro Probe etwa 30 mg Pflanzenmaterial in die TFM Ø 14,5/12x60 mm 6ml Mikrowellengefäße abgewogen. Das genaue Gewicht wurde notiert. Das Pflanzenmaterial wurde mit 2 ml HNO₃ und 1 ml 30 % H₂O₂ vollständig überschichtet. Je 3 solcher vorbereiteten Gefäße wurden dann in MPV 100 Behälter mit 6 ml HNO₃ gestellt. Die so vorbereiteten Proben wurden mittels Mikrowellensystem aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte in zwei Aufheizphasen. Zunächst wurden die Proben für 10 min auf 80°C und dann für 15 min auf 180°C aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben kontinuierlich auf Raumtemperatur abgekühlt, in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur gelagert.

2.7.3 Vermessung mittels ICP-OES (induced coupled plasma – optical emission spectrometry)

Die Proben wurden mittels iCAP 6500 (Thermo Scientific) vermessen. Dabei wurde Zink bei 213 nm, Eisen bei 238 nm und Mn bei 294 nm gemessen.

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Quick DNA Extraktion (genomische DNA)

Als erstes wurden drei bis vier kleine Blätter von *Arabidopsis thaliana* zusammen mit zwei Stahlkügelchen in 2 ml Eppendorfreaktionsgefäße gegeben. Die Gefäße wurden sofort danach in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial in einer Kugelmühle 1 min gemörsert. Danach wurden 500 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris/HCl (pH 7,5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % (v/v) SDS) zugegeben, alles durch Invertieren gründlich gemischt und 5 min bei 16 000 g zentrifugiert. Als nächstes wurden 300 µl Überstand abgenommen und in einem neuen 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß durch Invertieren mit 300 µl Isopropanol gemischt. Die Reaktionsgefäße wurden erneut für 5 min bei 16 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Danach wurde bei 16 000 g weitere 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Reaktionsgefäße wurden offen stehen gelassen, bis das Pellet vollständig getrocknet war. Anschließend wurden 40 µl ddH₂O zugegeben und alles für 5 min bei 60°C inkubiert. Nach den 5 min wurden die Reaktionsgefäße für 2 min auf Eis gestellt und dann 1 min

bei 16 000 g zentrifugiert. Zuletzt wurden je 35 µl Überstand abgenommen und in PCR-Reaktionsgefäße überführt. Die so extrahierte genomische DNA wurde bei 4°C gelagert.

2.8.2 DNA-Extraktion für Resequenzierung von *ozs1* Suppressor-Mutanten

Zunächst wurden 2 g Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das gemörserte Material wurde nahezu aufgetaut und anschließend mit 10 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA (pH8,0), 500 mM NaCl) versetzt. Danach wurden unter ständigem Rühren 100 µl 20% SDS zugegeben. In einem 50 ml Greiner-Röhrchen wurde alles für 30 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 15 ml Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und für 30 s kräftig geschüttelt. Als nächstes wurden die Proben bei 3 000 g für 10 min bei 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde über eine Miracloth-Membran in ein neues 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und mit dem zweifachen Volumen an 100 % Ethanol versetzt. Durch mehrfaches Invertieren wurde gemischt und anschließend erneut bei 3 000 g für 15 min bei 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch Zugabe von 15 ml 70% Ethanol und kräftiges Schütteln gereinigt. Danach wurde bei 3 000 g für 5 min bei 20°C zentrifugiert und im Anschluss der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und danach in 750 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)) gelöst. Das gelöste Pellet wurde in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt, mit 10 µl RNase-Lösung (10 mg/ml) versetzt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Danach wird alles in ein neues 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und es wurden 750 µl Tris-gesättigtes Phenol zugegeben. Anschließend wurde kräftig geschüttelt und danach bei 16 000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt und es wurden 1/10 Volumen Na-Acetat zugegeben. Nachdem dies gemischt worden war, wurde alles mit dem zweifachen Volumen 100% Ethanol überschichtet und zweimal geschwenkt. Mit Hilfe eines Glashakens wurde die DNA aufgefangen. Die DNA wurde anschließend in 70 % Ethanol gewaschen und für 30 min getrocknet, bevor sie über Nacht in 500 µl TE-Puffer gelöst wurde. Zur Aufreinigung wurden am nächsten Tag zu 500 µl gelöster DNA 50 µl 3 M Na-Acetat und 550 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und alles 10-mal invertiert. Anschließend wurde bei 16 000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert und danach der Überstand abgenommen. Zu diesem wurde das gleiche Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gegeben und bei 16 000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen, mit dem zweifachen Volumen 100% Ethanol gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde alles bei 16 000 g für 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde im Anschluss mit Ethanol gewaschen und getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde zum Schluss in 50 µl TE-Puffer gelöst. Die Konzentration wurde mittels Qubit 3 Fluorometer nach Herstellerangaben vermessen.

2.8.3 Polymerasekettenreaktion

Für jede PCR wurde ein Mastermix (Tab.6) mit den jeweiligen Primern (s. Tab. A1) angesetzt. Für PCRs mit der Taq Polymerase wurde der 10 x Taq-Puffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris/HCl (pH 9,0), 1 % Triton X-100) verwendet. Für PCR Ansätze mit Phusion Polymerase wurde 5 x Phusion HF Puffer (Thermo Fisher Scientific) genutzt.

Tab. 6: Mastermix Zusammensetzung. Gezeigt sind die Zusammensetzungen für unterschiedliche Taq- und Phusion-PCR Ansätze.

| | Taq | | | Phusion |
|-----------------------|----------|-------|-------------|---------|
| | 20 µl | 50 µl | Kolonie-PCR | 50 µL |
| 10 x Taq-Puffer | 2,1 µl | 5 µl | 3 µl | – |
| 5 x Phusion HF Puffer | – | – | – | 10 µl |
| 200 mM dNTP's | 0,47 µl | 1 µl | 0,3 µl | 0,5 µl |
| 20 µM forward Primer | 0,47 µl | 1 µl | 0,3 µl | 1,25 µl |
| 20 µM reverse Primer | 0,47 µl | 1 µl | 0,3 µl | 1,25 µl |
| Polymerase | 0,47 µl | 1 µl | 0,3 µl | 0,5 µl |
| ddH ₂ O | 16,22 µl | 40 µl | 25,8 µl | 35,5 µl |
| Template | 1 µl | 1 µl | 1 Kolonie | 1 µl |

Alle PCRs wurden mit SensoQuest Labcyclern oder BioRad iCyclern entweder als ein- oder zweistufige PCR (Tab. 7) durchgeführt. Eine zweistufige PCR wurde genutzt, wenn als Template gDNA isoliert durch Quick DNA Extraktion verwendet wurde. PCR-Produkte wurden anschließend mit Ladepuffer (30 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol) gemischt und auf Agarose-Gele geladen.

2.8.4 Agarose-Gel

Für die Gele wurde TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl (pH 8,0), 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) mit LE-Agarose (Biozym) aufgekocht. Die Konzentration an Agarose wurde der jeweiligen Fragmentlänge angepasst. Bei größeren Fragmenten wurden niedrigere Konzentrationen gewählt, bei kleineren Fragmenten höhere Konzentrationen. Es wurden 0,5 % - 2,0 %ige Agarose-Gele verwendet. Zur Detektion der DNA wurde dem Gel Ethidiumbromid zugegeben. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer. Gele ausgehend von 100 ml TAE-Puffer liefen bei 110 V für 40 min, Gele ausgehend von 50 ml TAE-Puffer liefen bei 80 V für 30 min.

2.8.5 Spezial-Agarose-Gel

Sollten Größenunterschiede von weniger als 30 bp gezeigt werden, wurde ein Spezial-Agarose-Gel verwendet. Dafür wurde ein 3 %iges Gel mit NuSieve Agarose (Biozym) in TBE-Puffer (9 mM Borsäure, 9 mM Tris/HCl (pH 8,0), 2 mM EDTA (pH 8,0)) hergestellt. Zur Detektion der DNA wurde

dem Gel Ethidiumbromid zugegeben. Das Gel wurde in TBE-Puffer laufen gelassen. Die Proben liefen zunächst bei 60 V für 20 min in das Gel ein. Anschließend erfolgte die Auftrennung bei 100 V für 30 min.

Tab. 7: PCR-Programm. Gezeigt sind die PCR-Programme für die jeweiligen PCR-Ansätze; T_m wird dem jeweiligem Primerpaar (Tab. A1) angepasst; t_a ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragments und der Polymerase (Taq = 1 min/1kb; Phusion = 1min/2kb, Phusion Gateway= 1min/1kb).

| Taq PCR (1-stufig) | | | Phusion PCR | | |
|--------------------|------------|----------|---------------------|-----------------------|-----------|
| Zyklen | Temperatur | Zeit | Zyklen | Temperatur | Zeit |
| 1 x | 96°C | 2:00 min | 1 x | 98°C | 1:00 min |
| | 96°C | 0:30 min | | 98°C | 0:10 min |
| 40 x | T_m | 0:30 min | 40 x | $T_m+3^\circ\text{C}$ | 0:30 min |
| | 72°C | t_a | | 72°C | t_a |
| 1 x | 72°C | 5:00 min | 1 x | 72°C | 10:00 min |
| Taq PCR (2-stufig) | | | Phusion PCR Gateway | | |
| Zyklen | Temperatur | Zeit | Zyklen | Temperatur | Zeit |
| 1 x | 96°C | 2:00 min | 1 x | 98°C | 1:00 min |
| | 96°C | 0:30 min | | 98°C | 0:15 min |
| 10 x | T_m | 1:30 min | 5 x | 45°C | 0:30 min |
| | 72°C | t_a | | 72°C | t_a |
| | 96°C | 0:30 min | | 98°C | 0:15 min |
| 30 x | T_m | 0:30 min | 20 x | 55°C | 0:30 min |
| | 72°C | t_a | | 72°C | t_a |
| 1 x | 72°C | 5:00 min | 1 x | 72°C | 5:00 min |

2.8.6 Enzymatischer Verdau

Es wurden Enzyme von Thermo Fisher Scientific und New England Biolabs verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurde jeder Verdau nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.8.7 RNA Methoden

2.8.7.1 RNA Extraktion (TRIsure)

100 – 200 g gemörsertes Pflanzenmaterial wurden zunächst mit 1 ml TRIsure (Bioline) versetzt und 1 min gevortext. Anschließend wurden die Proben 5 min bei RT inkubiert und danach erneut 1 min gevortext. Als nächsten wurden 200 µl Chloroform zugegeben und 20 sec lang geschüttelt. Die Proben wurden wieder 5 min bei RT inkubiert und anschließend 15 min bei 4°C und 16 000 g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit 500 µl Isopropanol gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 16 000 g und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml 70 %igem Ethanol überschichtet. Nach erneuter

Zentrifugation für 5 min bei 16 000 g und 4 °C wurde der Überstand wieder verworfen und das Pellet an der Luft für 10-20 min getrocknet. War das Pellet trocken, wurden 20 µl RNase-freies Wasser zugegeben und für 5 min bei 50°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 1 min auf Eis gekühlt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

2.8.7.2 DNase Behandlung

Die RNA wurde auf 86 ng/µl verdünnt. Für die DNase-Behandlung wurde zu 8 µl verdünnter RNA 1 µl 10 x Reaktionspuffer und 1 µl DNase I (Thermo Fisher Scientific) gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl 50 mM EDTA zugegeben und erneut inkubiert (10 min, 65°C).

2.8.7.3 cDNA Synthese

4 µl der DNase Behandlung wurden mit 1 µl 5 x PrimeScript RT Mastermix (TaKaRa) versetzt und zunächst 15 min bei 37°C und anschließend 5 sec bei 85°C inkubiert. Die fertige cDNA wurde bei 4°C gelagert.

2.8.7.4 Real-time qRT-PCR Analyse

Zur Aufnahme der dsDNA Synthese wurde SYBR Green verwendet. Zunächst wurde die cDNA 1:50 verdünnt. Danach wurde ein Master-Mix für die Triplikate der jeweiligen Proben und das Primer-Paar hergestellt. Dazu wurden zunächst die vorwärts und rückwärts Primer-Paare gemischt, um am Ende eine Mischung mit einer Konzentration von 0,5 µM zu erhalten. Pro Probe wurden nun 2,5 µl der Primer-Mischung und 5 µl des SsoAdvanced Universal SYBR Green Mastermixes (BioRad) mit 2,5 µl der verdünnten cDNA gemischt. Als Referenz-Gene wurden PP2A und UBC9 vermessen. Die PCR-Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 95°C für 3 min, 40 Zyklen mit 95°C für 10 sec und 60°C für 40 sec, 95°C für 10 sec. Anschließend wurde die Schmelzkurve vermessen. Dazu wurde die Temperatur in 0,5°C Schritten von 65°C auf 95°C erhöht. Die von Bio-Rad CFX Maestro ausgegebenen cq-Werte der Triplikate wurden gemittelt. Die cq-Werte beider Referenzgene (PP2a, UBC9) wurden ebenfalls für die jeweilige Probe gemittelt. Anschließend wurde Δcq berechnet ($\Delta cq = cq_{(Kandidatengen)} - cq_{(Referenzgene)}$). Daraus konnte das relative Transkriptlevel berechnet werden ($RTL = 1000 \times 2^{-\Delta cq}$).

2.8.7.5 RNA Extraktion für RNA-Seq-Analyse

Die RNA wurde wie bereits unter 2.7.6.1 beschrieben isoliert. Anschließend wurde sie mittels RNeasy® Mini Kit (250) (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Während der Aufreinigung wurde eine DNase-Behandlung durch RNase-Free DNase Set (50) (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.9 Klonierung

2.9.1 Gateway

Für die Gateway-Klonierung wurde die gewünschte Sequenz zunächst mittels Phusion PCR amplifiziert. Die PCR wurde anschließend auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, ausgeschnitten und mit dem GeneJET Gel Extraktion Kit (Thermo Scientific) nach Herstellerangabe aufgereinigt. Als nächstes wurde eine Phusion PCR Gateway durchgeführt, um die benötigten attB Adapter anzufügen. Die PCR wurde erneut auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, ausgeschnitten und aufgereinigt.

Danach wurde die Sequenz mittels BP-Reaktion in den Entry Klon pDONR221 nach Herstellerangaben (Invitrogen) eingebracht. Das Reaktions-Produkt wurde dann in *E. coli* DH10 β transformiert. Die Transformanten wurden auf Km selektiert. Entstandene Kolonien wurden durch eine Kolonie-PCR überprüft. Positive Klone wurden in einer Übernachtskultur angezogen. Das Plasmid wurde mittels GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) nach Herstellerangabe isoliert und zur Überprüfung nach Vorgabe sequenziert (Macrogen).

Daran wurde die LR-Reaktion angeschlossen. Zunächst wurde der Entry-Klon mit PvuI verdaut und über ein Agarosegel aufgereinigt. Anschließend wurde die LR-Reaktion nach Herstellerangaben (Invitrogen) durchgeführt. Es folgte die Transformation in *E. coli* DH10 β . Die Transformanten wurden auf Km selektiert. Entstandene Kolonien wurden durch eine Kolonie-PCR und einen Verdau überprüft.

Als letztes wurden korrekte Plasmide in *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 transformiert.

2.9.2 Erstellung von *ozs3* knockout mittels CRISPR/Cas9

Zur Identifizierung der Zielsequenzen für CRISPR/Cas9 wurde CCTop (Stemmer et al. 2015) genutzt. Es wurden zwei Zielsequenzen im ersten Exon gefunden (Zielsequenz 1: TTAATGTTCCCGAGTCCCTTAGG, Zielsequenz 2: TCGTCCGTTTAGATGACGGTGG). Für diese Zielsequenzen wurden Primer Dimere mit zwei BsaI-Überhängen erstellt. Als erstes wurden vorwärts und rückwärts Primer auf eine Konzentration von 1 μ M eingestellt und dann 1:1 gemischt. Danach wurden sie für 10 min bei 95°C inkubiert und bei RT abgekühlt. In der Zwischenzeit wurde der pKSE Vektor verdaut. Dazu wurden 3 μ g Vektor mit 3 μ l BsaI, 3 μ l Puffer G gemischt und auf 30 μ l mit ddH₂O aufgefüllt. Das Ganze wurde bei 37°C für 1:30 h inkubiert und dann bei 65°C für 15 min inhibiert. Der Verdau wurde auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen und der linearisierte Vektor ausgeschnitten und aufgereinigt (GeneJET Gel Extraction Kit, Thermo Scientific). Anschließend wurde der linearisierte Vektor mit dem Primerpaar ligiert. Dazu wurden 100 ng Vektor, 1 μ l Primer, 0,4 μ l T4 Ligase zusammen pipettiert, mit ddH₂O auf 20 μ l aufgefüllt und bei 16°C über Nacht inkubiert. Danach wurden 2 μ l des Ligationsansatzes in *E. coli* DH10 β transformiert und auf LB-Medium mit Km

(30 µg/ml) selektiert. Kolonien wurden mittels Kolonie PCR überprüft. Von positiven Klonen wurde das Plasmid isoliert und zur Überprüfung zur Sequenzierung geschickt. Als letztes wurden korrekte Plasmide in *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 transformiert.

2.9.3 pGEM-T

Für die Klonierung von Fragmenten in pGEM-T wurde zunächst das gewünschte PCR-Fragment mittels Phusion PCR amplifiziert und polyadeniliert. Dazu wurde zu dem PCR Ansatz 1 µl Taq Polymerase und 1 µl 5 mM dATP gegeben und bei 72°C für 20 min inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz über ein Agarosegel aufgereinigt und die Konzentration über ein Abschätzungsgel bestimmt. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde dann in pGEM-T ligiert, indem zu 7 µl des PCR-Produktes 1 µl 10 x Ligase-Puffer (Thermo Fisher Scientific), 1 µl pGEM-T und 1 µl T4 Ligase zugegeben wurden und über Nacht bei 4°C inkubiert wurden. Der Ligations-Ansatz wurde am nächsten Tag in *E. coli* DH10β transformiert und auf LB Platten mit Amp, IPTG und X-Gal selektiert. Kolonien wurden mittels Kolonie PCR überprüft.

2.10 Transformation

2.10.1 *E. coli*

100 µl chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden langsam aufgetaut. Danach wurden 2 µl Ligationsansatz zugegeben und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde mindestens 30 min auf Eis stehen gelassen und anschließend bei 42°C für 1 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sofort für 1-3 min auf Eis gestellt. Danach wurde 1 ml LB Medium zugegeben und bei 37°C für 1 h unter leichtem Schütteln (100 rpm) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 3 300 g für 3 min bei RT pelletiert. Der Überstand wurde abgegossen und 100 µl LB Medium zugegeben. Darin wurden die Zellen resuspendiert und in 2 Portionen (20 µl und 80 µl) auf LB-Selektionsplatten ausgestrichen und für einen Tag bei 37°C inkubiert.

2.10.2 *A. tumefaciens*

100 µl chemisch kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen wurden langsam aufgetaut. Danach wurde 1 µg Plasmid zugegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei 37°C für 5 min inkubiert. Als nächstes wurde 1 ml LB Medium zugegeben und bei 30°C für 2-4 h leicht geschüttelt (100 rpm). Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 3 300 g für 3 min bei RT pelletiert. Der Überstand wurde abgegossen und 100 µl LB Medium zugegeben. Darin wurden die Zellen resuspendiert und auf YEPII-Selektionsplatten ausgestrichen und für zwei Tage bei 30°C inkubiert.

2.10.3 *A. thaliana*

Für die Transformation von *A. thaliana* wurden zunächst 2 ml über Nacht Kulturen (ÜNK) von *A. tumefaciens* mit den gewünschten Plasmiden in LB Medium bei 30°C unter Schütteln (180 rpm) angezogen. Am nächsten Tag wurden mit den ÜNK 100 ml YEPII Medium angeimpft und erneut über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden am nächsten Tag abzentrifugiert und in 200 ml Saccharose-Lösung (150 mM Saccharose, 40 µl (v/v) Silvet) resuspendiert. Die Infloreszenz von *A. thaliana*-Pflanzen wurden für 10 sec in diese Lösung getaucht und die Pflanzen anschließend über Nacht liegend im Dunkeln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Pflanzen unter Langtag-Bedingungen bis zur Samenreife ins Licht gestellt. Die Samen wurden anschließend auf ½ MS Selektionsmedium mit den entsprechenden Antibiotika bis zur Homozygotie selektiert.

2.10.4 *N. benthamiana*

Für die Transformation von *N. benthamiana* wurden zunächst 2 ml ÜNK von *A. tumefaciens* mit den gewünschten Plasmiden in YEPII Medium mit den entsprechenden Antibiotika bei 30°C unter Schütteln (180 rpm) angezogen. Am nächsten Tag wurden damit 50 ml Kulturen angeimpft und erneut bei 30°C über Nacht geschüttelt. Dazu wurden in 250 ml Erlenmeyerkolben 50 ml YEPII mit Antibiotika, 500 µl 1 M MES (pH 5,2) und 10 µl 100 mM Acetosyringon und mit der 2 ml ÜNK angeimpft. Am nächsten Tag wurde die OD der Kulturen bei 600 nm vermessen und auf eine OD von 1,5 eingestellt. Lediglich der *A. tumefaciens* Stamm p19 wurde auf eine OD von 1,8 eingestellt. Anschließend wurden die Infiltrationslösungen hergestellt. Dazu wurden je 5 ml von p19 mit je 5 ml der gewünschten *A. tumefaciens*-Kulturen gemischt. Das Ganze wurde bei 2 500 g für 30 min abzentrifugiert und in 12 ml Infiltrationspuffer (10 mM MgCl₂, 10 mM MES (pH 5,2), 150 µM Acetosyringon) resuspendiert. Diese Suspension wurde dann 2 h bei RT geschüttelt und anschließend mit Hilfe einer 1 ml Spritze in 5-6 Wochen alte Blätter von *N. benthamiana* infiltriert. Die Blätter wurden nach 3 Tagen geerntet, außer für den Ceramid-Kinase-Assay. Hier wurden die Blätter bereits nach 2 Tagen geerntet. Die Blätter wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Blätter, die fotografiert wurden, wurden nach 7 Tagen geerntet.

2.11 EMS-Mutagenese

Etwa 5000 *Arabidopsis thaliana ozs1* Samen wurden in einem 50 ml Falcon-Tube mit dem 25fachen Volumen an 0,2 %igem EMS versetzt. Das Falcon-Tube wurde anschließend mit Parafilm verschlossen und 15 h bei RT geschüttelt (100 rpm). Anschließend wurde gewartet, bis sich die Samen abgesetzt hatten und der Überstand wurde dekantiert. Eventuelle Reste wurden mit einer Pasteurpipette entfernt. Das Falcon-Tube wurde dann mit ddH₂O aufgefüllt. Alles wurde kurz gemischt und der Überstand erneut dekantiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 4-mal wiederholt. Als nächstes

wurden die Samen 2-mal für je 15 min mit 100 mM Natrium Thiosulfat gewaschen. Danach wurde erneut 15 min und als letztes 1 h mit ddH₂O gewaschen. Das Wasser wurde wieder abgenommen. Die Samen wurden anschließend erneut mit etwas ddH₂O versetzt und mit Hilfe einer Plastik-Pasteur-Pipette auf Erde ausgebracht. Die Samen wurden unter Langtag-Bedingungen kultiviert und anschließend wurden 3000 einzelne Pflanzen pikiert.

Zur Überprüfung der Mutageneserate wurden etwa 30 Schoten von unterschiedlichen Pflanzen geerntet. Diese Samen wurden auf Hoagland-Platten ausgestreut und anschließend die Anzahl an Albino-Pflanzen bestimmt.

2.12 Identifizierung von Mutanten

2.12.1 CRISPR/Cas9 Linien

Die T1-Samen der transformierten *A. thaliana*-Pflanzen wurden auf ½ MS-Platten mit Km selektiert. Von diesen selektierten Pflanzen wurde durch Quick DNA Extraktion genomische DNA isoliert. Daraus wurde ein Fragment amplifiziert, welches beide Zielsequenzen beinhaltet. Um zu überprüfen, ob die selektierten Pflanzen eine Mutation aufwiesen, welche zu einem Frame-shift führt, wurden die amplifizierten Fragmente sequenziert. Anschließend wurde von diesen Pflanzen Samen erneut auf Km getestet, um Linien zu identifizieren, welche keine Cas9-Kassette mehr besitzen.

Zur genauen Bestimmung der Mutation wurde von diesen Pflanzen genomische DNA durch Quick DNA Extraktion isoliert und wie zuvor das Fragment mit beiden Zielsequenzen amplifiziert. Die Fragmente wurden dann in pGEM-T kloniert und mehrere Klone sequenziert.

2.12.2 *nahG* x *acd5-1* Doppelmutante

Nach der Kreuzung von *nahG* mit *acd5-1*, wurde die F1-Generation bis zur Samenreife angezogen. Die F2-Samen wurden auf ½ MS-Medium mit Km selektiert. Pflanzen, die eine einheitliche Kanamycin-Resistenz aufwiesen, wurden als Homozygot für *nahG* bestimmt. Von diesen Pflanzen wurde mittels Quick DNA Extraktion genomische DNA isoliert. Das Fragment, welches die *acd5-1* Mutation enthält, wurde amplifiziert und zur Sequenzierung geschickt. So wurden die Pflanzen identifiziert, welche zusätzlich zu *nahG* auch noch homozygot für *acd5-1* waren.

2.12.3 *nahG* x *acd5-2* Doppelmutanten

Zur Identifikation von *nahG* x *acd5-2*-Doppelmutanten wurde zunächst von der F2-Generation genomische DNA mittels Quick DNA Extraktion isoliert. Zur Identifikation von Pflanzen, welche homozygot für *acd5-2* waren, wurden ein Fragment, welches die *acd5-2* Mutation enthält, amplifiziert. Das erhaltene Produkt wurde mit Hae III in Puffer R verdaut. Der Verdau wurde anschließend auf ein Spezialagarose-Gel geladen und es konnten Pflanzen identifiziert werden,

welche für *acd5-2* homozygot waren. Diese Pflanzen wurden auf Km selektiert. Pflanzen, die eine einheitliche Kanamycin-Resistenz aufwiesen, wurden als homozygot für *nahG* bestimmt und somit als *nahG* x *acd5-2* Doppelmutanten identifiziert.

2.12.4 *ozs1* Suppressor-Screen

Nach der EMS-Mutagenese wurden etwa 3500 Pflanzen der M1-Generation kultiviert. Diese 3500 Pflanzen wurden in 42 Pools aufgeteilt. Die M2-Generation wurde auf 50 μM Zn^{2+} selektiert. Es wurde nach Keimlingen gesucht, welche eine erhöhte Zink-Toleranz gegenüber *ozs1* aufwiesen. Dabei wurden je Pool etwa 1500 Samen, also insgesamt etwa 63 000 Samen untersucht. Von diesen keimten etwa 42 000 Samen, unter denen sich etwa 300 Pflanzen befanden, die ein längeres Wurzelwachstum als *ozs1* zeigten. Diese Keimlinge wurden bis zur Samenreife kultiviert. Die M3-Generation wurde erneut auf die gesteigerte Zink-Toleranz untersucht. Drei Linien zeigten einen stabil reproduzierbaren Phänotyp.

2.13 QTL-Seq-Analyse

Um anschließend die Mutation in *suo1* zu finden, welche zu der erhöhten Zink-Toleranz führte, wurde zunächst *ozs1* mit *suo1* gekreuzt. Aus der F2-Generation wurden anschließend zwei Pools von je 80 - 120 Pflanzen generiert. Dabei wurden die Pflanzen unter 50 μM Zink angezogen und anhand ihrer Wurzellänge sortiert. Es wurde ein Pool mit langen (LP) und ein Pool mit kurzen Wurzeln (KP) gebildet. Anschließend wurde die genomische DNA dieser Pools isoliert, wie unter 2.8.2 beschrieben, und zu Genewiz zur Sequenzierung geschickt. Die erhaltenen Daten wurden zur Verbesserung der Qualität getrimmt. Dabei wurden eventuell verbliebene Adaptern sowie zu kurze Reads entfernt. Anschließend wurden die Reads mittels Bowtie2 Algorithmus aligned. Als nächstes wurden nach entstandenen single nucleotide polymorphisms (SNPs) gesucht. Zu Beginn wurde nur nach SNPs gesucht, da durch EMS-Mutagenese vornehmlich solche Mutationen ins Genom eingefügt werden. Dabei wurde gleichzeitig die Varianz-Frequenz oder auch der SNP-Index berechnet. Um eine möglichst hohe Qualität des Aligments zu erhalten, wurden als nächstes alle SNPs aussortiert, bei denen mehr als 80 Reads aligned wurden. Da nicht der WT, sondern die *ozs1*-Mutante mutagenisiert wurde, mussten zunächst die Mutationen von *ozs1* bestimmt werden. Dazu wurden beide Pools verglichen. Kam ein SNP in beiden Pools vor und hatte in beiden Fällen einen SNP-Index von über 0,8, wurde dieser SNP *ozs1* zugeordnet. Solche Mutationen konnten also aussortiert werden, da sie nicht in Zusammenhang mit der erhöhten Zink-Toleranz standen. Weiter wurden SNPs mit einem SNP-Index von unter 0,1 aussortiert. So geringe Werte lassen auf Sequenzier- oder Aligmentfehler schließen und sind für diese Analyse nicht zu verwenden. Um die Qualität des Aligments weiter zu erhöhen, wurde versucht Mutationen auszusortieren, welche gehäuft in einem sehr engen Bereich

(30 – 100 bp) auftraten. Solche Mutationen sind ebenfalls auf Alignment-Fehler zurückzuführen. Dazu wurden zu der Position jedes SNPs die Entfernung des vorangegangenen und nachfolgenden SNPs in Nukleotiden ermittelt und addiert. Lag die Summe unter 100, lagen die Mutationen zu nahe beisammen. Um nun auch die Mutationen von der weiteren Analyse zu entfernen, welche am Rand eines solchen Clusters lagen, wurde für jeden der übrigen SNPs die Entfernung zu dem vorangegangenen SNP in Nukleotiden berechnet. Lagen die Mutationen näher als 1000 Nukleotide zusammen, wurden diese ebenfalls ausgeschlossen.

Nachdem durch diese Schritte die Anzahl falsch positiver SNPs reduziert wurde, wurde anschließend die Mutation gesucht, welche in *suo1* zu der erhöhten Zink-Toleranz führte. Um den Ort der Mutation sichtbar zu machen, wurden die SNP-Indizes der einzelnen SNPs entsprechend ihrer Lage auf dem Chromosom aufgetragen. Dazu wurde der Mittelwert der SNP-Indizes im Bereich von 1 Mbp um jeden SNP ermittelt.

2.14 RNA-Seq-Analyse

Für die Analyse der RNA-Seq-Daten mittels Geneious Prime wurden die erhaltenen Reads zunächst getrimmt und anschließend paarweise aligned. Anschließend wurden über die Funktion „Calculate Expression Levels“ die Expression der Proben für jedes Chromosom separat berechnet. Die Expressionlevels wurden dann mittels der Funktion „Compare Expression Levels“ durch DESeq2 miteinander verglichen. Waren die log₂-Werte der differentiellen Expression größer oder gleich 1, wurden die Gene als induziert betrachtet, waren die Werte kleiner oder gleich -1 als reprimiert. Um unter diesen Genen GO-Terms zu finden, wurde das Webtool GeneOntology verwendet.

2.15 Proteinanalyse

2.15.1 Co-Immunpräzipitation

Zum Nachweis der Proteininteraktion wurde eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Dazu wurden Tabak-Blätter infiltriert. Die Blätter wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und 0,5 g Pflanzenmaterial abgewogen. Zu dem Pflanzenmaterial wurden 1,5 ml Extraktionspuffer (25 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (v/v) IGEPAL, 2,5 mM EDTA, 1 x Protease Inhibitor Cocktail von Roche) gegeben. Das Ganze wurde dann für 20 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand über eine Miracloth Membran in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und auf Eis aufbewahrt. Hier wurden als Kontrolle 100 µl abgenommen und ebenfalls auf Eis gelagert. Als nächstes wurden die GFP-Trap®_MA (Chromotek) equilibriert, indem je 25 µl 3 mal mit je 500 µl Waschpuffer (10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA (pH 7,5)) gewaschen wurden. Anschließend wurde der Proteinextrakt zugegeben und für 1 h bei 4°C in einem Überkopffrotator inkubiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Protein durch Zugabe von 100 µl 2 x SDS

Probenpuffer (100 mM Tris/HCl (pH 6,8), 100 mM DTT, 20% (v/v) Glycerin, 0.2% Bromphenol Blau, 2% (w/v) SDS) und 10 min Inkubation bei 95°C in Lösung gebracht.

2.15.2 Proteinextraktion für Ceramid-Kinase

Hierfür wurde zu 200 mg gemörsertem Pflanzenmaterial 260 µl Extraktionspuffer (s. 2.12.1) gegeben. Das Ganze wurde vorsichtig gemischt und für 15 min bei 16 000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde über eine Miracloth-Membran in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde über Bradford (s. 2.12.8) bestimmt. Die Proben wurden in 1 x SDS Probenpuffer (s. 2.12.1) gegeben und 1 min gekocht. Anschließend wurden je 60 µg Gesamtprotein auf ein SDS-Gel geladen.

2.15.3 SDS-Gelelektrophorese

Proteinextrakte wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden die Proben auf ein SDS-Gel (Tab. 3) geladen. Die Elektrophorese wurde zunächst bei 10 mA pro Gel für 45 min und anschließend bei 20 mA pro Gel für 1 h laufen gelassen. Die Gele befanden sich dabei in Laufpuffer (0,2 M Glycerin, 25 mM Tris/HCl, 0,1 % (w/v) SDS).

Tab. 8: Zusammensetzung des SDS-Gels. Mengenangaben entsprechen zwei Gelen.

| | Trenngel (12%) | Sammelgel (5%) |
|-------------------------|----------------|----------------|
| ddH ₂ O | 3,3 ml | 2,8 ml |
| 30 % Acrylamid | 4,0 ml | 660 µl |
| 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) | 2,5 ml | – |
| 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8) | – | 500 µl |
| 10 % (v/v) SDS | 100 µl | 40 µl |
| 10 % (w/v) APS | 60 µl | 40 µl |
| TEMED | 6 µl | 4 µl |

2.15.4 Western Blot

Der Blot wurde in einer Halbtrockenkammer (PEQLab, Biotechnologie GmbH) durchgeführt. Dazu wurden zunächst zwei Lagen Whatmann-Papier in die Kammer geschichtet, gefolgt von einer Nitrocellulose Membran (Firma). Darauf wurde das SDS-Gel gelegt und erneut 2 Lagen Whatmann-Papier aufgelegt. Alle Komponenten wurden zuvor in Transferpuffer (25 mM Tris/HCl, 0,2 M Glycerin, 20 % (v/v) Methanol) eingelegt. Die Übertragung der Proteine erfolgte bei 50 mA pro Membran für 1:10 h. Nach dem Blotten wurde die Membran 3mal je 5 min lang mit je 5 ml TBS-T Puffer (10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween20) gewaschen. Danach wurde die Membran mit 5

ml Blockierlösung (10 % Magermilchpulver in TBS-T Puffer) über Nacht bei 4°C auf einem Kipp-Rollmischer inkubiert.

2.15.5 Immunodetektion

Zur Detektion von Proteinen nach dem Western Blot wurde die Membran mit Antikörpern behandelt. Zunächst wurde die über Nacht blockierte Membran 3mal je 5 min mit 5 ml TBS-T gewaschen. Anschließend wurden 5 ml Antikörperlösung (Blockierlösung mit Antikörper) zugegeben. Zunächst wurde die Membran mit dem primären Antikörper behandelt. Zur Detektion von GFP wurde der anti-GFP Antikörper (11 814 460 001, Roche) in einer Verdünnung 1:1000 verwendet. Zur Detektion von HA diente der anti-HA Antikörper (H9658, Sigma-Aldrich) in einer 1:3000-Verdünnung. Die Membran wurde mit der Antikörperlösung 1 h bei RT auf einem Kipp-Rollmischer inkubiert. Anschließend wurde erneut 3mal mit TBS-T gewaschen, bevor sie mit dem sekundären Antikörper behandelt wurde. Dazu wurde der Antikörper (anti-mouse, A9044, Sigma-Aldrich) gebunden an eine Peroxidase in einer Verdünnung von 1:10 000 verwendet. Die Membran wurde erneut für 1h bei RT auf einem Kipp-Rollmischer inkubiert und danach 3mal mit TBS-T gewaschen. Zur Detektion wurde ein ECL Kit (GE Healthcare) verwendet. Die Membran wurde im Anschluss an die Detektion mit Amidoschwarz (40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % (w/v) Amidoschwarz) gefärbt und mit ddH₂O entfärbt.

2.15.6 Protein Co-Lokalisation

Zur Lokalisation von Proteinen wurden die *ACD5* WT, *acd5-1* und *acd5-2* Allele in pMDC43 kloniert und zusammen mit CD3 Markerproteinen markiert mit mCherry für ER, Golgi und Mitochondrien in Tabakblättern infiltriert. Nach 3 Tagen wurden die Blätter geerntet und die untere Epidermis mit Hilfe eines Leica SP5 confocal laser-scanning Mikroskops betrachtet. Alle Bilder wurden mit den gleichen Instrumenteinstellungen aufgenommen.

2.15.7 Ceramid-Kinase Aktivitäts-Messung

Zur Messung der Ceramid-Kinase Aktivität wurden Blätter von *Nicotiana bentamiana* transient transformiert. Das Blattmaterial wurde anschließend gemörsert und je Probe 200 mg abgewogen. Zur Proteinisolation wurden je 260 µl Extraktionspuffer (100 mM HEPES-NaOH pH 7,4, 8 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 12,5 % (v/v) Glycerin, 1 mM DTT, 5 % (w/v) Polyvinylpyrrolidone (PVP-10), 1fach Protease Inhibitor Cocktail) zugegeben. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand über eine Miracloth Membran in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Der Proteinextrakt wurde 1:4 verdünnt und 75 µl wurden mit 300 µl Reaktionspuffer (20 mM HEPES (7,4), 10 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 10 % Glycerin, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 0,02 mg/ml Fettsäure freies BSA, 10 µM C6-NBD Ceramid (Cayman Chemical Company)) versetzt. Der Ansatz

wurde für 15 min bei 35°C im Dunkeln inkubiert. Als nächstes wurden 750 µM Chloroform/Methanol (2:1) zugegeben und gevortext. Nach 1 min Zentrifugation bei 21 800 g bei RT wurden je Probe 3 mal 100 µl der wässrigen oberen Phase in eine 96 well Platte gegeben. Zu diesen 100 µl wurden je 100 µl DMF zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Hier ist darauf zu achten, dass Überstand und DMF die gleiche Temperatur haben. Die Proben wurden am Fluoreszenz-Platten-Leser vermessen. Als Nullabgleich diente der verdünnte Proteinextrakt gemischt mit dem Reaktionspuffer ohne Inkubationszeit. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford.

2.15.8 Bestimmung der Proteinkonzentration über Bradford

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Bradford-Lösung 1:5 mit ddH₂O verdünnt. In einer 1 ml Küvette wurden von dieser Verdünnung 990 µl vorgelegt und mit 10 µl Proteinextrakt vermischt. Das Ganze wurde anschließend für 5-30 min bei RT inkubiert und anschließend am Fotometer bei 595 nm vermessen. Zur Quantifizierung wurde mit Hilfe verschiedener BSA-Verdünnungen eine Standardreihe erstellt und ebenfalls vermessen.

2.16 Färbungen

2.16.1 ROS Färbung

Für die Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wurden zunächst etwa 10 Keimlinge pro Probe in 5ml DAB (1mg/ml DAB, 10 mM Na₂HPO₄, 0,05 % (v/v) Tween20, pH 3,0) oder NBT-Färbelösung (3,5 mg/ml NBT, 10 mM KH₂PO₄, 10 mM NaN₃, pH 7,8) gelegt und für 5 min vakuumfiltriert. Die Proben für die DAB-Färbung wurden anschließend für 4h, die für NBT für 2,5 h im Dunkeln auf RT bei 100 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Färbelösungen entfernt und durch 7 ml Bleichlösung (60 % (v/v) Ethanol, 20 % (v/v) Essigsäure, 20 % (v/v) Glycerin) ersetzt. Das Ganze wurde dann 30 min im Dunkeln gekocht. Die Bleichlösung wurde entfernt.

Für die DAB-Färbung wurde das Pflanzenmaterial trocken getupft und nach Messung des Gewichtes in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit Hilfe der Kugelmühle wurden die Proben als nächstes 3 min lang gemörsert und danach mit 1 ml 0,2 M HClO₄ Lösung kurz gevortext. Dann wurden die Proben 5 min auf Eis stehen gelassen und dann 10 min bei 12 000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 450 nm fotometrisch vermessen.

Die mit NBT gefärbten Proben wurden nach dem Bleichen lichtmikroskopisch betrachtet.

2.16.2 Trypan-Blau-Färbung

Für die Färbung von toten Zellen wurde die Trypan-Blau Färbung-durchgeführt. Dazu wurden als erstes 3-4 Keimlinge mit 3 ml Färbelösung (Lactophenol (Milchsäure, Glycerin, Phenol, ddH₂O; 1:1:1:1, 2,5 mg/ml Trypan-Blau), Ethanol 1:2), versetzt und 1 min gekocht. Anschließend wurden die

Proben 1 h bei RT geschüttelt (100 rpm). Die Pflanzen wurden danach in eine 12 well Platte gelegt und mit 3 ml Chloralhydrat (2,5g/ml ddH₂O) überschichtet. Als nächstes wurden die Pflanzen 4 h bei RT unter Schütteln (100 rpm) inkubiert, bevor das Chloralhydrat erneuert wurde und die Pflanzen über Nacht bei RT schüttelten. Am nächsten Tag wurde das Chloralhydrat entfernt und durch 70 % Glycerin ersetzt. Anschließend wurden die Keimlinge lichtmikroskopisch untersucht.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, neue Bestandteile und Mechanismen der Zink-Homöostase aufzudecken. Dazu wurden verschiedene Pflanzen untersucht, welche eine Veränderung in der Zink-Toleranz zeigten. Im Zentrum der Arbeit standen drei *ozs*-Mutanten, die näher charakterisiert und molekular analysiert wurden.

3.1 *ozs11* (*acd5-2*)

3.1.1 *ACD5* (*accelerated cell death 5*)

Die erste *ozs*-Mutante, die untersucht wurde, war *ozs11*. Die kausale Mutation liegt in *ACD5*. Da für dieses Gen bereits eine Mutante (Greenberg et al. 2000) beschrieben wurde, wurde für *ozs11* die alternative Bezeichnung *acd5-2* gewählt. Bei der bereits beschriebene *acd5-1*-Mutante führte eine Punktmutation im zehnten Exon zu einem Aminosäureaustausch (G412R) (Abb. 6, 7A). In *acd5-2* führte ebenfalls eine Punktmutation zu einem Aminosäureaustausch. Die Mutation lag hier allerdings im achten Exon (L324F) (Abb. 6, 7A). Beide Mutationen sind in hoch konservierten Bereichen der Aminosäuresequenz zu finden. Ein Vergleich der orthologen Ceramid-Kinasen aus verschiedenen Pflanzenarten (Abb. 6) zeigte, dass beide mutierten AS hoch konserviert sind. Die in *acd5-1* mutierte AS ist in allen Pflanzen ein Glycin. Wohingegen bei der in *acd5-2* mutierten Position ein Leucin oder Isoleucin zu finden ist.

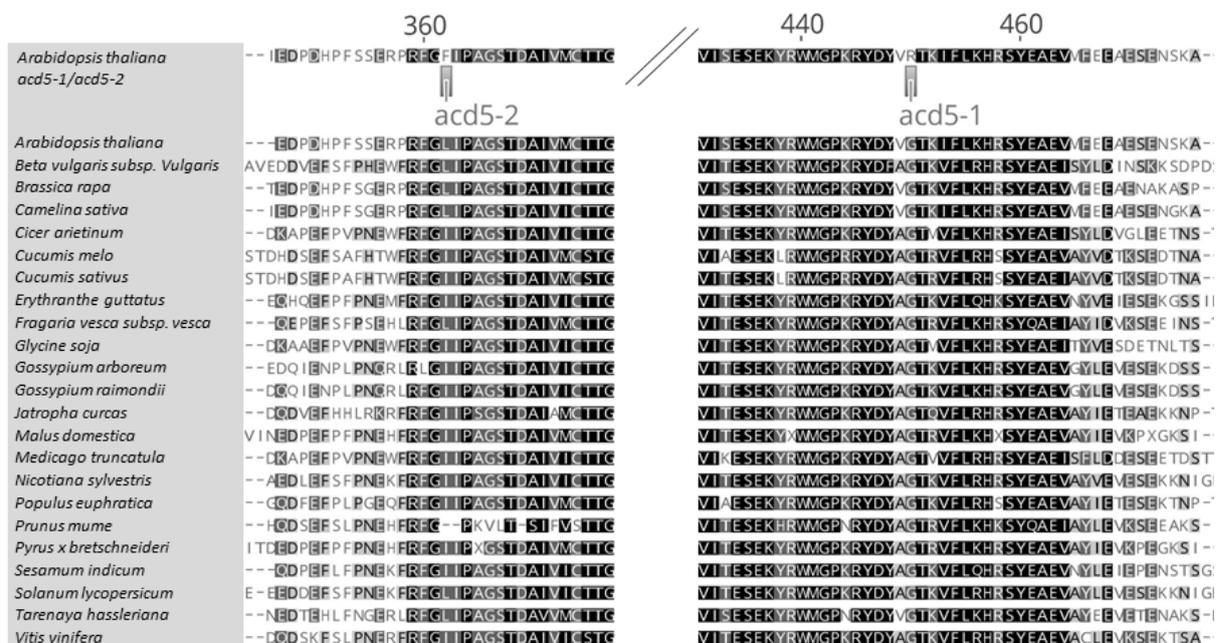


Abb. 6: Vergleich der AS-Sequenzen der Ceramid-Kinase aus verschiedenen Pflanzen. Dunkle Bereiche zeigen dabei hochkonservierte Aminosäuren an.

Bei der Charakterisierung wurden zunächst zwei Rückkreuzungslinien (*acd5-2 RK-1*, *acd5-2 RK-2*) auf ihre Zink-Hypersensitivität hin untersucht. Dabei zeigten beide Linien eine verstärkte Reduktion des Wurzelwachstums unter 60 $\mu\text{M Zn}^{2+}$ im Vergleich zu Col-0 (Abb. 7B). Als nächstes wurden Zink-Konzentrationen getestet, um herauszufinden, ab welcher Konzentration eine signifikante Wurzelwachstumsreduktion zu beobachten ist. Dazu wurden die beiden Rückkreuzungslinien unter ansteigenden Zink-Gehalten kultiviert. Unter Kontroll-Bedingungen zeigte lediglich *acd5-2 RK-2* mit einer Länge von etwa 8 cm eine leichte Verkürzung der Wurzeln im Vergleich zu Col-0 mit etwa 9 cm. *acd5-2 RK-1* zeigte dies nicht. Unter Zink-Stress zeigt sich bereits bei 40 $\mu\text{M Zn}^{2+}$ eine signifikante Reduktion im Wurzelwachstum um etwa 2 cm bei beiden Rückkreuzungslinien. Auch bei 60 und 80 $\mu\text{M Zn}^{2+}$ konnte diese signifikante Reduktion beobachtet werden (Abb. 7C). Bei 60 $\mu\text{M Zn}^{2+}$ wurde das Wachstum um etwa 3 cm verkürzt und bei 80 $\mu\text{M Zn}^{2+}$ um etwa 3,5 cm. Die Wurzellänge nahm mit zunehmender Zink-Konzentration kontinuierlich ab.

Auf der Suche nach weiteren *ACD5*-Allelen, wurden verschiedene T-DNA Insertionslinien untersucht. Eine der getesteten Linien (SALK_115871C) zeigte eine Insertion im letzten Intron und eine stark verminderte Transkriptakkumulation (siehe auch 3.1.9). Diese Linie wurde *acd5-3* genannt (Abb. 7A). Nachdem die verschiedenen *ACD5*-Allele identifiziert wurden, wurde ihre Zink-Hypersensitivität überprüft. Unter Kontroll-Bedingungen konnte bei *acd5-3* eine leichte Reduktion des Wurzelwachstums um etwa 1 cm beobachtet werden. Unter Zink-Stress zeigten alle drei Allele eine signifikante Verkürzung der Wurzellänge um 3,5 bis 2 cm im Vergleich zu Col-0 (Abb. 7D). Dies war ein zusätzlicher Hinweis, dass es sich bei der gefundenen Mutation tatsächlich um die kausale Mutation in *ozs11* handelt.

Um dies endgültig zu bestätigen, wurde *acd5-2* mit *ACD5* transformiert. Die Wildtypvariante von *ACD5* wurde unter Kontrolle eines 35S-Promotors oder unter Kontrolle des nativen Promotors exprimiert. Nach der Selektion mehrerer transgener Linien wurden jeweils zwei repräsentative Linien für die weiteren Experimente verwendet. Unter Kontroll-Bedingungen zeigte keine der Linien eine Veränderung der Wurzellänge. Unter erhöhten Zink-Konzentrationen zeigten alle vier transgenen Linien eine volle Komplementation. Damit wurde der sichere Beweis erbracht, dass es sich bei der identifizierten Punktmutation in *ACD5* um die kausale Mutation in *ozs11* handelt (Abb. 7D).

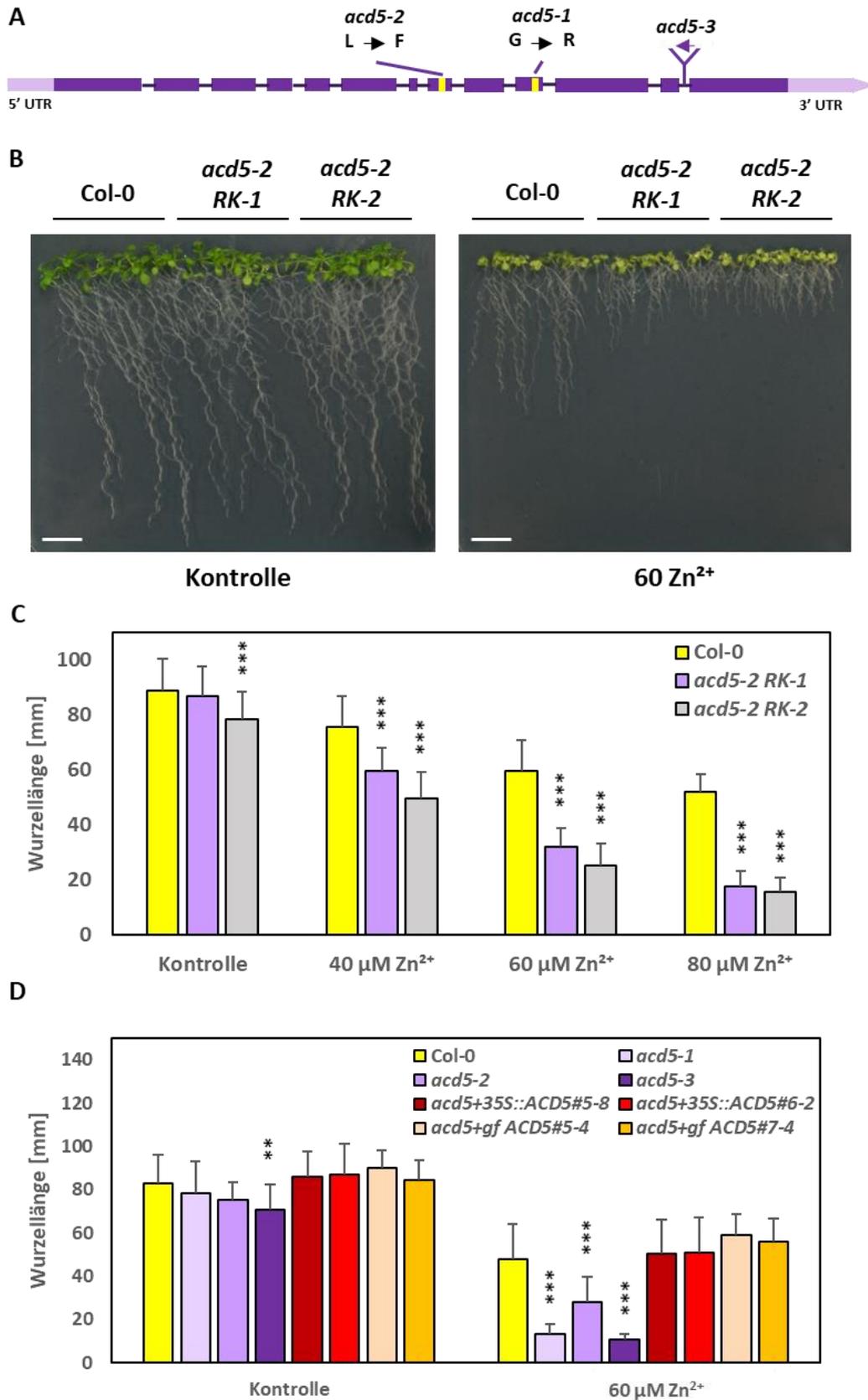


Abb. 7: Konzentrationsabhängige Reduktion des Wurzelwachstums verschiedener *acd5*-Mutanten unter Zink-Stress. Die Keimlinge von Col-0 und zwei Rückkreuzungslinien *acd5-2* RK-1 und *acd5-2* RK-2 wurden etwa 12 Tage auf Hoagland-Platten unter verschiedenen Zink-Konzentrationen angezogen. Danach wurde die Länge

der Primärwurzel gemessen. **(A)** Exon-Intron Struktur von *ACD5* (Dunkel-lila Boxen = Exons, Striche = Introns, gelbe Markierung = Lokalisation der Mutationen). **(B)** Keimlinge nach 12 d unter Kontroll-Bedingungen und 60 μM Zn^{2+} . Längenstandard = 1 cm **(C)** Konzentrationsabhängige Reduktion des Wurzelwachstums unter Zink-Stress von *acd5-2 RK-1* und *acd5-2 RK-2*. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm StAbw von 3 unabhängigen Experimenten ($n = 35 - 44$). Signifikante Unterschiede wurden durch zweifaktorielle ANOVA und Tukey's HSD-Test ermittelt. Sterne zeigen statistische Unterschiede zu Col-0 an (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$). **(D)** Komplementation von *acd5-2* mit *ACD5-WT* unter 35S und nativem Promotor (inklusive endogenem Terminator). Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm StAbw von 3 unabhängigen Experimenten ($n = 20 - 44$). Signifikante Unterschiede wurden durch zweifaktorielle ANOVA und Tukey's HSD-Test ermittelt. Sterne zeigen statistische Unterschiede zu Col-0 an (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$).

3.1.2 Metallverteilung in Keimlingen

Im Rahmen der Masterarbeit wurde bereits die Metallverteilung in adulten Pflanzen analysiert. Hier konnte kein Unterschied zwischen Col-0 und *acd5-2* festgestellt werden. Da die Reduktion des Wurzelwachstums auf Zink jedoch im Keimlingsstadium beobachtet wurde, sollte nun in diesem die Metallverteilung überprüft werden. Hierfür wurden Col-0 mit *acd5-2* und *acd5-3* untereinander verglichen. Nach einer zwölf-tägigen Kultivierung auf Hoaglandplatten mit normaler und erhöhter Zinkkonzentration wurden die Metallgehalte in den Keimlingen, aufgeteilt in Spross und Wurzel, mittels ICP-OES ermittelt.

Unter Kontroll-Bedingungen konnte bei *acd5-3* im Spross ein etwa 20 ppm geringerer Zink-Gehalt als in Col-0 festgestellt werden. In der Wurzel hingegen konnte ein solcher Unterschied nicht beobachtet werden (Abb. 8A, B). Wurden die Pflanzen unter erhöhten Zink-Konzentrationen kultiviert, konnte kein Unterschied in der Zink-Akkumulation zwischen Col-0 und den *acd5-Mutanten* gefunden werden. Im Spross lag die Zink-Konzentration bei etwa 1000 ppm und in der Wurzel bei etwa 4000 ppm (Abb. 8A).

Bei den Eisen-Gehalten der *acd5-Mutanten* konnte unter Kontroll-Bedingungen kein Unterschied zu Col-0 gemessen werden, weder im Spross noch in der Wurzel. Die Werte lagen immer bei etwa 90 ppm. Auch unter Zink-Stress konnte kein Unterschied in der Verteilung gemessen werden. Die Werte lagen im Spross bei etwa 80 ppm und in den Wurzeln bei etwa 170 ppm (Abb. 8A).

Zuletzt wurden die Mangankonzentrationen analysiert. Im Spross konnte dabei weder unter Kontroll-Bedingungen noch unter Zink-Stress ein Unterschied im Gehalt festgestellt werden. In beiden Geweben lagen die ppm-Werte zwischen 10 und 15 ppm. Auch in den Wurzeln war Mangan zwischen Col-0 und den Mutanten gleich verteilt. Sowohl in der Kontrolle als auch unter Zink-Stress wurden Mangan-Gehalte von etwa 5 ppm gemessen (Abb. 8A).

Im Wesentlichen kann gesagt werden, dass es weder in adulten Pflanzen noch in Keimlingen signifikante Unterschiede in der Metallverteilung im Vergleich zu Col-0 gab. Lediglich *acd5-3* zeigte im Spross unter Kontroll-Bedingungen einen verminderten Zink-Gehalt.

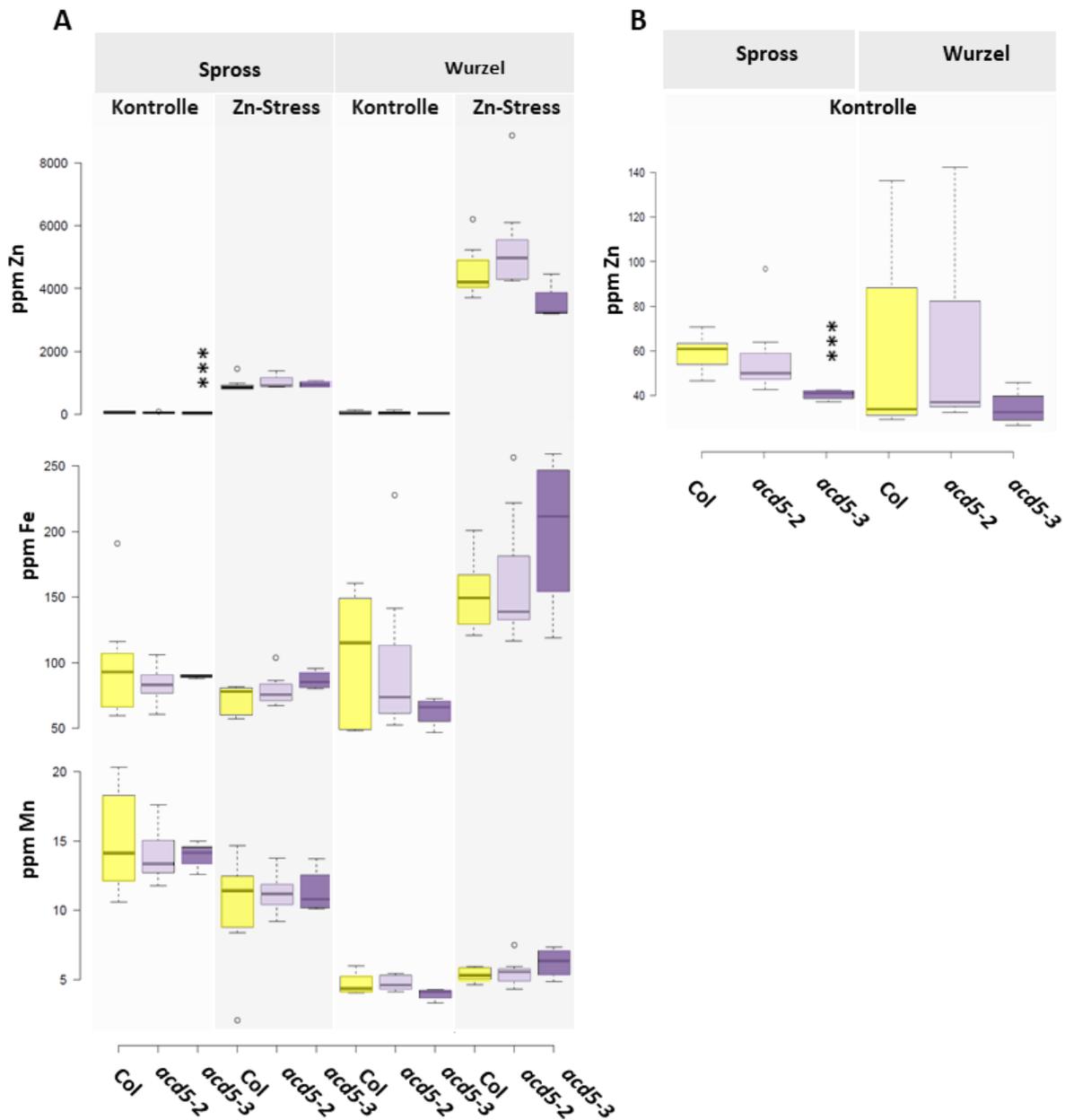


Abb. 8: Metallakkumulation in Keimlingen von Col-0 und *acd5*-Mutanten. Col-0 und zwei *acd5*-Mutanten, *acd5-2* und *acd5-3*, wurden vertikal auf Hoagland-Platten unter Kontroll-Bedingungen und 20 μM Zn^{2+} angezogen. Die Pflanzen wurden getrennt in Spross und Wurzel mittels ICP-OES vermessen. **(A)** Gezeigt ist die Verteilung von Zink, Eisen und Mangan. **(B)** Zinkgehalt in Spross und Wurzel unter Kontroll-Bedingungen. Die Daten repräsentieren den Median, die Quantilen, Antennen und Ausreißer von 2 - 4 unabhängigen Experimenten ($n = 4 - 8$). Signifikante Unterschiede zu Col-0 wurden durch Student's t-Test ermittelt (** $p \leq 0,001$)

3.1.3 Messung von ROS unter Zink-Stress

Nachdem die Metallverteilung untersucht wurde, sollten die verschiedenen *ACD5*-Mutanten weiter charakterisiert werden. Dazu wurde die Bildung von ROS betrachtet. Sind Pflanzen hohen Schwermetallkonzentrationen ausgesetzt, kommt es zur vermehrten Produktion von ROS (Choudhury et al. 2013). Darunter fällt die Bildung von Wasserstoffperoxid oder Sauerstoff-Radikalen (Choudhury et al. 2013). Da es sich bei *acd5-2* um eine Zink-hypersensitive Pflanze handelte, war es von Interesse, die Bildung von ROS näher zu untersuchen. Dazu wurden sieben Tage alte Keimlinge für 24 Stunden mit Zink gestresst und anschließend mit NBT gefärbt. Dabei zeigte sich sowohl unter Kontroll-Bedingungen als auch nach Zink-Stress kein Unterschied in der Akkumulation von Superoxid-Radikalen zwischen den *acd5*-Mutanten und Col-0 in den Blättern. Auch zwischen Kontroll-Behandlung und Zink-Behandlung konnte keine vermehrte ROS-Bildung beobachtet werden (Abb. 9). Eine 24 stündige Zink-Behandlung zeigte unter diesen Versuchsbedingungen also keinen Anstieg der ROS-Produktion, weder in Col-0 noch in den *acd5*-Mutanten. Die Wurzeln zeigten unter den gegebenen Bedingungen durchgehend bei allen Pflanzen und Bedingungen eine tiefblaue Färbung.

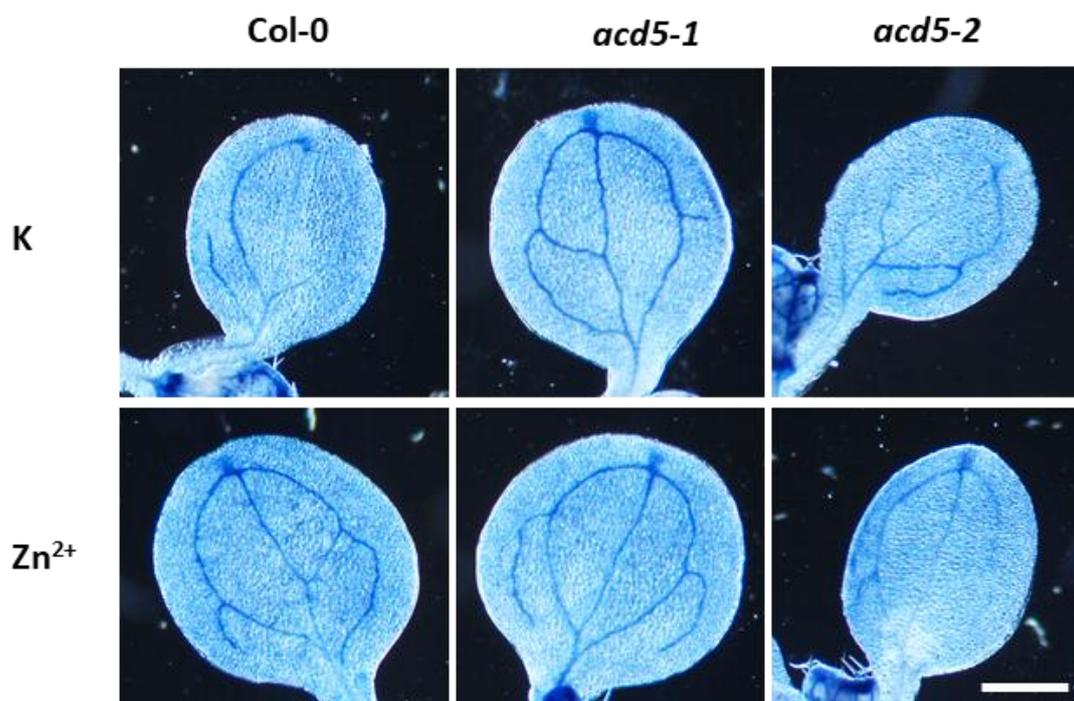


Abb. 9: Färbung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) in *acd5*-Mutanten unter Zink-Stress mittels NBT. Col-0 und zwei *acd5*-Mutanten, *acd5-1* und *acd5-2* wurden für 7d vertikal auf Hoagland-Platten unter Kontroll-Bedingungen angezogen, bevor sie für 24 h auf 100 μM Zn^{2+} umgesetzt wurden. Anschließend wurden sie zur Detektion von ROS mit NBT gefärbt. Die Bilder zeigen repräsentative Blätter von zwei unabhängigen Experimenten. Längenstandard = 1 mm

3.1.4 Auswirkung von Zink-Stress auf die Transkription von *ACD5*, *PR1* und *WIN3*

Ein 24-stündiger Zink-Stress führte also nicht zu einer sichtbar erhöhten ROS-Produktion. Von Interesse war aber, ob ein solcher Stress Auswirkungen auf das *ACD5*-Transkriptlevel hat und ob es Unterschiede in der *ACD5*-Expression zwischen Col-0 und den *acd5*-Mutanten gibt. Zusätzlich zum Transkriptlevel von *ACD5* sollte auch die Expression von *PR1* und *WIN3* untersucht werden. Zum einen, weil bereits gezeigt werden konnte, dass *acd5-1*-Blätter Läsionen ausbilden, die mit einem erhöhten *PR1*-Transkriptlevel einhergehen. Zum anderen wurde ebenfalls beobachtet, dass das SA-Level in *acd5-1* deutlich erhöht war (Greenberg et al. 2000). *WIN3* ist an der Regulation der SA-Akkumulation und des Zell-Tods beteiligt (Wang et al. 2011). Zur Bestimmung des relativen Transkriptlevels (RTL) wurde für 2, 8 und 24 Stunden Zink-Stress appliziert. Anschließend wurde das Transkriptlevel bestimmt und nach eventuellen Unterschieden in der Reaktion auf Zink-Stress zwischen den untersuchten Pflanzen gesucht.

Zunächst wurde das Transkriptlevel von *ACD5* näher untersucht. Nach zwei Stunden konnte kein Unterschied zwischen Kontrolle und Zink-Stress festgestellt werden (Abb. 10). Auch zwischen den untersuchten Linien konnten keine Unterschiede gefunden werden. Der RTL-Wert lag immer zwischen 230 bis 350. Nach acht Stunden Zink-Stress zeigte sich bei Col-0 jedoch ein signifikant höherer RTL-Wert. Dieser Trend konnte auch bei den beiden *acd5*-Mutanten beobachtet werden, obwohl der Unterschied nicht signifikant war. Die RTL-Werte unter Kontroll-Bedingungen lagen dabei bei etwa 230 und unter Zink-Stress zwischen 340 und 670. Die Expression unter Kontroll-Bedingungen sowie unter Zink-Stress unterschied sich dabei zwischen Col-0 und den *acd5*-Mutanten nicht. Eine längere Behandlung mit erhöhten Zink-Konzentrationen führte zu keiner weiteren Veränderung. Nach 24 Stunden zeigten sich praktisch die gleichen Ergebnisse wie nach acht Stunden Stress-Applikation (Abb. 10).

Als nächstes wurde das Transkriptlevel von *PR1* betrachtet. Auch hier konnte nach zwei Stunden kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Zink-Stress festgestellt werden. Auch zwischen Col-0 und den *acd5*-Mutanten zeigten sich keine Unterschiede. Die RTL-Werte lagen zwischen 1000 und 3000. Das Gleiche konnte nach acht Stunden Zink-Behandlung beobachtet werden. Zwar lagen die RTL-Werte mit 1300 bis 5300 etwas höher als zuvor, trotzdem zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Anders war es nach 24 Stunden Zink-Stress. Hier konnte ein signifikanter Unterschied im Transkriptlevel zwischen Kontroll- und Zink-Behandlung gefunden werden. Die Werte stiegen von 2500 bis 5500 unter Kontroll-Bedingungen auf 13 000 bis 45 000 unter Zink-Stress. Erneut konnte jedoch kein Unterschied zwischen den getesteten Linien gefunden werden (Abb. 10).

Als letztes wurde das Transkriptlevel von *WIN3* unter den verschiedenen Bedingungen bestimmt. Hier konnten bereits nach zwei Stunden erste signifikante Unterschiede beobachtet werden. Sowohl bei Col-0, als auch bei *acd5-2* zeigte sich unter Zink-Stress ein signifikant höheres Transkriptlevel als unter Kontroll-Bedingungen. Dabei war zu sehen, dass es aber auch einen Unterschied in der Transkriptmenge unter Zink-Stress zwischen Col-0 und den *acd5-Mutanten* gab. Mit einem Wert 935 ± 348 war das Transkriptlevel von *acd5-2* signifikant höher als das von Col-0 unter Zink-Stress mit einem RTL von 215 ± 89 . Im Gegensatz dazu konnte bei *acd5-1* kein signifikanter Unterschied im RTL zwischen Kontrolle und Zink-Behandlung festgestellt werden. Auch unterschied sich das Transkriptlevel unter Kontrolle und Zink-Stress nicht von den RTL-Werten von Col-0 und *acd5-2* unter Kontrolle und Zink-Behandlung. Unter Zink-Stress schien nach kurzer Zeit also *WIN3* in *acd5-2* stärker hoch reguliert zu werden als im WT. In *acd5-1* konnte dies jedoch nicht beobachtet werden. Da die Unterschiede jedoch nicht sehr stark waren und auch nur nach zwei Stunden Zink-Stress auftraten, kann dies höchstwahrscheinlich durch eine biologische Variabilität erklärt werden. Nach acht Stunden Stressbehandlung konnte nun bei allen Linien ein signifikant höheres Transkriptlevel unter Zink-Stress im Vergleich zu Kontroll-Behandlung gemessen werden. Zwischen Col-0 und den *acd5-Mutanten* sowie zwischen *acd5-1* und *acd5-2* konnte nun weder unter Kontroll- noch unter Zink-Behandlung ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die RTL-Werte unter Zink-Stress im Vergleich zu einer zweistündigen Behandlung mit Zink nach acht Stunden deutlich angestiegen waren. Lagen die RTL-Werte nach zwei Stunden noch durchschnittlich bei 470, lagen sie nach acht Stunden bereits im Schnitt bei 940. Dieser Trend konnte auch nach 24 Stunden Zink-Behandlung weiter beobachtet werden. Hier stieg der Wert ebenfalls an, im Mittel auf 2300. Ansonsten konnten die gleichen Ergebnisse, wie nach acht Stunden Zink-Behandlung beobachtet werden. Es gab einen signifikanten Anstieg des Transkriptlevels in allen drei Linien unter Zink-Stress im Vergleich zur Kontrolle, wobei sich die Linien untereinander weder unter Kontroll- noch unter Zink-Behandlung unterschieden (Abb. 10). Die *WIN3*-Expression nimmt also über die Zeit der Zink-Behandlung kontinuierlich zu. Zudem konnte beobachtet werden, dass zu Beginn der Zink-Zugabe das *WIN3* Transkriptlevel in *acd5-2* schneller hoch reguliert wurde als in Col-0.

Auf Grund der Tatsache, dass das Transkriptlevel von *WIN3* bereits nach kurzer Zeit auf Zink-Zugabe reagierte und eine kontinuierliche Steigerung der RTL-Werte über die Zeit der Zink-Behandlung zeigte, wäre *WIN3* potentiell als ein Indikator-Gen für Zink-Stress sehr gut geeignet. Deshalb wurde mittels ePlant (Waese et al. 2017) überprüft, ob *WIN3* auch durch andere abiotische Stress-Bedingungen reguliert wird. Zusätzlich wurde die Expression in verschiedenen pflanzlichen Geweben und Entwicklungsstadien überprüft. Unter abiotischem Stress zeigte sich lediglich bei Kälte nach 12 - 24 Stunden eine leichte Erhöhung des Transkriptlevels in den Wurzeln. Zusätzlich zeigte sich ein geringfügiger Anstieg der Expression nach 3 - 6 Stunden UV-B-Stress in den Blättern. Dagegen konnte

bei vielen anderen abiotischen Stress-Faktoren, wie z.B. Salz-, Trocken- oder Hitze-Stress, sowie osmotischem und oxidativem Stress, aber auch bei Eisen-Defizienz kein Unterschied in der *WIN3* Expression gefunden werden (Abb. A1A). Bei der Expression innerhalb der Pflanze konnte im vegetativen Stadium kein Unterschied in der Expression zwischen den unterschiedlichen Geweben gefunden werden. Lediglich in der reproduktiven Phase zeigte sich ein Anstieg der Expression in den

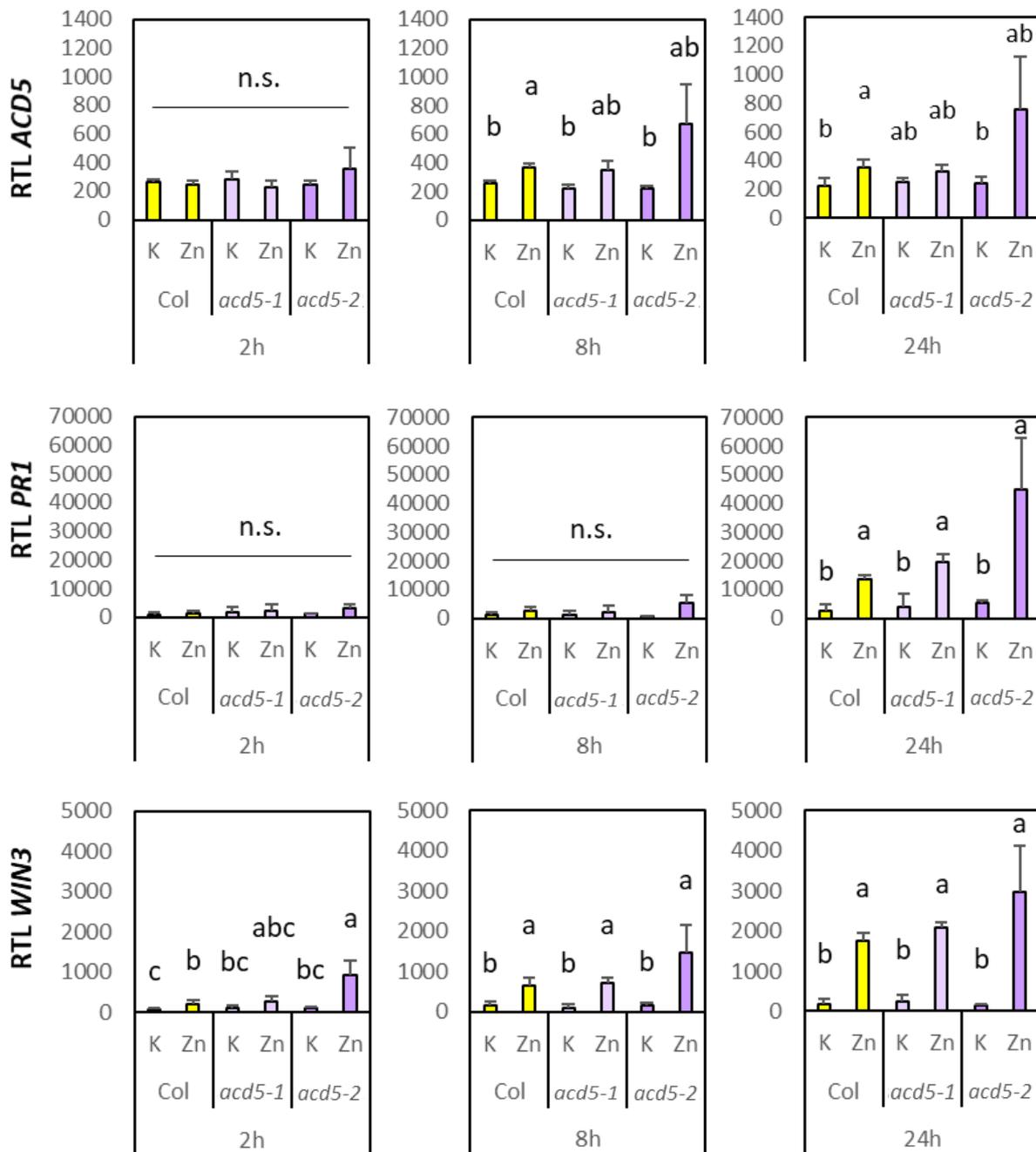


Abb. 10: Relatives Transkriptlevel von *ACD5*, *WIN3* und *PR1* unter Zink-Stress in Col-0 und *acd5*-Mutanten. Col-0, *acd5-1* und *acd5-2* wurden für 7 d in 6 well Platten angezogen und dann für 2, 8 und 24 h mit 100 μM Zn^{2+} gestresst. Anschließend wurde das *ACD5*, *WIN3* und *PR1* RTL gemessen. Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm StAbw von 2 - 5 unabhängigen Experimenten ($n = 2 - 5$). Signifikante Unterschiede wurden durch Student's t-Test ermittelt ($p \leq 0,05$).

Sepalen. Im Laufe der Entwicklung zeigten nur seneszente Blätter eine erhöhte Expression (Abb. A1B). Da es also sehr wenige Faktoren gibt, welche die Expression beeinflussen, konnte *WIN3* als Indikator-Gen für Veränderungen im Zink-Gehalt identifiziert werden.

3.1.5 Verbindung von Zink und Salicylsäure (SA)

3.1.5.1 Auswirkung der SA-Konzentration auf die Zink-Toleranz

Die Expression von *WIN3*, welches an der Regulation der SA-Akkumulation beteiligt ist, wird unter Zink-Stress induziert. Zudem wurde bereits gezeigt, dass *acd5-1*-Mutanten einen erhöhten SA-Gehalt aufweisen (Greenberg et al. 2000). Es stellte sich also die Frage, ob es eine Verbindung zwischen der Zink-Hypersensitivität und der Akkumulation von SA gibt. Um dies zu klären, wurden zunächst mehrere Mutanten auf Zink-Hypersensitivität hin untersucht, bei denen eine Mutation vorliegt, welche den SA-Stoffwechsel stört. In Vorversuchen wurden die klassischen SA-Mutanten, wie *nahG*, *sid2*, *ndr1*, *pad4*, *npr1-2* und *npr1-3* untersucht. Bei *nahG*, *sid2*, *ndr1*, *pad4* kommt es dabei zu einer reduzierten SA-Akkumulation (Wildermuth et al. 2001; Shapiro und Zhang 2001; Jirage et al. 1999). Wohingegen bei *npr1-2* und *npr1-3* die SA-Signalweiterleitung gestört ist (Jirage et al. 1999; Cao et al. 1997). Keine dieser Mutante zeigte eine Zink-Hypersensitivität.

Daraufhin wurden weitere SA-Mutanten untersucht. Eine der zu untersuchenden Mutanten war die *accelerated cell death* Mutante *acd11* (Brodersen et al. 2002). *acd11* zeigt genau wie *acd5* die Bildung von Läsionen und eine stark erhöhte SA-Akkumulation (Brodersen et al. 2005). ACD11 fungiert als Cer1P Transport-Protein. Aus diesem Grund zeigt die *acd11*-Mutante eine erhöhte Cer1P Akkumulation (Simanshu et al. 2014).

Eine weitere SA Mutante war *enhanced disease susceptibility 5 (eds5-1)* (Rogers et al. 1997) (N3735). Diese zeigt nach Pathogenbefall oder auf abiotischen Stress eine reduzierte Bildung von SA und zusätzlich eine stark reduzierte Expression von *PR1*. Zudem ist sie anfälliger für Pathogenbefall (Nawrath et al. 1999).

Des Weiteren wurden zwei SA-Mutanten untersucht, *sag101-3* (Chen et al. 2015) (SALK_022911) und *sag101-5* (SALK_030411), welche eine T-DNA-Insertion in *senescence-associated gene 11 (SAG101)* tragen. Solche Mutanten zeigen eine erhöhte Frost-Toleranz, welche abhängig von einem geringeren Gehalt an SA ist (Chen et al. 2015). Zudem interagiert SAG101 mit EDS1 und PAD4, wodurch die angeborene Immunantwort reguliert wird (Feys et al. 2005).

Zuletzt wurden noch zwei *pbs3-(avrPphB susceptible)*-Mutanten untersucht, *pbs3-1* (Nobuta et al. 2007) und *pbs3-2* (SALK_018225). Dabei ist zu beachten, dass *PBS3* ein anderer Name für *WIN3* ist. Diese Mutanten zeigen eine erhöhte Anfälligkeit für Pathogene. Dabei konnte beobachtet werden,

dass das *PR1-Transkriptlevel* und der Gehalt an SA-Glucosiden nach *P. syringae*-Infektion in den Mutanten reduziert war, während der Gehalt an freiem SA höher war als im WT (Nobuta et al. 2007).

All diese Mutanten wurden auf ihre Zink-Hypersensitivität getestet. Unter Kontroll-Bedingungen konnte zwischen Col-0 und den Mutanten kein Unterschied im Wurzelwachstum festgestellt werden. Unter 60 μM Zn^{2+} Stress zeigten lediglich *acd5-1* und *acd5-2* ein reduziertes Wurzelwachstum im Vergleich zu Col-0. Bei allen anderen Mutanten war das gleiche Wurzelwachstum wie bei Col-0 zu beobachten. *pbs3-1* zeigte sogar ein um 1 cm signifikant besseres Wurzelwachstum unter Zink-Stress. Unter 80 μM Zn^{2+} Stress konnte wieder nur bei den beiden *acd5*-Mutanten ein verkürztes Wurzelwachstum beobachtet werden. *eds5-1* und die *sag101*-Mutanten zeigten wie bei 60 μM Zn^{2+} keinen Unterschied zu Col-0. Bei *pbs3-1* konnte erneut ein um 1 cm verbessertes Wurzelwachstum festgestellt werden. Diese im Vergleich zu Col-0 gesteigerte Zink-Toleranz konnte nun auch bei *pbs3-2* beobachtet werden. Hier zeigte sich ein mit 6-8 mm signifikant besseres Wurzelwachstum (Abb. 11A). Bei *acd11* konnte weder unter 60 μM noch unter 80 μM Zink-Stress ein verändertes Wurzelwachstum zu Ler festgestellt werden (Abb. 11A).

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass unter stark erhöhten Zink-Konzentrationen eine verringerte SA-Konzentration keinen Einfluss auf die Zink-Toleranz zeigte. Sowohl *eds5-1* als auch *sag101-3* und *sag101-5* zeigten keine Veränderung in ihrem Wurzelwachstum im Vergleich zu Col-0. Mutanten mit einem erhöhten SA-Gehalt, wie hier *pbs3-1* und *pbs3-3*, zeigten eine leicht erhöhte Zink-Toleranz, wohingegen *acd11* keine Verbesserung zeigte. Für *acd5-1* ist bekannt, dass es ebenfalls zu einer erhöhten SA-Akkumulation kommt. Dies konnte bisher jedoch nur in adulten Pflanzen gezeigt werden. Ob es in *acd5-1* Keimlingen ebenfalls zu einer Veränderung in der SA-Akkumulation kommt, muss noch geklärt werden. Ob also wirklich die SA-Konzentration einen Einfluss auf die Zink-Toleranz hat, konnte hier nicht gezeigt werden.

3.1.5.2 Abhängigkeit der Zink-Hypersensitivität in *acd5*-Mutanten von der SA-Akkumulation

Als nächstes sollte jedoch überprüft werden, ob SA an der Ausprägung des Zink-hypersensitiven Phänotyps in *acd5-1* und *acd5-2* beteiligt ist. Dass die Bildung von Läsionen in *acd5-1* von der erhöhten SA-Akkumulation abhängig ist, konnte bereits gezeigt werden (Greenberg et al. 2000). Um den direkten Einfluss von SA auf die Zink-Hypersensitivität von *acd5* zu untersuchen, wurden Doppelmutanten mit *nahG* generiert. Es wurde sowohl *acd5-1* als auch *acd5-2* mit *nahG* gekreuzt. Ob der verminderte SA-Gehalt in den Doppelmutanten einen Einfluss auf die Zink-Toleranz hat, wurde mittels klassischem Wurzelwachstumsassay überprüft.

Da sich gezeigt hatte, dass es zwischen Col-0 und *nahG* unter Kontroll-Bedingungen und unter Zink-Stress keinen Unterschied im Wurzelwachstum gibt (Abb. A2), wurden die *acd5*-Mutanten und die

Doppelmutanten nur mit *nahG* verglichen. Unter Kontroll-Bedingungen zeigten *acd5-1*, *acd5-2* sowie die *nahG* x *acd5-2* Doppelmutante keinen signifikanten Unterschied im Wurzelwachstum. Anders die Doppelmutante mit *acd5-1*. Hier konnte ein um 17 mm signifikant besseres Wachstum beobachtet werden. Unter Zink-Stress zeigten *acd5-1* und *acd5-2* die bekannte Zink-Hypersensitivität im Gegensatz zu *nahG*. Die beiden Doppelmutanten zeigten mit einer Wurzellänge von 41±6 - 43±9 mm ein intermediäres Wurzelwachstum, zwischen *nahG* mit 52±10 mm und den *acd5-Mutanten* mit 22±4 - 24±8 mm (Abb. 11B). Das verminderte Wurzelwachstum konnte durch die Reduktion von SA also zum Teil aufgehoben werden. Da aber die *acd5-1* x *nahG* Doppelmutante bereits unter Kontroll-Bedingungen ein verbessertes Wurzelwachstum zeigte, wurde zusätzlich das Wachstum relativ zur

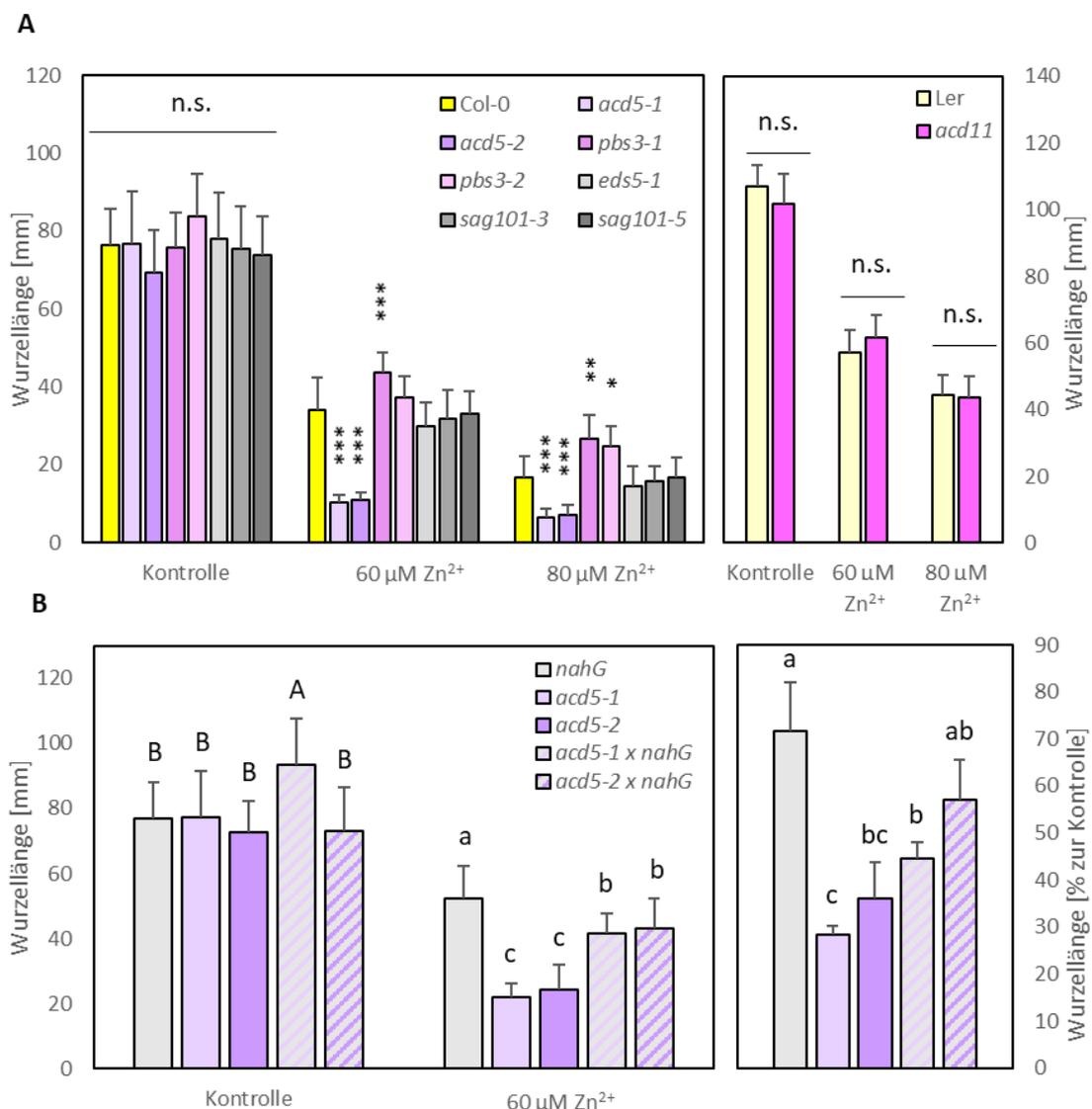


Abb. 11: Verbindung von Zink-Toleranz und Salicylsäure. Es wurde überprüft, ob die SA-Konzentration in Pflanzen einen Einfluss auf ihre Zink-Toleranz hat. **(A)** Wurzelwachstum von SA-Mutanten unter Zink-Stress. Die Pflanzen wurden für 12 - 14 Tage auf Hoagland-Platten ohne und mit 60 bzw. 80 µM Zn²⁺ angezogen. Daten repräsentieren die Mittelwerte ± StAbw von 2 - 3 unabhängigen Experimenten (n = 15 - 62). Signifikante Unterschiede wurden durch zweifaktorielle ANOVA und Tukey's HSD-Test ermittelt (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p

$\leq 0,001$). **(B)** Abhängigkeit der Zink-Hypersensitivität von der SA-Akkumulation. Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm StAbw von 3 unabhängigen Experimenten ($n = 48 - 69$). Signifikante Unterschiede wurden durch zweifaktorielle ANOVA und Tukey's HSD-Test (links) sowie Student's t-Test (rechts) ermittelt ($p \leq 0,05$).

Kontrolle betrachtet. Dabei erreichten die Wurzeln von *nahG* unter Zink-Stress 70% der Wurzellänge von *nahG* unter Kontroll-Bedingungen. Die beiden *acd5*-Mutanten zeigten noch immer ein signifikant schlechteres Wurzelwachstum. Es konnten nur 28 - 40 % der Wurzellänge im Vergleich zur Kontrolle erreicht werden. Dabei war zwischen den beiden Mutanten kein signifikanter Unterschied in der Reduktion der Wurzellänge zu beobachten. Die *acd5-1 x nahG* Doppelmutante zeigte mit 45 % im Vergleich zu *nahG* ebenfalls eine signifikante Reduktion der Wurzellänge unter Zink-Stress. Dabei war das Wachstum aber gleichzeitig besser als bei der *acd5-1* Einzelmutante mit 29%. Die *acd5-2 x nahG* Doppelmutante zeigte mit 57 % ebenfalls ein besseres Wachstum als die *acd5-2* Einzelmutante mit 35 %. Im Gegensatz zu *acd5-1 x nahG* konnte bei *acd5-2 x nahG* kein signifikanter Unterschied mehr zu *nahG* festgestellt werden. Da also in beiden Doppelmutanten eine zu den *acd5*-Mutanten gesteigerte Zink-Toleranz zu sehen war, konnte gezeigt werden, dass die Zink-Hypersensitivität von *acd5-1* und *acd5-2* teilweise von der SA-Konzentration abhängig ist.

3.1.6 Spontaner Zelltod in *acd5*-Mutanten

Auf Grund der vorangegangenen Ergebnisse könnte man die Hypothese aufstellen, dass die SA-Konzentration in *acd5-2* wie in *acd5-1* erhöht ist, da eine Reduktion des SA-Gehaltes in *nahG x acd5-2* Doppelmutanten die Zink-Toleranz steigerte. Bei der Anzucht der drei *acd5*-Mutanten konnte jedoch beobachtet werden, dass *acd5-2* keine Läsionen ausbildete. Es konnte aber bereits gezeigt werden, dass *acd5-1* nach fünf Wochen erste Läsionen aufweist, welche mit einer erhöhte SA-Akkumulation korrelieren (Greenberg et al. 2000). Dies sollte nun genauer untersucht werden. Dazu wurden Col-0 und die drei *acd5*-Mutanten auf Erde angezogen und die Bildung von Läsionen wöchentlich dokumentiert (Abb. 12A, B).

Nach vier Wochen auf Erde konnten bei keiner der Pflanzen Läsionen festgestellt werden. Nach fünf Wochen zeigten sich bei *acd5-1* die ersten Läsionen. Auch *acd5-3* zeigte dies vereinzelt. Bei *acd5-3* konnte jedoch noch kein signifikanter Unterschied zu Col-0 beobachtet werden. Bei *acd5-1* hingegen war die Bildung von Läsionen signifikant höher als bei Col-0. Nach sechs Wochen nahm die Bildung von Läsionen bei *acd5-1* von 14 auf 44 % befallener Blätter, massiv zu. *acd5-2* zeigte noch immer keine Läsionen und auch wenn bei *acd5-3* Läsionen zu sehen waren, unterschied sich deren Menge noch nicht signifikant von Col-0 oder *acd5-2*. Nach sieben Wochen war auch bei *acd5-3* ein starker

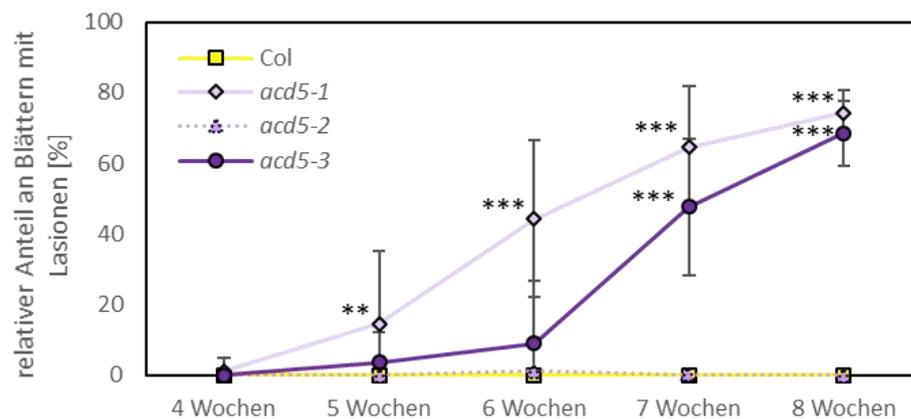
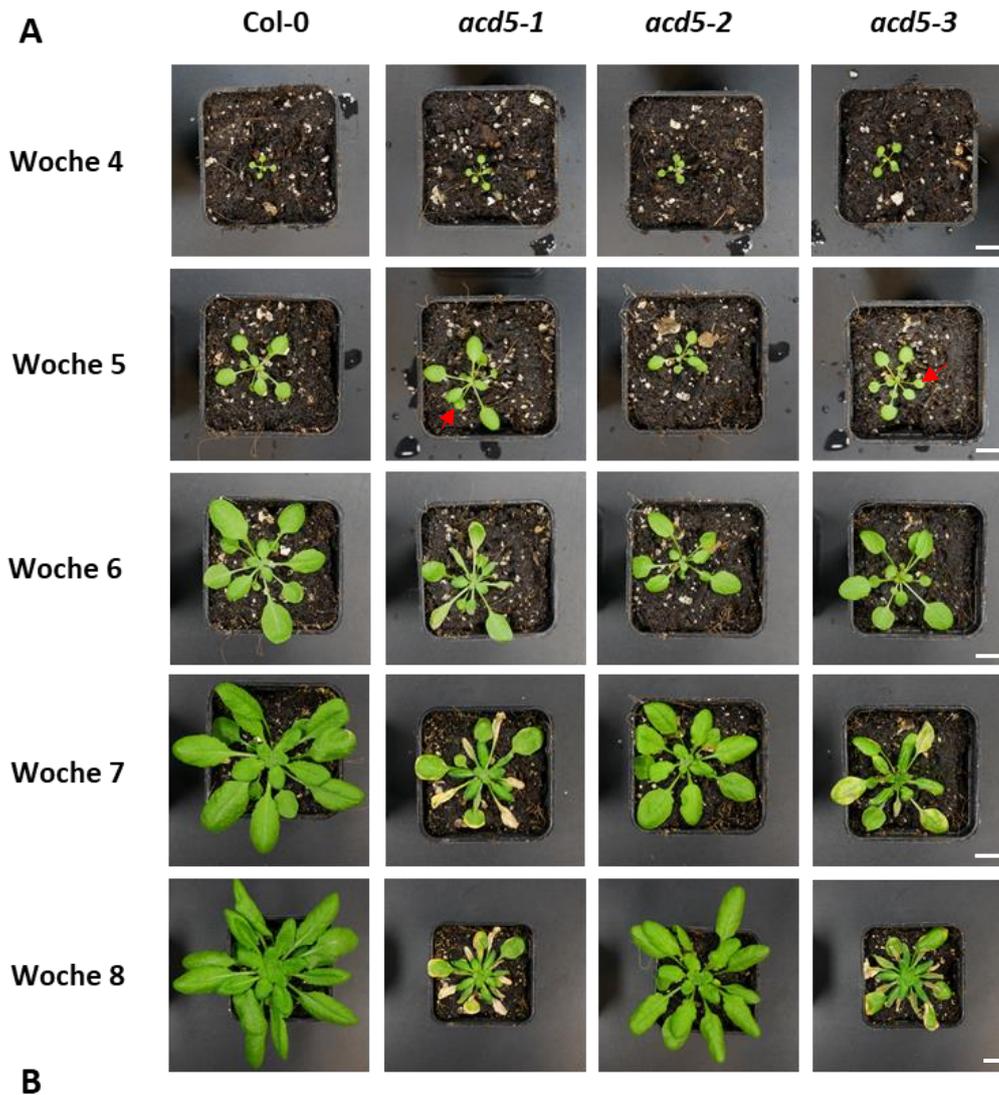


Abb. 12: Langzeit Entwicklung von Col-0 und *acd5*-Mutanten auf Erde. Dazu wurden Pflanzen 4 Wochen lang auf Erde angezogen (**A**) Nach 4 Wochen wurde die Entwicklung alle 7 d photographisch festgehalten. Die Bilder zeigen repräsentative Pflanzen von drei unabhängigen Experimenten. Pfeile zeigen Läsionen bei 5 Wochen alten Pflanzen. (**B**) Anhand dieser Fotos wurde der Anteil der von mit Läsionen befallenen Blätter im Verhältnis zur Gesamt-Blatt-Zahl ermittelt. Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm StAbw von 3 unabhängigen Experimenten ($n = 15$). Signifikante Unterschiede wurden durch Student's t-Test ermittelt. Sterne zeigen Statistische Unterschiede zu Col-0 an (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Längenstandard = 1 cm

Anstieg an mit Läsionen befallener Blätter zu beobachten. Mit einem Befall von 48 % der Blätter wies nun auch *acd5-3* einen signifikant höheren Anteil an Läsionen auf als Col-0 und *acd5-2*. Auch in *acd5-1* nahm die Bildung von Läsionen weiter zu. So zeigte mit einem Anteil von 65 % an befallenen Blättern immer noch *acd5-1* den höchsten Wert. *acd5-2* zeigte nach wie vor keine Läsionen. Nach acht Wochen nahm der Anteil an befallenen Blättern in *acd5-1* und *acd5-3* noch weiter bis auf 68% bei *acd5-1* und 74 % bei *acd5-3* zu. Beide zeigten die gleiche signifikant erhöhte Bildung von Läsionen im Vergleich zu Col-0 und *acd5-2*. Sowohl bei Col-0 als auch bei *acd5-2* konnte über die gesamte Dauer der Kultivierung keine Bildung von Läsionen beobachtet werden. Diese Ergebnisse würden wiederum einer erhöhten SA-Akkumulation in *acd5-2* widersprechen. Da gezeigt wurde, dass die Bildung von Läsionen in *acd5-1* SA-abhängig ist, liegt die Vermutung nahe, dass sich bei einer erhöhten SA-Akkumulation in *acd5-2* auch hier Läsionen bilden würden. Sollte die erhöhte SA-Akkumulation jedoch nur nötig, aber nicht hinreichend sein, um die Bildung von Läsionen auszulösen, könnte ein weiterer Faktor in *acd5-2*, trotz erhöhter SA-Konzentrationen, dazu führen, dass sich keine Läsionen bilden.

3.1.7 Unabhängigkeit der Zink-Hypersensitivität von der Eisen-Verfügbarkeit

Aber nicht nur SA könnte Einfluss auf die Zink-Hypersensitivität nehmen. Auch ein Eisenmangel könnte zu einer Reduzierung des Wurzelwachstums führen. Zu Beginn wurde erwähnt, dass ein Zink-Überschuss zu einem physiologischen Eisenmangel führen kann, da Zink Eisen aus Eisen-bindenden Proteinen verdrängen kann (Arrivault et al. 2006). Viele Transporter, welche für die Eisenaufnahme verantwortlich sind, können auch Zink transportieren. Eine gesteigerte Zink-Konzentration im Medium kann nun dazu führen, dass Zink und Eisen um die Transporter konkurrieren. Bedingt durch die erhöhten Zink-Konzentrationen wird dabei vermehrt Zink und weniger Eisen in die Zelle aufgenommen. Dadurch entsteht ein Eisenmangel, welcher ebenfalls den beobachteten Phänotyp auslösen könnte. Um nun herauszufinden, ob ein physiologischer Eisenmangel, ausgelöst durch Zink-Überschuss, oder eine Zink-Hypersensitivität für das reduzierte Wurzelwachstum verantwortlich war, wurden folgende zwei Experimente durchgeführt, ein Eisen-Rettungs- und ein Eisen-Transferexperiment.

3.1.7.1 Eisen-Rettungsexperiment

Zum einen wurde getestet, ob eine übermäßige Eisen-Zugabe mit gleichzeitigem Zink-Stress das reduzierte Wurzelwachstum aufheben kann. Das Prinzip hier war, dass versucht werden sollte, einem Eisenmangel durch erhöhte Eisen-Zugabe vorzubeugen. Wird dem Medium eine erhöhte Zink-Konzentration zugegeben, wird vermehrt Zink aufgenommen. Durch die Konkurrenz um die Aufnahmetransporter, wird dabei gleichzeitig auch weniger Eisen aufgenommen. Wird dem Medium

sowohl Zink als auch Eisen im Überschuss zugegeben, liegen beide Metalle etwa zu gleichen Teilen vor. Bei der Aufnahme wird also nicht länger vermehrt Zink, sondern auch wieder Eisen aufgenommen (Abb. 13A).

Keimlinge von Col-0 und *acd5-2* wurden für dieses Experiment unter vier Bedingungen kultiviert. Zum einen wurde das Wurzelwachstum unter Kontroll-Bedingungen beobachtet. Wie in vorangegangenen Experimenten zeigte sich hier kein Unterschied im Wurzelwachstum. Auch eine erhöhte Eisen-Konzentration im Medium führte zu keinem Unterschied in den Wurzellängen untereinander. Unter Zink-Stress konnte wieder ein hoch signifikant reduziertes Wurzelwachstum von *acd5-2* im Vergleich

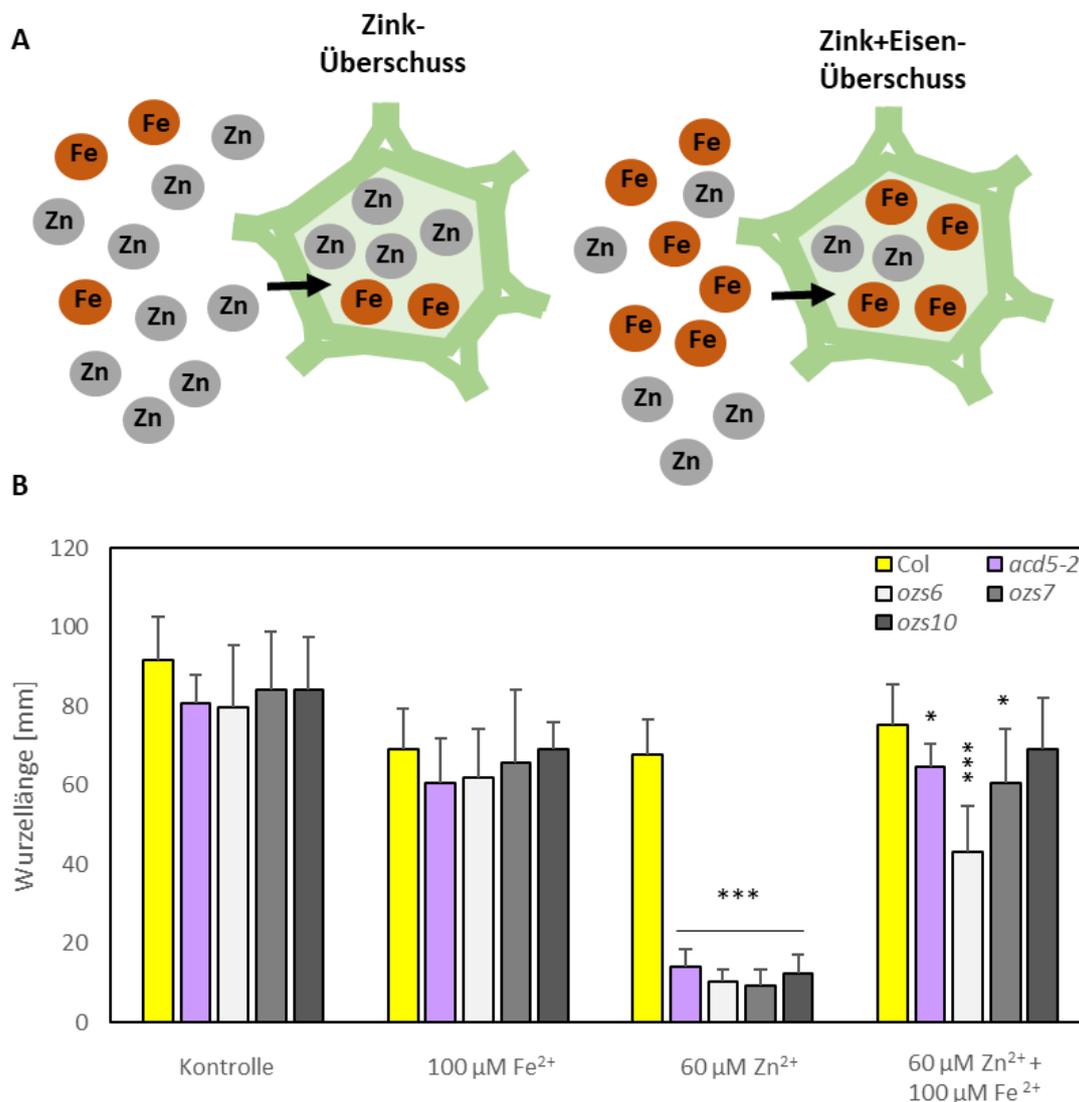


Abb. 13: Eisen-Unabhängigkeit der Zink-hypersensitiven Reduktion des Wurzelwachstums bei *acd5*-Mutanten. Dazu wurden Col-0 und verschiedene *ozs*-Linien für 12 d entweder auf Kontroll-Medium, 100 µM Fe²⁺, 60 µM Zn²⁺ oder 100 µM Fe²⁺ zusammen mit 60 µM Zn²⁺ angezogen. **(A)** Schematische Darstellung des Rettungsexperiments. **(B)** Eisen-Rettungsexperiment mit *acd5-2* und weiteren *ozs*-Mutanten. Daten repräsentieren die Mittelwerte ± StAbw von 3 unabhängigen Experimenten (n = 46 - 57). Signifikante Unterschiede wurden durch zweifaktorielle ANOVA und Tukey's HSD-Test ermittelt. Sterne zeigen statistische Unterschiede zu Col-0 an (*p ≤ 0,05; ***p ≤ 0,001).

zu Col-0 gezeigt werden. Wurden Keimlinge nun sowohl erhöhten Eisen- als auch Zink-Konzentrationen ausgesetzt, konnte noch immer ein signifikanter Unterschied zwischen Col-0 und *acd5-2* festgestellt werden. Zwar zeigte *acd5-2* mit einer Reduktion des Wurzelwachstums um 1 cm keinen so großen Unterschied im Wurzelwachstum zu Col-0 wie unter Zink-Stress mit 3 cm, gänzlich konnte das Wurzelwachstum durch die erhöhte Eisengabe aber nicht gerettet werden (Abb. 13B). Ein Eisen-Mangel allein konnte die Reduktion des Wurzelwachstums also nicht erklären. Dass es zu einer vollständigen Rettung der Zink-Hypersensitivität durch zusätzliche Eisen-Zugabe kommen kann, konnte jedoch an einer anderen *ozs*-Mutante gezeigt werden (Abb. 13B). In *ozs10* führt eine Erhöhung der Eisen-Konzentration unter Zink-Stress dazu, dass die Pflanze wieder das gleiche Wurzelwachstum wie Col-0 zeigte (Abb. 13B). Hier scheint also ein physiologischer Eisenmangel der Grund für das verkürzte Wurzelwachstum unter Zink-Stress zu sein. Dass sich ein solcher Eisenmangel auch weniger stark auf die Reduktion des Wurzelwachstums unter Zink-Stress auswirken kann als bei *acd5-2*, zeigte sich bei *ozs6*. Hier zeigten die Wurzeln unter Eisen- und Zink-Überschuss eine deutliche Reduktion im Wachstum. Wieder andere *ozs*-Mutanten, wie *ozs7*, zeigten die gleiche Reaktion unter erhöhten Eisen- und Zink-Konzentrationen wie *acd5-2* (Abb. 13B). Bei diesem Experiment könnte das verbesserte Wurzelwachstum bei Eisen- und Zink-Stress aber auch dadurch erklärt werden, dass bedingt durch die höheren Eisen-Konzentrationen mehr Eisen und weniger Zink aufgenommen wurde. Dadurch wäre die Zink-Konzentration in der Pflanze so niedrig, dass sie die Zink-Hypersensitivität nicht auslösen könnte. Deshalb wurde anschließend ein Eisen-Transferexperiment durchgeführt.

3.1.7.2 Eisen-Transferexperiment

Um zu testen, ob unter den „hoch-Eisen“-Bedingungen lediglich die durch Konkurrenz verursachte verminderte Zink-Aufnahme für die Abschwächung des Phänotyps verantwortlich ist, wurden Pflanzen im Laufe ihrer Entwicklung auf verschiedenen Medien angezogen. Dabei wurden Keimlinge von Col-0 und den drei *ACD5*-Allelen (*acd5-1*, *acd5-2*, *acd5-3*) zum einen zur Kontrolle auf Kontroll-Medium angezogen und dann nach vier Tagen auf Zink-Stress-Medium umgesetzt. Zum anderen wurden die Pflanzen zunächst für vier Tage auf Medium mit erhöhtem Eisen-Gehalt kultiviert. Dabei konnten die Keimlinge reichlich Eisen aufnehmen, sodass ein Anstieg der Zink-Konzentration weniger effektiv zu einer Eisen-Verdrängung führt. Auch diese Keimlinge wurden anschließend auf Zink-Stress-Medium umgesetzt. Durch die zeitliche Trennung der Metall-Aufnahmen wurde eine Konkurrenz bei der durch Transporter vermittelten Aufnahme von Zink und Eisen vermieden (Abb. 14A).

Keimlinge der *acd5*-Mutanten, die zunächst auf Kontroll-Medium wuchsen, zeigten unter Zink-Stress die bereits beobachtete hochsignifikante Reduktion des Wurzelwachstums im Vergleich zu Col-0. Alle drei Allele zeigten eine Verkürzung der Wurzel um etwa 3,5 cm. Ist die Reduktion des Wurzelwachstums auf einen physiologischen Eisen-Mangel zurückzuführen, sollten Keimlinge, welche zuvor auf Medium mit einem erhöhten Eisen-Gehalt angezogen wurden, eine verminderte Reduktion in der Wurzellänge zeigen, da die Zellen mit Eisen gesättigt sind. Sollte der Phänotyp jedoch auf einer Zink-Toxizität beruhen, sollte auch eine gesteigerte Eisen-Konzentration in der Pflanze nicht zu einem verbessertem Wurzelwachstum führen. Nach dem Transfer von „hoch-Eisen“-Bedingungen auf Zink-Stress-Medium zeigten alle drei *acd5*-Mutanten eine hochsignifikante Reduktion des Wurzelwachstums. Auch hier lag die Reduktion bei etwa 3 - 3,5 cm (Abb. 14B). Damit konnte gezeigt werden, dass der beobachtete Phänotyp der verkürzten Wurzeln auf eine Zink-Toxizität zurückzuführen war, und nicht durch einen physiologischen Eisenmangel ausgelöst wurde.

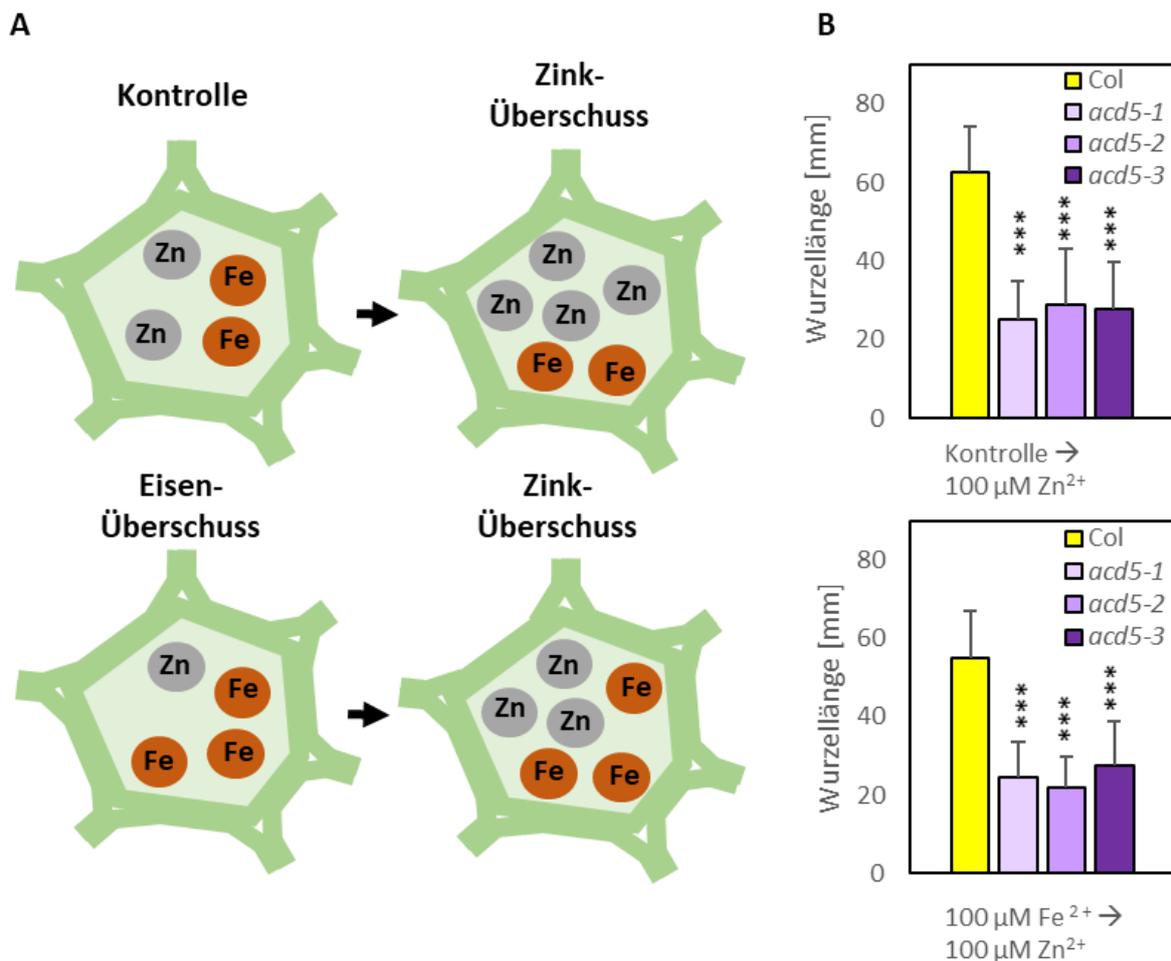


Abb. 14: Eisen-Unabhängigkeit der Zink-hypersensitiven Reduktion des Wurzelwachstums bei *acd5*-Mutanten. Dazu wurden Col-0 und verschiedene *acd5*-Linien zunächst für 4 Tage auf Kontroll-Medium oder 100 µM Fe²⁺ angezogen, bevor sie für weitere 8 – 10 Tage auf 100 µM Zn²⁺ umgesetzt wurden. **(A)** Schematische Darstellung des Transferexperiments. **(B)** Daten repräsentieren die Mittelwerte ± StAbw von 3 unabhängigen Experimenten (n = 46 - 57). Signifikante Unterschiede wurden durch zweifaktorielle ANOVA und Tukey's HSD-Test ermittelt. Sterne zeigen statistische Unterschiede zu Col-0 an (***) (***p ≤ 0,001).

3.1.8 Kältehypersensitivität von *acd5-2*

Im Rahmen der Masterarbeit konnte nicht nur eine Hypersensitivität von *acd5-2* gegenüber Zink festgestellt werden, sondern auch gegenüber Kälte.

3.1.8.1 Reduktion des Wurzelwachstums unter Kälte-Stress

Um nun zu prüfen, ob die Kälte-Hypersensitivität ebenfalls durch die Mutation in *ACD5* verursacht wurde, wurden die *ACD5*-Allele, *acd5-1* und *acd5-3*, sowie die Komplementationslinien auf ihre Reaktion auf Kälte hin überprüft. Unter Kälteeinwirkung konnte bei *acd5-2* erneut eine hoch signifikante Reduktion des Wurzelwachstums beobachtet werden. Die beiden weiteren *acd5*-Mutanten, *acd5-1* und *acd5-3*, zeigten hingegen keine verkürzten Wurzeln. *acd5-3* wies sogar etwas längere Wurzeln auf als Col-0. Die Komplementationslinien, sowohl mit 35S als auch mit dem nativen Promotor, zeigten hingegen ebenfalls eine Reduktion des Wurzelwachstums (Abb. 15A). Betrachtet man die unter Kältestress am besten wachsenden Komplementationslinie *acd5+35S::ACD5#6-2*, zeigt diese ein signifikant besseres Wurzelwachstum als *acd5-2*. Die Kälte-Hypersensitivität konnte also nur teilweise komplementiert werden. Die in *acd5-2* identifizierte Punktmutation in *ACD5* scheint also nicht allein für den Kälte-Phänotyp verantwortlich zu sein.

3.1.8.2 Verbindung zwischen Zink- und Kälte-Hypersensitivität

Da *acd5-2* durch EMS-Mutagenese generiert wurde, könnte es eine weitere Mutation in *acd5-2* geben, welche die Kälte-Hypersensitivität auslöst. Durch chemische Modifikationen von Nukleotiden führt EMS zu Fehlpaarungen und daraus resultierendem Basen-Austausch. Dabei führt EMS zu einer zufälligen Verteilung von Mutationen im gesamten Genom (Greene et al. 2003). Um Mutationen herauszukreuzen, welche nicht an der Zink-Hypersensitivität beteiligt sind, wurden EMS mutagenisierte Pflanzen mit Col-0 rück gekreuzt und auf Zink-Hypersensitivität hin selektiert. Weitere solcher RK-Linien wurden auf Zink- und Kältesensitivität hin überprüft.

Zusätzlich zu *acd5-2* wurden fünf weitere Rückkreuzungslinien, welche allesamt Zink-hypersensitiv waren, auf ihre Kältesensitivität hin überprüft. Unter Kontroll-Bedingungen zeigten dabei die Rückkreuzungslinien (RK) 2, 6, 15 und 18 ein signifikant reduziertes Wurzelwachstum. Frühere Untersuchungen in der Masterarbeit konnten aber klar zeigen, dass die Reduktion unter Kontroll-Bedingungen genetisch nicht mit der Zink-Hypersensitivität gekoppelt ist. Das gleiche sollte nun auch für die Kältesensitivität aufgezeigt werden. Wie zuvor konnte eine signifikante Reduktion des Wurzelwachstums unter Kältestress bei *acd5-2* festgestellt werden. Aber auch alle anderen getesteten RK-Linien zeigten eine signifikante Reduktion in der Wurzellänge im Vergleich zu Col-0 (Abb. 15B). Es konnte also keine Trennung der beiden Phänotypen beobachtet werden. Dies könnte eventuell daran

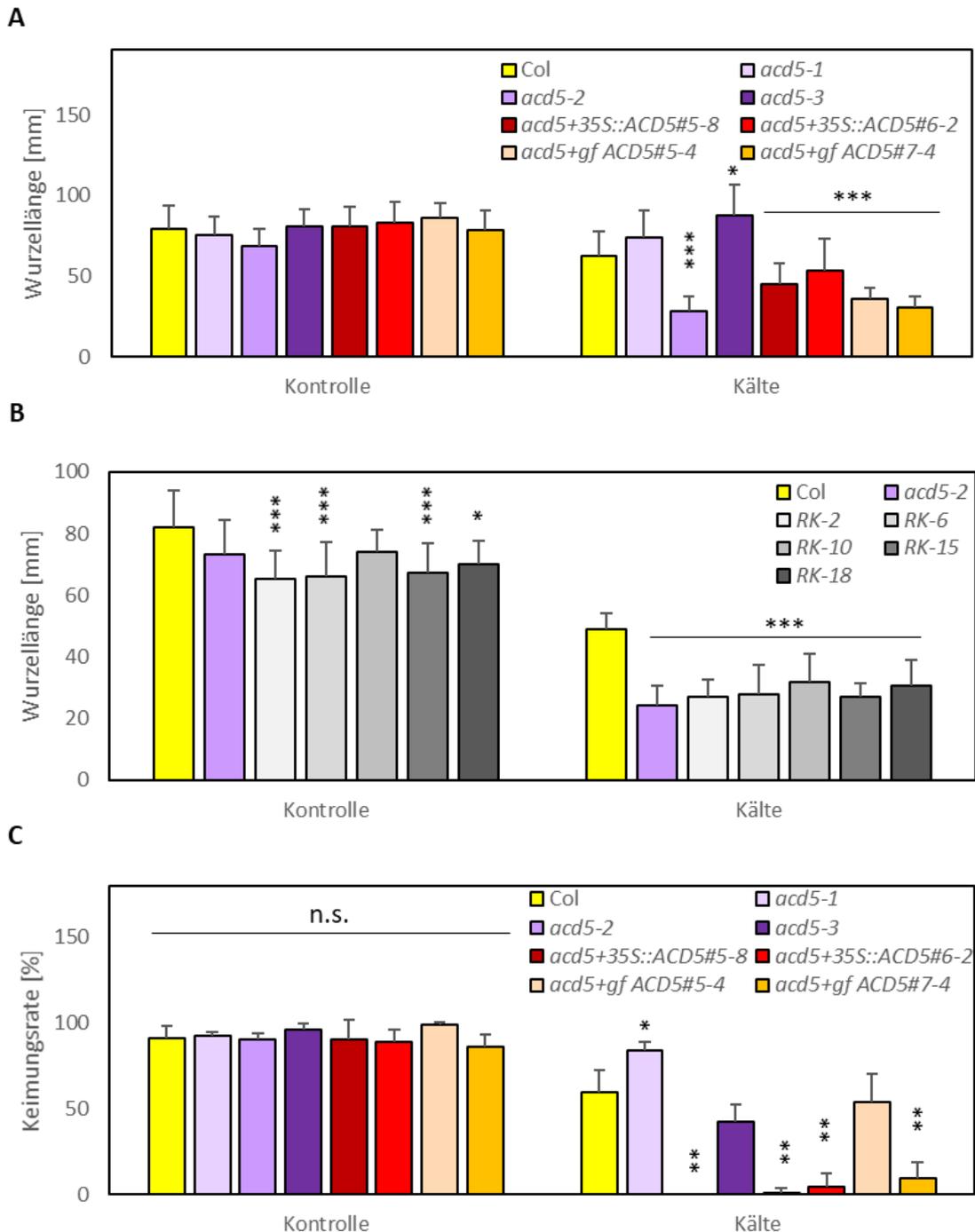


Abb. 15: Phänotypen der *ACD5* Allele und Komplementationslinien unter Kälteeinfluss. Es wurde die Reaktion von Col-0, *acd5*-Mutanten und *ACD5* Komplementationslinien auf Kälte untersucht. **(A)** Länge der Primärwurzel nach 6 Wochen Wachstum bei 4°C. Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm StAbw von 3 - 7 unabhängigen Experimenten (n = 60 - 132). Signifikante Unterschiede wurden durch zweifaktorielle ANOVA und Tukey's HSD-Test ermittelt. Sterne zeigen statistische Unterschiede zu Col-0 an (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$). **(B)** Länge der Primärwurzel von Col-0 und verschiedener Zink-hypersensitiver RK-Linien von *acd5-2* nach 5 Wochen Wachstum bei 4°C. Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm StAbw von 2 unabhängigen Experimenten (n = 25 - 36). Signifikante Unterschiede wurden durch zweifaktorielle ANOVA und Tukey's HSD-Test ermittelt. Sterne zeigen statistische Unterschiede zu Col-0 an (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$). **(C)** Keimungsrate. Samen wurden für 3 Wochen im Dunkeln bei 4°C kultiviert. Anschließend wurden gekeimte Samen ausgezählt. Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm StAbw von 3 unabhängigen Experimenten (n = 150). Signifikante Unterschiede wurden durch Student's t-Test ermittelt. Sterne zeigen statistische Unterschiede zu Col-0 an (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

liegen, dass die „kausale Mutation“ doch für die Kältesensitivität verantwortlich ist. Eine andere Erklärung wäre aber auch, dass eine zusätzliche Mutation für den Kälte-Phänotyp verantwortlich ist, welche sich in räumlicher Nähe zu der „kausalen Mutation“ befindet. Auf Grund der Tatsache, dass die beiden anderen Allele *acd5-1* und *acd5-3* keine Reaktion auf Kälte-Stress zeigten, ist die zweite Interpretation als wahrscheinlicher einzustufen.

3.1.8.3 Einfluss von Kälte auf die Keimungsrate

Dass eine Mutation in *ACD5* Auswirkungen auf die Kälte-Toleranz haben kann, wurde bereits früher beobachtet (Dutilleul et al. 2015). Es wurde gezeigt, dass sich Kälte auf die Keimfähigkeit von *acd5-1* Samen auswirkt. Dabei wurden Col-0 und *acd5-1* Samen für 14 Tage bei 4°C im Dunkeln kultiviert. Anschließend zeigte *acd5-1* eine um 49% signifikant niedrigere Keimungsrate als Col-0. Dieses Experiment sollte hier mit den anderen beiden *acd5-Mutanten* und den Komplementationslinien wiederholt werden. Da aber nach 14 Tagen bei 4°C keine Keimung, auch nicht bei Col-0, zu beobachten war, wurden die Pflanzen für insgesamt 21 Tage kultiviert. Nach dieser Zeit konnte eine Keimung beobachtet werden (Abb. 15C). Unter Kontroll-Bedingungen konnte kein Unterschied in der Keimfähigkeit der Samen festgestellt werden. Alle Linien zeigten eine Keimungsrate von etwa 90%. Nach 21 Tagen Kälte-Behandlung zeigte Col-0 eine Keimungsrate von 60%. *acd5-1* hingegen zeigte hier keine verringerte Keimungsrate. Das Gegenteil war der Fall. Es konnte mit 84% eine signifikant bessere Keimung beobachtet werden als bei Col-0. Wie in dem vorangegangenen Kälte-Experiment zeigte nur *acd5-2* eine Kälte-Hypersensitivität. Während *acd5-3* keine Veränderung in der Keimfähigkeit im Vergleich zu Col-0 zeigte, konnte *acd5-2* unter Kälteeinfluss nicht zum Keimen gebracht werden. Komplementationslinien mit 35S Promotor zeigten mit 1 bzw. 5% ebenfalls eine signifikant verminderte Keimungsrate. Bei den Komplementationslinien mit nativem Promotor hingegen konnte eine der beiden Linien (*acd5+gf ACD5#5-4*) die Keimungsrate von Col-0 erreichen. Die Linie *acd5+gf ACD5#7-4* hingegen wies mit 9% ebenfalls eine signifikant geringere Keimfähigkeit auf (Abb. 15C). Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede könnte ein unterschiedliches *ACD5*-Transkriptlevel in den verschiedenen Komplementationslinien sein.

3.1.9 Relatives Transkriptlevel von *ACD5*

Aus diesem Grund sollte das *ACD5* Transkript in Col-0, den *acd5*-Mutanten und den Komplementationslinien gemessen werden. Da es sich bei *acd5-3* um eine T-DNA-Insertionslinie handelt, sollte hier entweder gar kein Transkript mehr vorhanden sein oder nur noch sehr wenig. Da in anderen Arbeiten kein kompletter Knockout von *ACD5* gefunden werden konnte, wurde bereits spekuliert, dass *ACD5* ein essentielles Gen sei (Dutilleul et al. 2015). Deshalb wurde hier lediglich ein vermindertes Transkriptlevel erwartet. Bei den Komplementations-Linien mit 35S Promotor wurde

ein entsprechend hoher RTL-Wert erwartet, da der Promotor zur Überexpression führt. Die komplementierten Linien mit nativem Promotor sollten annähernd an die Expression des WT_s heranreichen.

Um das ACD5-Transkriptlevel in den unterschiedlichen Linien zu bestimmen, wurden sie für sieben Tage auf Hoagland-Kontroll-Platten kultiviert. Bei der Messung des RTL-Wertes zeigte sich, dass die beiden *acd5*-Mutanten, *acd5-1* und *acd5-2*, keinen Unterschied in ihrem Transkriptlevel im Vergleich zu Col-0 aufwiesen. Die T-DNA-Insertionslinie *acd5-3* hingegen zeigte wie erwartet einen signifikant geringeren RTL-Wert auf. War bei Col-0 und *acd5-1* und *acd5-2* noch ein RTL-Wert von etwa 250 zu beobachten, konnte bei *acd5-3* nur noch ein RTL-Wert von 12 ± 2 gemessen werden. Somit lag hier ein Knockdown, aber kein kompletter Knockout vor. Bei den Komplementationslinien mit 35S Promotor zeigte vor allem die Linie *acd5+35S::ACD5#5-8* mit einem RTL-Wert von 8995 ± 1431 eine stark erhöhte Expression. *acd5+35S::ACD5#6-2* zeigte mit einem durchschnittlichen RTL-Wert von 1704 ± 1877 ebenfalls eine gesteigerte Expression. Da hier zwischen den einzelnen Messungen jedoch größere Schwankungen zu beobachten waren, konnte kein signifikanter Unterschied zu Col-0 oder den *acd5*-Mutanten festgestellt werden. Bei den Komplementationslinien mit nativem Promotor zeigte *acd5+gf ACD5#5-4* mit einem RTL-Wert von 1525 ± 131 zwar einen geringeren Wert als die Komplementationslinien mit 35S Promotor, dieser lag aber immer noch deutlich über dem Level von Col-0. *acd5+gf ACD5#7-4* zeigte mit einem RTL-Wert von 647 ± 72 am ehesten eine vergleichbare Expression zum WT. Es konnte aber immer noch ein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen den *gf* Linien und Col-0 und den *acd5*-Mutanten gesehen werden (Abb. 16).

Als nächstes wurden die RTL-Werte mit dem Kältephänotyp verglichen. Bei den *acd5*-Mutanten zeigte lediglich *acd5-2* eine Reduktion des Wurzelwachstums und der Keimfähigkeit im Vergleich zu Col-0, nicht so *acd5-1*. Diese zeigte das gleiche Wurzelwachstum wie Col-0 und sogar eine leicht verbesserte Keimungsrate unter Kälte-Stress. Die beiden Mutanten haben also annähernd die gleiche ACD5-Expression und wie später gezeigt werden konnte, (3.1.11) auch die gleiche verminderte CerK-Aktivität. *acd5-3* dagegen zeigte ein signifikant niedrigeres Transkriptlevel und als einzige Linie ein leicht verbessertes Wurzelwachstum unter Kälte-Stress. Die Keimungsrate war jedoch die gleiche wie bei Col-0. Die Komplementationslinien, welche alle eine Reduktion des Wurzelwachstums unter Kälte zeigten, vergleichbar mit *acd5-2*, zeigten ebenfalls alle eine erhöhte ACD5 Expression. Dabei waren die Unterschiede im RTL-Wert zwischen diesen Linien sehr groß. Zeigte doch *acd5+35S::ACD5#5-8* einen RTL-Wert von 8995 ± 1431 und *acd5+gf ACD5#7-4* nur von 647 ± 72 . Bei der Keimungsrate konnten Unterschiede zwischen den Komplementationslinien festgestellt werden. Die beiden 35S-Linien sowie

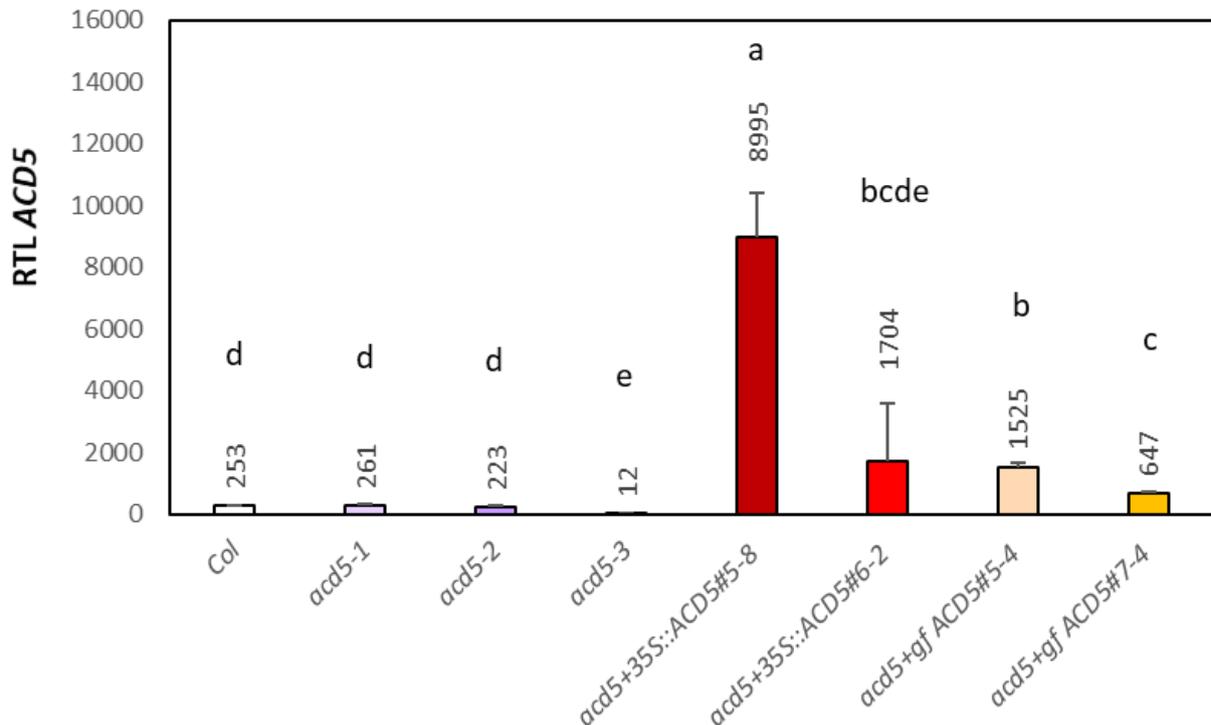


Abb. 16: Relatives Transkriptlevel von ACD5 in verschiedenen Pflanzenlinien. Analyse des ACD5 Transkriptlevels mittels quantitativer realtime PCR. Dazu wurden die Pflanzen für 7 d auf Hoagland-Kontroll-Platten angezogen. Zur Normalisierung wurden PP2A und UBC9 verwendet. Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm StAbw von 3 - 6 unabhängigen Experimenten ($n = 3 - 6$). Signifikante Unterschiede wurden durch Student's t-Test ermittelt ($p \leq 0,01$).

acd5+gf ACD5#7-4 zeigten alle eine signifikant schlechtere Keimfähigkeit als Col-0. Die Keimungsrate lag jedoch über der von *acd5-2*, welche keine Keimung mehr aufwies. *acd5+gf ACD5#5-4* hingegen zeigte eine mit Col-0 vergleichbare Keimungsrate. Dabei ließ sich bei dem Transkriptlevel zwischen *acd5+35S::ACD5#6-2*, *acd5+gf ACD5#5-4* und *acd5+gf ACD5#7-4* kein signifikanter Unterschied erkennen. Vor allem bei *acd5+35S::ACD5#6-2* mit einem RTL-Wert von 1704 ± 1877 und *acd5+gf ACD5#5-4* mit 1560 ± 131 lagen die Werte nah beieinander. Die Keimungsraten unterschieden sich hier jedoch deutlich. *acd5+35S::ACD5#6-2* zeigte eine Keimungsrate von 5%, wohingegen *acd5+gf ACD5#5-4* mit 54 % eine Keimungsrate wie der WT aufwies. Die Ergebnisse legen also nahe, dass die verminderte Keimungsfähigkeit und das reduzierte Wurzelwachstum unter Kälte nicht von der ACD5 Transkriptmenge abhängen.

3.1.10 Lokalisation von ACD5

Eine weitere mögliche Erklärung für die beobachteten Unterschiede zwischen den ACD5-Allelen könnte eine Veränderung in der Lokalisation von ACD5 innerhalb der Zelle sein. Dazu wurden verschiedene Kombinationen aus GFP markierten ACD5-Varianten ($ACD5_{WT}$, $ACD5_{mut1}$, $ACD5_{mut2}$)

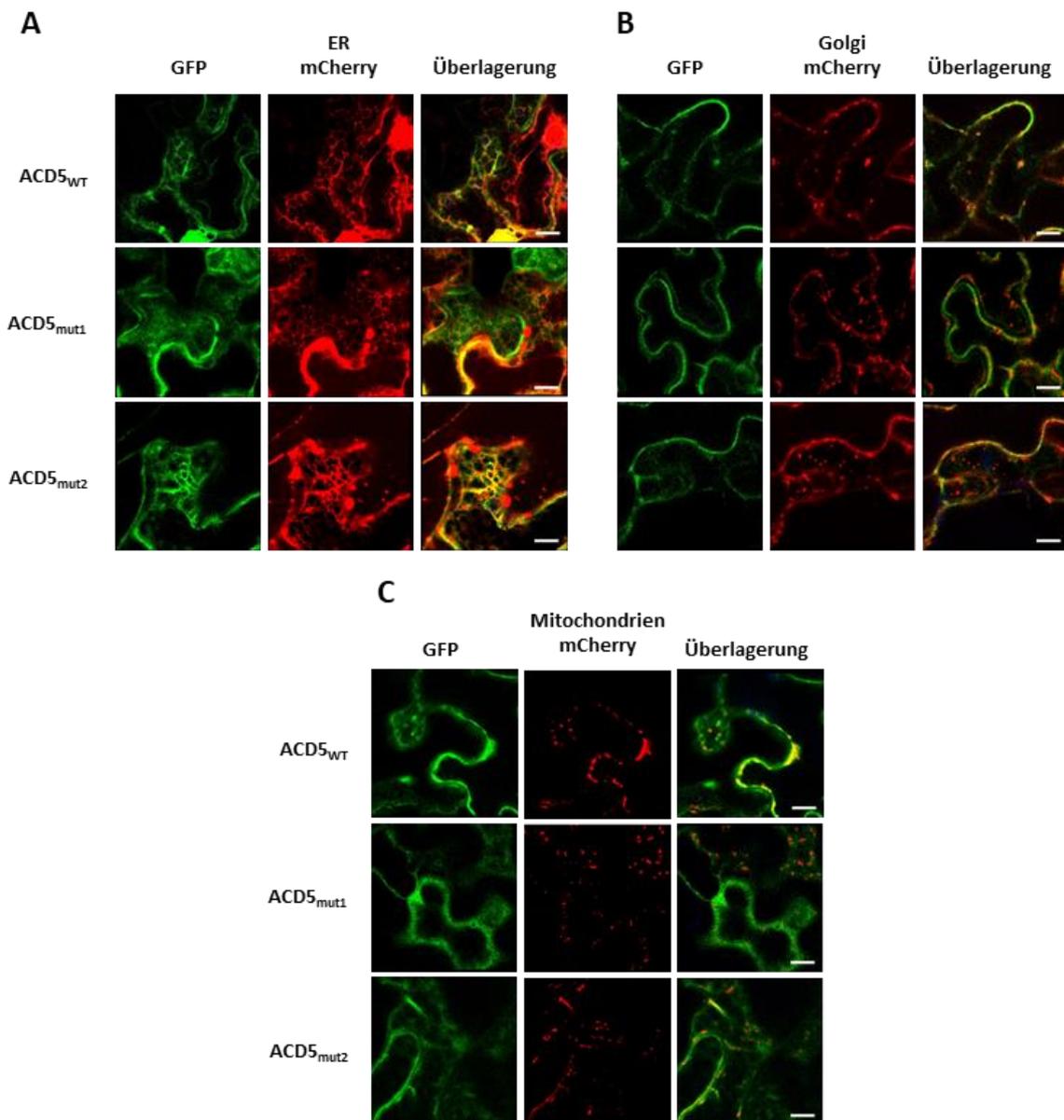


Abb. 17: Co-Lokalisation von GFP markiertem ACD5_{WT}, ACD5_{mut1} und ACD5_{mut2}. Blätter von *N. benthamiana* wurden mit GFP markierten ACD5_{WT} und zwei ACD5 Varianten, ACD5_{mut1} und ACD5_{mut2} infiltriert. Zusätzlich wurden die Blätter mit mCherry-markierten Markern für ER, Golgi und Mitochondrien infiltriert. Nach 3 d wurde die Blattunterseite am confocal-laser-scanning-Mikroskop untersucht. **(A)** Co-Lokalisation mit ER-Marker. **(B)** Co-Lokalisation mit Golgi-Marker. **(C)** Co-Lokalisation mit Mitochondrien-Marker. Die Bilder zeigen repräsentative Blätter von 3 unabhängigen Experimenten für die Lokalisation mit ER- und Golgi-Marker und 1 unabhängiges Experiment für die Lokalisation mit Mitochondrien-Marker. Längenstandard = 10 µm.

zusammen mit mCherry-fusionierten Markerproteinen transient in *Nicotiana benthamiana* co-exprimiert. Bi et al. zeigten bereits, dass ACD5_{WT} im ER, dem Golgi-Apparat und den Mitochondrien lokalisiert ist. Deshalb wurden Markerproteine für diese Zell-Kompartimente verwendet. Bei der Co-Lokalisation der ACD5-Proteine mit dem ER-Marker konnte eine Überlagerung des GFP- und mCherry-Signals gesehen werden. Dies zeigte, dass ACD5_{WT} im ER lokalisiert war. Anschließend

wurde die Lokalisation zwischen ACD5_{WT} und ACD5_{mut1} und ACD5_{mut2} verglichen. Dabei konnten weder in der Lokalisation noch in der Signalstärke, welche ein Indiz für die Proteinmenge ist, ein Unterschied zwischen den ACD5-Varianten festgestellt werden (Abb. 17A). Als nächstes wurden die ACD5-Varianten mit einem Golgi Marker zusammen infiltrierte. Auch hier konnte eine leichte Überlagerung der Signale beobachtet werden, wenn diese auch nicht so ausgeprägt war, wie bei den ER-Aufnahmen. Dennoch konnte gesagt werden, dass ACD5_{WT} ebenfalls teilweise im Golgi-Apparat lokalisiert war. Bei einem Vergleich zwischen ACD5_{WT} und den beiden mutierten Proteinen konnte erneut kein Unterschied in der Lokalisation oder Signalstärke festgestellt werden (Abb. 17B). Bei der Co-Expression der ACD5-Proteine mit einem Mitochondrien-Marker konnte keine Überlagerung der Signale beobachtet werden. Die Lokalisation von ACD5_{WT} in den Mitochondrien konnte also nicht nachgewiesen werden. Erneut zeigte sich bei einem Vergleich der Lokalisation und Signalstärke der ACD5-Proteine kein Unterschied (Abb. 17C). Da die Lokalisation und Signalstärke zwischen ACD5_{mut1} und ACD5_{mut2} gleich war, scheint auch die Lokalisation und Proteinmenge nicht für die Unterschiede zwischen den ACD5-Allelen verantwortlich zu sein.

3.1.11 Ceramid-Kinase-Aktivität der *acd5*-Mutanten

Bei der Infiltration der Tabakblätter für die Co-Lokalisation konnte nach längerer Kultivierung der Pflanzen eine Veränderung der Blätter festgestellt werden. Einige Blätter zeigten großflächige Läsionen. Um dies genauer zu untersuchen, wurden erneut Tabakblätter transient mit ACD5_{WT}, ACD5_{mut1} und ACD5_{mut2} transformiert. Dabei wurde je eine Hälfte der Blätter mit dem Helferstamm p19 als Kontrolle infiltrierte und die andere Hälfte mit dem jeweiligen ACD5-Allel. Nach sieben Tagen konnte bei den Blatthälften, welche mit ACD5_{WT} infiltrierte wurden, erneut große Areale mit Läsionen beobachtet werden. Hier waren 29 % des Blattes mit Läsionen befallen. Infiltrationen mit ACD5_{mut1} oder ACD5_{mut2} zeigten kaum eine Bildung von Läsionen. Nur auf 2,5 und 4% des Blattareals waren Läsionen zu finden (Abb. 18A, B).

Da zum einen zuvor gezeigt werden konnte, dass sich weder das Transkriptlevel in *A. thaliana*, noch die Lokalisation von ACD5_{WT}, ACD5_{mut1} und ACD5_{mut2} in *N. benthamiana* voneinander unterscheiden, ist es wahrscheinlich, dass es einen anderen Grund für die Unterschiede in den Phänotypen gibt. Zum anderen konnte bereits gezeigt werden, dass es in *acd5-1* in der späten Entwicklung zur Bildung von Läsionen kommt. Diese entstehen, wenn das Gleichgewicht zwischen Ceramid und Ceramid-1-Phosphat gestört wird. Die Verschiebung kommt dadurch zustande, dass die Ceramid-Kinase, für welche ACD5 codiert und Cer in Cer-1-P phosphoryliert, gestört ist (Liang et al. 2003). Bei der Expression von ACD5 in Tabak wurden die ACD5-Allele unter der Kontrolle eines 35S-Promotors infiltrierte. Es wurde also eine erhöhte Menge der CerK gebildet, welche höchstwahrscheinlich das Gleichgewicht zwischen Cer und Cer-1-P störte. Dies würde die Bildung der Läsionen bei der

Infiltration mit ACD5 erklären. Die Tabakblätter, welche mit *acd5-1* und *acd5-2* infiltriert wurden, zeigten jedoch keine Läsionen. Dadurch lag die Vermutung nahe, dass hier die Aktivität der CerK vermindert war.

Da für die Berechnung der Ceramid-Kinase-Aktivität nur die Gesamt-Proteinmenge gemessen werden sollte, könnte auch eine geringere ACD5 Protein-Konzentration bei ACD5_{mut1} und ACD5_{mut2} zu einer geringeren Aktivität führen. Um dies zu überprüfen, wurde ein Western Blot durchgeführt. Dazu wurde der Tabak erneut infiltriert, aber dieses Mal bereits nach zwei Tagen geerntet, bevor sich Läsionen bilden konnten. Anschließend wurden die GFP-markierten ACD5-Proteine durch einen GFP-Antikörper sichtbar gemacht. Zwar lässt sich bei ACD5_{mut2} im Vergleich zu ACD5_{WT} und ACD5_{mut1} eine leicht erhöhte Proteinmenge beobachten (Abb. 18C), dies konnte in Wiederholungen des Experimentes jedoch nicht erneut gezeigt werden. Obwohl sich immer leichte Unterschiede in den Proteinmengen zeigten, konnte kein einheitlicher Trend beobachtet werden. Da die Schwankung in der Proteinmenge sehr gering war und nicht immer zwischen den gleichen Konstrukten beobachtet werden konnte, wurde davon ausgegangen, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Proteinmenge bei den verschiedenen ACD5-Varianten gab. Dies deckte sich mit den Ergebnissen der Co-Lokalisation. Auch hier konnte in der Signalstärke als Indiz für die Proteinmenge kein Unterschied gefunden werden. Anschließend wurde die Ceramid-Kinase-Aktivität in den Tabakblättern gemessen. Dabei zeigte sich, dass Extrakte von mit ACD5_{mut1} und ACD5_{mut2} infiltrierten Blättern eine signifikant niedrigere CerK-Aktivität aufwiesen als solche, die mit ACD5 infiltriert wurden. Die Aktivität glich dabei der des Helferstammes p19 (Abb. 18D). Die Bildung von Läsionen bei mit 35S-ACD5 infiltrierten Blättern korrelierte also mit einer höheren Ceramid-Kinase-Aktivität. Trotz ähnlicher Protein-Konzentrationen von ACD5_{WT}, ACD5_{mut1} und ACD5_{mut2} zeigten die mutierten Proteine eine stark verringerte bis nahezu keine CerK-Aktivität. Daraus lässt sich schließen, dass die verringerte Aktivität der CerK durch eine Beeinträchtigung der Protein-Funktion und nicht durch eine niedrigere Protein-Konzentration verursacht wird.

1.1.1 RNA-Seq-Analyse

Um einen tieferen Einblick in die Veränderung der Physiologie unter Zink-Stress bzw. zwischen Col-0 und *acd5-2* zu erhalten, wurde eine RNA-Seq-Analyse durchgeführt. Dazu sollten Keimlinge zunächst auf Kontrollmedium angezogen und anschließend für 24 Stunden mit Zink gestresst werden. Dafür musste zunächst herausgefunden werden, nach welcher Zeit die Keimlinge von Kontroll-Medium auf Zink-Stress-Medium umgesetzt werden müssen. Die Keimlinge wurden nach vier, fünf und sieben Tagen auf Platten mit erhöhter Zink-Konzentration umgesetzt. Wurden die Keimlinge nach vier oder

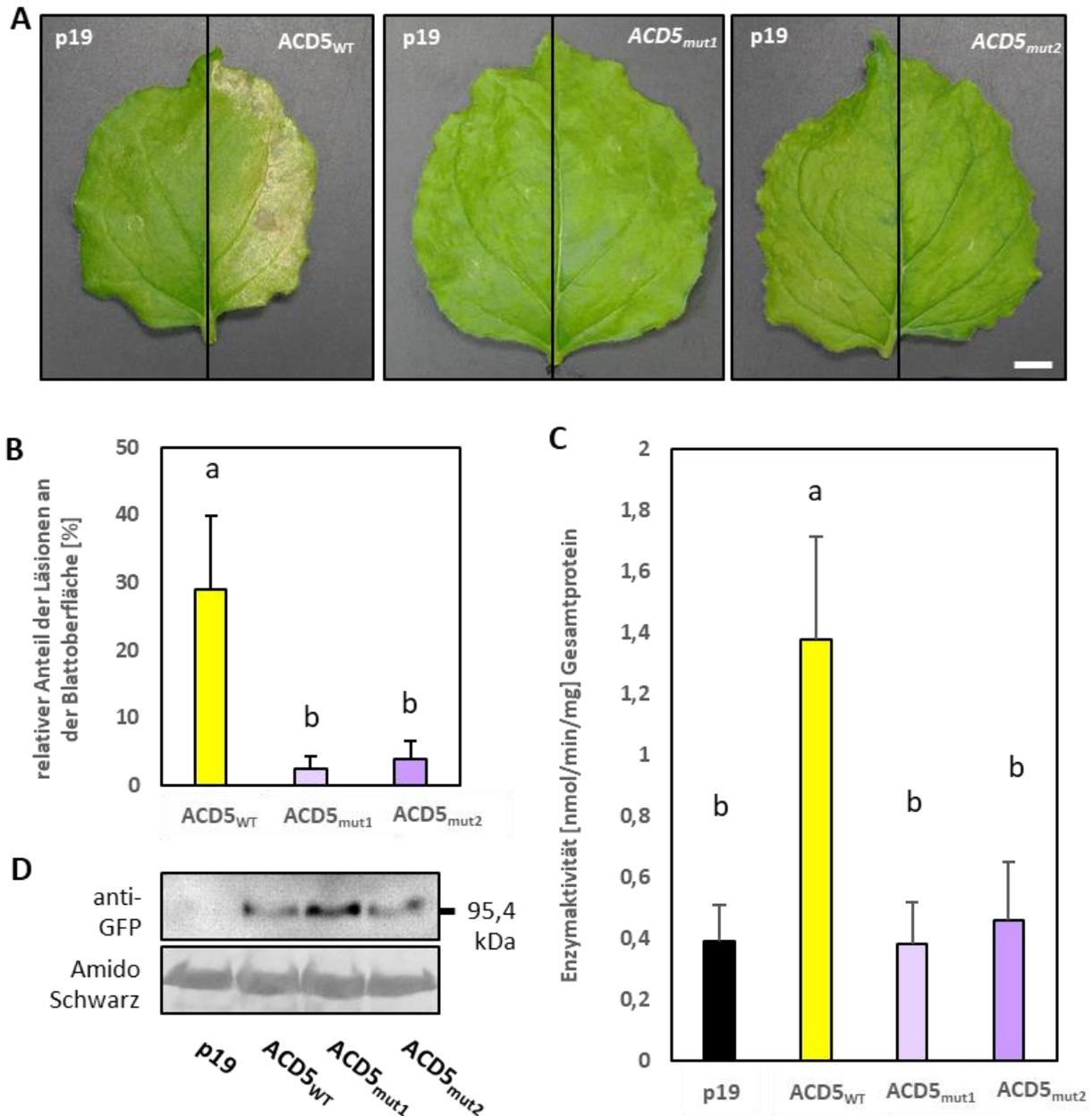


Abb. 18: Ceramid-Kinase-Aktivität verschiedener ACD5-Varianten. ACD5_{WT}, ACD5_{mut1} und ACD5_{mut2} wurden transient in *N. benthamiana* infiltriert **(A)** Infiltrierte Blätter wurden nach 7 d fotografiert. Längenstandard = 1 cm. **(B)** Relativer Anteil der entstandenen Läsionen an der Blattoberfläche. Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm StAbw von 3 unabhängigen Experimenten (n = 7 - 9). Signifikante Unterschiede wurden durch Student's t-Test ermittelt ($p \leq 0,001$). **(C)** Western Blot. Gleiche Mengen an Gesamt-Protein wurden aufgetragen. ACD5_{WT}, ACD5_{mut1} und ACD5_{mut2} waren GFP-markiert (Molekular-Gewicht 95,4 kDa). p19 diene als Negativ-Kontrolle. **(D)** Ceramid-Kinase-Aktivität. Infiltrierte Blätter wurden nach 2 d geerntet und mittels Ceramid-Kinase-Assay vermessen. Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm StAbw von 3 unabhängigen Experimenten (n = 3). Signifikante Unterschiede wurden durch Student's t-Test ermittelt ($p \leq 0,05$).

fünf Tagen umgesetzt, konnte sowohl unter 100 μ M als auch unter 150 μ M Zink-Stress eine signifikante Reduktion des Wurzelwachstums beobachtet werden. Wurden die Pflanzen erst nach sieben Tagen gestresst, konnte die Zink-Hypersensitivität von *acd5-2* nicht gezeigt werden (Abb. 19).

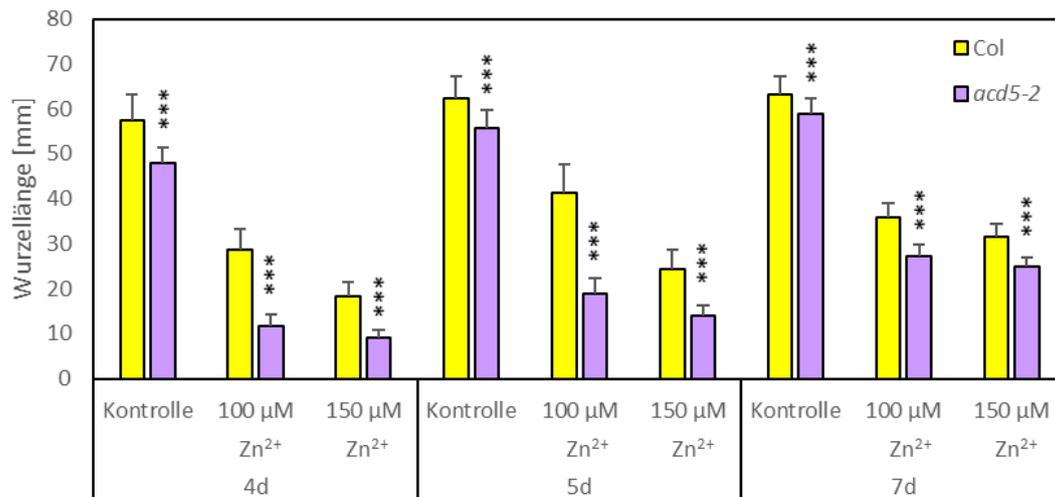


Abb.19: Vortest zur optimalen Anzucht der Keimlinge für die RNA-Seq-Analyse. Zur Bestimmung der optimalen Bedingungen für die Proben-Gewinnung für die RNA-Seq-Analyse wurden Keimlinge unterschiedlich lang auf Kontroll-Medium kultiviert, bevor sie mit verschiedenen Zink-Konzentrationen gestresst wurden. Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm StAbw von 2 unabhängigen Experimenten ($n = 31 - 47$). Signifikante Unterschiede wurden durch zweifaktorielle ANOVA und Tukey's HSD-Test ermittelt. Sterne zeigen statistische Unterschiede zu Col-0 an (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$).

Für die RNA-Seq-Analyse eigneten sich also nur die Ansätze, bei denen die Keimlinge nach vier oder fünf Tagen transferiert wurden. Auf Grund der größeren Wurzelmasse bei Keimlingen, welche erst nach fünf Tagen auf 100 μM Zn^{2+} umgesetzt wurden, wurde dieser Ansatz für die RNA-Seq-Analyse gewählt.

Bei der Untersuchung des Transkriptoms von Col-0 und *acd5-2* wurde zunächst die allgemeine Antwort von *A. thaliana* auf Zink-Stress näher untersucht. Dabei wurden Gene als induziert betrachtet, wenn deren \log_2 -Wert der Expression über 1 lag, und als reprimiert, wenn der \log_2 -Wert unter -1 lag. Dazu wurde sowohl für Col-0 als auch für *acd5-2* zunächst überprüft, ob es bei den induzierten Genen zu einer Anreicherung von Genen eines Ontology (GO)-Term kommt. Sowohl der WT als auch die Mutante zeigten unter Zink-Stress eine vermehrte Induktion von Genen, welche an der „zellulären Eisen-Ionen-Homöostase“, an der „Antwort auf Wasserstoffperoxid“, am „Transport von Übergangsmetallen“, an der „zellulären Antwort auf Hypoxie“ und an der „Antwort auf Stress“ beteiligt sind (Abb. 20A). In Col-0 konnte zudem eine vermehrte Induktion von Genen, welche an der „Antwort auf Metallionen“ beteiligt sind, beobachtet werden, und in *acd5-2* kam es zu einer Induktion von Genen der „Antwort auf Salzstress“ und „Antwort auf Chitin“. Bei einem Vergleich der Gene der GO-Terms, welche sowohl in Col-0 als auch in *acd5-2* induziert waren, konnten bei der „zellulären Eisen-Ionen-Homöostase“, „Antwort auf Wasserstoffperoxid“ und „Transport von

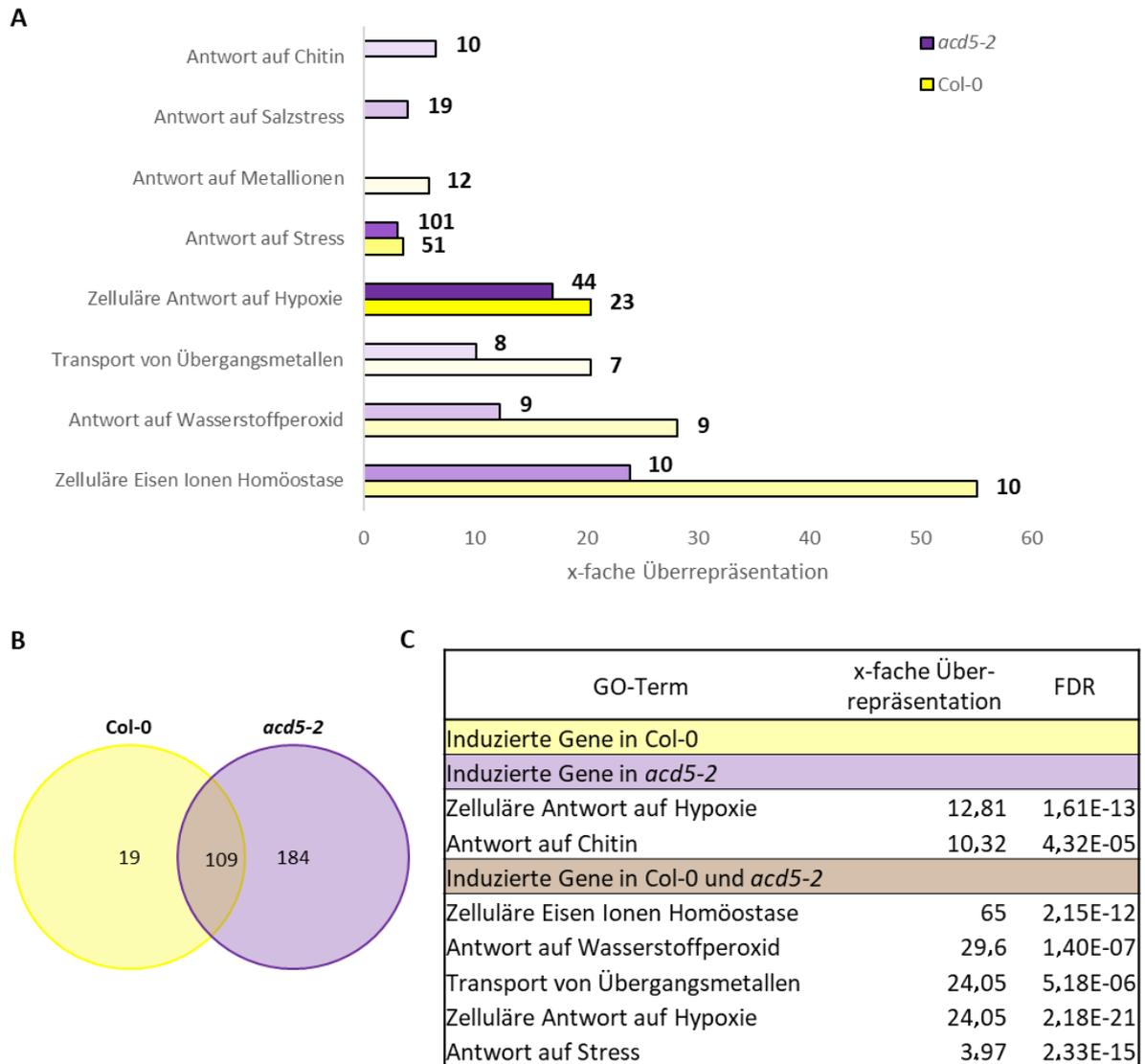


Abb. 20: Induktion unter Zink-Stress. Gezeigt ist die Induktion der Gene von Col-0 und *acd5-2* unter Zink-Stress. **(A)** GO-Term-Analyse der induzierten Gene unter Zink-Stress von Col-0 und *acd5-2*. Gezeigt die x-fache Überrepräsentation der Anzahl an Genen des GO-Terms im Vergleich zur Anzahl der erwarteten Gene. Die Helligkeit der Farbe zeigt den FDR- (False-Discoverc-Rate) Wert an. Je heller die Farbe, desto größer ist der FDR-Wert. Zahlen geben die Anzahl der induzierten Gene des GO-Terms an. **(B)** Gezeigt ist die Anzahl der Gene, welche in Col-0 oder in *acd5-2* oder in beiden unter Zink-Stress induziert sind. **(C)** GO-Term-Analyse der Gene, welche entweder in Col-0 oder in *acd5-2* oder in beiden Pflanzen unter Zink-Stress induziert sind. Als induziert wurden Gene betrachtet, wenn deren log₂-Wert der Expression über 1 lag, und als reprimiert, wenn der log₂-Wert unter -1 lag und gleichzeitig der „adjusted p-value“ kleiner 0,05 war.

Übergangsmetallen“ die gleichen Gene gefunden werden. Die geringere x-fache Überrepräsentation kommt dadurch zustande, dass bei *acd5-2* unter Zink-Stress etwa doppelt so viele Gene wie in Col-0 induziert waren. Bei der gleichen Anzahl induzierter Gene in Col-0 und in *acd5-2* verringert sich die x-fache Überrepräsentation in *acd5-2* entsprechend der höheren Gesamtanzahl induzierter Gene um

etwa die Hälfte. Bei der „zellulären Antwort auf Hypoxie“ und der „Antwort auf Stress“ hingegen zeigte sich in Col-0 und in *acd5-2* die gleiche x-fache Überrepräsentation an Genen in den GO-Terms.

Verglich man anschließend die in Col-0 und *acd5-2* unter Zink-Stress induzierten Gene, konnten 19 Gene gefunden werden, welche ausschließlich in Col-0, 184 Gene, welche nur in *acd5-2* und 109 Gene, welche in beiden Pflanzen induziert waren (Abb. 20B). Es konnte also zum einen, wie zuvor bereits erwähnt, festgestellt werden, dass in *acd5-2* mit insgesamt 293 Genen wesentlich mehr Gene induziert waren als in Col-0 mit 128 Genen, was darauf hindeutete, dass die Zink-Stress-Antwort in *acd5-2* stärker ausgeprägt war als in Col-0. Zum anderen wurden mögliche GO-Terms dieser Gruppen herausgearbeitet. Dabei zeigte sich, dass bei den einzig in Col-0 induzierten Genen keine Gene eines GO-Term überrepräsentiert waren. Gene, die nur in *acd5-2* induziert waren, zeigten eine Häufung in der „zellulären Antwort auf Hypoxie“ und in der „Antwort auf Chitin“. Gene, welche in Col-0 und *acd5-2* induziert waren, zeigten ebenfalls eine Anhäufung bei der „zellulären Antwort auf Hypoxie“ zusätzlich zu den anderen gefundenen GO-Terms der „zellulären Eisen-Ionen-Homöostase“, der „Antwort auf Wasserstoffperoxid“, des „Transports von Übergangsmetallen“ und der „Antwort auf Stress“ (Abb. 20C). Die Tatsache, dass Hypoxie-responsive Gene sowohl in Col-0 als auch in *acd5-2* unter Zink-Stress induziert sind, zeigt, dass es anscheinend Überschneidungen dieser physiologischen Antworten gibt. Dass aber auch Hypoxie-responsive Gene gefunden wurden, welche nur in *acd5-2* induziert waren, deutet darauf hin, dass es in *acd5-2* unter Zink-Stress zu einer verstärkten Hypoxie-Antwort kommt.

Viele der GO-Terms mit überrepräsentierten Genen konnten also sowohl in Col-0 als auch in *acd5-2* gefunden werden. Dies zeigt auf, dass es in beiden Fällen zu Veränderungen in denselben Stoffwechselwegen kommt. Deshalb sollte als Nächstes überprüft werden, ob es eine Zink-Stress-Kern-Antwort gibt. Dazu wurden die in Col-0 unter Zink-Stress differentiell exprimierten Gene zusammen mit anderen Transkriptom-Analysen auf Zink-Stress untersucht. Als Vergleich dienten Microarray-Daten von sechs Wochen alten *A. thaliana*-Col-0-Pflanzen, welche sieben Tage mit Zink gestresst wurden (van de Mortel et al. 2006) und Microarray Daten von vier Wochen alten Col-0-Pflanzen, welche ebenfalls für sieben Tage mit Zink gestresst wurden (Landa et al. 2015). Gene, die in allen drei Experimenten unter Zink-Stress entweder induziert oder reprimiert waren, wurden als Zink-Stress-Kern-Gene definiert (Abb. 21A). 14 solcher Gene konnten gefunden werden. Die Expression dieser 14 Gene wurde unter Zink-Stress immer induziert (Abb. 21B). Es konnten keine Gene gefunden werden, welche in allen drei Experimenten unter Zink-Stress reprimiert wurden. Die Expression der Zink-Stress-Kern-Gene wurde anschließend zwischen Col-0 und *acd5-2* verglichen, um festzustellen, ob die Zink-Stress-Kern-Antwort in der Mutante gestört ist. Dabei zeigte sich bei allen

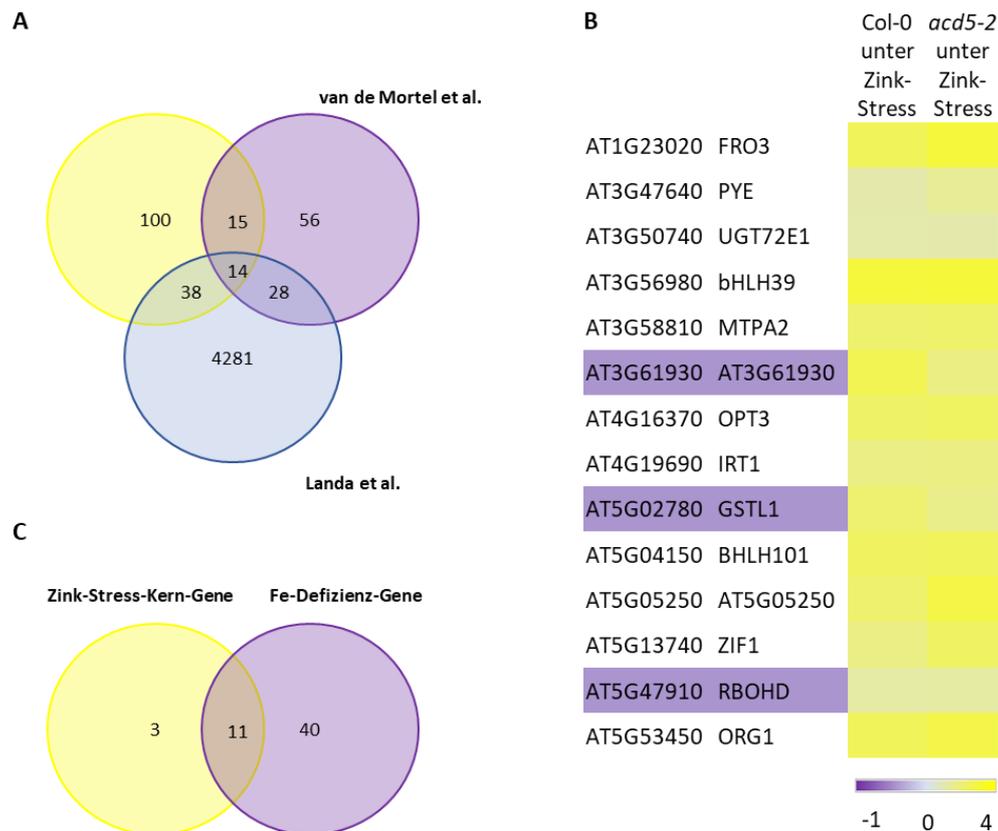


Abb. 21: Zink-Stress-Kern-Gene. Es wurde nach Genen gesucht, die die Kern-Antwort auf Zink-Stress bilden. **(A)** Vergleich der eigenen Expressionsdaten mit den Daten von van de Mortel et al. und Landa et al. für Col-0 unter Zink-Stress zur Ermittlung von Zink-Stress-Kern-Genen. **(B)** Zink-Stress-Kern-Gene in Col-0 und *acd5-2* unter Zink-Stress. Blau markiert sind Gene, welche nicht unter Eisen-Defizienz differentiell exprimiert sind. **(C)** Vergleich der Zink-Stress-Kern-Gene mit Eisen-Defizienz responsiven Genen. Als induziert wurden Gene betrachtet, wenn deren log₂-Wert der Expression über 1 lag und als reprimiert, wenn der log₂-Wert unter -1 lag und gleichzeitig der „adjusted p-value“ kleiner 0,05 war.

14 Zink-Stress-Kern-Genen sowohl in Col-0 als auch in *acd5-2* eine vergleichbare Induktion der Gene (Abb. 21B). In *acd5-2* liegt also keine Veränderung der Zink-Stress-Kern-Antwort vor. Wie zuvor bereits erwähnt, kann Zink-Stress auch einen physiologischen Eisen-Mangel auslösen. Um dies zu überprüfen, wurden als erstes die Zink-Stress-Kern-Gene mit unter Eisen-Defizienz (Colangelo et al. 2004; Zhang et al. 2019; Gao et al. 2020) differentiell exprimierten Genen verglichen. Dabei zeigte sich eine starke Überlappung. Elf der 14 Zink-Stress-Kern-Gene reagieren ebenfalls auf Eisen-Mangel (Abb. 21C). Dies ist ein erster deutlicher Hinweis darauf, dass Zink-Stress zu einem Eisenmangel führen kann.

Anschließend wurde überprüft, ob sich unter den unter Zink-Stress differentiell exprimierten Genen in Col-0 weitere Eisenmangel-responsive Gene finden ließen. Tatsächlich waren 34 der insgesamt 52 überprüften Eisenmangel-responsiven Gene ebenfalls in Col-0 unter Zink-Stress differentiell exprimiert (Abb. 22A). Bei einem Vergleich der Expression dieser 34 Gene fiel auf, dass sich drei Gene in ihrer

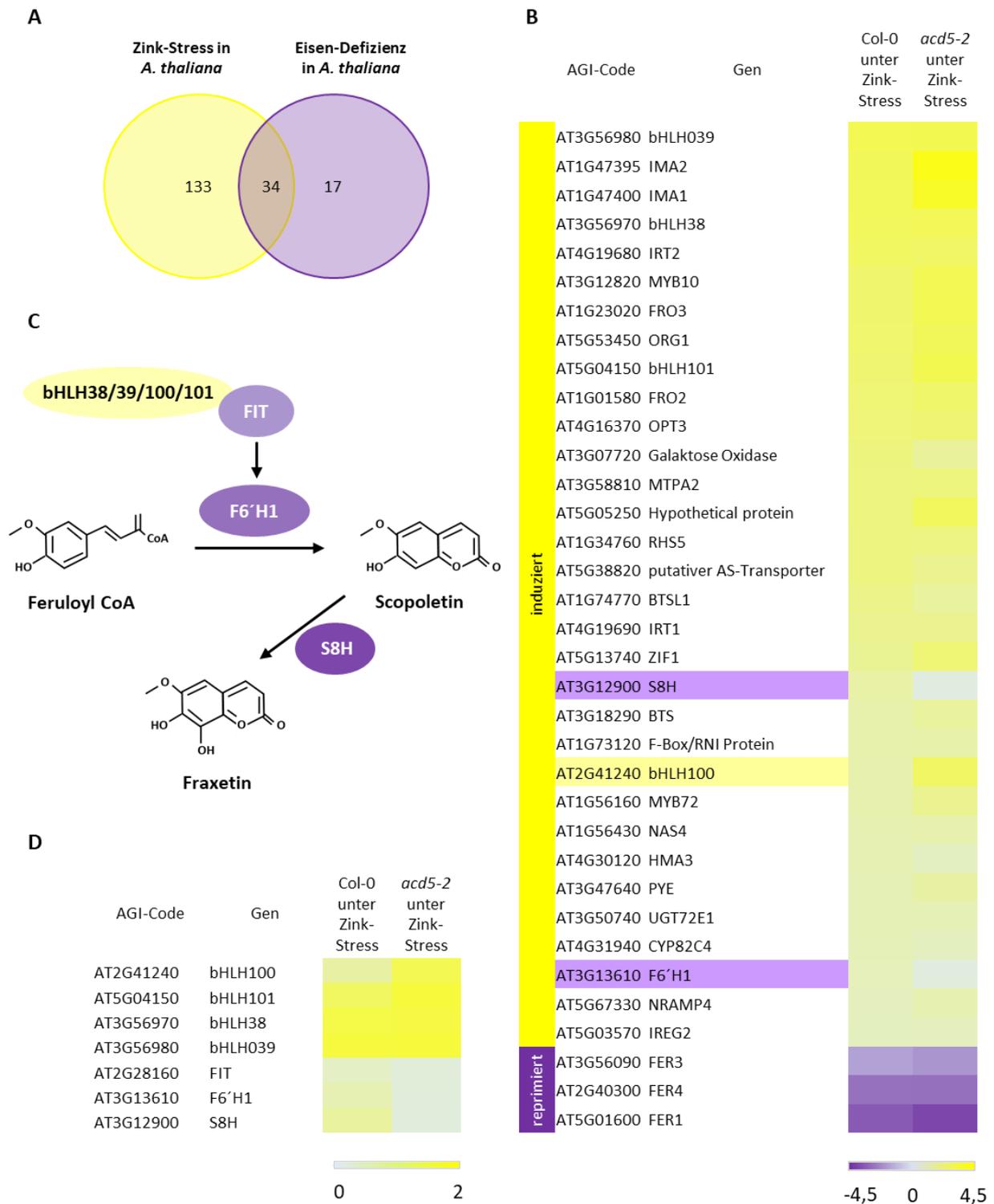


Abb. 22: Eisen-Defizienz unter Zink-Stress. Vergleich der Zink-Stress-Antwort mit der Eisen-Defizienz-Antwort in *A. thaliana*. **(A)** Vergleich der in Col-0 unter Zink-Stress differentiell exprimierten Gene mit Eisen-Defizienz responsiven Genen. **(B)** Expression der Gene aus der Schnittmenge von A für Col-0 und *acd5-2* unter Zink-Stress. Gelb markierte Gene zeigen eine zu Col-0 erhöhte Genexpression in *acd5-2* an, lila markierte Gene eine reprimierte Expression. **(C)** *F6'H1*-abhängige Cumarin-Biosynthese. **(D)** In Col-0 und *acd5-2* differentiell exprimierte Gene der *F6'H1*-abhängigen Cumarin-Biosynthese. Als induziert wurden Gene betrachtet, wenn deren log₂-Wert der Expression über 1 lag, und als reprimiert, wenn der log₂-Wert unter -1 lag und gleichzeitig der „adjusted p-value“ kleiner 0,05 war.

Expression zwischen Col-0 und *acd5-2* unter Zink-Stress unterschieden. *S8H* sowie *F6'H1* waren in Col-0 unter Zink-Stress induziert. In *acd5-2* hingegen konnte keine Induktion beobachtet werden. Für *bHLH100* konnte zwar sowohl in Col-0 als auch in *acd5-2* eine Induktion unter Zink-Stress beobachtet werden, aber die Induktion in *acd5-2* war in etwa doppelt so stark wie in Col-0 (Abb. 22B). Diese drei Gene sind Teil der Cumarin-Biosynthese (Abb. 22C, D). Cumarine, wie Esculetin oder Scopoletin, sind wichtig für die Eisen-Aufnahme aus Substraten mit geringer Eisen-Verfügbarkeit (Clemens et al. 2016). Für die Aufnahme unter alkalischen Bedingungen sind vor allem Cumarine, die durch *F6'H1* gebildet werden, wichtig (Schmid et al. 2014). Dabei wird die Bildung der *bHLH*-Transkriptionsfaktoren 38, 39, 100 und 101 unter Eisen-Defizienz durch *bHLH121* induziert. Diese Transkriptionsfaktoren interagieren wiederum mit FIT (Gao et al. 2020). Der entstandene Komplex induziert die Bildung von *F6'H1*, welches Feruloyl in Scopoletin umwandelt. Dieses wiederum wird durch *S8H* in Fraxetin umgewandelt (Siwinska et al. 2018) (Abb. 22C, D). Die Mutation in *acd5-2* könnte sich also auf die Cumarin-Biosynthese auswirken.

Um herauszufinden, welche weiteren transkriptionellen Vorgänge in *acd5-2* im Vergleich zu Col-0 verändert sind und somit zur Zink-Hypersensitivität führen könnten, wurden die GO-Terms mit in *acd5-2* überrepräsentierten Gene genauer betrachtet. Bei dem Vergleich der „zellulären Antwort auf Hypoxie“ zeigte sich, dass unter Zink-Stress einige Gene in *acd5-2* deutlich stärker exprimiert wurden als in Col-0 (Abb. 23A). Am deutlichsten war dieser Effekt bei *ZAT7*. Hier konnte im Vergleich zu Col-0 eine 5,7-fach stärkere Expression beobachtet werden. Einige Hypoxie-responsive Gene wurden bereits als Hypoxie-Kern-Gene beschrieben (Mustroph et al. 2009). Bei einem Vergleich dieser 49 Gene mit den hier durch Zink induzierten Hypoxie-responsiven Genen zeigte sich, dass 16 der 49 Hypoxie-Kern-Gene ebenfalls durch Zink induziert wurden. Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Untersuchungen in der Pappel (Carbonare et al. 2019). Es konnte gezeigt werden, dass etwa ein Drittel der Hypoxie-Kern-Gene durch Zink induzierbar waren. Bei einem Vergleich der Gene in der Pappel, welche unter Hypoxie- und Zink-Stress differentiell exprimiert wurden, mit Genen aus Col-0 unter den gleichen Voraussetzungen, konnten vier Gene identifiziert werden, die in beiden Pflanzen induziert waren (Abb. 23B, C). Betrachtete man die Expression dieser vier Gene in der Pappel unter Zink-Stress (Ariani et al. 2015) und unter Hypoxie-Stress (Kreuzwieser et al. 2009) und in *A. thaliana* unter Zink-Stress und unter Hypoxie-Stress (Licausi et al. 2011a) zeigte sich, dass alle Gene unter den genannten Stress-Bedingungen induziert waren (Abb. 23C). Zudem gehörten alle vier Gene zu den Hypoxie-Kern-Genen.

Im GO-Term der „Antwort auf Chitin“ konnten in *acd5-2* zehn Gene gefunden werden, deren Expression im Vergleich zu Col-0 unter Zink-Stress induziert war (Abb. 23D). Die stärkste Induktion - verglichen mit Col-0 - zeigte dabei der Transkriptionsfaktor *T18C15_3* und die zweitstärkste *ZAT7*.

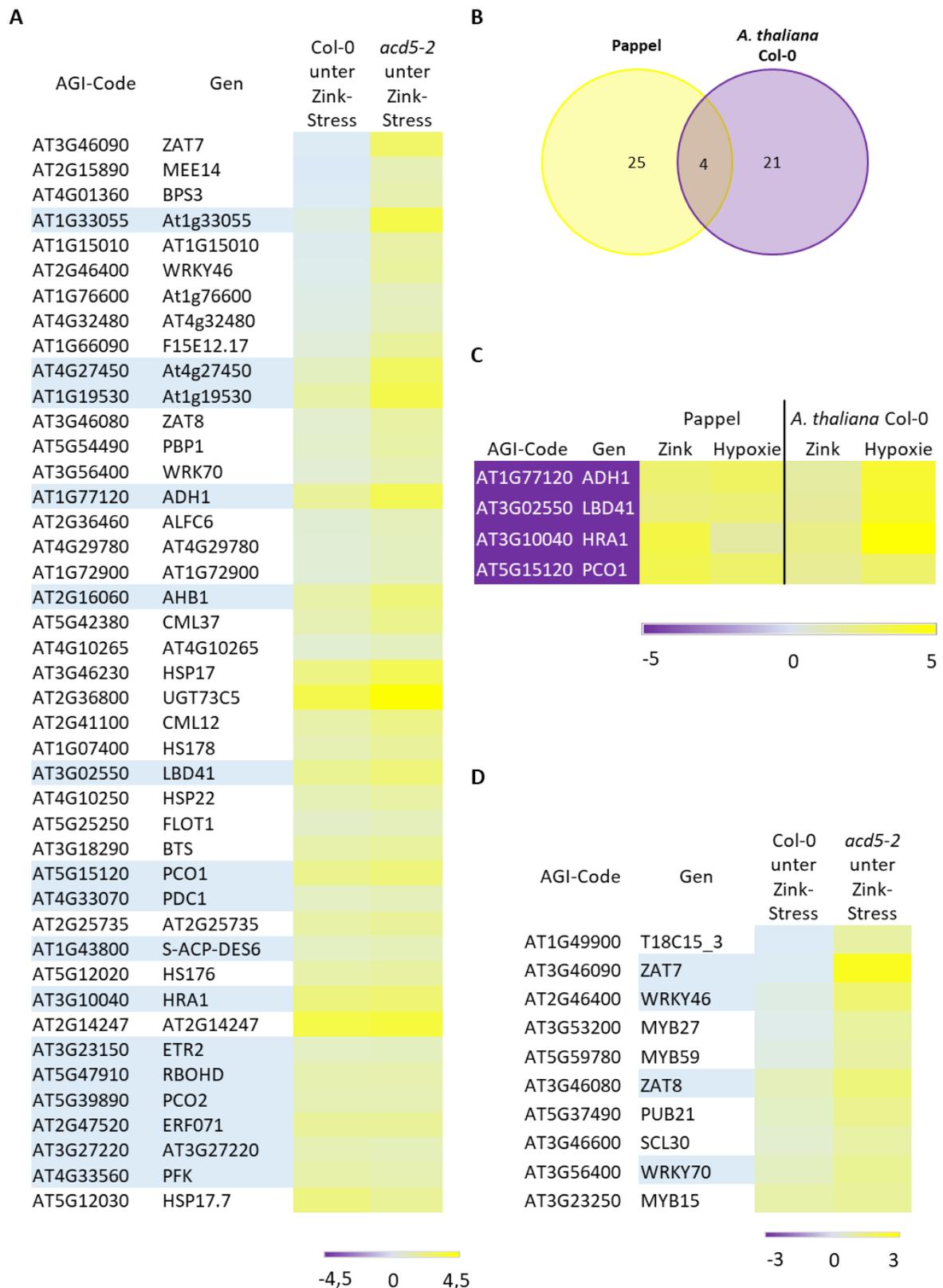


Abb. 23: Induktion Hypoxie- und Chitin-responsiver Gene unter Zink-Stress. Gezeigt ist die Induktion der Hypoxie- und Chitin-responsiven Gene von Col-0 und *acd5-2* unter Zink-Stress. **(A)** Expression in Col-0 und *acd5-2* geordnet nach der Stärke der Veränderung der Expression von *acd5-2* zu Col-0 unter Zink-Stress. Die Hypoxie- Kern-Gene wurden von Mustroph et al. (2009) bestimmt. Blau markierte Gene zeigen Hypoxie-Kern-Gene an. **(B)** Gezeigt sind Gene, welche in der Pappel und in *A. thaliana* unter Hypoxie- und Zink-Stress

differentiell exprimiert sind und welche Überschneidungen es dabei gibt. **(C)** Expression der vier Gene, die sowohl in der Pappel unter Zink-Stress (Ariani et al. 2015) und Hypoxie-Stress (Kreuzwieser et al. 2009) als auch in *A. thaliana* Col-0 unter Zink-Stress (eigene Daten) und Hypoxie-Stress (Licausi et al. 2011a) differentiell exprimiert sind. **(D)** Expression Chitin-responsiver Gene in Col-0 und *acd5-2*. Blau markierte Gene zeigen Hypoxie-responsive Gene. Als induziert wurden Gene betrachtet, wenn deren log₂-Wert der Expression über 1 lag, und als reprimiert, wenn der log₂-Wert unter -1 lag und gleichzeitig der „adjusted p-value“ kleiner 0,05 war.

Vier der Chitin-responsiven Gene (*ZAT7*, *WRKY46*, *ZAT8* und *WRKY70*) sind zudem Hypoxie-responsiv. Des Weiteren waren verschiedene MYB-Transkriptionsfaktoren induziert. *MYB59* ist dabei Teil der Calcium abhängigen Signalweiterleitung (Fasani et al. 2019). *MYB15* ist an der Lignifizierung der Zellwand beteiligt. Eine Überexpression führt zu einem erhöhten Lignin-Gehalt (Chezem et al. 2017). Über *MYB27* weiß man bisher nur, dass es an der Wahrnehmung eines Kohlenstoffmangels beteiligt ist (Nardoza et al. 2020). Über *PUB21* und *SCL30* ist noch nichts weiter bekannt.

Anschließend wurden die unter Zink-Stress reprimierten Gene untersucht. Bei einem Vergleich dieser Gene in Col-0 und *acd5-2* konnten sechs Gene gefunden werden, welche nur in Col-0, 91 Gene, die in *acd5-2* und 33 Gene, die in beiden Pflanzen reprimiert wurden (Abb. 24A). Bei der Analyse der GO-Terms dieser Gruppen, konnte in Col-0 und in *acd5-2* keine Anhäufung von Genen eines biologischen Prozesses gefunden werden. Lediglich die Gene, die sowohl in Col-0 als auch in *acd5-2* reprimiert waren, zeigten eine Häufung in der „zellulären Eisen-Ionen-Homöostase“, der „Antwort auf Metallionen“, dem „Transport von Übergangsmetallen“, dem „Transport von zweiwertigen Metallen“ und der „Antwort auf ROS“ (Abb. 24B).

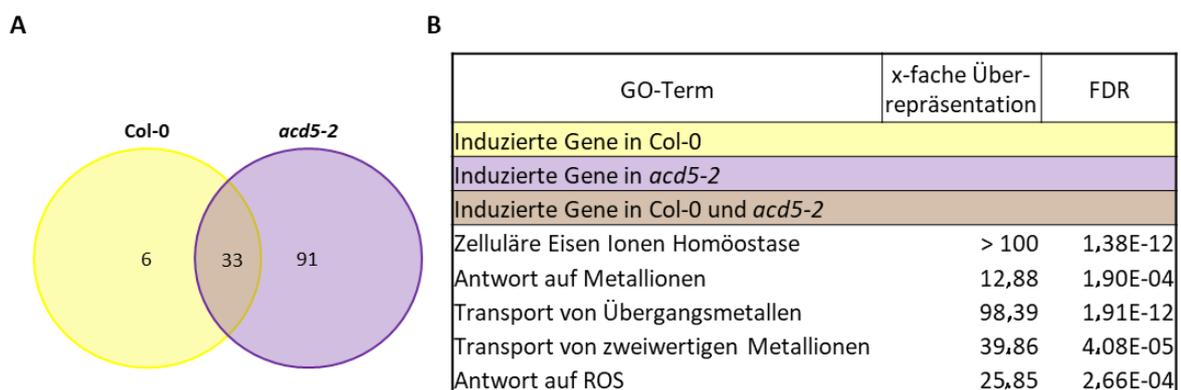


Abb. 24: Repression unter Zink-Stress. Gezeigt ist die Repression der Gene von Col-0 oder *acd5-2* unter Zink-Stress. **(A)** Gezeigt ist die Anzahl der Gene, welche in Col-0 oder in *acd5-2* oder in beiden unter Zink-Stress reprimiert sind. **(B)** GO-Term-Analyse der Gene, welche entweder in Col-0 oder in *acd5-2* oder in beiden unter Zink-Stress reprimiert sind. Als induziert wurden Gene betrachtet, wenn deren log₂-Wert der Expression über 1 lag, und als reprimiert, wenn der log₂-Wert unter -1 lag und gleichzeitig der „adjusted p-value“ kleiner 0,05 war.

Da es in adulten *acd5-1*-Pflanzen zu einer erhöhten Akkumulation von SA kommt, wurde zudem untersucht, ob es eine Veränderung der Expression zwischen Col-0 und *acd5-2* unter Zink-Stress bezüglich SA-responsiver Gene (Mahalingam et al. 2003) gab. Dabei konnten kaum Überschneidungen gefunden werden. Lediglich vier von 67 SA-responsiven Genen waren in *acd5-2* unter Zink-Stress differentiell exprimiert (Abb. 25A). Ein transkriptioneller Unterschied in der SA-Antwort in *acd5-2* als Ursache für die Zink-Hypersensitivität ist daher eher unwahrscheinlich.

Auch die Pathogenabwehr in *acd5-1* ist verändert. So zeigt die Mutante eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Pseudomonas syringae* und *Botrytis cinerea* (Greenberg et al. 2000; van Baarlen et al. 2004). Aus diesem Grund wurden die nur in *acd5-2* unter Zink-Stress differentiell exprimierten Gene mit *Pseudomonas*-responsiven Genen verglichen. Dabei waren nur 15 von insgesamt 614 *Pseudomonas*-responsiven Genen (Thilmony et al. 2006) in *acd5-2* induziert (Abb. 25B). Somit ist höchst wahrscheinlich auch eine transkriptionelle Veränderung in der Antwort auf Pathogene, wie *Pseudomonas*, nicht ursächlich für die Zink-Hypersensitivität von *acd5-2*.

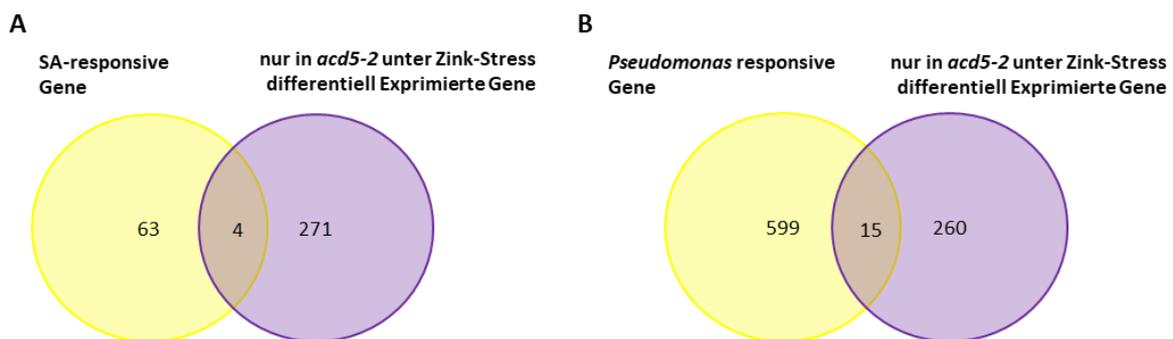


Abb. 25: Anteil der SA- und Pathogen-responsiven Gene an den differentiell exprimierten Genen in *acd5-2*. (A) Vergleich der nur in *acd5-2* unter Zink-Stress differentiell exprimierten Gene mit SA-responsiven Genen (Mahalingam et al. 2003). (B) Vergleich der nur in *acd5-2* unter Zink-Stress differentiell exprimierten Gene mit pathogen-responsiven Genen (Thilmony et al. 2006). Als induziert wurden Gene betrachtet, wenn deren log₂-Wert der Expression über 1 lag, und als reprimiert, wenn der log₂-Wert unter -1 lag und gleichzeitig der „adjusted p-value“ kleiner 0,05 war.

Da aber auch einzelne Gene für die Zink-Hypersensitivität verantwortlich sein könnten, wurden zusätzlich jeweils die zehn Gene, welche in *acd5-2* unter Zink-Stress am stärksten induziert und reprimiert waren, näher betrachtet (Abb. 26). Dabei fällt auf, dass sich unter den zehn am stärksten induzierten Genen *ZAT7* und *T18C15_3* wiederfinden ließen, die schon bei der Chitin- und Hypoxie-Antwort vorkamen.

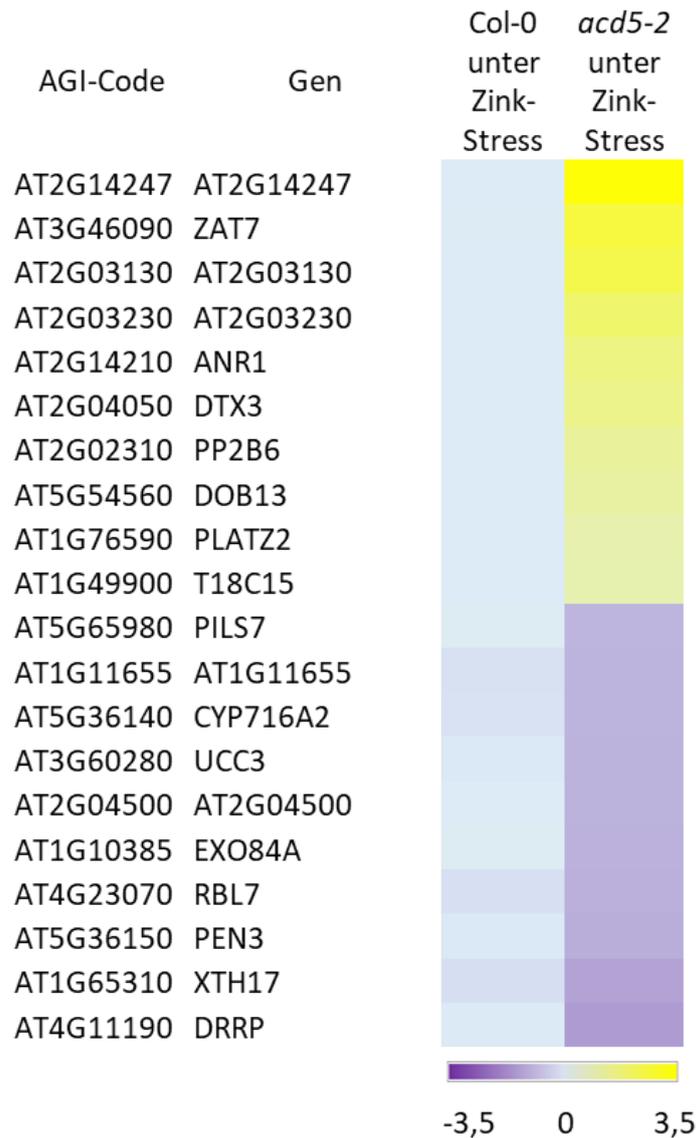


Abb. 26: Am stärksten induzierte und reprimierte Gene in *acd5-2* unter Zink-Stress. Gezeigt sind die in *acd5-2* im Vergleich zu Col-0 unter Zink-Stress am stärksten induzierten und reprimierten Gene. Als induziert wurden Gene betrachtet, wenn deren log₂-Wert der Expression über 1 lag, und als reprimiert, wenn der log₂-Wert unter -1 lag und gleichzeitig der „adjusted p-value“ kleiner 0,05 war.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass 14 Zink-Stress-Kern-Gene identifiziert werden konnten. Zudem konnte gezeigt werden, dass es zu einer Antwort auf Eisen-Defizienz kommt, wobei es in *acd5-2* scheinbar eine Veränderung in der Cumarin-Biosynthese gibt. Daneben gab es in *acd5-2* im Vergleich zu Col-0 unter Zink-Stress Unterschiede in der Expression von Genen der Hypoxie- und Chitin-Antwort. *ZAT7* und *T18C15_3*, die dabei eine erhöhte Induktion in *acd5-2* im Vergleich zu Col-0 zeigten, konnten ebenfalls unter den zehn am stärksten in *acd5-2* unter Zink-Stress induzierten Genen gefunden werden. Im Gegensatz dazu konnte bei der Expression von SA- und pathogen-responsiven Genen keine große Veränderung zwischen Col-0 und *acd5-2* unter Zink-Stress festgestellt werden.

3.2 *ozs3*

3.2.1 Nachweis der Interaktion von OZS3 mit DDB1a

Zu Beginn wurde die Hypothese aufgestellt, dass OZS3 als Substrat-Rezeptor eines CUL4-E3-Ligase-Komplexes dienen könnte. Diese Hypothese wurde auf Grund der Ähnlichkeit von OZS3 zu DCAF-Proteinen aufgestellt. Ein Merkmal von DCAF-Proteinen ist die DWD-Domäne. Diese Domäne kann über DDB1 mit einem CUL4-E3-Ligase-Komplex interagieren (Lee et al. 2007). Um diese Hypothese zu bestätigen, musste eine Interaktion von OZS3 mit DDB1a nachgewiesen werden. Dazu wurden im Vorfeld bereits Versuche durchgeführt. Hierbei konnte die Interaktion *in planta* mittels BiFC nachgewiesen werden und *in vivo* durch Y2H (Weber et al. 2020). Um die Hypothese weiter zu stützen, sollte die *in vivo*-Interaktion zusätzlich durch eine Co-Immunopräzipitation nachgewiesen werden. Für die Immunodetektion wurden als Negativ-Kontrolle zum einen DDB1a allein und zum anderen gemeinsam mit GFP exprimiert, um zu zeigen, dass HA-markiertes DDB1a allein oder zusammen mit GFP nicht präzipitiert werden kann. Zum Nachweis der Interaktion zwischen OZS3 und DDB1a wurden diese zusammen exprimiert. Betrachtet man die Ergebnisse der Co-Immunopräzipitation, kann man sehen, dass in allen drei Proteinextrakten vor der Präzipitation DDB1a nachgewiesen werden konnte. Nachdem die Proteine mit einem GFP-Antikörper präzipitiert wurden, konnte nur noch bei einer Co-Expression von DDB1a mit OZS3 DDB1a nachgewiesen werden (Abb. 27). Dadurch konnte die Interaktion also auch durch Co-Immunopräzipitation gezeigt werden, wodurch die vorherigen Experimente bestätigt wurden.

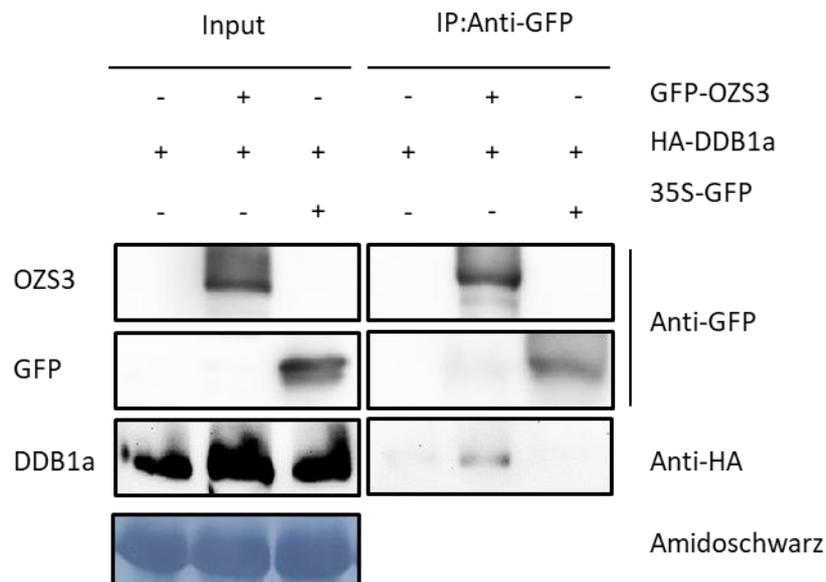


Abb. 27: Nachweis der Interaktion von OZS3 mit DDB1a durch Co-Immunopräzipitation. GFP-OZS3 und HA-DDB1a wurden transient in Blättern von *N. benthamiana* exprimiert. Gesamt-Protein-Extrakt der infiltrierten Blätter, entweder mit HA-DDB1a allein oder gemeinsam mit GFP-OZS3, wurden mittels anti-GFP-Antikörper präzipitiert und mittels Western Blot sichtbar gemacht. Ebenfalls wurden Blätter nur mit GFP als zusätzlicher Kontrolle infiltriert.

3.2.2 *OZS3* ist ein essentielles Gen

Zusätzlich zu dem Nachweis der Interaktion von *OZS3* mit DDB1a soll *OZS3* weiter charakterisiert werden. Dazu wurde im Vorfeld versucht ein Null-Allel von *ozs3* zu finden. Dafür wurden mehrere T-DNA-Insertions-Linien der SALK- und SAIL-Kollektion analysiert. Die SALK-Linien hatten dabei entweder eine Mutation im Promotor oder im 3'-UTR. Diese Linien zeigten bei Platten-Assays aber keine Veränderung im Wurzelwachstum und wurden deshalb nicht weiter untersucht. Die getestete SAIL-Linien hatten eine Insertion im ersten Exon. Obwohl diese Mutation zur Bildung eines verkürzten Proteins führte, war es in Bezug auf die Komplementation der *ozs3*-Phänotypen voll funktionsfähig (Weber et al. 2020). Es handelte sich bei dieser T-DNA-Linie also nicht um eine wirkliche Knockout-Mutante. Da unter den zahlreichen erhältlichen *ozs3*-T-DNA-Insertionslinien kein Null-Allel zu finden war, stand die Vermutung im Raum, dass es sich bei *OZS3* um ein essentielles Gen handelt.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden mittels CRISPR/Cas9 transgene Linien erzeugt. Zur Herstellung dieser Linien wurden zwei Zielsequenzen gewählt, welche sich im ersten Exon von *OZS3* befanden (Abb. 28A). Pflanzen der T1-Generation wurden sequenziert und es konnten heterozygote Individuen gefunden werden, welche sowohl das WT-Allel als auch eine mutierte *OZS3*-Variante enthielten. Bei der Verwendung der Zielsequenz 1 konnte eine Linie (*OZS3*-Cas9-1) identifiziert werden, welche eine Insertion von einem Nukleotid an der prognostizierten Stelle aufwies. Vorhergesagt als Mutationsstelle war eine Mutation drei Nukleotide entfernt von der PAM-Sequenz (Abb. 28B). Auch für die zweite Zielsequenz konnte eine Linie (*OZS3*-Cas9-2) mit einem „frameshift“ gefunden werden. Hier liegt eine Deletion eines Nukleotids vor. Erneut kam es drei Nukleotide entfernt von der PAM-Sequenz zur Mutation (Abb. 28B). Von diesen beiden Linien wurden die Samenschoten betrachtet. Dabei konnte beobachtet werden, dass keine der heterozygoten Linien Schoten zeigt, welche zur Gänze mit Samen beladen waren. Etwa 25% der Samenanlagen konnten nicht zu Samen ausgebildet werden. Dies entsprach nach Mendel der Anzahl an Pflanzen, die homozygot für *OZS3*-Cas9 wären. Im Gegensatz dazu zeigten transformierte Pflanzen, welche zwar Cas9 tragen, aber nicht die Mutation in *OZS3* keine Veränderung in der Samenproduktion. Hier sind die Schoten voll beladen (Abb. 28C). Zudem wurde die T2-Generation genotypisiert. Dabei konnten keine Pflanzen gefunden werden, welche homozygot für *OZS3*-Cas9 waren. Lediglich homozygote WT- Pflanzen und heterozygote Linien konnten identifiziert werden. Dies zeigte, dass ein kompletter Funktionsverlust von *OZS3* embryo-letal ist.

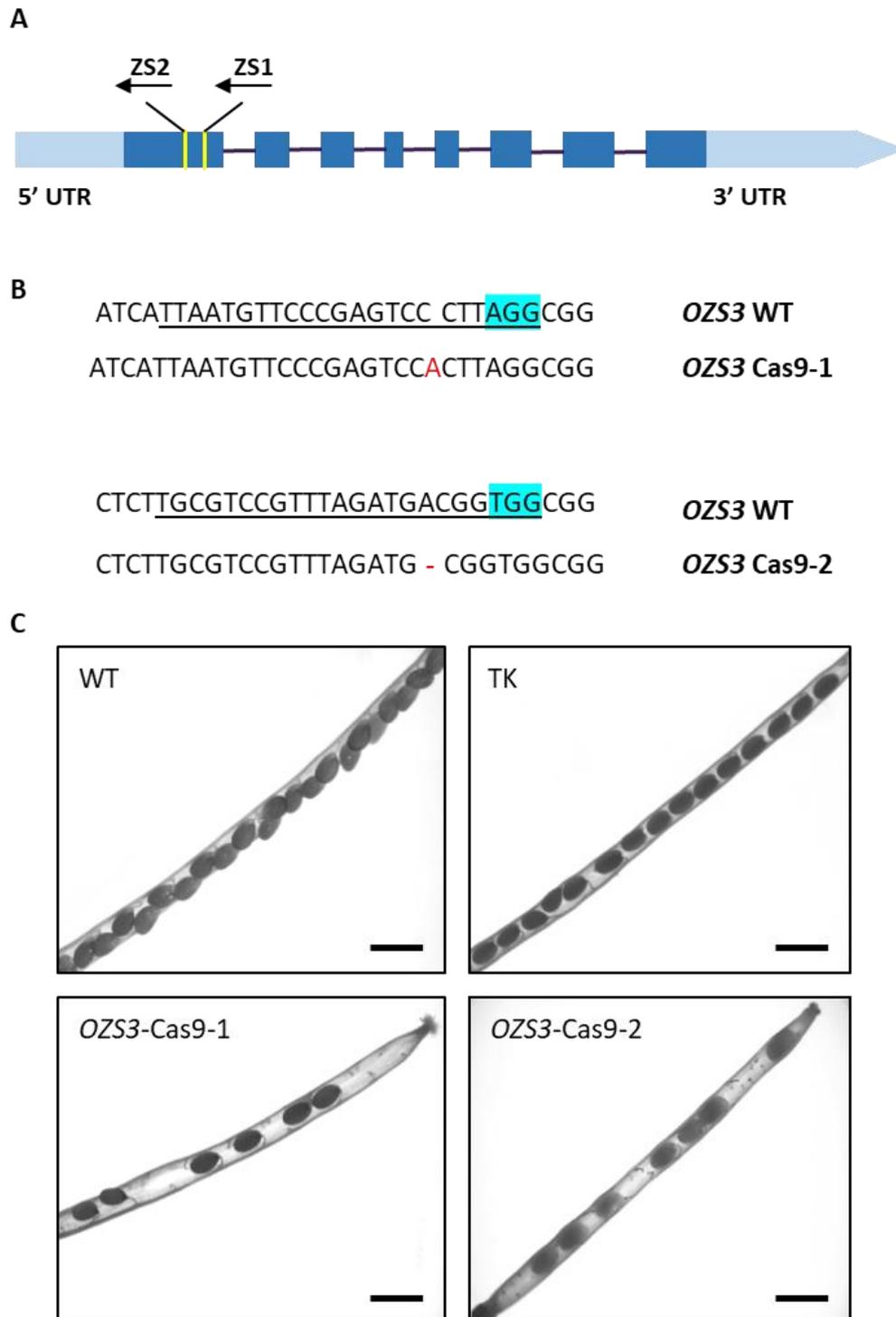


Abb. 28: OZS3 Funktionsverlust führt zu Embryo-Letalität. Mit Hilfe von CRISPR/Cas9 wurden *OZS3* Null-Allele generiert. **(A)** Exon-Intron Struktur von *OZS3* (Dunkel-blaue Boxen = Exons, gelbe Striche = Lokalisation der Zielsequenz). Beide Zielsequenzen sind im ersten Exon lokalisiert. **(B)** Sequenzen, der durch CRISPR/Cas9 veränderten Pflanzen. Die obere Mutation wurde mit Hilfe der Zielsequenz 1 erzeugt, die untere durch Zielsequenz 2. Beide Mutationen sind jeweils 3 Nukleotide von der PAM-Sequenz entfernt. In Rot sind die Mutationen gezeigt. Die Zielsequenzen sind unterstrichen und die PAM Sequenzen sind blau markiert. **(C)** Schoten von *A. thaliana* Col-0 (WT), einer transgenen Kontrolle (CAS9-Linie ohne Mutation in *OZS3*; TK) und zwei unabhängigen transgenen Linien mit Insertion (*OZS3*-CAS9-1) und Deletion (*OZS3*-CAS9-2) im ersten Exon von *OZS3*. Gezeigt sind jeweils Schoten der T1-Generation. Längenstandard = 1 mm.

3.2.3 ROS-Produktion unter Zink-Stress

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Bildung von ROS betrachtet. Sind Pflanzen hohen Schwermetallkonzentrationen ausgesetzt, kommt es zur vermehrten Produktion von ROS (Choudhury et al. 2013). Darunter fällt die Bildung von Wasserstoffperoxid oder Sauerstoffradikalen (Choudhury et al. 2013). Da *ozs3* eine Veränderung in der Zink-Toleranz zeigte, war es von Interesse herauszufinden, ob die Bildung von ROS ebenfalls verändert war. Dazu wurden Keimlinge von Col-0 und zwei RK-Linien von *ozs3* unter Zink-Stress auf ihre Produktion von ROS untersucht. Durch eine DAB-Färbung konnte die Konzentration an Wasserstoffperoxid in den Keimlingen gemessen werden. Unter Kontroll-Bedingungen konnte dabei gesehen werden, dass beide RK-Linien im Vergleich zu Col-0 signifikant weniger H_2O_2 bildeten. Konnte bei Col-0 noch eine H_2O_2 -Konzentration von $0,4 \mu\text{mol}/\text{mg}$ gemessen werden, zeigten die *ozs3*-Mutanten nur noch eine halb so hohe Konzentration von $0,2 \mu\text{mol}/\text{mg}$. Unter Zink-Stress hingegen zeigten die *ozs3*-Mutanten mit $1 \mu\text{mol}/\text{mg}$ eine signifikant höhere Akkumulation von Wasserstoffperoxid als bei Col-0 mit nur $0,5 \mu\text{mol}/\text{mg}$ (Abb. 29A).

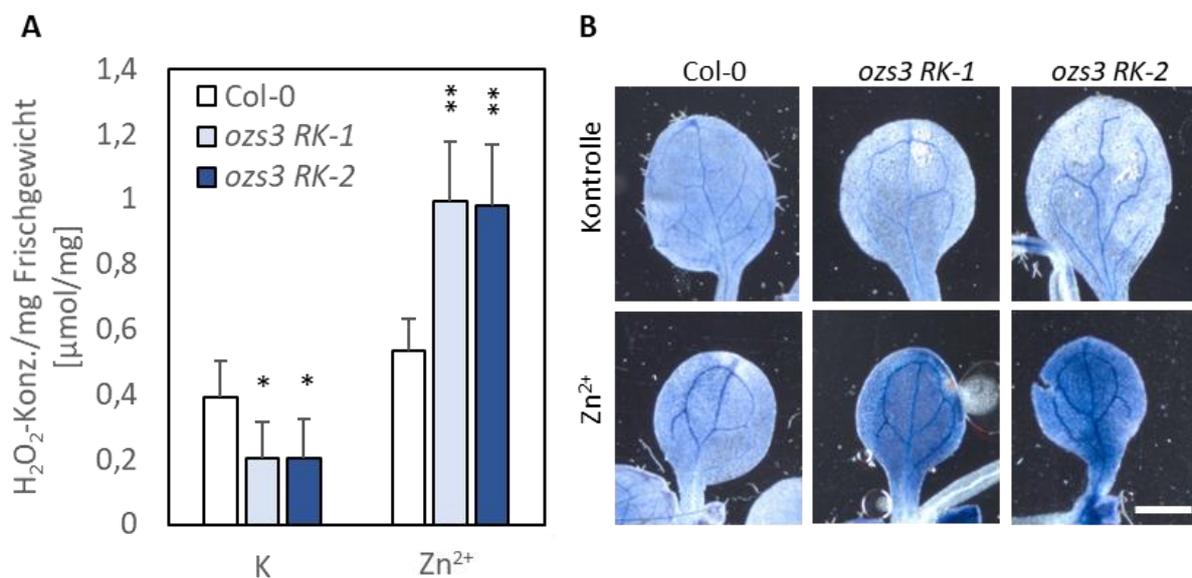


Abb. 29: Färbung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in *ozs3*-Mutanten unter Zink-Stress. Col-0 und *ozs3 RK-1* und *ozs3 RK-2* wurden für 12 d vertikal auf Hoagland-Platten unter Kontroll-Bedingungen und $60 \mu\text{M Zn}^{2+}$ angezogen. **(A)** Die Akkumulation von H_2O_2 wurde mittels DAB-Färbung ermittelt. Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm StAbw von 3 unabhängigen Experimenten ($n = 6$). Signifikante Unterschiede wurden durch Student's t-Test ermittelt. Sterne zeigen statistische Unterschiede zu Col-0 an (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$). **(B)** O_2^- Akkumulation wurde durch NBT-Färbung sichtbar gemacht. Die Bilder zeigen repräsentative Blätter. Längenstandard = 1 mm.

Als nächstes sollte die Bildung von Sauerstoffradikalen untersucht werden. Dazu wurden Keimlinge mit NBT gefärbt. Hier konnten die gleichen Ergebnisse wie bei der DAB-Färbung beobachtet werden.

Unter Kontrollbedingungen war nahezu kein Unterschied in der Intensität der Färbung zwischen Col-0 und den beiden *ozs3*-Mutanten zu beobachten, wenn auch die Tendenz vorlag, dass Col-0 eine etwas tiefere Blaufärbung zeigte. Dies hieße, dass die *ozs3*-Mutanten geringfügig weniger Sauerstoffradikale akkumuliert hätten. Unter Zink-Überschuss zeigte Col-0 etwa die gleiche Blaufärbung wie unter Kontrollbedingungen. Unter Zinkstress wurden bei Col-0 also nicht vermehrt ROS gebildet. Anders verhält es sich bei *ozs3*. Hier konnte bei beiden RK-Linien im Vergleich zu Col-0 unter Zink-Stress eine deutlich tiefere Blaufärbung beobachtet werden. Es lag also eine erhöhte Produktion von Sauerstoffradikalen vor (Abb. 29B). Es konnte also gezeigt werden, dass es unter Zink-Stress in *ozs3* zu einer erhöhten ROS-Produktion kommt.

3.2.4 ROS-Produktion unter Kälte-Stress

Bei *ozs3* wurde jedoch nicht nur eine Veränderung des Wurzelwachstums auf Zink-Stress, sondern auch unter Kälte-Einwirkung gefunden. Da bereits gezeigt werden konnte, dass Kälte zur Bildung von ROS führt (Suzuki et al. 2006), wurde im Folgenden die ROS-Produktion unter Kälte-Stress untersucht. Dazu wurden Keimlinge auf Hoagland-Platten angezogen und nach sieben Tagen für 24 Stunden bei 4°C kultiviert. Anschließend wurde die Bildung von Sauerstoffradikalen durch NBT-Färbung sichtbar gemacht. Dabei zeigte sich, dass sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Kälte-Behandlung kein Unterschied in der ROS-Akkumulation zwischen Col-0 und den *ozs3*-RK-Linien zu finden war. Es konnte lediglich eine leicht erhöhte Konzentration von Sauerstoffradikalen unter Kälte-Stress im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Abb. 30). Die Mutation in *OZS3* führte unter Kälte also zu einer Veränderung im Wurzelwachstum, hatte aber keinen Einfluss auf die ROS-Akkumulation unter Kälte.

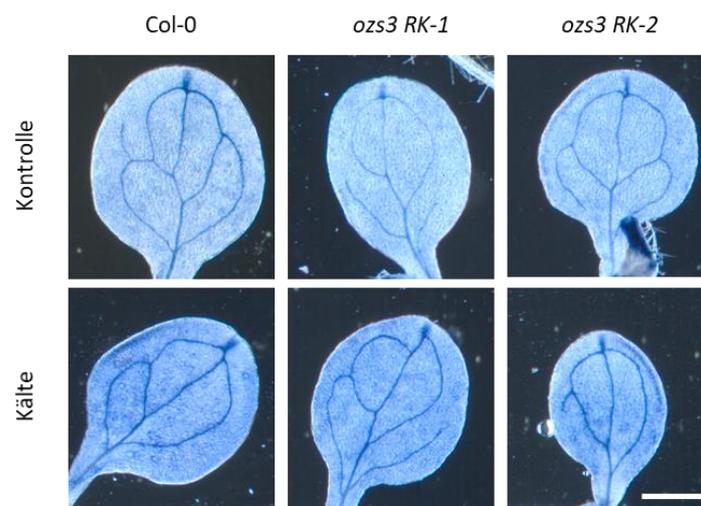


Abb. 30: Färbung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in *ozs3*-Mutanten unter Kälte-Stress. Col-0 und *ozs3 RK-1* und *ozs3 RK-2* wurden für 7 d vertikal auf Hoagland-Platten unter Kontroll-Bedingungen angezogen und anschließend für 24 h bei 4°C kultiviert. O_2^- Akkumulation wurde durch NBT-Färbung sichtbar gemacht. Die Bilder zeigen repräsentative Blätter von drei unabhängigen Experimenten. Längenstandard = 1 mm.

3.3 *ozs1*

Um weitere Komponenten der Zink-Homöostase, wie zum Beispiel Aufnahmesysteme, zu identifizieren, sollte ein Suppressor-Screen durchgeführt werden. Dazu wurde *ozs1* herangezogen, da diese Mutante unter Zink-Stress die stärkste Hypersensitivität, verglichen mit den anderen *ozs*-Mutanten, zeigte. Dadurch wurde die spätere Identifizierung von Mutanten mit einem verbesserten Wurzelwachstum unter Zink-Stress erleichtert. Es wurden also *ozs1*-Samen EMS-mutagenisiert, um Suppressor-Mutanten zu erzeugen, welche im Vergleich zu *ozs1* eine geringere Zink-Hypersensitivität zeigten. Nach der Mutagenisierung wurden etwa 3500 Pflanzen der M1-Generation kultiviert. Anhand der Samen der M1-Generation konnte die Mutageneserate bestimmt werden. Dazu wurden die Samen auf Hoagland-Medium kultiviert und Keimlinge mit einer Chlorophyll-Defizienz gezüchtet. Dadurch konnte eine Mutationsrate von 0,5 - 3% ermittelt werden. Anschließend wurde die M2-Generation auf 50 μM Zn^{2+} selektiert. Dazu wurden im Ganzen etwa 63 000 Samen untersucht. Etwa zwei Drittel der getesteten Samen keimten auf den Zink-Platten. Unter diesen Keimlingen konnten 300 Pflanzen mit einem längeren Wurzelwachstum im Vergleich zu *ozs1* unter Zink-Stress gefunden werden. Die erneute Überprüfung in der nächsten Generation führte zur vorläufigen Bestätigung von drei Linien, die im Anschluss näher untersucht wurden.

3.3.1 Verbesserte Zink-Toleranz von *ozs1* Suppressor-Mutanten

Dazu wurden die Suppressor-Mutanten zunächst auf Hoagland-Kontroll- und Zink-Stress-Platten angezogen und das Wurzelwachstum beobachtet. Zwei potentielle Suppressor-Mutanten (*psm1* und *psm3*) zeigten bereits unter Kontroll-Bedingungen ein signifikant besseres Wurzelwachstum als *ozs1*.

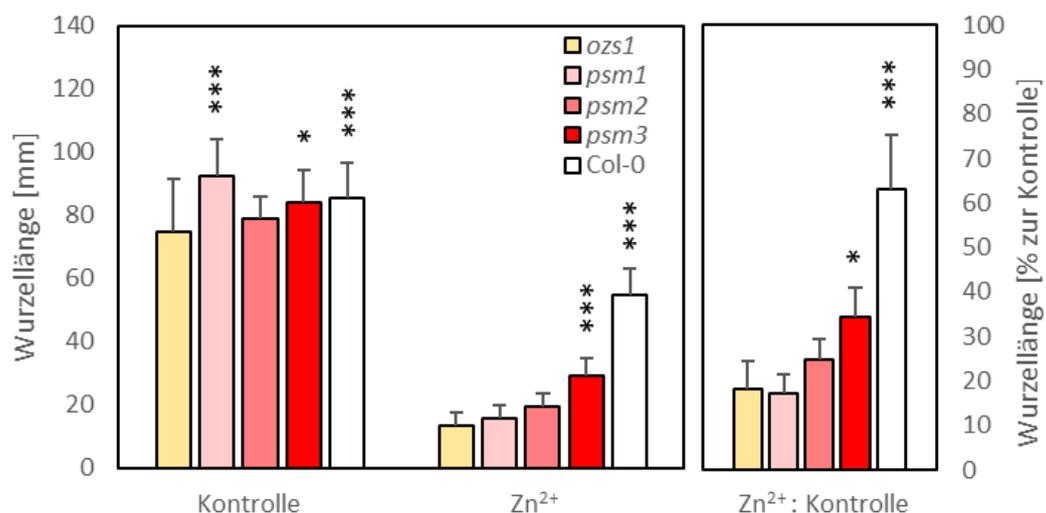


Abb. 31: Verbessertes Wurzelwachstum von *ozs1* Suppressor-Mutanten unter Zink-Stress. *ozs1*, *psm1*, *psm2*, *psm3* und Col-0 wurden für 12 - 14 d auf Hoagland-Platten mit 50 μM Zn^{2+} angezogen. Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm StAbw von 3 unabhängigen Experimenten ($n = 31 - 87$). Signifikante Unterschiede wurden durch zweifaktorielle ANOVA und Tukey's HSD-Test (links) bzw. Student's t-Test (rechts) ermittelt. Sterne zeigen statistische Unterschiede zu *ozs1* an (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$).

Dabei war bei *psm1* ein etwa 2 cm längeres Wurzelwachstum zu beobachten und bei *psm3* ein um etwa 1 cm besseres Wachstum. *psm1* zeigte mit 3 mm eine sehr geringe Verbesserung im Wurzelwachstum im Vergleich zu *ozs1*, wobei hier kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. Auch *psm2* zeigte ein leicht verbessertes Wurzelwachstum um 6 mm, welches jedoch auch nicht signifikant unterschiedlich zu *ozs1* war. Anders bei *psm3*. Hier konnte ein um 15 mm signifikant längeres Wurzelwachstum beobachtet werden (Abb. 31).

Nun zeigte sich bei *psm3* jedoch bereits ein verbessertes Wachstum unter Kontroll-Bedingungen. Um zu zeigen, dass dennoch ein signifikant besseres Wurzelwachstum vorlag, wurde die relative Wurzellänge zur Kontrolle berechnet. Dabei zeigte sich, dass *psm3* noch immer eine signifikant verbesserte Zink-Toleranz im Vergleich zu *ozs1* aufwies (Abb. 31). Bei *psm1* konnte nach dieser erneuten Überprüfung des Phänotyps also keine Verbesserung der Zinktoleranz gefunden werden. Aus diesen Gründen wurde sie bei den weiteren Experimenten nicht eingeschlossen. Auch wenn *psm2* keine signifikante Verbesserung des Wurzelwachstums zeigte, konnte hier jedoch zumindest ein Trend dahingehend festgestellt werden. Betrachtet man die relativen Werte des Wurzelwachstums unter Zink-Stress war der p-Wert bei *psm2* mit 0,1 bereits deutlich kleiner als bei *psm1* mit 0,4. Deshalb wurde *psm2* bei den nachfolgenden Experimenten ebenfalls untersucht. Die zwei bestätigten Suppressor-Mutanten wurden nun in *suo1* (*psm3*) und *suo2* (*psm2*) umbenannt.

3.3.2 *IRT1* in *ozs1* Suppressor-Mutanten

Eine zu Beginn aufgestellte Theorie, wie es zu einer verbesserten Zink-Toleranz in *ozs1* Suppressor-Mutanten kommen könnte, war die Mutation eines Aufnahme-Mechanismus für Zink. Dadurch würde weniger Zink in die Zelle gelangen. Da es in *ozs1* dadurch zur Toxizität kommt, dass Zink nicht mehr in die Vakuole transportiert werden kann, könnte ein geringerer Zink-Gehalt in der Zelle zu einer verbesserten Fitness der Pflanze führen. Ein bereits bekannter Aufnahmetransporter für Zink ist *IRT1*. Deshalb sollte zunächst überprüft werden, ob eine Mutation vorlag, die in irgendeiner Weise die *IRT1* Aktivität beeinflusst. Dazu wurde *IRT1* in den beiden bestätigten *ozs1* Suppressor-Mutanten sequenziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass keine Mutationen im Promotor oder in der codierenden Sequenz vorlagen.

Da aber auch eine indirekte Beeinflussung von *IRT1* denkbar ist, wurde das relative Transkriptlevel von *IRT1* in Col-0, *ozs1* und den *ozs1* Suppressor-Mutanten unter Kontroll-Bedingungen und unter Zink-Stress gemessen. Unter Kontroll-Bedingungen zeigten sich bei Werten von 450 - 570 keine signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Linien. Unter Zink-Stress zeigten alle Linien einen signifikanten Anstieg in der Expression von *IRT1*. Dabei konnte bei *suo2* mit 4112 ± 518 eine signifikant höhere *IRT1* Transkription als bei *ozs1* mit 2611 ± 405 gemessen werden. *suo1* sowie Col-0

wiesen unter Zink-Stress alle die gleiche Expression auf wie *ozs1* (Abb. 32). Bei *suo1* konnte also keine Veränderung in der *IRT1*-Expression gemessen werden, welche zu einer veränderten Zink-Toleranz hätte führen können. Lediglich *suo2* zeigte ein leicht erhöhtes *IRT1*-Transkriptlevel.

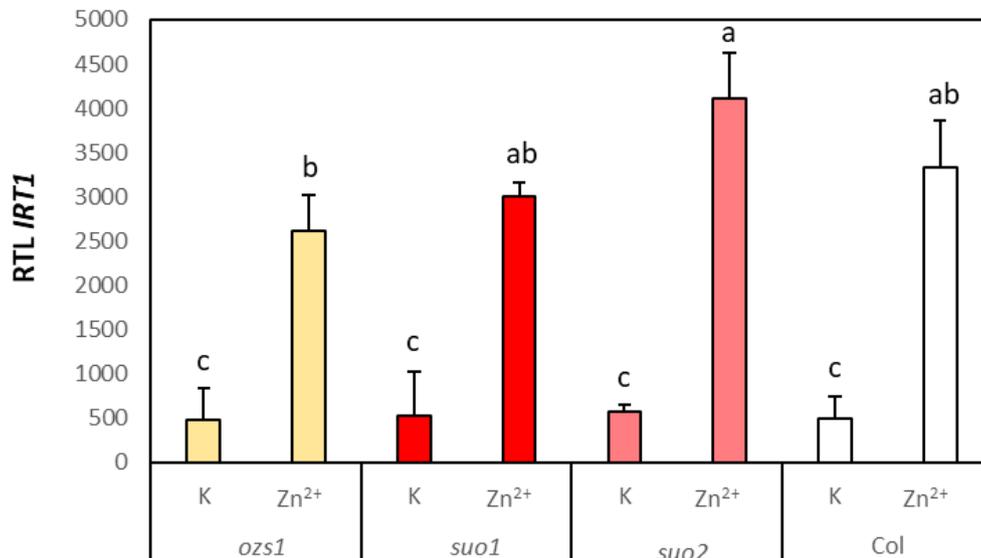


Abb. 32: *IRT1* Transkriptlevel von *ozs1* Suppressor-Mutanten unter Zink-Stress. *ozs1*, *suo1*, *suo2* und Col-0 wurden für 12 d auf Hoagland-Platten mit 50 μM Zn²⁺ angezogen. Anschließend wurde das *IRT1*-Transkriptlevel vermessen. Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm StAbw von 2 - 3 unabhängigen Experimenten (n = 2 - 3). Signifikante Unterschiede wurden durch Student's t-Test ermittelt ($p \leq 0,05$).

3.3.3 Metall-Verteilung in *ozs1* Suppressor-Mutanten

Wäre nach der zuvor aufgestellten Theorie ein Zink-Aufnahmemechanismus verantwortlich für das verbesserte Wurzelwachstum, sollte sich der Zink-Gehalt in der Pflanze ändern, da weniger Zink in die Zellen gelangen würde. Um dies zu überprüfen, wurde der Metall-Gehalt der Suppressor-Mutanten vermessen.

3.3.3.1 Metall-Verteilung in Keimlingen

Zunächst wurde die Metall-Verteilung in Keimlingen gemessen. Dazu wurden die Pflanzen auf Hoagland-Platten mit und ohne Zink kultiviert und anschließend in Wurzel und Spross getrennt analysiert. Dabei konnte beim Zink-Gehalt sowohl unter Kontroll-Bedingungen wie auch unter Zink-Stress weder im Spross noch in den Wurzeln ein Unterschied gemessen werden (Abb. 33A, B). Unter Zink-Stress war zu beobachten, dass die Zink-Konzentration im Spross und in den Wurzeln im Vergleich zur Kontrolle erhöht war. In den Blättern stieg die Zink-Konzentration auf 214 - 389 ppm an und in den Wurzeln auf 818 - 1486 ppm (Abb. 33A).

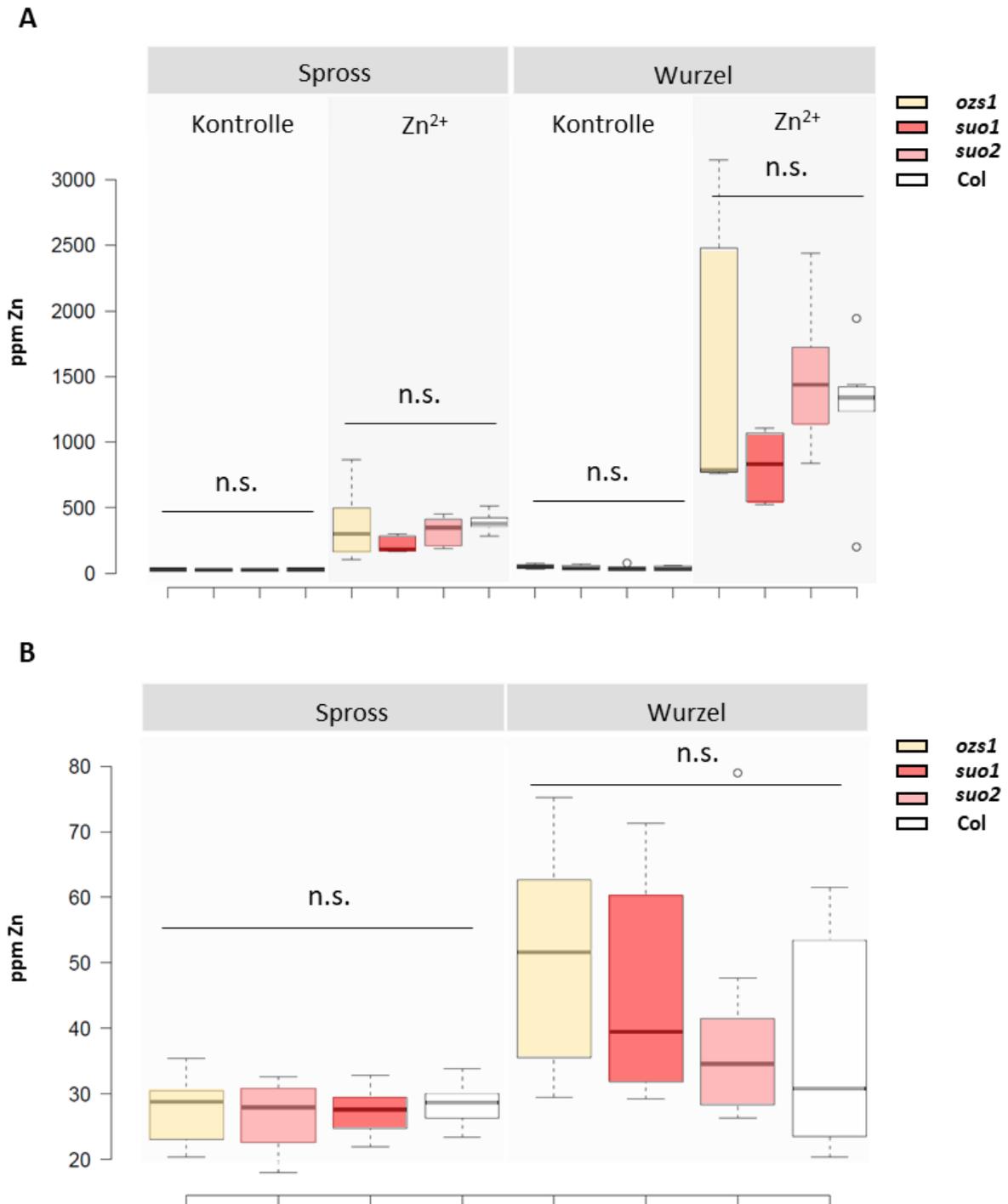
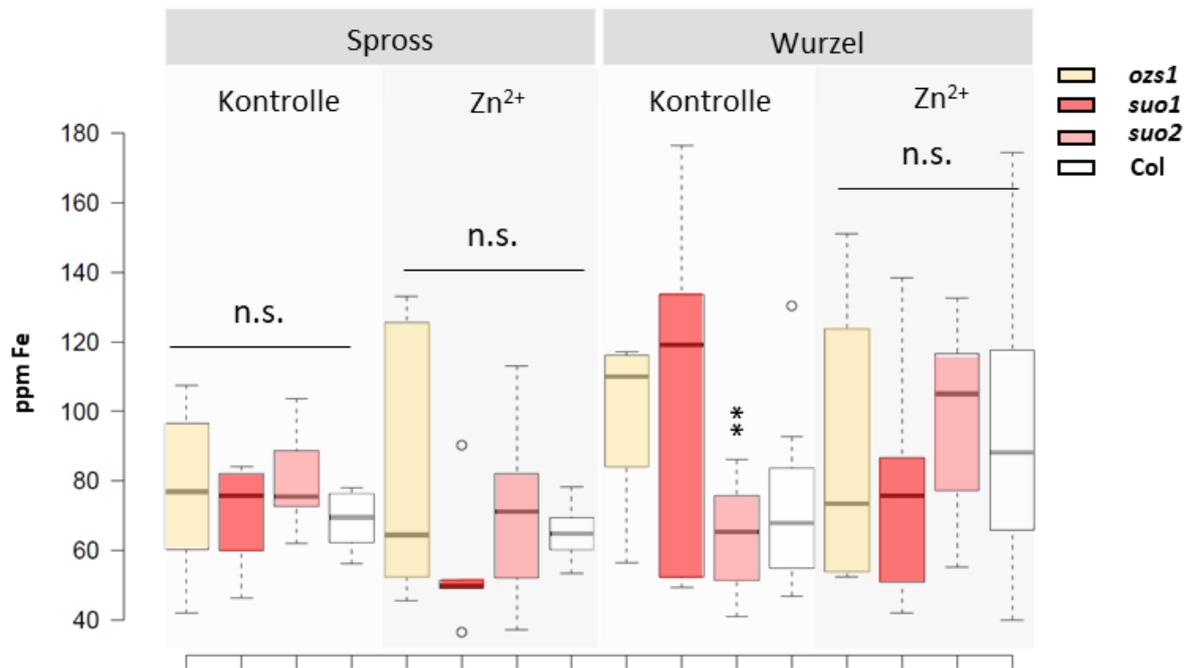


Abb. 33: Zinkakkumulation in Keimlingen von *ozs1* Suppressor-Mutanten. *ozs1*, *suo1*, *suo2* und Col-0 wurden vertikal auf Hoagland-Platten unter Kontroll-Bedingungen und 20 μM Zn^{2+} angezogen. Die Pflanzen wurden getrennt in Spross und Wurzel mittels ICP-OES vermessen. **(A)** Gezeigt ist die Verteilung von Zink unter Kontroll-Bedingungen und Zn^{2+} Stress. **(B)** Zinkgehalt in Spross und Wurzel unter Kontroll-Bedingungen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm StAbw von 3 unabhängigen Experimenten ($n = 4 - 10$). Signifikante Unterschiede zu *ozs1* wurden durch Student's t-Test ermittelt ($*p \leq 0,05$)

Anschließend wurde die Verteilung von Eisen und Mangan betrachtet. Hier konnten im Spross weder unter Kontroll-Bedingungen noch unter Zink-Stress Unterschiede im Eisen-Gehalt gemessen werden. Im Spross lagen die Eisen-Werte sowohl unter Kontroll-Bedingungen als auch unter Zink-Stress zwischen 54 - 82 ppm. In den Wurzeln wurde bei der Kontrolle bei *suo2* mit 64 ± 16 ppm ein signifikant geringerer Eisengehalt als in *ozs1* mit 100 ± 25 ppm gemessen. *suo1* zeigte mit 106 ± 55 ppm etwa den gleichen Eisen-Gehalte wie *ozs1* mit 99 ± 25 ppm. Unter Zink-Stress zeigte sich in den Wurzeln hingegen kein Unterschied in der Eisen-Verteilung. Die Konzentration war mit 78 - 98 ppm ähnlich den Konzentrationen unter Kontroll-Bedingungen oder im Spross (Abb. 34A).

Bei der Manganverteilung zeigten die *ozs1*-Suppressor-Mutanten im Spross unter Kontroll-Bedingungen keine Veränderung zu *ozs1*. Unter Zink-Stress war in *suo1* ein signifikant geringerer Mangan-Gehalt als in *ozs1* zu messen. *suo1* zeigte keinen Unterschied zu *ozs1*. Der Mangan-Gehalt lag dabei bei etwa 13 ppm bei *ozs1* und *suo2*. In *suo1* hingegen lag eine verringerte Konzentration von 8 ± 2 ppm vor. Zudem zeigte *ozs1* sowohl unter Kontroll-Bedingungen als auch unter Zink-Stress einen signifikant höheren Mangan-Gehalt als Col-0. In den Wurzeln konnte dieser erhöhte Mangan-Gehalt in *ozs1* im Vergleich zu Col-0 weder unter Kontroll-Bedingungen noch unter Zink-Stress beobachtet werden. Allgemein zeigten sich in der Wurzel mit 4 - 7 ppm geringere Mangan-Konzentrationen als im Spross mit 8 - 15 ppm. Dabei konnte weder unter Kontroll-Bedingungen noch unter Zink-Stress ein Unterschied in der Mangan-Konzentration im Vergleich zu *ozs1* gefunden werden (Abb. 34B).

A



B

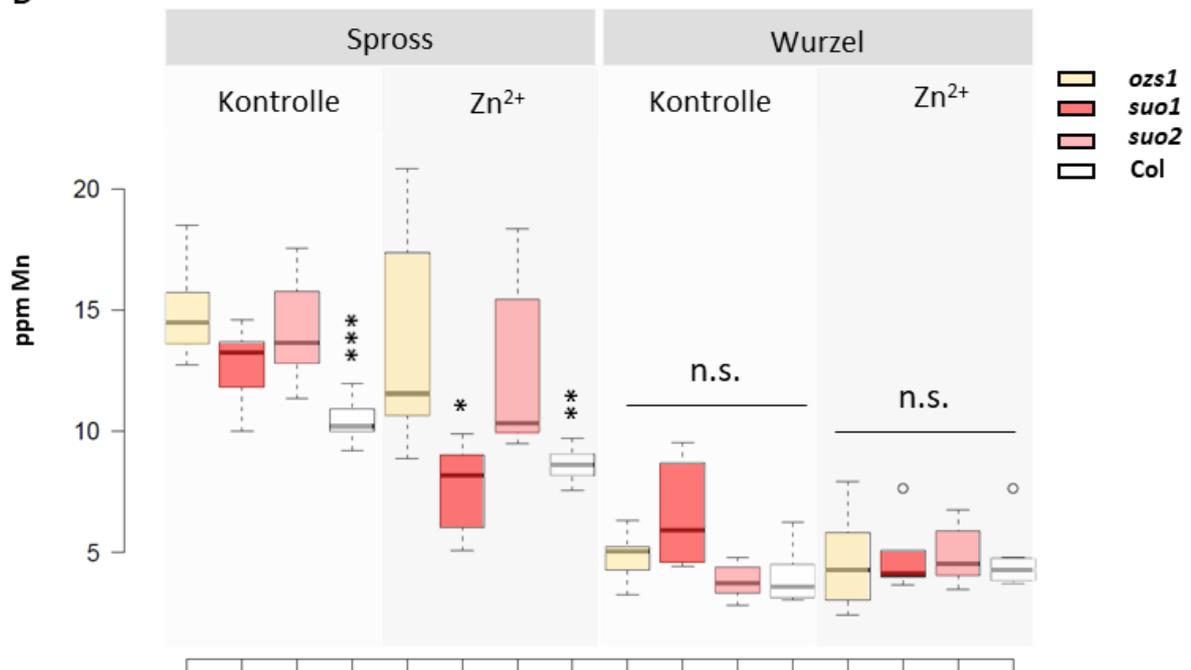


Abb. 34: Metallakkumulation in Keimlingen von *ozs1*-Suppressor-Mutanten. *ozs1*, *suo1*, *suo2* und Col-0 wurden vertikal auf Hoagland-Platten unter Kontrollbedingungen und 20 μ M Zn²⁺ angezogen. Die Pflanzen wurden getrennt in Spross und Wurzel mittels ICP-OES vermessen. (A) Fe²⁺ Verteilung, (B) Mn²⁺ Verteilung. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm StAbw von 3 unabhängigen Experimenten (n = 4 - 10). Signifikante Unterschiede zu *ozs1* wurden durch Student's t-Test ermittelt (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)

3.3.3.2 Metall-Verteilung in adulten Pflanzen

Nach den Keimlingen sollte die Metall-Verteilung auch in adulten Pflanzen gemessen werden. Als Erstes wurden erneut die Zink-Gehalte untersucht. Unter Kontroll-Bedingungen zeigten sich dieses Mal weder im Spross noch in den Wurzeln signifikante Unterschiede im Vergleich zu *ozs1* (Abb. 35A). Unter Zink-Stress war im Spross und in der Wurzel im Vergleich zu Kontrolle mehr Zink vorhanden. Im Spross lagen Konzentrationen von 400 - 588 ppm Zink vor und in der Wurzel 1655 - 1763 ppm im Vergleich zur Kontrolle mit 21 - 37 ppm. Es gab jedoch keine signifikanten Unterschiede in den Zink-Gehalten zwischen den *ozs1* Suppressor-Mutanten und Col-0 und *ozs1*, weder im Spross noch in der Wurzel (Abb. 35B).

Bei den Eisen-Gehalten zeigten sich im Spross sowohl unter Kontroll-Bedingungen als auch unter Zink-Stress Konzentrationen von 80 - 95 ppm. Dabei konnten zwischen *ozs1* und den anderen Linien keine Unterschiede festgestellt werden. Ebenso wie in den Wurzeln, auch hier gab es keine signifikanten Unterschiede in den Eisenkonzentrationen. Dabei waren die Eisengehalte höher als im Spross. Unter Kontroll-Bedingungen lagen Gehalte von 113 - 192 ppm vor und unter Zink-Stress von 387- 513 ppm (Abb. 36A).

Bei den Mangan-Konzentrationen konnten ebenfalls keine Unterschiede zu *ozs1* festgestellt werden. Was beobachtet werden konnte, war, dass mit 125 - 148 ppm höhere Mangan-Konzentrationen im Spross im Vergleich zur Wurzel mit 50 - 111 ppm gemessen werden konnten (Abb. 36B).

In adulten Pflanzen konnten also keine Unterschiede in der Metallverteilung zwischen *ozs1* und den *ozs1*-Suppressor-Mutanten festgestellt werden. Auch in Keimlingen konnten kaum Unterschiede beobachtet werden. Lagen Unterschiede vor, wie die verringerte Eisen-Konzentration von *suo2* in den Wurzeln unter Kontroll-Bedingungen oder die geringeren Mangan-Konzentrationen von *suo1* unter Zink-Stress im Spross, waren diese, obwohl signifikant, sehr gering. Daher lag die Vermutung nahe, dass keine Metallaufnahme-Mechanismen mutiert waren und die beobachtete gesteigerte Zink-Toleranz andere Ursachen hatte.

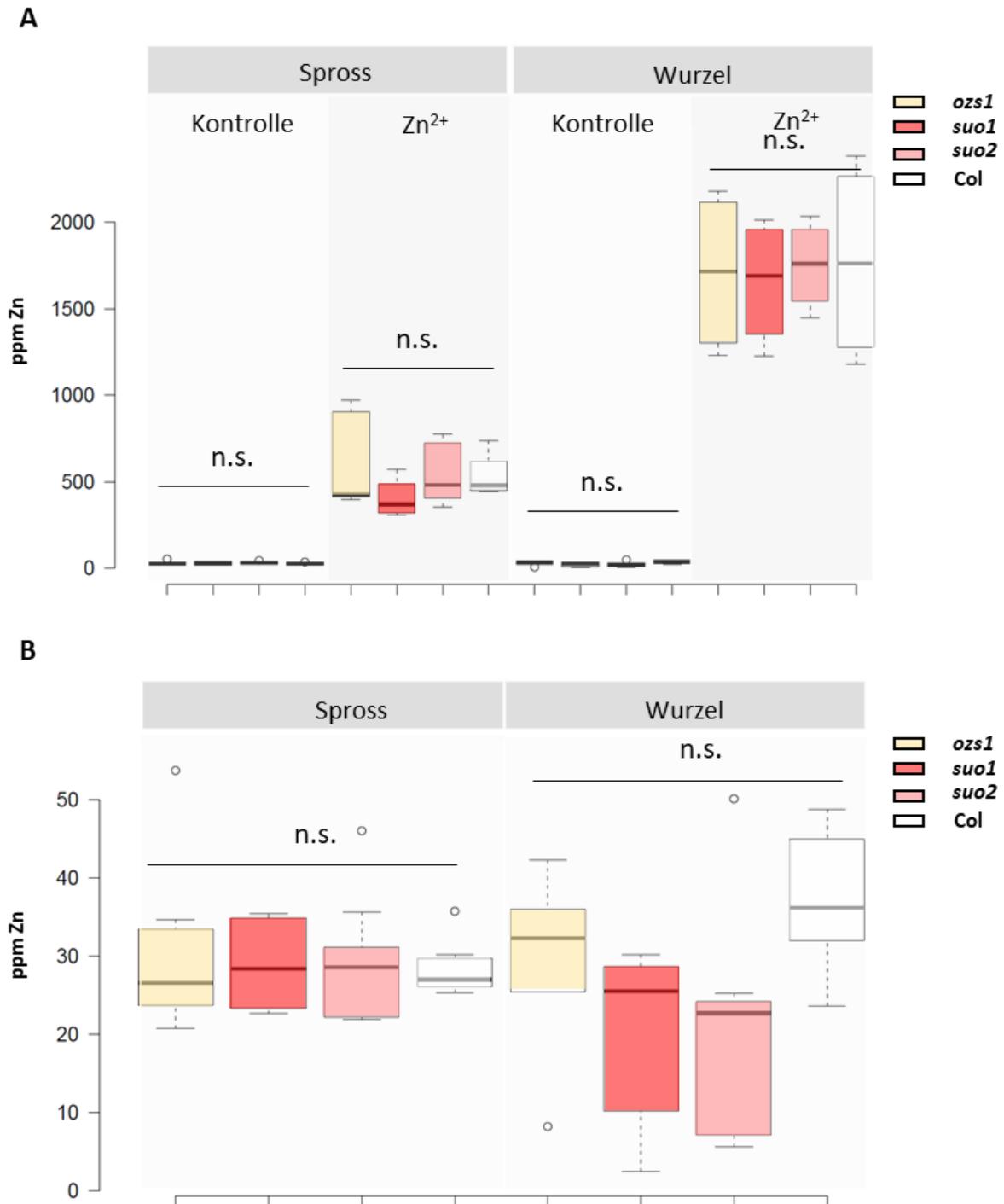


Abb. 35: Zinkakkumulation in adulten Pflanzen von *ozs1*-Suppressor-Mutanten. *ozs1*, *suo1*, *suo2* und Col-0 wurden im hydroponischen System unter Kontroll-Bedingungen und 20 μM Zn²⁺ angezogen. Die Pflanzen wurden getrennt in Spross und Wurzel mittels ICP-OES vermessen. **(A)** Gezeigt ist die Verteilung von Zink unter Kontroll-Bedingungen und Zn²⁺ Stress. **(B)** Zinkgehalt in Spross und Wurzel unter Kontroll-Bedingungen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± StAbw von 3 unabhängigen Experimenten (n = 4 - 10). Signifikante Unterschiede zu *ozs1* wurden durch Student's t-Test ermittelt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

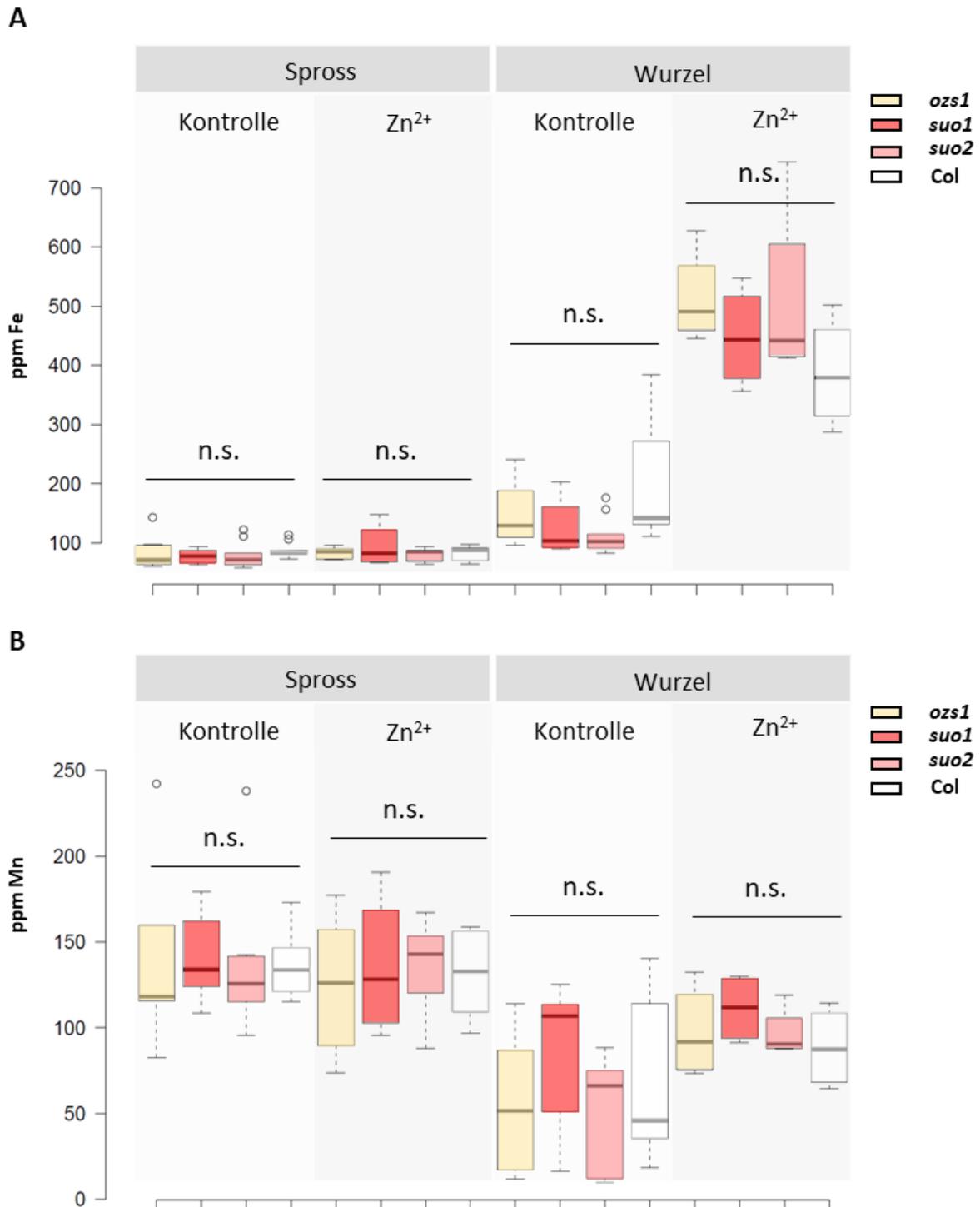


Abb. 36: Metallakkumulation in adulten Pflanzen von *ozs1*-Suppressor-Mutanten. *ozs1*, *suo1*, *suo2* und Col-0 wurden im hydroponischen System unter Kontroll-Bedingungen und 20 μM Zn^{2+} angezogen. Die Pflanzen wurden getrennt in Spross und Wurzel mittels ICP-OES vermessen. **(A)** Fe^{2+} Verteilung **(B)** Mn^{2+} Verteilung. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm StAbw von 3 unabhängigen Experimenten ($n = 4 - 10$). Signifikante Unterschiede zu *ozs1* wurden durch Student's t-Test ermittelt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

3.3.4 QTL-Seq Analyse der *ozs1*-Suppressor-Mutanten

Um nun herauszufinden, weshalb die *ozs1*-Suppressor-Mutanten gegenüber *ozs1* eine gesteigerte Zink-Toleranz aufwiesen, sollte die jeweilig ursächliche Mutation in den *ozs1*-Suppressor-Mutanten gefunden werden. Dazu wurde die QTL-Seq-Analysemethode verwendet. Im Folgenden wurde mit *suo1* gearbeitet, da diese als einzige eine signifikant verbesserte Zink-Toleranz zu *ozs1* zeigte. Dadurch war die Einteilung in die benötigten Pools am zuverlässigsten. Es wurden zwei Pools mit jeweils 80 - 120 Pflanzen erstellt. Dabei wurden die Pflanzen der F2-Generation der Kreuzung von *ozs1* und *suo1* anhand ihres Wurzelwachstum unter Zink-Stress eingeteilt. Es gab einen Pool mit langen Wurzeln (LP) wie bei *suo1* und einen mit kurzen Wurzeln (KP) wie bei *ozs1*.

3.3.4.1 Erbgang

Es konnte beobachtet werden, dass in der F2-Generation fast die Hälfte der Pflanzen ein intermediäres Wurzelwachstum unter Zink-Stress zeigte. Dies legte die Vermutung nahe, dass die Mutation semi-dominant vererbt wird. Um dies weiter zu überprüfen, wurde die F1-Generation ebenfalls unter Zink-Stress kultiviert. Hier zeigte sich, dass bereits heterozygote Pflanzen ein verbessertes Wurzelwachstum gegenüber *ozs1* aufwiesen (Abb. 37). Zusammen mit der Tatsache, dass bei der F2-Generation vorwiegend ein intermediäres Wachstum zu beobachten war, lag die Vermutung nahe, dass es sich höchstwahrscheinlich um einen semidominanten Erbgang handelte.

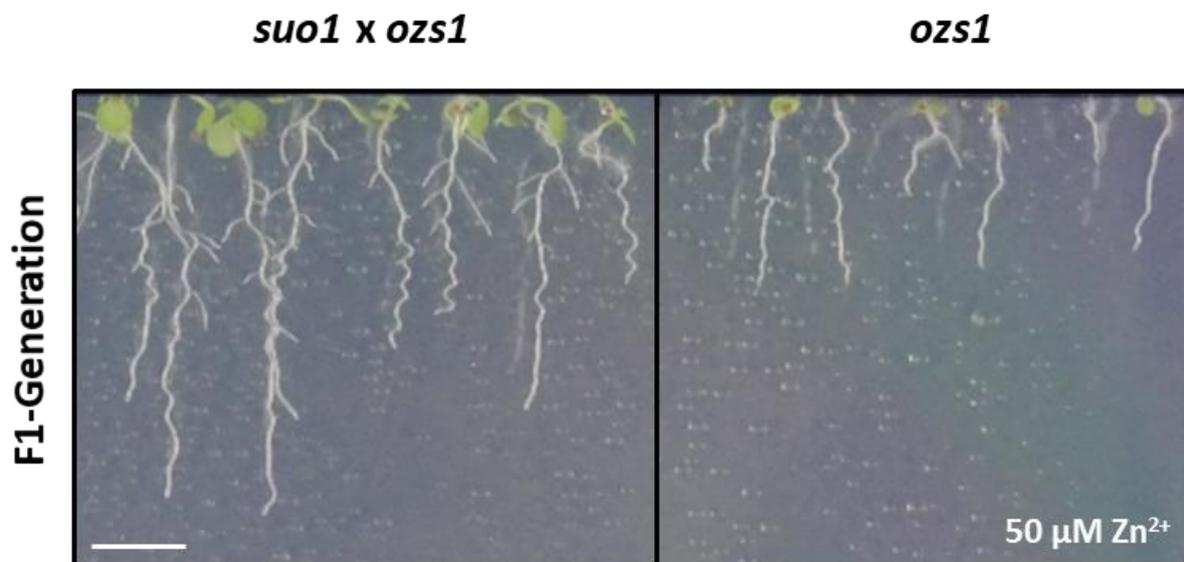


Abb. 37: Semi-dominanter Phänotyp von *suo1*. Die F1-Generation der Kreuzung von *suo1* und *ozs1* wurde zusammen mit *ozs1* auf 50 μM Zn²⁺ angezogen. Gezeigt sind die Keimlinge nach 12 d. Längenstandard = 0,5 cm

3.3.4.2 Bestimmung der Mutation mittels QTL-Seq-Analysemethode

Die QTL-Seq-Analysemethode wurde für jedes Chromosom separat durchgeführt. Zunächst wurden die SNP-Indizes (Anteil der SNPs an einer Stelle, an der Gesamtzahl alignter Sequenzen) der verschiedenen SNPs nach ihrer Lage auf dem jeweiligen Chromosom aufgetragen. In dem Bereich der gesuchten Mutation sollten SNPs aus dem LP sehr hohe SNP-Index-Werte nahe 1 zeigen, da auf diese Mutation hin selektiert wurde. An der gleichen Stelle im Genom sollte der entsprechende SNP-Index aus dem KP einen sehr kleinen Wert aufweisen. Bei der Betrachtung der einzelnen Chromosomen konnte gesehen werden, dass sich die SNP-Indizes der gefundenen SNPs aus beiden Pools auf Chromosom 1, 2, 4 und 5 kaum voneinander unterschieden (Abb. A3). Anders sah es bei Chromosom 3 aus. Ab etwa 16 Mbp zeigten die SNPs des LP höhere SNP-Index-Werte als die SNPs des KP. Auch wenn man hier einen deutlichen Unterschied in den Werten sehen konnte, waren die Werte des KP mit 0,4 - 0,5 eigentlich zu hoch. Ab etwa 20 Mbp konnte neben einem starken Anstieg der SNP-Index-Werte im LP auf bis zu 0,9, eine ebenso starke Senkung der Werte im KP beobachtet werden. Hier wurden teilweise nur noch Werte von 0,2 erreicht (Abb. 39A). Um den Bereich zu bestimmen, in dem sich also die Mutation befindet, musste eine Stelle gefunden werden, bei dem hohe SNP-Index-Werte im LP und gleichzeitig kleine SNP-Index-Werte im KP vorlagen.

Abgesehen von Sequenzier- und Alignment-Fehlern können auch andere Faktoren, wie ein Meiotic Drive (Takagi et al. 2013), zu einer Verzerrung der SNP-Index-Werte führen. Dabei würden sich jedoch SNP-Index-Ausschläge der beiden Pools in dieselbe Richtung zeigen. Um diese Ausschläge zu entfernen, wurden deshalb die Δ SNP-Index-Werte berechnet, indem die SNP-Index-Werte des KP von denen des LP subtrahiert wurden (Abb. 38). SNPs, welche in beiden Pools ähnliche Werte aufwiesen, ergaben also Werte nahe 0. Gesucht wurde nach Werten nahe 1, was darauf schließen ließ, dass die gewünschten Parameter erfüllt waren. Erneut konnte auf den Chromosomen 1, 2, 4 und 5 kein Bereich gefunden werden, in dem die Δ SNP-Index-Werte über $\pm 0,25$ stiegen (Abb. 38). Bei Chromosom 3 konnte ein erster leichter Anstieg bis 0,37 bei etwa 17 Mbp beobachtet werden. Der stärkste Anstieg konnte bei etwa 21 Mbp beobachtet werden. Hier stiegen die Δ SNP-Index-Werte auf bis zu 0,68 (Abb. 39B). Damit wurde der erste Bereich, in dem sich die gesuchte Mutation befindet, auf Chromosom 3 zwischen 16 und 22 Mbp eingegrenzt (Abb. 38, 39).

Zu Beginn wurde ein Bereich gesucht, in dem sich die gesuchte Mutation befindet. Dazu wurden nur SNPs betrachtet. Da dieser Bereich gefunden wurde, wurde anschließend nach allen vorkommenden Mutationen gesucht. Da diese Suche weniger stringent ist und es zu einer höheren Rate an falsch positiv identifizierten Mutationen kommen kann, wurden alle so gefundenen Mutationen einzeln

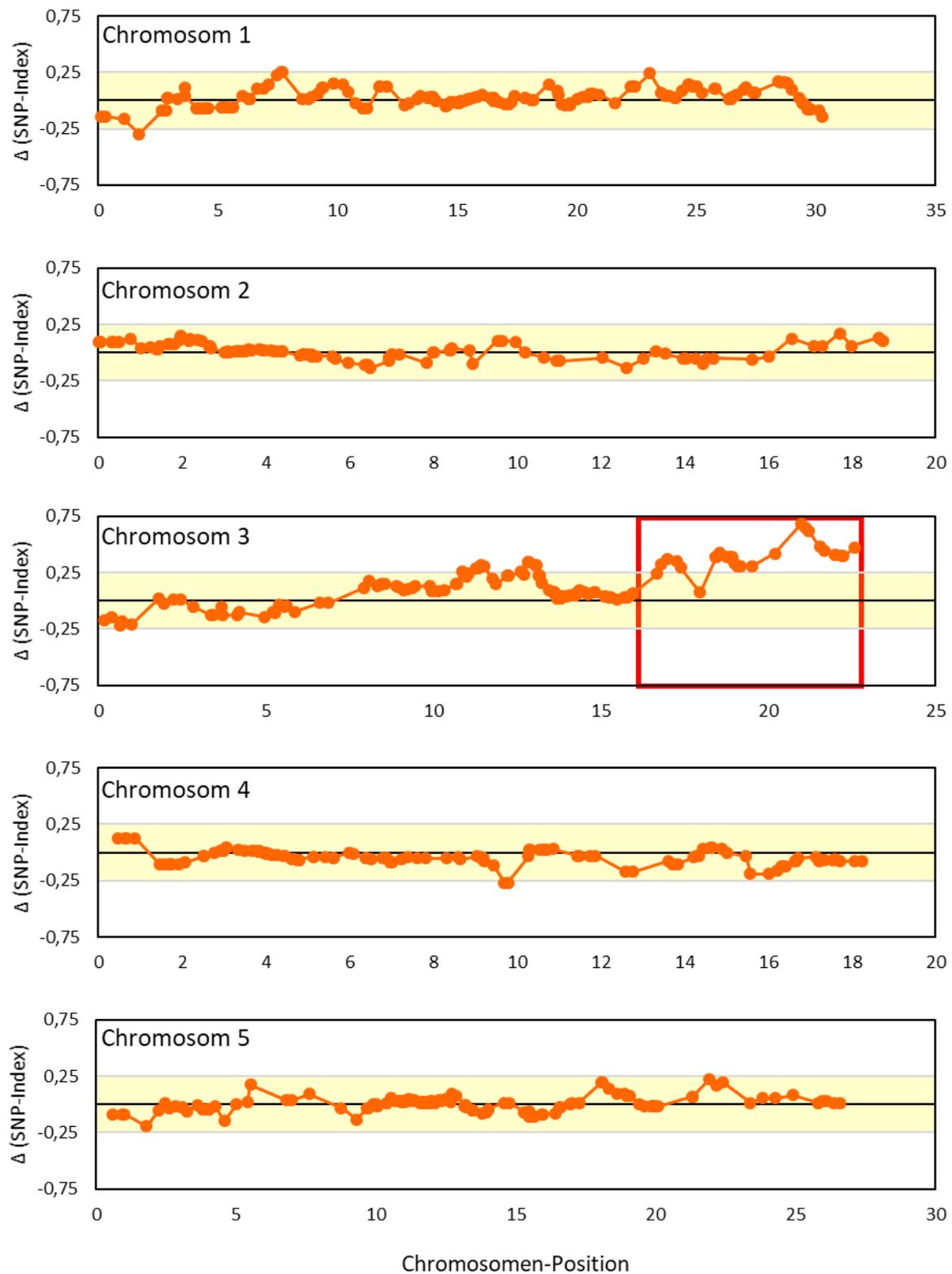


Abb. 38: Δ SNP-Index-Analyse: Gezeigt sind die Δ SNP-Indizes der 5 Chromosomen von *A. thaliana*. Für jedes Chromosom sind die Δ SNP-Index-Werte der beiden Pools mit langen und kurzen Wurzeln sortiert nach ihrer Lage auf dem Chromosom verrechnet worden. Die gelben Kästen zeigen den $\pm 0,25$ Bereich der Δ SNP-Index-Werte an.

überprüft. Dabei wurden alle Mutationen, deren Mutations-Indizes in beiden Pools über 0,8 lagen, ausgeschlossen, da es sich dabei um Mutationen aus dem *ozs1*-Hintergrund handelte. Zudem wurden Mutationen mit einem Mutations-Index von unter 0,1 von der weiteren Analyse ausgeschlossen, da diese erfahrungsgemäß fast ausschließlich auf Alignmentfehler oder eine fehlerhafte Sequenzierung zurückzuführen sind. Weitere Kriterien für die Filterung (siehe Material und Methoden 2.12.5) wie bei der ersten Analyse wurden hier nicht vorgenommen, da hier nun nach der tatsächlichen Mutation und nicht mehr nur nach einem Bereich gesucht wurde. Unter den so ermittelten Mutationen wurde nun nach solchen gesucht, welche zu einer Veränderung der Protein-Sequenz führten. Von diesen Mutationen wurde erneut der Δ SNP-Index-Werte ermittelt (Abb. 39C). Mutationen, welche einen Wert von über 0,4 aufwiesen, wurden als mögliche Kandidaten-Gene identifiziert.

Es konnten fünf Mutationen gefunden werden, welche alle Kriterien erfüllten (Abb. 39C; Tab. A3). Die erste Mutation wurde bei 18,47 Mbp gefunden und wies einen Δ SNP-Index von 0,56 auf. Die Mutation lag in einem uncharakterisierten Gen, *At3G49800*, mit *BSD-* (*BTF2-liketranscription factors, synapse-associated and DOS2-like protein*) Domäne. Es lag ein Basenaustausch von C zu T vor. Dies führte zu einem AS-Austausch (G146R). Da es sich hier um eine konservierte AS handelte (überprüft durch einen Vergleich von orthologen Genen), ist es wahrscheinlich, dass eine Mutation zu einer Funktionsveränderung des Proteins führt. Die zweite Mutation lag bei 20,21 Mbp und zeigte einen Δ SNP-Index von 0,42. Es lag eine Substitution von C zu T vor, was zu einem AS-Austausch (T93I) führte. Die Mutation lag in *At3G54590*. Dieses Gen kodiert für *Extensin2 (EXT2)*. Laut SIFT-Analyse ist dieser AS-Austausch jedoch tolerierbar und sollte somit nicht zu einer Veränderung der Funktion führen. Die nächste Mutation mit einem Δ SNP-Index von 0,63 konnte bei 21,12 Mbp gefunden werden. Auch hier lag eine Substitution von C zu T vor, was ebenfalls zu einem AS-Austausch (E532K) führte. Die Mutation lag in *At3G57060*. Laut SIFT-Analyse war auch dieser AS-Austausch tolerierbar. Danach konnte eine Mutation bei 21,21 Mbp in *At3g57330* gefunden werden. Mit einem Wert von 0,64 konnte hier der höchste Δ SNP-Index beobachtet werden. Hier kam es ebenfalls zu einem Nukleotid-Austausch von C zu T. Dies erzeugte jedoch ein Stop-Codon nach 105 AS von insgesamt 1025 AS, wodurch das Protein stark verkürzt wird. Durch diese Verkürzung ist ein Funktionsverlust sehr wahrscheinlich. *At3G57330* codiert für *Autoinhibited Ca²⁺-ATPase 11 (ACA11)*. Die letzte Mutation, welche für den beobachteten Phänotyp verantwortlich sein könnte, liegt bei 22,02 Mbp in *At3G59610* und hat einen Δ SNP-Index von 0,46. Das Gen codiert für ein Protein der F-Box-Proteinfamilie. Durch einen Nukleotidaustausch von C zu T entstand auch hier ein verfrühtes Stop-Codon nach 455 AS von 521 AS. Diese Mutation würde also ebenfalls zu einer Verkürzung führen, die jedoch nicht so massiv ist wie bei *ACA11*.

Die Mutation bei 18,78 Mbp zeigte mit 0,18 einen sehr kleinen Δ Mutations-Index-Wert. Dies liegt an dem mit 0,52 niedrigen LP SNP-Index-Wert. Durch die räumliche Nähe zu den anderen Mutationen mit LP SNP-Index-Werten zwischen 0,84 bis 0,94 sollte auch hier der Wert höher sein. Was genau die Ursache für diesen geringen Wert ist, kann momentan nicht erklärt werden. Ein Alignment-Fehler wurde jedoch ausgeschlossen.

Zum Schluss wurde überprüft, ob die gefundenen Mutationen in *suo1* nachgewiesen werden konnten und entsprechend in *ozs1* nicht zu finden waren. Dazu wurden die entsprechenden Abschnitte im Genom amplifiziert und sequenziert. Alle Mutationen konnten in *suo1* gefunden werden und waren in *ozs1* nicht vorhanden.

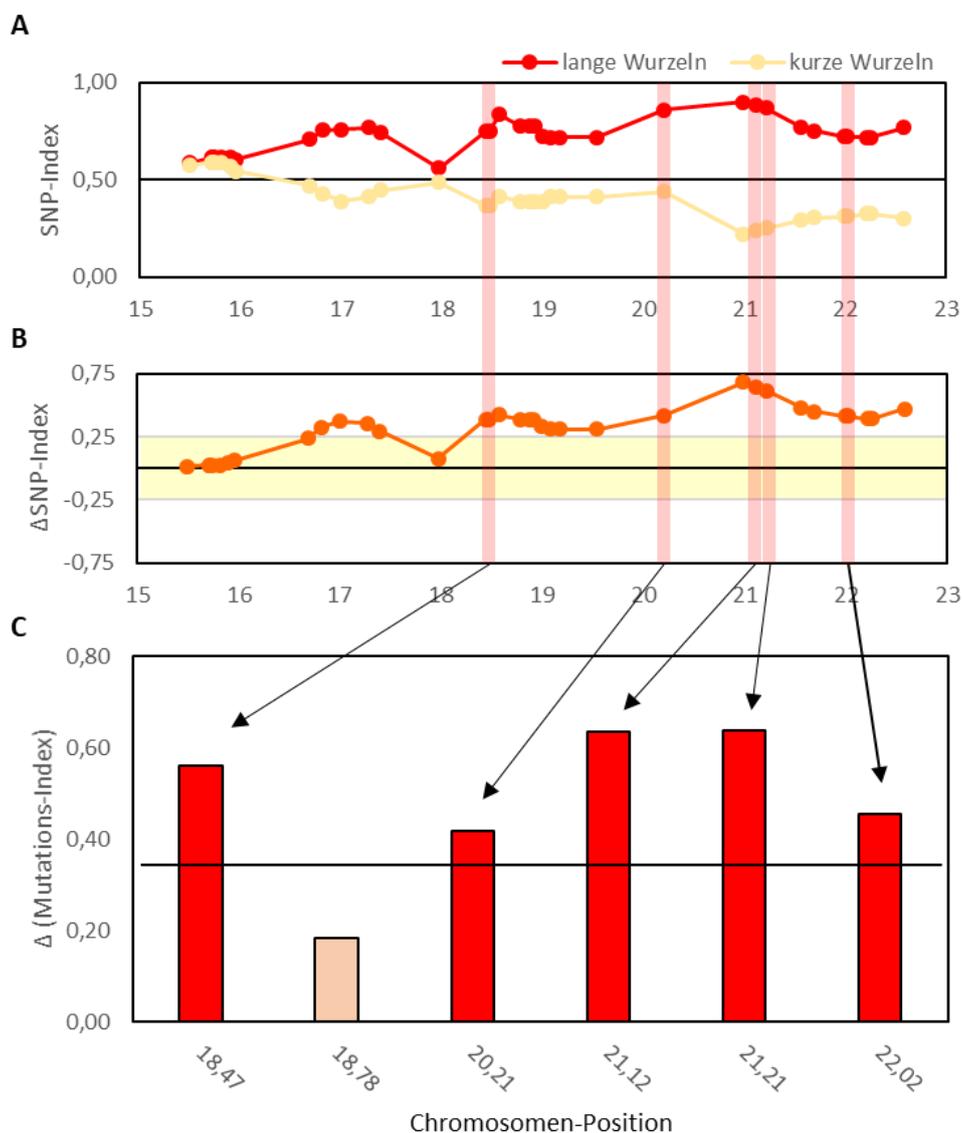


Abb. 39: QTL-Seq-Analyse Chromosom 3. Gezeigt ist der Bereich auf Chromosom 3, in dem die Mutation liegt, welche für die gesteigerte Zink-Toleranz verantwortlich ist. **(A)** SNP-Index-Werte. **(B)** Δ SNP-Index-Werte. **(C)** Δ Mutations-Index-Werte. Hier wurden nur Mutationen betrachtet, welche zu einer Veränderung in der Aminosäure-Sequenz führten. Die roten Balken zeigen die Mutationen an, deren Δ Mutations-Index-Werte über 0,4 lagen.

4. Diskussion

Wie schon zu Beginn erwähnt, konnten bereits einige Mechanismen der Zink-Homöostase aufgedeckt werden. Es gibt aber immer noch viele offene Fragen. Zum Beispiel konnte in Tieren bereits gezeigt werden, dass Zink als Signalmolekül dienen kann (Hannun et al. 2002). Daraus ergibt sich die Frage, ob Zink in Pflanzen diese Funktion ebenfalls übernehmen kann. Auch wie eine Veränderung im Zink-Status von Pflanzen wahrgenommen werden kann, ist bisher nur ansatzweise geklärt. Dabei ist die Wahrnehmung eines Zink-Mangels durch bZIP19 und ZIP23 (*Arabidopsis thaliana* basic-region leucine-zipper) bereits relativ gut verstanden (Assunção et al. 2010), während die Detektion eines Zink-Überschusses noch unklar ist. Die genaue Aufnahme von Zink ist ebenfalls noch nicht vollständig verstanden. Zwar konnte gezeigt werden, dass Zink durch Proteine der ZIP-Familie, wie IRT1, das vor allem Eisen transportiert, aufgenommen werden kann, aber eventuell gibt es noch andere Transporter, die speziell für die Zink-Aufnahme verantwortlich sind. Für ZIP4 konnte beispielsweise beobachtet werden, dass es unter Zink-Mangel induziert wird (Grotz et al. 1998). Dies könnte auf eine Beteiligung an der Zink-Aufnahme hindeuten. Ein Knockout von ZIP4 zeigt aber keinen Phänotyp, weshalb es nicht der einzige entscheidende Aufnahme-Transporter für Zink sein kann. Es stellt sich also auch die Frage nach weiteren Mechanismen der Zink-Aufnahme. Um diese Fragen klären zu können, ist es wichtig, die Zink-Homöostase besser zu verstehen. Dazu sollten in dieser Arbeit verschiedene *ozs-Mutanten* physiologisch charakterisiert und molekular analysiert werden. Wie wichtig das Verständnis für die Aufnahme, den Transport und die Speicherung von Zink bei Pflanzen ist, wird vor allem vor dem Hintergrund des sogenannten „Hidden Hunger“ deutlich. Damit ist eine unzureichende Versorgung mit Nährstoffen gemeint. Laut WHO leiden weltweit 2 Milliarden Menschen an einem Eisen- oder Zink-Mangel. Dabei sterben jährlich sieben Millionen Kinder an den direkten oder indirekten Folgen einer solchen Mangelernährung. Durch Biofortifikation könnte diesem Problem entgegengewirkt werden. Dadurch könnte die Eisen- und Zink-Konzentration in Lebensmitteln erhöht werden, wodurch die unzureichende Versorgung mit Nährstoffen verringert würde.

4.1 *ozs11*

Für die Aufdeckung der Zink-Homöostase wurden hier verschiedene Zink-hypersensitive Pflanzen untersucht (*ozs-Mutanten*). Eine dieser *ozs-Mutanten* (*ozs11/acd5-2*) trägt eine Mutation in *At5g51920* (Abb. 6A). Durch die Transformation von *acd5-2* mit dem wildtypischen *ACD5*-Gen unter der Kontrolle eines 35S Promotors oder des nativen Promotors konnte die Zink-Hypersensitivität aufgehoben werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Mutation in *ACD5* für die Zink-Hypersensitivität verantwortlich ist (Abb. 7D).

4.1.1 Unabhängigkeit der Kälte-Hypersensitivität von der Mutation in ACD5

Zusätzlich zur Hypersensitivität gegenüber Zink zeigte *acd5-2* auch eine gesteigerte Kälteempfindlichkeit. Diese konnte jedoch nicht durch *ACD5* komplementiert werden (Abb. 15A). Da *acd5-2* durch EMS-Mutagenese erzeugt wurde, liegen noch andere Mutationen vor, welche eventuell den Kältephänotyp verursachen. Um dies zu klären, wurden Rückkreuzungen von *acd5-2* mit Col-0 untersucht. Es konnten keine Zink-hypersensitiven Mutanten gefunden werden, die nicht auch kältesensitiv waren (Abb. 15B). Erklärt werden könnte dies dadurch, dass die Mutationen, welche für die beobachteten Phänotypen verantwortlich sind, sehr nahe beieinander liegen und deshalb immer gemeinsam vererbt werden. Die Tatsache, dass die Kältesensitivität von *acd5-2* nicht durch *ACD5* komplementiert werden kann, spricht dagegen, dass diese Mutation für den Kältephänotyp verantwortlich ist. Zudem zeigen die beiden anderen *acd5*-Allele *acd5-1* und *acd5-3* keine gesteigerte Kältesensitivität (Abb. 15A). Dass *acd5-1* keine Reduktion des Wurzelwachstums unter Kälteeinfluss zeigt, konnte auch schon früher beobachtet werden. Zwar wurde das Wurzelwachstum dabei bei 12°C untersucht, aber auch hier konnte keine erhöhte Kältesensitivität festgestellt werden (Dutilleul et al. 2015).

In der Arbeit von Dutilleul et al. wurde jedoch für *acd5-1* eine verminderte Keimfähigkeit unter Kälteeinfluss gezeigt. Dieses Experiment wurde mit Pflanzen, die unterschiedliche *acd5*-Allele tragen, nachgestellt. Erneut zeigt sich bei *acd5-2* eine Kältesensitivität. Die publizierten Ergebnisse der verschlechterten Keimfähigkeit von *acd5-1* konnten jedoch nicht reproduziert werden. Möglicherweise wurden bei Dutilleul et al. Samen unterschiedlichen Alters verwendet. Dies könnte die Ursache für den Unterschied in der Keimfähigkeit sein. Somit wäre die reduzierte Keimungsrate von *acd5-1* unter Kälte lediglich ein Artefakt. Betrachtet man die anderen *acd5*-Mutanten und Komplementationslinien, zeigt *acd5-3* ebenfalls keine Sensitivität gegenüber Kälte. Zusätzlich zeigten drei der vier Komplementationslinien dieselbe verminderte Keimungsrate wie *acd5-2*. Lediglich *acd5+gf ACD5#5-4* zeigt eine Rettung des Phänotyps (Abb. 15C). Diese Ergebnisse sprechen ebenfalls dafür, dass der Kältephänotyp höchstwahrscheinlich nicht durch die Mutation in *ACD5* ausgelöst wird. Zusätzlich wird dies dadurch gestützt, dass auch das *ACD5*-Expressionslevel keinen Einfluss auf den Kältephänotyp zeigt (Abb. 16). So besitzen die Komplementationslinien *acd5+35S::ACD5#6-2* und *acd5+gf ACD5#5-4* das gleiche *ACD5*-Transkriptlevel, wobei nur *acd5+35S::ACD5#6-2* die Kältesensitivität zeigt. Eventuell hat auch die Insertionsstelle einen Einfluss auf die Kältesensitivität der Komplementationslinien. Somit könnten unterschiedliche Keimungsraten bei gleicher Expression erklärt werden. Die beobachtete Kälte-Hypersensitivität von *acd5-2* könnte aber auch, wie bereits erwähnt, auf eine zusätzliche Mutation in der Nähe von *ACD5* zurückzuführen sein. Durch die

räumliche Nähe dieser Mutation zu *acd5-2* wären die beiden Mutationen immer zusammen vererbt worden.

Dutilleul et al. zeigte aber auch, dass *acd5-1* unter Abscisinsäure-(ABA)-Zugabe eine schlechtere Keimungsrate als Col-0 aufwies. Dies könnte darauf hindeuten, dass in *acd5-1* ABA-abhängige Prozesse gestört sind. Es konnte bereits beobachtet werden, dass Mutanten mit verringertem ABA-Gehalt eine gesteigerte Kältesensitivität zeigen (Gilmour et al. 1991). Eine verringerte ABA-Konzentration wäre demnach eine mögliche Erklärung für die erhöhte Kältesensitivität von *acd5-2*. Die Sensitivität von *acd5-1* gegenüber erhöhten ABA-Konzentrationen würde jedoch gegen diese Theorie sprechen. Sollte *acd5-1* einen verringerten ABA-Gehalt aufweisen, sollte eine zusätzliche ABA-Gabe die Keimung eher fördern. Andererseits zeigt *acd5-1* in dem hier durchgeführten Experiment auch keine Kältesensitivität. Ob die Mutation in *acd5-2* zu einem verändertem ABA-Gehalt führt und dies den Kältephänotyp auslöst, müsste also überprüft werden. Dazu könnte zunächst das Experiment von Dutilleul et al. der gesteigerten ABA-Zuführung mit den *acd5*-Mutanten durchgeführt werden. Eine Messung der ABA-Konzentrationen in den *acd5*-Mutanten mittels LC/MS (Forcat et al. 2008) könnte ebenfalls weitere wichtige Erkenntnisse liefern.

4.1.2 Teilweise Abhängigkeit der Zink-Hypersensitivität von der SA-Akkumulation

Bei der Betrachtung des Phänotyps der *acd5*-Allele, lassen sich weitere Unterschiede beobachten. Für *acd5-1* wurde bereits gezeigt, dass die Blätter nach fünf Wochen erste Läsionen zeigen, deren Bildung SA-abhängig ist (Greenberg et al. 2000). Die Bildung von Läsionen konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. 12). Die Läsionen bei *acd5-3* erscheinen jedoch eine Woche später als bei *acd5-1*. Bei *acd5-2* konnte die Bildung von Läsionen wiederum nicht beobachtet werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass es in *acd5-2*, im Gegensatz zu *acd5-1*, zu keiner Akkumulation von SA in adulten Pflanzen kommt. Eine Messung der SA-Gehalte war im Rahmen der Doktorarbeit aus zeitlichen Gründen jedoch leider nicht mehr möglich. Die erhöhte Akkumulation von SA in *acd5-1* konnte bisher nur in adulten Pflanzen gezeigt werden (Greenberg et al. 2000). Die beobachtete Zink-Hypersensitivität zeigt sich hier aber in Keimlingen. Ob es also auch in Keimlingen zu einer veränderten SA-Akkumulation in *acd5* kommt, ist nicht bekannt. Um zu überprüfen, ob es eine Verbindung zwischen einer Veränderung in der SA-Akkumulation und der Zink-Hypersensitivität gibt, wurden SA-Mutanten auf ihre Zink-Toleranz hin überprüft. Dabei zeigten die Mutanten *pbs3-1* und *pbs3-2* mit einer erhöhten Akkumulation von SA unter Zink-Stress eine leicht verbesserte Zink-Toleranz, verglichen mit Col-0. Interessant ist dabei auch, dass *WIN3* (Synonym für *PBS3*) als Indikator-Gen für Zink-Stress identifiziert wurde. Unter Zink-Stress wird *WIN3* exprimiert, wobei *WIN3*-Mutanten, hier *pbs3-1* und *pbs3-2*, eine geringfügig gesteigerte Zink-Toleranz aufweisen (Abb.10). Eventuell ist diese erhöhte Toleranz also auf eine veränderte *WIN3*-Expression

zurückzuführen. Dafürsprechen würde auch, dass *acd11*, welche ebenfalls eine gesteigerte SA-Konzentration aufweist, keine veränderte Zink-Toleranz zeigt. Wobei auch beachtet werden muss, dass es in *pbs3*-Mutanten lediglich zu einer leichten Erhöhung der freien SA-Konzentrationen kommt, wohingegen *acd11* eine um das 63-fache gesteigerte SA-Akkumulation aufweist. Mutanten mit einer verringerten SA-Konzentration zeigten ebenfalls keinen Unterschied in ihrer Zink-Toleranz zum WT (Abb. 11A). Dass erhöhte SA-Konzentrationen durchaus zur Toleranz gegenüber Schwermetallen beitragen können, konnte jedoch bereits beobachtet werden (Sharma et al. 2020). Es konnte gezeigt werden, dass die Cd-Toleranz in *Brassica juncea* durch SA-Zugabe und dadurch ausgelöste Senkung der ROS-Konzentrationen gesteigert werden konnte (Faraz et al. 2020). Eine NBT-Färbung von *acd5*-Keimlingen unter Zink-Stress (Abb. 9) zeigte hier keine Veränderung in der ROS-Akkumulation. Jedoch wurden bisher nur die Blätter untersucht. Um die ROS-Akkumulation in den Wurzeln zu bestimmen, müssen andere Techniken, wie die Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen, angewendet werden. Dihydrodichlorofluorescein-Diacetat (H₂DCF-DA) wäre ein solcher Farbstoff. Er ist membranpermeabel und führt vor allem mit H₂O₂ zu einem starken Fluoreszenzsignal.

Es konnte aber auch gezeigt werden, dass eine erhöhte SA-Akkumulation in *A.thaliana*-Keimlingen zu einer Reduktion des Wurzelwachstums führt (Tan et al. 2020). Eine Hypothese wäre nun, dass leicht erhöhte SA-Konzentrationen die Schwermetall-Toleranz steigern. Übersteigen die SA-Gehalte jedoch eine gewisse Schwelle, wirken sie sich negativ auf das Wachstum aus. Die erhöhte Toleranz von *pbs3-1* und *pbs3-2* könnte also durch die leicht erhöhten SA-Konzentrationen erklärt werden. In *acd11* zeigt sich nun trotz erhöhter SA-Akkumulation keine Veränderung im Wurzelwachstum. Die SA-Konzentration scheint also nicht zu hoch zu sein, um das Wurzelwachstum zu reduzieren, aber auch nicht passend, um die Zink-Toleranz zu steigern. Eine andere Erklärung wäre, dass die erhöhte Toleranz der *pbs3*-Mutanten, wie bereits erwähnt, auf einer veränderten *WIN3*-Expression beruht. Um zu überprüfen, ob es einen Zusammenhang zwischen der *WIN3*-Expression und der Zink-Toleranz gibt, sollten Mutanten mit einem veränderten *WIN3*-Transkriptlevel untersucht werden. Dies würde bedeuten, dass es bei den überprüften Mutanten keinen Zusammenhang zwischen dem SA-Gehalt und der Zink-Toleranz gibt.

Bezieht man die Ergebnisse des Wurzelwachstums-Assays der *acd5-1/acd5-2* x *nahG*-Doppelmutanten mit ein, ergibt sich Folgendes. Da die Doppelmutanten ein verbessertes Wurzelwachstum unter Zink-Stress im Vergleich zu den Einzelmutanten zeigen (Abb.11B), scheint die SA-Konzentrationen jedoch in *acd5*-Mutanten einen Einfluss auf die Zink-Hypersensitivität zu haben. Unter der Berücksichtigung der zuvor aufgestellten Hypothese, würde das bedeuten, dass es in *acd5-1* und *acd5-2* unter Zink-Stress zu einer stark erhöhten Akkumulation von SA käme, welche das Wurzelwachstum unterdrücken würde. Diese erhöhte SA-Akkumulation könnte durch die in *acd5-1*

erhöhte Cer-Konzentration ausgelöst werden. Dass *acd5-1* Cer akkumuliert, konnte bereits gezeigt werden (Bi et al. 2014). Zudem wird bereits eine Verbindung zwischen Ceramiden und einer erhöhten SA-Akkumulation vermutet (Sánchez-Rangel et al. 2015). Zusätzlich könnte auch der Zink-Stress zur Erhöhung der SA-Konzentration führen. Da bereits gezeigt wurde, dass eine SA-Zufuhr die Toleranz gegenüber Schwermetallen erhöhen kann, liegt die Vermutung nahe, dass Pflanzen unter Zink-Stress vielleicht selbst vermehrt SA produzieren. In *acd5-1/acd5-2* x *nahG*-Doppelmutanten würde die stark erhöhte SA-Konzentration durch die von *nahG* gebildete Hydroxylase abgebaut werden, wodurch die inhibierende Wirkung von SA auf das Wurzelwachstum aufgehoben würde. Da die Zink-Hypersensitivität jedoch nicht ganz aufgehoben werden konnte, scheint die SA-Akkumulation zwar an der Ausprägung des Phänotyps beteiligt, aber nicht zur Gänze dafür verantwortlich zu sein. Dafür spricht auch die Tatsache, dass *acd11*, welche ebenfalls stark erhöhte Cer-Konzentrationen aufweist, keine Zink-Hyperaktivität zeigt. Der Unterschied zwischen *acd5* und *acd11* besteht nun darin, dass in *acd11* sowohl die Cer- als auch die Cer1P-Konzentration erhöht ist (Simanshu et al. 2014), wohingegen in *acd5* bisher nur gezeigt werden konnte, dass die Cer-Konzentration erhöht ist. Da aber die CerK-Aktivität stark vermindert ist (Abb. 18C), ist es sehr wahrscheinlich, dass das Cer1P-Level ebenfalls stark reduziert ist. Die verringerte Cer1P-Konzentration wäre eine mögliche Erklärung für die Zink-Hypersensitivität von *acd5*. Um all dies zu überprüfen, müssten die SA-Konzentrationen in *acd5-1*, *acd5-2* und den Doppelmutanten mit *nahG* sowie von *acd11* unter Kontroll-Bedingungen und unter Zink-Stress gemessen werden. Ebenfalls sollten die Cer- und Cer1P-Konzentrationen in solchen Keimlingen vermessen werden. Aus zeitlichen Gründen waren diese Analysen im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr möglich.

4.1.3 Lage der Mutation als Ursache der Bildung von Läsionen in *acd5-1*

Auch wenn die Zink-Hypersensitivität nur teilweise von der SA-Akkumulation abhängig zu sein scheint, konnte bereits gezeigt werden, dass die Bildung von Läsionen in adulten *acd5-1*-Pflanzen allein darauf zurückzuführen ist (Greenberg et al. 2000). Da sich in adulten *acd5-2*-Mutanten keine Läsionen beobachten lassen, liegt die Vermutung nahe, dass sich *acd5-1* und *acd5-2* im adulten Stadium in ihrem SA-Gehalt unterscheiden. Dadurch stellt sich aber die Frage, wie durch die Mutation des gleichen Genes die Unterschiede in der SA-Akkumulation entstehen können. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die CerK in den Mutanten unterschiedlich stark exprimiert wird. Das Transkriptlevel von *ACD5* ist jedoch in *acd5-1* und *acd5-2* sowie in Col-0 gleich sowohl unter Kontroll-Bedingungen als auch unter Zink-Stress (Abb. 10). In adulten Pflanzen von *acd5-1* konnte in Blättern mit Läsionen zudem ein erhöhtes *PR1*-Level nachgewiesen werden, wohingegen in Blättern vor der Bildung von Läsionen das gleiche *PR1*-Transkriptlevel wie im WT gefunden werden konnte (Greenberg et al. 2000). Deshalb wurde das Transkriptlevel von *PR1* untersucht. Die Ergebnisse von

Greenberg deckten sich dabei mit den hier gemessenen Transkriptleveln. Die getesteten Keimlinge zeigten keinen Unterschied in der Transkriptmenge zwischen Col-0 und den *acd5-Mutanten*, weder unter Kontroll-Bedingungen noch unter Zink-Stress (Abb. 10). Da gezeigt werden konnte, dass SA zur Expression von *PR1* führt (Genoud et al. 2002), ist dies ein weiterer Hinweis darauf, dass sich die SA-Konzentrationen in Keimlingen der *acd5-Mutanten* nicht voneinander unterscheiden. Die erhöhte *PR1-Expression* in adulten *acd5-1*-Pflanzen passt wiederum zu der Akkumulation von SA und der Bildung von Läsionen. Die Expression von *WIN3* wurde ebenfalls untersucht. Dieses Gen ist an der Regulation der SA-Akkumulation beteiligt (Wang et al. 2011). Auch hier konnten keine Unterschiede zwischen Col-0 und den *acd5-Mutanten* gefunden werden (Abb. 10), was die vorangegangene Hypothese bekräftigt, dass es in *acd5-1*- und *acd5-2*-Keimlingen keinen Unterschied in der SA-Akkumulation gibt. Von Interesse wäre nun die Expression von *ACD5* in adulten *acd5-1*- und *acd5-2*-Mutanten, um zu klären, ob es im adulten Stadium einen Unterschied gibt. Zudem könnte eine Messung des *PR1*-Transkriptlevels, da dieses SA abhängig zu sein scheint, erste Erkenntnisse über die SA-Konzentration in adulten *acd5-2* Pflanzen liefern. Letztlich müsste die SA-Konzentration der adulten Mutanten gemessen werden, um herauszufinden, ob es einen Unterschied zwischen *acd5-1* und *acd5-2* gibt, der den Unterschied in der Bildung von Läsionen erklären könnte.

Sollte es einen Unterschied in der SA-Akkumulation geben, stellt sich die Frage, durch was dieser ausgelöst wird. Auch ein Unterschied in der ACD5-Proteinmenge oder die Verteilung könnte einen Einfluss darauf haben. Mittels transienter Expression in *N. benthamiana* konnte gezeigt werden, dass es keinen Unterschied in der Lokalisation und Menge der in Col-0 und den *acd5*-Mutanten gebildeten Proteine gibt (Abb. 17). Dabei konnte die von Bi et al. gezeigte Lokalisation im ER und im Golgi-Apparat bestätigt werden. Die gezeigte Lokalisation in den Mitochondrien (Bi et al. 2014) konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die Unterschiede im Phänotyp von *acd5-1* und *acd5-2* können also ebenfalls nicht durch eine Veränderung in der Lokalisation oder im Proteingehalt erklärt werden.

Auch wenn die Lokalisation und die Proteinmenge zwischen den *acd5*-Mutanten gleich ist, kann sich dennoch die Aktivität der beiden mutierten Proteine voneinander und zum WT unterscheiden. Für *acd5-1* konnte bereits beobachtet werden, dass es eine 10fach verringerte Kinase-Aktivität besitzt (Bi et al. 2014). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *acd5-1* eine zu Col-0 verringerte Aktivität besitzt. Dasselbe konnte auch für *acd5-2* nachgewiesen werden (Abb.18). Aber auch wenn die Aktivität der *acd5*-Mutanten im Vergleich zu Col-0 verringert war, konnte erneut kein Unterschied zwischen den Mutanten beobachtet werden, der die unterschiedliche Bildung von Läsionen erklären könnte.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die wahrscheinlichste Erklärung für den Unterschied in der Bildung von Läsionen in einer unterschiedlich starken Akkumulation von SA in adulten *acd5-1* und

acd5-2 liegt. Was diesen Unterschied auslöst, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht gesagt werden. Die Ergebnisse der Transkriptanalyse von *PR1* und *WIN3* legen nahe, dass es in Keimlingen noch zu keinem Unterschied in der SA-Akkumulation kommt. Zusätzlich wird vermutet, dass die SA-Konzentration zwar an der Zink-Hypersensitivität der *acd5-Mutanten* beteiligt ist, auf Grund des Wurzelwachstums der Doppelmutanten mit *nahG* jedoch nicht gänzlich dafür verantwortlich ist.

Es bleibt also die Frage, wie es in adulten Pflanzen zu einem Unterschied in der Akkumulation von SA kommen kann. Wie zuvor erwähnt, könnte die Expression von *ACD5* in adulten Pflanzen verändert sein. Dies könnte mittels quantitativer realtime-PCR ermittelt werden. Sollte sich dabei zeigen, dass *ACD5* in *acd5-2* stärker exprimiert ist als in *acd5-1*, könnte in *acd5-2* bei gleicher enzymatischer Umsatzrate im Vergleich zu *acd5-1* dennoch mehr Cer phosphoryliert werden. Dadurch käme es in *acd5-2* zu einer geringeren Akkumulation von Ceramiden. Da vermutet wird, dass eine Akkumulation von Ceramiden zur Erhöhung der SA-Konzentration führt (Sánchez-Rangel et al. 2015), würde also ebenfalls die SA-Akkumulation verringert. Um dies zu überprüfen, müsste zusätzlich zur SA-Konzentration und dem *ACD5-Transkriptlevel* noch die Ceramid-Konzentration gemessen werden.

Eine weitere mögliche Erklärung könnte die Lage der Mutationen von *acd5-1* und *acd5-2* liefern. Die Mutation von *acd5-2* befindet sich in der DAGKc- (Diacylglycerol kinase catalytic) -Domäne (PROSITE-ProRule). Es ist also direkt die Kinase-Domäne betroffen. Dadurch wird höchstwahrscheinlich die Kinase-Funktion ausgeschaltet. Dass eine Mutation in dieser Domäne die Kinase-Aktivität stark verringern bis ausschalten kann, konnte bereits gezeigt werden (Abe et al. 2003). In *acd5-1* liegt die Mutation nun außerhalb dieser Domäne, dennoch zeigen beide Mutanten den gleichen Aktivitätsverlust. Was man bisher weiß, ist, dass die Ceramid-Kinase-Aktivität Calcium-abhängig ist (Liang et al. 2003). Die Aktivierung durch Calcium könnte nun durch das direkte Binden von Ca^{2+} an die CerK zustande kommen. Damit würde Ca^{2+} als Co-Faktor dienen. Ca^{2+} könnte aber auch an Calmodulin binden und dieses könnte dann die Ceramid-Kinase aktivieren. Bei der humanen Ceramid-Kinase (CERK) konnte bereits ein Calcium/Calmodulin-binde-Motiv gefunden werden (Sugiura et al. 2002). Auch die Interaktion der CERK mit Calmodulin und die daraus resultierende Wirkung als Calcium-Sensor für die CERK konnte gezeigt werden (Mitsutake et al. 2005). Dies legt die Vermutung nahe, dass auch die pflanzliche CerK durch Calcium-abhängiges Calmodulin aktiviert werden könnte. Die Mutation von *acd5-1* könnte sich also in der Calmodulin-Bindestelle befinden. Die Bindestelle der humanen CERK ist zwar bekannt, da die CERK-Proteinsequenz aber nur zu 31% mit der pflanzlichen CerK übereinstimmt (Liang et al. 2003), konnte ein direkter Vergleich der beiden das Vorkommen oder die Lage einer solchen Bindestelle in der pflanzlichen CerK nicht zeigen. Eine andere Möglichkeit wäre eine Veränderung der Proteinstruktur durch die Mutation (G412R). Dadurch würde eine eventuelle Bindestelle entweder für Calcium oder Calcium-aktiviertes

Calmodulin blockiert werden. Somit würde die Aktivierung der CerK verhindert werden. Da es sich bei Glycin um die kleinste und bei Arginin um die größte Aminosäure handelt, führt ein solcher Austausch mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer Veränderung der Proteinstruktur. Somit würden beide Mutationen zu einer verringerten CerK-Aktivität führen. Der Unterschied besteht nun darin, dass bei *acd5-1* die Bindestelle für Ca^{2+} entweder direkt oder über Calmodulin an die CerK mutiert ist, wodurch die Aktivität vermindert wird und bei *acd5-2* die Kinase-Domäne direkt betroffen ist.

4.1.4 Zink-Stress-Kern-Antwort

Um herauszufinden, wodurch die Zink-Hypersensitivität in den *acd5*-Mutanten ausgelöst wird, wurde zudem das Transkriptom von Col-0 und *acd5-2* unter Kontrolle und Zink-Stress verglichen. Betrachtet man zunächst die Zink-Stress-Antwort von Col-0, kann man sehen, dass es vermehrt zur Induktion von Genen, welche an der „zellulären Eisen-Ionen-Homöostase“, an „der Antwort auf Wasserstoffperoxid“, am „Transport von Übergangsmetallen“, an der „zellulären Antwort auf Hypoxie“, an der „Antwort auf Stress“ und an der „Antwort auf Metallionen“ kommt (Abb. 21A).

Anschließend wurde eine aus 14 Genen bestehende Zink-Stress-Kern-Antwort identifiziert (Abb. 21A, B). Auffällig dabei war, dass elf dieser 14 Gene ebenfalls Teil der Eisen-Defizienz-Antwort sind. Lediglich drei Gene reagieren nicht auf einen Eisen-Mangel. Darunter ein hypothetisches Gen (*AT3G61930*), über das noch nichts bekannt ist, eine *Glutathion S-Transferase (GST)* der Klasse Lambda (*GSTL1*) und ein *respiratory burst oxidase homologue (RBOHD)*. GST katalysieren die Bindung von freien Schwermetallen an den Chelator GSH (Marrs 1996). Es konnte bereits gezeigt werden, dass GST nach einer Behandlung mit Kupfer oder Cadmium aktiviert wird (Skórzyńska-Polit et al. 2010; Semane et al. 2010). Pflanzen, die GST-Gene überexprimieren, zeigen zudem eine gesteigerte Toleranz gegenüber Schwermetallen, wie Kupfer, Aluminium, Arsen oder Cadmium (Nianiou-Obeidat et al. 2017). Das GST-Gen *GSTL1* ist hier sowohl in Col-0 als auch in *acd5-2* unter Zink-Stress induziert. Dies könnte darauf hindeuten, dass GST ebenfalls an der Detoxifizierung von Zink beteiligt ist. *RBOHs* oder auch NADPH-Oxidasen katalysieren die Bildung von Sauerstoffradikalen. ROS, die durch *RBOH* gebildet werden, können anschließend als Signalmoleküle dienen, indem sie redox-kontrollierte Ca-Kanäle aktivieren (Foreman et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass *RBOHD* wichtig für die Pathogenabwehr ist (Kimura et al. 2020). Zudem konnte in *Arabidopsis thaliana* und *Citrullus colocynthis* bereits beobachtet werden, dass Cadmium-Stress zur Induktion von *RBOH*-Genen führt (Khafi et al. 2020; Remans et al. 2010). Möglicherweise könnte also eine durch *RBOH* vermittelten ROS-Bildung der Signalweiterleitung unter Zink-Stress dienen. Um die Beteiligung von *GSTL1* und *RBOHD* an der Zink-Homöostase zu überprüfen, könnten Überexpressions- oder Knockout-Mutanten auf ihre Zink-Toleranz hin untersucht werden.

4.1.5 Zink-Stress führt zur Eisen-Defizienz

Bereits zuvor konnte gezeigt werden, dass fast alle Gene der Zink-Stress-Kern-Antwort ebenfalls durch Eisen-Defizienz beeinflusst werden. Dies macht deutlich, dass durch Zink-Stress ein physiologischer Eisenmangel ausgelöst wird. Dies wurde schon lange vermutet, konnte aber in dieser Klarheit bisher experimentell nicht bewiesen werden. Vergleicht man die Zink-Stress-Antwort von Col-0 mit Eisen-Defizienz-Genen, kann man sehen, dass zwei Drittel der Eisen-Defizienz-Gene differentiell exprimiert sind (Abb. 20A). Vergleicht man die Expression dieser Gene in Col-0 mit der Expression in *acd5-2*, fällt auf, dass es drei Gene gibt, welche sich in ihrer Expression stark voneinander unterscheiden. Dabei handelt es sich um *S8H* (*Scopoletin 8-hydroxylase*), *bHLH100* (*Helix-loop-helix100*) und *F6'H1* (*Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase1*). Dabei sind *S8H* und *F6'H1* in *acd5-2* geringer exprimiert als in Col-0, wohingegen *bHLH100* in *acd5-2* stärker induziert ist (Abb. 20B). Diese drei Gene sind Bestandteil der Cumarin-Biosynthese. Cumarine dienen der Eisenaufnahme aus dem Boden (Clemens et al. 2016; Siwinska et al. 2018). Unter Eisen-Defizienz wird die Expression von *FIT* (*Fer-like iron deficiency-induced transcription factor*) induziert und es interagiert mit *bHLH38/39/100/101* (Gao et al. 2020). Dieser Komplex wiederum induziert die Expression von *F6'H1* (Jeong et al. 2017). Dieses kann Feruloyl CoA in Scopoletin umwandeln, welches weiter durch *S8H* zu Fraxetin prozessiert wird (Siwinska et al. 2018). Cumarine, die durch *F6'H1* gebildet werden, sind vor allem für die Aufnahme von Eisen unter alkalischen Bedingungen wichtig (Schmid et al. 2014). Vergleicht man die Expression dieser Gene zwischen Col-0 und *acd5-2* unter Zink-Stress, zeigt sich, dass bei den bHLH-Transkriptionsfaktoren lediglich *bHLH100* eine erhöhte Expression in *acd5-2* zeigt (Abb. 20D). *FIT* ist in *acd5-2* geringer exprimiert. Es zeigt sich also, dass die Cumarin-Biosynthese in *acd5-2* gestört ist. Eine mögliche Folge wären verringerte Scopoletin- und Fraxetin-Konzentrationen. Bei *f6'h1*-Mutanten konnte eine solche verringerte Cumarin-Akkumulation bereits beobachtet werden (Gao et al. 2020). Dies könnte darauf hindeuten, dass *acd5-2* sensitiver gegenüber einem Eisen-Mangels wäre. Um dies zu prüfen, sollte zunächst die Bildung von Cumarinen überprüft werden. Dazu müssten Keimlinge unter Zink-Stress und Eisen-Mangel angezogen und das Medium unter UV-Licht auf die Sekretion von Cumarinen hin überprüft werden. Auch wenn gezeigt werden konnte, dass Zink-Stress einen physiologischen Eisenmangel auslöst, scheint die veränderte Cumarin-Biosynthese jedoch nicht die Ursache für das verkürzte Wurzelwachstum unter Zink-Stress zu sein, da vorangegangene Experimente darauf hindeuten, dass eine physiologische Eisen-Defizienz nicht die Hauptursache für die Zink-Hypersensitivität von *acd5-2* ist (Abb. 13, 14).

4.1.6 GO-Term-Analyse der in *acd5-2* unter Zink-Stress induzierten Gene

Um herauszufinden, was zu der Zink-Hypersensitivität in *acd5-2* führt, wurde als nächstes eine GO-Term-Analyse mit den nur in *acd5-2* unter Zink-Stress induzierten Genen durchgeführt. Dabei zeigte

sich eine vermehrte Induktion von Genen der „zellulären Antwort auf Hypoxie“ und der „Antwort auf Chitin“ (Abb. 20C). Eine Häufung von induzierten Genen der „zellulären Antwort auf Hypoxie“ lässt sich aber auch für Gene beobachten, die sowohl in Col-0 als auch in *acd5-2* induziert sind (Abb. 20C). Dabei sind in Col-0 23 und in *acd5-2* 44 Gene, dieses GO-Terms induziert. Da es in *acd5-2* insgesamt zu einer stärkeren Antwort auf Zink-Stress kommt, das heißt, dass mehr Gene differentiell exprimiert werden, ist die Häufung der Gene in Col-0 und *acd5-2* ungefähr gleich stark. Auch kann man erkennen, dass sich unter den Zink-induzierten Hypoxie-responsiven Genen viele Hypoxie-Kern-Gene (etwa 36%) (identifiziert nach Mustroph et al. 2009) finden lassen (Abb 23A). Zink-Stress scheint also in *A. thaliana* allgemein eine Hypoxie-Stress-Antwort auszulösen.

Nun stellt sich die Frage, wieso Zink-Stress eine Hypoxie-Antwort auslösen sollte. Eine mögliche Antwort liefert die Arbeit von Carbonare et al. 2019. Hier wurde ebenfalls gezeigt, dass Zink-Stress, dieses Mal in *Populus spp.*, zur Induktion von Hypoxie-responsiven Genen führt. Bei einem Vergleich von Zink-toleranten und Zink-sensitiven Pappelspezies konnte bei der Betrachtung Hypoxie-responsiver Gene wie *ADH*, *PCO* oder *HRA1* kein Unterschied in der Expressionsstärke unter Zink-Stress festgestellt werden. Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Aktivierung von Hypoxie-Genen eine generelle Antwort auf Zink-Stress darstellt und keine Adaption an erhöhte Zink-Konzentrationen ist (Carbonare et al. 2019). Das gleiche kann auch in *A. thaliana* bei einem Vergleich von Col-0 und *acd5-2* festgestellt werden. Auch hier gibt es keinen Unterschied in der Expression dieser Gene unter Zink-Stress. Die Ergebnisse stützen also die Hypothese von Carbonare et al. 2019. Vergleicht man die Hypoxie-responsiven Gene der Pappel, die durch Zink induziert werden, mit denen von *A. thaliana*, können vier Gene gefunden werden, die in beiden Pflanzen induziert sind. *ADH1*, *LBD41*, *HRA1* und *PCO1* gehören dabei alle zu den Hypoxie-Kern-Genen (Abb. 23B, C). Die Tatsache, dass sowohl in der Pappel als auch in *A. thaliana* Hypoxie-responsive Gene unter Zink-Stress induziert werden, dabei sogar teilweise dieselben Gene, bekräftigt ebenfalls die Hypothese, dass die Aktivierung von Hypoxie-Genen eine generelle Antwort auf Zink-Stress ist.

Wie kann Zink-Stress nun eine Hypoxie-Antwort auslösen? Um eine Hypoxie-Antwort auszulösen, muss normalerweise ein Sauerstoffmangel wahrgenommen werden. Dies geschieht über den N-degron-Pfad. Dabei wird die Stabilität von Transkriptionsfaktoren der Hypoxie-Antwort durch deren N-Terminus bestimmt. Hypoxie-responsive Gene werden vor allem durch *RAP2.2*, *RAP2.3*, *RAP2.12* und *HRE1* sowie *HRE2* induziert (Gibbs et al. 2011; Licausi et al. 2011b). Diese Transkriptionsfaktoren gehören zu der Gruppe der Group VII Ethylene Response Factors (Group VII ERFs). Diese ERFs besitzen an ihrem N-Terminus ein Methionin, gefolgt von einem Cystein. Durch Methionin-Aminopeptidasen (MAP) wird das Methionin abgeschnitten, wodurch das Cystein frei vorliegt. Durch PCOs kann dieses Cystein unter der Beteiligung von Sauerstoff oxidiert werden. Über Arginyl-t-RNA-

Transferase (ATE) wird ein Argininrest an das oxidierte Cystein gebunden. Anschließend wird das Protein über Proteolysis 6 (PRT6) ubiquitiniert und somit für den proteasomalen Abbau markiert. Durch das 26S-Proteasom werden die ERFs dann degradiert (Weits et al. 2014). Unter hypoxischen Bedingungen fehlt Sauerstoff als Substrat der PCO, damit kann dieses das Cystein der ERFs nicht mehr oxidieren. Dadurch werden die ERFs nicht länger abgebaut, sondern stabilisiert und können so eine Hypoxie-Antwort durch die Expression Hypoxie-responsiver Gene auslösen. Um arbeiten zu können, benötigt PCO zusätzlich zu Sauerstoff aber auch noch Fe^{2+} . Wie unter 1.2.1 bereits erwähnt, kann ein Zink-Überschuss zu einem physiologischen Eisen-Mangel führen, indem es Fe^{2+} verdrängt. Es konnte gezeigt werden, dass Zink in der Pappel die Aktivität von PCO hemmt. Dabei könnte Zn^{2+} Fe^{2+} eventuell aus PCO verdrängen oder bei der Synthese von PCO wird Zn^{2+} auf Grund der übermäßigen Präsenz fälschlicherweise anstelle von Fe^{2+} eingebaut. Dadurch würde PCO inaktiviert und die ERFs stabilisiert werden. Die Induktion Hypoxie-responsiver Gene wäre also durch einen physiologischen Eisen-Mangel bedingt und nicht direkt durch erhöhte Zink-Konzentrationen (Carbonare et al. 2019). Dass es unter Zink-Stress zu einer Eisen-Defizienz kommt, konnte zuvor (4.1.5) bereits gezeigt werden. Somit scheint die Induktion von Hypoxie-responsiven Genen lediglich einen Nebeneffekt darzustellen. Gestützt wird dies durch die Analyse einer *rap2.2* (nur Knockdown) x *rap2.3* x *rap2.12* x *hre1* x *hre2* Quinrupelmutante. Diese zeigt auf Keimlingsniveau keine Veränderung in der Zink-Toleranz (persönliche Kommunikation Dr. Michael Weber).

Die Häufung von induzierten Genen im GO-Term „Antwort auf Chitin“ konnte nur in *acd5-2* unter Zink-Stress gefunden werden (Abb. 20C). Insgesamt zehn Gene fielen in diese Kategorie. Darüber hinaus waren auch zwei dieser Gene unter den zehn am stärksten in *acd5-2* unter Zink-Stress induzierten Genen zu finden. Einmal *AT1G49900*, welches unter den Chitin-responsiven Genen am stärksten induziert ist. Dabei handelt es sich um ein Protein der Familie der C2H2-Zink-Finger-Proteine über das noch nichts weiter bekannt ist. Das zweite Gen ist *ZAT7*. *ZAT7* besitzt eine ERF-associated amphiphilic repressio (EAR) Domäne. Von ZAT-Proteinen mit dieser Domäne wird vermutet, dass sie eine wichtige Rolle bei der Antwort auf abiotischen Stress spielen (Kazan 2006; Ohta et al. 2001). Zu dieser Gruppe zählt zum Beispiel auch *ZAT12*. Ursprünglich wurde es als Bestandteil der Licht-Stress-Antwort gefunden (Iida et al. 2000). Es ist aber auch an der Antwort auf Kälte- und Hitze-Stress sowie auf osmotischen und oxidativen Stress beteiligt (Davletova et al. 2005). Ein weiteres Protein dieser Gruppe ist *ZAT10*. Es ist an der Salz-, Trocken- und Kälte-Stress-Antwort beteiligt. Dabei inhibiert es die Transkription von Reportern und Genen der Abwehr (Sakamoto et al. 2004). Auch ist bereits ein ZAT-Gen bekannt, das an der Schwermetall-Homöostase beteiligt ist. *ZAT11* inhibiert die Transkription eines vakuolären Ni^{2+} -Transporters. Überexpressionslinien von *ZAT11* führen somit zu einer reduzierten Ni^{2+} -Toleranz (Liu et al. 2014). ZATs sind also wichtige Bestandteile der Antwort auf abiotischen Stress, darunter auch auf Schwermetall-Stress. Eine

veränderte Expression von ZAT-Genen in *acd5-2* könnte also eine mögliche Ursache für die Zink-Hypersensitivität in *acd5-2* sein.

4.1.7 Unveränderte SA- und Pathogen-Antwort in *acd5-2*

Zuvor wurde die Hypothese aufgestellt, dass es in adulten *acd5-1*- und *acd5-2*-Pflanzen zu einem Unterschied in der Akkumulation von SA kommt, welcher in Keimlingen eventuell noch nicht vorliegt. Um weiter zu überprüfen, ob SA an der Ausprägung des Zink-hypersensitiven Phänotyps beteiligt ist, wurden die nur in *acd5-2* unter Zink-Stress differentiell exprimierten Gene mit SA-responsiven Genen verglichen. Dabei zeigte sich lediglich eine Überschneidung bei vier Genen der insgesamt 275 SA-responsiven Gene (Abb. 25A). Dies deutet erneut darauf hin, dass Veränderungen im SA-Gehalt nur partiell für die Zink-Hypersensitivität verantwortlich sind, wie auch schon die teilweise verbesserte Zink-Toleranz von *nahG* x *acd5*-Doppelmutanten.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass *acd5-1* anfälliger für Pathogene, wie *Pseudomonas syringae*, ist. Diese erhöhte Anfälligkeit ist dabei in drei Wochen alten Pflanzen in Blättern vor der Bildung von Läsionen beobachtet worden (Greenberg et al. 2000). Um zu überprüfen, ob Pathogen-responsive Gene an der Ausbildung der Zink-Hypersensitivität beteiligt sind, wurden die Gene, welche nur in *acd5-2* unter Zink-Stress differentiell exprimiert sind, mit Genen verglichen, die unter *Pseudomonas-syringae*-Befall differentiell exprimiert waren. Es gab eine Überschneidung von lediglich 15 Genen bei 614 pathogen-responsiven Genen (Abb. 25B). Somit ist eine Beteiligung pathogen-responsiver Gene an der Zink-Hypersensitivität in *acd5-2* ebenfalls sehr unwahrscheinlich.

4.1.8 ZAT7 und DRRP als Verbindung zwischen Ceramid-Stoffwechsel und Zink-Homöostase

Um Gene zu finden, welche an der Ausbildung der Zink-Hypersensitivität beteiligt sind, wurden die zehn am stärksten induzierten und reduzierten Gene, die nur in *acd5-2* unter Zink-Stress differentiell exprimiert sind, näher betrachtet. Unter den induzierten Genen befinden sich vier Gene (*AT5G54560*, *AT2G14247*, *AT1G49900*, *AT2G03230*), über die noch nichts Näheres bekannt ist. Über ein weiteres Gen (*AT2G02310*) weiß man lediglich, dass es unter Eisen-Mangel induziert ist (Colangelo et al. 2004). Drei Gene können mit der Salz-Toleranz in Verbindung gebracht werden. Für *AT2G03130* konnte gezeigt werden, dass es in der Salz-hypersensitiven Mutante *sahy9* (*salt hypersensitive mutant 9*) unter Salz-Stress das am stärksten induzierte Gen war (Huang et al. 2018). Eine mögliche Schlussfolgerung könnte sein, dass eine Überexpression von *AT2G03130* unter abiotischem Stress zu einer verminderten Stress-Toleranz führen würde. Auch in *acd5-2* konnte unter Zink-Stress eine Induktion von *AT2G03130* gemessen werden und auch hier liegt eine verminderte Stress-Toleranz vor. *AT2G03130* könnte also sowohl für die Salz- als auch für die Zink-Toleranz von Bedeutung sein. Um dies zu überprüfen, müssten Überexpressions-Mutanten von *AT2G03130* auf ihre Zink-Toleranz

hin überprüft werden. Das zweite Gen, das in Verbindung mit der Salz-Toleranz steht, ist *PLATZ2* (*Plant AT-rich sequence and zinc-binding protein2*). Eine Überexpression dieses Gens führt ebenfalls zu einer Salz-Hypersensitivität (Liu et al. 2020). Es konnte aber auch gezeigt werden, dass *PLATZ2* direkt die Expression von *CBL4* und *CBL10* hemmt (Liu et al. 2020). Diese beiden Gene sind in *acd5-2* unter Zink-Stress jedoch nicht reprimiert. Da die Reduktion dieser Gene für die verminderte Toleranz gegenüber abiotischem Stress in *PLATZ2*-Überexpressionslinien verantwortlich ist, ist es nicht besonders wahrscheinlich, dass die erhöhte Induktion ohne gleichzeitige Expression von *CBL4* und *CBL10* in *acd5-2* zur Zink-Hypersensitivität führt. Das dritte Gen ist *ANR1* (*Arabidopsis nitrate regulated1*). Auch hier führt eine Überexpression zu einer verminderten Salz-Toleranz. Dabei ist *ANR1* responsiv gegenüber ABA und abiotischem Stress und induziert die Expression von *ABI3*, wodurch die Keimung unterdrückt wird (Lin et al. 2019). In *acd5-2* kommt es unter Zink-Stress zwar zur Induktion von *ANR1*, jedoch nicht von *ABI3*. Da dies aber wichtig ist für die Steigerung der Stress-Toleranz, scheint sich auch die Zink-Hypersensitivität dadurch nicht erklären zu lassen.

Die letzten beiden Gene konnten bereits mit der Schwermetall-Homöostase in Verbindung gebracht werden. Es handelt sich um *DTX3* (*Detoxification3*) und das schon unter 4.1.6 erwähnte *ZAT7*. *DTX3* gehört zur Familie der MATE- (*multidrug and toxic compound extrusion*) Efflux-Proteine. Bei einer Untersuchung von 12 *DTX* Genen in Flachs konnte gezeigt werden, dass neun unter Salz- und Cadmium-Stress induziert werden (Ali et al. 2020). Wird *DTX1* aus *A. thaliana* in *E. coli* transformiert, zeigt dieser Stamm eine erhöhte Cadmium-Toleranz. Neben Cadmium wurde auch die Toleranz gegenüber Zink überprüft, die jedoch nicht gesteigert werden konnte (Li et al. 2002). Ebenfalls konnte bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression zu einer erhöhten Toleranz gegenüber abiotischem Stress, wie Trockenheit, Kälte oder Salz-Stress, führt (Lu et al. 2019). Unter Zink-Stress in *acd5-2* kommt es nun ebenfalls zur Induktion eines *DTX*-Gens, hier *DTX3*, jedoch liegt eine verminderte Zink-Toleranz vor. Auf Grund des gegensätzlichen Wirkungsmusters von *DTX3* scheint es also nicht an der Ausprägung der Zink-Hypersensitivität beteiligt zu sein.

Als nächstes werden die zehn am stärksten reprimierten Gene in *acd5-2* unter Zink-Stress genauer betrachtet. Über drei Gene (*AT2G04500*, *AT3G60280*, *AT1G11655*) ist bisher noch nichts weiter bekannt. Über andere Gene weiß man schon mehr. *PEN3* (*Penetration3*) vermittelt die Camalexin-Ausschüttung, um *Botrytis cinerea* abzuwehren (He et al. 2019). *pen3*-Mutanten zeigen dementsprechend eine höhere Pathogen-Anfälligkeit als der WT. Auch in *acd5-1* kann eine verringerte Toleranz gegenüber *B. cinerea* beobachtet werden (He et al. 2019). Ob *acd5-2* ebenfalls anfälliger für Pathogene ist, muss noch geprüft werden. Da *PEN3* aber nur unter Zink-Stress in *acd5-2* reduziert ist und sich die Pathogenanfälligkeit in *acd5-1* unter Kontroll-Bedingungen zeigt, ist dieses Gen in *acd5-1* wohl nicht für die verringerte Toleranz gegenüber *B. cinerea* verantwortlich.

Zusammen mit CYP716A2 ist es zudem an der Modifikation von pentacyclischen Triterpenen beteiligt (Ghosh 2017). Bei dem reduzierten Gen PILS7 (PIN-Like7) handelt es sich um ein Protein aus der Familie der Auxin-Carrier, welche an der Auxin-Homöostase beteiligt sind (Barbez et al. 2012). Bei der Untersuchung von Überexpressionslinien und Knockdown-Linien konnte beobachtet werden, dass eine Überexpression von PILS zu einer Reduktion des Wurzelwachstums führt, und eine verringerte Expression zu einem verbesserten Wachstum (Barbez et al. 2012). Da in *acd5-2* die Expression von *PILS7* reprimiert ist und es dennoch zu einer Verkürzung der Wurzeln kommt, scheint die verminderte Expression nicht ausreichend zu sein, um sich phänotypisch zu äußern. *RBL7* (*Rhomboid-like protein7*) wiederum ist an der Embryo-Entwicklung beteiligt (Knopf et al. 2012). Da es bisher jedoch keine Anhaltspunkte für eine Veränderung in der Embryoentwicklung gibt, wurde dieses Gen zunächst nicht näher betrachtet. Proteine aus der XTH-Familie (Xyloglucan Endotransglycosylase) sind an der Konstruktion von Cellulose-Mikrofibrillen beteiligt (Osato et al. 2006). Für *XTH17* konnte zudem eine Beteiligung an der Schwermetall-Toleranz gezeigt werden. Unter Al-Stress wird die Expression von *XTH17* reprimiert. Zudem wurde gezeigt, dass T-DNA-Insertionslinien eine gesteigerte Al-Toleranz zeigen (Zhu et al. 2014). Auch in *acd5-2* wird die *XTH17*-Expression reduziert. Da *acd5-2* jedoch Zink-hypersensitiv ist, trägt eine verminderte *XTH17*-Expression hier nicht zur Toleranz bei. EXO-Proteine, wie *EXO84A2* (*exocyst complex84A2*), sind Untereinheiten eines Exocyt-Komplexes, welcher an der Bildung des Casparischen Streifens beteiligt ist (Kalmbach et al. 2017). Der Casparische Streifen ist wichtig für die Aufnahme von Metallen (Barberon et al. 2016). Auch wenn in dieser Arbeit keine Unterschiede in der Metallverteilung innerhalb der Pflanze gemessen werden konnten, könnten diese vorhanden sein, waren aber zu gering, um sie zu detektieren.

Am stärksten war *AT4G11190* reduziert. Dieses Gen codiert für ein Protein der DRRP- (*disease resistance response protein*) Familie. DRRPs sind an der Vermittlung von Lignin und der Lignin-Biosynthese beteiligt (Gang et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass Schwermetalle, wie Kupfer, Cadmium, Mangan und Zink, die Lignin-Konzentration in der sekundären Zellwand erhöhen können, wodurch deren Dicke zunimmt (Liu et al. 2016; Liu et al. 2018; Yang et al. 2007; Gao et al. 2012b; van de Mortel et al. 2006). Auf Grund der Tatsache, dass Lignin-Polymere eine Vielzahl an funktionellen Gruppen besitzen, kann es verschiedenste Schwermetalle, wie Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} usw., binden (Guo et al. 2008). Dadurch wird die Aufnahme von Schwermetallen in das Cytoplasma verhindert (Bhuiyan et al. 2007; Kováčik et al. 2007). Durch die reprimierte Expression von DRRP könnte dieser Puffer gestört sein, wodurch sich mehr Zink im Cytoplasma befände und so die Zink-Hypersensitivität auslösen könnte. Eine Veränderung im Lignin-Gehalt kann auch den Transport von Schwermetallen ins Xylem beeinträchtigen (Liu et al. 2018). Dies könnte durch die Vermessung von Schwermetallen aus Zellwandextrakten mittels ICP MS überprüft werden. Da es in der Zink-Verteilung jedoch zu keiner messbaren Veränderung zwischen Col-0 und *acd5-2* kommt (Abb. 8A, B), scheint der Transport

nicht beeinträchtigt zu sein. Ein Zwischenprodukt der Lignin-Biosynthese ist Feruloyl-CoA. Wie unter 4.1.5 beschrieben, wird dieses während der Cumarin-Biosynthese unter Eisen-Mangel von *F6'H1* zu Scopoletin umgesetzt. Da die Expression von *F6'H1* jedoch in *acd5-2* unter Zink-Stress reprimiert ist, könnte es zu einer erhöhten Akkumulation von Feruloyl-CoA kommen. Dies könnte wiederum zu einer Veränderung der Lignin-Biosynthese führen, was sich wiederum auf die Zink-Toleranz auswirken könnte. Dass eine Veränderung in der Expression von *F6'H1* die Lignin-Zusammensetzung und/oder den Gehalt beeinflussen kann, wurde bereits gezeigt (Sakamoto et al. 2020). Um dies hier zu überprüfen, müsste die Feruloyl-CoA-Konzentration mittels HPLC (high performance liquid chromatography) vermessen werden.

Ausgehend von den gesammelten Informationen, wird für die Zink-Hypersensitivität in *acd5-2* folgende Hypothese aufgestellt. Unter den jeweils zehn am stärksten regulierten Genen in *acd5-2* unter Zink-Stress ist die Wahrscheinlichkeit bei *ZAT7* und *DRRP* am höchsten, dass sie an der Ausprägung der Zink-Hypersensitivität beteiligt sind. Auf Grund der Zink-Hypersensitivität von *acd5*-Mutanten scheinen Ceramide an der Zink-Toleranz beteiligt zu sein. Dies könnte eventuell dadurch zustande kommen, dass Zink die CerK aktiviert. Dass zweiwertige Ionen in der Lage sind, die CerK-Aktivität zu erhöhen, konnte für Ca^{2+} bereits gezeigt werden. Aber auch das Schwermetall Mangan kann die Aktivität erhöhen (Liang et al. 2003). Unter Kontroll-Bedingungen kommt es demnach zu keiner gesteigerten CerK-Aktivität. Dadurch würden Cer und Cer1P in gleichen Mengen vorliegen. Da bereits vermutet wird, dass Cer die Bildung von SA fördert (Sánchez-Rangel et al. 2015), wird auch hier davon ausgegangen. Da keine erhöhte Cer-Konzentration vorliegt, kommt es demnach auch nicht zur SA-Akkumulation. Auf Grund der Tatsache, dass *acd11* genau wie *acd5-1* erhöhte Cer-Konzentrationen zeigt (Simanshu et al. 2014), aber keine veränderte Zink-Toleranz, kann die Zink-Hypersensitivität nicht allein durch die Cer-Akkumulation und damit verbundene gesteigerte SA-Konzentration hervorgerufen werden. Der Unterschied zwischen *acd11* und *acd5-1* könnte in der Cer1P-Konzentration liegen. Da ACD11 Cer1P transportiert, kommt es in der *acd11*-Mutante zu einer Erhöhung der Cer1P-Konzentration (Simanshu et al. 2014). In *acd5* hingegen ist die CerK-Aktivität stark verringert (Abb. 18D). Dadurch ist es wahrscheinlich, dass Cer1P nicht gebildet werden kann, wodurch eine stark verminderte Cer1P-Konzentration vorläge. Zusammen mit der Tatsache, dass *acd5*-Doppelmutanten mit *nahG* eine verbesserte Zink-Toleranz gegenüber den Einzelmutanten zeigen (Abb. 11B), lässt sich vermuten, dass für die Ausprägung der Zink-Hypersensitivität sowohl erhöhte SA-Konzentrationen (ausgehend von erhöhten Cer-Konzentrationen) als auch verringerte Cer1P-Gehalte vorliegen müssen. Über Cer1P in Pflanzen ist bisher wenig bekannt. Was bisher gezeigt werden konnte, ist, dass der programmierte Zelltod in *acd5-1* durch die Gabe von Cer1P unterdrückt werden kann (Liang et al. 2003). Auch in Macrophagen konnte gezeigt werden, dass Cer1P die Apoptose unterdrücken kann. Dies geschieht durch die Inhibierung von Sphingomyelinase

(Gómez-Muñoz et al. 2004b). Hier zeigt sich, dass Cer1P inhibierend wirken kann. In Säugetierzellen konnte auch die Beteiligung von CerK und Cer1P an der Signaltransduktion gezeigt werden (Gómez-Muñoz 2004a). Über Ceramide ist bereits etwas mehr bekannt. So konnte in Säugetieren gezeigt werden, dass sie als Signal-Moleküle dienen. Auch Ceramide sind wie Cer1P an der Apoptose beteiligt. Zudem konnte eine Beteiligung an der Zellproliferation oder der Seneszenz nachgewiesen werden (Hannun et al. 2000; Hannun et al. 2008). Die Funktion von Ceramiden in Pflanzen konnte ebenfalls schon zum Teil aufgezeigt werden. Man weiß bereits, dass Ceramide wichtig sind für das Wachstum, die Entwicklung und auch die Antwort auf Stress (Pata et al. 2010; Berkey et al. 2012; Chen et al. 2009). Dies legt die Vermutung nahe, dass Cer und Cer1P an der Vermittlung der Zink-Stress-Antwort beteiligt sind.

Bezieht man nun *ZAT7* und *DRRP* ein, ergibt sich folgende Hypothese. Wie bereits erwähnt, konnte für ZAT-Proteine gezeigt werden, dass sie an der Antwort auf abiotischen Stress beteiligt sind (Sakamoto et al. 2004; Liu et al. 2014). Dabei agieren die ZAT-Proteine jeweils als Negativ-Regulatoren. Geht man nun davon aus, dass auch *ZAT7* die abiotische Stressantwort durch Repression von Genen steuert, könnte die reduzierte *DRRP*-Expression damit in Zusammenhang stehen. *DRRP* wiederum ist an der Vermittlung von Lignin und der Lignin-Biosynthese beteiligt (Gang et al. 1999). Die Lignin-Akkumulation und -zusammensetzung beeinflusst wiederum die Schwermetall-Toleranz, indem es ihre cytosolische Konzentration beeinflusst (Liu et al. 2018). Die *acd5*-Mutanten wurden zwar bereits auf ihre Metall-aufnahme und -verteilung hin untersucht, wobei in Keimlingen keine Unterschiede zum WT zu beobachten waren, jedoch ist es mit der verwendeten Messmethode nicht möglich, eine Verschiebung der Zink-Gehalte zwischen Zell-Innerem und -Äußerem zu messen. Eine Veränderung wäre also möglich.

Die erhöhte Expression von *ZAT7* kann nun einzig in *acd5-2* unter Zink-Stress beobachtet werden. Dies führt zu der Frage, was genau zur Induktion führt. Da eine verringerte SA-Konzentration die Zink-Hypersensitivität teilweise retten konnte, könnte die *ZAT7*-Expression SA-anhängig sein. Tatsächlich konnte für *ZAT7* bereits gezeigt werden dass es SA-responsive ist (Mahalingam et al. 2003). Dadurch würde sich erklären lassen, warum es in Col-0 zu keiner Induktion von *ZAT7* kommt, da es ohne Cer-Akkumulation auch zu keiner Akkumulation von SA käme. In *acd5-2* kommt es aber sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Zink-Stress zu einer erhöhten SA-Akkumulation, aber nur unter Zink-Stress zur Induktion von *ZAT7*. Dies würde bedeuten, dass *ZAT7* nur induziert wird, wenn es gleichzeitig zur SA- und Zink-Akkumulation kommt. Aber auch *acd11* weist eine erhöhte SA-Akkumulation auf und zeigt unter Zink-Stress keine Hypersensitivität. Ist *ZAT7* wirklich an der Zink-Toleranz beteiligt und durch Zink und SA induzierbar, sollte auch hier eine Zink-Hypersensitivität auftreten. Der Unterschied zwischen *acd5* und *acd11* besteht nun in der Cer1P-

Konzentration. Diese ist in *acd5-2* höchstwahrscheinlich stark verringert, wohingegen sie, wie bereits erwähnt, in *acd11* erhöht ist. Diese verringerten Cer1P-Konzentrationen könnten also ebenfalls einen Einfluss auf *ZAT7* und die Zink-Hypersensitivität haben. Wie genau die *ZAT7*-Expression reguliert wird und ob sie wirklich an der Ausbildung der Zink-Hypersensitivität beteiligt ist, kann momentan jedoch noch nicht gesagt werden.

Um dies zu klären, müssen vor allem die SA-Konzentration, Cer- und Cer1P-Konzentrationen sowie die cytosolische Zink-Konzentration in Col-0 und den *acd5*-Mutanten unter Kontroll-Bedingungen und Zink-Stress gemessen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine NaCl-Behandlung die Cer-Akkumulation und die damit verbundene erhöhte SA-Akkumulation in *acd5-1* verhindert (Yang et al. 2019). Interessant wäre also, *acd5-2* gleichzeitig unter NaCl-Stress und Zink-Stress anzuziehen und die Zink-Hypersensitivität zu bestimmen. Eventuell könnte sich die so verringerte SA-Konzentration bereits auf die Zink-Toleranz auswirken und es kommt zu einer Rettung des Phänotyps. Dabei sollte auch die Expression von *ZAT7* gemessen werden. Wäre diese tatsächlich von der SA-Konzentration abhängig sein, sollte diese verringert sein. Ebenfalls von Interesse wäre die Zink-Toleranz von *ZAT7*-Überexpressionslinien und *DRRP*-knockout-Mutanten zu untersuchen. Sollte die aufgestellte Hypothese zutreffend sein, wären beide Mutanten Zink-sensitiv. Auf Grund der möglichen Beteiligung von *DRRP* an der Zink-Toleranz könnte ebenfalls der Lignin-Gehalt und die Lignin-Zusammensetzung untersucht werden. Da das Cer-Cer1P-Gleichgewicht anscheinend eine wichtige Rolle in der Zink-Toleranz spielt, müssten zudem die Lipid-Profile für die jeweiligen Pflanzen und Bedingungen erstellt werden.

4.2 *ozs3*

4.2.1 Interaktion zwischen *DDB1a* und *OZS3*

Die zweite *ozs*-Mutante, die hier näher untersucht wurde, war *ozs3*. Die für die Zink-Hypersensitivität verantwortliche Mutation liegt dabei in *At2g20330* (Weber et al. 2020). Dieses Gen kodiert für eines von 85 in *A. thaliana* vorhergesagten DCAF-Proteinen (Lee et al. 2008). DCAFs gehören zu Proteinen mit einer WD-Domäne. Viele dieser WD-Domänen sind in Eukaryoten hoch konserviert. Es konnte gezeigt werden, dass, wenn hoch konservierte WD-Domänen gefunden wurden, diese auch in vielen anderen Eukaryoten konserviert waren. Dies deutet darauf hin, dass diese Proteine an grundlegenden zellulären Mechanismen beteiligt sind (van Nocker et al. 2003). In *ozs3* ist nun die WD-Domäne (WD40) mutiert. Durch Komplementation mit *OZS3* unter der Kontrolle des eigenen nativen Promotors konnte gezeigt werden, dass diese Mutation für die Zink-Hypersensitivität verantwortlich war.

DCAFs, wie OZS3, besitzen eine DWD-Box, welche eine Interaktion mit DDB1 ermöglicht. DDB1 kann wiederum mit einem CUL4-E3-Ligase-Komplex interagieren, wodurch Proteine für den proteasomalen Abbau markiert werden (Lee et al. 2007). Die Interaktion kommt dabei über das konservierte WDXR-Motiv zustande. Die hoch konservierten Aminosäuren Aspartat und Arginin vermitteln die Interaktion zwischen DDB1 und WD40 (Angers et al. 2006). All dies legt die Vermutung nahe, dass OZS3 als Substrat-Rezeptor für den CUL4-E3-Ligase-Komplex dienen könnte. Die Interaktion zwischen DDB1 und WD40-Proteinen konnte schon früher in Pflanzen nachgewiesen werden. Dabei konnte mittels Y2H, BiFC-Analyse und Co-Immunopräzipitation die Interaktion von DDB1 mit dem DCAF-Protein ABD1 (ABA-Hypersensitive DCAF1) nachgewiesen werden. In *A. thaliana* gibt es zwei DDB1 Proteine, DDB1a und DDB1b. Während mittels Y2H und BiFC die Interaktion von DDB1a mit ABD1 nachgewiesen wurde, wurde mit der CoIP die Interaktion von ABD1 mit DDB1b aufgezeigt (Seo et al. 2014). Um nun zu zeigen, dass OZS3 als Substrat-Rezeptor dient, sollte auch hier die Interaktion zwischen DDB1a und OZS3 nachgewiesen werden. Dies konnte durch eine Co-Immunopräzipitation gezeigt werden (Abb. 27). Mit Hilfe von GFP markiertem OZS3 war es möglich, HA-markiertes DDB1a zu präzipitieren. Auch mittels weiterer Experimente konnte diese Interaktion gezeigt werden. Zum einen konnte die Interaktion durch Y2H nachgewiesen werden, zum anderen durch eine BiFC-Analyse (Weber et al. 2020). Diese zeigte die Interaktion der Proteine im Nukleus, wo OZS3 lokalisiert ist. Dabei konnte beobachtet werden, dass das Fluoreszenzsignal in *ozs3-Mutanten* mit veränderter DWD-Domäne stark reduziert war (Weber et al. 2020). Zusammengefasst kann gesagt werden, dass OZS3 und DDB1a interagieren und die Mutation in *ozs3* die Interaktion der Proteine hemmt. Zudem konnte die Hypothese bekräftigt werden, dass OZS3 als Substratrezeptor dient.

4.2.2 Nachweis von OZS3 als essentielles Gen

Orthologe von *OZS3* kommen in den meisten Eukaryonten vor, darunter auch in *H. sapiens* und *D. melanogaster* (van Nocker et al. 2003). In den meisten Organismen und so auch in *A. thaliana* gibt es immer nur eine Kopie von *OZS3* bzw. dessen Orthologen (Weber et al. 2020). Die Informationen über ihre Funktion sind jedoch sehr begrenzt. Bisher konnte lediglich in *Schizosaccharomyces pombe* gezeigt werden, dass das *OZS3*-Ortholog *Wdr70* an der DNA-Reparatur beteiligt ist (Zeng et al. 2016). In *Caenorhabditis elegans* konnte zudem gezeigt werden, dass ein Funktionsverlust in der *gad-1* Mutante zur Embryo-Letalität führt (Knight et al. 1998). Der Mangel an Informationen über die Funktion von *OZS3* und dessen Orthologe lässt die Vermutung zu, dass Mutanten mit einem vollständigen Funktionsverlust eventuell nicht lebensfähig sind. Dies wiederum wäre ein Indiz dafür, dass *OZS3* ein essentielles Gen ist und ein kompletter Funktionsverlust somit letal wäre. Diese These wird zudem dadurch gestützt, dass es keine T-DNA-Insertions-Linie gibt, die einen kompletten

Funktionsverlust von *OZS3* aufweist (Lee et al. 2010; Weber et al. 2020). Auch für andere DCAF-Proteine konnte gezeigt werden, dass sie essentiell sind. Eine Mutation von *WDR55* zum Beispiel führt in *A. thaliana* zur Embryoletalität (Bjerkkan et al. 2013).

Um nun zu überprüfen, ob *OZS3* essentiell ist, wurden mittels CRISPR/Cas9 *ozs3*-Mutanten erzeugt. Hierbei kam es durch Insertion oder Deletion eines Nukleotides zu einem Frame-shift und somit zum kompletten Funktionsverlust von *OZS3* (Abb. 28B). Dabei konnten in der T2-Generation keine Pflanzen gefunden werden, welche homozygot für die *OZS3*-Mutation waren. In den Samenschoten der T1-Generation war zudem zu beobachten, dass etwa 25% der Samenanlagen nicht zu Samen ausgebildet wurden (Abb. 28C). Dies entspricht dem Anteil an Samen, welche homozygot für die *OZS3* Mutation gewesen wären. Ein kompletter Funktionsverlust von *OZS3* führt demnach zur Embryoletalität. Damit wurde bewiesen, dass *OZS3* ein essentielles Gen ist.

4.2.3 Unabhängigkeit der erhöhten ROS-Produktion unter Zink-Stress von der generellen Antwort auf oxidativen Stress

Um nun einen tieferen Einblick in die Funktionsweise von *OZS3* zu bekommen, wurde die *ozs3*-Mutante weiter charakterisiert. Dabei wurde auch die Produktion von ROS untersucht. Da erhöhte Zink-Konzentrationen zur Bildung von ROS, wie H_2O_2 und O^{2-} , führen (Choudhury et al. 2013), könnte eine Veränderung in der Zink-Toleranz eventuell auch zu einer veränderten ROS-Produktion führen. Die Ergebnisse zeigen, dass die *ozs3*-Mutanten unter Kontroll-Bedingungen geringfügig weniger H_2O_2 bildeten als Col-0. Unter Zink-Stress hingegen konnte eine signifikant höhere Produktion beobachtet werden (Abb. 29). Dabei zeigte sich bei Col-0 keine gesteigerte Akkumulation von ROS unter Zink-Stress im Vergleich zur Kontroll-Behandlung. Dass leicht erhöhte Zink-Konzentrationen keinen Einfluss auf die ROS-Bildung in Col-0 haben, konnte auch früher schon gezeigt werden (Opdenakker et al. 2012). Die erhöhte Bildung von Sauerstoffradikalen unter Zink-Stress zwischen toleranten und sensitiven Pflanzen konnte bereits in *Brassica*-Spezies beobachtet werden. Dabei besitzt *B. napus* im Gegensatz zu *B. juncea* eine Hypersensitivität gegenüber Zink. Zwar zeigte unter Kontrollbedingungen die zinktolerante Spezies keinen Unterschied in der ROS-Produktion im Vergleich zur sensitiven Spezies, aber unter Zink-Stress konnte der gleiche Trend wie bei den *ozs3*-Mutanten beobachtet werden. Dabei wies die sensitive *Brassica* Spezies eine erhöhte Konzentration an H_2O_2 und O^{2-} im Vergleich zur toleranten Spezies auf (Feigl et al. 2015).

Dass generell die Antwort auf oxidativen Stress gestört ist, kann ausgeschlossen werden, da *ozs3* auch auf Paraquat angezogen wurde. Dies verursacht bei Pflanzen oxidativen Stress. *ozs3* zeigte aber die gleiche Reduktion im Wachstum wie Col-0. Es konnte sogar ein leicht besseres Wachstum gegenüber dem WT beobachtet werden (Weber et al. 2020). Wodurch genau die Steigerung der ROS-

Produktion unter Zink-Stress in *ozs3* zustande kommt, kann leider nicht gesagt werden. Möglich wäre eventuell eine Veränderung der cytosolischen Zink-Konzentration, welche mittels ICP-OES-Analyse nicht zu detektieren ist. Um dies zu klären, sollte die cytosolische Zink-Konzentration gemessen werden.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass *ozs3* neben der Zink-Hypersensitivität zusätzlich sensitiver auf Kälteeinwirkung reagiert (Weber et al. 2020). Da bekannt ist, dass auch Kälte-Stress zur Bildung von ROS führt (Suzuki und Mittler 2006), wurde die Bildung von Sauerstoffradikalen auch unter Kältestress in *ozs3-Mutanten* untersucht. Dabei zeigte sich ein leichter Anstieg in der Bildung von ROS unter Kälte-Stress sowohl in Col-0 als auch in *ozs3* (Abb. 30). Der Anstieg der ROS Konzentration von Col-0 konnte auch früher schon gezeigt werden. Dabei konnte bereits nach sechs Stunden Kälte-Behandlung ein leichter Anstieg in der H₂O₂ Akkumulation beobachtet werden (Kim et al. 2013). Zwischen Col-0 und *ozs3* konnte jedoch weder unter Kontrolle noch unter Kälte-Stress ein Unterschied in der ROS-Produktion festgestellt werden. Auch dies zeigt, dass es keine generelle Veränderung im Mechanismus der ROS-Bildung gibt. Zudem kann gesagt werden, dass die Reduktion des Wachstums von *ozs3* unter Kälte nicht durch eine veränderte ROS-Bildung bedingt ist.

4.2.4 Funktionen von DCAF-Proteinen in *A. thaliana*

Zusammengefasst kann man momentan nur über die genaue Funktion von *OZS3* spekulieren. Da WD40 die einzige Domäne ist, die gefunden werden konnte, scheint *OZS3* über die Interaktion von Proteinen zu arbeiten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass DCAFs an multiplen Vorgängen in der Pflanze beteiligt sind. Unter anderem sind CRL4-Komplexe an der Blühinduktion, der Antwort auf abiotischen Stress, wie Hitze oder osmotischen Stress, der circadianen Rhythmik, der DNA-Reparatur, SA-abhängigen Pathogenabwehr, ABA-Antwort, Entwicklung der Wurzel und Fotomorphogenese sowie der Antwort auf UV-Licht beteiligt (Choi et al. 2014). So zeigen zum Beispiel *dwa*-Mutanten unter ABA- oder NaCl-Stress eine verkürzte Primärwurzel. Als Substrat für einen CRL-DWA-Komplex wurde ABA-Insensitive 5 (ABI5) gefunden. Dabei geht ABI5 mit DWA1 und DWA2 sowie mit CUL4 einen Komplex ein und kann anschließend über Proteasome abgebaut werden. Damit dienen DWA1 und DWA2 als Negativ-Regulator der ABA-Signal-Transduktion (Lee et al. 2010). Ein weiteres DCAF, welches mit DDB1 interagiert, ist ABD1. Auch dieses Protein dient, wie DWA1 und DWA2, als Negativ-Regulator der ABA-Signal-Transduktion (Seo et al. 2014).

Es konnte auch gezeigt werden, dass Proteine mit DWD-Domäne an der Antwort auf Metall-Stress beteiligt sind (Nezames et al. 2012). ALT2 ist dabei wichtig für das Auffinden und die Antwort auf Stoffe, welche DNA-DNA-Verbindungen verändern. Bei einem Funktionsverlust von ALT2 können

Schäden, welche durch solche Stoffe verursacht werden, nicht repariert werden (Nezames et al. 2012).

Dass DCAFs auch an der DNA-Reparatur beteiligt sind, konnte an DDB2 und COP9 Signalosome (CSA) gezeigt werden. DDB2 kann zum Beispiel an DNA binden, welche durch UV-Licht geschädigt wurde. Dadurch wird sie für den DNA-Reparatur-Mechanismus, Nucleotide Excision Repair (NER), markiert (Biedermann et al. 2011). Damit dieser arbeiten kann, müssen die durch UV-Licht geschädigten Stellen der DNA zugänglich gemacht werden. Dazu bindet DDB2 an einen DDB1-CUL4-Komplex. Dadurch wird DDB2 soweit abgebaut, dass NER arbeiten kann (Scrima et al. 2008; Biedermann et al. 2011). Die DNA-Reparatur mit Hilfe von CSA funktioniert ähnlich. CSA kann zwar nicht direkt an die geschädigte DNA binden, dafür aber an die RNA-Polymerase, welche an DNA-Strängen mit Läsionen hängen bleibt. Dadurch ist die geschädigte DNA erneut markiert. Anschließend bindet CSA an DDB1. Dadurch wird die RNA-Polymerase abgebaut und die DNA wird zugänglich für NER (Groisman et al. 2003).

4.2.5 Funktion von OZS3-Orthologen

Über die Funktion von OZS3-Orthologen ist noch nicht viel bekannt. Wie zu Beginn erwähnt, ist das OZS3-Ortholog, *Wdr70*, in *S. pombe* ebenfalls an der DNA-Reparatur beteiligt. Dabei wird es als Teil eines CUL4-E3-Ligase-Komplexes zu Doppelstrangbrüchen transportiert. Dort führt es durch Ubiquitinierung von Lysin 119 in Histon 2 zu einer Chromatin-Veränderung (Zeng et al. 2016). *Wdr70*-Deletionsmutanten zeigen einen verzögerten Zellzyklus und eine Hypersensitivität gegenüber DNA-schädigenden Stoffen (Zeng et al. 2020). Auch für das humane WDR70 konnte gezeigt werden, dass es an der DNA-Reparatur beteiligt ist (Tang et al. 2017).

OZS3 könnte also ebenfalls an der DNA-Reparatur beteiligt sein. Genau wie *S. pombe-Δwdr70*-Mutanten eine erhöhte Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Stoffen zeigen, konnte dies auch für *ozs3* beobachtet werden. Zum einen zeigt *ozs3* eine Hypersensitivität gegenüber Kälte (Weber et al. 2020). Kälte kann DNA-Schäden vor allem in den Wurzelstammzellen verursachen (Hong et al. 2017). Zum anderen zeigt *ozs3* ebenfalls eine erhöhte Sensitivität gegenüber UV-Licht (Weber et al. 2020). Ob nun auch Zink zu DNA-Schäden führt, ist noch nicht bekannt (Angelé-Martínez et al. 2014). In humanen Zellen konnte gezeigt werden, dass zwar ein Zink-Mangel zu vermehrten Brüchen des DNA-Stranges führt, ein Zink-Überschuss zeigte dies jedoch nicht (Sharif et al. 2012).

Da OZS3 potentiell als Substratrezeptor eines CUL4-E3-Ligase-Komplexes fungiert, wird die Identifikation von interagierenden Proteinen mit OZS3 ein wichtiger Schritt sein, die genaue Funktion des Proteins aufzuklären.

4.3 *ozs1*-Suppressor-Screen

Um weitere Einblicke in die Zink-Homöostase zu gewinnen, wurde ein Suppressor-Screen mit *ozs1* durchgeführt. Dass ein solcher Ansatz erfolgversprechend ist, konnte bereits früher gezeigt werden (van Oosten et al. 2013; Gabrielson et al. 2006). Bei der Reaktion auf abiotischen Stress konnten dadurch neue Mechanismen der Stress-Antwort aufgezeigt werden. So konnte zum Beispiel ein neuer Mechanismus der Salz-Stress-Antwort gefunden werden (van Oosten et al. 2013). Aber auch bei der Aufklärung von Metall-Homöostasen konnten neue Erkenntnisse gewonnen werden. In der Al-Homöostase konnte so die Beteiligung des Gens ATR (Ataxia Telangiectasia-mutated and Rad3-related), welches an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt ist, nachgewiesen werden (Gabrielson et al. 2006; Rounds et al. 2008).

Hier wurde nun *ozs1* EMS-mutagenisiert. *ozs1* besitzt eine Punktmutation in *MTP1*, welche zu einem Funktionsverlust des Genes führt (Weber et al. 2013). *MTP1* ist in der vakuolären Membran lokalisiert. Dort transportiert es Zink vom Cytosol in die Vakuole. Dadurch werden unter Zink-Stress zu hohe Konzentrationen an freiem Zink vermieden (Kobae et al. 2004). Ist *MTP1* mutiert, kann Zink nicht länger in die Vakuole transportiert werden. Dies zeigt sich in Keimlingen unter anderem in einem verkürzten Wurzelwachstum unter Zink-Stress. Diese Mutante wurde nun EMS-mutagenisiert und im Anschluss auf Zink selektiert. Es konnten zwei Suppressor-Mutanten mit einem verbessertem Wurzelwachstum im Vergleich zu Col-0 unter Zink-Stress gefunden werden (Abb. 31). Dabei zeigte jedoch nur *suo1* einen signifikanten Unterschied in der Wurzellänge. Aber auch für *suo2* konnte dieser Trend beobachtet werden, wenn das Wurzelwachstum auch nicht signifikant verbessert war. Für dieses verbesserte Wachstum kann es mehrere Ursachen geben. Zum Beispiel könnte ein Aufnahme-Mechanismus für Zink gestört sein, wodurch weniger Zink in die Zelle gelangen würde. Ist weniger Zink in der Zelle vorhanden, ist die Detoxifizierung durch *MTP1* nicht nötig. Die Mutation in *ozs1* ist somit nicht mehr von so großer Bedeutung.

4.3.1 Zink-Aufnahme in den Suppressor-Mutanten

IRT1 ist ein bereits bekannter Aufnahme-Transporter für Zink (Korshunova et al. 1999). Demnach wurde zunächst überprüft, ob *IRT1* mutiert ist. Dazu wurde *IRT1* sequenziert und das Transkriptlevel untersucht (Abb. 32). Dabei konnte in den Suppressor-Mutanten kein Unterschied zu *ozs1* festgestellt werden. Wäre nun ein anderer Aufnahme-Mechanismus betroffen, müssten sich die Zink-Gehalte in der Pflanze ändern. Um dies zu überprüfen wurden die Metall-Gehalte von *suo1* und *suo2* vermessen. Dabei konnte sowohl unter Kontrolle als auch unter Zink-Stress kein Unterschied in der Zink-Konzentration zwischen *ozs1* und den Suppressor-Mutanten festgestellt werden (Abb. 33, 35). Dies konnte sowohl für Keimlinge als auch für adulte Pflanzen gezeigt werden. Der Zink-Gehalt in

Wurzeln und im Spross von Col-0 und *mtp1-1*-Keimlingen wurde bereits untersucht. Dabei wurde jedoch ein deutlich geringerer Zink-Gehalt in den Wurzeln von *mtp1-1* festgestellt (Kawachi et al. 2009). Dieser Unterschied konnte sowohl unter Kontroll-Bedingungen als auch unter Zink-Stress beobachtet werden. Unter Kontrolle zeigte der WT eine etwa doppelt so hohe Zink-Konzentration wie *mtp1-1*. Unter Zink-Stress war die Konzentration sogar etwa 3-mal so hoch. Es konnte auch gesehen werden, dass die Zink-Konzentrationen unter Kontroll-Bedingungen 3 - 4-mal höher waren als in dem hier durchgeführten Experiment (Kawachi et al. 2009). Der Unterschied könnte eventuell am Alter der Keimlinge liegen. Im vorliegenden Experiment wurden die Keimlinge nach zwei Wochen geerntet, bei Kawachi et al. erst nach drei Wochen. Zudem befand sich die Mutation im WS- und nicht im Col-0-Hintergrund. Was man sicher sagen kann, ist, dass es zwischen *ozs1* und den Suppressor-Mutanten keinen Unterschied im Gesamtgehalt von Zink gibt. Es könnte allerdings eine Veränderung in der cytosolischen Zink-Konzentration geben. Diese könnte zum Beispiel mittels eCALWY-FRET- (Förster resonance energy transfer) Sensoren gemessen werden (Lanquar et al. 2014). eCALWY-Sensoren bestehen aus zwei metallbindenden Domänen, die über einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind. Diese beiden Domänen sind wiederum mit Donor- und Akzeptor-Fluoreszenz-Domänen gekoppelt. In der Abwesenheit von Zn^{2+} interagieren die beiden Fluoreszenz-Domänen und es kommt zum Energie-Transfer. Bindet Zink zwischen den beiden Metall-bindenden Domänen wird die Interaktion der Fluoreszenz-Domänen gestört, wodurch das FRET-Signal sinkt (Lanquar et al. 2014).

4.3.2 Ermittlung möglicher Gene mit Beteiligung an der Zink-Homöostase

Im Anschluss daran wurde die Mutation, welche für die gesteigerte Zink-Toleranz gegenüber *ozs1* verantwortlich ist, in *suo1* mittels QTL-Seq-Analyse-Methode gesucht. Auf Grund der Tatsache, dass es für diese Analyse besonders wichtig ist, die Phänotypen klar unterscheiden zu können, wurde sich hierbei auf *suo1* konzentriert, da diese die einzige Suppressor-Mutante war, die unter Zink-Stress ein signifikant besseres Wurzelwachstum zeigte. Die QTL-Seq-Analyse-Methode lieferte fünf Kandidatengene (Tab. A3). Alle Mutationen in diesen Genen führten zu einer veränderten AS-Sequenz. Eine Mutation wurde in *AT3G54590* gefunden. Dieses Gen codiert für *Extensin2* (*EXT2*). Extensine sind Bestandteil der Zellwand und dort an deren Organisation beteiligt (Lampert 1963). Es konnte gezeigt werden, dass *EXT2* vor allem bei Rehydrierung nach Dehydrierung exprimiert und unter Salz-Stress reprimiert wird (Yoshida et al. 2001). Da laut SIFT-Analyse der vorliegende AS-Austausch jedoch tolerierbar ist, also höchstwahrscheinlich nicht zu einer Veränderung der Funktion des Proteins führt, wurde *EXT2* nicht weiter untersucht. Genauso verhält es sich bei *AT3G57060*. Dieses Gen codiert für ein CAP-D Protein (Chromosome Associated Polypeptide), welches für die Chromatin Organisation, das

Wachstum und die Fertilität wichtig ist (Schubert et al. 2013). Auch hier ist der AS-Austausch laut SIFT-Analyse tolerierbar.

Eine weitere Mutation wurde in *AT3G49800* gefunden. Dieses Gen codiert für ein Protein mit BSD-Domäne. BSD-Domänen kommen in verschiedenen Protein-Familien vor und sind etwa 60 AS lang. Daher stammt auch der Name BSD (BTF2-like transcription factors, synapse-associated, DOS2-like proteins) (Doerks et al. 2002). *BTF2* aus Säugetieren und das homologe Gen *TFB1* aus Hefe enthalten zum Beispiel eine BSD-Domäne. Diese Proteine dienen als Transkriptionsfaktoren (Fischer et al. 1992; Gileadi et al. 1992). BSD-Domänen können auch in Synapsen assoziierten Proteinen und in DOS2-like Proteinen gefunden werden (Doerks et al. 2002). Für DOS2 konnte gezeigt werden, dass es in Hefe an der Organisation von Heterochromatin beteiligt ist (Li et al. 2005). BSD-Domänen sind nicht nur in vielen verschiedenen Protein-Familien zu finden, sondern auch in vielen Spezies von frühen Protozoen bis hin zum Menschen, was auf eine konservierte, möglicherweise essentielle Funktion hindeutet (Doerks et al. 2002). Da BSD-Domänen in Transkriptionsfaktoren gefunden wurden, wird vermutet, dass sie an Chromatin-assoziierten Prozessen beteiligt sind. In Pflanzen wiederum erscheint eine BSD-Domäne auch mit einer U-Box Domäne. U-Box-Domänen sind an der Ubiquitinierung von Proteinen beteiligt (Aravind et al. 2000). Letztendlich ist die genaue Funktion von BSD-Domänen noch nicht bekannt (Doerks et al. 2002). Die BSD-Domäne ist die einzige Domäne, die in *AT3G49800* gefunden werden konnte. Laut BLAST-Analyse erstreckt sie sich über die AS 195 - 247. Somit liegt die gefundene Mutation nicht in der BSD-Domäne, da sie die 146. AS verändert. Auch wenn ein Alignment von *AT3G49800* Orthologen darauf hindeutet, dass die mutierte AS konserviert ist, spricht die Tatsache, dass sich die Mutation nicht in der BSD-Domäne befindet, dagegen, dass die Funktion des Proteins beeinflusst ist. Betrachtet man zudem den SNP-Index von KP, kann man sehen, dass dieser bei 0,38 liegt. Damit liegt die Allel-Häufigkeit des KP deutlich über dem erwarteten Wert.

Eine weitere mögliche Mutation, die laut QTL-Seq-Analyse-Methode zu der gesteigerten Zink-Toleranz führen könnte, wurde in *AT3G59610* gefunden. Die Mutation führt hier zu einer Verkürzung des Proteins von 521 AS auf 455 AS. Das Gen codiert für ein *Jacalin related Lectin 38 (JAL38)*-Protein. Das Protein besitzt am N-Terminus eine F-Box-Domäne (PROSITE-ProRule). Proteine mit einer F-Box-Domäne kommen zum Beispiel in Skp1-Cullin-F-Box (SCF)-Komplexen vor. SCF sind Ubiquitin-E3-Ligase-Komplexe (Risseeuw et al. 2003). Zu diesen zählen auch die unter 4.2 behandelten CUL4-E3-Ligase-Komplexe. Da sich die F-Box-Domäne jedoch am N-Terminus des Proteins befindet und nur wenige AS am C-Terminus fehlen, sollte die Funktion dieser Domäne nicht beeinflusst sein. Am C-terminalen Ende befindet sich jedoch eine weitere Domäne. Hier ist eine Jacalin-related Lectin (JRK) - Domäne zu finden, die sich über die AS 377-519 erstreckt (PROSITE-ProRule). JRL-Domänen sind an der Resistenz gegenüber biotischem und der Toleranz gegenüber abiotischem Stress beteiligt (Esch et

al. 2017). Für *OsJRL* aus Reis konnte gezeigt werden, dass es als Antwort auf Salz-, Trocken-, Kälte- und Hitzestress hoch reguliert wird (He et al. 2017). JRL-Domänen binden reversibel Kohlenhydrate. Proteine mit einer JRL-Domäne sind an der Pathogenabwehr beteiligt. So wurde gezeigt, dass ein JRL-Protein nach dem Binden von Oligosacchariden, was einen Signalstoff nach Pathogenbefall darstellt, an die Stelle der Infektion relokalisiert wurde (Weidenbach et al. 2016). Durch die Mutation entsteht in *JAL38* ein Stop-Codon wodurch es zur Bildung eines verkürzten Proteins kommt. Dadurch wird die JRL-Domäne nicht mehr ganz gebildet. Es werden nur noch 78 der 142 AS translatiert. Ein Teil der Domäne ist also noch vorhanden, ob dieser ausreichend ist, um die Funktion des Proteins aufrecht zu erhalten, kann nicht gesagt werden. Betrachtet man jedoch zusätzlich bei der QTL-Seq-Analyse-Methode den SNP-Index von KP, liegt dieser bei 0,46. Auch hier ist die Allel-Häufigkeit des KP deutlich höher als erwartet. Somit ist es unwahrscheinlich, dass diese Mutation den beobachteten Phänotyp verursacht.

Die letzte Mutation, die mittels QTL-Seq-Analyse-Methode als mögliche Ursache für die erhöhte Zink-Toleranz gefunden wurde, befindet sich in *AT3G57330*. Die Mutation führt, wie die Mutation in *AT3G59610*, zu einem verfrühten Stop-Codon, wodurch nur noch ein verkürztes Protein entsteht. Dabei werden lediglich 105 der insgesamt 1025 AS gebildet. *AT3G57330* codiert für eine *Autoinhibitorische Ca²⁺-ATPase11 (ACA11)*. In *Arabidopsis* gibt es 14 *Ca²⁺-ATPasen*, die in zwei Familien eingeteilt werden. Es gibt die *Autoinhibitorischen Ca²⁺-ATPasen (ACAs)* und vier *ER-Typ Ca²⁺-ATPasen (ECAs)* (Baxter et al. 2003). *ACAs* wiederum können in vier Unterfamilien eingeteilt werden. *ACA4* und *ACA11* bilden dabei eine Unterfamilie (Baxter et al. 2003). *ACA4* ist in prävakuolären Kompartimenten lokalisiert (Bolte et al. 2004), während *ACA11* in der vakuolären Membran lokalisiert ist (Lee et al. 2007). *ACA11* besitzt am N-Terminus eine calmodulinregulierte autoinhibitorische Domäne. Diese befindet sich innerhalb der ersten 37 AS (Lee et al. 2007). Darin unterscheidet sich *ACA11* von den *Plasmamembran Ca²⁺-ATPasen (PMCA)s* von Tieren, welche diese Domäne am C-terminalen Ende aufweisen (Carafoli 1997). Kommt es zu einem Anstieg der Calcium-Konzentration im Cytosol aktiviert dieses CaM. CaM wiederum bindet an der calmodulinregulierten autoinhibitorischen Domäne von *ACA11* und aktiviert dort den Transport von Calcium aus dem Cytosol in die Vakuole (Baekgaard et al. 2005). Die mittels QTL-Seq-Analyse-Methode gefundene Mutation führt nun zur Verkürzung des Proteins auf 105 AS. Damit ist zwar noch die calmodulinregulierte autoinhibitorische Domäne vorhanden, jedoch fehlen die anschließenden 920 AS. Dadurch kann die *Ca²⁺-Transportaktivität* höchstwahrscheinlich nicht ausgeführt werden. Dieser Aspekt spricht dafür, dass es sich hier um die gesuchte Mutation handelt, da die anderen Mutationen entweder tolerierbar sind oder eine zu hohe Allel-Häufigkeit des KP aufweisen. Betrachtet man den SNP-Index der Mutation in *ACA11* ist dieser bei kurzen Wurzeln mit 0,2 sehr niedrig. Es ist der niedrigste Wert, der berechnet wurde. Somit ist es am wahrscheinlichsten, dass die Mutation in

ACA11 für die gesteigerte Zink-Toleranz, welche in *suo1* gegenüber *ozs1* beobachtet wurde, verantwortlich ist.

4.3.3 *ACA11* und die Calcium-Homöostase

Über *ACA11* ist bereits einiges bekannt. Man weiß zum Beispiel, dass es an der Calcium-Homöostase beteiligt ist. Freies cytosolisches Calcium dient als Signalmolekül und vermittelt so Reaktionen auf biotischen und abiotischen Stress (Reddy et al. 2011; McAinsh et al. 2009). Viele äußere Einflüsse können die Konzentration von cytosolischem Ca^{2+} beeinflussen (Bush 1995). Damit Calcium als Signalmolekül arbeiten kann, muss die cytosolische Konzentration jedoch niedrig gehalten werden. Bis zu 5% des pflanzlichen Trockengewichtes können Calcium sein, während die cytosolische Konzentration mit weniger als $1 \mu\text{M}$ sehr niedrig ist (Pottosin et al. 2007). Die Konzentration wird dabei durch Ca^{2+} -Ein- und -Ausstrom ins Cytosol geregelt. Der Einstrom wird über Ionen-Kanäle entlang eines elektrochemischen Gradienten gesteuert, zum Beispiel durch Ca^{2+} -permeable Cyclic Nucleotide Gated Channels (CNGCs) oder spannungsgesteuerte Kanäle, wie Two Pore Channels (TPCs) (Pottosin et al. 2007; McAinsh et al. 2009; Ward et al. 1995). Ca^{2+} -Ausstrom wird durch energieabhängige Ca^{2+} -Pumpen, wie ACAs, ermöglicht (Harper 2001). Wie zuvor erwähnt ist *ACA11* an der vakuolären Membran lokalisiert. Die Vakuole ist ein Hauptspeicherort für Calcium (Lee et al. 2007). Bei niedrigen Calcium-Konzentrationen ist *ACA11* durch die autoinhibitorische Domäne inaktiv. Steigen die cytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen, bindet Ca^{2+} an CaM und aktiviert dieses. Dieser Komplex bindet anschließend an die calmodulinregulierte autoinhibitorische Domäne, wodurch *ACA11* aktiviert und Ca^{2+} in die Vakuole gepumpt wird. Dadurch verringert sich die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration, wodurch wiederum eine Rückkopplungsschleife entsteht und sich *ACA11* selbst inaktiviert (Lee et al. 2007).

Dadurch könnte auch der beobachtete semidominante Phänotyp der F1-Generation erklärt werden (Abb. 37). Da die calmodulinregulierte autoinhibitorische Domäne von *ACA11* noch vorhanden ist, könnte CaM in der heterozygoten F1-Generation sowohl an das wildtypische *ACA11* binden als auch an die mutierte Variante. Bindet CaM an das mutierte Protein, kann auf Grund der Verkürzung jedoch keine Transportaktivität stattfinden. Es würde also immer noch genauso viel CaM an *ACA11* binden; aber da nur noch die Hälfte der *ACA11*-Proteine funktionsfähig ist, würde auch nur noch halb so viel Ca^{2+} in die Vakuole transportiert werden. Dass defekte Proteine in heterozygoten Pflanzen wildtypische Gene negativ beeinflussen können und somit dominant sind, konnte schon oft beobachtet werden, zum Beispiel bei NEET-Proteinen. Diese Proteine sind Homodimere. Bei der Überexpression eines mutierten NEET-Proteins können entweder nicht funktionale Homodimere wildtypische Dimere verdrängen oder es kommt zur Dimerisierung von nicht funktionalen Heterodimeren, die aus einer WT und einer mutierten Untereinheit bestehen. So kann die NEET-

Funktion bereits mit einem mutierten Allel massiv gestört werden (Zandalinas et al. 2020; Darash-Yahana et al. 2016). Zwar bildet ACA11 keine Dimere, aber eventuell kommt es durch die Lokalisation in der vakuolären Membran zur Konkurrenz zwischen dem WT und dem mutierten Allel. Die gefundene Mutation in ACA11 könnte also den beobachteten semidominanten Phänotyp in *suo1* erklären.

4.3.4 Mögliche Ursache der gesteigerten Zink-Toleranz in *suo1*

Nun stellt sich die Frage, wie die Mutation in *ACA11* zu der erhöhten Zink-Toleranz in *suo1* führen könnte. In Tabak zum Beispiel führt das Ausschalten eines *ACA*-Gens, *NbCA1* (*Type IIB Ca²⁺-ATPase*), zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Pathogenen. Zudem ist der durch Pathogenbefall hervorgerufene Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration höher und länger als im WT (Zhu et al. 2010). Auch in *Physcomitrella patens* führt der Knockout eines *ACA*-Genes, hier *PCA1* (*P-type Ca²⁺-ATPase 1*), dazu, dass unter Salz-Stress die Erhöhung der cytosolische Ca^{2+} -Konzentration stärker und langanhaltender ist als im WT (Qudeimat et al. 2008). Diese Mutante zeigt eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Salz-Stress. Die anhaltend erhöhte cytosolische Ca^{2+} -Konzentration korreliert dabei mit einer Veränderung in der Expression von stressinduzierten Genen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass *PCA1* ein Teil der Antwort auf abiotischen Stress ist.

Der Funktionsverlust von *ACA*-Genen führt unter biotischem und abiotischem Stress in den genannten Beispielen zu einer anhaltend erhöhten cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Dies könnte demnach auch in *suo1* geschehen. Dafürsprechen würde, dass *ACA11* nur dann eine Funktion ausübt, wenn die cytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen erhöht sind. Da in *suo1* eine verbesserte Zink-Toleranz beobachtet werden kann, scheint also Zink-Stress zu einer Erhöhung des cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels zu führen. Daraus ergibt sich aber die Frage, was in *suo1* zu einer Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führen könnte. Eine Möglichkeit wäre, dass Zink-Stress direkt zu einem erhöhten Ca^{2+} -Gehalt führen würde. Viele Stress-Faktoren sowohl abiotische als auch biotische führen in Pflanzen zu einem Anstieg des cytosolischen Ca^{2+} -Gehaltes. Die Konzentration wird zum Beispiel bei Fraßschäden durch *Spodoptera littoralis* erhöht (Vadassery et al. 2012a). Aber auch unter Trocken- und Salz-Stress (Knight et al. 1997) sowie unter Kälte-Stress (Knight et al. 1996) wird die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration erhöht. Eine Verbindung zur Zink-Homöostase könnte dadurch zustande kommen, dass Zink-Stress ebenfalls zu einer erhöhten Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol führen könnte. Betrachtet man die RNA-Seq-Analyse (Abb. A4), kann man sehen, dass in Col-0 unter Zink-Stress zum Beispiel *Calmodulin-like Gene* (*CML*) induziert sind. Diese sind nahe verwandt mit Calmodulin (CaM). In Tabak konnte gezeigt werden, dass ausgelöst durch Wind oder Kälte-Schock die Ca^{2+} -Konzentration ansteigt. Dadurch wird die Expression von CaM-Genen induziert (van der Luit et al. 1999). Das *CML*-Gen *TCH* (Termed The Touch) wird ebenfalls durch erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen

induziert (Braam 1992). Unter Zink-Stress konnte nun die Induktion von zwei weiteren *CML*-Genen (*CML12* und *CML37*) beobachtet werden. Dass die Ca^{2+} -Konzentration bei Fraßschaden durch *Spodoptera littoralis* erhöht wird, wurde bereits erwähnt. Zudem wird die Expression von *CML12* (Vadassery et al. 2012b) und *CML37* (Scholz et al. 2014) induziert. Die Induktion weiterer *CaM*- und *CML*-Gene durch Kälte- und Hitze-Stress sowie durch Phytohormone konnte ebenfalls gezeigt werden (McCormack et al. 2003). Gemeinsam haben diese Stress-Behandlungen, dass sie zu einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration führen (Knight et al. 1996; Gao et al. 2012a; Vadassery et al. 2012b). Somit könnte auch hier der gestiegene Ca^{2+} -Gehalt die Ursache für die Induktion dieser Gene sein. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass eine erhöhte ROS-Produktion zu einem Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führen könnte. Unter Schwermetall-Stress kann es zur Bildung von ROS kommen (Choudhury et al. 2013). Dies zeigen auch die Daten der RNA-Seq-Analyse von 3.1.12. Hier zeigt sich bei Col-0 unter Zink-Stress eine Häufung von Genen, welche an der Antwort auf Wasserstoffperoxid beteiligt sind. Durch die Mutation in *ozs1*, ist ein Transporter mutiert, der Zink vom Cytosol in die Vakuole transportiert. Dadurch steigt die cytosolische Zink-Konzentration (Kawachi et al. 2009), welche zu einer vermehrten Produktion von ROS führen könnte. Die so erhöhte ROS-Konzentration kann wiederum zu oxidativem Stress führen, welcher eine Steigung des cytosolischen Ca^{2+} -Gehaltes auslösen kann (Rentel et al. 2004). Durch die Mutation in *ACA11* würde die Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration anschließend stärker und länger aufrechterhalten. Wie dies zu einer verbesserten Zink-Toleranz in *suo1* führen könnte, kann momentan leider noch nicht beantwortet werden.

Um dies herauszufinden, muss als erstes überprüft werden, ob die Mutation in *ACA11* für die gesteigerte Zink-Toleranz verantwortlich ist. Dazu können mehrere Ansätze verfolgt werden. Ein Nachweis dafür könnte durch die Kreuzung von *suo1* mit anderen *ozs*-Mutanten erbracht werden. Da es sich hier um eine semidominante Mutation handelt, sollte bereits die F1-Generation eine gesteigerte Zink-Toleranz zeigen. Zudem könnte in *ozs*-Mutanten das mutierte *ACA11*-Gen überexprimiert werden. Sollte das verkürzte *ACA11*-Protein zur Verbesserung der Zink-Toleranz führen, müsste auch in anderen *ozs*-Mutanten eine verringerte Zink-Hypersensitivität auftreten. Da es sich bei *suo1* jedoch um eine durch EMS-Mutagenese entstandene Mutation handelt, könnten ebenfalls andere Mutationen vererbt werden, welche einen Einfluss auf die Zink-Toleranz haben könnten. Um dies auszuschließen, müsste in *ozs1* mittels CRISPR-Cas9 die Verkürzung von *ACA11* aus *suo1* eingefügt werden. Damit wäre die einzige zusätzliche Mutation in *ozs1* die Verkürzung von *ACA11*. Kann die gesteigerte Zink-Toleranz immer noch beobachtet werden, kann mit Sicherheit gesagt werden, dass die Mutation in *ACA11* für diesen Phänotyp verantwortlich ist.

Um weitere Einblicke in die Funktion von *ACA11* zu gewinnen, könnten zum einen Pflanzen mit der *aca11*-Mutation ohne *ozs1*-Hintergrund auf Zink-Stress überprüft werden. Diese sollten auf Grund der gesteigerten Stress-Antwort sensitiver auf Zink reagieren. Zudem sollte die cytosolische Zn^{2+} -Konzentration bestimmt werden. Um die Ursache für die höchstwahrscheinlich erhöhten cytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen zu finden, könnte die ROS-Produktion in Col-0, *ozs1* und *suo1* unter Zink-Stress miteinander verglichen werden. Auch die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration sollte über die Zeit nach der Applikation von Zink in Col-0 und *suo1* gemessen werden. Dazu könnte das Fusionsprotein Cameleon genutzt werden. Dieses besteht aus einer Cyan-emittierenden Version von GFP gekoppelt an Calmodulin und einem Calmodulin-bindende Protein gekoppelt an ein Gelb-emittierendes GFP. Durch Ca^{2+} kommt es zur Konformationsänderung, die durch ein verändertes FRET- (fluorescence resonance energy transfer) Signal detektiert werden kann (Miyawaki et al. 1999; Gadella et al. 1999). Zum einen um zu überprüfen, ob es wirklich zu einem stärkeren und verlängerten Anstieg des cytosolischen Ca^{2+} -Gehaltes in *suo1* unter Zink-Stress kommt. Zum anderen, um zu überprüfen, ob Zink-Stress oder die dadurch ausgelöste ROS-Produktion den Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration bewirkt. Sollte der Zink-Stress verantwortlich sein, sollten auch Col-0-Pflanzen einen Anstieg zeigen. Sind erhöhte ROS-Konzentrationen jedoch für die erhöhte cytosolische Ca^{2+} -Konzentration verantwortlich, sollten nur *ozs1* und *suo1* einen Anstieg zeigen, da hier, durch die Mutation in *MTP1*, ein erhöhter Zink-Stress vorliegt, der zur ROS-Produktion führen könnte.

Zusammengefasst wird die Hypothese aufgestellt, dass es in *suo1* unter Zink-Stress zu einem stärkeren und verlängerten Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration kommt, wodurch die Zink-Toleranz gesteigert wird.

Literaturverzeichnis

- Abbas, H. K.; Tanaka, T.; Duke, S. O.; Porter, J. K.; Wray, E. M.; Hodges, L. et al. (1994):** Fumonisin- and AAL-Toxin-Induced Disruption of Sphingolipid Metabolism with Accumulation of Free Sphingoid Bases. In: *Plant physiology* 106 (3), S. 1085–1093. DOI: 10.1104/pp.106.3.1085.
- Abe, T.; Lu, X.; Jiang, Y.; Boccone, C. E.; Qian, S.; Vatter, K. M. et al. (2003):** Site-directed mutagenesis of the active site of diacylglycerol kinase alpha: calcium and phosphatidylserine stimulate enzyme activity via distinct mechanisms. In: *The Biochemical journal* 375 (Pt 3), S. 673–680. DOI: 10.1042/bj20031052.
- Achard, P.; Cheng, H.; Grauwe, L. de; Decat, J.; Schoutteten, H.; Moritz, T. et al. (2006):** Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. In: *Science (New York, N.Y.)* 311 (5757), S. 91–94. DOI: 10.1126/science.1118642.
- Achard, P.; Renou, J.; Berthomé, R.; Harberd, N. P.; Genschik, P. (2008):** Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. In: *Current Biology* 18 (9), S. 656–660. DOI: 10.1016/j.cub.2008.04.034.
- Ali, E.; Saand, M. A.; Khan, A. R.; Shah, J. M.; Feng, S.; Ming, C.; Sun, P. (2020):** Genome-wide identification and expression analysis of *detoxification efflux carriers (DTX)* genes family under abiotic stresses in flax. In: *Physiol Plant*. DOI: 10.1111/ppl.13105.
- Ali, U.; Li, H.; Wang, X.; Guo, L. (2018):** Emerging Roles of Sphingolipid Signaling in Plant Response to Biotic and Abiotic Stresses. In: *Molecular plant* 11 (11), S. 1328–1343. DOI: 10.1016/j.molp.2018.10.001.
- Andreini, C.; Banci, L.; Bertini, I.; Rosato, A. (2006):** Zinc through the three domains of life. In: *Journal of proteome research* 5 (11), S. 3173–3178. DOI: 10.1021/pr0603699.
- Angelé-Martínez, C.; Goodman, C.; Brumaghim, J. (2014):** Metal-mediated DNA damage and cell death: mechanisms, detection methods, and cellular consequences. In: *Metallomics : integrated biometal science* 6 (8), S. 1358–1381. DOI: 10.1039/c4mt00057a.
- Angers, S.; Li, T.; Yi, X.; MacCoss, M. J.; Moon, R. T.; Zheng, N. (2006):** Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery. In: *Nature* 443 (7111), S. 590–593. DOI: 10.1038/nature05175.
- Arana, L.; Gangoiti, P.; Ouro, A.; Trueba, M.; Gómez-Muñoz, A. (2010):** Ceramide and ceramide 1-phosphate in health and disease. In: *Lipids in health and disease* 9, S. 15. DOI: 10.1186/1476-511X-9-15.
- Aravind, L.; Koonin, Eugene V. (2000):** The U box is a modified RING finger — a common domain in ubiquitination. In: *Current Biology* 10 (4), R132–R134. DOI: 10.1016/s0960-9822(00)00398-5.
- Ariani, A.; Di Baccio, D.; Romeo, S.; Lombardi, L.; Andreucci, A.; Lux, A. et al. (2015):** RNA sequencing of *Populus x canadensis* roots identifies key molecular mechanisms underlying physiological adaptation to excess zinc. In: *PloS one* 10 (2), e0117571. DOI: 10.1371/journal.pone.0117571.
- Arrivault, S.; Senger, T.; Krämer, U. (2006):** The *Arabidopsis* metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 46 (5), S. 861–879. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.02746.x.

- Asai, T.; Stone, J. M.; Heard, J. E.; Kovtun, Y.; Yorgey, P.; Sheen, J.; Ausubel, F. M. (2000):** Fumonisin B1-induced cell death in *arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. In: *The Plant cell* 12 (10), S. 1823–1836. DOI: 10.1105/tpc.12.10.1823.
- Assunção, A. G. L.; Herrero, E.; Lin, Y.; Huettel, B.; Talukdar, S.; Smaczniak, C. et al. (2010):** *Arabidopsis thaliana* transcription factors *bZIP19* and *bZIP23* regulate the adaptation to zinc deficiency. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (22), S. 10296–10301. DOI: 10.1073/pnas.1004788107.
- Baekgaard, L.; Fuglsang, A. T.; Palmgren, M. G. (2005):** Regulation of plant plasma membrane H⁺- and Ca²⁺-ATPases by terminal domains. In: *Journal of bioenergetics and biomembranes* 37 (6), S. 369–374. DOI: 10.1007/s10863-005-9473-0.
- Barak, P.; Helmke, P. A. (1993):** The Chemistry of Zinc. In: A. D. Robson (Hg.): Zinc in Soils and Plants. Dordrecht: Springer Netherlands, S. 1–13.
- Barberon, M.; Vermeer, J. E. M.; Bellis, D. de; Wang, P.; Naseer, S.; Andersen, T. G. et al. (2016):** Adaptation of Root Function by Nutrient-Induced Plasticity of Endodermal Differentiation. In: *Cell* 164 (3), S. 447–459. DOI: 10.1016/j.cell.2015.12.021.
- Barbez, E.; Kubeš, M.; Rolčík, J.; Béziat, C.; Pěňčík, A.; Wang, B. et al. (2012):** A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. In: *Nature* 485 (7396), S. 119–122. DOI: 10.1038/nature11001.
- Baxter, I.; Tchieu, J.; Sussman, M. R.; Boutry, M.; Palmgren, M. G.; Gribskov, M. et al. (2003):** Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice. In: *Plant physiology* 132 (2), S. 618–628. DOI: 10.1104/pp.103.021923.
- Berkey, R.; Bendigeri, D.; Xiao, S. (2012):** Sphingolipids and plant defense/disease: the "death" connection and beyond. In: *Frontiers in plant science* 3, S. 68. DOI: 10.3389/fpls.2012.00068.
- Bernhardt, A.; Mooney, S.; Hellmann, H. (2010):** *Arabidopsis* DDB1a and DDB1b are critical for embryo development. In: *Planta* 232 (3), S. 555–566. DOI: 10.1007/s00425-010-1195-9.
- Bhuiyan, N. H.; Liu, W.; Liu, G.; Selvaraj, G.; Wei, Y.; King, J. (2007):** Transcriptional regulation of genes involved in the pathways of biosynthesis and supply of methyl units in response to powdery mildew attack and abiotic stresses in wheat. In: *Plant molecular biology* 64 (3), S. 305–318. DOI: 10.1007/s11103-007-9155-x.
- Bi, F.; Liu, Z.; Wu, J.; Liang, H.; Xi, X.; Fang, C. et al. (2014):** Loss of ceramide kinase in *Arabidopsis* impairs defenses and promotes ceramide accumulation and mitochondrial H₂O₂ bursts. In: *The Plant cell* 26 (8), S. 3449–3467. DOI: 10.1105/tpc.114.127050.
- Biedermann, S.; Hellmann, H. (2011):** WD40 and CUL4-based E3 ligases: lubricating all aspects of life. In: *Trends in plant science* 16 (1), S. 38–46. DOI: 10.1016/j.tplants.2010.09.007.
- Biedermann, S., Sutton M., and Hanjo H.n (2011):** Recognition and repair pathways of damaged DNA in higher plants. In: *Selected topics in DNA repair*, S. 201–236.
- Bjerkkan, K. N.; Grini, P. E. (2013):** The *Arabidopsis* DDB1 interacting protein WDR55 is required for vegetative development. In: *Plant signaling & behavior* 8 (9). DOI: 10.4161/psb.25347.
- Bolte, S.; Brown, S.; Satiat-Jeunemaitre, B. (2004):** The N-myristoylated Rab-GTPase m-Rabmc is involved in post-Golgi trafficking events to the lytic vacuole in plant cells. In: *Journal of cell science* 117 (Pt 6), S. 943–954. DOI: 10.1242/jcs.00920.

- Braam, J. (1992):** Regulated expression of the calmodulin-related TCH genes in cultured Arabidopsis cells: induction by calcium and heat shock. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (8), S. 3213–3216. DOI: 10.1073/pnas.89.8.3213.
- Brodersen, P.; Malinovsky, F. G.; Hématy, K.; Newman, M.; Mundy, J. (2005):** The role of salicylic acid in the induction of cell death in Arabidopsis *acd11*. In: *Plant physiology* 138 (2), S. 1037–1045. DOI: 10.1104/pp.105.059303.
- Brodersen, P.; Petersen, M.; Pike, H. M.; Olszak, B.; Skov, S.; Odum, N. et al. (2002):** Knockout of Arabidopsis *accelerated-cell-death11* encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. In: *Genes & development* 16 (4), S. 490–502. DOI: 10.1101/gad.218202.
- Bush, D. S. (1995):** Calcium Regulation in Plant Cells and its Role in Signaling. In: *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 46 (1), S. 95–122. DOI: 10.1146/annurev.pp.46.060195.000523.
- Cao, H.; Glazebrook, J.; Clarke, J. D.; Volko, S.; Dong, X. (1997):** The Arabidopsis *NPR1* Gene That Controls Systemic Acquired Resistance Encodes a Novel Protein Containing Ankyrin Repeats. In: *Cell* 88 (1), S. 57–63. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81858-9.
- Carafoli, E. (1997):** Plasma membrane calcium pump: structure, function and relationships. In: *Basic research in cardiology* 92 Suppl 1, S. 59–61. DOI: 10.1007/bf00794069.
- Carbonare, L. D.; White, M. D.; Shukla, V.; Francini, A.; Perata, P.; Flashman, E. et al. (2019):** Zinc Excess Induces a Hypoxia-Like Response by Inhibiting Cysteine Oxidases in Poplar Roots. In: *Plant physiology* 180 (3), S. 1614–1628. DOI: 10.1104/pp.18.01458.
- Chaney, R. L. (2010):** Cadmium and Zinc. In: Peter S. Hooda (Hg.): *Trace Elements in Soils*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, S. 409–439.
- Chen, L.; Hellmann, H. (2013):** Plant E3 ligases: flexible enzymes in a sessile world. In: *Molecular plant* 6 (5), S. 1388–1404. DOI: 10.1093/mp/sst005.
- Chen, M.; Cahoon, E. B.; Saucedo-García, M.; Plasencia, J.; Gavilanes-Ruíz, M. (2009):** Plant Sphingolipids: Structure, Synthesis and Function. In: Govindjee, Hajime Wada und Norio Murata (Hg.): *Lipids in Photosynthesis*, Bd. 30. Dordrecht: Springer Netherlands (Advances in Photosynthesis and Respiration), S. 77–115.
- Chen, Q.; Le X.; Tan, W.; Chen, L.; Qi, H.; Xie, L. et al. (2015):** Disruption of the Arabidopsis Defense Regulator Genes *SAG101*, *EDS1*, and *PAD4* Confers Enhanced Freezing Tolerance. In: *Molecular plant* 8 (10), S. 1536–1549. DOI: 10.1016/j.molp.2015.06.009.
- Chezem, W. R.; Memon, A.; Li, F.; Weng, J.; Clay, N. K. (2017):** SG2-Type R2R3-MYB Transcription Factor *MYB15* Controls Defense-Induced Lignification and Basal Immunity in Arabidopsis. In: *The Plant cell* 29 (8), S. 1907–1926. DOI: 10.1105/tpc.16.00954.
- Chichaibelu, B. (2013):** Identification of novel components of the zinc homeostasis mechanism in *Arabidopsis thaliana*. Universität Bayreuth, Bayreuth.
- Choi, C. M.; Gray, W. M.; Mooney, S.; Hellmann, H. (2014):** Composition, roles, and regulation of cullin-based ubiquitin e3 ligases. In: *The arabidopsis book* 12, e0175. DOI: 10.1199/tab.0175.
- Choudhury, S.; Panda, P.; Sahoo, L.; Panda, Sanjib K. (2013):** Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. In: *Plant signaling & behavior* 8 (4), e23681. DOI: 10.4161/psb.23681.
- Christianson, D. W. (1991):** Structural Biology of Zinc. In: *Metalloproteins: Structural Aspects*, Bd. 42: Elsevier (Advances in Protein Chemistry), S. 281–355.

- Clemens, M. W.; Jacobsen, E. D.; Horwitz, S. M. (2019):** 2019 NCCN Consensus Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Breast Implant-Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma (BIA-ALCL). In: *Aesthetic surgery journal* 39 (Suppl_1), S3-S13. DOI: 10.1093/asj/sjy331.
- Clemens, S.; Kim, E. J.; Neumann, D.; Schroeder, J. I. (1999):** Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. In: *The EMBO journal* 18 (12), S. 3325–3333. DOI: 10.1093/emboj/18.12.3325.
- Clemens, S. (2010):** Zn – A Versatile Player in Plant Cell Biology. In: Rüdiger Hell und Ralf-Rainer Mendel (Hg.): *Cell Biology of Metals and Nutrients*, Bd. 17. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Plant Cell Monographs), S. 281–298.
- Clemens, S.; Weber, M. (2016):** The essential role of coumarin secretion for Fe acquisition from alkaline soil. In: *Plant signaling & behavior* 11 (2), e1114197. DOI: 10.1080/15592324.2015.1114197.
- Colangelo, E. P.; Guerinot, M. L. (2004):** The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. In: *The Plant cell* 16 (12), S. 3400–3412. DOI: 10.1105/tpc.104.024315.
- Coleman, J. E. (1992):** Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. In: *Annual review of biochemistry* 61, S. 897–946. DOI: 10.1146/annurev.bi.61.070192.004341.
- Curie, C.; Cassin, G.; Couch, D.; Divol, F.; Higuchi, K.; Le Jean, M. et al. (2009):** Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. In: *Annals of botany* 103 (1), S. 1–11. DOI: 10.1093/aob/mcn207.
- Curtis, M. D.; Grossniklaus, U. (2003):** A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. In: *Plant physiology* 133 (2), S. 462–469. DOI: 10.1104/pp.103.027979.
- Darash-Yahana, M.; Pozniak, Y.; Lu, M.; Sohn, Y.; Karmi, O.; Tamir, S. et al. (2016):** Breast cancer tumorigenicity is dependent on high expression levels of NAF-1 and the lability of its Fe-S clusters. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (39), S. 10890–10895. DOI: 10.1073/pnas.1612736113.
- Davletova, S.; Schlauch, K.; Coutu, J.; Mittler, R. (2005):** The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in Arabidopsis. In: *Plant physiology* 139 (2), S. 847–856. DOI: 10.1104/pp.105.068254.
- Desbrosses-Fonrouge, A.; Voigt, K.; Schröder, A.; Arrivault, S.; Thomine, S.; Krämer, U. (2005):** *Arabidopsis thaliana* MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation. In: *FEBS letters* 579 (19), S. 4165–4174. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.06.046.
- Doerks, T.; Huber, S.; Buchner, E.; Bork, P. (2002):** BSD: a novel domain in transcription factors and synapse-associated proteins. In: *Trends in Biochemical Sciences* 27 (4), S. 168–170. DOI: 10.1016/S0968-0004(01)02042-4.
- Dutilleul, C.; Chavarria, H.; Rézé, N.; Sotta, B.; Baudouin, E.; Guillas, I. (2015):** Evidence for ACD5 ceramide kinase activity involvement in Arabidopsis response to cold stress. In: *Plant, cell & environment* 38 (12), S. 2688–2697. DOI: 10.1111/pce.12578.
- Eklund, H.; Nordström, B.; Zeppezauer, E.; Söderlund, G.; Ohlsson, I.; Boiwe, T. et al. (1976):** Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.4 Å resolution. In: *Journal of Molecular Biology* 102 (1), S. 27–59. DOI: 10.1016/0022-2836(76)90072-3.

- Esch, L.; Schaffrath, U. (2017):** An Update on Jacalin-Like Lectins and Their Role in Plant Defense. In: *International journal of molecular sciences* 18 (7). DOI: 10.3390/ijms18071592.
- Faraz, A.; Faizan, M.; Sami, F.; Siddiqui, H.; Hayat, S. (2020):** Supplementation of Salicylic Acid and Citric Acid for Alleviation of Cadmium Toxicity to *Brassica juncea*. In: *J Plant Growth Regul* 39 (2), S. 641–655. DOI: 10.1007/s00344-019-10007-0.
- Fasani, E.; DalCorso, G.; Costa, A.; Zenoni, S.; Furini, A. (2019):** The *Arabidopsis thaliana* transcription factor MYB59 regulates calcium signalling during plant growth and stress response. In: *Plant molecular biology* 99 (6), S. 517–534. DOI: 10.1007/s11103-019-00833-x.
- Feigl, G.; Lehotai, N.; Molnár, Á.; Ördög, A.; Rodríguez-Ruiz, M.; Palma, J. M. et al. (2015):** Zinc induces distinct changes in the metabolism of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) in the roots of two Brassica species with different sensitivity to zinc stress. In: *Annals of botany* 116 (4), S. 613–625. DOI: 10.1093/aob/mcu246.
- Feys, B. J.; Wiermer, M.; Bhat, R. A.; Moisan, L. J.; Medina-Escobar, N.; Neu, C. et al. (2005):** Arabidopsis SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 stabilizes and signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 complex in plant innate immunity. In: *The Plant cell* 17 (9), S. 2601–2613. DOI: 10.1105/tpc.105.033910.
- Fischer, L.; Gerard, M.; Chalut, C.; Lutz, Y.; Humbert, S.; Kanno, M. et al. (1992):** Cloning of the 62-kilodalton component of basic transcription factor BTF2. In: *Science (New York, N.Y.)* 257 (5075), S. 1392–1395. DOI: 10.1126/science.1529339.
- Forcat, S.; Bennett, M. H.; Mansfield, J. W.; Grant, M. R. (2008):** A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress. In: *Plant methods* 4, S. 16. DOI: 10.1186/1746-4811-4-16.
- Foreman, J.; Demidchik, V.; Bothwell, J. H. F.; Mylona, P.; Miedema, H.; Torres, M. A. et al. (2003):** Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. In: *Nature* 422 (6930), S. 442–446. DOI: 10.1038/nature01485.
- Fox, T. C.; Guerinot, M. L. (1998):** Molecular Biology of Cation Transport in Plants. In: *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 49, S. 669–696. DOI: 10.1146/annurev.arplant.49.1.669.
- Gabrielson, K. M.; Cancel, J. D.; Morua, L. F.; Larsen, P. B. (2006):** Identification of dominant mutations that confer increased aluminium tolerance through mutagenesis of the Al-sensitive Arabidopsis mutant, *als3-1*. In: *Journal of experimental botany* 57 (4), S. 943–951. DOI: 10.1093/jxb/erj080.
- Gadella, T. W.J.; van der Krogt, G. N.M.; Bisseling, T. (1999):** GFP-based FRET microscopy in living plant cells. In: *Trends in plant science* 4 (7), S. 287–291. DOI: 10.1016/S1360-1385(99)01426-0.
- Gang, D. R.; Costa, M. A.; Fujita, M.; Dinkova-Kostova, A. T.; Wang, H.; Burlat, V. et al. (1999):** Regiochemical control of monolignol radical coupling: A new paradigm for lignin and lignan biosynthesis. In: *Chemistry & Biology* 6 (3), S. 143–151. DOI: 10.1016/S1074-5521(99)89006-1.
- Gao, F.; Han, X.; Wu, J.; Zheng, S.; Shang, Z.; Sun, D. et al. (2012a):** A heat-activated calcium-permeable channel--Arabidopsis cyclic nucleotide-gated ion channel 6--is involved in heat shock responses. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 70 (6), S. 1056–1069. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2012.04969.x.

- Gao, F.; Robe, K.; Bettembourg, M.; Navarro, N.; Rofidal, V.; Santoni, V. et al. (2020):** The Transcription Factor bHLH121 Interacts with bHLH105 (ILR3) and Its Closest Homologs to Regulate Iron Homeostasis in Arabidopsis. In: *The Plant cell* 32 (2), S. 508–524. DOI: 10.1105/tpc.19.00541.
- Gao, L.; Peng, K.; Chen, Y.; Wang, G.; Shen, Z. (2012b):** Roles of apoplastic peroxidases, laccases, and lignification in the manganese tolerance of hyperaccumulator *Phytolacca americana*. In: *Acta Physiol Plant* 34 (1), S. 151–159. DOI: 10.1007/s11738-011-0813-x.
- Genoud, T.; Buchala, A. J.; Chua, N.; Métraux, J. (2002):** Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in Arabidopsis. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 31 (1), S. 87–95. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2002.01338.x.
- Ghosh, S. (2017):** Triterpene Structural Diversification by Plant Cytochrome P450 Enzymes. In: *Frontiers in plant science* 8, S. 1886. DOI: 10.3389/fpls.2017.01886.
- Gibbs, D. J.; Lee, S.; Isa, N. M.; Gramuglia, S.; Fukao, T.; Bassel, G. W. et al. (2011):** Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. In: *Nature* 479 (7373), S. 415–418. DOI: 10.1038/nature10534.
- Gileadi, O.; Feaver, W. J.; Kornberg, R. D. (1992):** Cloning of a subunit of yeast RNA polymerase II transcription factor b and CTD kinase. In: *Science (New York, N.Y.)* 257 (5075), S. 1389–1392. DOI: 10.1126/science.1445600.
- Gilmour, S. J.; Thomashow, M. F. (1991):** Cold acclimation and cold-regulated gene expression in ABA mutants of *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant molecular biology* 17 (6), S. 1233–1240. DOI: 10.1007/BF00028738.
- Gómez-Muñoz, A. (2004a):** Ceramide-1-phosphate: a novel regulator of cell activation. In: *FEBS letters* 562 (1-3), S. 5–10. DOI: 10.1016/S0014-5793(04)00211-X.
- Gómez-Muñoz, A.; Kong, J. Y.; Salh, B.; Steinbrecher, U. P. (2004b):** Ceramide-1-phosphate blocks apoptosis through inhibition of acid sphingomyelinase in macrophages. In: *Journal of lipid research* 45 (1), S. 99–105. DOI: 10.1194/jlr.M300158-JLR200.
- Grant, S. G.; Jessee, J.; Bloom, F. R.; Hanahan, D. (1990):** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (12), S. 4645–4649. DOI: 10.1073/pnas.87.12.4645.
- Greenberg, J. T.; Silverman, F. P.; Liang, H. (2000):** Uncoupling salicylic acid-dependent cell death and defense-related responses from disease resistance in the Arabidopsis mutant *acd5*. In: *Genetics* 156 (1), S. 341–350.
- Greene, E. A.; Codomo, C. A.; Taylor, N. E.; Henikoff, J. G.; Till, B. J.; Reynolds, S. H. et al. (2003):** Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in Arabidopsis. In: *Genetics* 164 (2), S. 731–740.
- Groisman, R.; Polanowska, J.; Kuraoka, I.; Sawada, J.; Saijo, M.; Drapkin, R. et al. (2003):** The Ubiquitin Ligase Activity in the DDB2 and CSA Complexes Is Differentially Regulated by the COP9 Signalosome in Response to DNA Damage. In: *Cell* 113 (3), S. 357–367. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00316-7.
- Grotz, N.; Fox, T.; Connolly, E.; Park, W.; Guerinot, M. L.; Eide, D. (1998):** Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (12), S. 7220–7224. DOI: 10.1073/pnas.95.12.7220.

- Guo, X.; Zhang, S.; Shan, X. (2008):** Adsorption of metal ions on lignin. In: *Journal of hazardous materials* 151 (1), S. 134–142. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2007.05.065.
- Hannun, Y. A.; Luberto, C. (2000):** Ceramide in the eukaryotic stress response. In: *Trends in Cell Biology* 10 (2), S. 73–80. DOI: 10.1016/S0962-8924(99)01694-3.
- Hannun, Y. A.; Obeid, L. M. (2002):** The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (29), S. 25847–25850. DOI: 10.1074/jbc.R200008200.
- Hannun, Y. A.; Obeid, L. M. (2008):** Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (2), S. 139–150. DOI: 10.1038/nrm2329.
- Hänsch, R.; Mendel, R. R. (2009):** Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). In: *Current opinion in plant biology* 12 (3), S. 259–266. DOI: 10.1016/j.pbi.2009.05.006.
- Harper, J. F. (2001):** Dissecting calcium oscillators in plant cells. In: *Trends in plant science* 6 (9), S. 395–397. DOI: 10.1016/S1360-1385(01)02023-4.
- Haydon, M. J.; Kawachi, M.; Wirtz, M.; Hillmer, S.; Hell, R.; Krämer, U. (2012):** Vacuolar nicotianamine has critical and distinct roles under iron deficiency and for zinc sequestration in Arabidopsis. In: *The Plant cell* 24 (2), S. 724–737. DOI: 10.1105/tpc.111.095042.
- He, X.; Li, L.; Xu, H.; Xi, J.; Cao, X.; Rong, S. et al. (2017):** A rice jacalin-related mannose-binding lectin gene, OsJRL, enhances *Escherichia coli* viability under high salinity stress and improves salinity tolerance of rice. In: *Plant biology (Stuttgart, Germany)* 19 (2), S. 257–267. DOI: 10.1111/plb.12514.
- He, Y. J.; McCall, C. M.; Hu, J.; Zeng, Y.; Xiong, Y. (2006):** DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4-ROC1 ubiquitin ligases. In: *Genes & development* 20 (21), S. 2949–2954. DOI: 10.1101/gad.1483206.
- He, Y.; Xu, J.; Wang, X.; He, X.; Wang, Y.; Zhou, J. et al. (2019):** The Arabidopsis Pleiotropic Drug Resistance Transporters PEN3 and PDR12 Mediate Camalexin Secretion for Resistance to *Botrytis cinerea*. In: *The Plant cell* 31 (9), S. 2206–2222. DOI: 10.1105/tpc.19.00239.
- Hirano, T.; Murakami, M.; Fukada, T.; Nishida, K.; Yamasaki, S.; Suzuki, T. (2011):** Roles of Zinc and Zinc Signaling in Immunity: Zinc as an Intracellular Signaling Molecule. In: Biedermann, Sascha, Sutton Mooney, and Hanjo Hellmann (Hg.), Bd. 97: Elsevier (Advances in Immunology), S. 149–176.
- Hong, J. H.; Savina, M.; Du, J.; Devendran, A.; Kannivadi Ramakanth, K.; Tian, X. et al. (2017):** A Sacrifice-for-Survival Mechanism Protects Root Stem Cell Niche from Chilling Stress. In: *Cell* 170 (1), 102–113.e14. DOI: 10.1016/j.cell.2017.06.002.
- Hua, Z.; Vierstra, R. D. (2011):** The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. In: *Annual review of plant biology* 62, S. 299–334. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042809-112256.
- Huang, K.; Lin, W.h; Cheng, W. (2018):** Salt hypersensitive mutant 9, a nucleolar APUM23 protein, is essential for salt sensitivity in association with the ABA signaling pathway in Arabidopsis. In: *BMC plant biology* 18 (1), S. 40. DOI: 10.1186/s12870-018-1255-z.
- Huang, S.; Sasaki, A.; Yamaji, N.; Okada, H.; Mitani-Ueno, N.; Ma, J. F. (2020):** The ZIP Transporter Family Member OsZIP9 Contributes To Root Zinc Uptake in Rice under Zinc-Limited Conditions. In: *Plant physiology* 183 (3), S. 1224–1234. DOI: 10.1104/pp.20.00125.
- Huby, E.; Napier, J. A.; Baillieul, F.; Michaelson, L.e V.; Dhondt-Cordelier, S. (2020):** Sphingolipids: towards an integrated view of metabolism during the plant stress response. In: *New Phytologist* 225 (2), S. 659–670. DOI: 10.1111/nph.15997.

- Hussain, D.; Haydon, M. J.; Wang, Y.; Wong, E.; Sherson, S. M.; Young, J. et al. (2004):** P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in Arabidopsis. In: *The Plant cell* 16 (5), S. 1327–1339. DOI: 10.1105/tpc.020487.
- Iida, A.; Kazuoka, T.; Torikai, S.; Kikuchi, H.; Oeda, K. (2000):** A zinc finger protein RHL41 mediates the light acclimatization response in Arabidopsis. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 24 (2), S. 191–203. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2000.00864.x.
- Irving, H.; Williams, R. J. P. (1953):** 637. The stability of transition-metal complexes. In: *J. Chem. Soc.*, S. 3192. DOI: 10.1039/jr9530003192.
- Jeong, J.; Merkovich, A.; Clyne, M.; Connolly, E. L. (2017):** Directing iron transport in dicots: regulation of iron acquisition and translocation. In: *Current opinion in plant biology* 39, S. 106–113. DOI: 10.1016/j.pbi.2017.06.014.
- Jirage, D.; Tootle, T. L.; Reuber, T. L.; Frost, L. N.; Feys, B. J.; Parker, J. E. et al. (1999):** *Arabidopsis thaliana* PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (23), S. 13583–13588. DOI: 10.1073/pnas.96.23.13583.
- Kalmbach, L.; Hématy, K.; Bellis, D. de; Barberon, M.; Fujita, S.; Ursache, R. et al. (2017):** Transient cell-specific EXO70A1 activity in the CASP domain and Casparian strip localization. In: *Nature Plants* 3 (5). DOI: 10.1038/nplants.2017.58.
- Kambe, T.; Tsuji, T.; Hashimoto, A.; Isumura, N. (2015):** The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. In: *Physiological reviews* 95 (3), S. 749–784. DOI: 10.1152/physrev.00035.2014.
- Kawachi, M.; Kobae, Y.; Mori, H.; Tomioka, R.; Lee, Y.; Maeshima, M. (2009):** A mutant strain *Arabidopsis thaliana* that lacks vacuolar membrane zinc transporter MTP1 revealed the latent tolerance to excessive zinc. In: *Plant & cell physiology* 50 (6), S. 1156–1170. DOI: 10.1093/pcp/pcp067.
- Kazan, K. (2006):** Negative regulation of defence and stress genes by EAR-motif-containing repressors. In: *Trends in plant science* 11 (3), S. 109–112. DOI: 10.1016/j.tplants.2006.01.004.
- Keilin, D.; Mann, T. (1940):** Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. In: *The Biochemical journal* 34 (8-9), S. 1163–1176. DOI: 10.1042/bj0341163.
- Khafi, A. S.; Iranbakhsh, A.; Safipour A., A.; Khavari Nejad, Ra. A. (2020):** RBOH expression and ROS metabolism in *Citrullus colocynthis* under cadmium stress. In: *Braz. J. Bot* 43 (1), S. 35–43. DOI: 10.1007/s40415-020-00581-z.
- Khudsar, T.; Iqbal, M.; Sairam, R. K. (2004):** Zinc-Induced Changes in Morpho-Physiological and Biochemical Parameters in *Artemisia annua*. In: *Biologia Plantarum* 48 (2), S. 255–260. DOI: 10.1023/B:BIOP.0000033453.24705.f5.
- Kim, S. J.; Kim, W. T. (2013):** Suppression of Arabidopsis RING E3 ubiquitin ligase AtATL78 increases tolerance to cold stress and decreases tolerance to drought stress. In: *FEBS letters* 587 (16), S. 2584–2590. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.06.038.
- Kimura, S.; Hunter, K.; Vaahtera, L.; Tran, H. C.; Citterico, M.; Vaattovaara, A. et al. (2020):** CRK2 and C-terminal Phosphorylation of NADPH Oxidase RBOHD Regulate Reactive Oxygen Species Production in Arabidopsis. In: *The Plant cell* 32 (4), S. 1063–1080. DOI: 10.1105/tpc.19.00525.

- Knight, H.; Trewavas, A. J.; Knight, M. R. (1996):** Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. In: *The Plant cell* 8 (3), S. 489–503. DOI: 10.1105/tpc.8.3.489.
- Knight, H.; Trewavas, A. J.; Knight, M. R. (1997):** Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 12 (5), S. 1067–1078. DOI: 10.1046/j.1365-313x.1997.12051067.x.
- Knight, J. K.; Wood, W. B. (1998):** Gastrulation initiation in *Caenorhabditis elegans* requires the function of *gad-1*, which encodes a protein with WD repeats. In: *Developmental Biology* 198 (2), S. 253–265. DOI: 10.1016/S0012-1606(98)80003-1.
- Knopf, R. R.; Adam, Z. (2012):** Rhomboid proteases in plants - still in square one? In: *Physiol Plant* 145 (1), S. 41–51. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2011.01532.x.
- Kobae, Y.; Uemura, T.; Sato, M. H.; Ohnishi, M.; Mimura, T.; Nakagawa, T.; Maeshima, M. (2004):** Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. In: *Plant & cell physiology* 45 (12), S. 1749–1758. DOI: 10.1093/pcp/pci015.
- Koncz, C.; Schell, J. (1986):** The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. In: *Molec Gen Genet* 204 (3), S. 383–396. DOI: 10.1007/BF00331014.
- Korshunova, Y. O.; Eide, D.; Clark, W. G.; Guerinot, M. L.; Pakrasi, H. B. (1999):** The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. In: *Plant molecular biology* 40 (1), S. 37–44. DOI: 10.1023/A:1026438615520.
- Kováčik, J.; Bačkor, M. (2007):** Phenylalanine Ammonia-Lyase and Phenolic Compounds in Chamomile Tolerance to Cadmium and Copper Excess. In: *Water Air Soil Pollut* 185 (1-4), S. 185–193. DOI: 10.1007/s11270-007-9441-x.
- Kreuzwieser, J.; Hauberg, J.; Howell, K. A.; Carroll, A.; Rennenberg, H.; Millar, A. H.; Whelan, J. (2009):** Differential response of gray poplar leaves and roots underpins stress adaptation during hypoxia. In: *Plant physiology* 149 (1), S. 461–473. DOI: 10.1104/pp.108.125989.
- Küpper, H.; Šetlík, I.; Spiller, M.; Küpper, F. C.; Prášil, O. (2002):** Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation 1. In: *Journal of Phycology* 38 (3), S. 429–441. DOI: 10.1046/j.1529-8817.2002.01148.x.
- Lampert, D. T. (1963):** Oxygen fixation into hydroxyproline of plant cell wall protein. In: *The Journal of biological chemistry* 238, S. 1438–1440.
- Landa, P.; Prerostova, S.; Petrova, S.; Knirsch, V.; Vankova, R.; Vanek, T. (2015):** The Transcriptomic Response of *Arabidopsis thaliana* to Zinc Oxide: A Comparison of the Impact of Nanoparticle, Bulk, and Ionic Zinc. In: *Environmental science & technology* 49 (24), S. 14537–14545. DOI: 10.1021/acs.est.5b03330.
- Lanquar, V.; Grossmann, G.; Vinkenborg, J. L.; Merx, M.; Thomine, S.; Frommer, W. B. (2014):** Dynamic imaging of cytosolic zinc in *Arabidopsis* roots combining FRET sensors and RootChip technology. In: *New Phytologist* 202 (1), S. 198–208. DOI: 10.1111/nph.12652.
- Lee, J.; Terzaghi, W.; Gusmaroli, G.; Charron, J. F.; Yoon, H.; Chen, H. et al. (2008):** Characterization of *Arabidopsis* and rice DWD proteins and their roles as substrate receptors for CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. In: *The Plant cell* 20 (1), S. 152–167. DOI: 10.1105/tpc.107.055418.

- Lee, J.; Yoon, H.; Terzaghi, W.; Martinez, C.; Dai, M.; Li, J. et al. (2010):** DWA1 and DWA2, two Arabidopsis DWD protein components of CUL4-based E3 ligases, act together as negative regulators in ABA signal transduction. In: *The Plant cell* 22 (6), S. 1716–1732. DOI: 10.1105/tpc.109.073783.
- Lee, J.; Zhou, P. (2007):** DCAFs, the missing link of the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase. In: *Molecular cell* 26 (6), S. 775–780. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.06.001.
- Lee, S. M.; Kim, H. S.; Han, H. J.; Moon, B. C.; Kim, C. Y.; Harper, J. F.; Chung, W. S. (2007):** Identification of a calmodulin-regulated autoinhibited Ca²⁺-ATPase (ACA11) that is localized to vacuole membranes in Arabidopsis. In: *FEBS letters* 581 (21), S. 3943–3949. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.07.023.
- Li, F.; Goto, D. B.; Zaratiegui, M.I.; Tang, X.; Martienssen, R.; Cande, W. Z. (2005):** Two novel proteins, dos1 and dos2, interact with rik1 to regulate heterochromatic RNA interference and histone modification. In: *Current Biology* 15 (16), S. 1448–1457. DOI: 10.1016/j.cub.2005.07.021.
- Li, L.; He, Z.; Pandey, G. K.; Tsuchiya, T.; Luan, S. (2002):** Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (7), S. 5360–5368. DOI: 10.1074/jbc.M108777200.
- Liang, H.; Yao, N.; Song, J. T.; Luo, S.; Lu, H.; Greenberg, J. T. (2003):** Ceramides modulate programmed cell death in plants. In: *Genes & development* 17 (21), S. 2636–2641. DOI: 10.1101/gad.1140503.
- Licausi, F.; Kosmacz, M.; Weits, D. A.; Giuntoli, B.; Giorgi, F. M.; Voesenek, L. A. C. J. et al. (2011a):** Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. In: *Nature* 479 (7373), S. 419–422. DOI: 10.1038/nature10536.
- Licausi, F.; Weits, D. A.; Pant, B. D.; Scheible, W.-R.; Geigenberger, P.; van Dongen, J. T. (2011b):** Hypoxia responsive gene expression is mediated by various subsets of transcription factors and miRNAs that are determined by the actual oxygen availability. In: *New Phytologist* 190 (2), S. 442–456. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2010.03451.x.
- Lin, J.; Yu, L.; Xiang, C. (2019):** ARABIDOPSIS NITRATE REGULATED 1 acts as a negative modulator of seed germination by activating ABI3 expression.
- Lin, Y.; Aarts, M. G. M. (2012):** The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69 (19), S. 3187–3206. DOI: 10.1007/s00018-012-1089-z.
- Lindsay, W. L. (1972):** Zinc in Soils and Plant Nutrition. In: *Zinc in Soils and Plant Nutrition*, Bd. 24: Elsevier (Advances in Agronomy), S. 147–186.
- Liu, Q.; Le, L.; Zheng, L. (2018):** Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants. In: *International journal of molecular sciences* 19 (2). DOI: 10.3390/ijms19020335.
- Liu, S.; Yang, R.; Liu, M.; Zhang, S.; Yan, K.; Yang, G. et al. (2020):** PLATZ2 negatively regulates salt tolerance in Arabidopsis seedlings by directly suppressing the expression of the CBL4/SOS3 and CBL10/SCaBP8 genes. In: *Journal of experimental botany* 71 (18), S. 5589–5602. DOI: 10.1093/jxb/eraa259.
- Liu, X.; An, J.; Han, H. J.; Kim, S. H.; Lim, C. O.; Yun, D.; Chung, W. S. (2014):** ZAT11, a zinc finger transcription factor, is a negative regulator of nickel ion tolerance in Arabidopsis. In: *Plant cell reports* 33 (12), S. 2015–2021. DOI: 10.1007/s00299-014-1675-7.

- Liu, X. S.; Feng, S. J.; Zhang, B. Q.; Wang, M. Q.; Cao, H. W.; Rono, J. K. et al. (2019):** OsZIP1 functions as a metal efflux transporter limiting excess zinc, copper and cadmium accumulation in rice. In: *BMC plant biology* 19 (1), S. 283. DOI: 10.1186/s12870-019-1899-3.
- Liu, Y.; Tabata, D.; Imai, R. (2016):** A Cold-Inducible DEAD-Box RNA Helicase from *Arabidopsis thaliana* Regulates Plant Growth and Development under Low Temperature. In: *PloS one* 11 (4), e0154040. DOI: 10.1371/journal.pone.0154040.
- Lu, P.; Magwanga, R. O.; Kirungu, J. N.; Hu, Y.; Dong, Q.; Cai, X. et al. (2019):** Overexpression of Cotton a DTX/MATE Gene Enhances Drought, Salt, and Cold Stress Tolerance in Transgenic Arabidopsis. In: *Frontiers in plant science* 10, S. 299. DOI: 10.3389/fpls.2019.00299.
- Mahalingam, R.; Gomez-Buitrago, A.a; Eckardt, N.; Shah, N.; Guevara-Garcia, A.; Day, P. et al. (2003):** Characterizing the stress/defense transcriptome of Arabidopsis. In: *Genome biology* 4 (3), R20. DOI: 10.1186/gb-2003-4-3-r20.
- Marrs, K. A. (1996):** The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. In: *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 47, S. 127–158. DOI: 10.1146/annurev.arplant.47.1.127.
- McAinsh, M. R.; Pittman, J. K. (2009):** Shaping the calcium signature. In: *The New phytologist* 181 (2), S. 275–294. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02682.x.
- McCormack, E.; Braam, J. (2003):** Calmodulins and related potential calcium sensors of Arabidopsis. In: *New Phytologist* 159 (3), S. 585–598. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2003.00845.x.
- Mitsutake, S.; Igarashi, Y. (2005):** Calmodulin is involved in the Ca²⁺-dependent activation of ceramide kinase as a calcium sensor. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (49), S. 40436–40441. DOI: 10.1074/jbc.M501962200.
- Miyawaki, A.; Griesbeck, O.; Heim, R.; Tsien, R. Y. (1999):** Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (5), S. 2135–2140. DOI: 10.1073/pnas.96.5.2135.
- Mustroph, A.; Zanetti, M. .; Jang, C. J. H.; Holtan, H. E.; Repetti, P. P.; Galbraith, D. W. et al. (2009):** Profiling translatoemes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in Arabidopsis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (44), S. 18843–18848. DOI: 10.1073/pnas.0906131106.
- Nardoza, S.; Boldingh, H. L.; Kashuba, M. P.; Feil, R.; Jones, D.; Thrimawithana, A. H. et al. (2020):** Carbon starvation reduces carbohydrate and anthocyanin accumulation in red-fleshed fruit via trehalose 6-phosphate and MYB27. In: *Plant, cell & environment* 43 (4), S. 819–835. DOI: 10.1111/pce.13699.
- Nawrath, C.; Métraux, J. P. (1999):** Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. In: *The Plant cell* 11 (8), S. 1393–1404. DOI: 10.1105/tpc.11.8.1393.
- Nelson, B. K.; Cai, X.; Nebenführ, A. (2007):** A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 51 (6), S. 1126–1136. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03212.x.
- Nezames, C. D.; Sjogren, C. A.; Barajas, J. F.; Larsen, P. B. (2012):** The Arabidopsis cell cycle checkpoint regulators TANMEI/ALT2 and ATR mediate the active process of aluminum-dependent root growth inhibition. In: *The Plant cell* 24 (2), S. 608–621. DOI: 10.1105/tpc.112.095596.

- Nianiou-Obeidat, I.; Madesis, P.; Kissoudis, C.; Voulgari, G.; Chronopoulou, E.; Tsaftaris, A.; Labrou, N. E. (2017):** Plant glutathione transferase-mediated stress tolerance: functions and biotechnological applications. In: *Plant cell reports* 36 (6), S. 791–805. DOI: 10.1007/s00299-017-2139-7.
- Nobuta, K.; Okrent, R. A.; Stoutemyer, M.; Rodibaugh, N.; Kempema, L.; Wildermuth, M. C.; Innes, R. W. (2007):** The GH3 acyl adenylase family member PBS3 regulates salicylic acid-dependent defense responses in Arabidopsis. In: *Plant physiology* 144 (2), S. 1144–1156. DOI: 10.1104/pp.107.097691.
- Ohta, M.; Matsui, K.; Hiratsu, K.; Shinshi, H.; Ohme-Takagi, M. (2001):** Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. In: *The Plant cell* 13 (8), S. 1959–1968. DOI: 10.1105/TPC.010127.
- Opdenakker, K.; Remans, T.; Keunen, E.; Vangronsveld, J.; Cuypers, A. (2012):** Exposure of *Arabidopsis thaliana* to Cd or Cu excess leads to oxidative stress mediated alterations in MAPKinase transcript levels. In: *Environmental and Experimental Botany* 83, S. 53–61. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2012.04.003.
- Osato, Y.; Yokoyama, R.; Nishitani, K. (2006):** A principal role for AtXTH18 in *Arabidopsis thaliana* root growth: a functional analysis using RNAi plants. In: *Journal of plant research* 119 (2), S. 153–162. DOI: 10.1007/s10265-006-0262-6.
- Paracelsus:** Septem Defensiones. Die dritte Defension wegen des Schreibens der neuen Rezepte 1538.
- Pata, M. O.; Hannun, Y. A.; Ng, C. K-Y (2010):** Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. In: *The New phytologist* 185 (3), S. 611–630. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.03123.x.
- Pottosin, I. I.; Schönknecht, G. (2007):** Vacuolar calcium channels. In: *Journal of experimental botany* 58 (7), S. 1559–1569. DOI: 10.1093/jxb/erm035.
- Qudeimat, E.; Faltusz, A. M. C.; Wheeler, G.; Lang, D.; Holtorf, H.; Brownlee, C. et al. (2008):** A PIIB-type Ca²⁺-ATPase is essential for stress adaptation in *Physcomitrella patens*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (49), S. 19555–19560. DOI: 10.1073/pnas.0800864105.
- Reddy, A. S. N.; Ali, G. S.; Celesnik, H.; Day, I. S. (2011):** Coping with stresses: roles of calcium- and calcium/calmodulin-regulated gene expression. In: *The Plant cell* 23 (6), S. 2010–2032. DOI: 10.1105/tpc.111.084988.
- Remans, T.; Opdenakker, K.; Smeets, K.; Mathijsen, D.; Vangronsveld, J.; Cuypers, Ann (2010):** Metal-specific and NADPH oxidase dependent changes in lipoxygenase and NADPH oxidase gene expression in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium or excess copper. In: *Functional Plant Biol.* 37 (6), S. 532. DOI: 10.1071/FP09194.
- Rentel, M. C.; Knight, M. R. (2004):** Oxidative stress-induced calcium signaling in Arabidopsis. In: *Plant Physiol.* 135 (3), S. 1471–1479. DOI: 10.1104/pp.104.042663.
- Risseuw, E. P.; Daskalchuk, T. E.; Banks, T. W.; Liu, E.; Cotelesage, J.; Hellmann, H. et al. (2003):** Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from Arabidopsis. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 34 (6), S. 753–767. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2003.01768.x.
- Rogers, E. E.; Ausubel, F. M. (1997):** Arabidopsis enhanced disease susceptibility mutants exhibit enhanced susceptibility to several bacterial pathogens and alterations in PR-1 gene expression. In: *The Plant cell* 9 (3), S. 305–316. DOI: 10.1105/tpc.9.3.305.

- Rounds, Megan A.; Larsen, Paul B. (2008):** Aluminum-dependent root-growth inhibition in *Arabidopsis* results from AtATR-regulated cell-cycle arrest. In: *Current Biology* 18 (19), S. 1495–1500. DOI: 10.1016/j.cub.2008.08.050.
- Rovina, Philipp; Schanzer, Andrea; Graf, Christine; Mechtcheriakova, Diana; Jaritz, Markus; Bornancin, Frédéric (2009):** Subcellular localization of ceramide kinase and ceramide kinase-like protein requires interplay of their Pleckstrin Homology domain-containing N-terminal regions together with C-terminal domains. In: *Biochimica et biophysica acta* 1791 (10), S. 1023–1030. DOI: 10.1016/j.bbali.2009.05.009.
- Rutter, Guy A.; Chabosseau, Pauline; Bellomo, Elisa A.; Maret, Wolfgang; Mitchell, Ryan K.; Hodson, David J. et al. (2016):** Intracellular zinc in insulin secretion and action: a determinant of diabetes risk? In: *The Proceedings of the Nutrition Society* 75 (1), S. 61–72. DOI: 10.1017/S0029665115003237.
- Sakamoto, Hideki; Maruyama, Kyonoshin; Sakuma, Yoh; Meshi, Tetsuo; Iwabuchi, Masaki; Shinozaki, Kazuo; Yamaguchi-Shinozaki, Kazuko (2004):** *Arabidopsis* Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. In: *Plant physiology* 136 (1), S. 2734–2746. DOI: 10.1104/pp.104.046599.
- Sakamoto, Shingo; Kamimura, Naofumi; Tokue, Yosuke; Nakata, Miyuki T.; Yamamoto, Masanobu; Hu, Shi et al. (2020):** Identification of enzymatic genes with the potential to reduce biomass recalcitrance through lignin manipulation in *Arabidopsis*. In: *Biotechnology for biofuels* 13, S. 97. DOI: 10.1186/s13068-020-01736-6.
- Sánchez-Rangel, Diana; Rivas-San Vicente, Mariana; La Torre-Hernández, M. Eugenia de; Nájera-Martínez, Manuela; Plasencia, Javier (2015):** Deciphering the link between salicylic acid signaling and sphingolipid metabolism. In: *Frontiers in plant science* 6, S. 125. DOI: 10.3389/fpls.2015.00125.
- Schmid, Nicole B.; Giehl, Ricardo F. H.; Döll, Stefanie; Mock, Hans-Peter; Strehmel, Nadine; Scheel, Dierk et al. (2014):** Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase1-dependent coumarins mediate iron acquisition from alkaline substrates in *Arabidopsis*. In: *Plant Physiol.* 164 (1), S. 160–172. DOI: 10.1104/pp.113.228544.
- Scholz, Sandra S.; Vadassery, Jyothilakshmi; Heyer, Monika; Reichelt, Michael; Bender, Kyle W.; Snedden, Wayne A. et al. (2014):** Mutation of the *Arabidopsis* calmodulin-like protein CML37 deregulates the jasmonate pathway and enhances susceptibility to herbivory. In: *Molecular plant* 7 (12), S. 1712–1726. DOI: 10.1093/mp/ssu102.
- Schubert, Veit; Lermontova, Inna; Schubert, Ingo (2013):** The *Arabidopsis* CAP-D proteins are required for correct chromatin organisation, growth and fertility. In: *Chromosoma* 122 (6), S. 517–533. DOI: 10.1007/s00412-013-0424-y.
- Scrima, Andrea; Konícková, Renata; Czyzewski, Bryan K.; Kawasaki, Yusuke; Jeffrey, Philip D.; Groisman, Regina et al. (2008):** Structural basis of UV DNA-damage recognition by the DDB1-DDB2 complex. In: *Cell* 135 (7), S. 1213–1223. DOI: 10.1016/j.cell.2008.10.045.
- Seki, Motoaki; Ishida, Junko; Narusaka, Mari; Fujita, Miki; Nanjo, Tokihiko; Umezawa, Taishi et al. (2002):** Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. In: *Functional & integrative genomics* 2 (6), S. 282–291. DOI: 10.1007/s10142-002-0070-6.
- Semane, Brahim; Dupae, Joke; Cuyppers, Ann; Noben, Jean-Paul; Tuomainen, Marjo; Tervahauta, Arja et al. (2010):** Leaf proteome responses of *Arabidopsis thaliana* exposed to mild cadmium stress. In: *Journal of Plant Physiology* 167 (4), S. 247–254. DOI: 10.1016/j.jplph.2009.09.015.

- Seo, K.; Lee, J.; Nezames, C. D.; Zhong, S.; Song, E.; Byun, M.; Deng, X. (2014):** ABD1 is an Arabidopsis DCAF substrate receptor for CUL4-DDB1-based E3 ligases that acts as a negative regulator of abscisic acid signaling. In: *The Plant cell* 26 (2), S. 695–711. DOI: 10.1105/tpc.113.119974.
- Shapiro, A. D.; Zhang, C. (2001):** The Role of NDR1 in Avirulence Gene-Directed Signaling and Control of Programmed Cell Death in Arabidopsis. In: *Plant Physiol.* 127 (3), S. 1089–1101. DOI: 10.1104/pp.010096.
- Sharif, R.; Thomas, P.; Zalewski, P.; Fenech, M. (2012):** Zinc deficiency or excess within the physiological range increases genome instability and cytotoxicity, respectively, in human oral keratinocyte cells. In: *Genes & nutrition* 7 (2), S. 139–154. DOI: 10.1007/s12263-011-0248-4.
- Sharma, A.; Sidhu, G. Preet S.; Araniti, F.; Bali, A. S.; Shahzad, B.; Tripathi, D. K. et al. (2020):** The Role of Salicylic Acid in Plants Exposed to Heavy Metals. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (3). DOI: 10.3390/molecules25030540.
- Simanshu, D. K.; Zhai, X.; Munch, D.; Hofius, D.; Markham, J. E.; Bielawski, J. et al. (2014):** Arabidopsis accelerated cell death 11, ACD11, is a ceramide-1-phosphate transfer protein and intermediary regulator of phytoceramide levels. In: *Cell reports* 6 (2), S. 388–399. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.12.023.
- Sinclair, S. A.; Senger, T.; Talke, I. N.; Cobbett, C. S.; Haydon, M. J.; Krämer, U. (2018):** Systemic Upregulation of MTP2- and HMA2-Mediated Zn Partitioning to the Shoot Supplements Local Zn Deficiency Responses. In: *The Plant cell* 30 (10), S. 2463–2479. DOI: 10.1105/tpc.18.00207.
- Sinclair, S. A.; Krämer, U. (2012):** The zinc homeostasis network of land plants. In: *Biochimica et biophysica acta* 1823 (9), S. 1553–1567. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.05.016.
- Siwinska, J.; Siatkowska, K.; Olry, A.; Grosjean, J.; Hehn, A.; Bourgaud, F. et al. (2018):** Scopoletin 8-hydroxylase: a novel enzyme involved in coumarin biosynthesis and iron-deficiency responses in Arabidopsis. In: *Journal of experimental botany* 69 (7), S. 1735–1748. DOI: 10.1093/jxb/ery005.
- Skórzyńska-Polit, E.; Drążkiewicz, M.; Krupa, Z. (2010):** Lipid peroxidation and antioxidative response in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium and copper. In: *Acta Physiol Plant* 32 (1), S. 169–175. DOI: 10.1007/s11738-009-0393-1.
- Stemmer, M.; Thumberger, T.; Del Sol Keyer, M.; Wittbrodt, J.; Mateo, J. L. (2015):** CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. In: *PloS one* 10 (4), e0124633. DOI: 10.1371/journal.pone.0124633.
- Sugiura, M.; Kono, K.; Liu, H.; Shimizugawa, T.; Minekura, H.; Spiegel, S.; Kohama, T. (2002):** Ceramide kinase, a novel lipid kinase. Molecular cloning and functional characterization. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (26), S. 23294–23300. DOI: 10.1074/jbc.M201535200.
- Suzuki, N.; Mittler, R. (2006):** Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. In: *Physiol Plant* 126 (1), S. 45–51. DOI: 10.1111/j.0031-9317.2005.00582.x.
- Takagi, H.; Abe, A.; Yoshida, K.; Kosugi, S.; Natsume, S.; Mitsuoka, C. et al. (2013):** QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 74 (1), S. 174–183. DOI: 10.1111/tpj.12105.

- Tan, S.; Abas, M.; Verstraeten, I.; Glanc, M.; Molnár, G.; Hajný, J. et al. (2020):** Salicylic Acid Targets Protein Phosphatase 2A to Attenuate Growth in Plants. In: *Current biology : CB* 30 (3), 381-395.e8. DOI: 10.1016/j.cub.2019.11.058.
- Tang, Z.; Wang, H.; Zeng, M.; Liu, C.; Li, D. (2017):** DNA Repair Function and Mutation of an H2B Monoubiquitination Factor WDR70 in Ovarian Cancer. In: *Sichuan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Sichuan University. Medical science edition* 48 (5), S. 693–698.
- Tennstedt, P.; Peisker, D.; Böttcher, C.; Trampczynska, A.; Clemens, S. (2009):** Phytochelatin synthesis is essential for the detoxification of excess zinc and contributes significantly to the accumulation of zinc. In: *Plant physiology* 149 (2), S. 938–948. DOI: 10.1104/pp.108.127472.
- Thilmony, R.; Underwood, W.; He, S. Y. (2006):** Genome-wide transcriptional analysis of the *Arabidopsis thaliana* interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 46 (1), S. 34–53. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.02725.x.
- Vadassery, J.; Reichelt, M.; Hause, B.; Gershenzon, J.; Boland, W.; Mithöfer, A. (2012a):** CML42-mediated calcium signaling coordinates responses to *Spodoptera* herbivory and abiotic stresses in *Arabidopsis*. In: *Plant physiology* 159 (3), S. 1159–1175. DOI: 10.1104/pp.112.198150.
- Vadassery, J.; Scholz, S. S.; Mithöfer, A. (2012b):** Multiple calmodulin-like proteins in *Arabidopsis* are induced by insect-derived (*Spodoptera littoralis*) oral secretion. In: *Plant signaling & behavior* 7 (10), S. 1277–1280. DOI: 10.4161/psb.21664.
- van Baarlen, P.; Staats, M.; van Kan, J. A. L. (2004):** Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*. In: *Molecular plant pathology* 5 (6), S. 559–574. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2004.00253.x.
- van de Mortel, J. E.; Almar, J.; Laia, J.; Schat, H.; Kwekkeboom, J.; Coughlan, S.; Moerland, P. D. et al. (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*. In: *Plant physiology* 142 (3), S. 1127–1147. DOI: 10.1104/pp.106.082073.
- van der Luit, A. H.; Olivari, C.; Haley, A.; Knight, M. R.; Trewavas, A. J. (1999):** Distinct calcium signaling pathways regulate calmodulin gene expression in tobacco. In: *Plant physiology* 121 (3), S. 705–714. DOI: 10.1104/pp.121.3.705.
- van Nocker, S.; Ludwig, P. (2003):** The WD-repeat protein superfamily in *Arabidopsis*: conservation and divergence in structure and function. In: *BMC genomics* 4 (1), S. 50. DOI: 10.1186/1471-2164-4-50.
- van Oosten, M. J.; Sharkhuu, A.; Batelli, G.; Bressan, R. A.; Maggio, A. (2013):** The *Arabidopsis thaliana* mutant *air1* implicates SOS3 in the regulation of anthocyanins under salt stress. In: *Plant molecular biology* 83 (4-5), S. 405–415. DOI: 10.1007/s11103-013-0099-z.
- van Overloop, H.; Gijsbers, S.; van Veldhoven, P. P. (2006):** Further characterization of mammalian ceramide kinase: substrate delivery and (stereo)specificity, tissue distribution, and subcellular localization studies. In: *Journal of lipid research* 47 (2), S. 268–283. DOI: 10.1194/jlr.M500321-JLR200.
- Velázquez-Delgado, E. M.; Hardy, J. A. (2012):** Zinc-mediated allosteric inhibition of caspase-6. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (43), S. 36000–36011. DOI: 10.1074/jbc.M112.397752.
- Waese, J.; Fan, J.; Pasha, A.; Yu, H.; Fucile, G.; Shi, R. et al. (2017):** ePlant: Visualizing and Exploring Multiple Levels of Data for Hypothesis Generation in Plant Biology. In: *The Plant cell* 29 (8), S. 1806–1821. DOI: 10.1105/tpc.17.00073.

- Wang, G.; Seabolt, S.; Hamdoun, S.; Ng, G.; Park, J.; Lu, H. (2011):** Multiple roles of WIN3 in regulating disease resistance, cell death, and flowering time in *Arabidopsis*. In: *Plant physiology* 156 (3), S. 1508–1519. DOI: 10.1104/pp.111.176776.
- Wang, Ho.; JIN, J. (2007):** Effects of Zinc Deficiency and Drought on Plant Growth and Metabolism of Reactive Oxygen Species in Maize (*Zea mays L.*). In: *Agricultural Sciences in China* 6 (8), S. 988–995. DOI: 10.1016/S1671-2927(07)60138-2.
- Ward, J. M.; Pei, Z. M.; Schroeder, J. I. (1995):** Roles of Ion Channels in Initiation of Signal Transduction in Higher Plants. In: *The Plant cell* 7 (7), S. 833–844. DOI: 10.1105/tpc.7.7.833.
- Weber, M.; Beyene, B.; Nagler, N.; Herfert, J.; Schempp, S.; Klecker, M.; Clemens, S. (2020):** A mutation in the essential and widely conserved DAMAGED DNA BINDING1-Cullin4 ASSOCIATED FACTOR gene OZS3 causes hypersensitivity to zinc excess, cold and UV stress in *Arabidopsis thaliana*. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology*. DOI: 10.1111/tpj.14779.
- Weber, M.; Deinlein, U.; Fischer, S.; Rogowski, M.; Geimer, S.; Tenhaken, R.; Clemens, S. (2013):** A mutation in the *Arabidopsis thaliana* cell wall biosynthesis gene pectin methylesterase 3 as well as its aberrant expression cause hypersensitivity specifically to Zn. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 76 (1), S. 151–164. DOI: 10.1111/tpj.12279.
- Weber, M.; Harada, E.; Vess, C.; Roepenack-Lahaye, E. v.; 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. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 37 (2), S. 269–281. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2003.01960.x.
- Weidenbach, D.; Esch, L.; Möller, C.; Hensel, G.; Kumlehn, J.; Höfle, C. et al. (2016):** Polarized Defense Against Fungal Pathogens Is Mediated by the Jacalin-Related Lectin Domain of Modular Poaceae-Specific Proteins. In: *Molecular plant* 9 (4), S. 514–527. DOI: 10.1016/j.molp.2015.12.009.
- Weits, D. A.; Giuntoli, B.; Kosmacz, M.; Parlanti, S.; Hubberten, H.; Riegler, H. et al. (2014):** Plant cysteine oxidases control the oxygen-dependent branch of the N-end-rule pathway. In: *Nature communications* 5, S. 3425. DOI: 10.1038/ncomms4425.
- Wettstein, D. von; Gough, S.; Kannangara, C. G. (1995):** Chlorophyll Biosynthesis. In: *The Plant cell* 7 (7), S. 1039–1057. DOI: 10.1105/tpc.7.7.1039.
- Wildermuth, M. C.; Dewdney, J.; Wu, G.; Ausubel, F. M. (2001):** Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. In: *Nature* 414 (6863), S. 562–565. DOI: 10.1038/35107108.
- Xing, H.; Dong, L.; Wang, Z.; Zhang, H.; Han, C.; Liu, B. et al. (2014):** A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. In: *BMC plant biology* 14, S. 327. DOI: 10.1186/s12870-014-0327-y.
- Yadav, S. K. (2010):** Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants. In: *South African Journal of Botany* 76 (2), S. 167–179. DOI: 10.1016/j.sajb.2009.10.007.
- Yang, Y.; Yin, J.; Huang, L.; Li, J.; Chen, D.; Yao, N. (2019):** Salt Enhances Disease Resistance and Suppresses Cell Death in Ceramide Kinase Mutants. In: *Plant Physiol.* 181 (1), S. 319–331. DOI: 10.1104/pp.19.00613.
- Yang, Y.; Cheng, L.; Liu, Z. (2007):** Rapid effect of cadmium on lignin biosynthesis in soybean roots. In: *Plant Science* 172 (3), S. 632–639. DOI: 10.1016/j.plantsci.2006.11.018.

- Yoshiba, Y.; Aoki, C.; Iuchi, S.; Nanjo, T.; Seki, M.; Sekiguchi, F. et al. (2001):** Characterization of four extensin genes in *Arabidopsis thaliana* by differential gene expression under stress and non-stress conditions. In: *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 8 (3), S. 115–122. DOI: 10.1093/dnares/8.3.115.
- Zandalinas, S. I.; Song, L.; Sengupta, S.; McInturf, S. A.; Grant, D. G.; Marjault, H. et al. (2020):** Expression of a dominant-negative AtNEET-H89C protein disrupts iron-sulfur metabolism and iron homeostasis in *Arabidopsis*. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 101 (5), S. 1152–1169. DOI: 10.1111/tpj.14581.
- Zeng, M.; Ren, L.; Mizuno, K.; Nestoras, K.; Wang, H.; Tang, Z. et al. (2016):** CRL4(Wdr70) regulates H2B monoubiquitination and facilitates Exo1-dependent resection. In: *Nature communications* 7, S. 11364. DOI: 10.1038/ncomms11364.
- Zeng, M.; Tang, Z.; Guo, L.; Wang, X.; Liu, C. (2020):** Wdr70 regulates histone modification and genomic maintenance in fission yeast. In: *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 1867 (5), S. 118665. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2020.118665.
- Zhang, X.; Di Z.; Sun, W.; Wang, T. (2019):** The Adaptive Mechanism of Plants to Iron Deficiency via Iron Uptake, Transport, and Homeostasis. In: *International journal of molecular sciences* 20 (10). DOI: 10.3390/ijms20102424.
- Zhao, F.; Ma, Y.; Zhu, Y.; Tang, Z.; McGrath, S. P. (2015):** Soil contamination in China: current status and mitigation strategies. In: *Environmental science & technology* 49 (2), S. 750–759. DOI: 10.1021/es5047099.
- Zhu, X.; Wan, J. X.; Sun, Y.; Shi, Y. Z.; Braam, J.; Li, G. X.; Zheng, S. J. (2014):** Xyloglucan Endotransglucosylase-Hydrolase17 Interacts with Xyloglucan Endotransglucosylase-Hydrolase31 to Confer Xyloglucan Endotransglucosylase Action and Affect Aluminum Sensitivity in *Arabidopsis*. In: *Plant Physiol.* 165 (4), S. 1566–1574. DOI: 10.1104/pp.114.243790.
- Zhu, X.; Caplan, J.; Mamillapalli, P.; Czymmek, K.; Dinesh-Kumar, S. P. (2010):** Function of endoplasmic reticulum calcium ATPase in innate immunity-mediated programmed cell death. In: *The EMBO journal* 29 (5), S. 1007–1018. DOI: 10.1038/emboj.2009.402

5. Anhang

5.1 Tabellen

Tab. A1: Liste der verwendeten Primer.

| | Primer | Sequenz | Verwendungszweck |
|-----------------|-----------------------------------|---|---|
| Amplifikation | attB1_fw | ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggct | BP-Klonierung |
| | attB2_rev | ggggaccactttgtacaagaaagctgggt | |
| | ACD5-gds-g-fw | aaaaagcaggcttacgaatcaactggctttcaacatagg | |
| | ACD5-gds-T1-rev | gctgatctcagtcactacaacc | |
| | ACD5-gds-T2-fw | gcttagcagaaattgcgacatgac | |
| | ACD5-gds-g-rev | agaaagctgggttctcatcttagctgttaccgaactgt | |
| | ACD5-cds-fw | aaaaagcaggcttaatggaggaaggctgac | |
| | ACD5-cds-mS-rev | agaaagctgggtttatatctctggaccagatgcgaaca | |
| | ACD5-cds-oS-rev | agaaagctgggtttatctctggaccagatgcgaaca | |
| | CRISPR_P1-P2_fw | cgctcgatatcaccacgaagaaacc | CRISPR/Cas9 |
| | CRISPR_P1-P2_rev | ctctagctccagcactatcaacagc | |
| | ACD5-G412R-fw | gcctcattcgctgggtaattgg | <i>acd5-1</i> Mutation |
| ACD5-G412R-rev | cttactccgctatgtagggaagc | | |
| WD40-01-F | attgtaatgttcccagatccctt | CRISPR/Cas9 Zielsequenzen | |
| WD40-01-R | aaacaagggactcggaacatta | | |
| WD40-02-F | attggcgtccggttagatgacgg | | |
| WD40-02-F | aaaccgctcatctaaacggacgc | | |
| Genotypisierung | nahG_fw | gccttagcactggaactctg | Identifizierung von <i>acd5-2</i> x nahG Doppelmutanten |
| | nahG_rev | tcggtgaacagcacttgac | |
| | acd5-2_fw_neu | gatcatccctttagtagtgaagc | |
| | acd5-2-rev | gcaggataactttgctagtgggaag | |
| | LBa1 | tggttcacgtagtggccatcg | Identifizierung von <i>acd5-3</i> |
| | N668901-fw | ttgttctcgtcccaagtacttatgg | |
| | N668901-rev | ccaatctcattggttacatctcga | |
| | P1-5_fw | ttatgatgggaccaccgccaccgctacg | Identifizierung von CRISPR-Cas-Linien |
| | P1-5_rev | gctcaatggaatctggtaacgattctccacgt | |
| | P2-4_5_fw | agtttcgctcgatatacaccacgaagcatgctgat | |
| P2-4_5_rev | atcctcctcctcctccttgcgctccggttgcag | | |
| Km_NPTII_fw | tatgactgggcacaacagaca | | |
| Km_NPTII_rev | ttcagcaatatcagggtagc | | |
| Sequenzierung | BP_gds-Seq1_fw | caggtgtgatgtttcttgagatc | BP-Klonierung |
| | BP_gds-Seq2_fw | cataaatcctctagtataacgg | |
| | BP_gds-Seq3_fw | ccgaaactgagatcaaattctc | |
| | BP_gds-Seq4_fw | gttcaaccgcgggacaggtaac | |
| | BP_gds-Seq5_fw | gtgcatagtagtgaccaagt | |
| | BP_cds-Seq1_fw | gtggtaaaggaaatggctccaag | |

| | | | |
|--------------|---------------------|---------------------------|-------------------|
| | U6-26p-F | tgtccaggattagaatgattagc | |
| | irt1_diag1_rev | gctacgagcacaacatcacacg | IRT1 |
| | irt1_diag2_fw | ctagacatcaagctatgaaaagagg | |
| | irt1_diag3_fw | cacactggaagcaaacgagtaatc | |
| | irt1_diag4_fw | ccgagtcattgccatggttcg | |
| | irt1_diag5_fw | ggtttacgtctcgattctctatcgg | |
| | M13-(-20)-fw | gtaaacgacggccag | pGEM-T Klonierung |
| | M13-rev | caggaaacagctatgac | |
| | SP6 | atntagtgacactatagaa | |
| | T7-term | gctagttattgctcagcgg | |
| realtime PCR | QPCR-ACD5-1-fw | aagcttcctacatacgcgg | ACD5 |
| | QPCR-ACD5-1-rev | gtgcttgcaactgtccaacc | |
| | OZS3-5'-fw | ggaggacgaattggaaggtc | OZS3 |
| | OZS3-5'-rev | gctgtgaatggcttcagttg | |
| | q_PR1-F | gctcttgttcttcctcgaaag | PR1 |
| | q_PR1-R | gcctcttagttgtctgcgtagct | |
| | q_WIN3-F | cggtgtcactggttcaatgg | WIN3 |
| | q_WIN3-R | tcttcaggttgcacagagg | |
| | qAtIRT1-WoSCh-F | caccattcggaatagcgtagg | IRT1 |
| | qAtIRT1-WoSCh-R | ccagcggagcatgcatttag | |
| | qPCR_UBC9_f | tcacaattccaaggtgctgc | Referenz-Gene |
| | qPCR_UBC9_r | tcctctgggttggatccgt | |
| qPCR_PP2A_f | taactggccaaaatgatgc | | |
| qPCR_PP2A_r | gttctccacaaccgcttgg | | |

Tab. A2: GO-Term Analyse. GO-Terms der in Col-0 und *acd5-2* unter Zink-Stress induzierten Gene. Angegeben ist die x-fache Überrepräsentation, die „False Discovery Rate“ (FDR) = Falscherkennungsrate, die Anzahl der in diesem GO-Term induzierten Gene und die Gesamtanzahl der Gene des GO-Terms.

| GO-Term | x-fache Überrepräsentation | FDR | Anzahl induzierter Gene | Gesamtzahl der Gene im GO-Term |
|--|----------------------------|----------|-------------------------|--------------------------------|
| Col-0 unter Zink-Stress | | | | |
| zelluläre Eisen-Ionen-Homöostase | 55,04 | 1,28E-11 | 10 | 37 |
| Antwort auf Wasserstoffperoxid | 28,2 | 2,37E-08 | 9 | 65 |
| Transport von Übergangsmetallen | 20,37 | 1,58E-05 | 7 | 70 |
| Zelluläre Antwort auf Hypoxie | 20,37 | 1,27E-19 | 23 | 230 |
| Antwort auf Stress | 3,57 | 5,33E-14 | 51 | 2910 |
| Antwort auf Metallionen | 5,87 | 1,74E-04 | 12 | 416 |
| <i>acd5-2</i> unter Zink-Stress | | | | |
| zelluläre Eisen-Ionen-Homöostase | 23,95 | 3,41E-08 | 10 | 37 |
| Antwort auf Wasserstoffperoxid | 12,27 | 2,35E-05 | 9 | 65 |
| Transport von Übergangsmetallen | 10,13 | 3,21E-04 | 8 | 70 |
| Zelluläre Antwort auf Hypoxie | 16,95 | 1,21E-34 | 44 | 230 |
| Antwort auf Stress | 3,08 | 1,08E-22 | 101 | 2910 |
| Antwort auf Salzstress | 4 | 9,34E-05 | 19 | 421 |
| Antwort auf Chitin | 6,52 | 6,55E-04 | 10 | 136 |

Tab. A3: Kandidaten-Gene aus der QTL-Seq-Analyse-Methode. Aufgelistet sind die fünf Gene, welche nach der QTL-Seq-Analyse-Methode zu der gesteigerten Zink-Toleranz führen könnten.

| Position [Mbp] | Mutations-Index LP | Mutations-Index KP | ΔMutations-Index | AS-Austausch | bp-Austausch | Gen | Auswirkung der Mutation |
|----------------|--------------------|--------------------|------------------|--------------|--------------|----------------------------------|---------------------------------|
| 18.47 | 0,94 | 0,38 | 0,56 | G -> R | C -> T | AT3G49800 BSD-Domänen-Protein | Mutation einer konservierten AS |
| 20.21 | 0,86 | 0,44 | 0,42 | T -> I | C -> T | AT3G54590 EXT2 | tolerierbar laut SIFT-Analyse |
| 21.12 | 0,86 | 0,23 | 0,63 | E -> K | C -> T | AT3G57060 | tolerierbar laut SIFT-Analyse |
| 21.21 | 0,84 | 0,20 | 0,64 | STOP-Codon | C -> T | AT3G57330 ACA11 | Verkürzung von 1025 auf 105 AS |
| 22.02 | 0,91 | 0,45 | 0,46 | STOP-Codon | C -> T | AT3G59610 F-Box Protein | Verkürzung von 521 auf 455 AS |

Tab. A4: Differentiell exprimierte Gene in Col-0 unter Zink-Stress. Gezeigt sind in Col-0 induzierten und reprimierten Gene unter Zink-Stress. Lila markiert sind Gene, die in *acd5-2* ebenfalls differentiell exprimiert sind.

| Induzierte Gene | | | Reprimierte Gene | | |
|-----------------|----------|--------------------------------|------------------|----------|--------------------------------|
| AGI-Code | Gen | Differentielle Expression Log2 | AGI-Code | Gen | Differentielle Expression Log2 |
| AT2G14247 | | 3,202755708 | AT1G05300 | ZIP5 | -4,069649787 |
| AT2G36800 | DOGT1 | 3,146307048 | AT5G01600 | FER1 | -3,469727792 |
| AT3G56980 | bHLH39 | 3,002500405 | AT1G60960 | IRT3 | -3,454895693 |
| AT1G13609 | | 2,982118152 | AT2G32270 | ZIP3 | -3,106314941 |
| AT3G58060 | | 2,9438089 | AT2G40300 | FER4 | -2,909280011 |
| AT1G53540 | | 2,893583973 | AT1G78230 | | -2,791929095 |
| AT1G47395 | | 2,891977263 | AT1G21140 | | -2,556145861 |
| AT1G47400 | | 2,86378325 | AT3G25190 | | -2,28050811 |
| AT3G56970 | bHLH38 | 2,852741763 | AT2G36885 | | -1,995308319 |
| AT4G19680 | IRT2 | 2,735074788 | AT4G11393 | | -1,82650254 |
| AT2G30760 | | 2,638355067 | AT1G68650 | | -1,788833644 |
| AT3G61930 | | 2,634733233 | AT3G56090 | FER3 | -1,77234641 |
| AT2G30766 | | 2,581870891 | AT3G43670 | | -1,673164307 |
| AT3G12820 | MYB10 | 2,533508303 | AT1G58290 | HEMA1 | -1,672111649 |
| AT1G23020 | FRO3 | 2,533496405 | AT1G10970 | ZIP4 | -1,62428898 |
| AT5G53450 | ORG1 | 2,52631403 | AT3G11050 | FER2 | -1,623301204 |
| AT5G52940 | | 2,461617891 | AT4G25010 | SWEET14 | -1,598795015 |
| AT5G04150 | BHLH101 | 2,444983452 | AT3G47710 | BNQ3 | -1,542717538 |
| AT2G21640 | | 2,441933055 | AT4G04770 | ABC18 | -1,525675773 |
| AT2G04050 | | 2,426562952 | AT3G59930 | | -1,498870672 |
| AT1G01580 | FRO2 | 2,388741936 | AT3G49160 | | -1,459474066 |
| AT2G35850 | | 2,304140558 | AT5G33355 | | -1,445876615 |
| AT4G16370 | OPT3 | 2,303028417 | AT1G76800 | | -1,400772034 |
| AT3G10040 | | 2,239516325 | AT4G25100 | FSD1 | -1,350425301 |
| AT3G07720 | | 2,235015843 | AT3G22231 | PCC1 | -1,278316442 |
| AT4G19370 | | 2,224830036 | AT4G08390 | SAPX | -1,253102817 |
| AT3G58810 | MTPA2 | 2,202356772 | AT1G74490 | | -1,231417394 |
| AT5G05250 | | 2,188296843 | AT1G14550 | | -1,182645344 |
| AT1G34760 | GRF11 | 2,172463502 | AT5G40510 | | -1,17539645 |
| AT5G38820 | | 2,171524026 | AT4G01890 | | -1,165516581 |
| AT5G12030 | HSP17,6A | 2,170996141 | AT2G35980 | YLS9 | -1,156669901 |
| AT5G02780 | GSTL1 | 2,169187142 | AT1G69050 | | -1,130544609 |
| AT3G46230 | HSP17,4 | 2,095652693 | AT2G46650 | CB5-C | -1,128693803 |
| AT4G09110 | | 2,086153796 | AT2G28270 | | -1,12551438 |
| AT5G67370 | CGLD27 | 2,047344749 | AT4G13250 | NYC1 | -1,111992821 |
| AT4G10270 | | 2,037921521 | AT5G20710 | BGAL7 | -1,063292083 |
| AT1G74770 | | 2,007937828 | AT3G23170 | | -1,015270537 |
| AT1G49570 | | 1,960058352 | AT1G11460 | UMAMIT26 | -1,008735553 |
| AT2G20800 | NDB4 | 1,956602417 | AT4G01430 | UMAMIT29 | -1,001457922 |
| AT5G15120 | | 1,924777148 | | | |

| | | |
|-----------|-----------|-------------|
| AT4G19690 | IRT1 | 1,829813421 |
| AT3G02550 | LBD41 | 1,81525198 |
| AT5G13740 | ZIF1 | 1,810349459 |
| AT3G60140 | DIN2 | 1,793784556 |
| AT5G39670 | | 1,763180761 |
| AT1G77120 | ADH1 | 1,709698083 |
| AT1G14185 | | 1,707584587 |
| AT2G47520 | ERF71 | 1,705416761 |
| AT5G45070 | PP2-A8 | 1,649107003 |
| AT3G51860 | CAX3 | 1,619580062 |
| AT4G17680 | | 1,597884029 |
| AT1G12030 | | 1,594479414 |
| AT5G24640 | | 1,535096105 |
| AT5G37820 | NIP4;2 | 1,501177286 |
| AT1G52120 | | 1,496617267 |
| AT3G12900 | | 1,485832277 |
| AT5G26220 | | 1,479054677 |
| AT4G12735 | | 1,473716215 |
| AT2G42065 | | 1,466245114 |
| AT2G28815 | | 1,463912067 |
| AT2G25735 | | 1,446388518 |
| AT1G19530 | | 1,445153008 |
| AT4G33560 | | 1,438759848 |
| AT2G16060 | HB1 | 1,434571854 |
| AT2G41730 | | 1,429276448 |
| AT2G34390 | NIP2;1 | 1,428512319 |
| AT2G41100 | TCH3 | 1,427775927 |
| AT2G18193 | | 1,412332049 |
| AT3G50930 | BCS1 | 1,412243036 |
| AT5G12020 | HSP17,6II | 1,407081618 |
| AT3G18290 | BTS | 1,380576764 |
| AT1G73120 | | 1,368329551 |
| AT2G41240 | BHLH100 | 1,362968211 |
| AT3G02480 | | 1,357306752 |
| AT1G56160 | MYB72 | 1,349048162 |
| AT1G53635 | | 1,329811342 |
| AT2G41105 | | 1,304143406 |
| AT5G47910 | RBOHD | 1,294877562 |
| AT1G56430 | NAS4 | 1,294749567 |
| AT1G09560 | GLP5 | 1,283206436 |
| AT5G52930 | | 1,281641698 |
| AT2G42750 | | 1,279496669 |
| AT1G62420 | | 1,277367421 |
| AT2G26740 | SEH | 1,271242687 |
| AT3G54530 | | 1,251064452 |
| AT5G40590 | | 1,24421464 |
| AT3G56360 | | 1,236314496 |

| | | |
|-----------|-----------|-------------|
| AT5G42380 | CML37 | 1,228145813 |
| AT1G09790 | COBL6 | 1,220989888 |
| AT1G07400 | | 1,218913055 |
| AT5G39890 | | 1,21075255 |
| AT3G27220 | | 1,203577104 |
| AT1G30560 | G3Pp3 | 1,187956642 |
| AT3G47640 | PYE | 1,185986362 |
| AT1G32870 | NAC13 | 1,182071559 |
| AT4G10250 | ATHSP22,0 | 1,179164115 |
| AT4G30120 | HMA3 | 1,178530732 |
| AT4G13300 | TPS13 | 1,177337651 |
| AT3G50740 | UGT72E1 | 1,173139987 |
| AT4G31940 | CYP82C4 | 1,162557459 |
| AT3G29000 | | 1,151101034 |
| AT3G06890 | | 1,133307096 |
| AT3G13610 | | 1,128604726 |
| AT3G61410 | | 1,121016676 |
| AT2G03230 | | 1,118932301 |
| AT4G13310 | CYP71A20 | 1,113717273 |
| AT4G21490 | NDB3 | 1,109148997 |
| AT4G34950 | | 1,107761611 |
| AT3G01600 | NAC044 | 1,101713402 |
| AT2G03760 | SOT12 | 1,093258856 |
| AT5G23660 | SWEET12 | 1,087602409 |
| AT2G38823 | | 1,083347746 |
| AT5G67330 | NRAMP4 | 1,072447499 |
| AT1G13480 | | 1,065700588 |
| AT4G31330 | | 1,06391277 |
| AT1G21890 | UMAMIT19 | 1,057142229 |
| AT5G03570 | IREG2 | 1,056343076 |
| AT3G25855 | | 1,042941248 |
| AT3G27580 | ATPK7 | 1,039490767 |
| AT1G52130 | | 1,037470884 |
| AT4G13390 | EXT12 | 1,037262928 |
| AT1G60750 | | 1,03340786 |
| AT4G34510 | KCS17 | 1,027152589 |
| AT1G05680 | UGT74E2 | 1,022174017 |
| AT5G13210 | | 1,016284302 |
| AT1G07135 | | 1,015502291 |
| AT4G27450 | | 1,009096683 |
| AT1G75290 | | 1,000309581 |

Tab. A5: Differenziell exprimierte Gene in *acd5-2* unter Zink-Stress. Gezeigt sind die in *acd5-2* induzierten und reprimierten Gene unter Zink-Stress. Lila markiert sind Gene, die in Col-0 ebenfalls differenziell exprimiert sind.

| Induzierte Gene | | | Reprimierte Gene | | |
|-----------------|---------|--------------------------------|------------------|-----------|--------------------------------|
| AGI-Code | Gen | Differenzielle Expression Log2 | AGI-Code | Gen | Differenzielle Expression Log2 |
| AT2G36800 | DOGT1 | 4,456891924 | AT1G05300 | ZIP5 | -4,190614199 |
| AT1G47395 | | 4,075300651 | AT5G01600 | FER1 | -3,96179056 |
| AT1G13609 | | 3,996884311 | AT2G32270 | ZIP3 | -3,78940056 |
| AT2G30766 | | 3,890630909 | AT1G21140 | | -3,732898702 |
| AT1G47400 | | 3,756966682 | AT1G60960 | IRT3 | -3,222430265 |
| AT4G21490 | NDB3 | 3,649313639 | AT2G40300 | FER4 | -2,953358257 |
| AT5G52940 | | 3,637502034 | AT4G25010 | SWEET14 | -2,777584972 |
| AT5G52930 | | 3,41972291 | AT2G36885 | | -2,412629557 |
| AT2G30760 | | 3,415532933 | AT4G01430 | UMAMIT29 | -2,242962679 |
| AT2G14247 | | 3,409255143 | AT5G65690 | PCK2 | -2,172214376 |
| AT2G44460 | BGLU28 | 3,302959186 | AT3G49960 | | -2,071813875 |
| AT1G33055 | | 3,182372717 | AT3G56090 | FER3 | -2,064822434 |
| AT1G19530 | | 3,112454916 | AT3G11050 | FER2 | -1,973871829 |
| AT3G56980 | bHLH39 | 3,034221924 | AT1G10970 | ZIP4 | -1,95601452 |
| AT1G23020 | FRO3 | 3,017150074 | AT5G44130 | FLA13 | -1,946435802 |
| AT1G77120 | ADH1 | 2,976509965 | AT3G25190 | | -1,867931202 |
| AT3G12820 | MYB10 | 2,975605078 | AT1G58290 | HEMA1 | -1,851926533 |
| AT3G46230 | HSP17,4 | 2,972310702 | AT4G08390 | SAPX | -1,848042559 |
| AT2G28815 | | 2,969757522 | AT4G11020 | | -1,843296835 |
| AT3G56970 | bHLH38 | 2,917773374 | AT3G59930 | | -1,817185692 |
| AT3G58060 | | 2,904460314 | AT5G40510 | | -1,815634429 |
| AT5G05250 | | 2,827753949 | AT1G68650 | | -1,805456587 |
| AT5G53450 | ORG1 | 2,802133865 | AT4G11393 | | -1,793019042 |
| AT4G09110 | | 2,777243108 | AT1G14550 | | -1,747958186 |
| AT4G27450 | | 2,76827625 | AT4G04770 | ABC18 | -1,736308323 |
| AT1G12030 | | 2,716772197 | AT4G01890 | | -1,712930804 |
| AT3G58150 | | 2,685908884 | AT4G20240 | CYP71A27 | -1,704902484 |
| AT2G41240 | BHLH100 | 2,685785032 | AT3G16240 | DELTA-TIP | -1,699397223 |
| AT4G19680 | IRT2 | 2,650562968 | AT5G33355 | | -1,699134469 |
| AT3G46090 | ZAT7 | 2,621264774 | AT1G11460 | UMAMIT26 | -1,693842205 |
| AT1G01580 | FRO2 | 2,583533058 | AT1G78230 | | -1,693298059 |
| AT2G21640 | | 2,551892322 | AT4G11210 | | -1,666326488 |
| AT4G19370 | | 2,541459915 | AT3G47710 | BNQ3 | -1,623073904 |
| AT5G04150 | BHLH101 | 2,493238892 | AT1G05250 | | -1,6190375 |
| AT4G15990 | | 2,491631766 | AT2G25680 | MOT1 | -1,604451623 |
| AT1G62420 | | 2,441178767 | AT3G54830 | | -1,56245533 |
| AT2G03130 | | 2,43577319 | AT1G76240 | | -1,557399776 |
| AT5G67370 | CGLD27 | 2,416076113 | AT1G23160 | | -1,556467361 |
| AT4G16370 | OPT3 | 2,409782756 | AT1G05240 | | -1,551708515 |
| AT3G10040 | | 2,407338857 | AT3G18000 | XPL1 | -1,517544434 |
| AT5G13740 | ZIF1 | 2,388319703 | AT4G11190 | | -1,491394266 |

| | | | | | |
|-----------|----------|-------------|-----------|---------|--------------|
| AT4G10270 | | 2,360705813 | AT1G78860 | | -1,476987216 |
| AT3G02550 | LBD41 | 2,305732102 | AT3G23730 | XTH16 | -1,475276904 |
| AT3G48740 | SWEET11 | 2,305662737 | AT1G65900 | | -1,465992938 |
| AT1G80440 | | 2,304090572 | AT1G71050 | HIPP20 | -1,458123423 |
| AT5G15120 | | 2,276958759 | AT5G65800 | ACS5 | -1,423765611 |
| AT2G16060 | HB1 | 2,267323172 | AT1G74490 | | -1,407565097 |
| AT3G58810 | MTPA2 | 2,257083825 | AT4G25250 | | -1,380062421 |
| AT5G53190 | SWEET3 | 2,149226721 | AT2G46650 | CB5-C | -1,37778533 |
| AT1G34760 | GRF11 | 2,136807755 | AT4G37540 | LBD39 | -1,364688289 |
| AT5G24640 | | 2,09503486 | AT3G45080 | | -1,364037339 |
| AT1G53540 | | 2,092681468 | AT4G25100 | FSD1 | -1,348156777 |
| AT2G34390 | NIP2;1 | 2,087727273 | AT2G29750 | UGT71C1 | -1,342231297 |
| AT5G54550 | | 2,079111377 | AT1G05650 | | -1,340997032 |
| AT2G36790 | UGT73C6 | 2,036956417 | AT5G01740 | | -1,338656547 |
| AT2G41100 | TCH3 | 2,009044839 | AT1G65310 | XTH17 | -1,333551577 |
| AT1G01680 | PUB54 | 1,986649024 | AT3G20510 | | -1,332133811 |
| AT4G13310 | CYP71A20 | 1,984798366 | AT1G07890 | APX1 | -1,33026765 |
| AT5G09570 | | 1,984118818 | AT5G11420 | | -1,325892997 |
| AT2G03230 | | 1,983932038 | AT1G09750 | | -1,30757179 |
| AT3G22910 | | 1,956876903 | AT3G06020 | FAF4 | -1,292138217 |
| AT5G49450 | bZIP1 | 1,938416397 | AT2G31310 | LBD14 | -1,285319997 |
| AT5G42380 | CML37 | 1,936672363 | AT2G15620 | NIR1 | -1,268676485 |
| AT5G40010 | AATP1 | 1,92881444 | AT3G22231 | PCC1 | -1,268288871 |
| AT5G26220 | | 1,895842564 | AT4G38400 | EXLA2 | -1,265667084 |
| AT1G56160 | MYB72 | 1,886613006 | AT4G33790 | CER4 | -1,254704833 |
| AT1G05340 | | 1,881277928 | AT3G58850 | PAR2 | -1,236995759 |
| AT5G38820 | | 1,878224956 | AT3G18450 | | -1,227560032 |
| AT2G41105 | | 1,868138651 | AT1G14960 | | -1,225171571 |
| AT4G31370 | FLA5 | 1,856317954 | AT1G18140 | LAC1 | -1,223632455 |
| AT1G14185 | | 1,847638843 | AT3G28750 | | -1,216323495 |
| AT3G61930 | | 1,846775453 | AT5G04590 | SIR | -1,199824068 |
| AT4G19690 | IRT1 | 1,84208228 | AT1G76800 | | -1,198807597 |
| AT2G44130 | | 1,832159348 | AT4G32690 | GLB3 | -1,190570169 |
| AT5G10040 | | 1,821926592 | AT5G50800 | SWEET13 | -1,187789727 |
| AT1G64660 | MGL | 1,817976176 | AT5G53250 | AGP22 | -1,182775776 |
| AT3G45730 | | 1,813475277 | AT1G16390 | OCT3 | -1,181081786 |
| AT1G22710 | SUC2 | 1,7636412 | AT3G12750 | ZIP1 | -1,175684672 |
| AT2G17850 | | 1,75899251 | AT1G04330 | | -1,171146703 |
| AT1G52120 | | 1,745677102 | AT5G52260 | MYB19 | -1,170293229 |
| AT1G13480 | | 1,737307171 | AT5G24880 | | -1,160304035 |
| AT5G12030 | HSP17,6A | 1,734870119 | AT5G20710 | BGAL7 | -1,155848594 |
| AT5G02780 | GSTL1 | 1,729934122 | AT4G28250 | EXPB3 | -1,151728569 |
| AT1G23730 | BCA3 | 1,725671868 | AT4G34740 | ASE2 | -1,149145823 |
| AT4G39675 | | 1,72179245 | AT5G62670 | HA11 | -1,146418815 |
| AT1G52130 | | 1,720363453 | AT5G59240 | | -1,145048711 |
| AT2G47520 | ERF71 | 1,714540608 | AT5G36150 | PEN3 | -1,133161997 |
| AT2G21900 | WRKY59 | 1,712825989 | AT2G38920 | | -1,118911277 |

| | | | | | |
|-----------|-----------|-------------|-----------|----------|--------------|
| AT3G07720 | | 1,709709496 | AT5G22390 | | -1,110732924 |
| AT4G37030 | | 1,704528164 | AT2G25160 | CYP82F1 | -1,108040247 |
| AT2G25735 | | 1,697995698 | AT5G45410 | | -1,106825581 |
| AT3G55090 | ABCG16 | 1,694871094 | AT4G00670 | | -1,104732488 |
| AT2G33830 | | 1,691506261 | AT5G26930 | GATA23 | -1,104138714 |
| AT1G66090 | | 1,689454781 | AT4G23070 | RBL7 | -1,099550242 |
| AT1G07400 | | 1,685841814 | AT5G27200 | ACP5 | -1,098399918 |
| AT4G12735 | | 1,681417629 | AT5G67080 | MAPKKK19 | -1,085974704 |
| AT2G35850 | | 1,676838992 | AT4G22666 | | -1,084213062 |
| AT3G56360 | | 1,672443835 | AT4G24120 | YSL1 | -1,081731536 |
| AT3G18290 | BTS | 1,664364507 | AT1G36060 | | -1,078064166 |
| AT2G14210 | AGL44 | 1,661596127 | AT1G10385 | | -1,070137974 |
| AT5G40000 | | 1,656098963 | AT5G66620 | DAR6 | -1,06412753 |
| AT2G42750 | | 1,655136167 | AT5G19260 | FAF3 | -1,054920187 |
| AT1G13470 | | 1,635481171 | AT2G28270 | | -1,053101118 |
| AT1G74770 | | 1,626891783 | AT5G65980 | | -1,048904844 |
| AT5G55620 | | 1,613211163 | AT2G04500 | | -1,047618712 |
| AT2G46400 | WRKY46 | 1,607188727 | AT1G10155 | PP2-A10 | -1,045530341 |
| AT2G36970 | | 1,594399863 | AT4G29610 | | -1,042786669 |
| AT1G09560 | GLP5 | 1,587908381 | AT3G60280 | UCC3 | -1,042188881 |
| AT5G66480 | | 1,575023793 | AT4G13420 | HAK5 | -1,039743014 |
| AT5G12020 | HSP17,6II | 1,572996797 | AT3G52561 | | -1,038336452 |
| AT2G41730 | | 1,571776479 | AT5G36140 | CYP716A2 | -1,024606028 |
| AT5G10695 | | 1,564913323 | AT1G73630 | | -1,024329281 |
| AT2G04050 | | 1,545047139 | AT4G38420 | sks9 | -1,017750945 |
| AT1G07180 | NDA1 | 1,535978293 | AT1G50110 | | -1,014425609 |
| AT3G01490 | | 1,53309929 | AT5G66815 | | -1,014054599 |
| AT3G47640 | PYE | 1,532758766 | AT1G11655 | | -1,012783487 |
| AT5G01380 | | 1,528835412 | AT4G20040 | | -1,010517315 |
| AT3G46080 | | 1,515183342 | AT5G14200 | IMD1 | -1,009020547 |
| AT1G56150 | | 1,504350735 | AT1G14280 | PKS2 | -1,00466954 |
| AT1G15010 | | 1,500441809 | AT5G09210 | | -1,00431578 |
| AT1G60750 | | 1,49978152 | AT5G60060 | | -1,003406432 |
| AT4G10250 | ATHSP22,0 | 1,494619891 | AT5G59400 | | -1,002168688 |
| AT2G38823 | | 1,476372108 | AT4G36050 | | -1,000406926 |
| AT5G43570 | | 1,468489176 | AT2G21880 | RAB7A | -1,000287753 |
| AT5G54490 | PBP1 | 1,457116758 | | | |
| AT3G11930 | | 1,447383816 | | | |
| AT3G15450 | | 1,437270337 | | | |
| AT1G07135 | | 1,426613971 | | | |
| AT1G73120 | | 1,424225348 | | | |
| AT5G37820 | NIP4;2 | 1,419713851 | | | |
| AT3G50930 | BCS1 | 1,418377347 | | | |
| AT3G27060 | TSO2 | 1,415108553 | | | |
| AT5G39080 | | 1,411914382 | | | |
| AT1G52690 | LEA7 | 1,400317379 | | | |
| AT4G36410 | UBC17 | 1,394897981 | | | |

| | | |
|-----------|----------|-------------|
| AT5G13210 | | 1,391493959 |
| AT3G61390 | | 1,385811542 |
| AT5G03860 | MLS | 1,380217883 |
| AT1G55775 | | 1,378132693 |
| AT1G60470 | GoIS4 | 1,375847185 |
| AT1G03470 | NET3A | 1,375705362 |
| AT1G15040 | GAT1_2,1 | 1,373801399 |
| AT2G32020 | | 1,364392951 |
| AT4G34510 | KCS17 | 1,358923202 |
| AT1G48300 | DGAT3 | 1,35796739 |
| AT1G56430 | NAS4 | 1,355304494 |
| AT1G53635 | | 1,349581051 |
| AT5G47910 | RBOHD | 1,33536921 |
| AT4G01360 | BPS3 | 1,324118984 |
| AT3G06890 | | 1,323114838 |
| AT2G02310 | PP2-B6 | 1,310490621 |
| AT5G67330 | NRAMP4 | 1,301732581 |
| AT3G51860 | CAX3 | 1,299224493 |
| AT5G17860 | CAX7 | 1,296081936 |
| AT4G33560 | | 1,295840285 |
| AT4G31330 | | 1,292780652 |
| AT1G61415 | | 1,292342989 |
| AT2G40880 | CYSA | 1,286062746 |
| AT5G21940 | | 1,282448464 |
| AT1G10875 | | 1,280788802 |
| AT3G11020 | DREB2B | 1,271276204 |
| AT5G59080 | | 1,265694502 |
| AT5G02580 | | 1,258630172 |
| AT4G21680 | NRT1,8 | 1,256241361 |
| AT1G05680 | UGT74E2 | 1,255600887 |
| AT5G37490 | | 1,251607802 |
| AT1G78290 | SNRK2-8 | 1,251475809 |
| AT1G72330 | ALAAT2 | 1,246226512 |
| AT3G29000 | | 1,246169927 |
| AT1G28330 | DYL1 | 1,244990594 |
| AT1G13608 | | 1,235176369 |
| AT5G39890 | | 1,234280007 |
| AT2G03760 | SOT12 | 1,231227416 |
| AT3G47480 | | 1,22705603 |
| AT1G78830 | | 1,226716049 |
| AT5G54560 | | 1,219758256 |
| AT1G32960 | SBT3,3 | 1,212108598 |
| AT4G17680 | | 1,211989507 |
| AT2G29460 | GSTU4 | 1,209362889 |
| AT3G21720 | ICL | 1,207364821 |
| AT3G56400 | WRKY70 | 1,206799105 |
| AT3G54520 | | 1,204786259 |

| | | |
|-----------|----------|-------------|
| AT5G48850 | ATSDI1 | 1,204278261 |
| AT1G77145 | | 1,202956204 |
| AT3G26740 | CCL | 1,199948601 |
| AT3G02480 | | 1,199821248 |
| AT2G15890 | MEE14 | 1,199793517 |
| AT1G30560 | G3Pp3 | 1,185290922 |
| AT1G70290 | TPS8 | 1,184281541 |
| AT3G15630 | | 1,182824885 |
| AT4G39235 | | 1,181136413 |
| AT1G09932 | | 1,180090271 |
| AT3G50740 | UGT72E1 | 1,1784779 |
| AT1G43910 | | 1,172950497 |
| AT2G04040 | DTX1 | 1,172301105 |
| AT4G12290 | | 1,171074263 |
| AT2G32487 | | 1,16959633 |
| AT3G18250 | | 1,165589753 |
| AT1G47960 | C/VIF1 | 1,161654082 |
| AT2G38250 | | 1,153592914 |
| AT3G15635 | | 1,15245829 |
| AT2G31420 | | 1,141789347 |
| AT2G18700 | TPS11 | 1,136480759 |
| AT2G33130 | RALFL18 | 1,134306572 |
| AT1G43800 | FTM1 | 1,13423266 |
| AT3G23250 | MYB15 | 1,133276236 |
| AT5G63350 | | 1,128412502 |
| AT1G80180 | | 1,127751021 |
| AT5G54165 | | 1,126280856 |
| AT4G32480 | | 1,124525618 |
| AT1G49570 | | 1,123472257 |
| AT4G33070 | | 1,121924155 |
| AT2G18193 | | 1,118982201 |
| AT3G13080 | ABCC3 | 1,118960236 |
| AT5G56550 | OXS3 | 1,114561742 |
| AT3G53200 | MYB27 | 1,114458327 |
| AT3G27220 | | 1,114194584 |
| AT5G62490 | HVA22B | 1,111163722 |
| AT4G22710 | CYP706A2 | 1,111125841 |
| AT4G33666 | | 1,106854801 |
| AT5G25250 | FLOT1 | 1,106600816 |
| AT2G15830 | | 1,106111594 |
| AT5G02020 | SIS | 1,104756836 |
| AT4G26890 | MAPKKK16 | 1,104538446 |
| AT3G15500 | NAC3 | 1,101813693 |
| AT5G35940 | | 1,099026268 |
| AT2G36460 | FBA6 | 1,098389153 |
| AT2G23830 | | 1,098096785 |
| AT2G22860 | PSK2 | 1,097040095 |

| | | |
|-----------|----------|-------------|
| AT4G10120 | ATSPS4F | 1,095765547 |
| AT5G14070 | ROXY2 | 1,095519452 |
| AT2G15880 | | 1,095426257 |
| AT4G25433 | | 1,092730219 |
| AT1G73260 | KT11 | 1,091081655 |
| AT3G14620 | CYP72A8 | 1,09085949 |
| AT1G75190 | | 1,08696723 |
| AT5G39050 | PMAT1 | 1,084463221 |
| AT3G61410 | | 1,084176341 |
| AT5G28000 | | 1,08409909 |
| AT3G21270 | DOF2 | 1,075927008 |
| AT3G03640 | BGLU25 | 1,075238695 |
| AT1G17147 | | 1,074817666 |
| AT5G22555 | | 1,0747431 |
| AT1G71140 | | 1,074464169 |
| AT5G03570 | IREG2 | 1,072786323 |
| AT5G52640 | HSP90,1 | 1,071791995 |
| AT1G76600 | | 1,071753281 |
| AT2G20800 | NDB4 | 1,071719246 |
| AT3G12920 | BRG3 | 1,069096653 |
| AT4G25380 | SAP10 | 1,068350158 |
| AT3G50980 | XERO1 | 1,066561023 |
| AT1G76590 | | 1,062422582 |
| AT5G66052 | | 1,059779212 |
| AT1G62280 | SLAH1 | 1,051144701 |
| AT1G64590 | | 1,050705177 |
| AT4G10265 | | 1,046500942 |
| AT2G04070 | | 1,043498888 |
| AT1G25275 | | 1,042930118 |
| AT3G23080 | | 1,04065167 |
| AT4G22690 | CYP706A1 | 1,03910861 |
| AT3G29240 | | 1,038938507 |
| AT5G51810 | GA20OX2 | 1,035618914 |
| AT2G25900 | ATCTH | 1,033721051 |
| AT1G05560 | UGT75B1 | 1,032741826 |
| AT4G28460 | | 1,030455993 |
| AT5G59780 | MYB59 | 1,029914738 |
| AT3G09400 | PLL3 | 1,028836787 |
| AT4G31940 | CYP82C4 | 1,026397093 |
| AT2G43120 | | 1,025781822 |
| AT3G10590 | | 1,025712383 |
| AT5G43580 | UPI | 1,025273506 |
| AT1G24140 | | 1,024092564 |
| AT5G54100 | | 1,023830108 |
| AT3G12520 | SULTR4;2 | 1,022809984 |
| AT1G72900 | | 1,022716943 |
| AT5G66400 | RAB18 | 1,022533554 |

| | | |
|-----------|---------|-------------|
| AT5G15290 | CASP5 | 1,021068835 |
| AT1G49900 | | 1,020708246 |
| AT1G64980 | CDI | 1,019886849 |
| AT1G64900 | CYP89A2 | 1,019516752 |
| AT5G57510 | | 1,01800223 |
| AT3G60140 | DIN2 | 1,016406764 |
| AT1G69570 | | 1,013180228 |
| AT5G43450 | | 1,010232909 |
| AT3G23150 | ETR2 | 1,009808065 |
| AT3G58160 | XIJ | 1,009670464 |
| AT2G26740 | SEH | 1,008423162 |
| AT4G39740 | HCC2 | 1,005764023 |
| AT4G29780 | | 1,003710084 |
| AT3G46600 | | 1,003053166 |
| AT3G23550 | | 1,000589191 |
| AT5G66053 | | 1,0005024 |
| AT2G32140 | | 1,000232036 |

Tab. A6: Differenziell exprimierte Gene unter Kontroll-Bedingungen. Gezeigt sind die in *acd5-2* im Vergleich zu Col-0 induzierten und reprimierten Gene unter Kontroll-Bedingungen.

| Induzierte Gene | | | Reprimierte Gene | | |
|-----------------|-------|--------------------------------|------------------|--------|--------------------------------|
| AGI-Code | Gen | Differenzielle Expression Log2 | AGI-Code | Gen | Differenzielle Expression Log2 |
| AT3G60950 | | 5,387287523 | AT1G24880 | LpxC2 | -7,887967557 |
| AT1G10875 | | 5,313195451 | AT5G45070 | PP2-A8 | -7,005386379 |
| AT5G47260 | | 5,21254668 | AT1G24822 | | -6,741383186 |
| AT3G61030 | | 4,943770163 | AT1G25211 | | -6,510750326 |
| AT1G53480 | MRD1 | 4,498815434 | AT1G23960 | | -6,349834205 |
| AT1G12340 | | 4,259863942 | AT1G25055 | | -6,32566731 |
| AT1G04580 | AO4 | 4,203767154 | AT1G24881 | | -6,321401899 |
| AT1G19550 | | 4,105749504 | AT1G24800 | | -6,278236699 |
| AT3G28540 | | 3,734551554 | AT1G25097 | | -6,130073544 |
| AT5G02340 | | 3,646567258 | AT1G24996 | | -6,108119393 |
| AT3G44490 | hda17 | 3,494478159 | AT3G53650 | | -6,042831206 |
| AT3G44790 | | 3,331211428 | AT3G43740 | | -5,793550653 |
| AT2G13660 | | 3,269557861 | AT1G25150 | | -5,399170981 |
| AT5G27890 | | 3,080887719 | AT5G43040 | | -5,29489443 |
| AT2G20800 | NDB4 | 3,040185774 | AT5G48770 | | -4,905621913 |
| AT3G28310 | | 3,023930364 | AT5G46520 | | -4,901747806 |
| AT3G29635 | | 2,91962661 | AT5G43030 | | -4,354549688 |
| AT5G44575 | | 2,848817198 | AT5G46510 | | -4,252234289 |
| AT2G06845 | | 2,83184755 | AT1G23935 | | -4,152657072 |
| AT3G44660 | hda10 | 2,806139189 | AT3G44710 | | -4,126724177 |
| AT2G13900 | | 2,801962975 | AT1G05340 | | -3,838285566 |
| AT2G21640 | | 2,677178166 | AT1G13480 | | -3,790934846 |
| AT3G28320 | | 2,674698895 | AT5G48780 | | -3,508732854 |

| | | | | | |
|-----------|--------|-------------|-----------|--------|--------------|
| AT5G43360 | PHT1;3 | 2,596319697 | AT5G02810 | PRR7 | -3,4886427 |
| AT2G24692 | | 2,487151181 | AT5G44566 | | -3,445088578 |
| AT3G29430 | | 2,472755837 | AT5G45080 | PP2-A6 | -3,44096644 |
| AT3G58150 | | 2,454192905 | AT3G43890 | | -3,372077894 |
| AT1G19565 | | 2,421989843 | AT5G44574 | | -3,352479398 |
| AT3G30725 | GDU6 | 2,376961266 | AT1G07550 | | -3,31550531 |
| AT5G07990 | TT7 | 2,366266721 | AT5G43580 | UPI | -3,310481211 |
| AT3G29410 | | 2,326818885 | AT5G43520 | | -3,301487792 |
| AT3G44716 | | 2,322101911 | AT3G52680 | | -3,242327729 |
| AT1G26530 | | 2,164414866 | AT1G15885 | | -3,152057543 |
| AT5G43740 | | 2,138410871 | AT1G23950 | | -3,00111903 |
| AT5G52940 | | 2,047569477 | AT5G45095 | | -2,934588857 |
| AT2G03230 | | 2,040739408 | AT3G32030 | | -2,932145671 |
| AT5G43210 | | 2,005109161 | AT5G46650 | | -2,872596429 |
| AT5G45960 | | 1,970802964 | AT5G06980 | | -2,845873407 |
| AT1G27570 | | 1,901745386 | AT1G25145 | LpxC4 | -2,725043559 |
| AT5G44306 | | 1,89699611 | AT3G54530 | | -2,704204761 |
| AT5G44567 | | 1,848946448 | AT1G19070 | | -2,650179989 |
| AT1G26770 | EXPA10 | 1,834082495 | AT1G24793 | LpxC1 | -2,513629171 |
| AT2G36800 | DOGT1 | 1,821392037 | AT1G12010 | | -2,484631668 |
| AT2G23910 | | 1,814367256 | AT2G44130 | | -2,454751313 |
| AT3G48850 | PHT3;2 | 1,799649339 | AT5G46040 | | -2,447566177 |
| AT3G28360 | ABCB16 | 1,797246651 | AT2G46790 | PRR9 | -2,422021552 |
| AT5G01075 | | 1,792650424 | AT1G33055 | | -2,420757773 |
| AT5G43370 | PHT1;2 | 1,785359169 | AT5G44063 | | -2,41370742 |
| AT2G42065 | | 1,776614814 | AT4G27310 | BBX28 | -2,400878058 |
| AT1G15630 | | 1,768062794 | AT1G25210 | LpxC5 | -2,360279824 |
| AT2G04070 | | 1,762331974 | AT3G27980 | | -2,350835932 |
| AT5G46660 | | 1,755361519 | AT1G11280 | | -2,336290854 |
| AT1G07660 | | 1,738032968 | AT1G71030 | MYBL2 | -2,307937167 |
| AT1G10370 | ERD9 | 1,734344176 | AT1G20630 | CAT1 | -2,268643589 |
| AT2G20760 | | 1,72947349 | AT1G25054 | LpxC3 | -2,247369658 |
| AT2G47520 | ERF71 | 1,727889214 | AT5G43440 | | -2,22124341 |
| AT5G51440 | | 1,704680737 | AT1G19530 | | -2,184129626 |
| AT2G13950 | | 1,7020507 | AT1G06630 | | -2,175671061 |
| AT5G27889 | | 1,699438654 | AT1G09910 | | -2,151669551 |
| AT3G29690 | | 1,692797249 | AT1G16390 | OCT3 | -2,12761322 |
| AT4G12735 | | 1,67084318 | AT2G46670 | | -2,070526144 |
| AT3G27500 | | 1,653015144 | AT4G27450 | | -2,039960456 |
| AT1G26762 | | 1,642561704 | AT5G02350 | | -2,036516929 |
| AT3G47480 | | 1,627743429 | AT1G20490 | | -2,015085735 |
| AT5G24640 | | 1,623134748 | AT5G41750 | | -1,950269 |
| AT1G73390 | | 1,613965476 | AT3G50970 | LTI30 | -1,939563877 |
| AT3G44730 | KP1 | 1,577980676 | AT1G19394 | | -1,939134417 |
| AT3G20810 | JMJD5 | 1,568197113 | AT1G09350 | GoIS3 | -1,932187458 |
| AT3G01600 | NAC044 | 1,561772763 | AT1G80440 | | -1,898962208 |
| AT5G27810 | | 1,556515269 | AT2G47180 | GoIS1 | -1,857739205 |

| | | | | | |
|-----------|----------|-------------|-----------|----------|--------------|
| AT5G46670 | | 1,551497039 | AT1G22400 | UGT85A1 | -1,850782278 |
| AT1G23200 | | 1,54280453 | AT2G33830 | | -1,837885911 |
| AT5G43490 | | 1,53709371 | AT5G44130 | FLA13 | -1,837098957 |
| AT1G62262 | SLAH4 | 1,532240484 | AT3G27940 | LBD26 | -1,831986944 |
| AT3G28510 | | 1,522024222 | AT5G44920 | | -1,827781493 |
| AT5G17040 | | 1,522020606 | AT3G10020 | | -1,809789567 |
| AT1G30530 | UGT78D1 | 1,513528759 | AT1G12620 | | -1,808340305 |
| AT3G26250 | | 1,507257826 | AT1G69570 | | -1,802973467 |
| AT5G08640 | FLS1 | 1,505001813 | AT1G06020 | | -1,795263225 |
| AT4G15310 | CYP702A3 | 1,493881197 | AT2G25900 | ATCTH | -1,792104587 |
| AT1G17170 | GSTU24 | 1,482963728 | AT1G23830 | | -1,791538301 |
| AT5G09570 | | 1,481290977 | AT5G43980 | PDLP1 | -1,77615386 |
| AT1G25988 | | 1,47772866 | AT3G59940 | | -1,775545376 |
| AT1G02300 | | 1,442105755 | AT3G15450 | | -1,773661048 |
| AT1G65060 | 4CL3 | 1,434305834 | AT3G53830 | | -1,756879248 |
| AT4G10860 | | 1,432926116 | AT5G65207 | | -1,741916085 |
| AT5G60770 | NRT2,4 | 1,430577278 | AT4G36670 | PMT6 | -1,735081537 |
| AT2G41730 | | 1,427188503 | AT3G44755 | | -1,719436616 |
| AT5G46560 | | 1,424314645 | AT4G15990 | | -1,699033017 |
| AT4G15480 | UGT84A1 | 1,416491496 | AT1G28330 | DYL1 | -1,684637602 |
| AT1G16030 | Hsp70b | 1,413922876 | AT1G10000 | | -1,684597619 |
| AT5G13210 | | 1,407663806 | AT2G15880 | | -1,682230285 |
| AT5G62210 | | 1,399146089 | AT3G53370 | | -1,67738863 |
| AT3G55120 | TT5 | 1,395868079 | AT3G50480 | HR4 | -1,673805936 |
| AT1G22150 | SULTR1;3 | 1,389423639 | AT5G61590 | | -1,673261229 |
| AT2G13905 | | 1,379894074 | AT5G44190 | GLK2 | -1,668075999 |
| AT3G49110 | PRXCA | 1,376105222 | AT4G22214 | | -1,66527049 |
| AT3G29720 | | 1,373374732 | AT2G15890 | MEE14 | -1,664318126 |
| AT5G47990 | CYP705A5 | 1,371726121 | AT5G24140 | SQP2 | -1,649530886 |
| AT1G51480 | | 1,369731067 | AT1G25230 | | -1,642932976 |
| AT2G28815 | | 1,367955641 | AT1G25141 | | -1,631868317 |
| AT3G61400 | | 1,364433104 | AT1G29410 | PAI3 | -1,6158626 |
| AT5G48880 | KAT5 | 1,3626733 | AT4G08290 | UMAMIT20 | -1,593325502 |
| AT4G25010 | SWEET14 | 1,359701528 | AT1G19396 | | -1,588937942 |
| AT1G32870 | NAC13 | 1,349020306 | AT1G23890 | | -1,588837494 |
| AT5G54100 | | 1,341808651 | AT1G04240 | SHY2 | -1,58741476 |
| AT1G53130 | GRI | 1,341332325 | AT3G12320 | | -1,558820822 |
| AT4G04750 | | 1,334815604 | AT5G48790 | | -1,556957604 |
| AT3G26930 | | 1,334726626 | AT3G24310 | MYB305 | -1,550836217 |
| AT3G47050 | | 1,332380846 | AT5G24490 | | -1,54347027 |
| AT1G22980 | | 1,331873919 | AT3G47500 | CDF3 | -1,540836638 |
| AT2G04050 | | 1,3279606 | AT5G44400 | | -1,540323845 |
| AT4G39740 | HCC2 | 1,32531416 | AT5G57660 | COL5 | -1,534698939 |
| AT1G01670 | | 1,30302033 | AT5G45220 | | -1,530570147 |
| AT5G37260 | RVE2 | 1,301783399 | AT1G26680 | | -1,512856735 |
| AT5G13930 | TT4 | 1,294836984 | AT1G78290 | SNRK2-8 | -1,510848524 |
| AT5G49140 | | 1,293904218 | AT5G24655 | LSU4 | -1,502721041 |

| | | | | | |
|-----------|---------|-------------|-----------|----------|--------------|
| AT5G10140 | FLC | 1,285945304 | AT1G02260 | | -1,497603044 |
| AT5G44440 | | 1,282796719 | AT5G62360 | | -1,497556995 |
| AT5G45150 | RTL3 | 1,28037172 | AT1G17240 | RLP2 | -1,49657982 |
| AT3G48840 | | 1,274047534 | AT1G15040 | GAT1_2,1 | -1,487757642 |
| AT3G51240 | F3H | 1,259678926 | AT5G41860 | | -1,47051904 |
| AT3G48920 | MYB45 | 1,259091273 | AT1G21100 | IGMT1 | -1,459899697 |
| AT5G45113 | | 1,256248411 | AT5G49450 | bZIP1 | -1,456214659 |
| AT3G44630 | | 1,247171984 | AT3G46490 | | -1,446291362 |
| AT3G50170 | | 1,244207469 | AT1G17147 | | -1,439175976 |
| AT5G50800 | SWEET13 | 1,243503376 | AT5G33355 | | -1,432544094 |
| AT5G17220 | GSTF12 | 1,242601979 | AT3G47675 | | -1,428138849 |
| AT5G44010 | | 1,238548768 | AT1G10560 | PUB18 | -1,423116779 |
| AT3G55180 | | 1,228049365 | AT5G42590 | CYP71A16 | -1,422688914 |
| AT2G40080 | ELF4 | 1,221876274 | AT3G52526 | | -1,420801529 |
| AT3G46480 | | 1,221681909 | AT5G42250 | | -1,419691053 |
| AT1G12210 | RFL1 | 1,217770693 | AT2G02710 | PLPB | -1,40953622 |
| AT3G44800 | | 1,210367112 | AT3G48360 | BT2 | -1,405916526 |
| AT3G24290 | AMT1;5 | 1,205530218 | AT3G59930 | | -1,397744821 |
| AT1G22900 | | 1,204069954 | AT1G76080 | CDSP32 | -1,397253556 |
| AT5G43380 | TOPP6 | 1,19893619 | AT1G02640 | BXL2 | -1,393151516 |
| AT1G24470 | KCR2 | 1,19257968 | AT1G13609 | | -1,365371888 |
| AT3G49820 | | 1,189401262 | AT1G80380 | | -1,365020082 |
| AT3G01345 | | 1,182867162 | AT5G43890 | YUC5 | -1,363894769 |
| AT5G48100 | TT10 | 1,181757875 | AT5G22920 | | -1,361241427 |
| AT1G09420 | G6PD4 | 1,18140299 | AT3G18080 | BGLU44 | -1,360104998 |
| AT2G47460 | MYB12 | 1,174770134 | AT2G34420 | LHB1B2 | -1,341320944 |
| AT1G50400 | | 1,174766649 | AT2G35980 | YLS9 | -1,3405018 |
| AT3G46270 | | 1,167661284 | AT3G53200 | MYB27 | -1,339039328 |
| AT2G22590 | | 1,162072334 | AT2G38790 | | -1,318299778 |
| AT5G16080 | CXE17 | 1,161497701 | AT4G39675 | | -1,316948868 |
| AT3G21560 | UGT84A2 | 1,15898744 | AT3G50350 | | -1,308227445 |
| AT5G53820 | | 1,140300066 | AT5G65400 | | -1,30613699 |
| AT5G17050 | UGT78D2 | 1,136746379 | AT5G48620 | | -1,305114551 |
| AT5G43450 | | 1,135372974 | AT3G10113 | | -1,30425804 |
| AT5G49630 | AAP6 | 1,134228209 | AT1G12390 | | -1,30100319 |
| AT4G14690 | ELIP2 | 1,133654689 | AT1G49500 | | -1,300368293 |
| AT5G46960 | | 1,128667369 | AT1G27540 | | -1,299848203 |
| AT3G22830 | HSFA6B | 1,125914424 | AT1G11530 | CXXS1 | -1,297950406 |
| AT1G07710 | | 1,124721404 | AT5G64170 | | -1,294138177 |
| AT3G32047 | | 1,123897516 | AT1G09410 | | -1,292873667 |
| AT3G50610 | | 1,122468385 | AT5G61290 | | -1,290945156 |
| AT1G02230 | NAC004 | 1,11064615 | AT5G01740 | | -1,289878495 |
| AT5G43170 | ZF3 | 1,110424473 | AT1G05200 | GLR3,4 | -1,283626508 |
| AT3G29100 | VTI13 | 1,10524589 | AT4G31875 | | -1,279020774 |
| AT1G10540 | NAT8 | 1,099366349 | AT3G28917 | MIF2 | -1,275401628 |
| AT1G07795 | | 1,097875162 | AT3G44880 | ACD1 | -1,271801749 |
| AT1G24210 | | 1,096026858 | AT1G15890 | | -1,263377525 |

| | | | | | |
|-----------|--------|-------------|-----------|-----------|--------------|
| AT1G12600 | | 1,083647722 | AT3G61060 | PP2-A13 | -1,262894205 |
| AT3G19030 | | 1,082370235 | AT3G07310 | | -1,253317087 |
| AT5G05270 | CHIL | 1,080920906 | AT5G43200 | | -1,248649916 |
| AT1G42550 | PMI1 | 1,080914957 | AT1G70290 | TPS8 | -1,247557444 |
| AT1G48800 | | 1,080526275 | AT2G22140 | EME1B | -1,243382348 |
| AT4G19810 | ChiC | 1,080363158 | AT1G13420 | ST4B | -1,239286981 |
| AT5G48530 | | 1,077742909 | AT1G24240 | | -1,236399233 |
| AT1G73810 | | 1,077555949 | AT5G02160 | | -1,235665666 |
| AT5G17010 | | 1,067023788 | AT3G47470 | LHCA4 | -1,227139284 |
| AT5G66480 | | 1,062474796 | AT5G47450 | TIP2;3 | -1,225714334 |
| AT1G08100 | NRT2,2 | 1,051713135 | AT1G78440 | ATGA2OX1 | -1,217208524 |
| AT3G28330 | | 1,049058471 | AT2G45560 | CYP76C1 | -1,215792042 |
| AT1G26240 | | 1,040154149 | AT3G54890 | LHCA1 | -1,211139104 |
| AT1G11800 | | 1,035327909 | AT5G60060 | | -1,208135173 |
| AT5G37980 | | 1,031656673 | AT5G16810 | | -1,205769287 |
| AT2G18193 | | 1,030639707 | AT3G46700 | | -1,202030035 |
| AT1G23205 | | 1,025777566 | AT3G28130 | UMAMIT44 | -1,200172219 |
| AT1G74120 | | 1,022677964 | AT1G19540 | | -1,198471945 |
| AT3G28500 | | 1,021086532 | AT1G27030 | | -1,19629152 |
| AT2G48080 | | 1,018887076 | AT5G20250 | DIN10 | -1,196025275 |
| AT1G06540 | | 1,017340318 | AT5G47940 | | -1,193878943 |
| AT5G44820 | | 1,017096091 | AT3G44695 | | -1,191168655 |
| AT5G47950 | | 1,009138889 | AT4G16860 | RPP4 | -1,191042158 |
| AT3G44450 | | 1,003676003 | AT5G57887 | | -1,189930247 |
| AT5G02330 | | 1,003632097 | AT1G19397 | | -1,186980859 |
| | | | AT1G06640 | | -1,184748967 |
| | | | AT5G19120 | | -1,179884477 |
| | | | AT3G53680 | | -1,172444925 |
| | | | AT4G11320 | | -1,172107012 |
| | | | AT5G65690 | PCK2 | -1,166469352 |
| | | | AT3G44700 | | -1,166336581 |
| | | | AT3G18450 | | -1,166308025 |
| | | | AT5G48190 | | -1,164994946 |
| | | | AT3G28210 | PMZ | -1,163855023 |
| | | | AT1G56300 | | -1,161744641 |
| | | | AT1G24480 | | -1,161594426 |
| | | | AT3G45700 | | -1,16012444 |
| | | | AT1G78830 | | -1,156225076 |
| | | | AT1G63180 | UGE3 | -1,145572446 |
| | | | AT3G48410 | | -1,144022667 |
| | | | AT1G52400 | BGLU18 | -1,143723752 |
| | | | AT1G26800 | | -1,140779753 |
| | | | AT5G42900 | COR27 | -1,140058062 |
| | | | AT1G23390 | | -1,138074063 |
| | | | AT5G42580 | CYP705A12 | -1,129486477 |
| | | | AT2G25150 | | -1,126743661 |
| | | | AT5G02090 | | -1,120793479 |

| | | |
|-----------|---------|--------------|
| AT2G18700 | TPS11 | -1,120494766 |
| AT3G55580 | | -1,116130976 |
| AT3G16690 | SWEET16 | -1,114209731 |
| AT1G72140 | | -1,112584721 |
| AT1G34510 | | -1,109235735 |
| AT3G51910 | HSFA7A | -1,104030834 |
| AT1G52410 | TSA1 | -1,101642172 |
| AT1G65970 | TPX2 | -1,097837818 |
| AT5G48570 | | -1,097191355 |
| AT3G49160 | | -1,096822942 |
| AT5G46295 | | -1,095151376 |
| AT2G22122 | | -1,094158264 |
| AT5G45115 | | -1,093253053 |
| AT1G10140 | | -1,093180002 |
| AT2G32150 | | -1,089541649 |
| AT5G46060 | | -1,089354428 |
| AT1G22710 | SUC2 | -1,087531213 |
| AT2G19800 | MIOX2 | -1,08643059 |
| AT4G22230 | | -1,086085943 |
| AT4G37950 | | -1,08525586 |
| AT5G14120 | | -1,082148453 |
| AT2G46220 | | -1,072299308 |
| AT2G31945 | | -1,068084204 |
| AT3G07490 | AGD11 | -1,064395071 |
| AT2G15960 | | -1,062686976 |
| AT1G70860 | | -1,062502534 |
| AT1G18330 | EPR1 | -1,060624493 |
| AT3G48520 | CYP94B3 | -1,059894293 |
| AT3G53420 | PIP2A | -1,059878425 |
| AT5G01210 | | -1,055765379 |
| AT3G27030 | | -1,052794974 |
| AT4G33730 | | -1,051451646 |
| AT4G00910 | | -1,04805802 |
| AT1G77145 | | -1,047092838 |
| AT1G78230 | | -1,046678956 |
| AT5G49360 | BXL1 | -1,046066333 |
| AT2G30600 | | -1,04547011 |
| AT1G23380 | KNAT6 | -1,044726538 |
| AT3G52180 | SEX4 | -1,042177408 |
| AT4G25470 | CBF2 | -1,040395366 |
| AT5G62340 | | -1,039285939 |
| AT4G37050 | PLP4 | -1,036996548 |
| AT2G37440 | | -1,036972486 |
| AT5G15950 | | -1,035577449 |
| AT5G18910 | | -1,034848483 |
| AT1G52245 | | -1,030565867 |
| AT3G50840 | | -1,024257851 |

| | | |
|-----------|--------|--------------|
| AT1G09480 | | -1,024046642 |
| AT4G21870 | | -1,021607618 |
| AT5G51390 | | -1,016846097 |
| AT4G18510 | CLE2 | -1,014073273 |
| AT1G80165 | | -1,013997391 |
| AT4G21120 | AAT1 | -1,012891688 |
| AT3G23080 | | -1,012026956 |
| AT1G64480 | CBL8 | -1,011068284 |
| AT1G17560 | HLL | -1,010748673 |
| AT2G40000 | HSPRO2 | -1,010624548 |
| AT3G61390 | | -1,010140465 |
| AT2G31082 | CLE7 | -1,007469038 |
| AT1G26150 | PERK10 | -1,003137734 |
| AT1G27580 | | -1,002807221 |

Tab. A7: Differenziell exprimierte Gene unter Zink-Stress. Gezeigt sind die in *acd5-2* im Vergleich zu Col-0 induzierten und reprimierten Gene unter Zink-Stress.

| Induzierte Gene | | | Reprimierte Gene | | |
|-----------------|--------|--------------------------------|------------------|--------|--------------------------------|
| AGI-Code | Gen | Differentielle Expression Log2 | AGI-Code | Gen | Differentielle Expression Log2 |
| AT3G60950 | | 5,320036482 | AT5G45070 | PP2-A8 | -8,877345657 |
| AT5G47260 | | 5,029321683 | AT1G24880 | LpxC2 | -8,145264288 |
| AT1G12340 | | 4,529642346 | AT1G24822 | | -6,952311919 |
| AT1G53480 | MRD1 | 4,495692568 | AT1G23960 | | -6,546710407 |
| AT3G28320 | | 4,394647869 | AT1G25211 | | -6,471199641 |
| AT3G61030 | | 4,330835541 | AT1G24996 | | -6,261585091 |
| AT1G19550 | | 4,150545582 | AT1G24881 | | -6,228492558 |
| AT3G44490 | hda17 | 3,853627547 | AT1G25097 | | -6,220826526 |
| AT2G13660 | | 3,807640048 | AT1G24800 | | -6,183383618 |
| AT1G04580 | AO4 | 3,726525478 | AT1G25055 | | -6,15571681 |
| AT5G44567 | | 3,484906847 | AT3G53650 | | -6,027250285 |
| AT3G44716 | | 3,259672027 | AT3G43740 | | -5,931113834 |
| AT5G02340 | | 3,173379825 | AT5G45080 | PP2-A6 | -5,536118978 |
| AT3G29635 | | 3,146930435 | AT1G25150 | | -5,42141647 |
| AT3G28540 | | 3,051111341 | AT5G43040 | | -5,256062328 |
| AT2G13900 | | 3,048252274 | AT5G48770 | | -5,238856469 |
| AT3G44790 | | 2,997041643 | AT5G46520 | | -5,001427214 |
| AT3G28510 | | 2,81286645 | AT5G43030 | | -4,328395278 |
| AT5G27890 | | 2,711155129 | AT3G54530 | | -4,22068409 |
| AT5G43360 | PHT1;3 | 2,689315042 | AT5G46510 | | -4,123948742 |
| AT5G52940 | | 2,602326352 | AT1G23935 | | -4,04596771 |
| AT1G19565 | | 2,566459689 | AT3G44710 | | -3,98497743 |
| AT2G06845 | | 2,550925618 | AT5G48780 | | -3,670084232 |
| AT3G29430 | | 2,536713715 | AT5G43520 | | -3,58021355 |
| AT2G24692 | | 2,399658992 | AT5G44566 | | -3,360234867 |
| AT3G58150 | | 2,395253629 | AT5G45095 | | -3,35830308 |

| | | | | | |
|-----------|---------|-------------|-----------|-----------|--------------|
| AT5G44575 | | 2,371757635 | AT3G52680 | | -3,346234387 |
| AT1G26530 | | 2,366564574 | AT3G32030 | | -3,299170283 |
| AT5G43210 | | 2,312092591 | AT1G13480 | | -3,155813199 |
| AT4G10860 | | 2,214464558 | AT1G23950 | | -3,117568177 |
| AT5G52930 | | 2,212414124 | AT5G46040 | | -3,087829795 |
| AT2G36800 | DOGT1 | 2,211769188 | AT5G02810 | PRR7 | -3,062352892 |
| AT4G21490 | NDB3 | 2,187167978 | AT5G44130 | FLA13 | -3,062200947 |
| AT5G09570 | | 2,168821984 | AT1G75945 | | -2,865234664 |
| AT1G25988 | | 2,16107672 | AT1G07550 | | -2,769776939 |
| AT3G46190 | | 2,160364064 | AT3G43890 | | -2,767348187 |
| AT5G43740 | | 2,157386294 | AT1G15885 | | -2,697194238 |
| AT2G22590 | | 2,144248971 | AT1G19070 | | -2,682161482 |
| AT3G30725 | GDU6 | 2,140688149 | AT5G44572 | | -2,676574015 |
| AT3G28360 | ABCB16 | 2,123758333 | AT2G46790 | PRR9 | -2,606355946 |
| AT3G47480 | | 2,029192061 | AT1G09350 | GoIS3 | -2,562298676 |
| AT1G27570 | | 2,028766492 | AT1G25145 | LpxC4 | -2,548984786 |
| AT5G44306 | | 2,005847196 | AT5G65690 | PCK2 | -2,507179061 |
| AT5G10140 | FLC | 1,98568006 | AT5G41750 | | -2,492646471 |
| AT3G46090 | ZAT7 | 1,947772422 | AT1G25054 | LpxC3 | -2,477548373 |
| AT5G02330 | | 1,942037254 | AT1G25210 | LpxC5 | -2,450764501 |
| AT1G10370 | ERD9 | 1,931246758 | AT1G24793 | LpxC1 | -2,420416513 |
| AT5G24640 | | 1,922666097 | AT5G42600 | MRN1 | -2,420227869 |
| AT1G26762 | | 1,881851621 | AT5G44063 | | -2,365169346 |
| AT5G07990 | TT7 | 1,879589973 | AT5G44574 | | -2,29465302 |
| AT1G15630 | | 1,856808948 | AT5G06980 | | -2,241366085 |
| AT1G01670 | | 1,854656612 | AT2G46670 | | -2,232451481 |
| AT5G46670 | | 1,852845536 | AT3G50970 | LTI30 | -2,213703455 |
| AT2G21640 | | 1,838638264 | AT1G06630 | | -2,164097613 |
| AT3G48850 | PHT3;2 | 1,835395115 | AT5G02350 | | -2,132134952 |
| AT5G27889 | | 1,830145844 | AT5G46650 | | -2,116950481 |
| AT1G17170 | GSTU24 | 1,808581307 | AT3G27980 | | -2,067911994 |
| AT1G02300 | | 1,794484277 | AT1G34510 | | -2,03264981 |
| AT2G44460 | BGLU28 | 1,767588959 | AT5G43580 | UPI | -2,026235585 |
| AT3G29410 | | 1,741795895 | AT3G18450 | | -1,921664168 |
| AT3G49110 | PRXCA | 1,708288432 | AT3G50480 | HR4 | -1,873483124 |
| AT5G48100 | TT10 | 1,706146649 | AT5G44920 | | -1,869112988 |
| AT2G28815 | | 1,705121202 | AT1G11280 | | -1,824384695 |
| AT2G14440 | | 1,703490321 | AT2G20520 | FLA6 | -1,81532755 |
| AT3G28310 | | 1,697986379 | AT3G12320 | | -1,801483364 |
| AT5G46660 | | 1,683587622 | AT3G27940 | LBD26 | -1,794714249 |
| AT1G07660 | | 1,676060324 | AT1G16530 | ASL9 | -1,790266282 |
| AT5G43570 | | 1,664271349 | AT5G62360 | | -1,782587716 |
| AT1G73390 | | 1,625678941 | AT5G48190 | | -1,776801345 |
| AT1G30530 | UGT78D1 | 1,619442626 | AT1G10000 | | -1,756303647 |
| AT1G26770 | EXPA10 | 1,602979207 | AT1G12620 | | -1,749368952 |
| AT3G45730 | | 1,59585102 | AT3G16240 | DELTA-TIP | -1,728970477 |
| AT2G13950 | | 1,569879258 | AT3G44755 | | -1,72425623 |

| | | | | | |
|-----------|---------|-------------|-----------|----------|--------------|
| AT5G43370 | PHT1;2 | 1,560686468 | AT1G02260 | | -1,719706238 |
| AT2G20800 | NDB4 | 1,554495351 | AT4G27310 | BBX28 | -1,715089044 |
| AT5G40010 | AATP1 | 1,549903788 | AT1G09910 | | -1,700133265 |
| AT2G46400 | WRKY46 | 1,543602037 | AT5G57530 | XTH12 | -1,697313625 |
| AT5G43450 | | 1,541205505 | AT3G53830 | | -1,669795807 |
| AT2G38823 | | 1,539442447 | AT1G20490 | | -1,666270087 |
| AT5G66480 | | 1,534372239 | AT4G22214 | | -1,641680351 |
| AT1G07180 | NDA1 | 1,519634929 | AT5G24140 | SQP2 | -1,63811048 |
| AT2G23910 | | 1,512984947 | AT3G53370 | | -1,622589626 |
| AT4G39740 | HCC2 | 1,511229482 | AT3G23730 | XTH16 | -1,621188274 |
| AT3G20810 | JMJD5 | 1,508830966 | AT1G12010 | | -1,620796672 |
| AT1G19960 | | 1,505061686 | AT2G22140 | EME1B | -1,580472944 |
| AT4G12735 | | 1,489021988 | AT5G44190 | GLK2 | -1,578218717 |
| AT5G54550 | | 1,48496193 | AT1G22400 | UGT85A1 | -1,576852393 |
| AT2G04070 | | 1,463995506 | AT1G19540 | | -1,575638169 |
| AT2G41730 | | 1,459235587 | AT5G44400 | | -1,569488759 |
| AT5G46950 | | 1,446815743 | AT1G23830 | | -1,564705531 |
| AT5G45150 | RTL3 | 1,443670243 | AT1G23890 | | -1,559746905 |
| AT2G20760 | | 1,4404442 | AT1G25141 | | -1,556088182 |
| AT3G55120 | TT5 | 1,432247258 | AT4G28850 | XTH26 | -1,549451551 |
| AT3G28190 | | 1,421420574 | AT4G39770 | TPPH | -1,537978351 |
| AT5G37260 | RVE2 | 1,419779254 | AT1G05200 | GLR3,4 | -1,531815432 |
| AT2G47520 | ERF71 | 1,415133393 | AT5G48790 | | -1,520473228 |
| AT1G10875 | | 1,389825022 | AT1G11655 | | -1,518420248 |
| AT2G13905 | | 1,388548062 | AT5G15950 | | -1,516245723 |
| AT5G17220 | GSTF12 | 1,387604219 | AT5G41860 | | -1,512321225 |
| AT3G12230 | scpl14 | 1,384494006 | AT4G08620 | SULTR1;1 | -1,505743562 |
| AT5G48880 | KAT5 | 1,379962106 | AT3G24310 | MYB305 | -1,496649884 |
| AT3G44730 | KP1 | 1,372479101 | AT3G52526 | | -1,493353908 |
| AT1G12210 | RFL1 | 1,366479829 | AT3G47500 | CDF3 | -1,471540141 |
| AT5G17040 | | 1,360335402 | AT1G09410 | | -1,468136538 |
| AT5G49140 | | 1,352786375 | AT1G29410 | PAI3 | -1,455808648 |
| AT5G26920 | CBP60G | 1,348291804 | AT3G45700 | | -1,449092572 |
| AT5G62210 | | 1,344299938 | AT4G33730 | | -1,444526002 |
| AT4G14690 | ELIP2 | 1,337867383 | AT1G54970 | PRP1 | -1,441548892 |
| AT2G45550 | CYP76C4 | 1,32358458 | AT4G11210 | | -1,441105427 |
| AT5G44010 | | 1,318505498 | AT1G27540 | | -1,440899044 |
| AT3G29100 | VTI13 | 1,301531138 | AT1G20630 | CAT1 | -1,426569256 |
| AT5G45040 | CYTC6A | 1,300074604 | AT1G10110 | | -1,421408085 |
| AT2G34610 | | 1,299549715 | AT3G53680 | | -1,413013809 |
| AT3G44800 | | 1,299362475 | AT1G10560 | PUB18 | -1,412245893 |
| AT3G32047 | | 1,297671708 | AT5G43890 | YUC5 | -1,407626404 |
| AT1G65060 | 4CL3 | 1,295237818 | AT1G04240 | SHY2 | -1,406141728 |
| AT5G45960 | | 1,295076942 | AT1G72140 | | -1,405118358 |
| AT1G22980 | | 1,293299623 | AT5G64170 | | -1,404107359 |
| AT5G54100 | | 1,284555578 | AT5G42965 | | -1,3992109 |
| AT2G42065 | | 1,279516373 | AT1G15890 | | -1,394983974 |

| | | | | | |
|-----------|---------|-------------|-----------|-------|--------------|
| AT3G27500 | | 1,278681897 | AT1G26680 | | -1,391552808 |
| AT5G25260 | | 1,278475975 | AT1G24240 | | -1,38757136 |
| AT5G46560 | | 1,277741214 | AT1G13130 | | -1,38448313 |
| AT2G04050 | | 1,271086741 | AT5G53250 | AGP22 | -1,383087311 |
| AT3G44450 | | 1,267156364 | AT1G19394 | | -1,371807506 |
| AT5G13210 | | 1,263203278 | AT3G46700 | | -1,371398241 |
| AT1G50400 | | 1,259169055 | AT1G06640 | | -1,370860306 |
| AT1G09420 | G6PD4 | 1,257070968 | AT2G47180 | GoS1 | -1,368830948 |
| AT4G39235 | | 1,254570972 | AT5G57540 | XTH13 | -1,362120276 |
| AT2G03130 | | 1,251585639 | AT1G65310 | XTH17 | -1,360846328 |
| AT5G08640 | FLS1 | 1,251566379 | AT5G22410 | RHS18 | -1,348187171 |
| AT1G52690 | LEA7 | 1,238052187 | AT1G12390 | | -1,343495868 |
| AT2G33230 | YUC7 | 1,23728546 | AT4G37950 | | -1,339901907 |
| AT5G62490 | HVA22B | 1,237173614 | AT1G27030 | | -1,335439508 |
| AT4G11655 | | 1,229717091 | AT3G60990 | | -1,335226358 |
| AT5G24316 | | 1,220270447 | AT5G02360 | | -1,334131143 |
| AT2G03230 | | 1,199315187 | AT4G12500 | | -1,330702972 |
| AT1G07710 | | 1,196755294 | AT1G17240 | RLP2 | -1,330090839 |
| AT2G29220 | | 1,195611143 | AT3G44695 | | -1,323732711 |
| AT4G15480 | UGT84A1 | 1,194954597 | AT2G44130 | | -1,312419597 |
| AT2G36790 | UGT73C6 | 1,193294826 | AT3G60280 | UCC3 | -1,312005999 |
| AT1G15870 | | 1,19266791 | AT5G24655 | LSU4 | -1,307017301 |
| AT2G32020 | | 1,188928215 | AT1G25230 | | -1,299912023 |
| AT1G44130 | | 1,188608638 | AT3G46880 | | -1,297151481 |
| AT1G11800 | | 1,176778784 | AT3G47340 | ASN1 | -1,289187368 |
| AT5G43490 | | 1,169416297 | AT1G09790 | COBL6 | -1,28760006 |
| AT3G58160 | XIJ | 1,168693027 | AT5G65400 | | -1,284293086 |
| AT5G62480 | GSTU9 | 1,167984242 | AT1G06830 | | -1,272388968 |
| AT5G13930 | TT4 | 1,167076914 | AT1G19250 | FMO1 | -1,270268067 |
| AT5G01075 | | 1,157572905 | AT4G22230 | | -1,270070964 |
| AT5G54560 | | 1,154431651 | AT4G20190 | | -1,268700908 |
| AT2G40080 | ELF4 | 1,149281293 | AT5G43440 | | -1,260580301 |
| AT1G22900 | | 1,147586577 | AT5G57660 | COL5 | -1,257059164 |
| AT1G23740 | AOR | 1,141855256 | AT3G43210 | TES | -1,249137297 |
| AT1G23205 | | 1,134300132 | AT3G16390 | NSP3 | -1,248880018 |
| AT3G50170 | | 1,131500058 | AT3G59930 | | -1,247428309 |
| AT1G32080 | LrgB | 1,13109418 | AT5G11590 | TINY2 | -1,247343371 |
| AT1G72330 | ALAAT2 | 1,128979771 | AT5G43980 | PDLP1 | -1,24514085 |
| AT3G44630 | | 1,119550055 | AT4G18510 | CLE2 | -1,236913084 |
| AT1G71140 | | 1,118185052 | AT1G19396 | | -1,22846692 |
| AT5G44440 | | 1,109782142 | AT3G49960 | | -1,211130206 |
| AT3G26250 | | 1,108710554 | AT4G25220 | G3Pp2 | -1,206760681 |
| AT5G20860 | | 1,106420388 | AT2G31310 | LBD14 | -1,206592671 |
| AT5G05260 | CYP79A2 | 1,104012255 | AT5G48620 | | -1,20331589 |
| AT1G26290 | | 1,100531276 | AT4G11190 | | -1,200600757 |
| AT2G19500 | CKX2 | 1,093591293 | AT1G06020 | | -1,195979684 |
| AT5G51440 | | 1,088386684 | AT4G00910 | | -1,193629202 |

| | | | | | |
|-----------|------------|-------------|-----------|----------|--------------|
| AT1G11370 | | 1,088001902 | AT1G34540 | CYP94D1 | -1,193351407 |
| AT1G42550 | PMI1 | 1,087130903 | AT5G47940 | | -1,189777212 |
| AT5G46640 | | 1,083299841 | AT4G02270 | RHS13 | -1,188487411 |
| AT3G20470 | GRP5 | 1,080993813 | AT5G01050 | | -1,184218029 |
| AT5G47530 | | 1,076004796 | AT2G43140 | | -1,184102028 |
| AT3G51750 | | 1,075753457 | AT3G50350 | | -1,183520519 |
| AT2G40880 | CYSA | 1,075028861 | AT3G48240 | | -1,180278767 |
| AT1G22160 | | 1,073856251 | AT1G67110 | CYP735A2 | -1,178657046 |
| AT2G38465 | | 1,073051971 | AT2G33790 | AGP30 | -1,177115154 |
| AT3G48920 | MYB45 | 1,064990174 | AT1G61950 | CPK19 | -1,173324916 |
| AT3G26930 | | 1,062846691 | AT5G63270 | | -1,172762595 |
| AT3G47050 | | 1,059672337 | AT5G45115 | | -1,172210998 |
| AT1G12600 | | 1,05495501 | AT1G14120 | | -1,17015976 |
| AT2G43720 | | 1,054210415 | AT5G06640 | EXT10 | -1,169504671 |
| AT1G06540 | | 1,0444545 | AT2G03720 | MRH6 | -1,168857843 |
| AT2G45450 | ZPR1 | 1,044245863 | AT1G14280 | PKS2 | -1,166853979 |
| AT1G60470 | GoIS4 | 1,043368914 | AT1G02570 | | -1,163642083 |
| AT5G43170 | ZF3 | 1,043289011 | AT3G50010 | | -1,161588628 |
| AT3G47580 | | 1,041626638 | AT3G16690 | SWEET16 | -1,157179216 |
| AT3G21560 | UGT84A2 | 1,041501944 | AT4G23070 | RBL7 | -1,156065681 |
| AT2G23400 | | 1,040641408 | AT5G42250 | | -1,154218652 |
| AT5G17050 | UGT78D2 | 1,038996655 | AT1G05340 | | -1,149201418 |
| AT1G23730 | BCA3 | 1,036399228 | AT1G24735 | | -1,146499563 |
| AT2G04040 | DTX1 | 1,034094591 | AT5G42590 | CYP71A16 | -1,145862512 |
| AT3G48700 | CXE13 | 1,032111825 | AT2G37440 | | -1,1398346 |
| AT4G01360 | BPS3 | 1,030676389 | AT2G24980 | EXT6 | -1,134887887 |
| AT1G62500 | | 1,029971896 | AT5G46295 | | -1,133412297 |
| AT4G04930 | DES-1-LIKE | 1,028813516 | AT5G27060 | RLP53 | -1,131938705 |
| AT2G36460 | FBA6 | 1,027626318 | AT4G36670 | PMT6 | -1,126227228 |
| AT3G30260 | AGL79 | 1,026347754 | AT1G13420 | ST4B | -1,11630639 |
| AT4G16240 | | 1,025804891 | AT5G43200 | | -1,114989089 |
| AT2G47460 | MYB12 | 1,024847315 | AT1G06923 | | -1,114548834 |
| AT3G51240 | F3H | 1,024135743 | AT3G07070 | | -1,113820315 |
| AT5G17860 | CAX7 | 1,017721962 | AT1G09750 | | -1,111833618 |
| AT1G02230 | NAC004 | 1,017696069 | AT3G61820 | | -1,110990133 |
| AT3G46080 | | 1,014775353 | AT3G10710 | RHS12 | -1,108482677 |
| AT5G06760 | LEA4-5 | 1,013931708 | AT1G62510 | | -1,104559503 |
| AT1G73810 | | 1,013172255 | AT5G42510 | | -1,104177113 |
| AT4G36880 | CP1 | 1,006937654 | AT3G44700 | | -1,10256488 |
| AT2G35480 | | 1,006717866 | AT1G24000 | | -1,100771622 |
| AT2G28270 | | 1,006311697 | AT4G25790 | | -1,098688194 |
| AT5G05270 | CHIL | 1,003784628 | AT5G06990 | | -1,097338302 |
| AT3G01600 | NAC044 | 1,002796758 | AT5G01740 | | -1,096570055 |
| AT2G05530 | | 1,002115698 | AT1G78440 | ATGA2OX1 | -1,094590794 |
| AT1G66090 | | 1,001643499 | AT5G01210 | | -1,092650534 |
| | | | AT5G41740 | | -1,089512721 |
| | | | AT1G78860 | | -1,089079126 |

| | | |
|-----------|----------|--------------|
| AT5G06645 | | -1,088898079 |
| AT2G22122 | | -1,088626083 |
| AT1G05990 | | -1,087997733 |
| AT5G44020 | | -1,086770496 |
| AT3G28130 | UMAMIT44 | -1,083419104 |
| AT3G61300 | | -1,082353476 |
| AT3G29330 | | -1,080104372 |
| AT5G01330 | PDC3 | -1,078490691 |
| AT1G05250 | | -1,077876188 |
| AT3G43960 | | -1,074793984 |
| AT1G49570 | | -1,068982955 |
| AT3G59370 | | -1,064270722 |
| AT3G48410 | | -1,062908208 |
| AT1G16390 | OCT3 | -1,061761056 |
| AT1G26720 | | -1,060331102 |
| AT1G62515 | | -1,058962226 |
| AT3G01760 | | -1,056794143 |
| AT5G03390 | | -1,052705196 |
| AT4G29450 | | -1,048398781 |
| AT1G09480 | | -1,046215693 |
| AT5G60660 | PIP2;4 | -1,040452395 |
| AT5G48670 | AGL80 | -1,032898971 |
| AT5G62330 | | -1,031697133 |
| AT3G54400 | | -1,02973072 |
| AT2G45560 | CYP76C1 | -1,026210285 |
| AT5G45220 | | -1,023546592 |
| AT5G60060 | | -1,020534636 |
| AT3G46490 | | -1,018830365 |
| AT4G25250 | | -1,015953525 |
| AT3G47350 | HSD2 | -1,015037067 |
| AT4G22212 | | -1,014170118 |
| AT1G63600 | | -1,013108846 |
| AT4G22666 | | -1,012405507 |
| AT5G43270 | SPL2 | -1,010493351 |
| AT3G28140 | | -1,009417992 |
| AT1G27580 | | -1,007767756 |
| AT1G24530 | | -1,007259515 |
| AT2G21880 | RAB7A | -1,005943102 |
| AT3G44880 | ACD1 | -1,001959669 |
| AT5G35190 | EXT13 | -1,000054751 |

5.2 Abbildungen

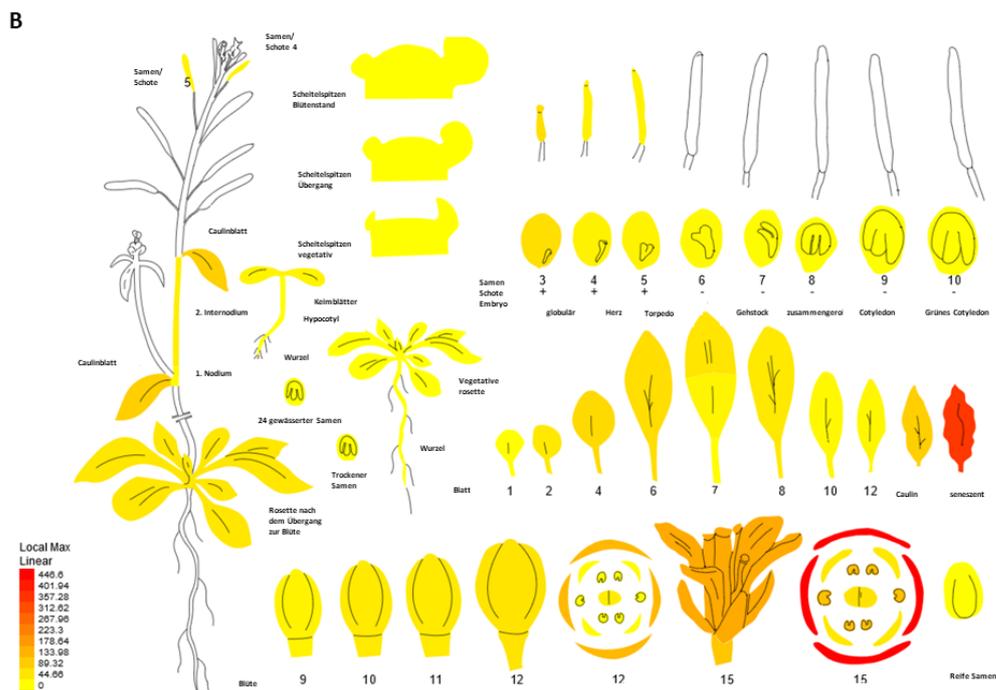
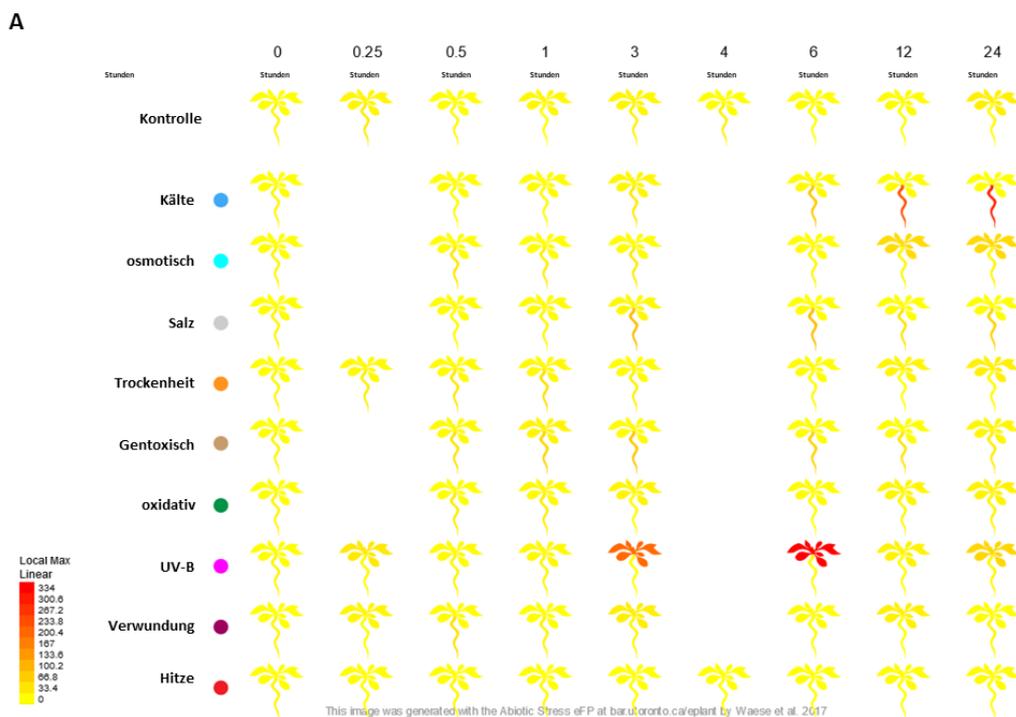


Abb. A1: Expressionsdaten für WIN3. Gezeigt ist die Expression von WIN3 in *A. thaliana*. **(A)** Expression unter verschiedenen Stress-Behandlungen. **(B)** Expression in den verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien von *A. thaliana*. Abbildung verändert nach ePlant (Waese et al. 2017).

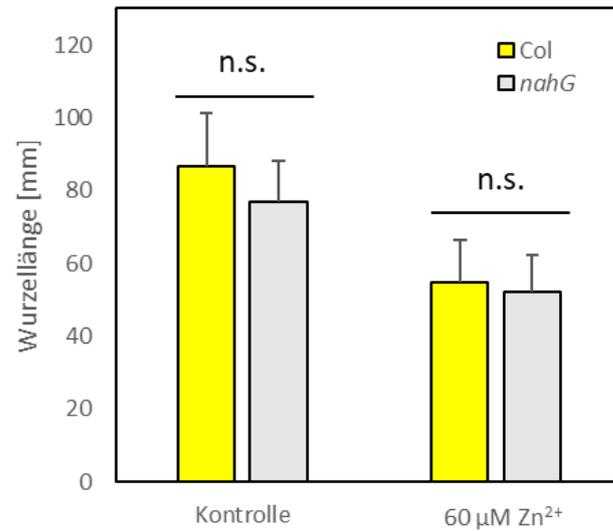


Abb. A2: Vergleich des Wurzelwachstums von Col-0 und *nahG* unter Kontroll- und Zink-Stress Bedingungen. Es wurde überprüft, ob es zwischen Col-0 und *nahG* unter Kontroll- und Zink-Stress-Bedingungen einen Unterschied im Wurzelwachstum gibt. Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm StAbw von 3 unabhängigen Experimenten ($n = 57 - 61$). Signifikante Unterschiede wurden durch zweifaktorielle ANOVA und Tukey's HSD-Test ermittelt.

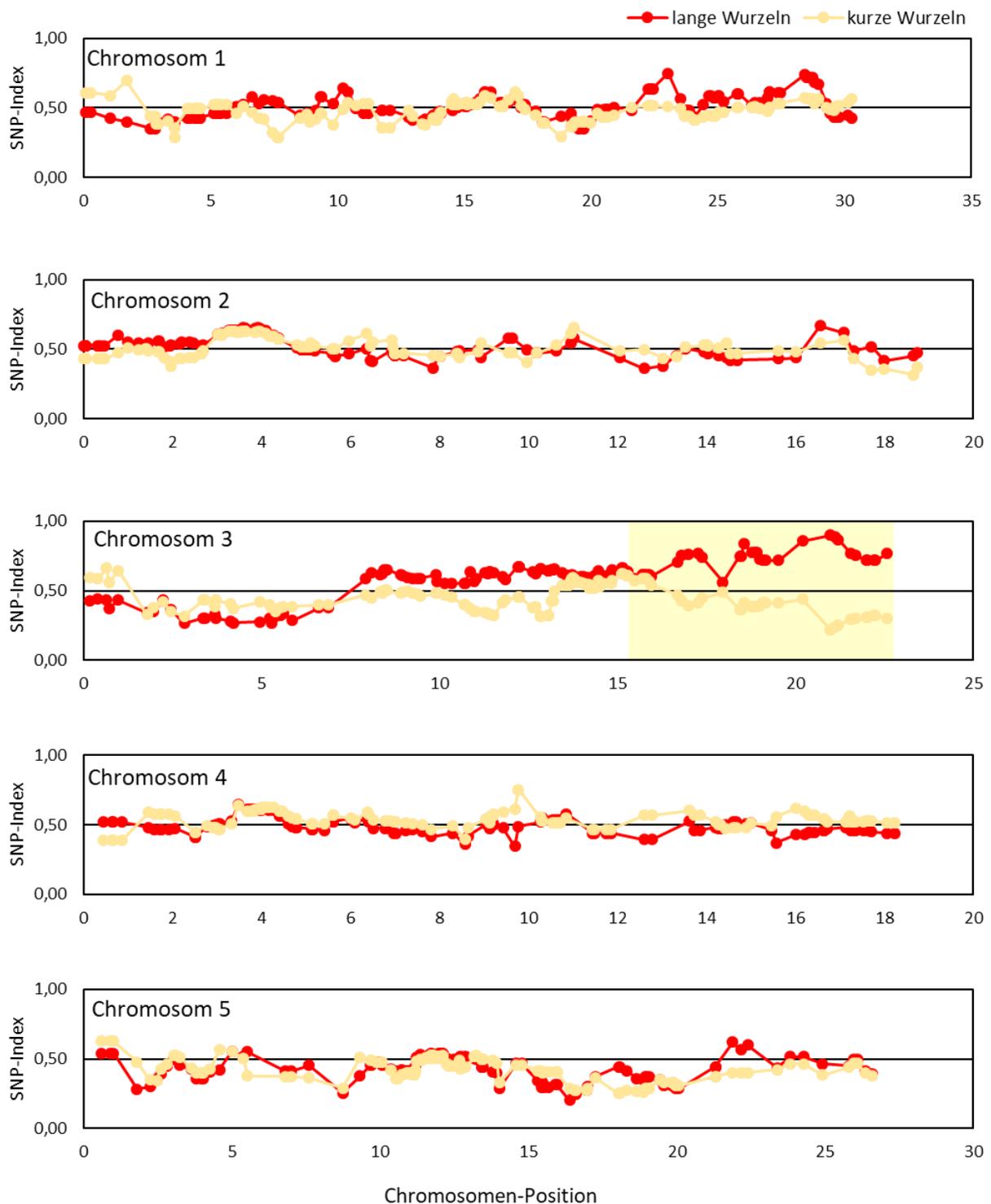


Abb. A3: SNP-Index-Analyse: Gezeigt sind die SNP-Indizes der 5 Chromosomen von *A. thaliana*. Für jedes Chromosom sind die SNP-Index-Werte der beiden Pools mit langen und kurzen Wurzeln (LP und KP) sortiert nach ihrer Lage auf dem Chromosom. Der gelbe Kasten zeigt den Bereich an, in dem sich die gesuchte Mutation, welche für die gesteigerte Zink-Toleranz verantwortlich ist, befindet.

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Clemens dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit anzufertigen. Danke für die stete Unterstützung und die vielen Anregungen für neue Gedanken und Experimente.

Auch möchte ich mich bei Prof. Dr. Angelika Mustroph und Prof. Dr. Stefan Geimer bedanken, dass sie mir während der Anfertigung meiner Doktorarbeit als Mentoren zur Seite standen.

Dank auch an Dr. Michael Weber, der meine zahlreichen Fragen immer mit allergrößter Geduld beantwortet hat. Dafür kann ich gar nicht genug Schokolade mitbringen.

Wer einem unter anderem dabei hilft, 3500 Pflanzen zu pikieren, zu versorgen und im Anschluss 300 Pflanzen zu untersuchen, dem gilt großer Dank. Deshalb herzlichen Dank an Christiane Meinen (zum Glück haben wir von der Ernte doch keine Schimmel-Vergiftung bekommen), Pia Schuster, Carmen Günther und Silke Matros.

Natürlich möchte ich auch insgesamt dem ganzen Lehrstuhl danken. Durch euch alle hat man sich hier einfach nur wohlfühlt. Ob nun durch unsere zahlreichen Unternehmungen oder auch die Unterstützung bei der Arbeit, die man immer durch Rat und Tat erhalten hat. Und auch wenn es schwierig wurde, wie zuletzt zu Coronazeiten, wurden immer Wege gefunden, diese Atmosphäre aufrecht zu erhalten, auch wenn dazu jahrelang abgelaufener Sekt getrunken werden musste. Dafür noch mal vielen lieben Dank an Sarah Nitsche, so konnten wir meine Publikation wenigstens etwas feiern.

Mein Dank geht auch an Helmut Neugebauer, der seit Jahren meine Arbeiten Korrektur liest und so vor allem meine willkürliche Kommasetzung bekämpft.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mich immer auf meinem Weg unterstützt haben. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen. Nicht nur, weil ich an den Wochenenden immer reichlich mit Essen versorgt wurde, das meistens noch bis zur Wochenmitte gereicht hat, sondern auch, weil ich mit all meinen Sorgen und Problem zu euch kommen konnte und immer ein offenes Ohr und Hilfe gefunden habe.

(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 64 Abs. 1 Satz 6 BayHSchG).

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

§ 9 Satz 2 Nr. 4 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw, -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

(§ 9 Satz 2 Nr. 7 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.

(§ 9 Satz 2 Nr. 8 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.

.....

Ort, Datum, Unterschrift