

**Untersuchung der funktionellen
Verknüpfung der Regulation der
Eisenaufnahme mit dem Ethylensignalweg
in *Arabidopsis thaliana***

Dissertation

zur Erlangung

des Grades des Doktors der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III

Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften

der Universität des Saarlandes

von Frau

Julia Mohrbacher, geb. Fleischer

geboren am 12.03.1982 in Darmstadt

Saarbrücken, im September 2010

Tag des Kolloquiums:

Dekan:

Berichterstatter:

Vorsitz:

Akad. Mitarbeiter:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	vi
Abbildungsverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	vii
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Bedeutung von Eisen für Organismen	3
2.1.1 Bedeutung von Eisen für den Menschen	3
2.1.2 Bedeutung von Eisen für Pflanzen	4
2.2 Eisenhaushalt der Pflanzen	5
2.2.1 Bioverfügbarkeit von Eisen	5
2.2.2 Morphologische Auswirkungen von Eisenmangel in Pflanzen	5
2.2.3 Strategien der Pflanzen für die Eisenaufnahme	6
2.2.4 Strategie I	6
2.2.5 Strategie II	14
2.2.6 Eisentransport durch die Pflanze	15
2.3 Regulation der Eisenaufnahme	17
2.3.1 Transkriptionelle Regulation	18
2.3.2 Posttranskriptionelle Regulation	24
2.3.3 Transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulation der Eisenaufnahme in weiteren Organismen	26
2.3.4 Möglichkeiten der Regulation von Transkriptionsfaktoren . .	29
2.3.5 Mögliche Regulation von AtFIT	32

2.4	Mögliche Signale zur Aktivierung der Eisenaufnahme	33
2.4.1	Systemische Signale	33
2.4.2	Stickstoffmonoxid (NO)	35
2.4.3	Auxin	35
2.4.4	Cytokinine	36
2.4.5	Ethylen	36
2.5	Das Pflanzenhormon Ethylen	37
2.5.1	Ethylenbiosynthese und deren Regulierung	37
2.5.2	Der Signalweg von Ethylen	39
2.5.3	Ethylenwirkung in der Nährstoffaufnahme	42
2.6	Ziel dieser Arbeit	42
3	Material und Methoden	44
3.1	Material	44
3.1.1	Pflanzenmaterialien	44
3.1.2	Bakterien	45
3.1.3	Reagenzien	45
3.1.4	Oligonukleotide	46
3.1.5	Materialien	49
3.1.6	Geräte	49
3.1.7	Vektoren	50
3.1.8	Plasmide	50
3.1.9	Puffer und Lösungen	51
3.1.10	Medien zur Anzucht	52
3.2	Methoden	53
3.2.1	Pflanzenmethoden	53
3.2.2	S-Protein Pulldown Assay	55
3.2.3	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation	57
3.2.4	Lokalisation des EIL1 Proteins mittels GFP Nachweis	59
3.2.5	Real-Time quantitative RT-PCR	59

4	Ergebnisse	63
4.1	Regulation der Eisenmangelantworten durch EIN3 und EIL1 . . .	63
4.1.1	Protein-Protein Interaktion zwischen FIT und den Ethylen- transkriptionsfaktoren EIN3/EIL1 in vitro	63
4.1.2	<i>In vivo</i> Protein Interaktion zwischen FIT und EIN3/EIL1 . .	64
4.1.3	Lokalisierung des EIL1 Proteins in der Wurzel	66
4.1.4	Charakterisierung der <i>ein3eil1</i> Doppelmutante im Kontext der Eisenhomöostase	68
4.1.5	Untersuchung der Regulation der Eisenaufnahme anhand der <i>fitin3eil1</i> Mutante	69
4.1.6	Auswirkungen der EIN3/EIL1 Faktoren auf die ektopische FIT Expression	74
4.2	Einfluss der Hemmung der Ethylenbiosynthese auf die Eisenman- gelantwort	76
4.2.1	Promoteraktivitäten verschiedener Eisenhomöostasegene bei gehemmter Ethylenbiosynthese	76
4.2.2	Expression der Eisenhomöostasegene unter Einfluss des Ethylenbiosynthesehemmers AVG	76
4.3	Untersuchung des Ethylenignalweges im Hinblick auf Eisenmangel	78
4.3.1	Analyse des Ethylenrezeptors ETR1 im Hinblick auf Eisen- mangel	78
4.3.2	Die Rolle des zentralen Ethylenregulators EIN2 in der Ei- senaufnahme	79
4.4	Der Einfluss der Regulatoren EBF1 und EBF2 auf die Eisenaufnahme	86
4.4.1	Expressionsanalysen der Eisenhomöostasegene in der <i>ebf1ebf2</i> Doppelmutante	86
4.4.2	Expression von EBF1 und 2 in Abhängigkeit von FIT und von Eisen	88
4.4.3	Charakterisierung einer EBF1 Überexpressionslinie	88
4.5	Der Einfluss von Eisenmangel auf die Ethylenbiosynthese und den Ethylenignalweg	90
4.5.1	Regulation der Ethylenbiosynthese durch Eisenmangel so- wie durch FIT	90

4.5.2	<i>EIN2</i> Expression bei Eisenmangel und in Abhängigkeit von FIT	92
5	Diskussion	95
5.1	EIN3 und EIL1 sind Feinregulatoren der Eisenmangelantwort . . .	95
5.1.1	Die Ethylentranskriptionsfaktoren EIN3 und EIL1 interagieren mit FIT.	95
5.1.2	EIN3 und EIL1 sind positive Regulatoren der Eisenhomöostase.	97
5.1.3	EIN3 und EIL1 wirken mit FIT zusammen additiv bei der Aufnahme von Eisen.	98
5.2	Hemmung der Ethylenbiosynthese in der Eisenmangelantwort . .	100
5.3	Der Einfluss verschiedener Komponenten des Ethylenwegs auf die Eisenhomöostase	101
5.3.1	Fehlen des Ethylenrezeptors ETR1 bewirkt negative Auswirkung auf die Eisenaufnahme.	102
5.3.2	Der zentrale Ethylenfaktor EIN2 ist wichtiger Spieler in der Eisenantwort	102
5.3.3	Die Rolle der F-Box Proteine EBF1/2 in der Eisenaufnahme	104
5.4	Ethylen wird für die Eisenhomöostase benötigt	108
5.5	Schlussfolgerungen	109
5.6	Perspektiven	110
	Literaturverzeichnis	i

Abbildungsverzeichnis

2.1	Strategie I der Eisenaufnahme	7
2.2	Strategie II der Eisenaufnahme	14
2.3	Ethylensignalweg	41
4.1	S-Agarose Pulldown Assay zwischen Kandidatenpeptiden EIN3/EIL1 und FIT.	64
4.2	BiFC Assay zwischen den EIL1 und FIT Proteinen	65
4.3	BiFC Assay zwischen den EIN3 und FIT Proteinen	66
4.4	BiFC Assay Kontrollen	67
4.5	Lokalisierung des EIL1 Proteins mittels GFP-Fusion in Arabidopsis Wurzeln	68
4.6	Physiologische Analyse der Eisenmangelantworten der <i>ein3eil1</i> Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp	70
4.7	Phänotypische Analyse der <i>fitein3eil1</i> Dreifachmutante	71
4.8	Physiologische Analyse der Eisenmangelantworten der <i>fitein3eil1</i> Dreifachmutante im Vergleich zum Wildtyp	73
4.9	Physiologische Analyse der Eisenmangelantworten in den Blättern der FITOx <i>ein3eil1</i> Linie im Vergleich zum Wildtyp	75
4.10	Promoter-GUS Assay verschiedener Eisenmangelgene unter dem Einfluss von AVG	77
4.11	Expressionsanalysen der Eisenmangelantwortgene bei inhibierter Ethylenbiosynthese	78
4.12	Expressionsanalyse der Eisenmangelantwort in der <i>etr1</i> Mutante .	80
4.13	Expressionsanalyse der Eisenmangelantwort der <i>ein2</i> Mutante unter Einwirkung von Jasmonsäure	82
4.14	Phänotypen der <i>fitein2</i> und der <i>ein2</i> Mutante	83

4.15 Expressionsanalysen der Eisenmangelgene in der <i>fitein2</i> Mutante	85
4.16 Physiologische Analyse der FITOx <i>ein2</i> Linie	85
4.17 Physiologische Analyse der <i>ebf1ebf2</i> Doppelmutante	87
4.18 Expressionsanalyse der <i>EBF1</i> und <i>2</i> Gene	89
4.19 Phänotyp der EBF1Ox Linie	90
4.20 Expressionsanalyse der Eisenmangelantwort der EBF1Ox Linie .	91
4.21 Untersuchung der Expression der Gene <i>EIN2</i> und <i>CHITB</i> in Ab- hängigkeit von FIT und des Eisenstatus	93
5.1 Modell des Zusammenspiels zwischen Ethylen und der Eisenho- möostase	110

Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäure	OD	optische Dichte
BHLH	<i>basic Helix-Loop-Helix</i>	PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-Puffer
BiFC	bimolekulare Fluoreszenz Komplementation	RNA	Ribonukleinsäure
BSA	<i>bovine serum albumine</i> ; Rinderserumalbumin	RNase	Ribonuklease
bp	Basenpaare	ROS	<i>Reactive oxygen species</i> ; Reaktive Sauerstoff Spezies
DMSO	Dimethylsulfoxid	RT	Raumtemperatur
DNA	Deoxyribonukleinsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
DNase	Deoxyribonuklease	SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
dNTP	Desoxyribonukleotid	TEMED	Tetramethylenethyldiamid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TF	Transkriptionsfaktor
Fe	Eisen	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
LB	Bakterienmedium nach <i>Luria Broth</i>	WT	Wildtyp
NA	Nicotianamin	X-Gluc	Cyclohexylammoniumsalz der 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronsäure
NO	Stickoxide		

1 Zusammenfassung

Eisen ist durch die Fähigkeit zur reversiblen Redoxreaktion der wichtigste Mikronährstoff für Pflanzen. Es ist vor allem als Kofaktor von Enzymen beteiligt an lebenswichtigen Reaktionen. Eisen muss von der Pflanze aktiv aus dem Boden gelöst, reduziert und aufgenommen werden. Die Aufnahme in die Pflanze wird aufgrund der hohen Reaktivität und der damit verbundenen Risiken genau gesteuert. In *Arabidopsis thaliana*, der wichtigsten Modellpflanze der Molekularbiologie, sind für Reduktion und Aufnahme aus dem Boden die beiden Proteine AtFRO2 als Reduktase und AtIRT1 als Transporter zuständig. Sie werden transkriptionell in Abhängigkeit des Eisenstatus der Pflanze durch den BHLH Transkriptionsfaktor AtFIT gesteuert. AtFIT jedoch wird nur schwach transkriptionell reguliert, eine weitere Regulation findet auf posttranskriptioneller Ebene statt. Eine Möglichkeit dafür ist die Dimerisierung mit anderen Proteinen. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Proteininteraktion von AtFIT mit den Transkriptionsfaktoren AtEIN3 und AtEIL1 aus dem Signalweg des Pflanzenhormons Ethylen *in planta* verifiziert werden. Die Untersuchung des Einflusses von AtEIN3 und AtEIL1 ergab, dass diese mit AtFIT additiv als positive Regulatoren in der Eisenmangelantwort agieren. Weitere Untersuchungen mit Faktoren aus dem Ethylensignalweg sowie mit Ethylen ergaben, dass Ethylen eine wichtige Rolle in der Regulation der Eisenhomöostase spielt.

Summary

Iron is, due to its ability for reversible redox reactions, the most important micronutrient for plants. It serves primarily as cofactor in enzymes which are involved in pivotal reactions. Iron needs actively to be solved from the soil, be reduced and taken up by the plant. This mechanism has to be tightly controlled due to the high reactivity of iron and the resulting risks. In the model plant *Arabidopsis thaliana*, the proteins AtFRO2 as reductase and AtIRT1 as transporter are responsible for the reduction and uptake from the soil. Both are regulated in a transcriptional manner dependent on the iron status of the plant by the BHLH transcription factor AtFIT. AtFIT itself is only weakly regulated on transcriptional level, further regulation takes place at the posttranscriptional level. One possibility for this regulation is the dimerisation with other proteins. In the present work, a protein interaction of AtFIT with the transcription factors AtEIN3 and AtEIL1 from the signalling pathway of the hormone ethylene could be verified *in planta*. Analysis of the influence of AtEIN3 and AtEIL1 revealed their roles as positive regulators together with AtFIT in an additive manner. Further experiments with other factors from the ethylene signalling pathway and with ethylene itself showed that ethylene plays an important role in the iron homeostasis of the plant.

2 Einleitung

2.1 Bedeutung von Eisen für Organismen

Eisen (Fe) stellt eines der vielfältigsten Metalle im Organismus dar. Seine Funktion wird meist durch seine chemische Fähigkeit zur reversiblen Redoxreaktion von Fe(II) zu Fe(III) bestimmt. Desweiteren ist Eisen in der Lage, oktaedrische Komplexe mit diversen Liganden zu bilden. Eisen kann sein Redoxpotential sehr gut dem jeweiligen Liganden anpassen und ist somit ein idealer Kofaktor von Enzymen bei einer Vielzahl biochemischer Reaktionen. Zusammen mit Schwefel bildet Eisen sog. Eisen-Schwefel-Proteine vom 2Fe-2S-Typ oder 4Fe-4S-Typ. Diese Proteine bilden funktionell wesentliche Bestandteile von Elektronen-Transport-Ketten wie in der Respiration in den Mitochondrien oder der Photosynthese in den Chloroplasten (Hell und Stephan, 2003). Der bekannteste Vertreter ist das Ferredoxin, welches an der Photosynthese beteiligt ist. Außerdem ist Eisen zentraler Bestandteil der Häm-Proteine, zu denen neben Hämoglobin u.a. die Cytochrome gehören, Proteine, die ebenfalls in den Elektronen-Transport-Ketten eingebettet sind. Außerdem spielt Eisen eine wichtige Rolle bei der Reduktion der Ribonukleotiden zu Desoxyribonukleotiden, den Bausteinen der Desoxyribonukleinsäure (DNA) (Guerinot und Yi, 1994).

2.1.1 Bedeutung von Eisen für den Menschen

Wie bereits beschrieben, spielt Eisen in vielen Enzymkomplexen der Elektronen-Transport-Ketten sowie der Bildung der DNA eine zentrale Rolle. Die wichtigste Funktion des Eisen im Menschen ist jedoch die als zentrales Ion im Häm, einem Bestandteil des Hämoglobins, welches für den Sauerstofftransport im Blut zuständig ist. Reduzierte Hämoglobinwerte, z.B. durch Eisen-arme Ernährung führt zu den Symptomen einer Anämie. Die spezielle Form der Eisenmangel-Anämie führt zu Symptomen wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Depressionen und Atemnot sowie zu Blutarmut. Fast 50 % der schwangeren Frauen weltweit leiden an dieser Form der Anämie. Während jedoch in modernen Ländern die Schwangerschaft genau überprüft wird und der Hämoglobinwert bestimmt wird, so

dass Eisenmangel rechtzeitig entgegengewirkt werden kann, kommt es in ärmeren Ländern sehr häufig zum Tod der Mutter im Kindbett durch den mit der Geburt einhergehenden hohen Blutverlust. Sehr oft sind bereits die Kinder von Anämie betroffen, was sich auf deren kognitive und physische Entwicklung negativ auswirkt. Ungefähr 30 % der Menschen weltweit sind anämisch durch Eisenmangel (World Health Organization, 2001, 2008).

Die Aufnahme von Eisen aus der Nahrung gestaltet sich unterschiedlich effizient. Aus Fleisch wird Eisen mit 20 % sehr effizient aufgenommen, da es Häm-gebunden ist. Die Aufnahme von Eisen auf Pflanzen ist mit 1,4 bis 7 % deutlich geringer, da dessen Aufnahme durch Stoffe wie Oxalsäure oder Polyphosphate gehemmt wird (Scrimshaw, 1991).

2.1.2 Bedeutung von Eisen für Pflanzen

In Pflanzen spielt Eisen vor allem als Kofaktor der Enzyme der Photosynthese, z.B. im Eisen-Schwefel-Protein Ferredoxin, eine wichtige Rolle. Darüber hinaus stellt Eisen als Bestandteil der Nitrogenase einen wesentlichen Faktor in der symbiontischen Stickstoff-Fixierung dar (Guerinot und Yi, 1994). In der Schwefel-Assimilation wirkt Eisen als Kofaktor der Adenosin-5'-Phosphosulfat Reduktase (Kopriva u. a., 2001). Außerdem ist Eisen beteiligt an der Biosynthese des Pflanzenhormons Ethylen im Enzym Aminocyclopropan-1-carboxylsäure Oxidase (Zhou u. a., 2002). Weitere wichtige eisenhaltige Enzyme sind die Superoxid-Dismutase sowie die Aconitase, die im Citratzyklus eine wichtige Rolle spielt.

Eisenmangel in Pflanzen wirkt sich in erster Linie auf den Chlorophyllgehalt aus, was durch Chlorosen, gelb verfärbte Bereiche der Blätter, sichtbar wird. Bei schwerem Eisenmangel kommt es zu Einbußen in der Ernte oder sogar zu Ernteaussfällen (Guerinot und Yi, 1994).

In der hohen Reaktivität von Eisen bergen jedoch nicht nur Vorteile, sondern auch Risiken. So können Fe(II) und Fe(III) katalytische Wirkung bei der Bildung „Reaktiver Sauerstoff Spezies“ (ROS) wie den Hydroxylradikalen $\text{OH}\bullet$ in der sog. Fentonreaktion haben (Fenton, 1894).

Diese Radikale können wiederum durch ihre hohe Reaktionsfähigkeit in der Zelle große Schäden anrichten. Daher muss der Gehalt an Eisen genau kontrolliert werden.

2.2 Eisenhaushalt der Pflanzen

2.2.1 Bioverfügbarkeit von Eisen

Obwohl Eisen mit einem Anteil von 4,7 % als vierthäufigstes Element der Lithosphäre auf der Erde in großen Mengen vorkommt, hat es eine sehr geringe Bioverfügbarkeit in aeroben und alkalischen Umgebungen. Eisen bildet durch die Oxidation mit atmosphärischem Sauerstoff sehr schwer lösliche Oxyhydroxid-Polymere der generellen Form FeOOH , wie z.B. Goethit und Hematit, welche durch Gesteinsverwitterung entstehen. Freies Eisen in Form von Fe(III) kommt dagegen im Boden mit 10^{-18} M bis 10^{-15} M nur in äußerst geringen Mengen vor (Bagg und Neilands, 1987; Guerinot und Yi, 1994).

Für Organismen wie Pflanzen oder Bakterien, die ihre Nährstoffe aus der Erde beziehen, ist dies jedoch eine viel zu geringe Konzentration. Pflanzen benötigen eine Konzentration von 10^{-9} M bis 10^{-4} M an freiem Eisen, Bakterien benötigen 10^{-7} M bis 10^{-5} M. Vor allem auf kalkreichen Böden, die ca. 30 % der Erde ausmachen, stellt die zu geringe Eisenverfügbarkeit im Boden für die Pflanzen eine große Einschränkung dar.

2.2.2 Morphologische Auswirkungen von Eisenmangel in Pflanzen

Um nicht dauerhaftem Eisenmangel ausgesetzt zu sein, ist es für die Pflanzen essentiell, die Eisenaufnahme aktiv zu beeinflussen, da sie ansonsten vor allem in den jungen Blättern eine Chlorose ausbilden, die vor allem zwischen der Blattnervatur mit gelben Flecken sehr auffällig ist. Dieser pathologische Phänotyp leitet sich vom mangelnden Chlorophyllgehalt ab, der durch den Eisenmangel verursacht wird. Die Synthese von δ -Aminolaevulinat (ALA), welches als Vorstufe des Häms sowie des Chlorophylls direkt von der Eisenversorgung abhängig ist, ist u.a. ein Faktor für die verminderte Chlorophyllbiosynthese (Marschner, 1995). Desweiteren kommt es bei Eisenmangel zu einer drastischen Verkleinerung der Chloroplasten, da nicht nur die Chlorophyllbiosynthese beeinträchtigt ist, sondern auch verschiedene eisenabhängige Enzyme in den beiden Photosystemen I und II. Dadurch ergibt sich eine verminderte Stärkebildung in den Chloroplasten (Marschner, 1995). Zur gesteigerten Eisenaufnahme reagieren die meisten Pflanzen außer Gramineen mit diversen morphologischen Anpassungen der Wurzel. Zum einen wird das Wurzellängenwachstum eingeschränkt, zum anderen wird die Oberfläche der Wurzel vergrößert, um mehr Eisen aufnehmen zu können. Dazu

wird der Querschnitt der apikalen Wurzelzone vergrößert, desweiteren findet eine verstärkte Bildung von Wurzelhaaren und Transferzellen statt (Marschner, 1995).

2.2.3 Strategien der Pflanzen für die Eisenaufnahme

Zusätzlich zu den morphologischen Anpassungen haben Pflanzen, die in aeroben Bedingungen leben, also die meisten der Landpflanzen, zwei phylogenetisch unterschiedliche Strategien entwickelt, um trotz der extrem niedrigen Konzentrationen von freiem Eisen im Boden genug Eisen aufnehmen zu können (Marschner und Römheld, 1994; Römheld und Marschner, 1986). Die Gruppe der dikotyledonen Pflanzen sowie der Monokotyledonen außer den Gräsern wenden einen Mechanismus zur Eisenaufnahme an, der Strategie I genannt wird. Dieser Mechanismus basiert auf der reduktiven Ablösung von Eisen von seinen Liganden. Bei Eisenmangel reagiert die Pflanze mit verstärkter Protonenextrusion im Wurzelbereich zur Ansäuerung des Bodens, mit verstärkter Fe(III) Reduktion an der Wurzeloberfläche sowie der Aufnahme von Fe(II) an der Wurzelplasmamembran (Römheld und Marschner, 1983).

Gräser reagieren bei Eisenmangel mit einem verstärkten Ausstoß von hochaffinen Eisen-chelatierenden Substanzen der Gruppe der Mugininsäuren, die Phytosydephoren (PS) genannt werden. Diese Substanzen lösen anorganische Fe(III) Verbindungen aus dem Boden und die daraus resultierenden Fe(III)-PS Komplexe werden über ein spezifisches membranständiges Transportsystem in die Wurzel aufgenommen, ohne jedoch dabei das Fe(III) zu reduzieren. Dieser Mechanismus heißt Strategie II (Römheld und Marschner, 1986) und ist dem Sydephorsystem der Bakterien sehr ähnlich (Bagg und Neilands, 1987).

2.2.4 Strategie I

Pflanzen der Strategie I-Gruppe reagieren auf Eisenmangel mit morphologischen und physiologischen Anpassungen (Römheld, 1987), die zu einer vergrößerten Wurzeloberfläche zur Reduktion und Aufnahme von Eisen führen. Die morphologischen Anpassungen umfassen das Anschwellen der Wurzelspitze, das verstärkte Ausbilden von Wurzelhaaren, die verstärkte Entwicklung von Lateralwurzeln sowie die verstärkte Ausbildung von Transferzellen (Marschner, 1995; Schmidt, 1999).

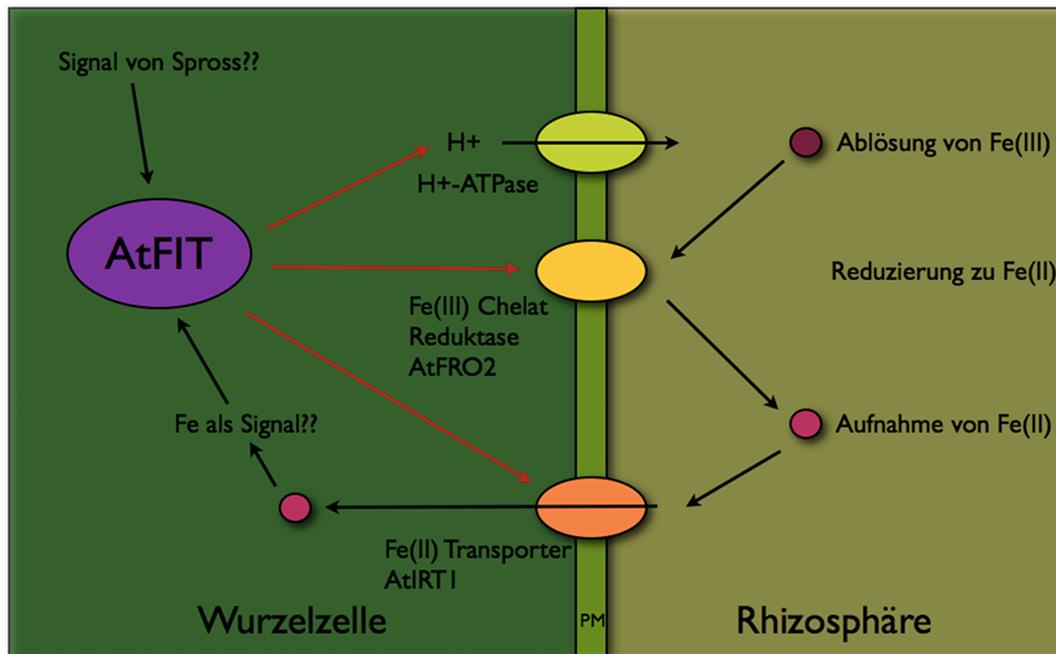


Abbildung 2.1: Strategie I der Eisenaufnahme

2.2.4.1 Ansäuerung

Die Ansäuerung der Rhizosphäre als Reaktion auf Eisenmangel ist eine der wichtigsten physiologischen Anpassungen der Pflanze bei Eisenmangel. Sie wird durch die Aktivierung einer spezifischen H⁺-ATPase begonnen, die dazu führt, dass Protonen aus der Wurzel in die Rhizosphäre ausgeschleust werden. In wenigen Stunden kann so der pH-Wert der Rhizosphäre um den Wert 3 gesenkt werden. Eine pH Absenkung um den Wert 1 bewirkt dabei bereits, dass 1000-fach mehr Fe(III) Ionen von den Liganden gelöst werden und in die Rhizosphäre abgegeben werden (Bienfait, 1985). Diese Protonenextrusion dient dabei nicht nur der Ansäuerung des Bodens, sondern auch beim Aufbau des elektrochemischen Gradienten, der die Aufnahme von gelösten Stoffen durch die entsprechenden spezifischen Transporter antreibt (Sussman, 1999). Die Kapazität von Pflanzen, die Umgebung bei Eisenmangel anzusäuern, hängt unter anderem von der Balance zwischen Kationen- und Anionenaufnahme ab sowie von der Stickstoffversorgung der Pflanzen. Ein Beispiel für eine P-Typ H⁺-ATPase ist die *Arabidopsis* H⁺-ATPase 2 AtAHA2, die vor allem in Wurzelhaaren sehr stark exprimiert werden kann (Sussman, 1994). Sie kodiert sehr wahrscheinlich für eine H⁺-ATPase, die an der Aufnahme von Mineralstoffen in die Pflanze beteiligt ist (Fox und Guerinot, 1998).

2.2.4.2 Eisenreduktion

Die typischste physiologische Reaktion der Strategie I Pflanzen auf Eisenmangel ist die verstärkte Reduktion von Fe(III) zu Fe(II). Die Reduktion findet an den Epidermiszellen der Wurzel statt. Diese katalysiert den transmembranen Elektronentransport von cytosolisch lokalisierten reduzierten Pyridinnukleotiden zu extrazellulären Eisenverbindungen, die als Elektronenakzeptoren dienen. Dieser Prozess ist Grundvoraussetzung zur Aufnahme von Eisen in Strategie I Pflanzen und wird bei Eisenmangel aktiviert (Buckhout u. a., 1989). Isolierte Plasmamembranen aus Wurzeln von an Eisenmangel leidenden Pflanzen zeigten eine 2-3 fach höhere spezifische Aktivität der Fe(III) Reduktase als solche, die aus Pflanzen auf ausreichendem Eisengehalt angezogen wurden (Buckhout u. a., 1989). Da das pH Optimum der Fe(III) Reduktase bei pH 6 liegt, erhöht eine vorhergehende Ansäuerung der Umgebung durch die H⁺-ATPase die Enzymaktivität der Fe(III) Reduktase (Chaney u. a., 1972). Ein Beispiel für eine Fe(III) Reduktase in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* ist Ferric reduction oxidase 2 AtFRO2 Robinson u. a. (1999).

2.2.4.3 Eisenaufnahme

Eisen wird als freies Fe(II) über die Plasmamembran der Wurzel transportiert. Dieser Transport findet statt über einen Transporter, der unterhalb der Fe(III) Reduktase agiert. Die Kapazität der Pflanze zur Eisenaufnahme und Translokation wird durch Eisenmangel besonders verstärkt (Yi und Guerinot, 1996). In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* ist der Transporter *Arabidopsis iron-regulated transporter 1* AtIRT1 hauptverantwortlich für die Aufnahme von Fe(II) in die Wurzel nach vorhergehender Reduktion von Fe(III) Chelaten durch die Fe(III) Reduktase (Eide u. a., 1996; Varotto u. a., 2002; Henriques u. a., 2002).

2.2.4.4 An Eisenmobilisierung und -Aufnahme beteiligte Gene und Faktoren

Reduktasegene

AtFRO2 Das Gen für die Fe(III) Chelat Reduktase aus *Arabidopsis*, *AtFRO2*, konnte aus Wurzeln von an Eisenmangel leidenden Pflanzen erfolgreich kloniert werden (Robinson u. a., 1999). Dies konnte aufgrund der Sequenzähnlichkeit zu den *FRE* Genen aus Hefe geschehen, die dort für Fe(III) Reduktasen kodieren. Außerdem wurde gezeigt, dass *AtFRO2* für das *frd1-1* Allel kartiert werden kann.

Eine Expression von *AtFRO2* in der *frd1-1* Mutante konnte die Funktion der Fe(III) Chelat Reduktase wieder herstellen.

AtFRO2 wird in Wurzeln unter Eisenmangelbedingungen exprimiert (Robinson u. a., 1999). Die mRNA von *AtFRO2* konnte in den Epidermiszellen der Wurzeln lokalisiert werden, ähnlich der Lokalisation des Eisentransporters *AtIRT1*, der an späterer Stelle noch ausführlich beschrieben wird. Durch Untersuchungen an *35s::AtFRO2* Pflanzen wurde festgestellt, dass auch eine posttranskriptionelle Kontrolle von *AtFRO2* stattfindet, da auch bei diesen für *AtFRO2* stark überexprimierenden Pflanzen keine Fe(III) Reduktase Aktivität bei ausreichender Eisenversorgung vorhanden war (Connolly u. a., 2003).

AtFRO2 hat Sequenzähnlichkeit mit der menschlichen phagozytischen NADPH gp91^{phox} Oxidoreduktase sowie den Fe(III) Chelat Reduktasen aus Hefe, vor allem in den Häm- und Nukleotid-Kofaktor Bindestellen zeigt sich diese Ähnlichkeit. Dies ist übereinstimmend mit seiner Rolle im Elektronentransfer vom cytosolischen NADPH zum extrazellulären Fe(III). Somit gehört *AtFRO2* zur Kategorie der Flavocytochrome, die Elektronen über Membranen hinweg transportieren (Robinson u. a., 1999).

Transportergene

AtIRT1 Die Expression einer Arabidopsis cDNA Bank in der Hefedoppelmutante *fet3fet4* (ferrous transporter), die sowohl in der hoch- als auch der niedrigaffinen Aufnahme von Eisen gestört ist, ermöglichte es, ein Gen für einen Fe(II) Transporter zu klonieren, der den Mutantenphänotyp der Hefe durch Komplementation retten konnte (Eide u. a., 1996). Dieses Gen wurde *AtIRT1* (iron-regulated transporter) genannt. Das *AtIRT1* Gen ist jedoch nicht das Äquivalent zu den FET3 und FET4 Eisentransportern der Hefe. Stattdessen kodiert es für ein Mitglied einer neuen Familie von eukaryontischen Metallionen Transportern, die ZIP (ZRT, IRT- LIKE TRANSPORTERS) genannt werden Guerinot (2000). Ähnliche Sequenzen wurden in Reis, Hefe, Nematoden und Menschen gefunden. *AtIRT1* kodiert für ein Protein mit acht transmembranen Domänen. Vier Histidin-Glycin Wiederholungen bilden wahrscheinlich die mögliche Metallbindungsstelle zwischen transmembraner Domäne 3 und 4 (Eng u. a., 1998; Kerkeb u. a., 2008).

AtIRT1 wird in Wurzeln exprimiert, wenn die Pflanzen unter Eisenmangelbedingungen angezogen wurden (Eide u. a., 1996; Connolly u. a., 2002; Vert u. a., 2002), was darauf schließen lässt, dass *AtIRT1* zur Eisenaufnahme benötigt wird. Diese Rolle wurde dann durch die Charakterisierung einer *irt1* knock-out Mutante bestätigt (Vert u. a., 2002). Die *irt1* Mutante ist sehr stark chlorotisch und hat

einen starken Wachstumsdefekt, wenn sie auf Erde angezogen wird, so dass sie abstirbt. Wenn sie jedoch mit exogenem Eisen behandelt wird, ist dieser Phänotyp umkehrbar, höchstwahrscheinlich durch andere, noch nicht charakterisierte niedrig affine Eisenaufnahmetransporter. Zudem können die Wurzeln der *irt1* Mutante kein Eisen aufnehmen. Da AtIRT1 an der Plasmamembran der Wurzelepidermiszellen lokalisiert werden kann, ist seine Bedeutung als Transporter von Eisen zur Aufnahme in die Wurzel sehr wahrscheinlich. Diese Ergebnisse konnten anhand zweier anderer *irt1* Mutanten verifiziert werden (Henriques u. a., 2002), (Varotto u. a., 2002). Somit wird angenommen, dass AtIRT1 der hauptsächliche Eisentransporter an der Wurzeloberfläche von *Arabidopsis* ist (Vert u. a., 2002). Wie bei der Fe(III) Reduktase AtFRO2 auch, wird *IRT1* nicht nur transkriptionell reguliert. In 35s::*IRT1* transgenen Pflanzen wird die *IRT1* mRNA zwar konstitutiv exprimiert, jedoch wird bei Eisenmangel außer in der Wurzel das Protein nirgendwo gebildet (Connolly u. a., 2002). Diese Möglichkeit der Regulation deutet auf eine sehr schnelle Anpassungsfähigkeit der Pflanze an sich verändernde Eisenbedingungen hin, so dass eine Überversorgung mit Eisen ausgeschlossen wird.

Weitere Eisentransporter in der Pflanze Die **NRAMP** (NATURAL RESISTANCE-ASSOCIATED MACROPHAGE PROTEIN) Genfamilie von Metalltransportern in *Arabidopsis* hat sieben Mitglieder (Mäser u. a., 2001). Generell sind *NRAMPs* in vielen lebenden Organismen weit verbreitet. Sie spielen eine Rolle im Transport divalenter Metallkationen, Eisen eingeschlossen (Gunshin u. a., 1997). Ihr Name kommt von dem phagosomalen NRAMP1, welches als Effluxpumpe in der Membran arbeitet, und so die Resistenz gegenüber intrazellulären Bakterien verstärkt, indem die Metallverfügbarkeit reduziert wird (Lafuse u. a., 2000).

In *Arabidopsis* werden *AtNRAMP1*, *AtNRAMP2*, *AtNRAMP3* und *AtNRAMP4* sowohl im Spross als auch in der Wurzel exprimiert, aber nur *AtNRAMP1*, *AtNRAMP3* und *AtNRAMP4* werden unter Eisenmangel in der Wurzel angereichert (Curie u. a., 2000). Die Überexpression von *AtNRAMP1* in Pflanzen verleiht diesen eine höhere Resistenz gegen toxische Eisenkonzentrationen (Curie u. a., 2000). Die nahe verwandten Gene *AtNRAMP3* und *AtNRAMP4* zeigen ähnliche gewebespezifische Expressionsmuster, eisenabhängige transkriptionelle Regulation sowie subzelluläre Lokalisation am Tonoplasten, der Membran der Vakuole (Thomine u. a., 2003; Lanquar u. a., 2005). Die Einzelmutanten für diese Gene zeigen keinen speziellen Phänotyp, die Keimung der Doppelmutante *nramp3nramp4* wird unter Eisenmangel jedoch gestoppt, was wiederum durch Eisengabe aufgehoben werden kann (Lanquar u. a., 2005). Zudem haben die Samen der Mutanten Eisen gespeichert, sie können die Eisenvorräte jedoch nicht aus den vakuolären Globoiden aufrufen. Diese Ergebnisse deuten auf eine redundante Funktion von

ArNRAMP3 und AtNRAMP4 in der Mobilisierung von Eisen aus der Vakuole während der Samenentwicklung hin.

Die Suche nach Homologen des Maisgens **YS1** in *Arabidopsis thaliana* führte zur Identifizierung von acht Genen, die **YSL** (YELLOW STRIPE-LIKE) genannt wurden (Curie u. a., 2001). Da Pflanzen, die nicht zur Gruppe der Strategie II Pflanzen gehören, keine PS synthetisieren und sekretieren, wurde vermutet, dass die YSLs für den Transport von Metallen verantwortlich sind, die an pflanzeigenen PS oder Nicotianamin (NA) gebunden sind (Colangelo und Guerinot, 2006). NA wird in allen Pflanzen produziert und kann Eisen binden (von Wiren u. a., 1999).

Drei Mitglieder der YSL Genfamilie, *AtYSL1*, *AtYSL2* und *AtYSL3* wurden kürzlich genauer untersucht. *AtYSL1* ist ein Gen, welches im Xylemparenchym der Blätter exprimiert wird. Sein Transkriptlevel steigt bei Eisenüberschuss an (Jean u. a., 2005). Basierend auf dem Phänotyp der *ysl1* Mutante wurde eine Rolle von *AtYSL1* im Ferntransport von Eisen und NA sowie deren Lieferung an Samen vorgeschlagen. Weitere Untersuchungen ergaben, dass *AtYSL1*, *AtYSL2* sowie *AtYSL3* eine Rolle in der Eisentranslokation spielen (zusammengefasst von Curie u. a. (2009).

Eine weitere Klasse von Transportern, die in die intrazelluläre Verteilung von Eisen involviert ist, wird repräsentiert von **AtIREG2**. *AtIREG1*, *AtIREG2* und *AtIREG3* sind in ihrer Sequenz ähnlich den tierischen IREGs (IRON-REGULATED PROTEINS), die auch FERROPORTINE (FPNs) genannt werden (Schaaf u. a., 2006) und für die eine Rolle im Eisenexport gezeigt wurde, wie z.B. das *IREG1* Gen aus Säugetieren (McKie u. a., 2000). *AtIREG2* ist beteiligt an der eisenabhängigen Nickel Detoxifizierung in Wurzeln. Seine Expression ist unter Eisenmangel klar hochreguliert und es kann im Tonoplasten lokalisiert werden (Schaaf u. a., 2006).

Die *Arabidopsis* Mutante *frd3*, auch *man1* genannt (Delhaize, 1996), ist unfähig, die Fe(III) Reduktase in *Arabidopsis* Wurzeln bei ausreichender Eisenversorgung auszuschalten (Yi und Guerinot, 1996). Die *frd3* Pflanzen akkumulieren verschiedene Metalle wie Mangan und Eisen durch die ständige Aktivierung von *AtIRT1* (Delhaize, 1996). Das **AtFRD3** Gen wird wurzelspezifisch exprimiert und kodiert für ein Transmembranprotein, welches zur Familie der MATE (MULTIDRUG AND TOXIN EFFLUX TRANSPORTERS) Proteine gehört (Rogers und Guerinot, 2002). Es wurde gezeigt, dass *AtFRD3* in der Eisenlokalisierung funktioniert, wobei es einen Eisenchelator, der für die effiziente Eisenaufnahme aus dem Xylem oder dem Apoplasten in Blattzellen notwendig ist, in das Xylem transportiert (Green und Rogers, 2004). Ein möglicher Eisenchelator, der durch *AtFRD3* transportiert wird, ist Citrat (Durrett u. a., 2007).

Ein weiterer Eisentransporter wurde mit **AtVIT1** (VACUOLAR IRON TRANSPORTER) gefunden, der vor allem in der korrekten Beladung von Embryonen mit Eisen

in deren Vakuolen eine Rolle spielt. Untersuchungen an der *vit1-1* Mutante haben gezeigt, dass die Versorgung des Embryo mit Eisen eine kritische Rolle in der Entwicklung spielt. So keimen *vit1-1* Samen nur bedingt bei Eisenmangel (Kim u. a., 2006).

Weitere Gene, die mit Eisenmangel assoziiert werden

AtNAS Die Tomatenmutante *chloronerva* akkumuliert hohe Mengen an Eisen (Stephan und Scholz, 1993), und verhält sich so als ob sie kontinuierlich an Eisenmangel leiden würde, selbst bei ausreichender Eisenversorgung. Die Mutante zeigt sehr ausgeprägt den typischen Eisenmangel-Phänotyp, die intervenöse Blattchlorose, wobei jedoch der Mechanismus zur hochaffinen Eisenaufnahme inklusive Protonenextrusion und Fe(III) Reduktion stetig angeschaltet ist. Das Ergebnis von dieser übermäßigen Eisenaufnahme ist der sehr hohe Eisengehalt im Spross, der auch zu örtlichen Blattnekrosen führen kann. Das Pfropfen des *chloronerva*-Sprosses auf den Wildtyp-Wurzelstock oder umgekehrt führt zu einer Normalisierung des Mutantenphänotypes, was darauf hin deutet, dass eine Eisen transportierende Substanz fehlt (Ling u. a., 1999). Diese beobachteten Auffälligkeiten korrelierten mit einem Mangel an Nicotianaminsynthese (Stephan und Gruen, 1989), die auf eine Mutation im *LeNAS* Gen, die für die Nicotianamin Synthase (NAS) kodiert, zurückzuführen ist. Diese Synthase wandelt S-Adosylmethionin in Nicotianamin um (Ling u. a., 1999). Das *LeNAS* Gen wurde kartiert und konnte so auf dem langen Arm des Chromosoms 1 lokalisiert werden (Ling u. a., 1996) und später durch Map-basierte Klonierung isoliert werden Ling u. a. (1999). Die *chloronerva* Mutante ist NA auxotroph und Applikation von NA auf Wurzeln oder Blätter führt zur phänotypischen Rettung (Stephan und Scholz, 1993). Es wurde hypothetisiert, dass in *chloronerva* Zellen Eisen aufgrund des fehlenden NA nicht mit einem Sensorprotein reagieren kann, so dass dieser Repressor ungesättigt bleibt und die Eisenaufnahme kontinuierlich bestehen bleibt Scholz u. a. (1992). Dies könnte erklären, warum die NA-freie Mutante zwar an Eisenmangel leidet, aber die Eisenmangelantwort nicht ausschalten kann (Stephan und Scholz, 1993). Auf molekularer Ebene führt der Mangel an NA in der *chloronerva* zu ständiger Expression von *LeIRT1* und *LeNRAMP1*, unabhängig von der Eisenversorgung. Diese Regulierung ist ihrerseits abhängig von einem funktionellen *LeFER* Gen, auf das später eingegangen wird. So konnte geschlossen werden, dass *LeNAS* für die genaue Regulierung von *LeIRT1* und *LeNRAMP1* benötigt wird (Bereczky u. a., 2003).

NA kommt in allen Pflanzen vor und chelatiert dort Metallkationen, inklusive Eisen. Seine Rolle als Vermittler des Eisentransports könnte auch die Phänotypen der

chloronerva Mutante erklären (Stephan u. a., 1994, 1996). Beweis hierfür ist, dass die Konzentrationen von NA im Phloem mit denen von Eisen und anderen Metallen korrelieren und dass die NA-freie Mutante *chloronerva* einen ausgeprägten Eisenmangel-Phänotyp zeigt (Stephan und Scholz, 1993; Pich und Scholz, 1996). Es wurde auch gezeigt, dass NA sowohl Fe(II) als auch Fe(III) chelatieren kann und eine Rolle im Auffangen vom Eisen um die Zelle vor oxidativen Schäden zu bewahren, wurde vorgeschlagen (von Wiren u. a., 1999). Zusätzlich konnte die zelluläre Verteilung von NA in Abhängigkeit der Eisenversorgung sowohl in Tomaten als auch in Erbsen gezeigt werden. Während NA bei geringer und normaler Eisenversorgung vor allem im Cytoplasma gefunden wurde, wurde NA bei einer Eisenübersorgung vor allem in der Vakuole gefunden, was seine mögliche Rolle bei der Eisen Detoxifizierung unterstützt (Pich u. a., 2001). Weitere Untersuchungen wurden an Tabakpflanzen gemacht, die das Gerste **HvNAAT** Gen konstitutiv exprimieren (Takahashi u. a., 2003). In Gräsern ist das NAAT Gen für den Transfer von Aminogruppen von NA zur Biosynthese von Phytosiderophoren verantwortlich (2.2.5). So wurden die Tabakpflanzen einem Mangel an NA ausgesetzt, der zu Fehlfunktionen im internen Metalltransport, intervenöser Chlorose und abnormal geformten und sterilen Blüten führte. Diese Untersuchungen zeigen die essentielle Rolle von NA bei Wachstum, Blütenentwicklung und Fruchtbarkeit der Pflanzen (Takahashi u. a., 2003).

Das *Arabidopsis thaliana* Genom enthält vier NA Synthase Gene, die *NAS* Gene (Suzuki u. a., 1999; Bauer u. a., 2004a). Das Ausschalten jeweils einzelner *NAS*-Gene führte nicht zu Veränderungen der Phänotypen. Kreuzungen der einzelnen knock-out Mutanten miteinander führten zu zwei verschiedenen Mutanten, bei denen alle vier Gene ausgeschaltet wurden. Die *nas4x-1* Mutante zeigte dabei einen stärkeren chlorotischen Phänotyp erst im reproduktiven Stadium der Pflanzenentwicklung. Die *nas4x-2* Mutante jedoch zeigte bereits während des vegetativen Stadiums einen stark chlorotischen Phänotyp, der vergleichbar ist mit der Tomatenmutante *chloronerva*. Der Unterschied zwischen der *nas4x-1* und *nas4x-2* konnte aufgrund zweier verschiedener Allele für *nas-2* erklärt werden. In der *nas4x-2* Mutante konnte kein Gehalt an NA festgestellt werden, was zeigt, dass die NA Synthese ohne diese vier *NAS* Gene nicht mehr möglich ist. Eisenmessungen der *nas4x-1* Mutante ergaben, dass NA benötigt wird, um die Samen mit Eisen zu beladen (Klatte u. a., 2009).

Ferritine Aufgrund des hohen chemischen Potentials von Eisen, welches zu schweren Zellschädigungen führen kann, muss die Pflanze nicht nur die Aufnahme und den Transport von Eisen genau regulieren, sondern auch die Speicherung von Eisen in einer sicheren und löslichen Form. Zwei dafür wichtige Kompartimente

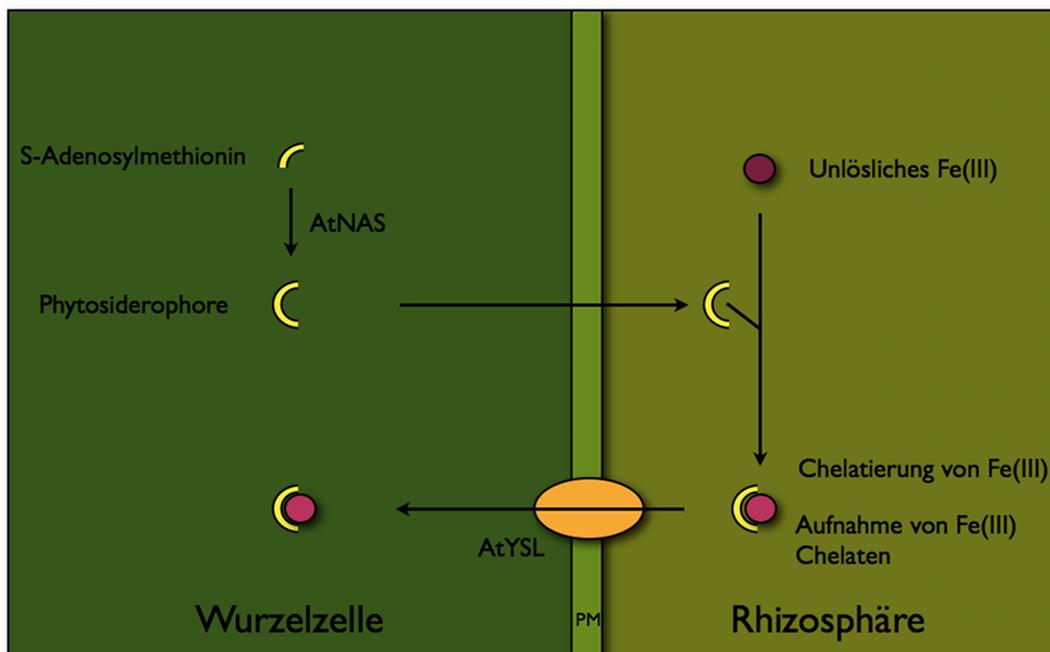


Abbildung 2.2: Strategie II der Eisenaufnahme

sind der apoplastische Raum sowie die Vakuole (Briat u. a., 1995). An der Speicherung von Eisen sind die Ferritine beteiligt, eine Klasse multimerer Proteine, die als Eisenpuffer innerhalb der Zelle wirken (Harrison und Arosio, 1996). Ferritine spielen in fast allen Organismen eine wichtige Rolle. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass in Pflanzen Ferritine vor allem eine wichtige Rolle beim Schutz vor reaktiven Sauerstoff-Spezies spielen (Ravet u. a., 2009; Briat u. a., 2010).

2.2.5 Strategie II

Pflanzen der Strategie II Gruppe der Eisenaufnahme, die Gräser, zeichnen sich durch die Exkretion von Phytosiderophoren (PS) aus. Ein Beispiel ist die Mugininsäure in Gerste oder die Avininsäure in Hafer. Diese PS lösen sehr effizient das Fe(III) aus dem Boden in dem sie es chelatieren. Desweiteren aktivieren diese Pflanzen einen hochaffinen Mechanismus zur Aufnahme dieser PS-Fe(III) Komplexe in die Pflanze (Römheld, 1987). Diese Prozesse werden unter Eisenmangel durch Hochregulierung der beteiligten Gene aktiviert.

Generell wird angenommen, dass die Strategie II effektiver ist als die Strategie I. Strategie II Pflanzen können auch auf kalkreichen Böden wachsen, auf denen Strategie I Pflanzen nicht wachsen können. Ein Grund könnte sein, dass der Ablauf des Strategie II Mechanismus unabhängiger vom pH Gehalt des Bodens ist (Guerinot und Yi (1994).

Detailliertes Wissen über den Strategie II Mechanismus der Eisenaufnahme hat stark zugenommen, seit PS in Spülungen von Wurzeln Eisenmangel leidender Gerste- und Haferpflanzen gefunden wurden (Takagi, 1976, 1993). Eine Ähnlichkeit dieser PS mit NA wurde gefunden. Später wurde dann bekannt, dass NA ein Zwischenprodukt in der Biosynthese von PS der Mugininsäurefamilie ist. Obwohl NA eine Verbindung ist, die sowohl in Dikotyledonen als auch in Monokotyledonen gebildet wird, beschränken sich die weiteren Schritte zur Synthetisierung der Mugininsäuren ausschließlich auf die Gräser. Das wichtigste Enzym dieser Synthese ist die Nicotianamin-Aminotransferase NAAT (Shojima u. a., 1990; Ohata u. a., 1993; Kanazawa u. a., 1994, 1995), die den Transfer eines Aminosäurerests auf NA katalysiert. Dies resultiert in der Bildung der 2'-Desoxymugininsäure, der direkten Vorstufe aller Mugininsäuren (Shojima u. a., 1990). Die nachfolgende Hydroxylierung von 2'-Desoxymugininsäure führt zur Bildung aller weiteren Mugininsäuren (Nakanishi u. a., 1993; Okumura u. a., 1994; Nakanishi u. a., 2000). Die Aufnahme von PS-Fe(III) Komplexen erfolgt über einen speziellen Transporter. Das Gen welches für diesen Transporter kodiert, wurde durch die Untersuchungen an der *yellow stripe1* (*ys1*) Mutante in Mais entdeckt. Diese Mutante ist nicht in der Lage, bei Eisenmangel PS-Fe(III) Komplexe aufzunehmen (Wiren u. a., 1994). Das *ZmYS1* Gen kodiert für ein Protein der Plasmamembran aus der OPT (OLIGOPEPTIDE TRANSPORTER) Familie (Yen u. a., 2001). Sowohl die Transkription als auch der Proteinlevel werden bei Eisenmangel hochreguliert. Dies passiert in Wurzeln und im Spross, wo *ZmYS1* als protonen-gekoppelter Symporter für den Transport von Fe(III)-PS Komplexen und Fe(III) NA Komplexen arbeitet (Curie u. a., 2001; Roberts u. a., 2004; Schaaf u. a., 2004).

2.2.6 Eisentransport durch die Pflanze

Die Akkumulation eines Metalls in einem Organismus ist generell gesehen eine Sache der Aufnahmekapazität sowie der intrazellulären Bindestellen. In einem vielzelligen Organismus wird die Situation durch die gewebe- und zwellspezifischen Unterschiede sowie den interzellularen Transport erschwert. Folgende Prozesse sind in der Metallakkumulation in der Pflanze beteiligt: Mobilisierung und Aufnahme aus dem Boden, Kompartimentierung und Verteilung innerhalb der Wurzel, die Effizienz der Xylembeladung und des Transports innerhalb des Xylems, Verteilung zwischen den Metall-benötigenden Stellen in den Teilen der Pflanze über dem Boden und Verteilung und Speicherung in den Blattzellen. Bei jedem dieser Schritte haben die Konzentration und Affinität der metallbindenden Chelatoren sowie das Vorhandensein und die Selektivität von Transportproteinen wesentlichen Einfluss auf die Rate der Metallakkumulation (Clemens u. a., 2002).

Die Aufnahme von Eisen in die Pflanze beginnt im Apoplasten in den Wurzelepidermiszellen (Bienfait, 1985). Sobald Eisen in den Symplasten aufgenommen wird, muss es von einer möglichen Reaktion mit Sauerstoff bewahrt werden, um eine Fällung oder eine mögliche Bildung von Sauerstoffradikalen zu verhindern. Daher wird angenommen, dass es von NA chelatiert wird, aus folgenden Gründen: (i) NA bildet mit beiden Eisenspezies Fe(II) und Fe(III) bei normalem und schwach alkalischem pH sehr stabile Komplexe (Stephan u. a., 1996), (ii) NA kommt in allen Pflanzen in allen Geweben vor (Scholz u. a., 1992), (iii) Eisen-NA Komplexe sind relativ schwache Fenton-Reagenzien (von Wiren u. a., 1999), (iv) NA Konzentrationen korrelieren mit der Lokalisierung und der Konzentration von Eisen (Pich u. a., 2001).

Der radiale Transport von Eisen von den Wurzelepidermiszellen zu den Xylemgefäßen passiert höchstwahrscheinlich als Fe(II)-NA Komplex über den Symplasten (Stephan u. a., 1996). Eisen wird dann in das Xylem geladen, wo es mit dem Transpirationsstrom durch den Xylemsaft in die über dem Boden liegenden Teile der Pflanze transportiert wird. Dieser Prozess wird vom Xylemparenchym oder den Transferzellen durchgeführt und so ist eine weitere Kontrolle der Metallaufnahme in den Spross möglich (Schurr, 1999). Eine Rolle der YSL Transporter in der Beladung des Xylems von den kortikalen Zellen ins Xylem wurde vorgeschlagen (Colangelo und Guerinot, 2006). Organische Säuren, vor allem Citrat, sind die Hauptmetallchelatoren im Xylem (White, 1981). Generell wird angenommen, dass Eisen zu Fe(III) oxidiert wird um dann als Fe(III)-Citrat Komplex durch das Xylem transportiert zu werden (Tiffin, 1966a,b; López-Millán u. a., 2000). Im Spross wird das Eisen aus dem Xylem in den apoplastischen Raum der Blattmesophyllzellen entladen. Die Aufnahme von Fe(III) durch die Blattmesophyllzellen ist wahrscheinlich abhängig von einem Reduktionsschritt durch eine Plasmamembran-gebundene Fe(III) Chelat Reduktase, die sehr wahrscheinlich das Eisen als Fe(II) vom Fe(III)-Citrat Komplex löst (Brüggemann u. a., 1993). In der Erbse und der Tomate sind die Eisenchelatreduktasen PsFRO1 und LeFRO1 im Spross exprimiert und werden durch Eisenmangel hochreguliert, daher sind sie gute Kandidaten für die Fe(III) Reduktion in Blättern (Waters u. a., 2002; Li u. a., 2004).

Die Verteilung des Eisen aus den direkt neben den Gefäßen liegenden Zellen in die Blattspreiten findet wahrscheinlich erneut als Eisen-NA Komplex statt, da in den Mutanten *chloronerva* (Tomate) und *nas4x-2* (Arabidopsis) das meiste Eisen entlang der Gefäße eingelagert ist, was dann auch den charakteristischen Phänotyp beider Mutanten verursacht (Stephan und Scholz, 1993; Klatter u. a., 2009).

Eisen kann dann von den „source“- zu den „sink“-Gewebe über das Phloem transportiert werden. Dabei ist NA eines der möglichen Phloemtransportmoleküle

für Metalle (Stephan und Scholz, 1993). Es bindet vorzugsweise Fe(II), nicht Fe(III) im Phloemsaft (von Wiren u. a., 1999). Eine niedrige, aber stetige Fe(II) Konzentration im Phloemsaft kann nachgewiesen werden (Maas u. a., 1988). Der Großteil an Eisen im Phloem liegt als Fe(III) vor, und wird durch ITP (IRON TRANSPORT PROTEIN) chelatiert, die zu den sog. LEA (LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT) Proteinen gehören (Krueger u. a., 2002). Es wird vermutet, dass NA eine Rolle bei der Be- und Entladung von Eisen in das Phloem spielt, indem es Fe(II) beim Übergang von und zu den Fe(III)-ITP Komplexen chelatiert. Die YSL Transporter sind dabei gute Kandidaten zu Be- und Entladung des Fe(II)-NA Komplexes in und aus dem Phloem. Dabei sollte auch eine Reduktase beteiligt sein, die das Eisen vom NA oxidiert und es so vorbereitet zur Bindung an die ITPs, bzw. es reduziert zur Bindung von den ITPs an NA.

Zur Induktion der Eisenmangelantworten sind sehr geringe Mengen an Eisen besser geeignet als kein Eisen. Zum Beispiel wurde eine erhöhte Eisenreduktaseaktivität in den Wurzeln der Sojabohne *Glycine max* nachgewiesen, wenn die Wurzeln mit 0,32 μM Eisen versorgt wurden, als wenn die Wurzeln mit nur 0,1 μM Eisen versorgt worden sind (Chaney u. a., 1972). Ähnliche Ergebnisse wurden für verschiedenste Arten gezeigt (Jolley u. a., 1986; Miller und Olsen, 1986; Stephan und Gruen, 1989).

Außerdem wurden in Mutanten, die sich durch verstärkte Eisenmangelantworten auszeichnen, wie z.B. *chloronerva*, höhere Eisenreduktaseaktivitäten gefunden mit normalen Eisengehalten im Medium als in Pflanzen, die auf Eisen-freiem Medium gewachsen sind (Stephan und Gruen, 1989; Grusak u. a., 1990; Grusak und Pezeshgi, 1996). Eine Stimulierung der Eisenaufnahme durch niedrige Eisengehalte, die nicht gegen null gehen, bringt möglicherweise Vorteile ökologischer Natur.

2.3 Regulation der Eisenaufnahme

Pflanzen müssen zwei Probleme während der Eisenbeschaffung beherrschen. Auf der einen Seite müssen sie mit der niedrigen Verfügbarkeit von Eisen im Boden umgehen, welche häufig Eisenmangel in der Pflanze verursacht. Zum Anderen ist Eisen hochtoxisch für die Zellen, wenn es nicht ausreichend chelatiert und kompartimentisiert wird. Daher ist die Koordination der Eisenaufnahmeprozesse gemäß den Anforderungen für das Wachstum von absoluter Notwendigkeit zum Überleben, so dass eine strikte Regulation stattfindet. Diese Regulation passiert auf verschiedenen Ebenen.

2.3.1 Transkriptionelle Regulation

Viele der biologischen Prozesse in einer Pflanze werden auf der Transkriptionsebene reguliert. Viele Veränderungen in der Genexpression unterliegen den Reaktionen der Pflanze auf Umweltbedingungen, Stresssituationen wie z.B. Licht, Temperatur sowie der Verfügbarkeit von Nährstoffen, den Abwehrreaktionen gegen Pathogene und vielem anderem. In Pflanzen als auch in Tieren basiert die Entwicklung auf der Fähigkeit der Zellen zur differentiellen Genexpression (Benfey und Weigel, 2001). Veränderungen der Genexpression werden mittlerweile als Hauptursache für die Diversität und die Anpassungen der morphologischen Evolution eukaryontischer Organismen angesehen (Tautz, 2000). Vor allem die morphologischen Anpassungen, die bei der Domestizierung von Pflanzen sowie der Verbesserung der Kulturpflanzen in der Landwirtschaft wurden assoziiert mit Mutationen in Transkriptionsfaktoren (Peng u. a., 1999), Änderungen in deren Expression (Wang u. a., 1999) oder Änderungen in der Expression anderer regulatorischer Proteine (Frary u. a., 2000).

Die Proteine, die in der Transkription von Eukaryonten involviert sind, können in vier verschiedene funktionelle Gruppen eingeteilt werden: (1) der grundlegende Transkriptionsapparat und intrinsisch assoziierte Faktoren, die auch als generelle Transkriptionsfaktoren bekannt sind; (2) große Co-Aktivatoren, die aus vielen Untereinheiten bestehen, sowie weitere Cofaktoren; (3) Sequenz-spezifische DNA-bindende Transkriptionsfaktoren und (4) Chromatin-zugehörige Proteine. Im Gegensatz zu den Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie, die generell hoch konserviert sind, sind Co-Regulatoren und Transkriptionsfaktoren unter Eukaryonten weit voneinander abgewichen (Lemon und Tjian, 2000).

In Pflanzen wurde die Eisenhomöostase hauptsächlich auf Genexpressionslevel beschrieben. Ein Mechanismus, der der IRE/IRP Kontrolle in Tieren ähnlich ist (Muckenthaler u. a., 2008), wurde bisher noch nicht beschrieben (2.3.3.3).

2.3.1.1 Das *LeFER* Gen und das *AtFIT* Gen

Der erste identifizierte Regulator der Eisenhaushalts in Pflanzen ist das ***LeFER*** Gen aus Tomaten (Ling u. a., 2002). Die chlorotische Tomatenmutante *fer* (*T3238fer*) ist unfähig auf Eisenmangel die Strategie I Mechanismen anzuschalten. Diese beinhalten auch die Protonenextrusion in die Rhizosphäre, die Erhöhung der Fe(III) Chelatreduktase Aktivität sowie die Aufnahme von Fe(II). Daher ist die Mutante auf Erde nicht überlebensfähig. Jedoch kann sich die Pflanze normal entwickeln, wenn die Pflanze mit hohen Konzentrationen des Eisenkomplexes FeHEDTA versorgt wird, oder wenn sie auf einen wildtypischen Wurzelstock

aufgepfropft wird (Brown u. a., 1971; Brown und Ambler, 1974). Reziprokes Pfropfen der Mutante auf den Wildtyp führte zu der Annahme, dass das *LeFER* Gen in der Wurzel, aber nicht im Spross benötigt wird (Brown u. a., 1971).

Genetische Analysen zeigten, dass die *fer* Mutation ein monogenes rezessives Merkmal ist, welches im Zentrum des Chromosoms 7 lokalisiert werden konnte (Ling u. a., 1996). Das *LeFER* Gen wurde durch Map-basierte Klonierung isoliert. Es wurde vorhergesagt, dass es für ein basic helix-loop-helix (BHLH) Protein kodiert, welches zur Induktion der Eisenmobilisation in Tomatenwurzeln benötigt wird (Ling u. a., 2002). Die Effekte der *fer* Mutation wurden sowohl bei niedriger als auch bei ausreichender Eisenversorgung auf physiologischer und morphologischer Ebene nachgewiesen (Ling u. a., 2002). Die *fer* Mutante zeigte dabei verringerte Fe(III) Reduktase Kapazität sowie eine verringerte *LeIRT1* Expression im Vergleich zu Wildtyp Pflanzen. Morphologisch reagieren *fer* Mutanten mit einer niedrigeren Anzahl von Wurzelhaaren an den Wurzelspitzen der Lateralwurzeln sowie signifikant ein verringertes Wurzelgewicht, welches durch das geringere Wachstum von Seitenwurzeln verursacht wird. Eine Expression des *LeFER* Gens wurde in Wurzeln und Wurzelspitzen, sowie in geringerem Maße in Hypokotylen von Keimlingen, jedoch nicht in Kotyledonen oder Blättern nachgewiesen. Kein signifikanter Unterschied in der Expression wurde festgestellt, wenn die Pflanzen entweder auf niedrigem oder ausreichendem Eisengehalt angezogen wurden (Brumbarova und Bauer, 2005; Ling u. a., 2002).

Desweiteren wurde mit in situ Hybridisierung nachgewiesen, dass das *LeFER* Gen innerhalb der Wurzel unterschiedlich stark exprimiert wird. In der unteren Wurzelzone, in der noch keine Vaskulatur entwickelt ist, wurde *LeFER* in der Epidermis und den äußeren kortikalen Zelllagen nachgewiesen. In der Elongationszone konnte *LeFER* hauptsächlich in der Epidermis nachgewiesen werden. In der Wurzelhaarzone war die Expression von *LeFER* auf den vaskulären Zylinder zwischen Xylem und Phloem begrenzt. Eine unterschiedliche Versorgung der Pflanzen mit Eisen zeigte dabei fast keinen Einfluss (Brumbarova und Bauer, 2005). Da die *fer* Mutante nicht in der Lage ist, die Eisenmangelantworten weder auf morphologischer, physiologischer oder Genexpressionsebene anzuschalten, wurde gefolgert, dass der primäre Defekt in dieser Mutante durch ein regulatorisches Defizit zustande kommt (Ling u. a., 2002).

Die Expression der Gene für die Fe(III)-Chelat Reduktase *LeFRO1* (Li u. a., 2004), sowie für die Transporter *LeIRT1* und *LeNRAMP1* (Bereczky u. a., 2003) ist in den Wurzeln von *fer* Pflanzen runterreguliert, dies deutet darauf hin, dass *LeFER* oberhalb des Eisenaufnahmemechanismus arbeitet. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die *LeNRAMP1* Expression mit der *LeFER* Expression im vaskulären Parenchym kolokalisiert. Jedoch war das *LeFER* Gen, wenn es ektopisch expri-

miert wurde, nicht ausreichend, um die Expression von *LeIRT1* und *LeNRAMP1* zu aktivieren (Bereczky u. a., 2003). Dies deutet darauf hin, dass mind. eine weitere Ebene der Regulation die Funktion von LeFER beeinflusst.

Eine Doppelmutante mit *fer* und *chloronerva* wurde charakterisiert. Der schwerwiegende Phänotyp, zusammen mit einer signifikant verringerten Expression von *LeIRT1* und *LeNRAMP1* in diesen Mutantepflanzen, deuten auf einen synergistischen Effekt des Fehlens der *LeFER* und *LeNAS* Gene hin. Dies könnte eine Rolle des Chelators Nicotianamin in der Signalisierung von Eisenmangel innerhalb der Pflanze aufzeigen. Interessanterweise waren die Expressionslevel sowohl von *LeIRT1* als auch von *LeNRAMP1* unabhängig von der Versorgung mit Eisen und der Anwesenheit des *LeFER* Gens erhöht (Bereczky u. a., 2003), was schließen lässt, dass NA für die Regulierung dieser beiden Gene benötigt wird.

Vor wenigen Jahren wurde das Homolog von *LeFER* in *Arabidopsis thaliana* beschrieben, es wird ***AtFIT*** (Fe-DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR) genannt, vorher war das Gen veröffentlicht unter den Namen *AtFRU* (FER-LIKE REGULATOR OF IRON UPTAKE), *AtBHLH029* und *AtFIT1* (Fe-DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR 1) (Colangelo und Guerinot, 2004; Jakoby u. a., 2004; Yuan u. a., 2005; Bauer u. a., 2007). Es wurden 162 BHLH Proteine vorhergesagt (Heim u. a., 2003; Toledo-Ortiz u. a., 2003; Bailey u. a., 2003). *AtFIT* ist davon das nächste Homolog zu dem *LeFER* Gen aus Tomate (Bauer u. a., 2004b). Es konnte die Tomaten *fer* Mutante funktionell komplementieren (Yuan u. a., 2005). Es wurde gezeigt, dass *AtFIT* für die Hochregulierung der Expression von Genen des Eisenmobilisierungsmechanismus notwendig ist. Daher wird angenommen, dass die Eisenaufnahme in Dikotyledonen durch konservierte Regulatoren kontrolliert wird (Jakoby u. a., 2004).

Die mRNA von *AtFIT* konnte, ähnlich wie bei *AtFRO2* und *AtIRT1* in den äußeren Zelllagen der Wurzeln nachgewiesen werden, vor allem unter Eisenmangel Colangelo und Guerinot (2004). *fit* Mutanten waren stark chlorotisch und benötigten die Applikation von externem Eisen um zu überleben. Sowohl im Spross als auch in den Wurzeln akkumulierten diese Mutanten weniger Eisen als Wildtyppflanzen Colangelo und Guerinot (2004). Analysen mit der Microarray Technik enthüllten viele Gene, die unter der Kontrolle von *AtFIT* sind. Diese waren entweder noch nicht mit der Eisenhomöostase in Zusammenhang gebracht worden oder es waren Gene, die bereits mit der Eisenversorgung der Pflanzen verknüpft waren (Colangelo und Guerinot, 2004).

Parallel zu diesen Arbeiten haben Jakoby u.a. (2004) die Funktion des *AtFIT* untersucht. Sie konnten zeigen, dass das Gen hauptsächlich in Wurzeln in einem zell-spezifischen Muster exprimiert war und durch Eisenmangel induziert wurde. Jedoch zeigten einige der Ergebnisse, die die Expressionslevel von *AtFRO2* und

AtIRT1 betrafen, Unterschiede zu den Ergebnissen von Colangelo und Guerinot (2004), wahrscheinlich aufgrund unterschiedlicher Wachstumsbedingungen sowie unterschiedlicher Mutantenallele. Jakoby u.a. (2004) zeigten, dass in den *fit* knock-out Mutanten die Expression von *AtFRO2* und *AtIRT1* runterreguliert war, jedoch in einer *AtFIT* Überexpressionslinie bei niedriger Eisenversorgung sowohl in Wurzeln als auch in Blättern induziert werden konnte. Diese Ergebnisse wurden durch Messungen der Fe(III) Reduktase Aktivität sowie durch Chlorophyllmessungen bestätigt.

Die beiden Gene *LeFER* und *AtFIT* scheinen ähnliche Aufgaben in ihren jeweiligen Organismen in der Kontrolle der Eisenmangelantworten haben (Colangelo und Guerinot, 2004; Bauer u. a., 2004a,b). Beide Gene, *LeFER* und *AtFIT* sind essentiell und haben eine zentrale Funktion in der Induktion des *AtFRO2/AtIRT1* Systems in Wurzeln. Die beiden BHLH Gene selbst werden durch niedrigen Eisengehalt im Medium hochreguliert, wobei diese Hochregulation nicht so stark ist wie die von *AtIRT1*. Überexpressionsstudien zeigten, dass *LeFER* und *AtFIT* die Eisenaufnahmeantworten verstärken können, dies ist jedoch nur bei Eisenmangel möglich, was daraufhin deutet, dass eine zusätzliche Regulierung durch posttranskriptionelle Aktivierung durch Eisenmangel bzw. durch Inaktivierung bei hohem Eisengehalt erfolgt (Jakoby u. a., 2004; Brumbarova und Bauer, 2005).

Die große Familie der BHLH Transkriptionsfaktoren ist von Hefen bis zu Säugertieren konserviert. BHLH Proteine stellen die zweitgrößte Familie von Transkriptionsfaktoren in Pflanzen dar und regulieren eine Vielzahl biologischer Prozesse (Riechmann u. a., 2000). Die konservierte BHLH Domäne besteht aus ca. 18 hydrophilen und basischen Aminosäuren, die die basische Region bilden. Diese erlaubt eine Bindung an DNA an den Hexanukleotiden E-Box Sequenzen 5'-CANNTG-3'. Zwei Abschnitte von hydrophoben Aminosäuren, die durch eine Schleife getrennt sind, formen zwei amphiphatischen α -Helices, dadurch können diese Proteine Homo- und/ oder Heterodimere bilden (Voronova und Baltimore, 1990), (Toledo-Ortiz u. a., 2003).

Die Expression der *Arabidopsis* Eisenmangelantwort Gene *AtFRO2*, *AtIRT1*, *AtIRT2* und *AtNRAMP1*, *AtNRAMP3* und *AtNRAMP4* wird durch den Eisenstatus auf Ebene der Transkriptakkumulation kontrolliert. Die mRNA dieser Gene akkumuliert in Wurzeln unter Eisenmangel, wird durch eine Wiederversorgung mit Eisen jedoch rasch wieder abgebaut (Eide u. a., 1996; Curie u. a., 2000; Connolly u. a., 2002). Das gleiche gilt für die Tomatengene *LeFRO1*, *LeIRT1* und *LeNRAMP1* (Bereczky u. a., 2003; Li u. a., 2004).

2.3.1.2 Weitere BHLH Proteine, die durch den Eisenstatus kontrolliert werden

In einer Studie von Vorwieger u.a. (2007) wurden zwei Gruppe Ib BHLH Transkriptionsfaktoren untersucht, die durch Eisenmangel sehr stark induzierbar waren, **AtBHLH038** und **AtBHLH039**. Sie zeigten außerhalb der BHLH Domäne keine Sequenzähnlichkeit zu *AtFIT*. Konstitutive Expression dieser Gene führte zu einer verstärkten, aber eisenunabhängigen Exkretion von Riboflavinen (Vorwieger u. a., 2007). Die Eisenabhängigkeit dieser beiden BHLH Transkriptionsfaktoren und zweier weiterer durch Eisenmangel induzierbarer Transkriptionsfaktoren naherwandten Homologen **AtBHLH100** und **AtBHLH101** wurde in einer weiteren Studie unserer Arbeitsgruppe von Wang u.a. (2007) genauer untersucht. Für alle vier BHLH Gene konnte gezeigt werden, dass ihre Mengen an mRNA unter Eisenmangel im Vergleich zu normalen Eisenbedingungen anstiegen. Dies konnte sowohl in Wurzeln als auch in Blättern nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu findet eine Expression der eisenregulierten Gene *AtFIT*, *AtIRT1* und *AtFRO2* nur in der Wurzel statt. Die stärkste Induktion sowohl der vier BHLHs als auch von *AtFIT*, *AtIRT1* und *AtFRO2* wurde 24 Stunden nach Einsetzen des Eisenmangels nachgewiesen. Einzelmutanten der vier BHLH Gene zeigten keinerlei Phänotyp, was ebenso wie die sehr ähnlichen Expressionsmuster auf eine redundante Funktion hindeutet (Wang u. a., 2007b).

In Blättern von Wildtyppflanzen konnte ein starker Rückgang der Expression bei sehr hoher Eisenversorgung oder Zink- oder Kupfermangel beobachtet werden. Zusammen mit weiteren Ergebnissen dieser Studie deutet dies daraufhin, dass die vier eisenregulierten BHLHs keine generelle Stressantwort betreiben, sondern eine eher spezifische Antwort auf Eisenmangel darstellen.

Eine Abhängigkeit der Expression von *AtFIT* konnte nicht festgestellt werden, da in der *fit* Mutante die Expression aller vier BHLH Gene generell erhöht war im Vergleich zum Wildtyp. Andersrum konnte gezeigt werden, dass die Induktion von *FIT* nicht von *AtBHLH100* abhängig ist (Wang u. a., 2007b).

Die vier *AtBHLH* Proteine lokalisieren vor allem in der Wurzelhaarzone und in den Blättern, was im Gegensatz zur Lokalisation von *AtFIT* und *AtIRT1* steht, die in der Wurzelspitze und höheren Wurzelbereichen exprimiert werden (Wang u. a., 2007a).

Kürzlich wurde ein weiterer BHLH Transkriptionsfaktor entdeckt, der eisenabhängig reagiert, **POPEYE** (PYE). Dieser könnte in der Perizykel-spezifischen Eisenmangelantwort eine wichtige Rolle spielen in dem er als positiver Regulator das Wachstum und die Entwicklung unter Eisenmangelbedingungen kontrolliert (Long u. a., 2010). PYE hilft in der Aufrechterhaltung der Eisenhomöostase indem

es bekannte Eisenhomöostasegene wie *FRO3*, *NAS4* und *ZIF1* durch Bindung an deren Promotoren sowie Gene, die an Transkription, Entwicklung und Stressantwort beteiligt sind, reguliert. *PYE* interagiert physisch mit *PYE* Homologen, wie z. B. dem IAA-Leu Resistant3 (*ILR3*), einem weiteren BHLH Transkriptionsfaktor der Metallhomöostase. Außerdem wurde **BRUTUS** (*BTS*) entdeckt, eine putative E3 Ligase, die mit *ILR3* interagiert. *BTS* verfügt über Metall- und DNA Bindedomänen. Es reguliert die Antwort der Pflanze auf Eisenmangel in negativer Art. *PYE* und *BTS* sind dabei ko-reguliert und die Autoren hypothetisieren, dass die Proteininteraktionen zwischen *PYE*, *PYE* Homologen und *BTS* wichtig für die Eisenhomöostase sind (Long u. a., 2010).

2.3.1.3 Weitere transkriptionelle Regulatoren in Pflanzen

Ein putatives BHLH Transkriptionsfaktorgen ***OsIRO2*** wurde identifiziert bei einem 22K oligo-DNA Microarray Experiment mit Reis. Dabei wurde festgestellt, dass es während Eisenmangel sowohl in Wurzeln als auch Spross stark exprimiert wurde. Das Homolog aus Gerste, *HvIRO2*, konnte auch durch Eisenmangel induziert werden, und es wurde festgestellt, dass *IRO2* in allen Gräsern hochkonserviert ist (Ogo u. a., 2006). Die Bindesequenz von *OsIRO2* (5´- CACGTGG - 3´) konnte bestimmt werden und ähnliche Sequenzen konnten in Promoterregionen verschiedener Gene, die an der Eisenaufnahme durch Produktion von Phytosiderophoren beteiligt sind, gefunden werden, wie z.B. *OsNAS1*, *OsNAS3*, *OsIRT1*, *OsFDH*, *OsAPT1* sowie *IDS3*. Dies deutet daraufhin, dass *OsIRO2* in der Regulation dieser Gene unter Eisenmangelbedingungen beteiligt ist (Ogo u. a., 2006).

Die Kontrolle der Genexpression durch Transkriptionsfaktoren wird durch cis-regulatorische Elemente in den Promoterregionen der jeweiligen Gene bestimmt. Studien an Genen, die in der Eisenmangelantwort verschiedener Pflanzen beteiligt sind, deckten Eisen-reagierende cis-Elemente auf, wie z.B. die 16 bp lange **IDRS** (Iron-Dependent Regulatory Sequence), die zwischen Mais und Arabidopsis konserviert vorliegt und in den Promotoren von Ferritingenen gefunden worden ist. Es wurde gezeigt, dass IDRS für die geringere Expression von Ferritinen unter Eisenmangel verantwortlich ist (Petit u. a., 2001).

Zwei cis-agierende Elemente ***IDE1*** und ***IDE2*** (Iron-Deficiency Responsive Element) wurden im Promoter des Gerstegens *HvIDS2* (Iron-Deficiency Specific clone 2) identifiziert (Kobayashi u. a., 2003). *HvIDS2* kodiert für eine Dioxygenase, die in die Hydroxylierung des PS Desoxymugininsäure (DMA) involviert ist Nakanishi u. a. (2000). Die beiden cis-Elemente konnten als verantwortlich für die Induktion von *HvIDS2* durch Eisenmangel gezeigt werden. IDE Sequenzhomologe wurden auch in den Promoterregionen anderer durch Eisen induzierbarer Gene gefunden,

wie z.B. *HvNAAT*, *HvNAS1*, *HvIDS3*, *OsNAS1*, *OsNAS2*, *OsIRT1*, *AtIRT1* sowie *AtFRO2*, was auf eine Konservierung der Eisen-reagierenden cis-regulatorischen Elemente zwischen vielen Genen und Arten hindeutet (Kobayashi u. a., 2003).

In einem Hefe 1 Hybrid Screen, in dem homologe Sequenzen in den Promoterregionen von *HvIDS2* und *HvIDS3* als Köder benutzt wurden, konnte ein neuartiges DNA bindendes Gen gefunden werden, welches für einen putativen basischen Leucin-Zipper Transkriptionsfaktor kodiert. Seine Expression war im frühen Stadium des Eisenmangels hochreguliert, so dass es einen guten Kandidaten als Regulator der Eisenmangelantworten in Gerste darstellt (Itai u. a., 2000; von Wirén, 2004).

Durch vergleichende Untersuchungen in *Arabidopsis* sowie in dem Zinkhyperakkumulator *Thlaspi caerulescens*, die Cadmium oder Zink ausgesetzt waren, wurde der R2R3-MYB ähnliche Transkriptionsfaktor **MYB72** entdeckt. Die *myb72* Mutante ist sensitiv gegenüber hohen Zinkkonzentrationen sowie gegenüber Eisenmangel (van de Mortel u. a., 2008).

MYB72 wird durch Befall von *Arabidopsis* Wurzeln mit *Pseudomonas fluorescens* Kolonien aktiviert. Diese Kolonisierung führt zu einer Jasmonat- und Ethylen-abhängigen induzierten systemischen Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Pathogenen. Dabei interagiert MYB72 interessanterweise mit einem Protein der EIN (ETHYLENE INSENSITIVE) Transkriptionsfaktorfamilie, dem EIL3, was MYB72 mit dem Ethylensignalweg verknüpft. Dabei konnte MYB72 in der induzierten systemischen Resistenz epistatisch oberhalb von Ethylen platziert werden (der Ent u. a., 2008).

Zudem wurde ein weiteres durch Eisen reguliertes MYB-Protein gefunden, **MYB10**. Weitergehende Studien wurden aber bislang noch nicht unternommen (Buckhout u. a., 2009).

2.3.2 Posttranskriptionelle Regulation

Viele Pflanzenarten besitzen Strategien um abiotische Stresssituationen zu überstehen sowie auf Pathogenattacken zu reagieren. Viele dieser Reaktionen werden auf Transkriptionsebene reguliert, aber es gibt außerdem eine außergewöhnliche Diversität von posttranskriptionellen Mechanismen, die sich positiv auf die Anpassungsfähigkeit in der Entwicklung und die Adaptation an Stresssituationen auswirken. Von vielen Pflanzengenen ist bekannt, dass sie posttranskriptionell kontrolliert werden (Bailey-Serres, 1999). Posttranskriptionelle Regulation kann auf verschiedene Art und Weise erfolgen, wie z.B. alternatives Splicing, Kontrolle der mRNA Turnover Rate, Proteinmodifikationen, gezielte Proteindegradation oder Proteininteraktionen.

Es wird vermutet, dass mind. 5 % aller vorhergesagter Gene in *Arabidopsis* alternativ gespleißt werden (Kazan, 2003). Die große Mehrheit solcher Gene kodiert für Proteine mit regulatorischer Funktion (<http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/splnotes.pl?species=Arabidopsis>). Zudem scheinen Gene, die mit verschiedenen Stressreaktionen verknüpft sind, vor allem bei abiotischem Stress, besonders oft alternativem Splicing zu unterliegen (Kazan, 2003). Ein solches Beispiel ist das jeweils unterschiedliche Vorkommen zweier Splice-Formen des *AtSOS4* (SALT OVERLY SENSITIVE 4) Gens bei Salzstress (Shi u. a., 2002).

Die Rate des mRNA Turnover, der Halbwertszeit der normalen mRNAs, ist ebenso ein wichtiger posttranskriptioneller Schritt in der Regulierung der Genexpression (Wilusz und Wilusz, 2004). Die Bedeutung des mRNA turnover wurde durch Phänotypen von Pflanzen aufgedeckt, in denen die Expression von Genen, die in der Kontrolle der mRNA Stabilität beteiligt sind, gestört war. Die *Arabidopsis* Mutante für Downstream 1, die die mRNA Stabilität der *Cinnamoyl-CoA Reductase-like* (*CCR*) sowie des *Senescence-associated gene 1* kontrolliert, zeigte Defekte in ihrem zirkadianen Rhythmus (Lidder u. a., 2005).

In den letzten Jahrzehnten konnten verschiedene reversible und irreversible kovalente Modifikationen von Proteinen gefunden werden, die die Proteinaktivität, die Lokalisierung, den Zustand und den Turnover stark beeinflussen können. Beispiele sind Phosphorylierung, Acetylierung, Myristylierung, Nitrosylierung, ADP Ribosylierung und Glykosylierung (Kouzarides, 2000; Farazi u. a., 2001; Lindermayr und Durner, 2009; Spiro, 2002; Corda und Girolamo, 2003). Sowohl biochemische Daten und die Anzahl der Protein Kinase und Phosphatase Gene in Pflanzengenomen deuten daraufhin, dass Phosphorylierung die am meisten vorkommende Modifikation von Proteinen darstellt (Callis und Vierstra, 2000). Kürzlich wurde zudem bestätigt, dass Polypeptid-Anhänge auch sehr wichtige posttranslationale Regulatoren der Proteinfunktion sein können. Zu diesen gehören Ubiquitin (Ub), RUB-1, welches ähnlich zu Ub-1 ist., SUMO (Small Ub-like modifier), ATG-8 (autophagy-8) und ATG-12, UFM-1 (Ub-fold modifier-1) und HUB-1 (homology to Ub-1) (Downes und Vierstra, 2005). Das meistbekannte Anhängsel ist Ubiquitin, welches als wiederverwendbarer Tag zur selektiven Proteindegradation durch das 26 S Proteasom sowie für das endosomale Trafficking dient. Genomische Analysen haben ergeben, dass der Ub Weg mehr als 6 % des *Arabidopsis* Proteoms ausmacht, mit tausenden Zielproteinen (Downes und Vierstra, 2005).

Daher hat diese Möglichkeit der Proteinmodifikation sehr großen Einfluss auf die Regulation der Biologie der Pflanzen (Hatakeyama und Nakayama, 2003). Vorläufige Studien über die weiteren erwähnten Polypeptid-Tags deuten daraufhin, dass diese viel kleinere Gruppen von Zielproteinen haben und sie viel stärker

spezialisierte Funktionen, z.B. transkriptionelle Regulation, Proteinlokalisierung, autophagischer Turnover und zu Ub antagonistische Effekte, aufweisen. Basierend auf ihrer umfassenden Verbreitung und den mannigfaltigen Funktionen, können Polypeptid Tags als primäre Faktoren der Pflanzenzellregulation angesehen werden (Downes und Vierstra, 2005).

Im Kontext der Regulation der Eisenmangelantworten sind verschiedene Proteine bekannt, die posttranskriptionell reguliert werden. Die detaillierten Mechanismen dieser regulatorischen Prozesse liegen jedoch noch im Verborgenen. Für die beiden wichtigsten an der Eisenaufnahme beteiligten Gene, *AtIRT1* und *AtFRO2*, konnte eine zusätzliche posttranskriptionelle Regulierung beobachtet werden (Connolly u. a., 2002, 2003). Mit Hilfe von 35s::*AtIRT1* transgenen Pflanzen konnte gezeigt werden, dass diese größere Mengen an Cadmium und Zink im Vergleich zu wildtypischen Pflanzen akkumulieren, dies deutet auf eine erfolgreiche Überexpression des Gens hin. Obwohl jedoch *AtIRT1* mRNA konstitutiv exprimiert wurde in diesen Pflanzen, konnte das AtIRT1 Protein nur in Wurzeln unter Eisenmangel nachgewiesen werden, dies deutet stark auf eine posttranskriptionelle Regulierung von AtIRT1 hin (Connolly u. a., 2002).

Eine Regulierung der *AtIRT1* Expression durch Ubiquitinierung unter ausreichenden Eisen/ Zink Bedingungen wurde hypothetisiert aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zwischen AtIRT1 und dem Zink-regulierten Hefetransporter ZRT1 (Zhao und Eide, 1996b,a; Connolly u. a., 2002). Für ZRT1 konnte eine posttranskriptionelle Regulierung durch Zink-regulierte Ubiquitinierung nachgewiesen werden (Gitan u. a., 1998; Gitan und Eide, 2000).

AtFRO2 wird, zusammen mit *AtIRT1*, unter Eisenmangel induziert und reprimiert unter nachfolgender Eisenversorgung. Die mRNA von *AtFRO2* konnte in hohen Konzentrationen in den Wurzeln und Sprossen von 35S::*AtFRO2* transgenen Pflanzen nachgewiesen werden. Die Aktivität der Fe(III) Chelat Reduktase war jedoch in diesen Überexpressionspflanzen nur unter Eisenmangelbedingungen erhöht, dies deutet auf eine posttranskriptionelle Regulation von AtFRO2, wie bei AtIRT1, hin (Connolly u. a., 2003; Vert u. a., 2003).

2.3.3 Transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulation der Eisenaufnahme in weiteren Organismen

2.3.3.1 Regulierung der Eisenaufnahme in Bakterien

In Bakterien wird eine Vielzahl von Genen, bis zu über 90 (Hantke, 2001), durch die vorherrschende intrazelluläre Fe(II) Konzentration kontrolliert. Fe(II) komplexiert

dabei mit einem regulatorischen Protein (mit dem FUR Protein oder ähnlichen Kandidaten). Auf diese Weise kann sich die Biochemie der Bakterienzelle an die Herausforderungen der Umwelt bzw. des Wirtes anpassen (Ratledge und Dover, 2000).

Das FUR (FERRIC UPTAKE REGULATOR) Protein, welches in gram-negativen und bestimmten gram-positiven Bakterien vorkommt, sowie das DtxR (DIPHTE-RIA TOXIN REPRESSOR) Protein aus gram-negativen Bakterien, reprimiert die Gentranskription wenn es mit Fe(II) komplexiert (Hantke, 1981), (Boyd u. a., 1990), (Schmitt und Holmes, 1991).

FUR reguliert zusätzlich zu den Genen der Eisenaufnahme auch noch weitere Gene. Die Eisenverfügbarkeit reguliert zahlreiche Toxine und andere Virulenzfaktoren (Litwin und Calderwood, 1993), vermutlich da ein Fehlen von Eisen dem Pathogens andeutet dass es innerhalb des Wirtsorganismus ist.

2.3.3.2 Regulierung der Eisenaufnahme in Hefe

In Hefe wird die homeostatische Kontrolle der Eisenaufnahme durch den transkriptionellen Aktivator AFT1 (ACTIVATOR FERROUS TRANSPORT) kontrolliert. Dieser bindet eine Konsensussequenz, die in den Promotoren der Zielgene vorhanden ist (Yamaguchi-Iwai u. a., 1995, 1996). Unter Eisenmangel induziert AFT1 die Transkriptakkumulation von *FRE1*, *FRE2*, *FET3* und *FTR1* sowie weiteren Eisenaufnahmegenen in Hefe (Yamaguchi-Iwai u. a., 1996; Eide, 1998). In eisengesättigten Zellen hingegen bindet AFT1 nicht an diese cis-Elemente. Es konnte gezeigt werden, dass die DNA Bindung durch AFT1, die eisenreguliert ist, nicht aufgrund des Expressionslevels des Proteins oder einer Änderung der Bindungsaktivität der DNA verändert wird (Yamaguchi-Iwai u. a., 2002). Stattdessen wird AFT1 abhängig vom Eisenstatus der Zelle unterschiedlich lokalisiert. In Eisenmangelbedingungen ist es im Zellkern lokalisiert, wo es seine Zielgene aktiviert. Bei ausreichendem Eisengehalt verbleibt AFT1 im Cytoplasma und somit inaktiv in seiner Wirkung als Transkriptionsfaktor. Desweiteren wurde hypothetisiert, dass der nukleäre Export von AFT1 ein kritischer Schritt in der eisenabhängigen transkriptionellen Aktivierung des AFT1 Regulons ist, und dass die Systeme für nukleären Import/Export an der Feststellung des Eisengehaltes durch AFT1 beteiligt sind (Yamaguchi-Iwai u. a., 2002).

Aufgrund seiner Aminosäuresequenz könnte AFT1 direkt an ein Eisenatom binden und so als Eisensensor im Cytoplasma fungieren, so dass es den Zellkern nur erreicht, wenn es nicht an Eisen gebunden ist, was sich dann aus einem Eisenmangel in der Zelle ergibt (Yamaguchi-Iwai u. a., 2002). Eine alternative Möglichkeit könnte sein, da AFT1 phosphoryliert werden kann (Casas u. a., 1997),

dass der intrazelluläre Eisenstatus den Phosphorylierungszustand von AFT1 verändern könnte und auf diese Weise die Lokalisation von AFT1 in der Zelle kontrolliert. In der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* wird FEP1 für die Runterregulierung von Genen, die für Komponenten der reduktiven Eisentransportmaschinerie kodieren, benötigt. Seine Repressorfunktion übt es durch Bindung an ein konserviertes regulatorisches Element oberhalb der Gene, die für die Fe(III) Reduktase (FRP1) an der Zelloberfläche sowie für den zwei Komponenten Eisentransportkomplex (FIP1 und FIO1) kodieren, aus (Pelletier u. a., 2002). Zudem reprimiert FEP1 die Expression des Eisen-Siderophor Transporters STR1 bei ausreichendem Eisengehalt, und belegt so eine zentrale Rolle in der Koordination der transkriptionellen Regulation von Genen, die für Komponenten des reduktiven sowie nicht-reduktiven Eisentransportsystems der Spaltheefe kodieren (Pelletier u. a., 2003).

Eine Studie von Puig u. a. (2005) hat eine koordinierte globale metabolische Umprogrammierung als Antwort auf Eisenmangel aufgedeckt und einen Mechanismus dafür identifiziert, der spezifische mRNA Moleküle für die Degradation ansteuert. Als Antwort auf Eisenmangel konnte gezeigt werden, dass das *S. cerevisiae* Cth2 Protein mRNAs für Proteine, die für verschiedenen eisenabhängigen Prozessen benötigt werden, spezifisch runterreguliert. Der Turnover der mRNA benötigt die Bindung des Cth2 an ein spezifisches AU-reiches Element in der 3'UTR Region der mRNAs, die zur Degradation angesteuert werden (Puig u. a., 2005).

2.3.3.3 Regulation der Eisenaufnahme in Säugern

In Säugern sind die Signale und regulatorischen Mechanismen, die die Expression von Proteinen, die beteiligt sind an Eisenaufnahme, Speicherung, Gebrauch und Export, steuern, am besten auf posstranskriptioneller Ebene untersucht.

IRE/IRP In Tieren ist die Expression verschiedener Komponenten der Eisenhomöostase über das IRE/IRP System posttranskriptionell reguliert (Klausner u. a., 1993). IRP1 und IRP2 (IRON-RESPONSIVE PROTEIN) sind eisen-wahrnehmende RNA-bindende Proteine, die an das IRE (iron-responsive element) in 5' oder 3' UTRs verschiedener Gene der Eisenhomöostase binden. IREs sind konservierte Haarnadelstrukturen in den UTRs von eisenbezogenen mRNAs. Die Bindung von IRP im 5' UTR der Ferritin H und L Ketten sowie der Ferreportin mRNAs inhibiert deren Translation. Im Gegensatz dazu, stabilisiert die Bindung von IRPs an den IREs in der 3' UTR der mRNA des Transferrin Receptor 1 (Tfr1) und der NRMAP2 mRNA deren Transkripte (Hentze und Kühn, 1996; Rouault und Klausner, 1997; Schneider und Leibold, 2000; Hentze u. a., 2004).

Obwohl die Gene, die für IRP1 und IRP2 kodieren, hochgradig homolog sind (Rouault und Klausner, 1997), nehmen sie den cytosolischen Eisengehalt durch verschiedene Mechanismen wahr. IRP1 ist ein bifunktionelles Protein. Wenn der zelluläre Eisengehalt hoch ist, bindet IRP1 an einen 4Fe-4S-Cluster und fungiert als cytoplasmatische Aconitase, die Citrat und Isocitrat ineinander umwandelt, und verbleibt dabei ohne RNA-bindende Fähigkeit. Unter diesen Bedingungen wird die mRNA des Transferrin Rezeptors (TfR) abgebaut und Ferritin mRNA wird translatiert. Wenn jedoch der zelluläre Eisengehalt niedrig ist, wird der 4Fe-4S Cluster abgebaut, was dem IRP1 Apoprotein erlaubt, an IREs mit hoher Affinität zu binden. Dies führt zu einer Stabilisierung der TfR mRNA und zu einer Vermeidung der Ferritin mRNA Translation (Beinert u. a., 1996).

IRP2 unterliegt einer eisenabhängigen Degradation in eisen-gesättigten Zellen (Guo u. a., 1995). Es kann Häm binden, um die Sauerstoff-abhängige Oxidation, die Ubiquitinierung durch die E3 Ubiquitin-Protein Ligase HOIL1 sowie die Degradation durch das Proteasom auszulösen (Kang u. a., 2003; Yamanaka u. a., 2003). So kann keines der IRP an IREs binden, wenn die Zelle ausreichend mit Eisen versorgt ist.

Die Aktivität der beiden IRPs sind nur teilweise redundant, und es wurde gezeigt dass sie verschiedene regulatorische Nischen besetzen. In der normalen Physiologie bestimmt der Sauerstoffpartialdruck die Beteiligung jedes IPR an der Regulation der Eisenhomöostase. Bei den umgebenden Sauerstoffkonzentrationen in Geweben gesunder Tiere ist der Fe-S Cluster des IRP1 stabil, und IRP1 kann daher nicht als Eisensensor dienen (Meyron-Holtz u. a., 2004b). IRP2 hingegen hat einen unterschiedlichen Mechanismus zur Eisenwahrnehmung, welcher auf der eisenabhängigen Degradation basiert (Guo u. a., 1995). Der eisenabhängige Turnover ist bei physiologisch relevanten Sauerstoffkonzentrationen intakt, dies befähigt IRP2 zur Übernahme der Regulierung der Eisenhomöostase in Säugern (Meyron-Holtz u. a., 2004a).

2.3.4 Möglichkeiten der Regulation von Transkriptionsfaktoren

Da Transkriptionsfaktoren die Proteine sind, die für die Regulation zellulärer Prozesse verantwortlich sind, ist es interessant und wichtig zu wissen, wie deren eigene Expression und Funktion reguliert wird. Diese Regulation kann durch verschiedene Mechanismen stattfinden, z.B. durch transkriptionelle Regulation durch weitere Transkriptionsfaktoren, posttranskriptionelle Regulation durch Protein-Protein Interaktionen, Proteinmodifikationen, Kontrolle der Proteinstabilität usw.

Ein sehr gut untersuchtes Beispiel für die transkriptionelle Regulation von Transkriptionsfaktoren sind die Gene die an der Aufrechterhaltung des Meristems und der Spezifizierung der lateralen Organe zuständig sind. Für diese wurde gezeigt, dass sie teilweise durch negative Interaktionen zwischen dem Myb-Domäne Transkriptionsfaktor *ASYMMETRIC LEAVES1*, welches in den lateralen Organprimordien exprimiert ist, und Homöobox Transkriptionsfaktoren, die im apikalen Sprossmeristem exprimiert werden (*KNOX* Gene), reguliert werden. Das *KNOX* Protein *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* reguliert hierbei negativ das Gen *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)*, welches im Gegenzug andere *KNOX* Gene wie *KNAT1* und *KNAT2* negativ reguliert (Byrne u. a., 2002; Iwakawa u. a., 2002).

Es gibt verschiedene Beispiele posttranskriptioneller Modulation der Funktion von Transkriptionsfaktoren durch direkte Interaktionen zwischen verschiedenen Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis*. Direkte Interaktion zwischen Transkriptionsfaktoren sind ein Mechanismus, durch den Proteine mit sehr ähnlichen DNA Binde-domänen zusätzlich regulatorische Spezifität erlangen können (z.B. (Grotewold u. a., 2000)). Diese direkten Interaktionen können zwischen Mitgliedern der selben Proteinfamilie auftreten, sie bilden dann dimere Komplexe, die palindromische DNA Sequenzen binden, aber sie können auch zwischen Transkriptionsfaktoren verschiedener Familien auftreten. Beispiele für letzteres beinhalten *Arabidopsis*-, Mais- und Petunienproteine der MYB und BHLH Familien. Diese Interaktionen sind dabei u.a. für die Regulation von Abscisinsäure-abhängigen Prozessen zuständig (Hobo u. a., 1999; Nakamura u. a., 2001).

Posttranskriptionelle Regulation auf der Ebene der Proteinstabilität wurde für verschiedene Transkriptionsfaktoren gezeigt. Forschungen auf dem Feld des Auxinsignalwegs, zum Beispiel, haben ein breitgefächertes Aufgebot von posttranskriptionellen Kontrollmechanismen aufgedeckt. 2005 haben drei Gruppen unabhängig voneinander gezeigt, dass die Auxinhomöostase und zugehörige Entwicklungsprozesse in *Arabidopsis* mit Hilfe von microRNA abhängiger Regulation von Schlüsselkomponenten des Auxinsignalwegs kontrolliert wird. Die Effekte von Auxin in der Pflanzenentwicklung werden durch verschiedene Transkriptionsfaktorfamilien gesteuert, diese beinhalten die Auxin response factors (ARFs) und NAC-Domäne Transkriptionsfaktoren. Zuerst wurde für *ARGONAUTE1 (AGO1)*, einem Schlüsselprotein in microRNA Signalwegen, gezeigt, dass es die Auxin-induzierte Wurzelbildung reguliert. Es hat dabei Einfluss auf die Expression von *AUXIN RESPONSE FACTOR17 (ARF17)* sowie auf durch Auxin induzierbare *GH3* Gene, die wahrscheinlich Zielgene des ARF17 sind (Sorin u. a., 2005).

Dann haben Mallory u.a. (2005) gezeigt, dass Pflanzen die eine Form von *ARF17* exprimieren, die gegen eine durch die microRNA miR160 vermittelte Spaltung resistent ist, hohe Level von *ARF17* mRNA exprimieren. Sie zeigen außerdem,

dass diese Pflanzen einer veränderte Akkumulationsrate von *GH3*-ähnlichen mRNAs haben, was für eine Vielzahl an verschiedenen schwerwiegenden Wachstumsdefekten verantwortlich ist (Mallory u. a., 2005). Desweiteren wurde gezeigt, dass die miR164-abhängige Spaltung von *NAC1* mRNA die Auxinregulierung der lateralen Wurzelentwicklung beeinflusst, dies deutet daraufhin dass eine microRNA-vermittelte Regulation in der Aufrechterhaltung der Auxinhomöostase funktionieren könnte (Guo u. a., 2005).

Ein weiteres interessantes Beispiel transkriptioneller Kontrolle von Transkriptionsfaktoren kommt auch aus dem Bereich der Auxinwirkungsweise. Dies macht den Auxinsignalweg zu einem guten Repräsentanten der Komplexität der regulatorischen Mechanismen, die in Pflanzen vorkommen. Die Klonierung des *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (AtTIR1)* Gens (Ruegger u. a., 1998) hat ergeben, dass es ein F-Box Protein ist, der Spezifitätsfaktor der SCF (für Skp1p, Cdc53p/Cullin und F-Box Protein in Hefe und Säugern) Klasse der Ubiquitin E3 Ligasen (Deshaies, 1999). Es wurde gezeigt, dass AtTIR1 mit den Arabidopsis Skp1-ähnlichen Proteinen AtASK1 und ASK2 sowie mit dem Cullin AtCUL1 interagiert, um einen SCF-AtTIR1 Degradationskomplex zu bilden (Gray u. a., 1999, 2001), welcher die Aux/IAA Familie von Transkriptionsfaktoren als Zielgene hat (Kepinski und Leyser, 2002).

Ein interessantes Beispiel komplexer Regulation von Transkriptionsfaktoren stammt aus der Forschung der Sauerstoffwahrnehmung in Säugern, welche auf mit den zellulären Eisenkonzentrationen verknüpft ist. Diese zeigt eine regulatorische Verbindung zwischen Signalwahrnehmung und -effekten auf die Transkriptionsfaktorfunktion. Die zelluläre hypoxische Antwort beinhaltet die transkriptionelle Aktivierung von Genen, die in der Angiogenese, Erythropoese und dem anaeroben Stoffwechsel beteiligt sind. Diese Antwort wird durch die Transkriptionsfaktoren HIF1 α (HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR) und HIF2 α vermittelt (Iliopoulos u. a., 1996). Bei normalem Sauerstoffpartialdruck wird HIF schnell für die proteasomische Degradation über eine Interaktion mit dem Hippel-Lindau (VHL) Tumor Suppressor angesteuert. Wenn der Sauerstoffgehalt abfällt, wird diese Interaktion unterbrochen und HIF akkumuliert in lokalen Regionen der Hypoxie (Cockman u. a., 2000). Interessanterweise ist der BHLH-PAS (basic helix-loop-helix Per/Sim/Arnt) Transkriptionsfaktor HIF1 α aus zwei Untereinheiten besteht, einem Sauerstoff-sensitiven und einem konstitutiv exprimierten Teil (Wang u. a., 1995; Wang und Semenza, 1995). Die Sauerstoff-sensitive Untereinheit wird durch Hypoxie, Eisenchelatoren sowie divalenten Kationen stabilisiert. Unter normalen Sauerstoffbedingungen nimmt die Hydroxylierung von HIF ab und es wird stabilisiert. Interessanterweise wurde gezeigt, dass die Hydroxylaseaktivität

von der zellulären Verfügbarkeit von Sauerstoff und Fe(II) abhängig ist (Schofield und Ratcliffe, 2004).

Ein weiteres gutes Beispiel für die Regulation von Transkriptionsfaktoren sind die BHLH Transkriptionsfaktoren Phytochrome Interacting Factors, PIFs, die direkt an lichtaktivierte Phytochrome binden und durch diese Regulation selbst licht-regulierte Gene in deren Expression steuern (Castillon u. a., 2007).

2.3.5 Mögliche Regulation von AtFIT

Die Expression von *AtFIT* ändert sich mit veränderten Eisenbedingungen. Unter Eisenmangel wird *AtFIT* induziert (Jakoby u. a. (2004)), und somit die Expression von *AtIRT1* und *AtFRO2* hochreguliert. Die Induktion von *AtFIT* ist jedoch nicht so stark wie die Induktion von *AtIRT1*. Experimente mit einer *AtFIT* Überexpressionslinie, die *AtFIT* konstitutiv und ektopisch auch in Blättern exprimiert, zeigten jedoch nur bei Eisenmangel eine Induktion der Expression von *AtFRO2* und *AtIRT1* (Jakoby u. a. (2004)). Dies deutet auf eine zusätzliche Regulierung des AtFIT Proteins auf posttranskriptioneller Ebene hin.

2.3.5.1 Posttranslationale Modifizierung von AtFIT

Eine Möglichkeit der Regulation der AtFIT Funktion könnte eine posttranslationale Modifizierung des AtFIT Proteins sein. Bislang wurden jedoch keine Studien durchgeführt, um eine solche Modifizierung nachzuweisen. Als möglich wird derzeit eine mögliche Phosphorylierung/Dephosphorylierung durch spezifische Kinasen/Phosphatasen angenommen. Desweiteren könnte die S-Nitrosylierung eine Rolle spielen. Sie wird derzeit als wichtigster Mechanismus für die Signaltransduktion des Signalgebers Stickstoffmonoxid (NO) angenommen (zusammengefasst durch Lindermayr und Durner, 2009). Es konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden, dass das freie bioaktive Radikal NO die Verfügbarkeit von metabolisch aktivem Eisen in der Pflanze verbessern kann (Graziano u. a., 2002; Graziano und Lamattina, 2005; Crosa, 1997).

2.3.5.2 Protein-Interaktion von AtFIT mit anderen Proteinen

Eine weitere Möglichkeit der Regulierung von AtFIT auf Proteinebene stellt eine mögliche Interaktion mit anderen Proteinen dar. Die Struktur der BHLH Transkriptionsfaktoren lässt eine Interaktion mit anderen Proteinen meist zu. Ein Beispiel für Interaktion zweier BHLH Transkriptionsfaktoren ist die Interaktion

zwischen PIF3 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3) und HFR1 (LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED), die im Phytochromsignalweg eine wichtige Rolle spielen (Yamashino u. a., 2003). Eine solche Interaktion von AtFIT entweder als Homodimer mit sich selbst oder als Heterodimer mit anderen Proteinen zur Regulierung ist sehr wahrscheinlich und erste Interaktionspartner wurden bereits entdeckt.

Interaktion mit BHLH038 und BHLH039 Im Jahr 2008 haben Yuan u.a. gezeigt, dass AtFIT sowohl mit sich selbst als auch mit den eisenregulierten BHLH Transkriptionsfaktoren AtBHLH038 und AtBHLH039 interagieren kann (Yuan u. a., 2008). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass diese Interaktion die Expression von *AtIRT1* und *AtFRO2* positiv reguliert. Überexpressionspflanzen, die sowohl eines der interagierenden AtBHLHs sowie AtFIT überexprimierten, zeigten ektopische Expression von *AtIRT1* und *AtFRO2*. Ebenso enthielten diese Pflanzen höhere Eisengehalte, was daraufhin deutet, dass die erhöhte Expression von *AtIRT1* und *AtFRO2* auch in erhöhter Proteinaktivität endet (Yuan u. a., 2008).

Interaktion mit AtEIL1 und AtEIN3 Studien in unserer Arbeitsgruppe zeigten außerdem, dass AtFIT in einem Hefe Dihybrid System noch mit anderen Interaktionspartnern interagieren kann. Unter anderem konnte in Hefe eine Interaktion mit AtZAT12 (RESPONSIVE TO HIGH LIGHT 41), einem Mediator für abiotischen Stress sowie eine Interaktion mit AtSOS4 (SALT OVERLY SENSITIVE 4) nachgewiesen werden (Fleischer, 2007). Der wichtigste in dieser Studie entdeckte Interaktionspartner ist jedoch AtEIL1 (ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE 1), der in der vorliegenden Arbeit detailliert auf seine Rolle in der Eisenaufnahme untersucht wurde. Gleichzeitig konnte eine Interaktion mit dem Protein AtEIN3 (ETHYLENE-INSENSITIVE3) nachgewiesen werden. AtEIN3 ist das zu AtEIL1 nächstverwandte Protein, diese arbeiten partiell redundant (Chao u. a., 1997).

2.4 Mögliche Signale zur Aktivierung der Eisenaufnahme

2.4.1 Systemische Signale

Neben ihrer Fähigkeit, Veränderungen der Eisenversorgung in der Rhizosphäre zu spüren, können Pflanzen auch den Eisenstatus im Spross verfolgen und ein Signal an die Wurzel senden, um die Eisenaufnahme zu aktivieren. Die Identität dieses

Signals ist noch unbekannt, man geht jedoch davon aus, dass es durch das Phloem transportiert wird (Maas u. a., 1988). Mögliche Kandidaten sind Pflanzenhormone, Eisenkomplexe oder Eisen selbst (Hell und Stephan, 2003) 2.4.

Hinweise darauf geben Versuche mit einem sog. Split-Root System. Dabei werden die Wurzeln einer Pflanze aufgeteilt, wobei die beiden Teile mit unterschiedlichen Eisenkonzentrationen versorgt werden. Wenn diese Pflanzen nun auf der einen Seite kontinuierlich mit Eisen versorgt wurden, konnte eine Steigerung der Reduktionsrate von Eisen gemessen werden auf der Wurzelseite, die mit ausreichend Eisen versorgt wurde. Daher ist davon auszugehen, dass die Reduktaseaktivität der mit Eisen versorgten Wurzeln vom Eisenbedarf des Sprosses kontrolliert wird, als Ausgleich für die verminderte Anzahl von Wurzeln, die an der Eisenaufnahme teilhaben (Schmidt u. a., 1996).

Die Regulation des hoch-affinen Eisenaufnahmesystems der Wurzel durch Signale der gesamten Pflanze wurde in *Arabidopsis* untersucht. Dabei wurde die Genexpression der Fe(III) Chelatreduktase in der Wurzel, *AtFRO2* sowie des hoch-affinen Eisentransporters *AtIRT1* untersucht (Vert u. a., 2002). Split-root Experimente zeigten, dass die Expression von *AtFRO2* und *AtIRT1* durch eine lokale Induktion des Eisenpools in der Wurzel sowie durch einen systemischen Weg, der ein spross-bürtiges Signal involviert, reguliert wird. Beide Signale zusammen bewirken dabei eine enge Regulation des Eisenaufnahmesystems der Wurzel. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Expression von *AtFRO2* und *AtIRT1* tageszeitabhängig reguliert werden, sie werden über Tag hochreguliert und in der Nacht runterreguliert. Diese Kontrolle kann jedoch durch Eisenmangel aufgehoben werden (Vert u. a., 2003).

Die Informationsweiterleitung zwischen verschiedenen Pflanzenteilen scheint von grundlegender Bedeutung für die Regulation angemessener interner Eisenkonzentrationen in höheren Pflanzen zu sein. Obwohl auch Wurzelzellen in der Lage sind, den intrazellulären und möglicherweise auch den externen Eisengehalt zu bestimmen und die Eisenmangelantworten anzuschalten, ist es möglich, dass diese Kontrolle durch Signale aus dem Spross überlagert werden.

Dies ist vor allem dann der Fall, wenn trotz ausreichender externer Eisenbedingungen entweder die Translokation oder die Eisenaufnahme durch Blattzellen inhibiert ist, oder eine große Menge an Eisen für das Sprosswachstum benötigt wird (wie z.B. wenn die Eisenversorgung lokal begrenzt ist wie im Fall der split-root Pflanzen (Schmidt, 1999; Wang u. a., 2007a).

2.4.2 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein kleines, hoch diffusionsfähiges und allgegenwärtiges bioaktives Molekül (Stamler u. a., 1992). In Tieren spielt es eine wichtige Rolle als biologischer Vermittler physiologischer Schlüsselprozesse, wie z.B. die Aufrechterhaltung des Blutdrucks im Kardiovaskulären System, der Stimulierung von Abwehrreaktionen im Immunsystem sowie der Regulation neuraler Transmission im Gehirn (Schmidt und Walter, 1994). Im letzten Jahrzehnt wurden gute Fortschritte im Verständnis der Rolle von NO in Pflanzen gemacht. NO wirkt als allgegenwärtiges Signal, welches in verschiedene physiologische Prozesse wie Keimung, Wurzelentwicklung, Stomataschließung, Induktion antioxidativer Enzyme sowie Anpassungen an biotischen und abiotischen Stress eine Rolle spielt (Lamattina u. a., 2003; Desikan u. a., 2004; Wendehenne u. a., 2004; Delledonne, 2005). Zudem unterstützen neuere Studien die These, dass NO eine Rolle in der Eisenhomöostase in Pflanzen spielt. Dabei wurden starke Interaktionen zwischen NO und Eisen entdeckt, sowie ein Einfluss von NO auf die Eisenhomöostase in Pflanzenzellen (Graziano und Lamattina, 2005). Verschiedene Studien haben NO als neue Komponente im pflanzlichen Eisenmetabolismus herausgestellt (Murgia u. a., 2002; Graziano und Lamattina, 2005, 2007; Arnaud u. a., 2006). NO könnte dementsprechend ein systemisches Signal sein, um Eisenmangelantworten in der Wurzel anzuregen.

2.4.3 Auxin

Ein Pflanzenhormon, was auf den Eisenhaushalt der Pflanzen eine Auswirkung haben könnte, ist Auxin. Auxin spielt eine wichtige Rolle in der Bildung von Wurzelhaaren, welche für die Aufnahme sowohl von Wasser als auch von Nährstoffen von großer Bedeutung für die Pflanze sind. Die externe Applikation von Auxin führt zu einer verstärkten Bildung von Wurzelhaaren. Dieser Phänotyp ist dem Phänotyp von Pflanzen unter Eisenmangel sehr ähnlich, dort werden ebenfalls verstärkt Wurzelhaare ausgebildet um die Wurzeloberfläche zu vergrößern und damit die Eisenaufnahme zu erleichtern. (Cholodny, 1931; Jackson, 1960). Pflanzen unter Eisenmangel enthalten außerdem mehr Auxin als Pflanzen in normalen Eisenbedingungen (Bates und Lynch, 1996). Weitere Studien haben ergeben, dass der Auxinsignalweg benötigt wird, damit unter Eisenmangel Wurzelhaare ausgebildet werden können (Schikora und Schmidt, 2001).

2.4.4 Cytokinine

Die Phytohormone Cytokinine kontrollieren Entwicklungs- und Wachstumsprozesse, so wie Zellproliferation, Samenkeimung und Nährstoffmobilisation. Es wurde gezeigt, dass Cytokinine die Antworten auf Nitrat-, Phosphat und Sulfatmangel in *Arabidopsis* unterdrücken können. Dazu zählt auch die Aufnahme der dementsprechenden Nährstoffe (Brenner u. a., 2005; Franco-Zorrilla u. a., 2002, 2005; Maruyama-Nakashita u. a., 2004). Die lokale und die Ferndistanzkontrolle die durch die Aufnahmemaschinerien von Nitrat und Eisen geteilt werden, führten zu Studien bezüglich des Einflusses der Cytokinine auf die Eisenaufnahme. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Cytokinine in der Lage sind, *AtIRT1*, *AtFRO2* und *AtFIT* auf Transkriptionsebene unabhängig von der Versorgung mit Eisen zu reprimieren. Diese Regulation ist unabhängig von FIT, benötigt jedoch die beiden Cytokininrezeptoren CRE1/WOL/AHK4 sowie AHK3. Wahrscheinlich kontrollieren die Cytokinine hierbei die Eisenaufnahme durch eine Veränderung des Wurzelwachstums (Séguéla u. a., 2008).

2.4.5 Ethylen

Experimente mit dem Pflanzenhormon Ethylen in verschiedenen dikotyledonen Pflanzen deuten auf eine physiologische Verbindung zwischen der Produktion von Ethylen und dem Eisenstatus der Pflanze hin. Externe Applikation von Ethylen-Vorstufen wie 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC) oder Ethephon zu Pflanzen auf ausreichendem Eisengehalt konnte die physiologischen und morphologischen Anpassungen an Eisenmangel hervorrufen (Landsberg, 1996; Romera und Alcantara, 1994; Romera u. a., 1999). An Eisenmangel leidende Pflanzen, die mit Ethyleninhibitoren wie Aminoethoxyvinylglycin (AVG), Aminoxyessigsäure (AOA) oder Silberthiosulfat (STS) behandelt wurden, zeigten verringerte mRNA Gehalte von *AtFRO2* und *AtIRT1*, wohingegen deren Behandlung mit ACC die Expression der Gene *AtIRT1* und *AtFRO2* ansteigen ließ (Lucena u. a., 2006). Diese Experimente deuten daraufhin, dass Ethylen einen Einfluss auf die Eisenaufnahme hat.

2.5 Das Pflanzenhormon Ethylen

Ethylen ist ein einfaches gasförmiges Alken (C_2H_4), welches nahezu alle Stadien der Pflanzenentwicklung beeinflusst. Vor allem bei der Samenkeimung, Zellelongation, Zelldeterminierung, Geschlechtsdeterminierung, Fruchtreife, Alterung und Blattabwurf zeigt Ethylen seinen Einfluss. Durch seinen positiven Einfluss auf Alterungsprozesse konnte Neljubov im Jahr 1901 Ethylen als aktive Komponente in Leuchtgasen der Straßenbeleuchtung nachweisen, da umliegende Bäume früher zum Abwurf der Blätter neigten als andere.

Es ist bekannt, dass Ethylen durch alle Zellen in der Pflanzenentwicklung synthetisiert wird, die Syntheseraten variieren jedoch stark (Abeles u. a., 1992). Die höchsten Syntheseraten werden mit meristematischem, gestresstem oder reifendem Gewebe assoziiert.

Ethylen kann sowohl in Lipidmembranen sowie der wässrigen Phase der Zellen gelöst werden und ist somit ein guter Kandidat zur systemischen Signalgebung, da es sich frei zwischen Zellen und Geweben bewegen kann (Abeles u. a., 1992).

Eine der bekanntesten Pflanzenreaktionen auf ein Ethylensignal stellt die sog. Dreifachantwort dar, die man in etiolierten Keimlingen nachweisen kann. Hierbei wird die Zellelongation in Wurzel und Hypokotyl inhibiert, während eine radiale Verdickung der Wurzel zu erkennen ist. Außerdem wird ein apikaler Haken ausgebildet (Waggoner und Dimond, 1954). Durch diese morphologisch sehr auffällige Anpassung wurde es möglich, in Arabidopsis nach Mutanten zu suchen, die einen Defekt in den Ethylenantworten haben (Bleecker u. a., 1988), (Guzmán und Ecker, 1990). Eine große Anzahl von Genen der Ethylenbiosynthese, Signaltransduktion und des Antwortweges wurden mit Hilfe dieser Mutantenscreens identifiziert und ein lineares Modell, welches diese Komponenten beinhaltet, wurde aufgestellt basierend auf epistatischen Analysen. Zudem wurden Methoden wie Map-basiertes Klonieren und Charakterisierung von Kandidatengenen in natürlichen Mutanten zusammen mit Protein-Protein Interaktionsnachweisen, DNA-Protein Interaktionsnachweisen und Analysen von Genfunktionen angewandt, um neue Komponenten zu identifizieren, die im Ethylensignalling auch in anderen Pflanzenspecies wie z.B. Tomaten funktionieren (Überblick von Lin u. a. (2009)).

2.5.1 Ethylenbiosynthese und deren Regulierung

Die Biochemie der Ethylenbiosynthese war Gegenstand intensiver Studien in der Pflanzenhormonphysiologie in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts. Aufgrund der einfachen Struktur von Ethylen wurde eine Anzahl verschiedener Komponenten

als Vorstufen vorgeschlagen, wie z.B. Linolensäure, Propanal, B-Alanin und Methionin (Baur und Yang, 1969b,a; Stinson und Spencer, 1969). Lieberman und Mapson haben dann als erste herausgefunden, dass Methionin die Vorstufe von Ethylen ist, und es aus dem C3 und dem C4 von Methionin gewonnen wird (Yang und Hoffmann, 1984). Liebermann u.a. konnten dies auch in vivo in Apfelpgeweben nachweisen. Die Bildung von Ethylen aus Methionin passiert über drei enzymatisch gesteuerte Reaktionen: (i) Methionin wird zu S-Adenosylmethionin durch die S-Adenosylmethioninsynthetase umgewandelt, (ii) Die ACC Synthase (ACS) konvertiert S-Adenosylmethionin zu 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC) und (iii) Die ACC Oxidase (ACO) baut ACC ab, wobei Ethylen frei wird. Zur Synthese von Ethylen ist Sauerstoff unbedingt notwendig.

Isoformen der ACS werden durch eine Genfamilie mit mehreren Mitgliedern kodiert. Diese Gene werden beeinflusst durch Entwicklung und Umwelteinflüsse differentiell auf Transkriptionsebene reguliert.

Im Arabidopsisgenom liegen 12 ACS-ähnliche Gene vor. Da *ACS3* ein Pseudogen mit kurzer Sequenz ist, und *ACS10* und *12* für Aminotransferasen kodieren (Yamagami u. a., 2003), gibt es neun echte ACS Gene, welche in drei Gruppen unterteilt werden. Alle Gene zeigen unterschiedliche räumliche und zeitliche Expressionsmuster während Pflanzenwachstum und -entwicklung und als Antwort auf verschiedene Stresssituationen (Yamagami u. a., 2003; Tsuchisaka und Theologis, 2004; Peng u. a., 2005). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass in Wurzeln die Expression von *ACS2*, *4*, *5*, *6*, *8* sowie *ACS11* durch Indollessigsäure (IAA), welche zu den Auxinen gehört, induziert werden kann, wohingegen die Expression von *ACS7* durch eine Behandlung anders lokalisiert wurde (Tsuchisaka und Theologis, 2004). Außer der Regulation auf Transkriptionsebene werden manche ACS auch auf Proteinebene reguliert. Ein Beispiel hierfür sind die Typ 1 ACS Proteine, die durch die Mitogen-aktivierende Proteinkinase MAPK6 und möglicherweise auch durch Calcium-abhängige Proteinkinasen phosphoryliert wird (Sebastià u. a., 2004).

In Arabidopsis sind die dominanten Ethylen-überproduzierenden Mutanten *eto2* und *eto3*, die Mutationen in den C-Termini der Isoformen *ACS5* und *ACS9* haben (Chae u. a., 2003). Die rezessive Ethylen-überproduzierende Mutante *eto1* hat eine Mutation in einem Gen, welches die ACS Aktivität und Ethylenproduktion negativ reguliert (Wang u. a., 2004).

Der finale Schritt in der Synthese von Ethylen läuft über die ACOs. ACOs werden durch eine Multigenfamilie in verschiedenen Pflanzenarten kodiert. Das Arabidopsisgenom enthält fünf ACO Gene. Expressionsanalysen der ACOs aus Tomate ergaben, dass sie in Geweben in verschiedenen Stadien des Lebenszyklus unterschiedlich reguliert werden. Zum Beispiel ist *LeACO1* das Hauptgen während der

Reifung der Früchte (Blume und Grierson, 1997), außerdem ist seine Expression in Blättern durch Verwundung induzierbar (Holdsworth u. a., 1987a,b; Blume und Grierson, 1997).

Es wurde gezeigt, dass die Level an ACO Transkripten durch Ethylen und andere Phytohormone reguliert werden. *OsACO2* Transkripte aus etiolierten Reiskeimlingen konnten durch IAA Gabe vermehrt gebildet werden, wohingegen die *OsACO3* mRNA bei Ethylengabe zunahm. Die Auxin-induzierte Expression des *OsACO2* wurde durch Ethylen partiell inhibiert, wohingegen Auxin die Ethylen-abhängige Induktion von *OsACO3* komplett blockierte. Dies zeigt, dass diese beiden Gene genspezifisch durch komplexe hormonelle Netzwerke reguliert werden. Außerdem wird angenommen, dass eine posttranslationale Modifikation stattfindet, da ein Inhibitor der Proteinphosphatase die IAA-abhängige Induktion von *OsACO2* unterdrücken konnte. Außerdem wurde berichtet, dass die ACO Gene durch Gibberellinsäure (GA) reguliert werden (Calvo u. a., 2004). Außerdem ist seit langer Zeit bekannt, dass *ACO1* durch Verwundung induziert werden kann (Holdsworth u. a., 1987a).

Für ACS und ACO Gene wurde außerdem mehrfach gezeigt, dass sie auf transkriptioneller Ebene durch homöotische Gene reguliert werden (Ito u. a., 2008; Lin u. a., 2008). Kürzlich wurde herausgefunden, dass LeERF2/TERF2, welches an Promoterelemente in *NtACS3* und *LeACO3* bindet, durch Ethylen induzierbar ist, und dass die Ethylenproduktion in transgenen antisense LeERF2/TERF2 Tomaten unterdrückt war. Dies könnte bedeuten, dass LeERF2/TERF2 als positiver Regulator im Feedback Loop der Ethyleninduktion funktioniert (Zhang u. a., 2009).

2.5.2 Der Signalweg von Ethylen

Erst mit der Arbeit mit *Arabidopsis thaliana* und den daraus resultierenden Möglichkeiten wie Mutantenscreens und molekulargenetische Techniken wurde es möglich, Ethylenmutanten zu identifizieren. Die Dreifachantwort der Pflanzen auf Dunkelheit und externe Ethylengabe machte diese Methoden zu einem idealen Werkzeug, um schnell Ethylensignalmutanten zu identifizieren. Der erste Durchbruch gelang mit der Isolation einer dominanten Ethylen-insensitiven Mutante, der *ethylene response 1 (etr1)*. *AtETR1* kodiert für einen zwei-Komponenten Kinase-ähnlichen Rezeptor, welcher in der mutierten Form nicht an Ethylen binden kann (Bleecker u. a., 1988; Chang u. a., 1993; Schaller und Bleecker, 1995). Zusammen mit *AtETR1* gibt es fünf Ethylenrezeptoren in *Arabidopsis thaliana*.

Eine zweite Komponente des Signalweges wurde über eine rezessive Mutante *constitutive triple response 1 (ctr1)* entdeckt, die eine konstitutive Aktivierung der Ethylenantworten in Abwesenheit von externem Ethylen zeigt. Epistatische Analysen haben *CTR1* genetisch unterhalb der Ethylenrezeptoren platziert. *CTR1*

kodiert für eine Raf-ähnliche Serin/Threonin Kinase die mit den Rezeptoren physisch interagieren kann (Kieber u. a., 1993; Clark u. a., 1998). Unterhalb des Rezeptor-CTR1 Komplexes liegt EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE2), welches ein positiver Regulator des Signalwegs ist (Alonso u. a., 1999a). Das N-terminale Ende von *EIN2* hat Sequenzhomologien mit den NRAMP Ionen transportern, aber wie EIN2 funktioniert, ist bislang nicht vollends verstanden.

Qiao u. a. (2009) haben kürzlich berichtet, dass EIN2 einem schnellen Proteasom-vermittelten Proteinabbau unterliegt, und dass seine Akkumulation durch Ethylen positiv reguliert wird. Die C-terminale Domäne von EIN2 interagiert mit zwei F-Box Proteinen, ETP1 und ETP2 (EIN2 TARGETING PROTEIN), welche es für seinen Abbau markieren. Ein komplexes Zusammenspiel zwischen Ethylen, ETP1 und 2 und der Degradation von EIN2 könnte die Ethylenantworten in Arabidopsis steuern (Qiao u. a., 2009). Kim u.a. berichteten, dass EIN2 zusammen mit dem NAC Transkriptionsfaktor ORE1 (Oresara bedeutet „langes Leben“ auf koreanisch) und der miRNA miR164 den altersbedingten programmierten Zelltod in Arabidopsis reguliert (Kim u. a., 2009).

Des Weiteren wurde postuliert, dass die MAP Kinase MKK9, eine von 10 *Arabidopsis* Mitogen-aktivierten Protein Kinasen Kinasen, sowie seine assoziierten MAP Kinasen MPK3 und MPK6, durch Ethylen aktiviert werden, und dass die MAPK Kaskade positiv im Ethylensignalweg unterhalb von CTR1 agiert (Yoo u. a., 2008). Es wurde berichtet, dass die durch MKK9 aktivierten MPK3/6 EIN3 phosphorylieren und so stabilisieren, und dass die *mkk9* Mutante einen teilweisen Ethylen-insensitiven Phänotyp aufweisen (Yoo u. a., 2008). Die Autoren schlossen, dass das MKK9-MPK3/6 Modul unterhalb der Rezeptoren und CTR1 agieren und so EIN2 in der Modulation von EIN3 umgehen (Yoo u. a., 2008). Zwei unabhängige weitere Studien jedoch zeigten, dass die gleiche MPK3/6, zusammen mit den höhergelegenen MKK9 oder MKK4/5 im Ethylenbiosyntheseweg agieren, indem sie die Proteinstabilität der ACC Synthasen ACS2 und ACS6 erhöhen sowie deren Genexpression steigern (Liu und Zhang, 2004; Yoo u. a., 2008; Xu u. a., 2008). In diesen Studien gelang es nicht, eine MPK6 Aktivierung durch die Gabe von ACC nachzuweisen. Desweiteren wurde ein anderer Bericht veröffentlicht, der zeigt, dass das Ethylensignaling unterhalb der MPK6 Aktivierung stattfindet (Bethke u. a., 2009). Daher ist die Rolle des MKK9-MPK3/6 Moduls im Ethylensignalweg kontrovers und verbleibt zunächst ungeklärt.

Im Zellkern werden Ethylenantworten durch eine Transkriptionsfaktorkaskade verstärkt, die EIN3 (ETHYLENE INSENSITIVE3), ERF1 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR1) sowie deren Homologe wie z.B. EIL1 (ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE 1) beinhaltet (Solano u. a., 1998).

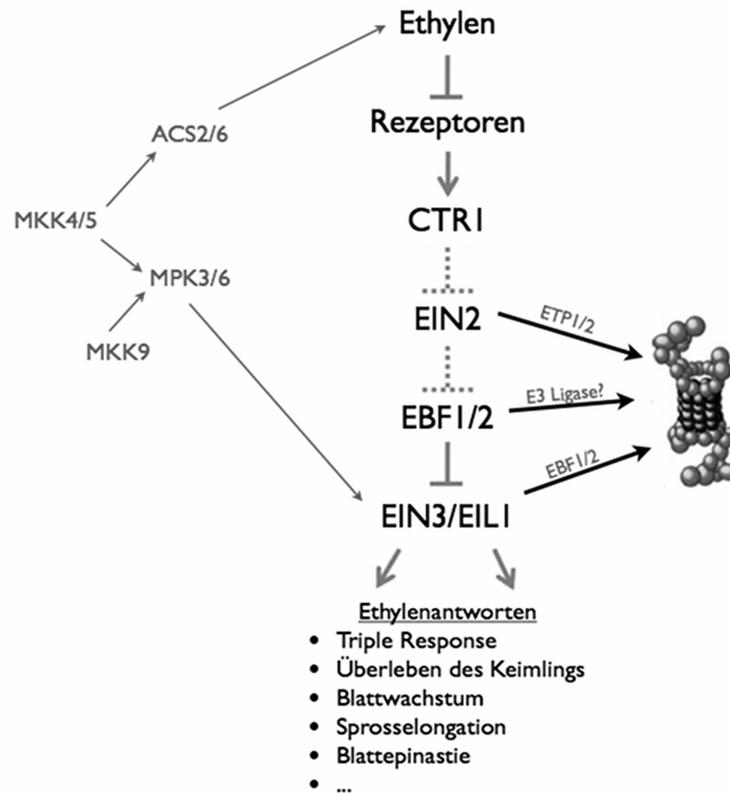


Abbildung 2.3: Ethylen-Signalweg, Darstellung modifiziert nach An u. a. (2010).

Mit diesen Ethylenmutanten konnte mittels eleganter genetischer Analysen ein großes lineares Modell zusammengestellt werden, welches die Ethylenwahrnehmung und das Signalnetzwerk, welches das Signal von Endomembranrezeptor zum nukleären Effektor weiterleitet, darstellt (Roman u. a., 1995; Schaller und Kieber, 2002). Hauptsächlich regulieren die Ethylenrezeptoren die Ethylenantworten negativ über CTR1. Kurz dargestellt, aktivieren die Rezeptoren CTR1, welches nach unten signalisiert, dass die Ethylenantworten bei Abwesenheit von Ethylen reprimiert werden. Die Bindung von Ethylen führt zur Inaktivierung der Rezeptoren und des inhibitorischen Signals von CTR1, welches dann ausgeschaltet wird.

Nach Inaktivierung von CTR1 aktiviert EIN2 die Ethylenantwort über die darunter gelegenen Transkriptionsfaktoren wie z.B. EIN3 und andere EIN3-ähnliche Proteine, die EILs. Diese regulieren auf direktem Wege andere auf Ethylen reagierende Gene in der Transkriptionskaskade. Neuere Studien haben komplexe posttranskriptionale regulatorische Mechanismen aufgedeckt, die die EIL und EIN3 Proteine ethylenabhängig regulieren. Zum einen werden EIN3 und EIL1 Proteine über die direkte Interaktion mit den Skp-Cullin-F-Box (SCF) F-Box E3 Ligasen EBF1 und EBF2 zur Ubiquitinierung und dem 26S Proteasom-abhängigen Abbau angesteuert (Potuschak u. a., 2003; Guo und Ecker, 2003). Interessanterweise

unterliegt die EBF1/2 mRNA posttranskriptioneller Regulierung durch die 5' nach 3' Exonuklease XRN4 (Potuschak u. a., 2006; Olmedo u. a., 2006).

Zum anderen kann die EIN3 Proteinstabilität zusätzlich über MAPK Phosphorylierung reguliert werden. Es wurde gezeigt, dass die MAPKK9-MAPK3/6 Kaskade die T174 und T592 Sites in EIN3 phosphorylieren kann, und somit seine Stabilität beeinflussen kann. Hier wurde angenommen, dass eine gleichzeitige Aktivierung der MAPKK9 Kaskade sowie der Inhibierung des CTR1 Wegs die EIN3 Mengen spezifizieren und mengenmäßig bestimmen können (Yoo u. a., 2009).

2.5.3 Ethylenwirkung in der Nährstoffaufnahme

Wie unter 2.4.5 bereits beschrieben, gibt es mehrere Studien über den Einfluss von Ethylen auf die Eisenaufnahme. In dieser Arbeit wird erstmals eine molekulare Verknüpfung zwischen beiden Signalwegen vorgestellt.

Desweiteren spielt Ethylen eine Rolle im Phosphat-Haushalt der Pflanzen. Es wurde gezeigt, dass Ethylen die Elongation der Hauptwurzel bei Phosphatmangel induziert sowie dass eine Behandlung von an Phosphatmangel leidenden Pflanzen mit Ethyleninhibitoren zu einer Abnahme der Wurzeelongation führt (Ma u. a., 2003).

Desweiteren führt eine Unterversorgung mit Kalium zur Induktion verschiedener an der Ethylenbiosynthese beteiligter Gene. Dieser Anstieg an Ethylen zeigt sich in einer reduzierten Anzahl an Lateralwurzeln bei an Kaliummangel leidenden Pflanzen (Jung u. a., 2009).

Diese Arbeiten verdeutlichen die Vielfalt des Pflanzenhormons Ethylen bei abiotischem Stress. Bei biotischem Stress wirkt Ethylen zusammen mit weiteren Pflanzenhormonen, um eine systemische Abwehr der Pflanzen gegen Schadorganismen zu gewährleisten (zusammengefasst von Zhao und Qi, 2008).

2.6 Ziel dieser Arbeit

Die Regulation der Eisenaufnahme in der Wurzel wird durch den BHLH Transkriptionsfaktor FIT gesteuert, der die Eisenmobilisierung und -aufnahme aus der Rhizosphäre steuert. Vorangegangene Studien zeigten, dass *FIT* nicht nur transkriptionell reguliert wird, sondern dass eine weitere Regulation auf posttranskriptioneller Ebene stattfinden muss. Die steuernden Mechanismen und Signalgeber sind weitestgehend unbekannt. Daher war es wichtig, die Art der posttranskriptionellen Regulation von FIT zu untersuchen. FIT gehört zu den BHLH

Transkriptionsfaktoren, einer in Pflanzen sehr umfassenden Proteinfamilie, die leicht Homo- oder Heterodimere bilden können und auf diese Art eine posttranskriptionelle Regulation erfahren können. Um die Frage zu beantworten, ob FIT möglicherweise über eine solche Protein-Protein Interaktion reguliert wird, wurde in vorangegangenen Arbeitsschritten nach möglichen Interaktionspartnern für FIT gesucht. Dabei konnte als möglicher Interaktionspartner der Transkriptionsfaktor EIL1 aus dem Ethylensignalweg gefunden werden.

Erstes Ziel dieser Arbeit war daher die Verifizierung der Interaktion von FIT mit EIL1 sowie dem ihm sehr ähnlichen Protein EIN3, sowohl in vitro als auch in vivo mit verschiedenen Methoden wie In vitro Pulldown Assay und bimolekularer Fluoreszenzkomplementation.

Das nächste Ziel lag dann darin, eine mögliche biologische Bedeutung dieser Protein-Protein Interaktion festzustellen. Vorrangig sollte hier ein möglicher Einfluss der EIN3/EIL1 Proteine auf die Eisenaufnahme mit Hilfe genetischer und physiologischer Methoden untersucht werden. Außerdem wurde der Einfluss des Ethylensignalweges auf die Regulation der Eisenhomöostase und der Eisenaufnahme untersucht.

Desweiteren sollte im Allgemeinen der Einfluss des Pflanzenhormons Ethylen auf die Regulation der Eisenaufnahme untersucht werden. Außerdem wurden Experimente durchgeführt, um nachzuweisen, ob Eisenmangel selbst sowie der Faktor FIT einen Einfluss auf die Ethylenbiosynthese haben.

3 Material und Methoden

Allgemein übliche molekularbiologische Standardverfahren wurden nach Sambrook u. a. (2001) durchgeführt und sind hier nicht gesondert beschrieben (z.B. Restriktionsverdauung, Agarosegelelektrophorese, Standard PCR, etc.). Weiter entsprachen allgemeine Laboreinrichtungen, verwendete Maschinen, Arbeitsgeräte und Chemikalien den in der Molekularbiologie üblichen Anforderungen und sind hier nicht gesondert aufgeführt. Im Folgenden sind daher nur die Materialien und Methoden aufgelistet, die für die Durchführung der Arbeit im Speziellen wesentlich waren.

3.1 Material

3.1.1 Pflanzenmaterialien

Tabakpflanzen

Nicotiana benthamiana

T-DNA Insertionslinien bzw. EMS Mutationslinien von *Arabidopsis thaliana*, Sorte Columbia-0 (Col-0)

Kürzel	Name/Herkunft	AGI Code Gen	Name Gen
<i>fit-3 (fit)</i>	GABI-kat 108C10/Jakoby u. a. (2004)	At2g28160	FIT
<i>ein3-1 eil1-1</i>	F.J. Romera, Cordoba	At3g20770	EIN3
	nicht veröffentlicht	At2g27050	EIL1
<i>ebf1-1 ebf2-1</i>	Ríos u. a. (2002)	At2g25490	EBF1
	Potuschak u. a. (2003)	At5g03280	EBF2
<i>etr1-1</i>	F.J. Romera, Cordoba, genaue Herkunft unbekannt	At1g66340	ETR1
<i>ein2-1</i>	Zipfel u. a. (2004)	At5g03280	EIN2

Überexpressionslinien von *Arabidopsis thaliana*, Sorte Columbia-0 (Col-0)

Kürzel	AGI Code Gen	Name Gen	Promoter	Tag	Herkunft
FIT0x	At2g28160	FIT	2x CaMV 35s	-	Jakoby u. a. (2004)
EBF10x	At2g25490	EBF1	1x CaMV 35s	HA	T.Potuschak
EIL1-GFP Ox	At2g27050	EIL1	1x CaMV 35s	GFP	T.Potuschak

Promoter-GUS Linien von *Arabidopsis thaliana*, Sorte Columbia-0 (Col-0)

Kürzel	AGI Code Gen	Name Gen	Herkunft
pBHLH100::GUS	At2g41240	BHLH100	Wang u. a. (2007b)
pIRT1::GUS	At4g19690	IRT1	Vert u. a. (2002)
pFIT::GUS	At2g28160	FIT	Jakoby u. a. (2004)

3.1.2 Bakterien

<i>Escherichia coli</i>	Stamm INV α F'	Genotyp: F' endA1 recA1 hsdR17 (rk-,mk+) supE44 thi-1 gyrA96 rel A1 Δ 80 lacZ M15 (lacZYA-argF) U169 (Invitrogen)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Stamm pGV2260	Rif ^r , Cn ^r

3.1.3 Reagenzien**3.1.3.1 Pflanzenhormone und Inhibitoren**

Jasmonat (in DMSO, 100 mM)	Sigma
Aminoethoxyvinylglycin (in H ₂ O, 100 mM)	Sigma
1-Aminocyclopropan-carbonsäure (in H ₂ O, 100 mM)	Sigma

3.1.3.2 Isotope

MCI Redivue 35S-Methionin	Amersham
---------------------------	----------

3.1.3.3 Antikörperprodukte

S-Protein Agarose	Sigma
-------------------	-------

3.1.3.4 Kits

Spectrum Plant Total RNA Kit	Sigma Aldrich Kat.Nr. STRN250
RevertAid First Strand cDNA synthesis Kit	Fermentas Kat.Nr. K1622
e.Z.N.A. Gel Extraction Kit	Omega Biotek Kat.Nr. 2500-02

BP Clonase II	Invitrogen Kat.Nr. 11789020
LR Clonase II	Invitrogen Kat.Nr. 11791023
TNT T7 Quick for PCR Kit	Promega Kat.Nr.TM325

3.1.3.5 PCR-Reagenzien

ExTaq RT-PCR I Version 2.1	TaKaRa
MgCl ₂ (25 mM und 250 mM)	TaKaRa
PCR Puffer ohne MgCl ₂	TaKaRa
dNTPs (je 2,5 und 10 mM)	TaKaRa
PreMix ExTaq	TaKaRa
SYBR green I nucleic acid gel stain	Roche

3.1.4 Oligonukleotide

Genotypisierung der Kreuzungen

T-DNA / Gen, AGI Code	Name	Sequenz
GABI-Kat	GABI T-DNA check	5'-ATATTGACCATCATACTCATTGC-3'
GABI-Kat	GABIo8409	5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3'
<i>FIT</i> ,	FRU 5' 166-187	5'-CCCTGTTTCATAGACGAGAAAC-3'
At2g28160	FRU 3'	5'-GGT CCCATCATTATTCGTAG-3'

Klonierung für Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation

Gen, AGI Code	Name	Sequenz
<i>EIN3</i>	EIN3 BiFC forw	5' - GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGATGTTTAAATGAGAT - 3'
<i>EIN3</i>	EIN3 BiFC YN-GW rev	5' - GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGAACCATATGGATAC - 3'
<i>EIN3</i>	EIN3 BiFC GW-YN rev	5' - GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGAAACCATATGGATACATCTT - 3'
<i>EIL1</i>	EIL1 BiFC forw	5' - GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGATGATGATGTTTAAACGAG - 3'
<i>EIL1</i>	EIL1 BiFC YN-GW rev	5' - GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGAACCATATTGATACA - 3'
<i>EIL1</i>	EIL1 BiFC GW-YN rev	5' - GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGAAACCATATTGATACATC - 3'
<i>FIT</i>	FIT BiFC forw	5' - GGGGACAAGTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGAAGGAAGAGT - 3
<i>FIT</i>	FIT BiFC YN-GW rev	5' - GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAAGTAAATGACTTGATG - 3'
<i>FIT</i>	FIT BiFC GW-YN rev	5' - GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGTAATGACTTGATGAATTCA - 3'

Real-time qPCR Primer

In der folgenden Tabelle sind sämtliche verwendeten real-time PCR Primer aufgezählt. Die Verwendung erfolgte entweder zur Amplifikation von Massenstandards (MS) oder zur Quantifizierung in der real-time qPCR (Q).

Gen, AGI Code	Name	Sequenz
<i>EF1Balpha2</i> ,	AtEF-temp-5'(1763)	5'-GCTGCTAAGAAGGACACCAAG-3'
<i>At5g19510 (MS)</i>	AtEF-temp-3'(2776)	5'-TGTTCTGTCCCTACTGGATCC-3'
<i>EF1Balpha2</i> ,	AtEF-c-5'(2125)	5'-ACTTGTACCAGTTGGTTATGGG-3'
<i>At5g19510 (Q, cDNA)</i>	AtEF-c-3'(2251)	5'-CTGGATGTACTIONCGTTGTTAGGC-3'
<i>EF1Balpha2</i> ,	AtEF-gen-3'(2726)	5'-CCGGGACATATGGAGGTAAG-3'
<i>At5g19510 (Q, gDNA)</i>	AtEF-gen-5'(2522)	5'-TCCGAACAATACCAGAACTACG-3'
<i>UBP6</i> ,	AtUBP6-temp-5'(3306)	5'-TTTCTGTAACCCTCTTGTGGC-3'
<i>At1g51710 (MS)</i>	AtUBP6-temp-3'(4397)	5'-GATGTCTTCTTCGCGTTGC-3'
<i>UBP6</i> ,	AtUBP6-c-5'(975)	5'-GAAAGTGGATTACCCGCTG-3'
<i>At1g51710 (Q)</i>	AtUBP6-c-3'(1066)	5'-CTCTAAGTTTCTGGCGAGGAG-3'
<i>IRT1</i> ,	AtIRT1-temp-5'(898)	5'-TAGCCATTGACTCCATGGC-3'
<i>At4g19690 (MS)</i>	AtIRT1-temp-3'(1910)	5'-AGAAAATATGAATCGTGGGG-3'
<i>IRT1</i> ,	AtIRT1-c-5'(1523)	5'-AAGCTTTGATCACGGTTGG-3'
<i>At4g19690 (Q)</i>	AtIRT1-c-3'(1622)	5'-TTAGGTCCCATGAACTCCG-3'
<i>FRO2</i>	AtFRO2-temp-5'(3110)	5'-CCATGCTCGATCTTGTCTTG-3'
<i>At1g01580 (MS)</i>	AtFRO2-temp-3'(4105)	5'-ATTCCGGAACTTTTGAAAGG-3'
<i>FRO2</i>	AtFRO2-c-5'(1806)	5'-CTTGGTCATCTCCGTGAGC-3'
<i>At1g01580 (Q)</i>	AtFRO2-c-3'(1927)	5'-AAGATGTTGGAGATGGACGG-3'
<i>FIT</i>	AtFRU-temp-5'(1108)	5'-TTCAGTACAAGCGAAGAAAC-3'
<i>At2g28160 (MS)</i>	AtFRU-temp-3'(2094)	5'-GCGATCCATATAGGTCGTCTG-3'
<i>FIT</i>	AtFRU-c-5'(1392)	5'-GGAGAAGGTGTTGCTCCATC-3'
<i>At2g28160 (Q)</i>	AtFRU-c-3'(1483)	5'-TCCGGAGAAGGAGAGCTTAG-3'
<i>BHLH100</i>	BHLH100-5'(62)	5'-CCTCCCACCAATCAAACG-3'
<i>At2g41240 (MS)</i>	BHLH100-3'(1062)	5'-ATGACATCGGTGTGTAACCAC-3'
<i>BHLH100</i>	BHLH100-RT-5'(348)	5'-AAGTCAGAGGAAGGGTTACA-3'
<i>At2g41240 (Q)</i>	BHLH100-RT-3'(479)	5'-GATGCATAGAGTAAAAGAGTCGCT-3'
<i>BHLH038</i>	BHLH038-STD-(206)-5'	5'-GGAGATAACCTAAATAACGGCA-3'
<i>At3g56970 (MS)</i>	BHLH038-STD-(1112)-3'	5'-GGTCCAGATCAGTGTTAGATTCA-3'
<i>BHLH038</i>	BHLH038-RT-5'	5'-AGCAGCAACCAAAGGCG-3'
<i>At3g56970 (Q)</i>	BHLH038-RT-3'	5'-CCACTTGAAGATGCAAAGTGTAG-3'

Gen, AGI Code	Name	Sequenz
<i>BHLH039</i>	BHLH039-STD-(62)-5'	5'- AACCAAAGCAGCTTCCAAG - 3'
<i>At3g56890 (MS)</i>	BHLH039-STD-(1062)-3'	5'- CGAAGAGAAAAAGGACGACA - 3'
<i>BHLH039</i>	BHLH039-RT-5'	5'- GACGGTTTCTCGAAGCTTG - 3'
<i>At3g56890 (Q)</i>	BHLH039-RT-3'	5'- GGTGGCTGCTTAACGTAACAT - 3'
<i>BHLH101</i>	BHLH101-STD-(101)-5'	5'- CATCCCATCAAAGTCTCTCTAGC - 3'
<i>At2g41240 (MS)</i>	BHLH101-STD-(1100)-3'	5'- CCTCCAGTCTCACTTTGCAAT - 3'
<i>BHLH101</i>	BHLH101-RT-5'	5'- CAGCTGAGAAACAAAGCAATG - 3'
<i>At2g41240 (Q)</i>	BHLH101-RT-3'	5'- CAGTCTCACTTTGCAATCTCC - 3'
<i>ACO1</i>	ACO1 Standard 5'	5'- TCAAAGAGAGAGAGATGGAGATTC - 3'
<i>At2g19590 (MS)</i>	ACO1 Standard 3'	5'- TCTTCATGGTCTCAAGTCTGG - 3'
<i>ACO1</i>	ACO1 RT 5'	5'- AGTAGACTGTCGATTGCTACGTT - 3'
<i>At2g19590 (Q)</i>	ACO1 RT 3'	5'- GCCTTTGTCTCCAAACTTGG - 3'
<i>ACO2</i>	ACO2 Standard 5'	5'- CCAAACCATGGCTCTAATCA - 3'
<i>At1g62380 (MS)</i>	ACO2 Standard 3'	5'- CATTCTTCATTGCTGCGAA - 3'
<i>ACO2</i>	ACO2 RT 5'	5'- CGGTTGCATCGTTTTACAA - 3'
<i>At1g62380 (Q)</i>	ACO2 RT 3'	5'- CCTTGGGCTGAAACTTGAC - 3'
<i>ACS4</i>	ACS4 Standard 5'	5'- CCAGGGTTTGATAGGGATCT - 3'
<i>At2g22810 (MS)</i>	ACS4 Standard 3'	5'- GTCGTGAAACGATAGTCGGA - 3'
<i>ACS4</i>	ACS4 RT 5'	5'- AAGAACCGGGTTGGTTTAGA - 3'
<i>At2g22810 (Q)</i>	ACS4 RT 3'	5'- CGCTTTTACTCTTTTGGCATC - 3'
<i>ACS6</i>	ACS6 Standard 5'	5'- TGATCCTGACCGGATTGTTA - 3'
<i>At4g11280 (MS)</i>	ACS6 Standard 3'	5'- CGTGTCACTAAAGCTTAACCTGA - 3'
<i>ACS6</i>	ACS6 RT 5'	5'- GCGAATATGGACCATAAGACG - 3'
<i>At4g11280 (Q)</i>	ACS6 RT 3'	5'- CATCATAGTTGTTGCAGCCA - 3'
<i>EIN2</i>	EIN2 Standard 5'	5'- TGGGAGTACCCTCGACTTATG - 3'
<i>At5g03280 (MS)</i>	EIN2 Standard 3'	5'- ATGATCCGTACGCAGTCAC - 3'
<i>EIN2</i>	EIN2 RT 5'	5'- ACAACCGCAGTCACACTTCT - 3'
<i>At5g03280 (Q)</i>	EIN2 RT 3'	5'- CAAAACCGAAGCCAAATTCT - 3'
<i>CHITB</i>	CHITB Standard 5'	5'- TCCTATCATTATCCTCGGCC - 3'
<i>At3g12500 (MS)</i>	CHITB Standard 3'	5'- CCGTTAACGAAGGATCTTTG - 3'
<i>CHITB</i>	CHITB RT 5'	5'- TCTTGCCATGCCGTGATA - 3'
<i>At3g12500 (Q)</i>	CHITB RT 3'	5'- CTATACGATCGGCGACTCTC - 3'
<i>EBF1</i>	EBF1-STD-(1012)-5'	5'- AACTCTCTGACCATGACAGCC - 3'
<i>At2g25490 (MS)</i>	EBF1-STD-(2012)-3'	5'- CCGAGCCTAGCGAGAGG - 3'
<i>EBF1</i>	EBF1-RT-(1728)-5'	5'- AGTTGCAGGTTGCTCTATGGT - 3'
<i>At2g25490 (Q)</i>	EBF1-RT-(1828)-3'	5'- AAATGGATCGACACTGTTGG - 3'
<i>EBF2</i>	EBF2-STD-(969)-5'	5'- GTTGAAGAACTAAGTCCCTCTC - 3'
<i>At5g25350 (MS)</i>	EBF2-STD-(1970)-3'	5'- AGTTCTAGGTGGAATCTATGGTT - 3'

<i>EBF2</i>	EBF2-RT-(1671)-5'	5'- CTTGGCATCTTCTCCTAACCAT - 3'
<i>At5g25350 (Q)</i>	EBF2-RT-(1771)-3'	5'- GGCCGAGTTTTTGTATGCAT - 3'

3.1.5 Materialien

Matrix-Säulchen Bio MicroSpin	Bio-Rad
PCR-Platten 96 wells	Heinemann Labortechnik
Abdeckfolie PCR-Platten iCycler iQ	Bio-Rad

3.1.6 Geräte

Tischzentrifuge	Heraeus Biofuge Pico
Zentrifugen	Heraeus Multifuge 1 L-R (kühlbar)
	Heraeus Multifuge 1 L
Überkopf-Rotator	Fisher Scientific
Konfokales Mikroskop	Zeiss LSM310 Laser Scanning Microscope
PCR-Cycler	Peqlab primus 96 advanced
RealTime qRT-PCR-Cycler	MyIQ Bio-Rad
UV-Plattenspektrophotometer	Tecan Safire ²
Küvettenpektrophotometer	LKB Biochrom Novaspec
Kulturenschüttler	Bühler TH15
	Thermo Forma Orbital Shaker
Platteninkubatoren	Thermo Innovens
Pflanzenanzuchtschrank	Percival CU 3624
Sterilbank	Heraeus HeraSafe KS 12
Heizschrank	Memmert
Thermoblock	Peqlab Thriller
Gelkammern für Nukleinsäuren	Peqlab
Gelkammern für SDS-PAGE	Bio-Rad Protean 3 Cell
Spannungsquellen	Bio-Rad
Pipetten	Abimed

Vortex

Homogenisator

VibroFix V

Retsch

Heidolph RZR2020

3.1.7 Vektoren

pGBKT7	<i>GAL4</i> _(1–147) DNA-BD, <i>TRP1</i> , Kan ^r	7,3 kb	Hefe 2 Hybrid Vektor mit DNA-Bindedomäne
pGADT7	<i>GAL4</i> _(768–881) DNA-AD, <i>LEU2</i> , Amp ^r	8,0 kb	Hefe 2 Hybrid Vektor mit DNA-Aktivierungsdomäne
pCRII	<i>lacZ</i> , Amp ^r , Kan ^r	4,0 kb	Vektor für TA Klonierung
pDONR207	Kan ^r , Gm ^r , <i>ccdB</i> GATEWAY	5,6 kb	ENTRY Vektor für Gateway Klonierung
pBiFP1	Spec ^r , <i>ccdB</i> GATEWAY, <i>YFP N-ter</i>	ca. 12,1 kb	Vektor für BiFC, N-terminaler Teil des YFP hinter GW Kasette
pBiFP2	Spec ^r , <i>YFP N-ter</i> , <i>ccdB</i> GATEWAY	ca. 12,1 kb	Vektor für BiFC, N-terminaler Teil des YFP vor GW Kasette
pBiFP3	Spec ^r , <i>YFP C-ter</i> , <i>ccdB</i> GATEWAY	ca. 12,1 kb	Vektor für BiFC, C-terminaler Teil des YFP vor GW Kasette

Vektoren BiFP von F. Parcis

3.1.8 Plasmide

pGBKT7: <i>FIT</i> Volllänge	<i>GAL4</i> _(1–147) DNA-BD, <i>TRP1</i> , Kan ^r , <i>FIT</i> Volllänge	4,9 kb
pDONR207: <i>FIT</i> m. Stop	Gm ^r , <i>FIT</i> cDNA Volllänge mit Stopcodon	4,36 kb
pDONR207: <i>FIT</i> o. Stop	Gm ^r , <i>FIT</i> cDNA Volllänge ohne Stopcodon	4,36 kb
pDONR207: <i>EIL1</i> m. Stop	Gm ^r , <i>EIL1</i> cDNA Volllänge mit Stopcodon	5,13 kb
pDONR207: <i>EIL1</i> o. Stop	Gm ^r , <i>EIL1</i> cDNA Volllänge ohne Stopcodon	5,13 kb
pDONR207: <i>EIN3</i> m. Stop	Gm ^r , <i>EIN3</i> cDNA Volllänge mit Stopcodon	5,29 kb
pDONR207: <i>EIN3</i> o. Stop	Gm ^r , <i>EIN3</i> cDNA Volllänge ohne Stopcodon	5,29 kb
pBiFP1: <i>FIT</i>	Spec ^r , <i>FIT</i> cDNA Volllänge o. Stop, <i>YFP N-terminal</i>	ca. 13,5 kb
pBiFP1: <i>EIN3</i>	Spec ^r , <i>EIN3</i> cDNA Volllänge o. Stop, <i>YFP N-terminal</i>	ca. 14,5 kb
pBiFP1: <i>EIL1</i>	Spec ^r , <i>EIL1</i> cDNA Volllänge o. Stop, <i>YFP N-terminal</i>	ca. 14,4 kb
pBiFP2: <i>FIT</i>	Spec ^r , <i>FIT</i> cDNA Volllänge m. Stop, <i>YFP N-terminal</i>	ca. 13,5 kb
pBiFP2: <i>EIN3</i>	Spec ^r , <i>EIN3</i> cDNA Volllänge m. Stop, <i>YFP N-terminal</i>	ca. 14,5 kb
pBiFP2: <i>EIL1</i>	Spec ^r , <i>EIL1</i> cDNA Volllänge m. Stop, <i>YFP N-terminal</i>	ca. 14,4 kb
pBiFP3: <i>FIT</i>	Spec ^r , <i>FIT</i> cDNA Volllänge m. Stop, <i>YFP C-terminal</i>	ca. 13,5 kb
pBiFP3: <i>EIN3</i>	Spec ^r , <i>EIN3</i> cDNA Volllänge m. Stop, <i>YFP C-terminal</i>	ca. 14,5 kb
pBiFP3: <i>EIL1</i>	Spec ^r , <i>EIL1</i> cDNA Volllänge m. Stop, <i>YFP C-terminal</i>	ca. 14,4 kb

3.1.9 Puffer und Lösungen

S-Protein Pulldown Assay

Bindepuffer

20 mM	HEPES-KOH pH7,5
200 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
20 %	Glycerin
0,1 %	Nonidet P-40
1 x	Proteinase Inhibitor Cocktail
0,1 mg/ml	BSA

Waschpuffer

20 mM	HEPES-KOH pH 7,5
200 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
20 %	Glycerin
0,1 %	Nonidet P-40
1 x	Proteinase Inhibitor Cocktail

Tabakinfiltration mit *Agrobacterium tumefaciens*

Infiltrationsmedium

10 mM	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure MES-KOH pH 5,2
10 mM	MgCl ₂
100 μM	Acetosyringon

gDNA Extraktion aus Pflanzenmaterial für PCR

Extraktionspuffer

200 mM	Tris Base pH 7,5
250 mM	NaCl
25 mM	EDTA pH 8,0
0,5 %	SDS

GUS Assay zur histochemischen Überprüfung der Promoteraktivität

Histochemische GUS Assay Lösung

100 mM	Na ₂ HPO ₄
pH 7,2	NaH ₂ PO ₄
2 mM	K ₄ (Fe(CN) ₆)
2 mM	K ₃ (Fe(CN) ₆)
0,2 %	Triton-X
2 mM	x-Gluc

3.1.10 Medien zur Anzucht

3.1.10.1 Sterile Pflanzenanzucht auf Plattensystem

Hoagland Medium, pH 6,0

<u>Makronährstoffe</u>		<u>Mikronährstoffe</u>		<u>Eisen (+Fe)</u>	
0,75 mM	MgSO ₄	50 μM	KCl	50 μM	FeNaEDTA
0,5 mM	KH ₂ PO ₄	50 μM	H ₃ BO ₃		
1,25 mM	KNO ₃	10 μM	MnSO ₄		
1,5 mM	Ca(NO ₃) ₂	2 μM	ZnSO ₄		
		1,5 μM	CuSO ₄		
		0,075 μM	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄		

pH 6,0 mit KOH, Zugabe von 1,0 % Saccharose und 0,8 % Pflanzenagar

3.1.10.2 Pflanzenanzucht auf Erde

- Torfsubstrat 2
- Vermiculit
- Töpfe mit Auslaß (50x50x46 mm)
- Euroschale 60x40x6,5

3.1.10.3 Bakterien

LB Medium (pH 7,5)

10 g/l	NaCl
10 g/l	Difco Bacto Trypton
5 g/l	Hefeextrakt

3.2 Methoden

In diesem Abschnitt nicht beschriebene Standard-Methoden der Molekularbiologie, wie z.B. die Agarosegelelektrophorese, wurden nach gängiger Laborpraxis durchgeführt. Für Informationen diesbezüglich sei auf die Standardliteratur, insbesondere die Laborhandbücher von Sambrook et al. (Sambrook u. a., 2001), verwiesen.

3.2.1 Pflanzenmethoden

3.2.1.1 Pflanzenanzucht

Zur sterilen Anzucht von *Arabidopsis thaliana* wurden die Samen für die Zeit von 8 Minuten mit 6 % NaOCl und 0,1 % Triton-X sterilisiert. Nach fünf Waschschritten mit H₂O dest. wurden die Samen zur Stratifikation in 0,1 %igen Pflanzenagar aufgenommen und bei 4 °C für drei Tage aufbewahrt.

Die so vorbereiteten Samen wurden zu je 2 Reihen á 12 Samen auf vorbereitete Hoagland-Festmedium Platten mit 50 µM Fe ausgelegt. Die Samen wurden für 14 Tage vertikal in einen Pflanzenanzuchtschrank unter Langtagbedingungen (16 h Licht) bei 70 % Lichtintensität und 21 °C zur Keimung gebracht. Nach 14 Tagen wurden die Pflanzen auf Hoagland-Festmedium ohne Fe mit 50 µM Ferrozin oder erneut mit 50 µM Fe umgesetzt. Nach weiteren drei Tagen unter o.a. Bedingungen wurden die Pflanzen getrennt in Spross und Wurzeln zügig geerntet, á ca. 100 mg aliquotiert und in flüssigem N₂ eingefroren.

Zur Anzucht der 6 Tage alten Pflanzen wurden die vorbereiteten Samen zu je 5 Reihen á 12 Samen auf Samen auf vorbereitete Hoagland-Festmedium Platten mit 50 µM Fe oder 0 µM Fe ausgelegt. Die Samen wurden für 6 Tage vertikal oder horizontal in einen Pflanzenanzuchtschrank unter Langtagbedingungen (16 h Licht) bei 70 % Lichtintensität und 21 °C zur Keimung gebracht. Die Pflanzen wurden zur weiteren Verwendung für die Extraktion von RNA zügig komplett geerntet, á ca. 60 mg aliquotiert und in flüssigem N₂ eingefroren.

3.2.1.2 Extraktion von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial für PCR

Kleine Blattstücke der jeweiligen Probe wurden in ein Probengefäß geerntet und für ca. eine Stunde bei -80 °C eingefroren. Nach Zugabe zweier steriler Metallkugeln wurden die Proben unter Kühlung mit flüssigem N₂ mittels Retsch Maschine homogenisiert. Nach Zugabe von 400 µl wurden die Proben für 5 Minuten bei 4 °C

zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 300 μl 2-Propanol gemischt. Nach erneuter 5-minütiger Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das entstandene Pellet wurde zweimal mit 400 μl 70 % Ethanol gewaschen. Nach Trocknen des Pellets wurde die DNA in 500 μl TE Puffer aufgenommen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.2.1.3 Extraktion von mRNA aus Pflanzenmaterial

Das bereits geerntete Pflanzenmaterial (3.2.1) wurden unter ununterbrochener Tiefkühlung mit flüssigem N_2 zu feinem Pulver homogenisiert. Pro 100 mg Pflanzenmaterial wurde 1 ml Trizol zugegeben, die Proben wurden für 5 Minuten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. Danach erfolgte die Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro Ansatz. Die Proben wurden für 15 Sekunden mit dem Vortex gut durchmischt. Nach einer Inkubation für 5 Minuten wurden die Proben für 15 Minuten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 12000 g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in welchem sie mit 500 μl 2-Propanol gemischt wurde. Die Proben wurden erneut für 10 Minuten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert um die RNA zu fällen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 10 Minuten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 12000 g wurden die Proben zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Zwischen den Waschschrritten erfolgten fünfminütige Zentrifugationsschritte bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 7500 g. Das so erhaltene Pellet wurde luftgetrocknet und das Pellet in 11 μl H_2O aufgenommen. Die Konzentration und Reinheit der so gewonnenen Nukleinsäuren wurde photometrisch bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm bestimmt.

3.2.1.4 Kreuzung von *A. thaliana*

Homozygote, zu kreuzende Insertionsmutanten bzw. EMS-Mutanten wurden wie beschrieben auf Erde angezogen. Nach dem Übertritt in das reproduktive Wachstum wurde zunächst der Primärspieß zurückgeschnitten und durch die Aufhebung der Apikaldominanz der Austrieb mehrerer Blüten tragender Seitensprosse induziert. Um eine Kontamination durch Selbstbestäubung zu unterbinden, wurden aus einer Infloreszenz des weiblichen Kreuzungspartners zunächst alte Blüten mit reifem, ausgeschüttetem Pollen mit einer feinen Pinzette entfernt und die Pinzette umgehend mit 70% Ethanol gereinigt. Als nächstes wurden unreife Knospen aus der Infloreszenz entfernt, so dass in der Regel 3 Knospen übrig blieben, an deren Spitze bereits die weißen Petalen sichtbar waren. In diesem Entwicklungsstadium ist eine Bestäubung des bereits reifen Karpells möglich, während der Pollen in den Stamina noch unreif und damit eine Selbstbestäubung ausgeschlossen ist. Die selektierten Knospen wurden mit einer feinen Pinzette von Sepalen, Petalen und Stamina befreit, so dass von der Blüte nur noch das Karpell übrig blieb.

Von Infloreszenzen des männlichen Kreuzungspartners wurden frisch geöffnete Blüten abgetrennt und der Pollen durch Abstreifen auf dem Karpell des weiblichen Kreuzungspartners platziert. Derart bestäubte Blüten wurden durch Bindfäden markiert und die Pflanzen im Anzuchttraum weiter kultiviert. 2 - 3 Tage nach der Kreuzung wurde dessen Erfolg in Form des Auswachsens des Karpells zum Fruchtkörper überprüft. Samen der aus Kreuzungen hervorgegangene Schoten wurden separat geerntet und umgehend zu Anzucht der F1 Nachkommen sterilisiert und auf Agarplatten ausgelegt. Mittels PCR sowie Ethylen Triple Response Assay identifizierte positive heterozygote F1 Nachkommen wurden geselbstet und homozygote Individuen in der F2 Generation mittels PCR und Triple Response Assay selektiert.

3.2.1.5 GUS Assay

Zum Nachweis der Promoteraktivitäten der Promoter::GUS-Linien wurde ein histochemischer GUS-Assay zum qualitativen Nachweis durchgeführt. Hierzu wurden die Pflanzen wie unter 3.2.1 für 6 Tage angezogen. Zu jeder Probe, bestehend aus 3 Pflanzen, wurden 250 μ l GUS Assay Lösung zugegeben und die Reaktion für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach 2 Stunden wurden die Pflanzen für eine Stunde mit 70 % Ethanol inkubiert, um das Chlorophyll zu entfernen. Zum Schluss wurde die Blaufärbung nach Lokalisation und Intensität ausgewertet.

3.2.1.6 Triple Response Assay

Zum Nachweis der Reaktion der Pflanzenlinien auf Ethylen wurde ein Triple Response Assay durchgeführt. Dazu wurden die Samen wie unter 3.2.1 vorbehandelt. Dann wurden die Samen auf Hoagland Platten mit 10 μ M ACC ausgelegt, mit porösem Band verschlossen und für eine Stunde im Licht inkubiert. Danach wurden die Pflanzen für 5 Tage in Dunkelheit gelagert. Danach wurde die Ausbildung der Ethylenantwort (2.4.5) ausgewertet.

3.2.2 S-Protein Pulldown Assay

Zur Verifizierung der potentiellen Interaktionspartner *in vitro* wurde hier die Interaktion zwischen den Klonen, das heißt den aus dem Hefe Di-Hybrid Assay gefundenen Teilen der potentiellen interessanten Interaktionspartner und dem AtFIT Protein mit C-Terminal und als Volllänge-Protein untersucht. Das FIT Protein lag als C-Terminal Domäne und als Volllänge-Protein bereits als in *E. coli* exprimiertes Protein mit S-Tag vor. Um aus den im Hefe Di-Hybrid gefundenen

Klonen funktionelle Proteine zu gewinnen, wurden die im Hefe Di-Hybrid Assay amplifizierten Insertionen mit Hilfe des TNT T7 Quick for PCR Kit transkribiert und translatiert und dabei mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert, um später einen Nachweis erbringen zu können.

3.2.2.1 In-vitro Translation von ^{35}S -Methionin-markierten Peptiden

Um die jeweiligen Insertionen zu transkribieren und translatieren zu können, wurden sie frisch aus den bereits im Hefe Di-Hybrid (Fleischer, 2007) erhaltenen PCR Produkten amplifiziert und mit Natriumacetat gefällt. Je 8 μl des so erhaltenen PCR Produktes wurden mit 40 μl TNT T7 PCR Quick Master Mix und 2 μl ^{35}S -Methionin (1000 Ci/mmol bei 10 mCi/ml) für 90 Minuten bei 30 °C im Thermoblock inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden nach der Inkubation bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert. Die Produkte dieser Reaktionen wurden jeweils mit SDS-PAGE und Phosphoimagerscreen nachgewiesen.

3.2.2.2 Expression von FIT-Volllänge mit S-tag in E.coli

Die heterologe Expression der in diesem Versuch verwendeten FIT-Proteine FIT Volllänge wurde vor Aufnahme der Versuche im Labor bereits durchgeführt und die Proteine mittels S-Tag Thrombin Purification Kit von Novagen einsatzfertig aufgereinigt.

3.2.2.3 S-Protein Pulldown Assay

Um die Interaktion zwischen o.a. Proteinen testen zu können wurde ein Nachweis nach (Hsiao and Chang, 1999) durchgeführt. Hierzu wurden von 100 μl S-Protein Agarose der Lagerpuffer abzentrifugiert und die Agarose in mit 1 mg/ml BSA beladen, kurz inkubiert, das BSA abzentrifugiert und in 100 μl Bindepuffer (3.1.9) aufgenommen. Für jeden Ansatz wurden 5 μl der S-Agarose mit 500 ng des S-getaggeten AtFIT Proteins beladen, die Mischung in 100 μl Bindepuffer aufgenommen und bei 4 °C für 4 Stunden über Kopf bei 10 rpm und einem Winkel von 20 ° rotiert. Danach wurde die S-Agarose auf BioRad Micro Bio Spin Säulchen aufgefangen, 5 mal mit 50 μl Waschpuffer (3.1.9) gewaschen, um nicht gebundenes AtFIT abzuwaschen und dann mit 100 μl Bindepuffer über der Matrix resuspendiert. Nun wurden je Ansatz 10 μl der vorbereiteten in-vitro synthetisierten radioaktiv markierten Proteine zugegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C auf dem Überkoprotator bei 10 rpm und einem Winkel von 20 °. Nach der Inkubation wurde erneut die S-Agarose mit dem daran

gebundenen FIT Protein auf BioRAD Bio MicroSpin Säulchen aufgefangen, 5 mal mit 50 μ l Waschpuffer gewaschen und die S-Agarose mit 20 μ l 2x Laemmli Puffer über der Matrix resuspendiert. Die jeweiligen Durchflüsse, Waschüberstände und die resuspendierte S-Agarose wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, in einem Wet Blot auf Nitrocellulose Membran übertragen und diese Blots nach Trocknen zum Nachweis für mehrere Tage auf einen Phosphoimagerscreen aufgelegt, bevor dieser in einem BAS-Reader Gerät ausgelesen wurden.

3.2.3 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation

3.2.3.1 Klonierung der zu untersuchenden Kandidaten

Die zu untersuchenden Kandidatengene für FIT, EIN3 und EIL1 wurden aus Col-0 cDNA mittels der Oligonukleotide 3.1.4 amplifiziert und mittels Rekombination mittels BP Clonase II in den GATEWAY Vektor pDONR207 eingebracht. Die so erhaltenen Klone wurden durch Antibiotikaselektion sowie durch das Ersetzen der Gateway Kasette durch die Gene selektiert. Die Gateway Kasette sorgt normal dafür, dass sich die Bakterien, die diese Kasette enthalten, nicht weiter vermehren können, so dass eine automatische Selektion erfolgreich transformierter Klone stattfindet. Desweiteren wurden die Klone durch Restriktionsverdau überprüft. Die so erhaltenen Plasmide wurden durch Rekombination mittels LR Clonase II benutzt, um die Gene in die Zielvektoren pBiFP zu übertragen und erneut selektiert.

3.2.3.2 Agrobacterium tumefaciens Transformation

Die so erhaltenen pBiFP Plasmide wurden durch Transformation in Agrobacterium tumefaciens Zellen eingebracht. Hierzu wurde zu chemisch kompetenten Agrobakterien je 1 μ g Plasmid-DNA zugegeben. Die Reaktionen wurden umgehend bei 37 °C für 5 Minuten inkubiert. Danach wurde 1 ml LB Medium zugefügt, und die Zellen bei 28 °C und 220 rpm für 2 - 4 Stunden geschüttelt. Die Zellen wurden dann für 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen, 100 μ l LB Medium zugegeben und resuspendiert. Danach wurden die Zellen auf selektivem Medium ausplattiert und im Platteninkubator für 2 Tage bei 28 °C inkubiert. Die erhaltenen Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR überprüft.

3.2.3.3 Transiente Tabaktransformation mittels Infiltration

Die mittels Kolonie PCR überprüften mit pBiFP Plasmiden transformierten Agrobacterium Zellen wurden in jeweils 100 ml LB Medium mit dementsprechenden

Tabelle 3.3: Kombinationen für BiFC

Kombinationen
pBiFP2:FIT + pBiFP3:EIN3
pBiFP2:FIT + pBiFP3:EIL1
pBiFP2:EIN3 + pBiFP3:FIT
pBiFP2:EIL1 + pBiFP3:FIT
pBiFP1:FIT + pBiFP3:EIN3
pBiFP1:FIT + pBiFP3:EIL1
pBiFP1:EIN3 + pBiFP3:FIT
pBiFP1:EIL1 + pBiFP3:FIT

Tabelle 3.4: Negativkontrollen BiFC

Kombinationen der BiFP Konstrukte zur Negativkontrolle
pBiFP2 + pBiFP3
pBiFP1 + pBiFP3
pBiFP2:FIT + pBiFP3
pBiFP2 + pBiFP3:EIN3
pBiFP2 + pBiFP3:EIL1
pBiFP2:EIN3 + pBiFP3
pBiFP2:EIL1 + pBiFP3
pBiFP1:FIT + pBiFP3
pBiFP1 + pBiFP3:EIN3
pBiFP1 + pBiFP3:EIL1
pBiFP1:EIN3 + pBiFP3
pBiFP1:EIL1 + pBiFP3

Antibiotika sowie 100 μ M Acetosyringon angezogen, abzentrifugiert und in einer optischen Dichte von 0,8 bis 1 in Infiltrationsmedium aufgenommen und für 2 bis 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Bakterienlösungen wurden miteinander vermischt, je nachdem welche Kombination von Proteinen auf Interaktion getestet werden sollte (3.3) und mit Hilfe einer sterilen Spritze mit hohem Druck auf die subapikale Epidermis von 4 - 6 Wochen alten Tabakpflanzen aufgebracht. Die Pflanzen wurden für 2 - 3 Tage bei ca. 23 °C bei 12 Stunden Licht/Tag gelagert.

3.2.3.4 Konfokale Mikroskopie zum Nachweis der Interaktion

Nach 2 - 3 Tagen wurden aus den infiltrierten Tabakpflanzen Schnitte der infiltrierten Blattareale angefertigt. Diese wurden unter dem konfokalen Laser Scanning

Tabelle 3.5: Zusammensetzung des Reaktionsmixes zum DNase Verdau.

7 μ l	RNA
1 μ l	10x DNase Puffer mit $MgCl_2$
0,5 μ l	RNase Inhibitor
1 μ l	DNase I
0,5 μ l	H_2O
10 μ l	Gesamtvolumen

Mikroskop betrachtet. Zur Bestimmung der Strukturen als Zellkerne wurden DAPI Färbungen an den Blattrandbereichen durchgeführt.

Laser: Argon/2: 488 nm

3.2.4 Lokalisation des EIL1 Proteins mittels GFP Nachweis

Die Pflanzenlinie EIL1-GFP Ox (Abb. 3.1.1) wurde im Plattensystem für 6 Tage auf + Fe und - Fe angezogen. Die Keimlinge wurden am 6. Tag mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie auf GFP Signale in der Wurzel überprüft.

Laser: Argon/2: 488 nm

3.2.5 Real-Time quantitative RT-PCR

3.2.5.1 cDNA Synthese

Die Pflanzen wurden nach 3.2.1 angezogen und die RNA für die cDNA Synthese isoliert. Die Konzentration der RNA wurde bestimmt und für folgende Reaktionen auf 1 μ g pro 7 μ l verdünnt.

Um die genomische DNA zu verdauen, die zum Teil mitisoliert wurde, wurde ein DNase Verdau vor der eigentlichen cDNA Synthese angesetzt, hierzu wurde je Probe ein Ansatz entsprechend Tabelle 3.5 gemacht.

Dieser Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zum Stoppen des Verdau wurde nun 1 μ l EDTA (25 mM) zugegeben, gleichzeitig wurde bereits 1 μ l des für die cDNA Synthese erforderliche oligo(dT)₁₈ Primers zugegeben. Die so behandelten Ansätze wurden für 10 Minuten auf 65 °C erhitzt. Bei diesem Schritt wurde gleichzeitig die RNA denaturiert. Nach folgendem Abkühlen der Proben auf 4 °C wurde der Reagenzienmix entsprechend Tabelle 3.6 zugegeben:

Die Reaktionsansätze wurden für 2 Stunden bei 42 °C inkubiert, danach die RTase für 10 Minuten bei 70 °C inaktiviert und die Proben auf 4 °C heruntergekühlt. Zum

Tabelle 3.6: Zusammensetzung des Reaktionsmixes zur cDNA Synthese

4 μ l	5x RTase Puffer
1 μ l	RNase Inhibitor
2 μ l	dNTPs 10 mM
0,5 μ l	M-MLV RTase
1 μ l	H ₂ O
20,5 μ l	Gesamtvolumen

Gebrauch in der Real Time qPCR wurden die Proben auf 200 μ l aufgefüllt und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

3.2.5.2 Etablierung der Real Time qPCR

Um genaue und reproduzierbare Ergebnisse für die Real Time qPCR zu erzielen, wurden für die neu zu untersuchenden Gene die PCR Oligonukleotide speziell konfiguriert, deren optimale Konzentration zueinander bestimmt, neue Standards für die jeweiligen Gene entwickelt und die PCR Effizienz optimiert.

Primer Design: Die Primer wurden mit Hilfe des Computerprogramms Primer 3 entwickelt, ihre Größen lagen zwischen 19 und 24 bp, die Amplikonlänge lag zwischen 101 und 261 bp, die Schmelztemperaturen lagen zwischen 58 °C und 61 °C. Die Amplikonlänge lag zwischen 101 und 269 bp und die Amplikons waren wegen des Gebrauchs eines oligo(dT)₁₈ Primers bei der cDNA Synthese am 3' Ende und somit in Nähe des poly-A Schwanzes der mRNA des jeweiligen Gens gelegen. Die Primer wurden durch Datenbankabgleich in NCBI und Tair auf ihre Spezifität hin überprüft. Die Primer wurden HPLC-aufgereinigt und in einer Konzentration von 100 μ M bestellt.

Standard-Entwicklung: Für die genaue Quantifizierung in der Real Time PCR wurden Standards generiert, die von cDNA amplifiziert wurden. Die Standards hatten eine Größe von 1 kb und enthielten auch die Sequenz der Real Time PCR Produkte. Die Standards wurden über Touchdown PCR amplifiziert, um höhere Spezifität der PCR Produkte zu erhalten. Die Produkte wurden mittel Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mit 3.1.3.4 aus dem Gel aufgereinigt. Die Standards wurden im UV-Plattenspektrophotometer quantifiziert und diese Quantifizierung im Agarosegel mit Konzentrationsmarker bestätigt. Die Standards wurden in einer Verdünnungsreihe von 10⁷ bis 10² Moleküle pro 10 μ l aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Primer Konzentrationsbestimmung: Um das jeweils effizienteste Verhältnis vom 5' Real Time PCR Primer zum 3' Real Time PCR Primer verwenden zu können, wurde für jedes Primerpaar eine sog. Primermatrix erstellt. Hierzu wurden Real

Time PCR Reaktionen durchgeführt mit Primer Konzentrationen zwischen 50 und 300 nM durchgeführt und jeweils nach der Konzentrationskombination mit der besten Effizienz selektiert.

Tabelle 3.7: Zusammensetzung des Mastermixes für die real time qPCR

10 µl	PreMix ExTaq
0,2 µl	Oligonukleotid 5´
0,2 µl	Oligonukleotid 3´
0,1 µl	SYBR green
10,5 µl	Gesamtvolumen

Tabelle 3.8: Schematische Darstellung des Thermoprofils für die real time PCR.

4 Minuten	Initialdenaturierung 95 °C.
40 Zyklen	
10 Sekunden	Denaturierung 95 °C
18 Sekunden	Annealing 58 °C
18 Sekunden	Elongation 72 °C
Schmelzkurve 1 Zyklus	
1 Minute	Denaturierung 95 °C
30 Sekunden	55 °C
30 Sekunden	95 °C

3.2.5.3 Real Time qPCR

Die Real Time qPCR wurde jeweils pro Reaktion entsprechend Tabelle 3.7 angesetzt. Da die Primer mit ähnlichen Annealingtemperaturen generiert wurden, konnte für alle Reaktionen das identische Thermoprofil entsprechend Tabelle 3.8 benutzt werden. Pro jeweiligem Versuchsansatz wurden je 2 technische Replikate gemacht um eventuelle Pipettierungenauigkeiten auszugleichen, ebenso werden je zwei Wasserkontrollen mitgeführt, um mit einer möglichen Hintergrundfluoreszenz auswerten zu können. Um eine Normalisierung durchführen zu können, wurden die beiden Housekeeping Gene UBP6 und EFalpha mitquantifiziert. Hierbei war es durch den Einsatz zweier verschiedener Primerpaare für EFalpha möglich, Kontaminierungen mit von genomischer DNA zu bestimmen sowie die eingesetzte Menge an cDNA zu bestimmen.

Zur Auswertung der Real Time qRT-PCR wurden die Mittelwerte der Moleküle der jeweiligen Replikate extrahiert, die durch die Standardkurve bereits quantifiziert worden sind. Nach Abzug der Werte der Wasserkontrollen für die jeweiligen Pflanzenlinien wurden die Kontaminierungen der genomischen DNA der jeweiligen Pflanzenlinien subtrahiert, um dann gegen die Housekeeping Gene normalisieren zu können. Auf diese Weise erhält man die Werte der absoluten Expression. Um relativ zu einer der Pflanzenlinien Aussagen treffen zu können, werden die absoluten Werte zu dem Wert der Pflanzenlinie gesetzt, zu der man relativ quantifizieren möchte.

4 Ergebnisse

4.1 Regulation der Eisenmangelantworten durch EIN3 und EIL1

4.1.1 Protein-Protein Interaktion zwischen FIT und den Ethylentranskriptionsfaktoren EIN3/EIL1 in vitro

Um eine mögliche posttranslationale Regulierung des FIT Transkriptionsfaktors zu untersuchen, wurde in vorangegangenen Arbeitsschritten nach einem Interaktionspartner für FIT gesucht. FIT gehört zur Klasse der BHLH Transkriptionsfaktoren, die sehr häufig über Homo- oder Heterodimerisierung reguliert werden. Um mögliche Interaktionspartner zu aufzufinden, wurde ein Hefe 2-Hybrid Screen durchgeführt. Hierbei wurde das C-terminale Ende von FIT (die letzten 330 Basenpaare der cDNA des Gens) als Köder benutzt. Die cDNA Bank, aus der mögliche Interaktionspartner gefunden werden sollten, wurde aus Arabidopsiswurzeln hergestellt, die auf Eisenmangelbedingungen angezogen wurden. Bei diesem Screen wurden annähernd 700 Kolonien untersucht, die auf für eine Interaktion selektivem Minimalmedium gewachsen sind. Sie wurden auf ihre durch eine Interaktion ausgelöste β -Galaktosidase Aktivität hin untersucht. Dabei wurden 495 positive Kolonien ausgewählt, deren Insertionen mittels PCR amplifiziert und im Anschluss sequenziert wurden. Die Sequenzanalyse ergab 40 verschiedene potentielle Kandidaten. Die dazugehörigen 40 cDNA Bank Insertionen wurden zusammen mit dem FIT C-terminalen Teil erneut kotransformiert und auf hoch stringentem selektivem Medium selektiert. Die so erhaltenen Kolonien wurden erneut auf deren β -Galaktosidase Aktivität hin untersucht, um die Rate möglicher falsch positiver Klone zu minimieren. So konnten 14 mögliche Interaktionspartner identifiziert werden. Durch weitere theoretische Analysen konnten 6 dieser 14 weiter herausgefiltert werden. Das interessanteste Protein war dabei EIL1 (Ethyleneinsensitive 3-like 1), welches mit drei unabhängigen Klonen als Interaktionspartner in Hefe nachgewiesen wurde.

In einem weiteren Experiment wurde diese Interaktion zwischen den gefundenen Fragmenten von EIL1 und dem C-terminalen Abschnitt von FIT in vitro verifiziert.

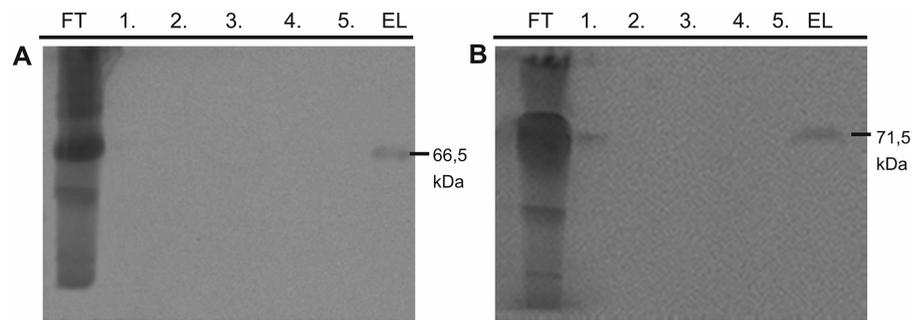


Abbildung 4.1: S-Agarose Pulldown Assay zwischen den Kandidatenpeptiden von A) EIL1 und B) EIN3 mit dem FIT Volllängeprotein. Die Größen der eluierten Peptide entsprechen den Originalgrößen der EIL1 und EIN3 Proteine. FT = Durchfluss; 1.-5. WS: Waschschritte; EL: Eluat der S-Agarose mit gebundenen Proteinen

Dazu wurde das C-terminale Ende des FIT Proteins mit einem S-Tag fusioniert und heterolog in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Die EIL1 Fragmente wurden *in vitro* synthetisiert und dabei radioaktiv mit ^{35}S -Methionin markiert, indem diese radioaktiv markierte Aminosäure während der Translation der Peptide eingebaut wurde. Dies ermöglichte einen sehr sensitiven Nachweis einer möglichen Interaktion. In einem S-Agarose Pulldown Assay wurden dann beide Proteine miteinander inkubiert, das FIT Peptid über eine S-Agarose gebunden, und das an FIT bindende Peptid eluiert.

So konnte die Interaktion zwischen dem C-terminalen Fragment von FIT sowie dem im Hefe 2-Hybrid Screen erhaltenen EIL1 Fragment bestätigt werden (Fleischer, 2007).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mittels des S-Agarose Pulldown Assay geprüft, ob diese Interaktion auch mit den Volllängeproteinen FIT und EIL1 möglich ist. Dies konnte bestätigt werden (Abb. 4.1 A). Desweiteren wurde überprüft, ob FIT auch mit dem Transkriptionsfaktoren EIN3, der mit 71% Sequenzübereinstimmung EIL1 sehr ähnlich ist (2.4.5), interagiert. Eine Interaktion *in vitro* konnte auch für diese Kombination von Volllängeproteinen bestätigt werden (Abb. 4.1 B).

Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass FIT mit EIL1 eine Protein-Interaktion eingehen kann und zeigen auch, dass dies für das EIN3 Protein ebenso möglich ist.

4.1.2 *In vivo* Protein Interaktion zwischen FIT und EIN3/EIL1

Die in 4.1.1 gezeigten Ergebnisse der Protein-Interaktion wurde *in vivo* im System Pflanze nochmals überprüft, um sicherzustellen, dass eine Interaktion in der Pflanze möglich ist, z.B. dadurch, dass die Proteine im gleichen Zellkompartiment exprimiert werden. Dazu wurden die jeweilig zu testenden Proteine mit entweder

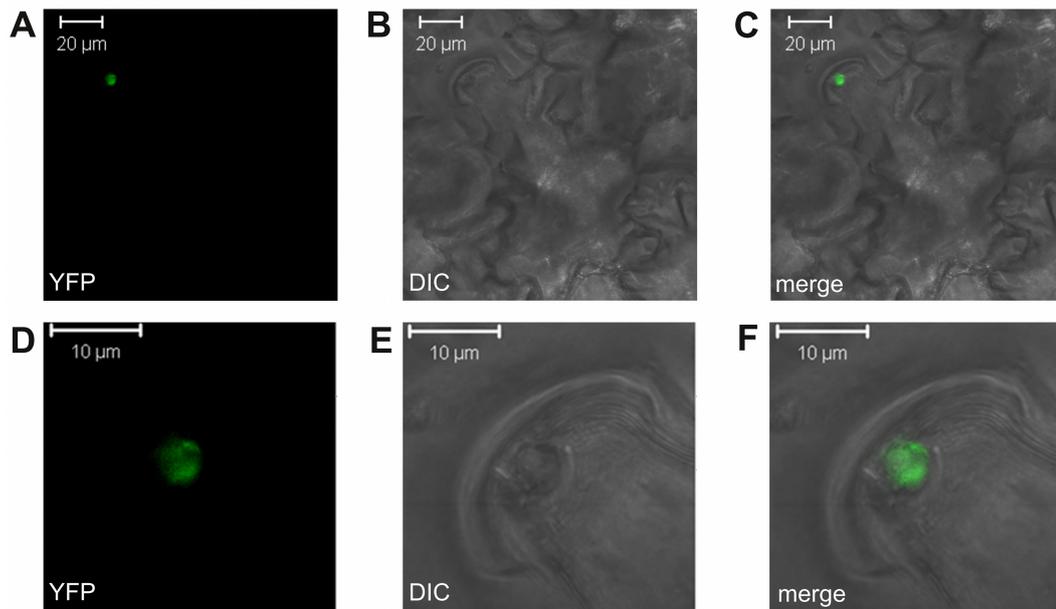


Abbildung 4.2: Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation zum Nachweis der Proteininteraktion zwischen EIL1, fusioniert mit dem N-terminalen Teil des gelb fluoreszierenden Proteins YFP, und FIT, fusioniert mit dem C-terminalen Teil des YFP. Das YFP Signal ist im Zellkern lokalisiert. A), D) YFP Signal im Zellkern durch Interaktion zwischen EIL1 und FIT; B), E) Differentialinterferenzkontrastmikroskopie DIC der gesamten Zelle; C), F) Übereinanderlagerung des YFP Signals mit der DIC zur genauen Lokalisation des YFP Signals.

den N-terminalen oder C-terminalen Teilen des gelb fluoreszierenden Proteins YFP (Yellow Fluorescent Protein) fusioniert. Die Kombinationen dieser Fusionen wurden mittels *Agrobacterium tumefaciens* vermittelter Transformation transient in Tabakblättern exprimiert. Eine erfolgreiche Interaktion der Kandidatenproteine führte dabei zur Rekonstituierung des YFP Proteins und somit zu einer Visualisierung der Interaktion und zur Lokalisation der Interaktion auf zellulärer Ebene.

Die getesteten Kombinationen waren folgende: FIT bzw. EIN3 oder EIL1, dahinter YFP N-terminal mit EIN3 oder EIL1 bzw. FIT, davor YFP C-terminal (pBiFP1 + pBiFP3), FIT bzw. EIN3 oder EIL1, davor YFP N-terminal mit EIN3 oder EIL1 bzw. FIT, davor YFP C-terminal (pBiFP2 + pBiFP3) (Tab. 3.3). Alle getesteten Kombinationen, von EIL1 bzw. EIN3 mit FIT führten zu fluoreszenten Signalen im Zellkern. In Abb. 4.2 wird die Interaktion des EIL1 Proteins mit FIT dargestellt. Durch Differentialinterferenzkontrastmikroskopie DIC ist es gelungen, den Zellkern der Tabakblattepidermiszellen zu lokalisieren und mittels Überlagerung der erhaltenen Bilder war es möglich, das spezifische YFP Signal im Zellkern zu lokalisieren. Dies war für die Interaktion zwischen dem EIN3 Protein und FIT ebenso möglich (Abb. 4.3).

Kontrollexperimente mit Kombinationen aus einer Protein-YFP Fusion und dem korrespondierenden leeren Vektor mit dem jeweilig passenden anderen

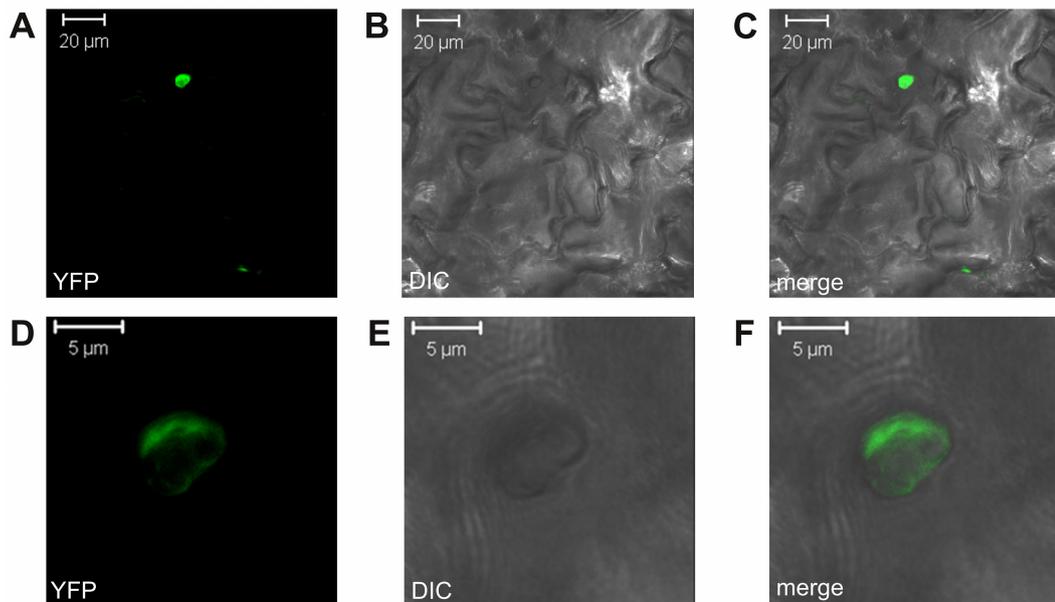


Abbildung 4.3: Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation zum Nachweis der Proteininteraktion zwischen EIN3, fusioniert mit dem N-terminalen Teil des gelb fluoreszierenden Proteins YFP, und FIT, fusioniert mit dem C-terminalen Teil des YFP. Das YFP Signal ist im Zellkern lokalisiert. A), D) YFP Signal im Zellkern durch Interaktion zwischen EIN3 und FIT; B), E) Differentialinterferenzkontrastmikroskopie DIC der gesamten Zelle; C), F) Übereinanderlagerung des YFP Signals mit der DIC zur genauen Lokalisation des YFP Signals.

YFP-Fragment sowie mit beiden Leervektoren (Tab. 3.4) bestätigten die Spezifität der hier gezeigten Interaktionen (Abb. 4.4).

Zusammenfassend konnte mit diesen Experimenten gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor FIT, der in der Eisenmangelantwort eine zentrale Rolle spielt, mit den Transkriptionsfaktoren EIL1 und EIN3 aus dem Ethylensignalweg spezifisch interagieren kann. Diese Ergebnisse weisen auf eine mögliche Rolle von Ethylen in der Regulation der Eisenmangelantworten in der Pflanzenwurzel hin.

4.1.3 Lokalisierung des EIL1 Proteins in der Wurzel

Die Interaktion zwischen den EIL1/EIN3 Proteinen mit FIT *in planta* setzen voraus, dass die Proteine in den gleichen Zellen exprimiert werden. Hier stehen die Wurzelzellen im Blickpunkt, da gezeigt wurde, dass FIT (bzw. LeFER) nur in der Wurzel, vor allem in der Wurzelspitze und Zentralzylinder, exprimiert wird (Ling u. a., 2002). *EIN3* und *EIL1* werden konstitutiv exprimiert, die Stabilisierung der Proteine erfolgt in Abhängigkeit von Ethylen (2.4.5) (Potuschak u. a., 2003; Guo und Ecker, 2003). *EIN3* ist normalerweise in den Wurzelzellen vorhanden, wenn die Pflanze im Licht angezogen wurde, so dass eine Interaktion möglich ist (Lee u. a., 2006). Um die Lokalisation von EIL1 in der Pflanzenwurzel zu überprüfen,

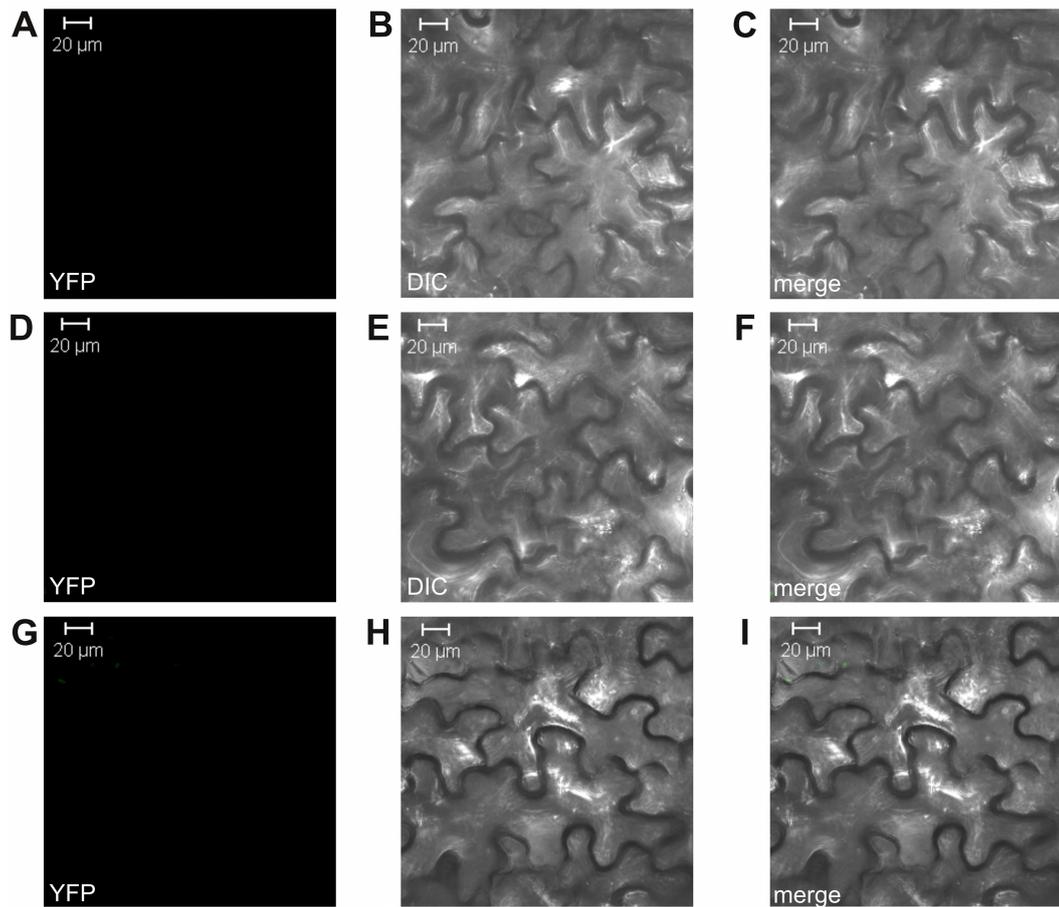


Abbildung 4.4: Kontrollen zur bimolekularen Fluoreszenzkomplementation zum Nachweis der Spezifität der Proteininteraktion zwischen EIL1 bzw. EIN3 und FIT. A), D), G) Aufnahme möglicher YFP Signale; B), E), H) Differentialinterferenzkontrastmikroskopie DIC der gesamten Zelle; C), F) Übereinanderlagerung des YFP Signals mit der DIC zur genauen Lokalisation des YFP Signals. A) - C) Kombination aus FIT, fusioniert mit dem C-terminalen Teil von YFP, mit dem Leervektor, der den N-terminalen Teil des YFP enthält. D) - F) Kombination aus EIN3, fusioniert mit dem N-terminalen Teil von YFP, mit dem Leervektor, der den C-terminalen Teil des YFP enthält. G) - I) Kombination aus den beiden Leervektoren, die den N- bzw. C-terminale Teil des YFP enthalten. Alle Kontrollen zeigten kein Fluoreszenzsignal.

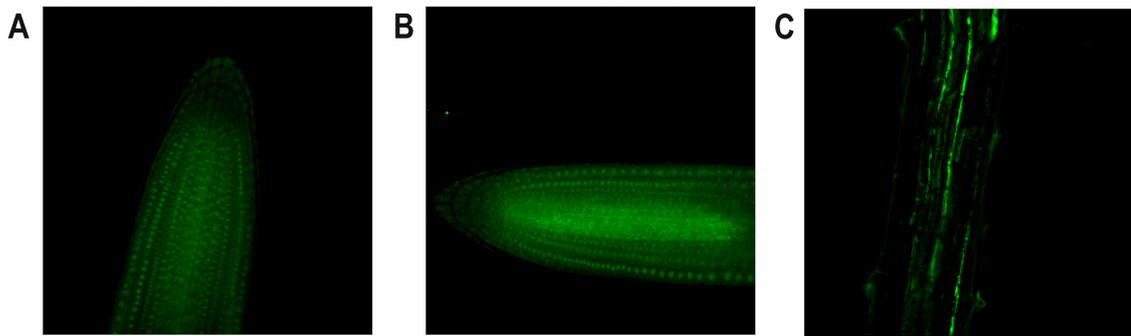


Abbildung 4.5: Transgene Arabidopsis Pflanzen mit Überexpression des EIL1 Proteins mit GFP-Fusion zum Nachweis der Lokalisation in verschiedenen Bereichen der Wurzel. A) Expression der EIL1-GFP Fusion bei +Fe Bedingungen im Bereich der Wurzelspitze; B) Expression der EIL1-GFP Fusion bei -Fe Bedingungen in der Wurzelspitze; A) - B): Expression in allen Zellschichten der Wurzelspitze in den Nuclei; C) Expression der EIL1-GFP Fusion in der oberen Wurzelhaarzone bei -Fe Bedingungen; Expression hauptsächlich in der Endodermis.

wurden Pflanzen angezogen, in denen EIL1 mit dem grün fluoreszierenden Protein GFP (Green Fluorescent Protein) fusioniert wurde (Linie von T. Potuschak: s. Tab. 3.1.1) Die Expression von EIL1-GFP erfolgte hierbei unter einem starken CaMV35s Promoter. Die so erhaltenen Pflanzen wurden auf 50 μM Eisen bzw. 0 μM für 6 Tage im Plattensystem im Langtag angezogen.

Bei der Untersuchung mittels konfokaler Mikroskopie zeigte sich, dass das EIL1-GFP Protein in der Wurzelspitze in allen Zellschichten exprimiert wurde (Abb. 4.5). Desweiteren wurde das EIL1-GFP Protein in der oberen Wurzelhaarzone nachgewiesen, dort beschränkte sich die Expression auf die Zellen des Zentralzylinders (Abb. 4.5). Diese Expression zeigte sich jedoch unabhängig vom Eisenstatus der Pflanzen. Daraus leitet sich ab, dass EIL1 nicht in Abhängigkeit von Eisen reguliert wird.

Es konnte somit nachgewiesen werden, dass EIN3/EIL1 in den für eine Interaktion mit FIT wichtigen Zellen der Wurzel bei Einfluss von Licht exprimiert werden, und somit eine Protein-Interaktion zwischen EIL1/EIN3 und FIT stattfinden kann.

4.1.4 Charakterisierung der *ein3eil1* Doppelmutante im Kontext der Eisenhomöostase

EIN3 und EIL1 sind zentrale Komponenten des Ethylensignalwegs, die teilweise redundant agieren. Sie sind beide in der Lage, physisch mit FIT zu interagieren. Da FIT eine wichtige Rolle in der transkriptionellen Regulation der Eisenmangelantwortkomponenten *FRO2* und *IRT1* spielt, sollte nun untersucht werden, ob EIN3/EIL1 einen Einfluss auf diese Regulation hat. Dazu wurde eine physiologische Analyse einer *ein3eil1* Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt.

Diese Doppelmutante ist gegenüber Ethylen stärker insensitiv gegenüber einer Behandlung mit Ethylen als die *eil1* Mutante oder der Wildtyp (Alonso u. a. (2003), s. Diplomarbeit Sabine Müller, 2008). Getestet wurde dies in einem Triple Response Assay (3.2.1.6), in dem die Pflanzen mit dem Ethylenvorprodukt ACC behandelt wurden und im Dunklen keimten. Die Doppelmutante zeigte hierbei den erwarteten Phänotyp sowie Genotyp, so dass sie für weitere Analysen genutzt werden konnte (Ergebnisse hier nicht gezeigt, s. Diplomarbeit Sabine Müller, 2008).

Die Pflanzen wurden 6 Tage lang auf + Fe bzw. - Fe Medium im Plattensystem ausgekeimt. Dabei zeigte sich bei qualitativer Auswertung kein phänotypischer Unterschied zum Wildtyp in Abhängigkeit vom Eisenstatus (Abb. 4.7). Die Transkriptionsraten der Gene *FIT*, *IRT1*, *FRO2* und *BHLH100* wurden mittels Realtime qRT-PCR nachgewiesen. Wie erwartet, konnte die *FIT* Expression im Wildtyp durch Eisenmangel um das ca. 3-fache induziert werden, während *IRT1* und *FRO2* wie erwartet stärker induziert wurden (Abb. 4.6). In der *ein3eil1* Doppelmutante hingegen zeigte sich eine Reduzierung der Expression von *IRT1* und *FRO2* sowohl bei + Fe als auch bei - Fe um das 2 bis 3 fache im Vergleich zum Wildtyp. Die Expression von *FIT* war nur bei Eisenmangel stark reduziert im Vergleich zum Wildtyp, eine Induktion unter Eisenmangel war also kaum noch möglich. Die Induktion der Eisenmangelantwortgene *IRT1* und *FRO2* war in der Doppelmutante jedoch immer noch möglich. Desweiteren war in der *ein3eil1* Mutante eine Induktion des eisenabhängigen Transkriptionsfaktors *BHLH100* möglich. Die generelle Expression sowohl bei + Fe als auch bei - Fe zeigte sich jedoch leicht verringert im Vergleich zum Wildtyp.

Diese Ergebnisse zeigen klar eine Rolle von EIN3 bzw. EIL1 als positive Regulatoren der Eisenmangelantwort in der Pflanzenwurzel.

4.1.5 Untersuchung der Regulation der Eisenaufnahme anhand der *fitein3eil1* Mutante

Wie gezeigt werden konnte, werden EIN3 und EIL1 für die vollständige Induktion der Eisenmangelantwort in der Wurzel benötigt. Sowohl in der *ein3eil1* Doppelmutante als auch in der *fit* Mutante, wie bereits gezeigt wurde (Jakoby u. a., 2004), ist eine Induktion der Eisenmangelantwortgene jedoch noch möglich. Daher sollte nun untersucht werden, ob das gleichzeitige Ausschalten beider Faktoren aufzeigt, ob sie additiv oder synergistisch miteinander agieren oder ob dies keinen weiteren Einfluss auf die Reaktion der Pflanze auf Eisenmangel hat. Daher wurde durch Kreuzung eine *fitein3eil1* Dreifachmutante hergestellt. Diese wurde auf phänotypische Besonderheiten sowie physiologisch auf ihre Reaktion auf Eisenmangel hin untersucht.

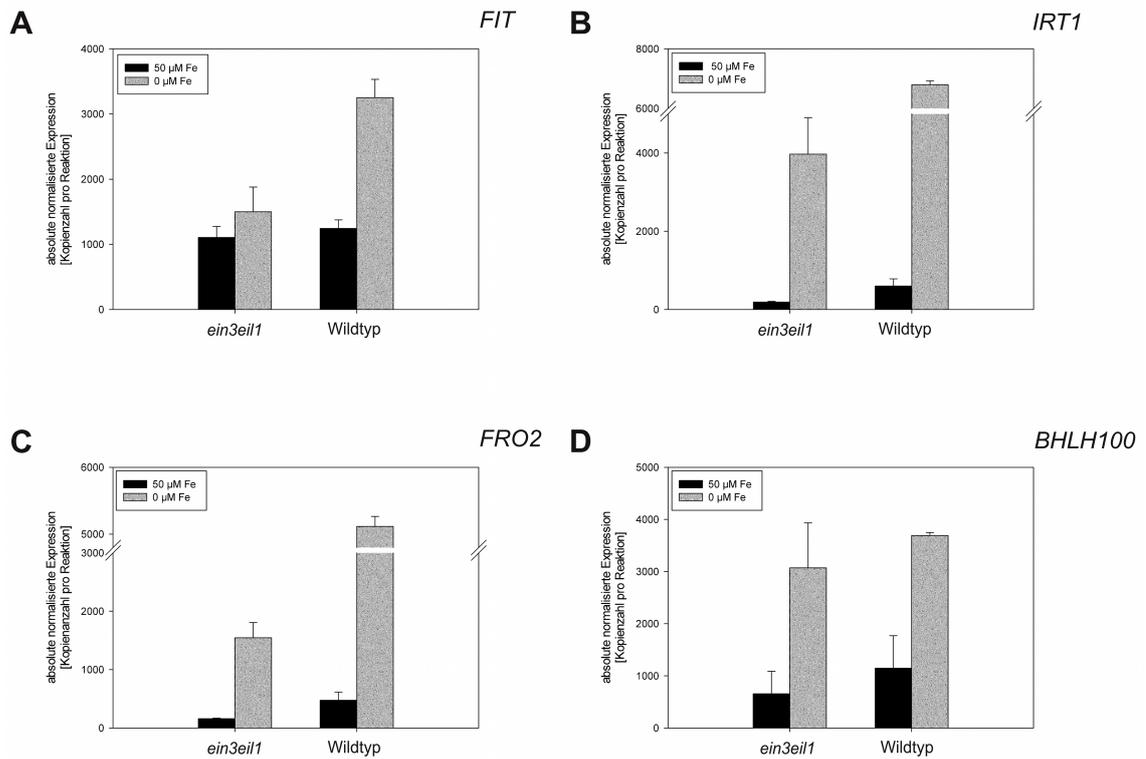


Abbildung 4.6: Bestimmt wurden die Gene der Eisenmangelantwort mittels Realtime qPCR zur physiologischen Analyse der *ein3eil1* Doppelmutante unter verschiedenen Eisenbedingungen (+ und - Fe) im Vergleich zum Wildtyp. A) Expression des *FIT* Transkriptionsfaktorgens; B) Expression des *IRT1* Eisentransportergens; C) Expression des *FRO2* Eisenreduktasegens; D) Expression des *BHLH100* Transkriptionsfaktorgens. 6 Tage alte Keimlinge auf Plattensystem, n=3.

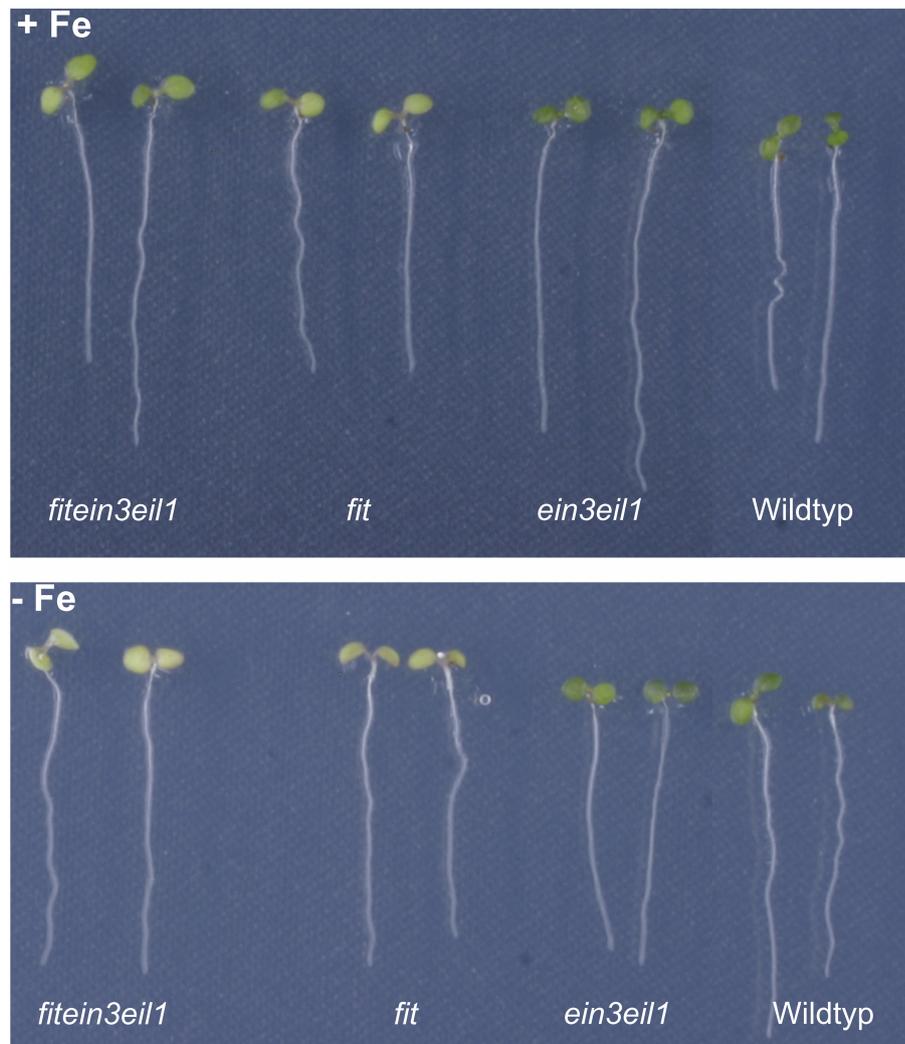


Abbildung 4.7: Untersucht wurden die Phänotypen von 6 Tage alten auf + Fe bzw. - Fe ausgekeimten Pflanzen. Hierbei wurde die *fitein3eil1* Dreifachmutante mit den Mutanten *fit* und *ein3eil1* sowie Wildtyppflanzen verglichen. Beispielhaft sind hier je zwei Keimlinge pro Pflanzenlinie abgebildet. Die Pflanzen wurden im Plattensystem herangezogen.

Die qualitative phänotypische Untersuchung der 6 Tage alten Keimlinge ergab, dass die Blattchlorose der *fitein3eil1* Mutante ähnlich stark ausgeprägt war wie die der *fit* Mutante. Bei ausreichenden Eisenbedingungen konnte jedoch ein verstärktes Wachstum der Wurzel beobachtet werden, was dem Wurzelphänotypen der *ein3eil1* Doppelmutante nahe kommt. Ebenso konnte, auch in älteren Pflanzen, beobachtet werden, dass die Keimblätter im Vergleich zur *fit* Mutante sowie zum Wildtyp vergrößert waren. Dies zeigte sich sowohl bei + Fe als auch bei - Fe (Abb. 4.7).

Desweiteren wurde eine physiologische Analyse der *fitein3eil1* Dreifachmutante durchgeführt. Sie wurde dabei mit den Mutanten *fit* und *ein3eil1* sowie dem Wildtyp verglichen. Die Pflanzen wurden für 6 Tage auf 50 μM Fe oder 0 μM ausgekeimt und angezogen. Die Transkriptmengen der Eisenmangelantwortgene

FIT, *IRT1*, *FRO2* sowie *BHLH100* wurden mittels Realtime qRT-PCR bestimmt (Abb. 4.8). Die Expression von *FIT* bei Eisenmangel war in der Dreifachmutante ca. 1,5-fach reduziert im Vergleich zum Wildtyp. Eine Induktion war nur in sehr geringem Umfang möglich. In der *fit* Mutante war keine Induktion mehr möglich. Transkriptmengen in der *fit* und der *fit ein3eil1* Mutante bei +Fe waren aufgrund der Platzierung der Realtime qRT-PCR Oligonukleotide im Verhältnis zur T-DNA Insertion vorhanden und spielen keine funktionelle Rolle, da das *FIT* Gen in diesen Mutanten ausgeschaltet ist. Die Transkription von *IRT1* war in der Dreifachmutante sowie in der *fit* Mutante kaum mehr möglich, dies war unabhängig vom Eisenstatus. Die *FRO2* Transkriptmengen wurden durch gleichzeitiges Ausschalten der *FIT* und *EIN3/EIL1* Gene stärker beeinflusst als in der *fit* Mutante. Sie lagen in der Dreifachmutante sowohl bei + Fe als auch bei - Fe in ca. vierfach niedrigerer Anzahl vor als im Wildtyp, in der *fit* Mutante in ungefähr 2,5 bis dreifach geringerer Menge. Eine Induktion durch Eisenmangel war jedoch weiterhin möglich. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen damit, dass *EIN3/EIL1* und *FIT* einen additiven Effekt auf die Expression der Eisenmangelantwortgene haben. Das heißt, zusammengerechnet ist die Differenz zwischen der Expression der untersuchten Gene in der Dreifachmutante und dem Wildtyp nicht höher als zwischen den Mutanten *fit* + *ein3eil1* und dem Wildtyp. Die Expression des Transkriptionsfaktors *BHLH100*, der hier beispielhaft für die vier eisenabhängigen Transkriptionsfaktoren *BHLH038*, *BHLH039*, *BHLH100* und *BHLH101* steht, war wie erwartet in der *fit* Mutante sowohl bei + Fe als auch bei - Fe mit der ungefähr achtfachen Transkriptmenge stark erhöht im Vergleich zum Wildtyp (Wang u. a., 2007a). In der Dreifachmutante hingegen war die Expression bei + Fe zwar ähnlich hoch wie in der *fit* Mutante, unter Eisenmangel jedoch war eine Induktion nur sehr schwach möglich und die Transkriptmenge erreichte nur ca. 1/3 der Menge in der *fit* Mutante. Dies deutet daraufhin, dass *EIN3/EIL1* nicht nur einen Einfluss als positive Regulatoren in der Eisenaufnahme haben, sondern, dass ihre Interaktion mit *FIT* auch benötigt wird, um die eisenabhängigen BHLH Transkriptionsfaktoren unter Eisenmangel zu regulieren.

Zusammengenommen zeigen die Experimente mit der *fit ein3eil1* Dreifachmutante, dass *EIN3/EIL1* eine wichtige Rolle als positive Regulatoren der Eisenmangelantwort spielen. Sie zeigen dabei vor allem feinsteuernde Effekte. Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die beiden Signalwege des Eisenhaushaltes in der Wurzel sowie der Ethylenantwort nicht nur auf physiologischer Ebene, sondern auch auf molekularer Ebene eng miteinander verbunden sind.

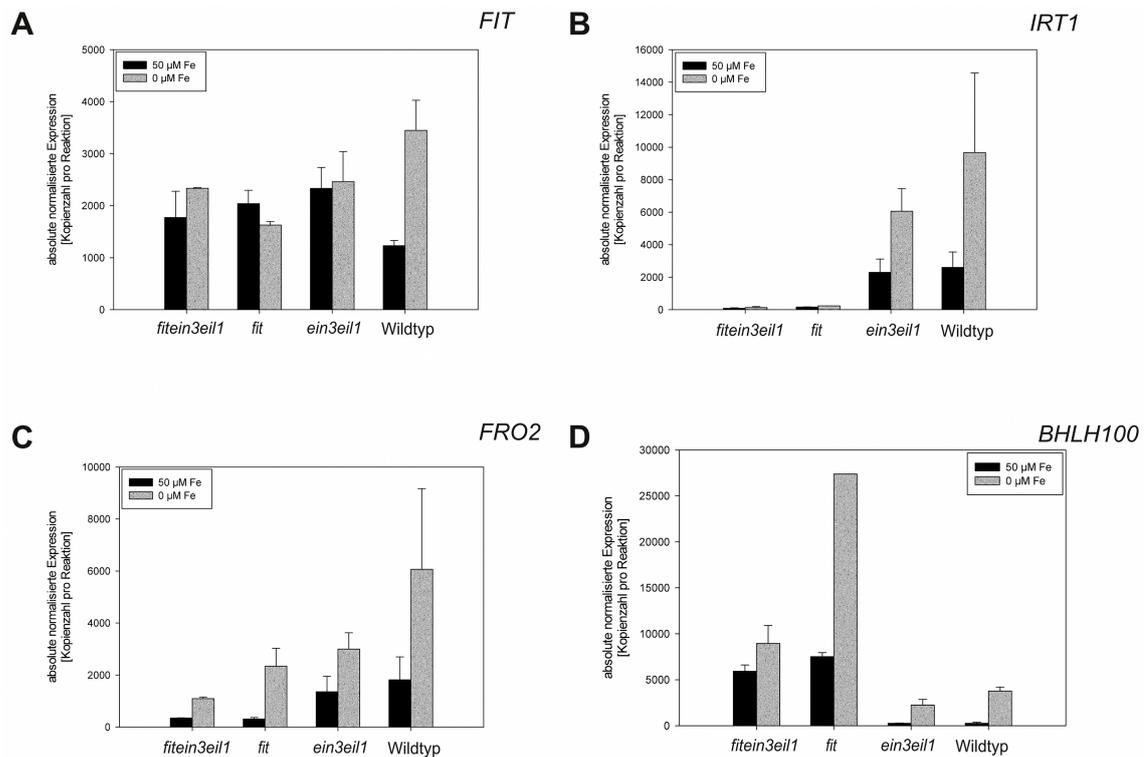


Abbildung 4.8: Bestimmt wurden die Gene der Eisenmangelantwort mittels Realtime qPCR zur physiologischen Analyse der *fitein3eil1* Dreifachmutante unter verschiedenen Eisenbedingungen (+ und - Fe) im Vergleich zum den Mutanten *fit* und *ein3eil1* sowie zum Wildtyp. A) Expression des *FIT* Transkriptionsfaktorgens; B) Expression des *IRT1* Eisentransportergens; C) Expression des *FRO2* Eisenreduktasegens; D) Expression des *BHLH100* Transkriptionsfaktorgens. 6 Tage alte Keimlinge auf Plattensystem, n=2.

4.1.6 Auswirkungen der EIN3/EIL1 Faktoren auf die ektopische FIT Expression

Die Überexpression von FIT in *Arabidopsis thaliana* mittels einem starken CaMV35s Promoter führte zur ektopischen Expression und Aktivität von FIT in den Blättern der Pflanzen (Jakoby u. a., 2004). Die Genexpression von FIT war dabei unabhängig vom Eisenstatus stark erhöht. Die Zielgene von FIT, *IRT1* und *FRO2*, konnten jedoch nur unter Eisenmangel in den Blättern induziert werden (Jakoby u. a., 2004). Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass FIT auf posttranskriptioneller Ebene reguliert werden müsse (Jakoby u. a., 2004). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine Protein-Interaktion von EIN3/EIL1 mit FIT unter Eisenmangel in Blättern sein, die daraufhin zu einer ektopischen Expression von *IRT1* und *FRO2* führt. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde eine Pflanzenlinie hergestellt, bei der die FITOx Linie (s. Tab. 3.1.1) in den Hintergrund der *ein3eil1* Doppelmutante eingekreuzt wurde, so dass *EIN3* und *EIL1* ausgeschaltet sind und *FIT* überexprimiert wird. Physiologische Analysen mittels Realtime qRT-PCR der Blätter von Pflanzen die 14 Tage auf + Fe angezogen wurden, und dann für 3 Tage entweder auf + Fe oder - Fe umgesetzt worden sind, ergaben dabei, dass *IRT1* und *FRO2* sowohl im Wildtyp Hintergrund (FITOx) als auch im *ein3eil1* Hintergrund (FITOx*ein3eil1*) in Blättern induziert werden konnten (s. Abb. 4.9). Jedoch wurden im *ein3eil1* Hintergrund nicht die gleichen Transkriptionslevel erreicht wie im Wildtyp Hintergrund, sie waren je um ca. 1/3 niedriger als in der FITOx Linie. Auch die Expression des *BHLH100* Transkriptionsfaktoren war in der FITOx*ein3eil1* Linie im Vergleich zur FITOx Linie erniedrigt. Dies zeigt wiederum die Bedeutung von EIN3 und EIL1 als positive Regulatoren der Eisenmangelantworten, obwohl eine sehr starke FIT Überexpression den Einfluss von EIN3 und EIL1 begrenzt. Die Expression von FIT hingegen wurde im *ein3eil1* Hintergrund sogar nochmals gesteigert.

Die gleichzeitige Ausschaltung der Gene *EIN3* und *EIL1* mit der Überexpression von *FIT* unterstützt die vorhergehenden Ergebnisse, so dass EIN3 und EIL1 als positive Feinregulatoren der Eisenmangelantwort angesehen werden können.

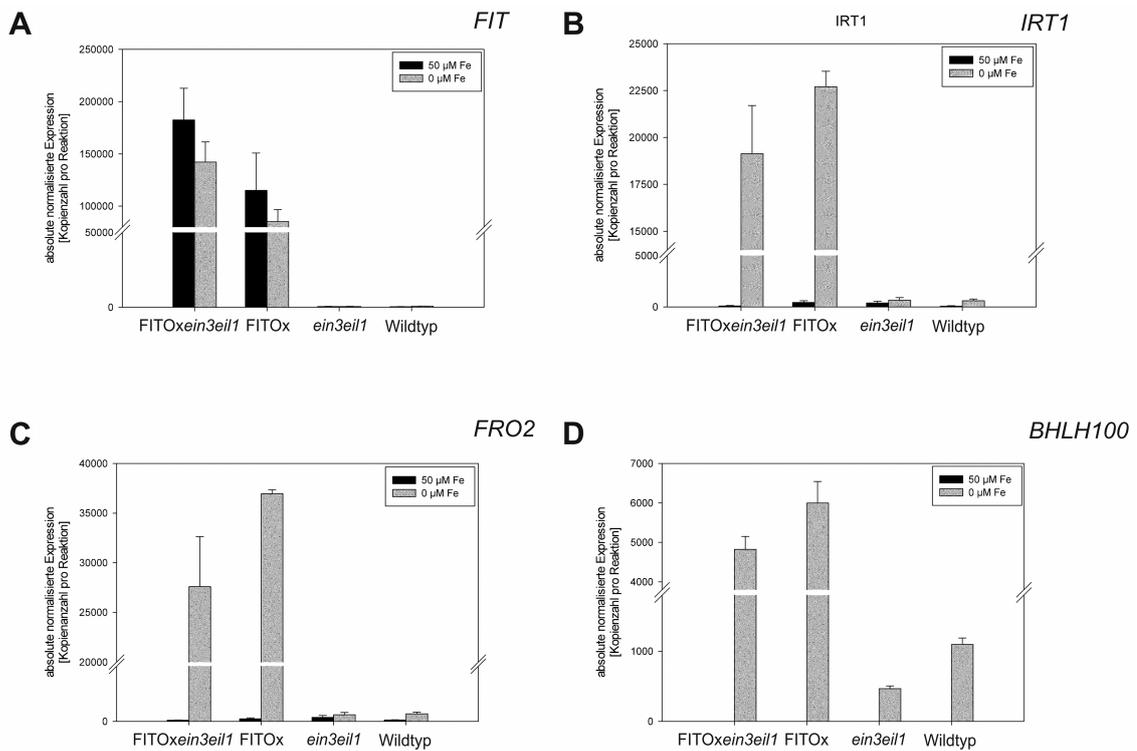


Abbildung 4.9: Bestimmt wurden die Gene der Eisenmangelantwort mittels Realtime qPCR zur physiologischen Analyse der FITO*ein3eil1* Linie unter verschiedenen Eisenbedingungen (+ und - Fe) im Vergleich zur FITOx Linie und der *ein3eil1* Mutante sowie zum Wildtyp in den Blättern. A) Expression des *FIT* Transkriptionsfaktorgens; B) Expression des *IRT1* Eisentransportergens; C) Expression des *FRO2* Eisenreduktasengens; D) Expression des *BHLH100* Transkriptionsfaktorgens. Pflanzen angezogen für 14 Tage auf + Fe, dann für 3 Tage auf + bzw. -Fe umgesetzt.

4.2 Einfluss der Hemmung der Ethylenbiosynthese auf die Eisenmangelantwort

4.2.1 Promoteraktivitäten verschiedener Eisenhomöostasegene bei gehemmter Ethylenbiosynthese

Da EIN3 und EIL1 zentrale Faktoren in der Weiterleitung eines Ethylensignales innerhalb einer Zelle sind, sollte hier untersucht werden, ob tatsächlich das Pflanzenhormon Ethylen aktivierende Wirkung auf den Eisenhaushalt hat, oder ob der Ethylensignalweg eine zusätzliche Funktion innehat. Dazu wurde die Ethylenbiosynthese in den Pflanzen gehemmt, um zu untersuchen, welche Auswirkungen dies auf die Pflanzenantwort auf Eisenmangel hat.

Dazu wurde zum Einen ein qualitativer Promoter-GUS Assay durchgeführt, bei dem die Promoteraktivität der Gene *BHLH100*, *IRT1* und *FRO2* in verschiedenen Eisenbedingungen sowie unter Einwirkung des Ethylenbiosynthesehemmers AVG getestet wurde. Zum Anderen wurden die mRNA Mengen der Gene *FIT*, *IRT1*, *FRO2* sowie *BHLH100* im Wildtyp unter Einfluss von AVG bei + Fe und - Fe quantifiziert.

In der GUS-Analyse wurde unter Eisenmangel für *BHLH100* eine starke Induktion der Promoteraktivität nachgewiesen, durch Zugabe von AVG wurde diese Aktivität jedoch komplett unterdrückt. Die gleichen Ergebnisse brachte die Betrachtung der *pIRT1::GUS* Linie, auch hier wurde durch Eisenmangel eine starke Induktion ausgelöst, die durch Gabe von AVG komplett unterdrückt werden konnte (Abb. 4.10, Tab. 3.1.1).

Die Aktivität des FIT Promoters war bereits bei + Fe Bedingungen induziert, konnte durch Eisenmangel jedoch verstärkt werden. Durch Gabe von AVG wurde die Aktivität sowohl bei + Fe als auch bei - Fe reduziert.

Diese Ergebnisse sind bereits deutliche Anzeichen für die Rolle von Ethylen als positiver Signalgeber der Eisenmangelantwort.

4.2.2 Expression der Eisenhomöostasegene unter Einfluss des Ethylenbiosynthesehemmers AVG

Um die Expression der Eisenmangelgene unter Einfluss des Ethyleninhibitors AVG zu untersuchen, wurden Wildtyppflanzen für 6 Tage auf 50 μM Fe oder 0 μM Fe in

4.2 Einfluss der Hemmung der Ethylenbiosynthese auf die Eisenmangelantwort

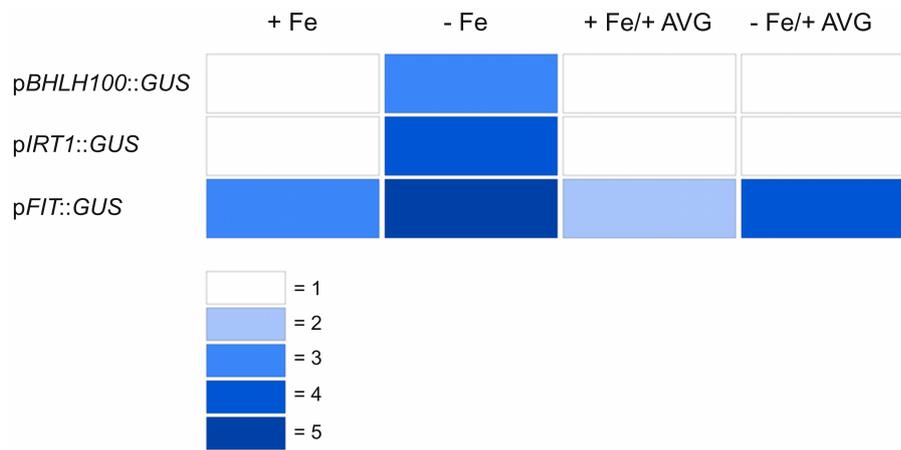


Abbildung 4.10: Qualitativer Nachweis der Promoteraktivitäten der Gene *BHLH100*, *IRT1* und *FIT* in verschiedenen Eisenbedingungen sowie mit durch AVG inhibierter Ethylenbiosynthese. Pflanzen wurden für 6 Tage auf + bzw. -Fe in Kombination mit 10 μ M AVG angezogen und die Intensität der Gesamtfärbung durch das Enzym β -Glucuronidase beurteilt. n = 20. 1) keine Färbung; 2) sehr leichte Blaufärbung; 3) mittelstarke Färbung; 4) starke Indigofärbung; 5) sehr starke Färbung.

Kombination mit 10 μ M AVG ausgekeimt und angezogen. Für die Untersuchungen wurden die ganzen Keimlinge geerntet (Abb. 4.11).

Die *FIT* Expression wurde durch die Gabe von AVG maßgeblich beeinträchtigt. Während ohne AVG die Expression durch Eisenmangel um das ca. dreifache induziert wurde, war eine Induktion mit AVG nur noch in sehr geringem Umfang möglich. Auch bei + Fe war die Expression mit AVG auf ca. ein Drittel verringert. Die Expression von *IRT1* war noch stärker eingeschränkt durch die AVG Gabe, eine Induktion war auch hier kaum noch möglich. Das gleiche Bild zeichnete sich für die Transkriptmengen für *FRO2* ab. Die Induktion von *BHLH100* durch Eisenmangel wurde ebenfalls durch den AVG Einfluss auf ein Viertel der Induktion ohne AVG begrenzt.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse sehr deutlich, dass Ethylen selbst benötigt wird, um die Eisenmangelantworten in umfangreichem Maße zu aktivieren. Die Inhibierung der Ethylenbiosynthese zeigt zwar auch negative Auswirkungen bei + Fe Bedingungen, bei - Fe Bedingungen jedoch wird deutlich, dass Ethylen vor allem bei Eisenmangel einen entscheidenden Einfluss auf die Eisenhomöostase ausübt.

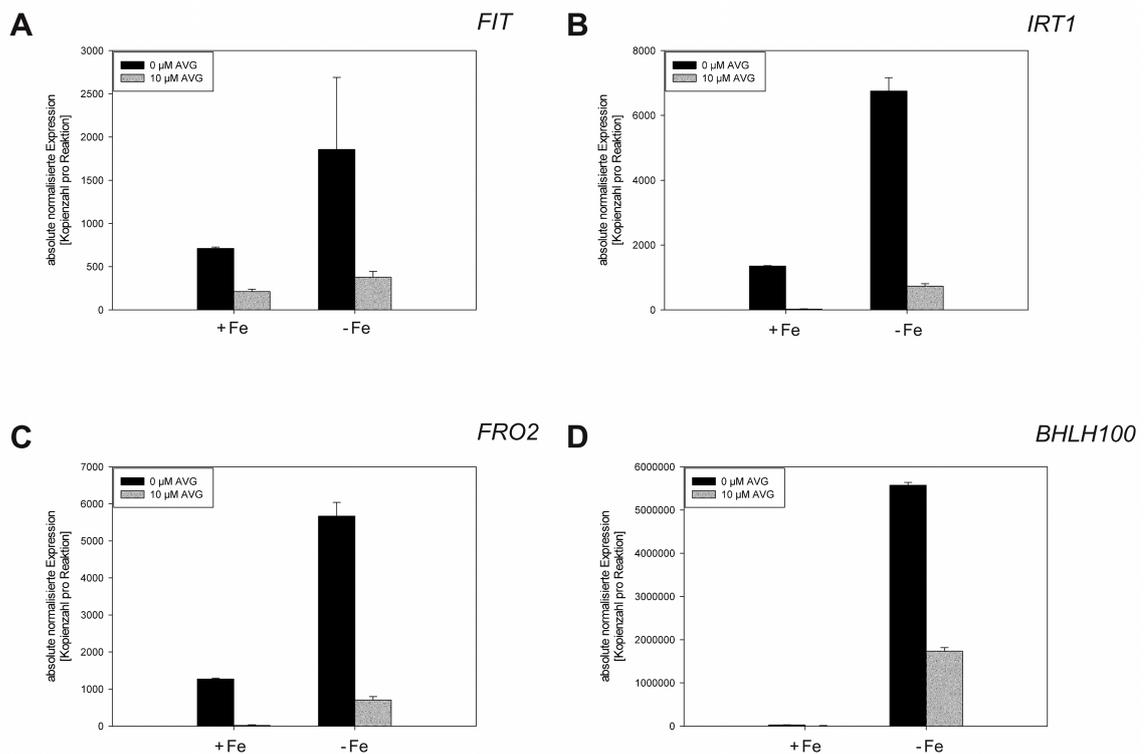


Abbildung 4.11: Quantifizierung der mRNA Mengen der Gene *FIT*, *IRT1*, *FRO2* und *BHLH100* im Wildtyp unter Einwirkung des Ethylensyntheseinhibitors AVG bei + und - Fe. Pflanzen wurden für 6 Tage auf + Fe bzw. -Fe in Kombination mit 10 µM AVG angezogen und ganze Keimlinge verwendet. n = 3.

4.3 Untersuchung des Ethylensignalweges im Hinblick auf Eisenmangel

Da in den vorhergehenden Experimenten herausgefunden werden konnte, dass EIN3 und EIL1 sowie Ethylen selbst eine Einwirkung auf die Regulation der Eisenaufnahme haben, sollten weitere Faktoren des Ethylensignalweges auf deren mögliche Funktion in der Eisenhomöostase untersucht werden. Die untersuchten Faktoren wurden hier in der Reihenfolge des Ethylensignalweges sortiert (s. Kap.2.4.5).

4.3.1 Analyse des Ethylenrezeptors ETR1 im Hinblick auf Eisenmangel

Die Wahrnehmung eines Ethylensignals innerhalb einer Zelle passiert durch spezifische Rezeptoren, die zur ETR1 Rezeptorfamilie gehören. Diese Familie hat fünf Mitglieder, ETR1, ERS1, ETR2, EIN4 und ERS2. Sie ähneln einem Zwei-Komponenten Regulationssystem aus Bakterien, welches Signale mittels Phosphotransferreaktionen weiterleiten kann.

Die Ethylenrezeptoren signalisieren ein Ethylensignal an den RAF Kinase-ähnlichen negativen Regulator CTR1 (Bleecker u. a., 1998). Mutationen in diesen fünf Genen führen zu einer dominanten Ethyleninsensitivität (Bleecker u. a., 1988; Hua u. a., 1998; Sakai u. a., 1998).

Kürzlich wurde nachgewiesen, dass EIN2 mit ETR1 eine spezifische Interaktion eingeht (Bisson u. a., 2009). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des ETR1 Rezeptors auf die Eisenhomöostase untersucht.

Dazu wurden Expressionsanalysen der *etr1* Mutante im Vergleich zum Wildtyp unter verschiedenen Eisenbedingungen durchgeführt. Dazu wurden die Pflanzen für 6 Tage auf 50 μM Fe oder 0 μM Fe ausgekeimt und angezogen. Für die Analyse wurden die ganzen Keimlinge verwendet. Untersucht wurden die Transkriptmengen der Gene *FIT*, *IRT1*, *FRO2* sowie *BHLH100* (Abb. 4.12).

Auffällig war, dass das Ausschalten des *ETR1* Gens nur bei Eisenmangel einen Unterschied in der Expression der hier untersuchten Gene macht. *FIT* und *FRO2* waren ca. um ein Drittel niedriger exprimiert unter Eisenmangel als im Wildtyp, während *IRT1* nur wenig geringere Transkriptmengen in der *etr1* Mutante vorwies. Die Expression des eisenabhängigen Transkriptionsfaktors *BHLH100* jedoch war sehr stark verringert, sie fiel auf ca. 1/10 der Transkriptmenge im Wildtyp. Eine Induktion unter Eisenmangel war jedoch weiterhin möglich.

Diese Ergebnisse deuten auf eine Aktivierung des Ethylensignalwegs unter Eisenmangel hin und unterstreichen nochmal die Bedeutung von Ethylen für die Regulation der eisenabhängigen BHLH Transkriptionsfaktoren.

4.3.2 Die Rolle des zentralen Ethylenregulators EIN2 in der Eisenaufnahme

4.3.2.1 Charakterisierung einer *ein2* Mutante im Kontext der Eisenaufnahme und einer möglichen Verknüpfung mit dem Jasmonatsignalweg

EIN2 ist ein integrales Membranprotein mit Ähnlichkeit zu den NRAMP Metalltransportern. Phänotypische, epistatische und biochemische Analysen ergaben, dass EIN2 im Ethylensignalweg eine sehr zentrale Rolle einnimmt, da es dort das Ethylensignal durch eine übergeordnete Signalkaskade empfängt und es dann an die EIN3 und EIL1 Transkriptionsfaktoren weiterleitet (Roman u. a., 1995; Johnson und Ecker, 1998; Guo und Ecker, 2003). Desweiteren spielt EIN2 eine Rolle in der Verknüpfung des Ethylensignalwegs mit weiteren Pflanzenhormonen wie Jasmonsäure (JA), dem JA-Antagonisten Salicylsäure (SA) sowie Auxinen

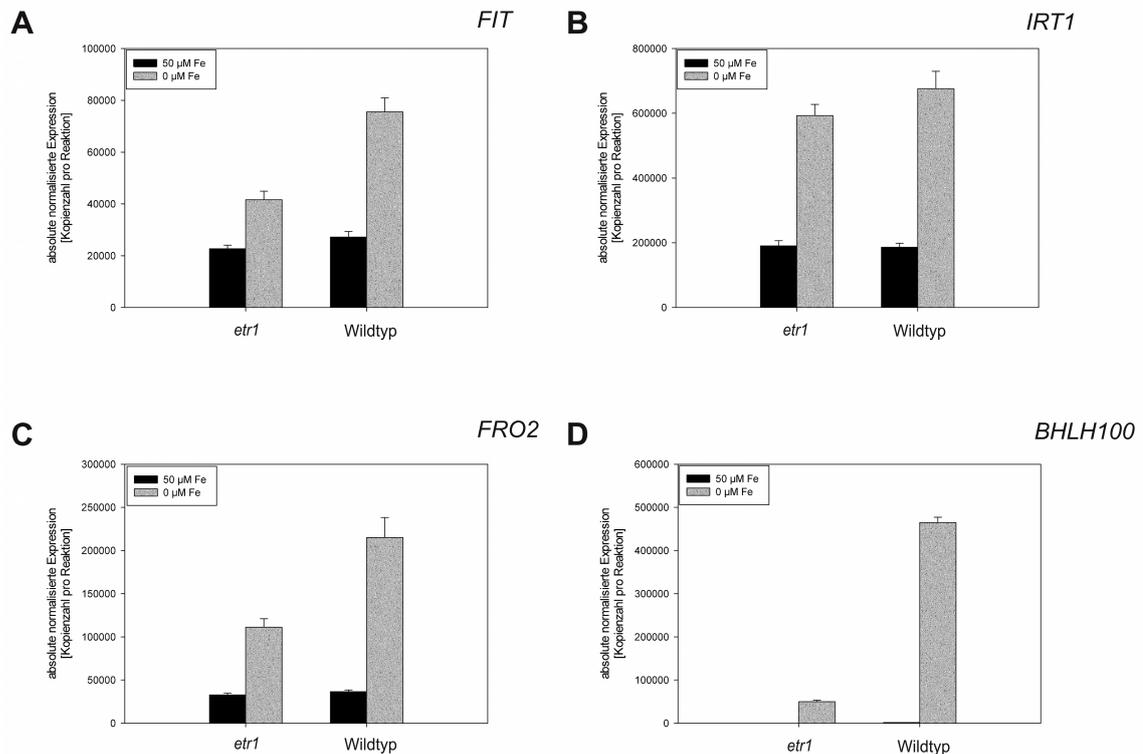


Abbildung 4.12: Untersucht wurde die Expression der Eisenmangelgene *FIT*, *IRT1*, *FRO2* und *BHLH100* in der *etr1* Mutante im Vergleich zum Wildtyp bei verschiedenen Eisenbedingungen. Pflanzen wurden für 6 Tage auf + bzw. - Fe angezogen und ganze Keimlinge geerntet. n = 3.

und Abscisinsäure (Wang u. a., 2007c; Leon-Reyes u. a., 2009; Negi u. a., 2008). Damit spielt EIN2 eine wichtige Rolle bei den Pflanzenantworten auf biotischen und abiotischen Stress, wie zum Beispiel Ozonstress, Salzstress, oxidativen Stress, hohe Bleikonzentrationen sowie in der Pathogenabwehr (Tamaoki u. a., 2003; He u. a., 2004, 2005; Cao u. a., 2007; Yoshida u. a., 2009; Cao u. a., 2009; Mersmann u. a., 2010).

Daher sollte hier untersucht werden, ob EIN2 durch seine Rolle im Ethylensignalweg einen Einfluss auf die Eisenmangelantwort hat oder ob möglicherweise EIN2 dafür verantwortlich ist, weitere Signale von anderen Hormonen in den Eisensignalweg zu integrieren; in der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Jasmonsäure untersucht, da von den Mechanismen der Pathogenabwehr bekannt ist, dass Ethylen und JA eng zusammenspielen (Bari und Jones, 2009). Dazu wurde eine *ein2* Mutante im Hinblick auf unterschiedliche Eisenkonzentrationen untersucht. Zudem wurde untersucht, ob die Repression der Eisenmangelantwort durch die Gabe von JA, die in der Arbeitsgruppe untersucht worden ist, durch EIN2 vermittelt wird (Sabine Müller, Diplomarbeit, 2008), eine solche Vermittlung würde in der *ein2* Mutante dann wegfallen. Dazu wurden Expressionsanalysen der *ein2* Mutante im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt. Die Pflanzen wurden dafür auf 50 µM Fe oder 0 µM Fe in Kombination mit 10 µM Jasmonsäure (JA) für 6 Tage

ausgekeimt und angezogen. Untersucht wurden die Gene der Eisenaufnahme *FIT*, *IRT1* und *FRO2* sowie der BHLH Transkriptionsfaktor *BHLH100* (Abb. 4.13).

In der *ein2* Mutante erschien die FIT Expression sowohl bei + Fe als auch bei -Fe kaum verringert im Vergleich zum Wildtyp. Der reprimierende Einfluss des JA zeigte sich auch in der *ein2* Mutante. Die Transkriptlevel von *IRT1* und *FRO2* waren einander ähnlich. In der *ein2* Mutante zeigte sich die *IRT1* Expression sowohl bei + Fe als auch bei - Fe gering verringert im Vergleich zum Wildtyp. Diese Verringerung war auch bei der Behandlung mit JA noch in gleichem Maße erkennbar. Die *FRO2* Expression war generell stärker verringert in der *ein2* Mutante. Auch hier zeigte die Gabe von JA eine zusätzliche Verringerung der Expressionsraten unabhängig vom Eisenstatus an.

Interessanterweise war die *BHLH100* Expression, die durch Eisenmangel induzierbar ist, in der *ein2* Mutante bei - Fe leicht erhöht im Vergleich zum Wildtyp, was auf einen Eisenmangel der Pflanzen hindeutet. Diese Expression war ebenfalls durch die Gabe von JA verringert, unabhängig von der Anwesenheit des EIN2 Proteins.

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass EIN2, wahrscheinlich durch seine Rolle als zentralem Faktor im Ethylensignalweg, zur vollständigen Induktion der Eisenmangelantworten benötigt wird. Jedoch scheint EIN2 nicht als Integrator des JA-Wegs in die Regulation der Eisenmangelantworten verantwortlich zu sein. Es konnte jedoch sehr gut bestätigt werden, dass JA für eine Repression der Eisenmangelantworten verantwortlich scheint.

4.3.2.2 Untersuchung der Eisenaufnahme in der *fitein2* Doppelmutante

Phänotypische Charakterisierung der *fitein2* Doppelmutante Um festzustellen, ob der Ethylensignalweg, der vom zentralen Faktor EIN2 abhängig ist, ebenso wie EIN3 und EIL1, zusammen mit FIT eine Rolle in der positiven Regulation der Eisenhomöostase spielt, wurden durch Kreuzung *fitein2* Doppelmutanten erzeugt und selektiert. Um den Phänotyp genauer zu analysieren, wurden ca. 20 Pflanzen betrachtet. Diese zeigten bei qualitativer Betrachtung vor allem bei Eisenmangel als Keimlinge einen ausgeprägten Phänotyp. Sie waren im Gesamten sehr klein, mit kurzer Wurzel, die auch die *ein2* Mutante bei - Fe zeigt, sowie rötlich gefärbten kotyledonen Blättern, was auf eine starke Stressantwort hindeutet, die mit der Bildung von Anthocyanen einhergeht. Bei + Fe zeigten die Doppelmutanten einen ähnlichen Phänotypen wie die *fit* Mutante mit leicht chlorotischen Blättern, sowie langen Wurzeln (Abb. 4.14, Vgl. zu *fit* s. 4.7).

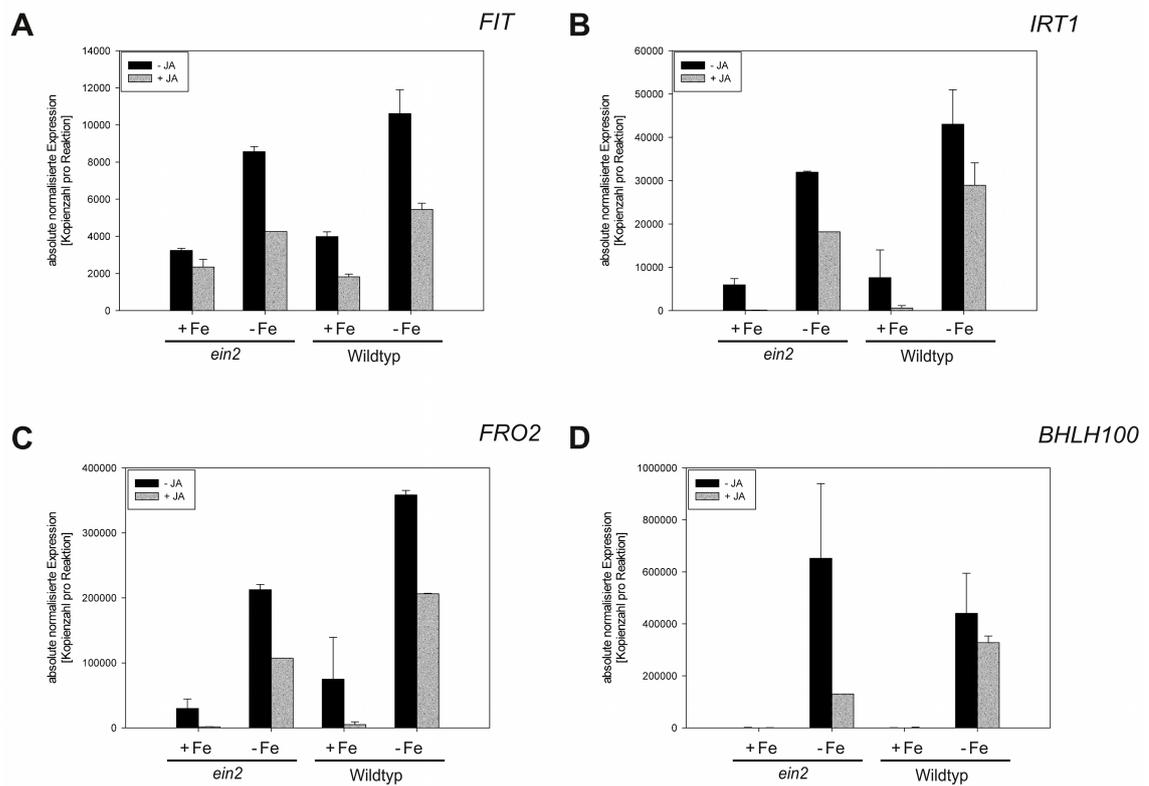


Abbildung 4.13: Physiologische Analyse der *ein2* Mutante im Kontext des Eisenhaushaltes. Des Weiteren wurde der Einfluss von Jasmonat auf die Eisenmangelantwort untersucht. Dabei wurde die Expression der Gene *FIT*, *IRT1*, *FRO2* und *BHLH100* untersucht. Die Pflanzen wurden unter verschiedenen Eisenbedingungen (+ und - Fe) sowie in Kombination mit der Gabe von Jasmonat (JA) für 6 Tage angezogen. n = 3.

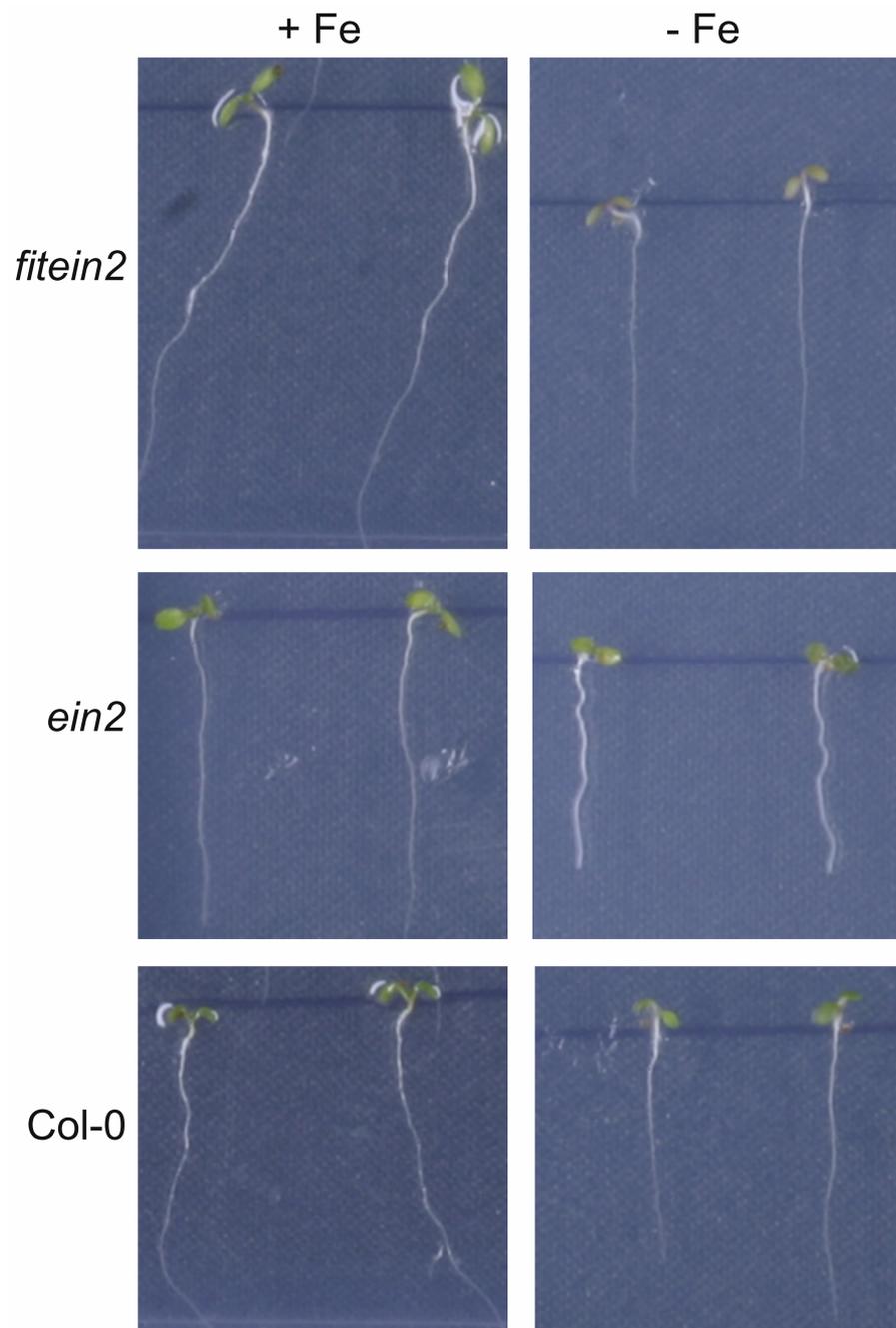


Abbildung 4.14: Phänotypische Untersuchungen der *fitein2* Doppelmutante im Vergleich zur *ein2* Mutante sowie zum Wildtyp Col-0 auf verschiedenen Eisenbedingungen. Pflanzen wurden für 6 Tage auf + oder - Fe angezogen.

Genexpressionsanalysen der *fitin2* Mutante in verschiedenen Eisenbedingungen Um die Genexpressionen der Eisenmangel-induzierten Gene *IRT1*, *FRO2*, *BHLH039* sowie *BHLH100* zu untersuchen, wurden die Pflanzen für 6 Tage auf 50 μM Fe oder 0 μM Fe angezogen. Die Expression wurde aus den gesamten Keimlingen ermittelt (Abb. 4.15).

Wie erwartet, war die Expression von *IRT1* in der *fitin2* Doppelmutante fast nicht mehr nachweisbar, daher war nicht erkennbar, ob der Unterschied zur Expression in der *fit* Mutante signifikant ist. Für die *FRO2* Expression war jedoch eindeutig erkennbar, dass das Ausschalten beider Gene *FIT* und *EIN2* einen additiven Effekt auf die Genexpression hat, dieser Effekt zeigte sich weitgehend unabhängig von der Versorgung mit Eisen. Die Untersuchung der Gene *BHLH039* und *BHLH100* ergab einen deutlichen Rückgang der Transkriptionen sowohl bei + Fe als auch bei - Fe in der Doppelmutante im Vergleich zur *fit* Mutante, obwohl die Expression in der *ein2* Mutante nicht verringert war im Vergleich zum Wildtyp.

Die hier erhaltenen Ergebnisse weisen auf einen Einfluss des Ethylensignalweges auf die Eisenmangelantwort hin. Vor allem auf Ebene der eisenabhängigen BHLH Transkriptionsfaktoren scheint sich dieser Einfluss niederzuschlagen. Dabei deuten die Ergebnisse auch daraufhin, dass ein Zusammenspiel von FIT mit Ethylen eine größere Rolle in der Regulation dieser Faktoren spielen könnte.

4.3.2.3 Einfluss des EIN2 Proteins auf die ektopische FIT Expression

Um zu betrachten, welchen Einfluss der Ethylensignalweg auf eine ektopische Expression von FIT hat, wurden die Überexpressionslinie für FIT, FITOx, und die *ein2* Mutante miteinander gekreuzt, so dass eine FITOx*ein2* Linie durch Selektion erhalten werden konnte. Mit dieser Linie wurden Expressionsanalysen der Gene *IRT1* und *FRO2* durchgeführt. Dafür wurden die Pflanzen für 14 Tage auf 50 μM Fe angezogen und dann für 3 Tage auf 50 μM Fe oder 0 μM Fe umgesetzt. Zur Analyse wurden die Rosettenblätter verwendet, um den Einfluss auf die ektopische Expression von FIT zu untersuchen (Abb. 4.16).

Wie auch in der FITOx*ein3eil1* Linie war die Expression beider Gene bei Eisenmangel im Vergleich zur FITOx Linie verringert, die FITOx Linie reagierte hingegen bei Eisenmangel sehr stark mit einer ektopischen Expression von *IRT1* und *FRO2*. Dies verdeutlicht nochmals den Einfluss des Ethylensignalweges als positiver Regulator der Eisenhomöostase.

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse sehr stark darauf hin, dass die korrekte Regulation der Eisenmangelantworten in der Wurzel vom Ethylensignalweg abhängig ist. Im Ethylensignalweg ist EIN2 ein wichtiger Faktor, weshalb er

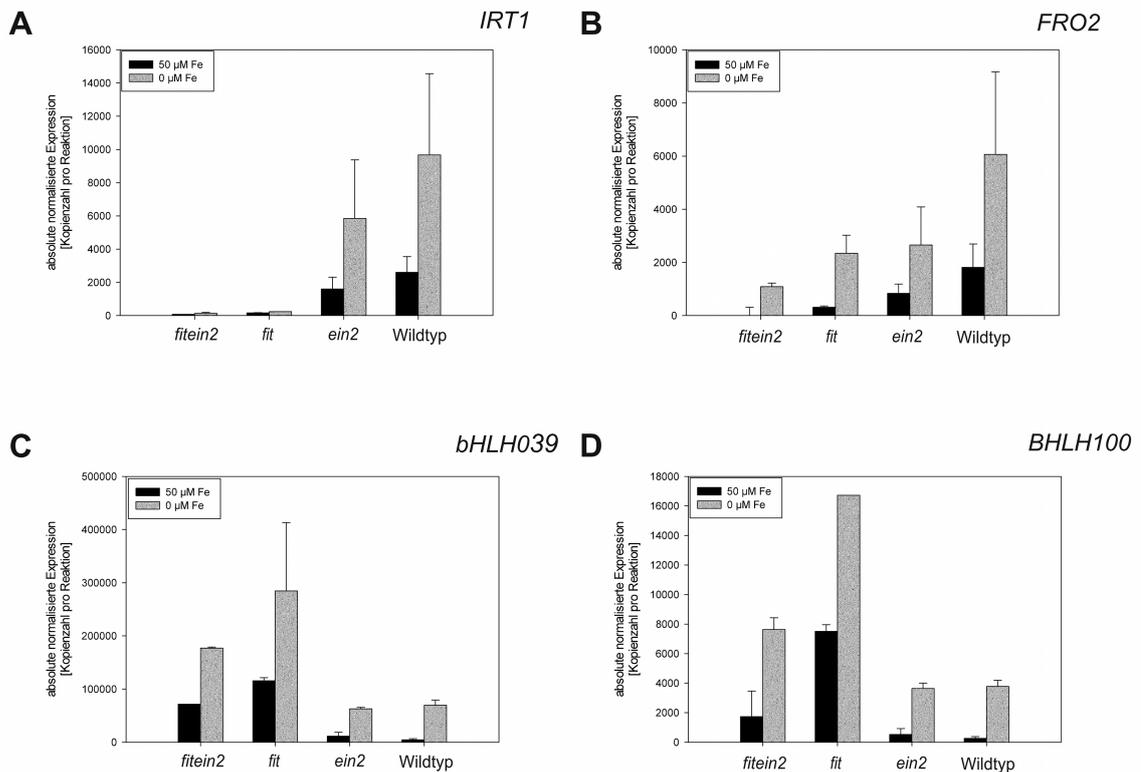


Abbildung 4.15: Untersuchungen der Transkriptmengen der Gene *IRT1*, *FRO2*, *BHLH039* und *BHLH100* in der *fitin2* Doppelmutante im Vergleich zu den Mutanten *fit* und *ein2* sowie zum Wildtyp im Hinblick auf verschiedene Eisenbedingungen. Pflanzen wurden für 6 Tage auf 50 μM oder 0 μM Fe angezogen und ganze Keimlinge gerntet. $n = 3$

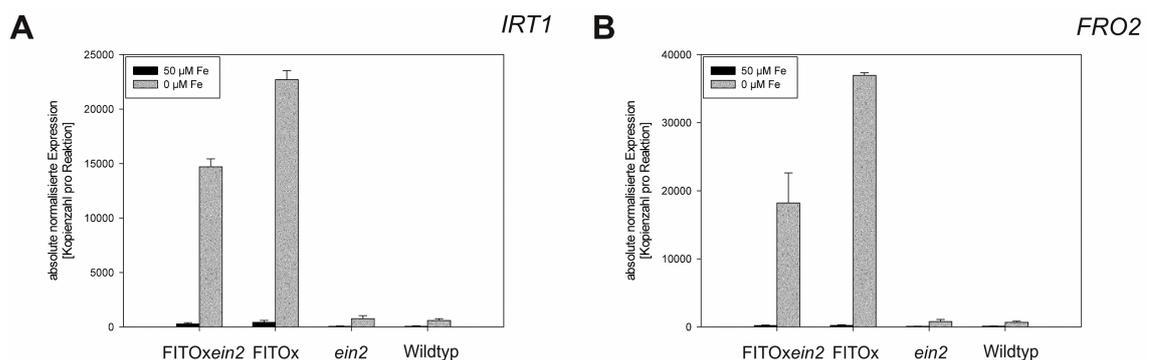


Abbildung 4.16: Expressionsanalysen der ektopisch exprimierten *IRT1* und *FRO2* Gene in der *FITOxein2* Linie verglichen mit der *FITOx* Linie, der *ein2* Mutante sowie dem Wildtyp. Pflanzen für 14 Tage auf + Fe angezogen, dann für 3 Tage auf + bzw. - Fe umgesetzt. Expression in Rosettenblättern quantifiziert. $n = 2$.

hier auch besonders herausgegriffen wurde. Eine Bedeutung von EIN2 in der Integration eines die Eisenaufnahme hemmenden Jasmonat-Signals konnte nicht festgestellt werden, da sich kein Unterschied in der Stärke der Repression der Eisenmangelgene zwischen der *ein2* Mutante und dem Wildtyp ergab.

4.4 Der Einfluss der Regulatoren EBF1 und EBF2 auf die Eisenaufnahme

Die Regulation der Transkriptionsfaktoren EIN3 und EIL1 aus dem Ethylensignalweg findet hauptsächlich auf posttranslationaler Ebene statt. Die Proteine werden, wenn ihre Funktion nicht benötigt wird, v.a. bei Abwesenheit eines Ethylensignals, ubiquitiniert und Proteasom-abhängig abgebaut. Die Vermittlung des Ubiquitin an die Proteine findet dabei durch eine Proteininteraktion mit den Skp-Cullin-F-Box (SCF) F-Box E3 Ligasen EBF1 und EBF2 statt, daraufhin erfolgt der Abbau über das 26S-Proteasom Potuschak u. a. (2003); Guo und Ecker (2003). EBF1 und 2 werden selbst durch die Exoribonuklease XRN4 (EIN5) auf transkriptioneller Ebene reguliert Potuschak u. a. (2006). Eine weitere Regulation findet durch EIN3 und EIL1 selbst statt (Konishi und Yanagisawa, 2008a,b), es wurde bekannt, dass die Promoteraktivität von EBF2 von EIN3 abhängig ist.

Der Einfluss der EIN3 und EIL1 Proteine auf die Eisenmangelantworten wurde bisher nur auf Ebene von EIN3 und EIL1 untersucht. Da diese jedoch durch EBF1/2 reguliert werden, wobei evtl. eine Rückkopplung greift, ist es wichtig, auch die Regulation der EBF1/2 Faktoren genauer zu betrachten.

4.4.1 Expressionsanalysen der Eisenhomöostasegene in der *ebf1ebf2* Doppelmutante

Um den Einfluss der F-Box Proteine EBF1 und 2 auf die Eisenmangelantworten genauer zu untersuchen, wurden mit einer *ebf1ebf2* Doppelmutante physiologische Analysen gemacht. Diese Mutante ist durch das permanent angeschaltete Ethylensignal stark beeinträchtigt, sie ist sehr kleinwüchsig, hat eine hohe Anzahl epinastisch eingerollter Blätter und stirbt sehr früh ab (Potuschak u. a., 2003). Die permanente Ethylenantwort spiegelt sich auch in der Ethylen Dreifachantwort (triple response assay) wieder, bei dem die *ebf1ebf2* Doppelmutante hypersensitiv auf Ethylen reagiert (Potuschak u. a., 2003; Achard u. a., 2007). Die Einzelmutanten hingegen zeigen keinen dieser Phänotypen, was auf eine Redundanz der Gene hindeutet (Potuschak u. a., 2003). Da die Doppelmutante durch ihre frühe

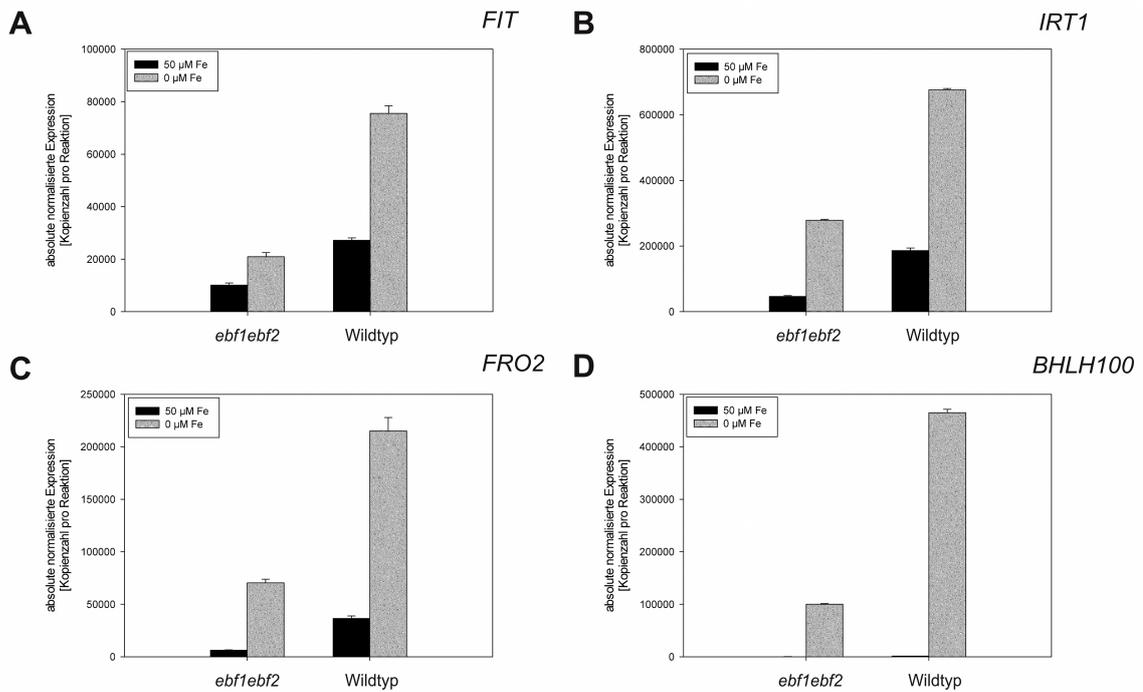


Abbildung 4.17: Mittels Expressionsanalysen wurden die Transkriptmengen der Gene *FIT*, *IRT1*, *FRO2* und *BHLH100* in der *ebf1ebf2* Doppelmutante unter verschiedenen Eisenbedingungen (+ und - Fe) im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. A) Expression des *FIT* Transkriptionsfaktorgens; B) Expression des *IRT1* Eisentransportergens; C) Expression des *FRO2* Eisenreduktasegens; D) Expression des *BHLH100* Transkriptionsfaktorgens. Pflanzen angezogen für 6 Tage auf 50 μM Fe oder 0 μM Fe. $n = 2$.

Lethalität steril ist, mussten zur Analyse homozygote Pflanzen aus der segregierenden Mutterlinie ausgewählt werden. Dies konnte anhand des ausgeprägten Phänotypen bereits im Alter von 6 Tagen passieren. Zur physiologischen Analyse wurden die Pflanzen für 6 Tage im Plattensystem auf 50 μM Fe oder 0 μM Fe ausgekeimt und angezogen. Mittels Realtime qRT-PCR wurde die Genexpression der Eisenmangelantwortgene *FIT*, *IRT1*, *FRO2* sowie *BHLH100* bestimmt (Abb. 4.17).

Interessanterweise war die Expression dieser Gene sowohl bei + Fe als auch bei - Fe stark vermindert, verglichen mit dem Wildtyp. Die Menge an Transkripten nahm jeweils um mindestens die Hälfte bis hin zu Dreiviertel ab im Vergleich zum Wildtyp. Dies deutet darauf hin, dass nicht nur eine positive Regulation der Eisenmangelantworten durch EIN3 und EIL1 bzw. den Ethylensignalweg stattfindet, sondern dass ein permanentes Ethylensignal, wie es in der *ebf1ebf2* Doppelmutante vorhanden ist, zu einer negativen Regulierung der Gene der Eisenhomöostase führen könnte.

4.4.2 Expression von EBF1 und 2 in Abhängigkeit von FIT und von Eisen

Um umgekehrt mögliche Einwirkungen des Eisenmangelsystems auf die EBF Regulation zu untersuchen, wurden die Transkriptmengen von *EBF1* und *EBF2* in der *fit* Mutante, der FITOx Linie und dem Wildtyp untersucht. Hierzu wurden diese Pflanzenlinien für 14 Tage auf 50 μM Fe im Hoagland-Plattensystem angezogen und dann für 3 Tage auf neue Platten mit 50 μM Fe oder 0 μM Fe umgesetzt. Die Expression der Gene *EBF1* und *EBF2* wurde in den Wurzeln der Pflanzen bestimmt, um den Einfluss des FIT Proteins zu untersuchen, welches in der Wurzel exprimiert wird (Abb. 4.18).

Interessanterweise war die *EBF1* Expression in *fit* Wurzeln sehr ähnlich der Expression in der FIT Überexpressionslinie (FITOx), *EBF1* wurde bei Eisenmangel um ca. ein Drittel stärker exprimiert als unter normalen Eisenbedingungen. Im Wildtyp hingegen war die Expression von *EBF1* bei normalem Eisengehalt am höchsten, dabei auch höher als in der *fit* Mutante und der FITOx Linie. Bei Eisenmangel wurde *EBF1* im Wildtyp niedriger exprimiert als bei normalen Eisenbedingungen.

Die Expression von *EBF2* war in der *fit* Mutante und dem Wildtyp der Expression von *EBF1* sehr ähnlich. Auch hier wurde *EBF2* in der *fit* Mutante durch Eisenmangel stärker induziert, und im Wildtyp niedriger exprimiert. In der Überexpressionslinie von FIT konnte keine Abhängigkeit der *EBF2* Transkriptmenge vom Eisenstatus festgestellt werden.

Diese Ergebnisse deuten auf eine Abhängigkeit der *EBF* Expression sowohl vom Eisenstatus der Pflanze als auch von FIT hin. Ob dies ein direkter Effekt ist, über die Interaktion von FIT mit EIN3 und EIL1 vermittelt wird oder durch eine Erhöhung des Ethylengehaltes durch veränderten Eisengehalt in der Pflanze zustande kommt, ist jedoch unklar.

4.4.3 Charakterisierung einer EBF1 Überexpressionslinie

Desweiteren wurde eine Überexpressionslinie für *EBF1* untersucht (s. Tab.3.1.1). Bereits im Phänotypen erschien diese Linie auffällig chlorotisch, wobei vor allem die sehr jungen Blätter von einer starken Chlorose betroffen waren. Dieser Phänotyp war durch externe Eisenapplikation auf die Blätter physiologisch komplementierbar (Ergebnisse nicht gezeigt). Ohne eine Behandlung mit Eisen konnte beobachtet werden, dass diese Pflanzen sehr spät und spärlich blühten. Desweiteren war eine ausgeprägte runde Blattform erkennbar. Diese Phänotypen zeigten sich sowohl bei der Anzucht auf Erde als auch bei kontrollierten Nährstoffbedingungen und konstanter Eisenversorgung im hydroponischen System (Abb. 4.19).

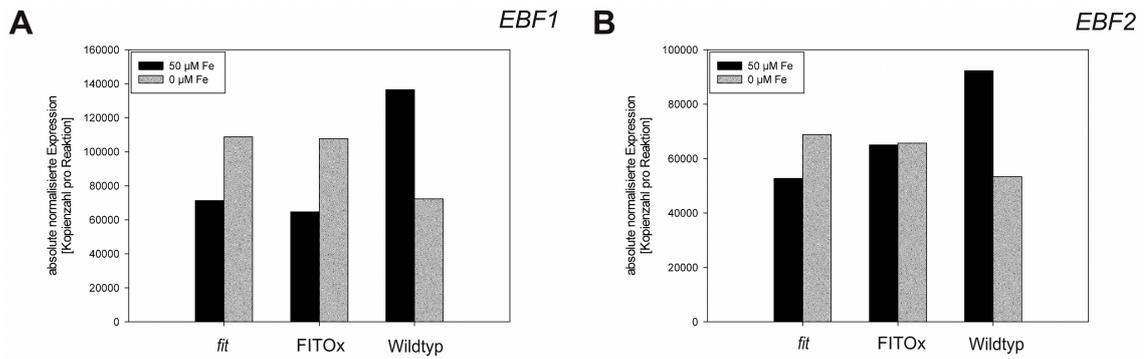


Abbildung 4.18: Mittels Realtime qRT-PCR wurden die Transkriptmengen der für die F-Box Proteine EBF1 und 2 kodierenden Gene *EBF1* und *2* quantifiziert. Zum einen wurde anhand der *fit* Mutante und der FITOx Linie im Vergleich zum Wildtyp eine mögliche Abhängigkeit von FIT untersucht, zum anderen wurde der Einfluss verschiedener Eisengehalte untersucht. A) Absolute Expression des Gens *EBF1*; B) Absolute Expression des Gens *EBF2*. Pflanzen wurden für 14 Tage bei 50 $\mu\text{M Fe}$ angezogen, dann für 3 Tage auf 50 $\mu\text{M Fe}$ oder 0 $\mu\text{M Fe}$ umgesetzt. Zur Analyse wurden die Wurzeln verwendet. $n = 1$.

Diese Ergebnisse könnten möglicherweise einen Einfluss des F-Box Proteins EBF1 im Eisenmangelweg zeigen.

Um den chlorotischen Phänotyp der Pflanzen physiologisch zu überprüfen und zu überprüfen, ob EBF1 tatsächlich einen Einfluss auf den Eisenmangelweg hat, wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt, um die Transkriptmengen der Gene der Eisenmangelantwort *FIT*, *IRT1* und *FRO2* in Abhängigkeit des Eisengehaltes im Medium zu bestimmen. Desweiteren wurde die Expression der eisenabhängigen BHLH Transkriptionsfaktoren *BHLH038*, *BHLH039* sowie *BHLH100* überprüft (Abb. 4.20). Dazu wurden die Pflanzen 6 Tage lang entweder auf 50 $\mu\text{M Fe}$ oder auf 0 $\mu\text{M Fe}$ ausgekeimt und angezogen. Die Transkriptmengen wurden jeweils aus den gesamten Keimlingen quantifiziert.

Die Expression von *FIT* war, unabhängig vom Eisenstatus, jeweils um ca. die Hälfte reduziert im Vergleich zum Wildtyp. Die Transkriptmengen der FIT-regulierten Gene *IRT1* und *FRO2* waren, ebenfalls eisenunabhängig, um 2/3 bzw. 3/4 reduziert.

Zusammen mit den Ergebnissen der Expressionsanalysen der *ebf1ebf2* Doppelmutante sind diese Ergebnisse ein Hinweis, dass eine sehr genaue Regulation der F-Box Faktoren EBF1 und EBF2 nötig ist, um die Eisenmangelantworten aufrecht zu erhalten.

Interessanterweise jedoch waren diese Pflanzen, trotz ihres stark ausgeprägten Eisenmangels, kaum mehr in der Lage, die BHLH Transkriptionsfaktoren *BHLH038*, *BHLH039* sowie *BHLH101* zu exprimieren, für alle drei Gene konnte nur eine leichte Induktion bei Eisenmangel-Bedingungen festgestellt werden. Die Expression bei + Fe unterschied sich hingegen nicht von der Expression bei + Fe im Wildtyp.

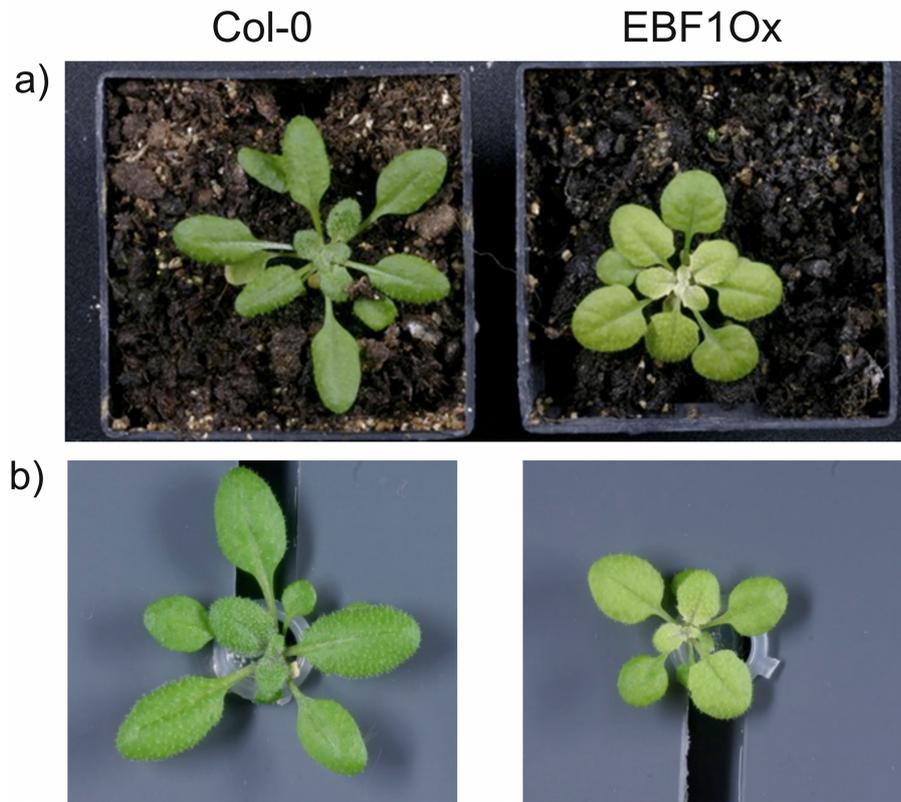


Abbildung 4.19: Phänotypisches Aussehen der EBF1Ox Linie im Vergleich zum Wildtyp. a) auf Erde angezogen; b) bei 10 μM Fe im hydroponischen System angezogen.

Diese Ergebnisse unterscheiden nun klar die Auswirkung der Überexpression von EBF1 von einem nicht funktionierenden FIT Protein wie in der *fit* Mutante, die die BHLH Transkriptionsfaktoren sowohl bei + Fe als auch bei - Fe Bedingungen sehr stark exprimiert (s. Kap.4.1.5), (Wang u. a., 2007a). Dies deutet auf eine spezifische Rolle des EBF1 Proteins in der Eisenhomöostase, unabhängig von FIT, hin.

4.5 Der Einfluss von Eisenmangel auf die Ethylenbiosynthese und den Ethylensignalweg

4.5.1 Regulation der Ethylenbiosynthese durch Eisenmangel sowie durch FIT

Frühere Studien haben bereits gezeigt, dass durch Eisenmangel in der Pflanze mehr Ethylen erzeugt wird (Landsberg, 1984, 1996; Romera und Alcantara, 1994; Schmidt u. a., 1996). Dadurch könnte es zu einer verstärkten Induktion der Ethylenbiosynthese sowie des Ethylensignalwegs kommen. Um dies nachzuprüfen,

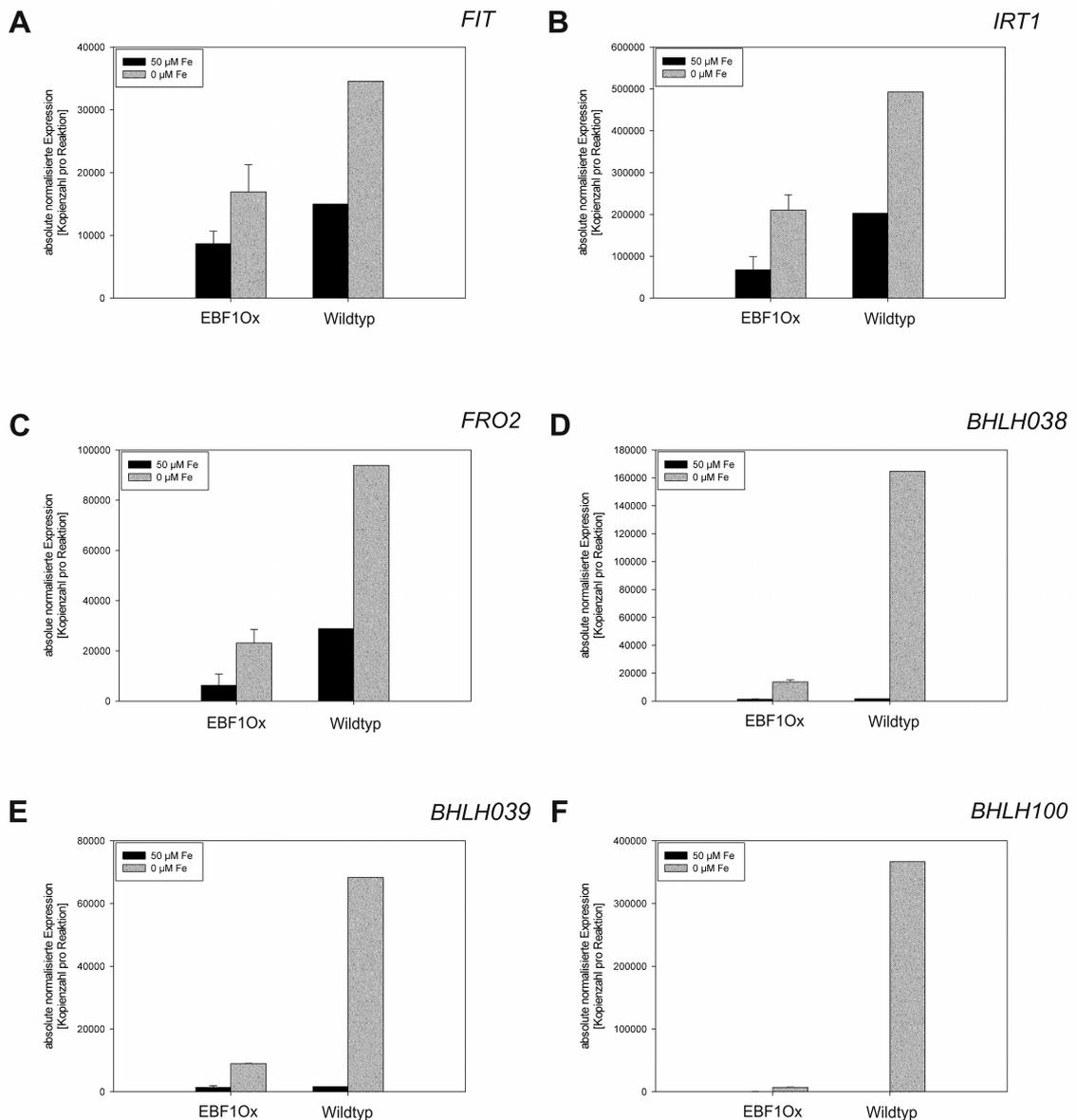


Abbildung 4.20: Physiologische Analyse der EBF1Ox Linie im Vergleich zum Wildtyp in Abhängigkeit von verschiedenen Eisenbedingungen. Untersucht wurden die Gene der Eisenaufnahmemaschinerie *FIT*, *IRT1* und *FRO2* sowie die Expression der eisenabhängigen Transkriptionsfaktoren *BHLH038*, *BHLH039* sowie *BHLH100*. Pflanzen wurden 6 Tage lang im Plattensystem bei 50 μM Fe oder 0 μM Fe ausgekeimt und angezogen. $n = 3$.

wurde die Expression verschiedener ACC Synthase- sowie ACC Oxidasegene in Abhängigkeit von Eisen sowie von FIT untersucht. Da die Genfamilien für diese Enzymklassen jedoch sehr umfangreich sind, konnten nur wenige Gene untersucht werden. Dabei zeigte sich sehr deutlich, dass große Schwankungen in der Expression zwischen verschiedenen Replikaten des gleichen Experiments auftraten, was nochmal unterstreicht, welche wesentliche Funktion Ethylen in der Regulation verschiedenster Pflanzenantworten hat. Daher wurde hier auf eine komplette Darstellung verzichtet, um genauere Angaben machen zu können, müssten umfangreichere Studien unternommen werden. Zusammenfassend kann jedoch gesagt werden, dass eine Überexpression von FIT in manchen Fällen zu einer stark differentiell regulierten Expression von ACC Synthasen bzw. Oxidasen führt, verglichen mit dem Wildtyp. In der FITOx Linie zeigten sich diese veränderten Transkriptniveaus auch weitestgehend unabhängig von der Eisensituation. Im Wildtyp ist eine differenzierte Regulation der Ethylenbiosynthesegene in Abhängigkeit von Eisen erkennbar, was die früheren Studien bestätigt.

Diese Ergebnisse könnten eine Abhängigkeit der eisenregulierten Ethylenbiosyntheseinduktion von FIT bedeuten, um genaue Aussagen treffen zu können, müssten jedoch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, bei denen vor allem geringere Schwankungen zwischen den Replikaten erzielt werden müssten, um Signifikanzen aufzeigen zu können.

4.5.2 *EIN2* Expression bei Eisenmangel und in Abhängigkeit von FIT

Um nun weitere Erkenntnisse der Auswirkung des Eisenmangels auf den Ethylensignalweg zu bekommen, wurde die Expression der beiden Gene *EIN2* und *CHITB* im Kontext des Eisenmangels genauer betrachtet. *EIN2* ist eines der wenigen Gene des Ethylensignalwegs, welches nicht nur über Proteasomabbau sondern auch über Genexpression reguliert wird.

Dabei könnte durch Eisenmangel bzw. in Abhängigkeit von FIT *EIN2* reguliert werden. Die Expression von *EIN2* wurde daher in Abhängigkeit von Eisen und von FIT untersucht. Dazu wurden FITOx Pflanzen zur Untersuchung der Abhängigkeit der Expression von FIT sowie Wildtyppflanzen für 14 Tage auf 50 μM Fe ausgekeimt und angezogen und dann auf 50 μM Fe und 0 μM Fe umgesetzt. Zur Analyse wurden die Blätter der Pflanzen verwendet, da dort in der FITOx Linie eine ektopische Expression von FIT stattfindet und so ein möglicher Einfluss von FIT auf die *EIN2* Expression gut ersichtlich sein sollte. Mittels Realtime qRT-PCR wurde die Expression von *EIN2* quantifiziert (Abb. 4.21).

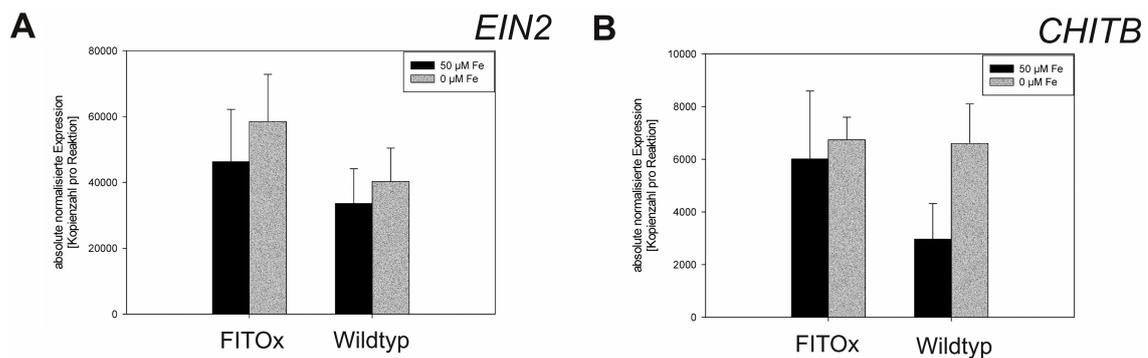


Abbildung 4.21: Analysiert wurden FITOx Pflanzen und Wildtyppflanzen auf ihre Expression der Gene *EIN2* und *CHITB* im Hinblick auf den Eisenstatus. Pflanzen wurden für 14 Tage auf + Fe angezogen, dann für 3 Tage auf + bzw. - Fe umgesetzt. Analyse der Transkriptmengen erfolgte in den Rosettenblättern. n = 2.

In der FITOx Linie war die Expression von *EIN2* generell höher als im Wildtyp, in beiden Linien erfolgte ein leichter Anstieg bei Eisenmangel. Dies deutet wie bereits für die Ethylenbiosynthese besprochen auf eine FIT-abhängige Regulation des Ethylensignalwegs, vor allem unter Eisenmangel, hin.

4.5.2.1 Die Expression der Chitinase B in Abhängigkeit von Eisen sowie von FIT

Um zu verifizieren, dass unter Eisenmangel eine verstärkte Reaktion auf ein mögliches Ethylensignal vorlag, wurde desweiteren die Expression der Chitinase B überprüft. Die Chitinase ist ein Protein, das in der Pathogenabwehr eine Rolle spielt, da es Chitin hydrolysiert, welches ein Hauptbestandteil von pilzlichen Zellwänden ist. Die Chitinase B kann sowohl durch Jasmonat als auch durch Ethylen induziert werden, und wird somit gern genutzt um ein Ethylensignal nachzuweisen, wenn Methoden wie die Konzentrationsbestimmung von Ethylen aus technischen Gründen nicht möglich ist (Rakwal u. a., 2004; Lucena u. a., 2006).

Die Expressionsanalyse wurde in den selben Proben wie unter 4.5.2 beschrieben, durchgeführt. Sehr eindeutig war eine Induktion der Expression im Wildtyp unter Eisenmangel erkennbar. Wenn FIT konstitutiv ektopisch exprimiert wurde, wurde die Chitinase sowohl bei + Fe als auch bei - Fe ähnlich stark exprimiert wie im Wildtyp unter Eisenmangel, und es erfolgte ein nur leichter Anstieg unter Eisenmangel (Abb. 4.21).

Somit konnte verifiziert werden, dass unter Eisenmangel ein verstärktes Ethylensignal auftritt, und dass dieses Signal von FIT abhängig ist, interessant wäre hier noch ein Vergleich mit der *fit* Mutante.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Ethylen ein wichtiger Faktor der Regulation der Eisenhomöostase ist. Die hier gefundene Interaktion zwischen dem Eisentranskriptionsfaktor FIT und den Ethylentranskriptionsfaktoren EIN3 und EIL1 könnte eine mögliche molekulare Verknüpfung der beiden Signalwege bedeuten. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass verschiedene Faktoren des Ethylensignalweges einen Einfluss auf die Eisenaufnahmeregulation haben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des Ethylensignalweges abhängig von Eisen bzw. von FIT ist. Somit gibt die vorliegende Arbeit tiefere Einblicke in die Regulation der Eisenaufnahme durch Ethylen.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine zuvor entdeckte Protein-Protein Interaktion zwischen dem für die Eisenaufnahme zuständigen Transkriptionsfaktor FIT und dem Transkriptionsfaktor EIL1 aus dem Ethylensignalweg *in vitro* und *in vivo* bestätigt. Zudem wurde eine Interaktion von FIT mit dem EIL1 sehr ähnlichen und partiell redundanten Protein EIN3 nachgewiesen. Durch Mutantanalyse konnte nachgewiesen werden, dass diese beiden interagierenden Faktoren einen wesentlichen Einfluss als positive Regulatoren auf die Eisenaufnahmemaschinerie haben. Die Generierung einer *fit1ein3eil1* Mutante und ihre Analyse ergab, dass EIN3 und EIL1 zusammen mit FIT einen additiven Einfluss auf die Expression der Fe(III) Reduktase FRO2 sowie auf den Eisentransporter IRT1 haben.

Weitere Untersuchungen an verschiedenen Mutanten des Ethylensignalwegs bestätigten, dass das multifunktionale Pflanzenhormon Ethylen als Regulator der Eisenaufnahme dient. Somit konnte erstmals eine molekulare Verknüpfung zwischen den Signalwegen der Eisenaufnahme sowie des Hormons Ethylen nachgewiesen werden.

Die gewonnenen Erkenntnisse werden im Folgenden im Hinblick auf ihre biologische Bedeutung für die Eisenhomöostase betrachtet.

5.1 EIN3 und EIL1 sind Feinregulatoren der Eisenmangelantwort

5.1.1 Die Ethylentranskriptionsfaktoren EIN3 und EIL1 interagieren mit FIT.

Die Eisenaufnahme in der Wurzel wird in *A. thaliana* durch den BHLH Transkriptionsfaktor FIT reguliert. FIT selbst wird zum einen auf transkriptioneller Ebene reguliert, bei Eisenmangel steigt die mRNA Menge um das 2-4 fache an. Untersuchungen mit einer Überexpressionslinie von FIT haben gezeigt, dass zusätzlich eine posttranskriptionelle Regulierung erfolgen muss, da die Transkription der untergeordneten Gene *IRT1* und *FRO2* bei ektopischer Überex-

pression von FIT nur unter Eisenmangel aktiviert wird (Bereczky u. a., 2003; Jakoby u. a., 2004). Eine Möglichkeit der Regulation, im Besonderen in der Klasse der BHLH Transkriptionsfaktoren, ist die physische Interaktion mit anderen Proteinen, entweder als Homo- oder als Heterodimer (Voronova und Baltimore, 1990; Toledo-Ortiz u. a., 2003). Dies sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Im Vorfeld wurden bereits mögliche Kandidaten zur Interaktion mit FIT als Heterodimer gefunden (Fleischer, 2007). Für den Transkriptionsfaktor EIL1 aus dem Ethylensignalweg wurde eine starke Interaktion in Hefe nachgewiesen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten diese Interaktionen mittels Pulldown Assay *in vitro*, auch für den EIL1 sehr ähnlichen Faktor EIN3, bestätigt werden.

4.1. Eine vollendete Verifizierung der Interaktion in der Pflanze gelang durch die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation für beide Proteine (s. Abb.4.2, 4.3). Es wurden bereits mehrfach Untersuchungen durchgeführt, die daraufhindeuten, dass Ethylen eines der Hormone ist, die die Eisenhomöostase regulieren und eine Verbindung zwischen Spross und Wurzel darstellen könnte (Landsberg, 1996; Romera und Alcantara, 1994; Lucena u. a., 2006; Waters u. a., 2007). Diese Proteininteraktion könnte nun Einfluss auf die Expression der FIT untergeordneten Gene IRT1 und FRO2 haben, das heißt eine Interaktion zwischen FIT und EIN3 bzw. EIL1 könnte inhibierend auf die Expression wirken, wenn der Proteinkomplex eine (bisher noch nicht nachgewiesene) Bindung an die Promotoren von IRT1 und FRO2 unmöglich macht. Ebenso ist jedoch möglich, dass eine Interaktion zwischen den Proteinen eine Aktivierung der Expression von IRT1 und FRO2 bewirkt, wenn der Proteinkomplex, möglicherweise unter speziellen Bedingungen, benötigt wird, um das Ablesen durch die Polymerase überhaupt in Gang zu setzen. Desweiteren wäre denkbar, dass die Bindung zwischen FIT und EIN3/EIL1 einen Einfluss auf eine weitere, bisher noch unbekannte Rolle, des FIT Proteins hat bzw. umgekehrt auf eine Rolle der EIN3/EIL1 Proteine.

Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass EIL1, nicht nur wie bisher angenommen, eine kleine Rolle in der Signaltransduktion des Ethylensignals darstellt, sondern dass es umfangreichen Einfluss auf die Ethylenantworten der Pflanze hat. So konnte gezeigt werden, dass EIL1 die Infloreszenzhöhe der Pflanzen, die Rosettengröße, die Blattepinastie, die Apikaldominanz und die Fruchtbarkeit der Pflanzen beeinflussen kann, während EIN3 vor allem im jungen Pflanzenstadium eine Rolle spielt (An u. a., 2010). Diese Erkenntnisse könnten in Zusammenhang mit den hier erhaltenen Ergebnissen andeuten, dass EIL1 und EIN3 in der morphologischen Anpassung der Pflanzen an Eisenmangel eine Rolle spielen könnten. Bereits mehrfach war gezeigt worden, dass die morphologischen Anpassungen der Wurzeln auf Eisenmangel auf Hormonreaktionen zurückzuführen sind (Schmidt u. a., 2000). So könnte es z.B. sein, dass im

frühen Entwicklungsstadium der Pflanze, dem Keimling, vornehmlich EIN3 mit FIT interagiert, um so Eisenmangel zu signalisieren und über die Funktion des EIN3 als Transkriptionsfaktor morphologische Anpassungen vornehmen zu können. Ebenso könnte EIL1 im späteren Pflanzenstadium mit FIT interagieren. Daher war es im weiteren Verlauf der Arbeit wichtig, nachzuprüfen, wie die Verknüpfung der beiden Signalwege für Eisen und Ethylen über die hier gezeigte Proteininteraktion sich auswirken könnte.

Um zu untersuchen, ob diese Interaktion räumlich möglich ist, wurde anhand Fluoreszenz-markierter EIL1 Proteine nachgewiesen, dass die Expression von EIL1 in den Zellkernen der Wurzel vor allem in der Wurzelspitze in allen Zellschichten sowie in der Wurzelhaarzone im Zentralzylinder und der Endodermis stattfindet (s. Abb.4.5). Da für FIT bereits ähnliche räumliche Expressionsmuster gezeigt wurden (Jakoby u. a., 2004), ist eine Interaktion räumlich möglich. Da EIN3 und EIL1 konstitutiv exprimiert werden, und nur bei Nicht-Bedarf abgebaut werden, ist die Interaktion auch zeitlich möglich. FIT wird in der Wurzel sowohl bei + Fe als auch bei - Fe exprimiert (Jakoby u. a., 2004), EIN3 und EIL1 werden bei einem ankommenden Ethylensignal stabilisiert (Guo und Ecker, 2003; Potuschak u. a., 2003; An u. a., 2010). Da bereits gezeigt wurde, dass unter Eisenmangelbedingungen verstärkt Ethylen gebildet wird (Romera u. a., 1999), ist anzunehmen, dass die Proteinstabilität von EIN3/EIL1 unter Eisenmangel zunimmt, so dass eine Interaktion der Proteine FIT und EIN3/EIL1 in der Pflanze unter Eisenmangelbedingungen sehr gut möglich ist.

5.1.2 EIN3 und EIL1 sind positive Regulatoren der Eisenhomöostase.

Um nun nachzuprüfen, in wiefern die Proteine EIN3/EIL1 Einfluss auf die Eisenaufnahme in der Wurzel nehmen können, wurde der Einfluss dieser Proteine auf die Eisenaufnahme in der Wurzel untersucht (s. Abb. 4.6) um eventuell zu zeigen, dass die Interaktion mit FIT für eine erfolgreiche Induktion der FIT Zielgene *IRT1* und *FRO2* notwendig ist. Expressionsanalysen der Eisenaufnahmegene mit einer *ein3eil1* Doppelmutante zeigten, dass EIN3 und EIL1 als positive Regulatoren für die Eisenaufnahme benötigt werden. Wenn sie nicht exprimiert werden können, zeigte sich die Expression der Eisenaufnahmegene stark verringert. Für *IRT1* und *FRO2* zeigte sich dieser Einfluss unabhängig von Eisen, sie wurden nach dem Ausschalten von EIN3/EIL1 generell niedriger exprimiert. *FIT* hingegen war durch das Fehlen von EIN3/EIL1 nur bei Eisenmangel beeinflusst. Eine Induktion der Eisenmangelantworten war jedoch immer noch möglich. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass durch die Interaktion mit EIN3/EIL1 FIT selbst

transkriptionell hochreguliert wird, also möglicherweise der Komplex aus FIT und EIN3/EIL1 benötigt wird, um den FIT Promoter verstärkt zu aktivieren, zu ähnlichen Schlussfolgerungen gelangen die Autoren Lucena u.a. (2006). Dies passiert aber nur bei Eisenmangel. Die Interaktion wird jedoch sowohl bei + Fe als auch bei Eisenmangel benötigt, um die Funktion von *FRO2* und *IRT1* aufrecht zu erhalten, da in beiden Situationen ein Fehlen der EIN3/EIL1 Proteine zu einer verminderten Expression von *IRT1* und *FRO2* führt. Die Expression des eisenabhängigen BHLH Transkriptionsfaktors *BHLH100* war in der *ein3eil1* Doppelmutante nur leicht verringert, dies unterstützt die erhaltenen Ergebnisse, dass eine Regulation durch EIN3/EIL1 selbst auf der Ebene von FIT passiert, da in der Literatur davon ausgegangen wird, dass *BHLH100* unabhängig von FIT auf einer möglicherweise parallelen Ebene agiert (Wang u. a., 2007b). Dass eine Induktion der Eisenmangelantworten auf beiden, eventuell parallelen, Ebenen *FIT* mit *IRT1* und *FRO2* sowie *BHLH100* nach dem Ausschalten der *EIN3/EIL1* Expression immer noch möglich war, deutet darauf hin, dass es weitere Regulationsmechanismen geben muss, die die Eisenaufnahme beeinflussen können und so in jeder Situation gewährleistet ist, dass die Pflanze Eisen aufnehmen kann und es nicht zu Unterversorgung kommt.

Somit konnte gezeigt werden, dass EIN3/EIL1 als positive Regulatoren in der Eisenaufnahme eine Rolle spielen.

5.1.3 EIN3 und EIL1 wirken mit FIT zusammen additiv bei der Aufnahme von Eisen.

Um detaillierter zu untersuchen, wie FIT und EIN3/EIL1 in der Regulation von *IRT1* und *FRO2* zusammenarbeiten, wurde durch Kreuzung eine *fitein3eil1* Dreifachmutante erzeugt. Phänotypisch zeigte sie keine auffälligen Besonderheiten (s. Abb. 4.7). Die Chlorose erschien ähnlich stark ausgeprägt wie bei der *fit* Mutante, das Wurzelwachstum und die Blattgröße zeigten sich ähnlich wie in der *ein3eil1* Mutante. Expressionsanalysen ergaben, dass, wie erwartet, die Expression von *IRT1* wie in der *fit* Mutante nicht mehr möglich war, die Expression von *FRO2*, die in der *fit* Mutante noch in geringem Umfang funktioniert, in der Dreifachmutante stark verringert war (s. Abb. 4.8). Rechnerisch konnte ermittelt werden (Formel: $(\text{Genexpression Col-0} - \text{Genexpression } fitein3eil1) - ((\text{Genexpression Col-0} - \text{Genexpression } fit) + (\text{Genexpression Col-0} - \text{Genexpression } ein3eil1))$), dass der Unterschied in der Expression zwischen dem Wildtyp und den Einzelmutanten größer ist als der Unterschied zwischen Wildtyp und Dreifachmutante. Damit handelt es sich um einen additiven Effekt von EIN3/EIL1 zusammen mit FIT in der Regulation des *FRO2* Gens.

Des Weiteren wurde die Expression des *BHLH100* Gens untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Expression bei + Fe ähnlich war wie in der *fit* Mutante, in der sie erhöht war im Vergleich zum Wildtyp. Bei Eisenmangel jedoch konnte in der Dreifachmutante *BHLH100* kaum stärker induziert werden, welche in der *fit* Mutante jedoch sehr stark erhöht war. Bereits in der Studie von Wang u.a. 2007 wurde gezeigt, dass FIT kein Repressor der vier eisenabhängigen BHLH Transkriptionsfaktorgene *BHLH038*, *BHLH039*, *BHLH100* und *BHLH101* ist (Wang u. a., 2007b). Die Ergebnisse mit der *fit3eil1* Mutante bei Eisenmangel haben gezeigt, dass die verstärkte Induktion von *BHLH100* ohne die Faktoren EIN3/EIL1 kaum mehr möglich ist. Dies könnte bedeuten, dass die Anwesenheit von EIN3 und EIL1 zusammen mit FIT erforderlich ist, um die BHLH Transkriptionsfaktoren zu beeinflussen. Es wurde bereits gezeigt, dass *BHLH038* und *BHLH039* mit FIT physisch interagieren können, und dass diese Interaktion möglicherweise für ein Anschalten der Gene *IRT1* und *FRO2* verantwortlich ist. Gemeinsame Expression von FIT mit *BHLH038/BHLH039* in Hefe resultierte in Aktivität von pIRT1::GUS oder pFRO2::GUS. Gemeinsame Überexpression von FIT und *BHLH038/BHLH039* in *Arabidopsis* resultierte in dieser Studie in konstitutiver Expression von *IRT1* und *FRO2*. (Yuan u. a., 2008). Mit den hier gewonnenen Erkenntnissen ist es möglich, einen weitere Verknüpfung zwischen der Ebene des FIT Proteins und den BHLH Transkriptionsfaktoren *BHLH038*, *039*, *100* und *101* aufzudecken. Möglicherweise spielen EIN3/EIL1 also eine Rolle in der Regulation der Eisenaufnahme sowie der Translokation, deren Regulation eventuell von den vier BHLH Proteinen abhängig ist.

Anhand einer Überexpressionslinie von FIT wurde, wie bereits erwähnt, gezeigt, dass FIT auf posttranskriptioneller Ebene reguliert werden muss (Jakoby u. a., 2004). Eine mögliche Regulation ist durch die Interaktion mit EIN3 und EIL1 wahrscheinlich geworden. Um nun den Einfluss von EIN3 und EIL1 bei der ektopischen Überexpression von FIT zu untersuchen, wurde durch Kreuzung eine FIT Überexpressionslinie (FITox) geschaffen, in der EIN3 und EIL1 ausgeschaltet sind, die FITox*ein3eil1* Linie. Die Expression der Gene *IRT1* und *FRO2* in den Blättern dieser Linie unter + Fe und - Fe wurde untersucht (s. Abb. 4.9). Obwohl in der FITox*ein3eil1* Linie eine höhere ektopische Expression von FIT erreicht wurde, waren die Transkriptmengen von *IRT1* und *FRO2* im Vergleich zur FITox Linie verringert. Auch die Expression des *BHLH100* war leicht verringert. Daher konnte mit diesem Experiment bestätigt werden, dass EIN3 und EIL1 feinregulatorische Aufgaben in der Regulation von *IRT1* und *FRO2* haben, da trotz sehr starker ektopischer Expression von *IRT1* und *FRO2* eine Verringerung durch den Einfluss der fehlenden EIN3/EIL1 erkennbar war, ein komplettes Abschalten der ektopischen Expression jedoch unterblieb.

Die durch die Studien mit der *ein3eil1* Mutante, der *fitein3eil1* Mutante sowie der FITO*ein3eil1* Linie erhaltenen Ergebnisse zeigen klar ein Einwirken der Ethylentranskriptionsfaktoren EIN3 und EIL1 als positive Regulatoren der Eisenhomöostase in der Wurzel. Dies könnte mehrere Bedeutungen haben. Das wahrscheinlichste Szenario ist Folgendes: Bereits mehrfach wurde gezeigt, dass unter Eisenmangel verstärkt Ethylen gebildet wird (Landsberg, 1984, 1996; Romero und Alcantara, 1994; Schmidt und Bartels, 1996). EIN3 und EIL1 könnten nun verantwortlich sein für das Übermitteln eines durch Eisenmangel im Spross ausgelösten Ethylensignals an die in der Wurzel stattfindenden Prozesse zur Aufrechterhaltung des Eisenhaushaltes. Außerdem könnten sie verantwortlich sein für die Regulation einer korrekten Translokation von Eisen über eine Regulation der vier eisenabhängigen BHLH Proteine 038, 039, 100 und 101. Eine ähnliche Rolle für EIN3/EIL1 wurde beim Übergang der Keimlinge von der Skotomorphogenese zur Photomorphogenese entdeckt. Dort sind sie verantwortlich für das Anschalten zweier für die Chlorophyllbiosynthese benötigten Enzyme. Sie kooperieren dabei mit PIF1 und übermitteln so das Ethylensignal (Zhong u. a., 2009).

Eine weitere Möglichkeit der Eisenaufnahmeregulation durch EIN3 und EIL1 könnte unter speziellen Bedingungen stattfinden, z.B. unter Pathogenbefall, da Ethylen in der Regulation von Pathogenantworten zusammen mit Salicylsäure und Jasmonsäure eine wichtige Rolle spielt. Denkbar wäre z.B. folgendes: Es findet ein lokal begrenzter Pathogenbefall statt. Um die Ernährung der Pathogene innerhalb der Pflanzenzelle zu inhibieren, wäre es möglich, dass Nährstoffe wie Eisen aus den befallenen Zellen abtransportiert wird, bzw. dort kein weiteres Eisen aufgenommen wird. Eine Rolle von EIN3/EIL1 in der Translokation des Eisens über die Regulation der BHLHs wäre hier zum Beispiel denkbar, da auch bekannt ist, dass BHLH038 und BHLH039 durch Salicylsäure reguliert werden (Kang u. a., 2003).

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die erste These, die besagt, dass EIN3/EIL1 mit FIT interagieren, um ein mögliches Eisenmangelsignal an die Mechanismen der Eisenaufnahme zu übertragen. Untersuchungen mit Pathogenen wurden hier nicht unternommen, könnten aber eventuell interessante Aufschlüsse geben.

5.2 Hemmung der Ethylenbiosynthese in der Eisenmangelantwort

Um zu untersuchen, welchen Einfluss ein Ethylensignal auf die Regulation der Eisenmangelantwort hat, wurde experimentell die Ethylenbiosynthese durch Gabe

des Biosynthesehemmers AVG unterdrückt. Untersuchungen mit verschiedenen GUS-Linien der Eisenmangelantwort zeigten hierbei deutlich, dass eine gehemmte Ethylenbiosynthese zu stark verminderten Promoteraktivitäten der Gene *FIT*, *IRT1* und *BHLH100* führte. Für *FIT* traf dies sowohl bei + Fe als auch bei - Fe zu. Dies könnte bedeuten, dass Ethylen sowohl bei + Fe als auch bei - Fe zur korrekten Aufnahme von Eisen bzw. zur Verteilung innerhalb der Pflanze bei ausreichenden Eisenbedingungen notwendig sein könnte. Hierbei wäre u.a. vorstellbar, dass die Dosis des Ethylen eine Rolle spielt.

Weitere Untersuchungen wurden vorgenommen, indem die mRNA Mengen der Gene *FIT*, *IRT1*, *FRO2* und *BHLH100* aus Wildtyp Pflanzen quantifiziert wurden, deren Ethylenbiosynthese gehemmt worden ist. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Transkriptmengen dieser Gene unter Hemmung der Ethylenbiosynthese unabhängig vom Eisengehalt des Mediums stark verringert sind im Vergleich zu den Kontrollpflanzen, in denen die Ethylenbiosynthese stattfinden konnte. Diese Ergebnisse verifizieren für das hier benutzte Anzuchtssystem Ergebnisse einer älteren Studie, in der durch Inhibierung der Ethylensynthese sowohl in Arabidopsis als auch in Tomate die Expression der Gene *FIT/FER*, *IRT1* und *FRO2/FRO1* stark verringert sind (Lucena u. a., 2006). Dort konnte gezeigt werden, dass nicht die Stabilität der mRNA dieser Gene betroffen ist, sondern die Transkription. Die Autoren konnten mit ihren Untersuchungen ein Modell aufstellen, dass Ethylen als Verstärker der Eisenmangelantwort darstellt, während Eisen selbst als Repressor dienen könnte. Dies konnte hier nicht deutlich unterstützt werden, da eine negative Beeinträchtigung der Eisenmangelgene durch Hemmung der Ethylenbiosynthese sowohl bei + Fe als auch bei - Fe vorlag. Trotzdem kann die Hypothese der Autoren Lucena u.a. (2006) nicht ausgeschlossen werden.

5.3 Der Einfluss verschiedener Komponenten des Ethylensignalwegs auf die Eisenhomöostase

Um im weiteren Verlauf der Arbeit die Rolle des Ethylensignalweges auf die Eisenhomöostase genauer zu beleuchten, wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, bei denen einzelne Komponenten des Ethylensignalweges im Hinblick auf den Eisenhaushalt betrachtet wurden.

5.3.1 Fehlen des Ethylenrezeptors ETR1 bewirkt negative Auswirkung auf die Eisenaufnahme.

Um die bereits diskutierten Ergebnisse im Hinblick auf die Wirkung von Ethylen in der Eisenaufnahme zu bestätigen, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurde eine Mutante für den Ethylenrezeptor ETR1 in unterschiedlichen Eisenbedingungen überprüft (s. Abb. 4.3.1). Hierzu wurde die Expression der Gene *FIT*, *IRT1*, *FRO2* sowie *BHLH100* bei + Fe und - Fe quantifiziert. Interessanterweise hat das Fehlen des ETR1 Rezeptors nur bei Eisenmangel einen im Vergleich zum Wildtyp reprimierenden Effekt auf die Eisenaufnahme. Dies könnte bedeuten, dass weitere Ethylenrezeptoren am Signalweg für die Eisenaufnahme beteiligt sind, außerdem könnte es ein Hinweis darauf sein, dass nur bei Eisenmangel ein verstärktes Ethylensignal in der Zelle ankommt, die Regulation bei + Fe aber von weiter unten liegenden Genen der Ethylenantwort differentiell beeinflusst wird. Hierbei könnten wiederum EIN3 und EIL1 zentrale Rollen spielen.

5.3.2 Der zentrale Ethylenfaktor EIN2 ist wichtiger Spieler in der Eisenantwort

Das Membranprotein EIN2 ist ein zentraler Faktor in der Ethylensignalweiterleitung innerhalb einer Zelle. Es wird für alle Ethylenantworten benötigt. Zudem erscheint EIN2 als Integrator weiterer Hormonsignalwege, wie z.B dem Jasmonsäureweg oder dem Abscisinsäureweg (Alonso u. a., 1999b; Yoshida u. a., 2009). Bis vor kurzem war sehr wenig über das EIN2 Protein bekannt. Studien von Qiao u.a. (2009) haben gezeigt, dass das EIN2 Protein eine kurze Halbwertszeit hat, da es einem schnellen Turnover durch protosomalem Abbau unterliegt (Qiao u. a., 2009). Dieser Abbau wird über zwei F-Box Proteine gesteuert, ETP1 und ETP2 (EIN2 TARGETING PROTEIN). Die Akkumulation von EIN2 wird durch Ethylen positiv beeinflusst. Überexpression dieser F-Box Proteine unterbindet die Akkumulation des EIN2 Proteins und bewirkt eine starke Insensitivität der Pflanzen gegenüber Ethylen. Ausschalten der ETP1/2 Proteine führt zu einer Akkumulation des EIN2 Proteins und konstitutiven Ethylenantworten (Qiao u. a., 2009).

Außerdem konnte das EIN2 Membranprotein kürzlich in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert werden (Bisson u. a., 2009).

Neueste Studien zeigten außerdem, dass EIN2 für die Ethylen-abhängige Akkumulation von EIN3 und EIL1 unbedingt benötigt wird (An u. a., 2010) und nicht wie bislang angenommen, die Regulation von EIN3 und EIL1 an EIN2 vorbei durch eine MAPK Kaskade funktioniert.

Da bereits gezeigt worden ist, dass EIN2 in der Regulation von abiotischen und biotischen Stressantworten beteiligt ist, wie z.B. Ozonstress, Salzstress, oxidativem Stress, Bleistress sowie in der Resistenz gegenüber Krankheiten (s. Kap.4.3.2), wurde EIN2 hier speziell rausgegriffen, um seinen Einfluss auf die Eisenhomöostase zu überprüfen, da möglicherweise eine weitere Rolle des EIN2 aufgedeckt werden könnte.

5.3.2.1 EIN2 wird in seiner Rolle als Ethylenfaktor für die Eisenhomöostase benötigt.

Um zu untersuchen, inwiefern EIN2 für die Eisenmangelantworten benötigt wird, wurde die Eisenaufnahmemaschinerie in einer *ein2* Mutante im Hinblick auf unterschiedliche Eisengehalte mittels Expressionsanalyse untersucht (s. Abb.4.13). Da bekannt ist, dass EIN2 auch im Jasmonatweg eine Rolle spielt und in der Arbeitsgruppe bereits entdeckt wurde, dass die Gabe von externem Jasmonat zur Reprimierung der Eisenaufnahmegene führt (Sabine Müller, Diplomarbeit 2008), wurde außerdem überprüft, ob EIN2 für die Weiterleitung eines Jasmonatsignals an die Komponenten der Eisenaufnahme beteiligt ist. In der *ein2* Mutante konnte nur eine sehr gering verminderte Expression des Transkriptionsfaktors *FIT* festgestellt werden. Die Zielgene von *FIT*, *IRT1* und vor allem *FRO2* erschienen stärker verringert im Vergleich zum Wildtyp, sowohl leichter bei + Fe als auch stärker bei - Fe. Dies deutet darauf hin, dass EIN2 benötigt wird, um ein Ethylensignal weiterzuleiten, dass dann wahrscheinlich über die EIN3/EIL1 Proteine zur Regulation der Eisenaufnahme gelangt. Interessant ist auch, dass im Gegensatz zur Expression in der *ein3eil1* Mutante die *FIT* Expression in der *ein2* Mutante nicht signifikant verringert war. Dies stützt wiederum die Hypothese, dass die Interaktion zwischen EIN3/EIL1 und *FIT* benötigt wird, um die *FIT* Expression zu beeinflussen.

Die Gabe von Jasmonat verringert im Wildtyp wie erwartet die Expression der Eisenaufnahmegene, ebenso stark verringert die Gabe von JA auch die Expression in der *ein2* Mutante, eine weitere Beeinflussung durch das Ausschalten von EIN2, z.B. eine verminderte Repression, konnte nicht festgestellt werden, was eine Rolle für EIN2 als Integrator der Jasmonatantwort in der Eisenhomöostase ausschließt. EIN2 scheint somit lediglich durch seine zentrale Rolle im Ethylensignalweg Einfluss auf die Aufnahme von Eisen zu spielen, weitere Untersuchungen mit anderen Stresssituationen bzw. Hormonen müssten allerdings durchgeführt werden, um eine erweiterte Rolle des EIN2 in der Eisenaufnahme und einem möglichen „Cross-talk“ mit anderen Stresssituationen auszuschließen.

Um festzustellen ob EIN2 zusammen mit *FIT* eine Rolle als positiver Regulator der Eisenaufnahme darstellt, wurde eine *fitein2* Doppelmutante hergestellt. Diese zeigt

bei Eisenmangel einen, wahrscheinlich durch Anthocyane, rot gefärbten Phänotyp. Dies deutet darauf hin, dass ein Fehlen beider Faktoren unter Eisenmangel zu einer starken Stressreaktion in dieser Pflanzenlinie führt. Zudem wurde die Genexpression der Gene *IRT1*, *FRO2*, *BHLH039* und *BHLH101* untersucht (4.15). Wie erwartet und bereits in der *fit* Mutante zu sehen, war die Expression von *IRT1* in der Doppelmutante durch das Ausschalten von *FIT* nicht mehr möglich. Die Expression von *FRO2* jedoch ergab, dass *FIT* und *EIN2* in additiver Weise die Expression beeinflussen, denn in der Doppelmutante war die Expression stärker verringert als in der *fit* Mutante. Die Expression der *BHLH* Gene zeigte einen deutlichen Rückgang in der Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp. Diese Ergebnisse bestätigen die mit der *fit* Mutante erhaltenen Ergebnisse und deuten so sehr stark auf eine wichtige Rolle von Ethylen in der Regulation der Eisenaufnahme hin.

Des Weiteren wurde eine *FIT* Mutante mittels Expressionsanalyse im Kontext der Eisenhomöostase untersucht (s. Abb. 4.16). Hier zeigte sich, dass ein Fehlen des *EIN2* Proteins zu einer verringerten ektopischen Expression von *IRT1* und *FRO2* führt. Diese Ergebnisse bestätigen so ebenfalls die Rolle von Ethylen als Hormon der Feinregulation der Eisenaufnahme. Möglicherweise deuten diese Ergebnisse, ebenso wie die mit der *FIT* Mutante erhaltenen Ergebnisse, darauf hin, dass eine Überexpression von *FIT* ein starkes Ethylensignal überflüssig macht, da *FIT* bereits in verstärktem Maße vorhanden ist.

Zusammengefasst ergeben diese Untersuchungen, dass die von Ethylen abhängige Regulation der Eisenhomöostase hauptsächlich über den Weg des *EIN2* durchgeführt wird. Damit kann eine (starke) Beteiligung alternativer Ethylensignalwege wie über die MAP Kinase Kinase 9 (MKK9) ausgeschlossen werden. Dies bestätigt die Ergebnisse von An u. a. in ihrer kürzlich veröffentlichten Studie (An u. a., 2010), die zeigen konnten, dass die Stabilisierung von *EIN3* und *EIL1* von *EIN2* aber nicht von MKK9 abhängig ist (An u. a., 2010). Desweiteren scheint *EIN2* für den durch Ethylen induzierbare Abbau der Proteine *EBF1/2* verantwortlich zu sein (An u. a., 2010).

5.3.3 Die Rolle der F-Box Proteine *EBF1/2* in der Eisenaufnahme

Die Regulation der Ethylentranskriptionsfaktoren *EIN3* und *EIL1* wird auf Ebene der Proteinstabilität durch protosomale Degradation durchgeführt. Für die Verknüpfung von Ubiquitin als Signal zum Abbau der Proteine sind die SCF-Komplex E3 Ligase F-Box Proteine *EBF1* und *EBF2* zuständig (Guo und Ecker, 2003; Potuschak u. a., 2003). *EBF1* und *EBF2* spielen dabei unterschiedliche Rollen. *EBF1* spielt

vor allem zu Beginn der Ethylensignalwirkung eine Rolle, EBF2 hingegen zeigt seinen Einfluss in den späteren Stadien der Ethylenantworten und in dem Moment, wenn das Ethylensignal wegfällt, so dass das normale Wachstum der Pflanzen wieder aufgenommen werden kann (Binder u. a., 2007). Dadurch wird der Pflanze ermöglicht, die Ethylenantworten feinstens zu regulieren, indem EBF1/2 die Ethylenantwort bei fehlendem Ethylen unterdrücken, bei hohen Ethylenkonzentrationen die Ethylenantworten einzudämmen und nach dem Entfernen des Ethylens die Pflanze schnell wieder zur Regeneration zu bringen (Binder u. a., 2007). Des Weiteren wurde entdeckt, dass diese F-Box Proteine durch eine Exoribonuklease XRN4 (EIN5) reguliert werden, welche unterhalb von CTR1 agiert (Potuschak u. a., 2006). Zudem wurde nachgewiesen, dass das EBF2 Gen durch Bindung des EIN3 Proteins an den EBF2 Promoter reguliert werden kann (Binder u. a., 2007; Konishi und Yanagisawa, 2008b,a).

Neueste Studien zeigten nun, dass EIL1 und EIN3 beide eine Rolle in der Regulation der F-Box Proteine spielen, jedoch unterschiedliche Funktionen haben. Wie bereits beschrieben, konnte der Einfluss von EIN3 auf EBF2 bestätigt werden. EIL1 hingegen konnte in dieser Studie zum ersten Mal eine eigene Rolle im Ethylensignalweg zugeordnet werden. Es zeigt seinen Einfluss am EBF1 Protein und ist vor allem in adulten Pflanzen aktiv, wo es das Blattgrößenwachstum und die Sprosselongation unterdrückt. Des Weiteren wurde herausgefunden, dass bei einem kompletten Fehlen der EBF1/2 Proteine die EIN3/EIL1 Proteine zwar im Zellkern angesammelt werden, aber nicht mehr auf externes Ethylen reagieren können (An u. a., 2010).

Zu diesen verschiedenen Möglichkeiten der Regulation der EBFs über Rückkopplung wurde auch entdeckt, dass die EBF1/2 Proteine selber durch Proteinabbau reguliert werden (An u. a., 2010).

Somit war es von äußerster Wichtigkeit, im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen über EBF1/2 im Hinblick auf die Eisenhomöostase anzustellen, da jedoch einige Erkenntnisse über EBF1/2 erst kürzlich bekannt wurden, konnte nicht auf diese Ergebnisse eingegangen werden.

5.3.3.1 Fehlen der EBF1/2 Faktoren bewirkt eine Verringerung der Eisenaufnahmeantworten.

Expressionsanalysen mit einer *ebf1ebf2* Doppelmutante auf verschiedenen Eisenkonzentrationen wurden durchgeführt (s. Abb. 4.17). Diese Mutante ist sehr kleinwüchsig und erschien während der Anzucht sehr gestresst. Die Expression der Gene *FIT*, *IRT1*, *FRO2* sowie *BHLH100* erschien sowohl bei + Fe als auch bei - Fe stark verringert im Vergleich zur Expression in den Wildtyppflanzen. Erwartet

worden war eine erhöhte Expression dieser Gene, da die positiven Regulatoren der Eisenaufnahme EIN3 und EIL1 in dieser Doppelmutante permanent abgebaut werden. Da die Pflanzen jedoch einem stetigen Ethylensignal, welches durch die Akkumulation von EIN3 und EIL1 verursacht wird, ausgesetzt sind, könnte es möglich sein, dass eine weitere Regulation stattfindet, die eine übermäßige Eisenaufnahme verhindert, z.B. könnten hier Mechanismen greifen, die durch andere Pflanzenhormone wie Jasmonat oder Cytokinine geregelt werden. Des Weiteren wäre vorstellbar, dass eine variierende Stärke des Ethylensignals unterschiedliche Ethylenantworten auslöst, da Ethylen ein multifunktionales Hormon ist, dessen Antworten sowohl zeitlich als auch räumlich koordiniert werden müssen. Ein gutes Beispiel hierfür ist ein Experiment von An u.a. (2010), welches zeigt, dass die EIL1 Dosis wichtig ist, um die Phänotypen einer *ein3 ebf1 ebf2* Mutante zu beeinflussen (An u. a., 2010)

Wie in der Studie von An u.a. 2010 gezeigt wurde, wird das Protein EIL1 bei Fehlen der EBF1/2 Faktoren zwar im Zellkern angesammelt, seine Funktion bei Gabe von externem Ethylen bleibt jedoch aus (An u. a., 2010). Dies deutet auf eine sehr enge Verknüpfung der Regulation zwischen EIN3/EIL1 und EBF1/2 hin und könnte somit bedeuten, dass beide Proteingruppen für die korrekte Regulation der Eisenaufnahme benötigt werden, bzw. dass sie sich gegenseitig beeinflussen könnten, je nachdem wie der Eisenstatus ist. Dabei wäre vorstellbar, dass sich hier durch die Eisensituation räumliche Muster ergeben, in denen EIN3/ EIL1 und EBF1/2 sich gegenseitig beeinflussen.

5.3.3.2 Die Expression von *EBF1/2* erscheint sowohl Eisen- als auch FIT-abhängig.

Des Weiteren wurde die Expression von *EBF1* und *EBF2* in Abhängigkeit der Eisenverfügbarkeit sowie in Abhängigkeit von FIT in Wurzeln untersucht (s. Abb.4.18). Hierbei ergab sich, dass sowohl in der *fit* Mutante als auch in der Überexpressionslinie für FIT (FITOx) die eisenabhängige Expression für *EBF1* sehr ähnlich war. In beiden Linien wurde *EBF1* unter Eisenmangel höher exprimiert. Im Wildtyp hingegen nahm die Expression von *EBF1* unter Eisenmangel ab. Die Expression von *EBF2* erschien im Wildtyp gleich wie die Expression von *EBF1*, auch sie war bei Eisenmangel niedriger reguliert. In der FITOx Linie war kein Unterschied zwischen + Fe und - Fe erkennbar, während in der *fit* Mutante die Expression von *EBF2* unter Eisenmangelbedingungen leicht erhöht wird. Die Ergebnisse im Wildtyp in Abhängigkeit von Eisen deuten auf eine Stabilisierung der EIN3/EIL1 Proteine unter Eisenmangel hin, und stimmen mit Studien überein,

die berichteten, dass unter Eisenmangel Ethylen gebildet wird (Romera u. a., 1999).

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Expression von *EBF1/2* zum einen von Eisen und zum anderen vom FIT Protein abhängig ist. Hierbei könnte wiederum die Regulation der Expression, zumindest des *EBF2*, durch *EIN3/EIL1* eine Rolle spielen (Konishi und Yanagisawa, 2008a), die dann durch ihre Interaktion mit FIT beeinflusst werden könnte. Des Weiteren könnte die Dosis eines vorhandenen Ethylensignales eine Rolle spielen, die durch den Eisenmangel bzw. möglicherweise auch durch FIT beeinflusst werden könnte (s. Ergebnisse 4.21). Um genauere Aussagen treffen zu können, müssten die *EBF1/2* Faktoren auf Proteinebene untersucht werden, da sie, wie kürzlich durch An u.a. entdeckt, auch protosomal abgebaut werden.

5.3.3.3 Überexpression von *EBF1* führt zum Verlust der Funktion der *BHLH* Transkriptionsfaktoren.

Untersuchungen an einer Überexpressionslinie für das F-Box Protein *EBF1* (*EBF1Ox*) haben ergeben, dass diese Linie einen chlorotischen Phänotyp der Rosettenblätter aufweist (s. Abb. 4.19). Vor allem die jungen Blätter erschienen sehr stark chlorotisch. Dieser Phänotyp war durch regelmäßige Gabe von externem Eisen physiologisch komplementierbar, was daraufhin deutet, dass die Chlorose durch starken Eisenmangel ausgelöst wurde. Physiologische Analysen mittels Expressionsstudien in verschiedenen Eisenbedingungen wurden durchgeführt (s. Abb. 4.20). Dabei zeigte sich, dass die Expression von *FIT*, *IRT1* und *FRO2* unabhängig von den Eisenbedingungen stark verringert waren. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die eisenabhängigen Transkriptionsfaktoren *BHLH038*, *039* und *100* fast nicht mehr durch Eisenmangel induziert werden konnten. Die Expression der *BHLHs* bei + Fe Bedingungen erschien dagegen unbeeinflusst. Dies steht im Gegensatz zur ebenfalls stark chlorotischen *fit* Mutante, in der die *BHLH* Gene sehr stark durch Eisenmangel induziert werden können und auch bei + Fe bereits stark exprimiert werden. Dieser Effekt war so stark, dass dies durch eine direkte Regulation der *BHLHs* durch *EBF1* zustande kommen könnte. Die mangelnde Induktion der *BHLH* Faktoren könnte als Folge die reduzierte Expression von *FIT*, *IRT1* und *FRO2* haben, jedoch ist diese, im Gegensatz zur Expression der *BHLHs*, auch bei + Fe reduziert. Die Überexpression von *EBF1* führt allerdings auch zu einem verstärkten Abbau der *EIN3/EIL1* Proteine, die wiederum als positive Regulatoren der Eisenaufnahme über FIT wirken und möglicherweise durch ihre Interaktion mit FIT auch die FIT Expression selbst stärken.

Daher unterstützen diese Ergebnisse die mit der *ein3eil1* Mutante erhaltenen Ergebnisse.

Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass das Zusammenspiel zwischen EIN3/EIL1 und EBF1/2 auch in der Eisenaufnahme eine wichtige Rolle spielt und so wahrscheinlich eine sehr genaue Regulierung der Eisenaufnahme möglich ist. Ebenfalls war erkennbar, dass die Proteine EBF1/2 auf der Ebene der BHLH Transkriptionsfaktoren wirken. Somit wurde es möglich, einen weiteren Verknüpfungspunkt für FIT und die BHLHs zu finden, dies könnte möglicherweise eine Bedeutung für die Translokation des Eisens innerhalb der Pflanze haben. Hierbei wäre vorstellbar, dass die Faktoren EBF1 und 2 einen großen Einfluss auf die BHLH Proteine haben, was wiederum Auswirkungen auf FIT und die ihm untergeordneten Faktoren haben könnte. Dies würde dann zusätzlich zur Proteininteraktion von FIT mit EIN3 und EIL1 eine zusätzliche Ebene des Einflusses des Ethylennetzwerkes auf die Eisenhomöostase bedeuten.

5.4 Ethylen wird für die Eisenhomöostase benötigt

Um nachzuweisen, ob die Induktion der Ethylenbiosynthese bei Eisenmangel, wie bereits mehrfach berichtet, gefördert wird und ob sie dabei von FIT abhängig ist, wurden einige Gene der Ethylensynthese, kodierend für ACC Synthasen und Oxidasen, herausgegriffen und auf ihre Expression in verschiedenen Eisenbedingungen sowie in der FITOx Linie untersucht. Große Schwankungen zwischen Replikaten zeigten hier jedoch sehr deutlich, dass die Ethylenbiosynthese von sehr vielen Prozessen und Situationen beeinflusst werden kann. Es konnten jedoch Tendenzen festgestellt werden, die darlegen, dass bei Eisenmangel die Ethylenproduktion angetrieben wird sowie dass dies scheinbar ein FIT-abhängiger Prozess ist, denn in der FITOx Linie wurde eine Erhöhung der Transkriptmengen sowohl bei + Fe als auch bei - Fe festgestellt. Diese neuen Erkenntnisse sind sehr interessant und lassen neue Fragestellungen zur detaillierten gegenseitigen Regulierung der Signalwege für Ethylen und für Eisen zu. Um diesen Einfluss von FIT und Eisenmangel auf den Ethylenweg auch im Ethylensignalweg nachzuvollziehen, wurde die Expression von EIN2 sowie der Ethylen-regulierten Chitinase B (CHITB) überprüft (s. Abb. 4.21). Dabei konnte für beide Gene eine verstärkte Expression durch eine Überexpression von FIT nachgewiesen werden. Die Expression von EIN2 wurde durch Eisenmangel nur leicht erhöht, die Expression der Chitinase im Wildtyp jedoch sehr stark. In der FITOx Linie hingegen erschien die Chitinase B jedoch eisenunabhängig stark erhöht, was bestätigt, dass bei einer Überexpression von FIT verstärkt Ethylen gebildet wird.

Somit konnte angedeutet werden, dass nicht nur der Ethylensignalweg eine Auswirkung auf die Eisenaufnahme hat, sondern auch umgekehrt der Transkriptionsfaktor FIT an der Induktion der Ethylenbiosynthese beteiligt ist. So scheint eine sehr enge Regulation der Eisenaufnahmesignale in der Wurzel möglich. Des Weiteren könnte dies bedeuten, dass Ethylen ein systemisches Signal, also z.B. vom Spross, wo für die Photosynthese und weitere Prozesse viel Eisen benötigt wird, zur Wurzel, wo Eisen aktiv aufgenommen werden muss, zur Übermittlung von Eisenmangelantworten ist, wie bereits postuliert (z.B. Grusak und Pezeshgi (1996)). Die Aufklärung seiner Funktion in der Regulation von Faktoren der Eisentranslokation innerhalb der Pflanze könnte zu einem tiefergehenden Verständnis führen und langfristig zur gezielten Eisenaufnahme und Translokation in Zielorgane wie Samen eingesetzt werden, um die Verfügbarkeit von Eisen in pflanzlichen Lebensmitteln zu verbessern.

5.5 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Signalwege der Eisenaufnahme sowie des Pflanzenhormons nicht nur physiologisch, sondern auch molekular verknüpft sind und dass wahrscheinlich die Proteine EIN3/EIL1 für die Übertragung eines (systemischen) Ethylensignals auf den in der Wurzel lokalisierten Transkriptionsfaktor FIT zuständig sind. Wahrscheinlich spielt der Ethylensignalweg auch in der Eisentranslokation eine Rolle, was sich in der Expression der BHLH Transkriptionsfaktoren zeigt, die durch Veränderungen im Ethylensignalweg auch betroffen sind. Des Weiteren konnten mit Hilfe genetischer Untersuchungen Hinweise gesammelt werden, dass Ethylen für eine korrekte Eisenhomöostase benötigt wird und dass unter Eisenmangel eine FIT-abhängige Ethyleninduktion stattfindet, für genauere Beweise müssten jedoch Eisenmessungen in den betreffenden Mutanten durchgeführt werden.

Die Interaktion von FIT mit EIN3 und EIL1 wirkt sich positiv auf die Induktion der Gene IRT1 und FRO2 aus, ähnliches wurde bereits für eine Interaktion von FIT mit den eisenabhängigen BHLH Transkriptionsfaktoren BHLH038/BHLH039 gezeigt (Yuan u. a., 2008). Außerdem wird die Expression von FIT durch die Interaktion von EIN3/EIL1 mit FIT selbst stimuliert, so dass es zu einer Rückkopplung kommt. Da gezeigt werden konnte, dass die Faktoren ETR1 und EIN2, die für eine Signalweiterleitung des Ethylensignals wesentlich sind, einen Einfluss auf die Eisenaufnahmeantwort haben, ist sehr wahrscheinlich, dass Ethylen ein (systemisches) Signal darstellt, was für die Induktion einer Eisenmangelantwort notwendig ist. Des Weiteren ist bekannt, dass die Ethylensynthese durch Eisenmangel

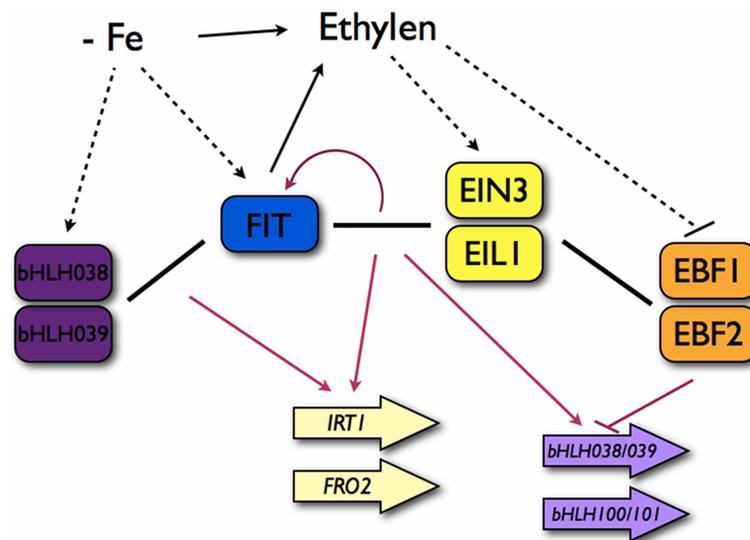


Abbildung 5.1: Zusammenfassung der bereits bekannten und hier erhaltenen Ergebnisse des Zusammenspiels der Signalwege der Eisenhomöostase und des Pflanzenhormons Ethylen.

stimuliert wird, dies konnte bestätigt werden. Zudem konnte angedeutet werden, dass diese Stimulation von FIT positiv beeinflusst wird (Zusammenfassung im Modell s. Abb. 5.1).

Eine starke Expression des F-Box Proteins EBF1 verhindert die Expression der eisenabhängigen BHLH Transkriptionsfaktoren BHLH038/039 und BHLH100/101, welche wahrscheinlich für eine korrekte Transduktion des Eisens innerhalb der Pflanze verantwortlich sind, was auf eine weitere mögliche Ebene der Beeinflussung des Eisenhaushalts durch den Ethylensignalweg hindeutet.

Somit ergibt sich ein sehr enges Zusammenspiel der verschiedenen Komponenten der Eisenhomöostase sowie des Ethylensignalwegs zur Feinregulation der Eisenaufnahme in der Wurzel.

5.6 Perspektiven

In dieser Arbeit wurde eine molekulare Verknüpfung zwischen der Aufnahme von Eisen und dem Pflanzenhormon Ethylen aufgedeckt. Zukünftige Arbeiten auf diesem Gebiet könnten helfen, mehr Einblicke in die genauen regulatorischen Vorgänge zu gewinnen. Diese neuen Erkenntnisse könnten dann dazu genutzt werden, Pflanzen durch genetische Optimierung in der Eisenaufnahme zu verstärken und so eventuell verbesserte Lebensmittel bezüglich des Eisengehaltes zu erhalten, hierzu könnten z.B. Pflanzen gezüchtet werden, die lokal veränderte

Ethylensignalantworten zeigen, die dann als Folge eine verstärkte Eisenaufnahme haben könnten.

In naher Zukunft sollten vor allem die Verknüpfung zwischen dem F-Box Protein EBF1 und den Eisen-regulierten BHLH Transkriptionsfaktoren BHLH038, 039, 100 und 101 genauer untersucht werden um auf der Ebene dieser Transkriptionsfaktoren regulatorische Mechanismen kennenzulernen sowie um deren Funktion in der Eisenhomöostase genauer verstehen zu können. Hierzu könnten aufgrund des offensichtlichen direkten Einflusses von EBF1 auf die Transkription der BHLHs Promoterbindestudien an die BHLH Promotoren durchgeführt werden. Ein Vergleich der genomweiten Expression zwischen der EBF1 Überexpressionslinie und einer BHLH Mehrfach Knockout Mutante könnte weitere Einblicke geben, da die Genexpression der BHLH Gene in der EBF1 Überexpressionslinie der in der BHLH Mehrfach Knockout Mutante weitestgehend entsprach. So könnte z.B. deutlich werden, welche Mechanismen durch das Fehlen der BHLH Expression beeinträchtigt sind, und ob diese Beeinträchtigungen in beiden Pflanzenlinien übereinstimmt.

Des Weiteren wird es wichtig werden, die verschiedenen Ebenen des Zusammenspiels zwischen Eisensignalweg und Ethylen zu lokalisieren und stärker im physiologischen Kontext zu betrachten, vor allem in der Untersuchung der verschiedenen Pflanzenorgane in Ethylenmutanten bzw. unter Ethyleneinfluss liegen hier neue Chancen. Insgesamt könnte so ein möglicher Einfluss von Ethylen nicht nur auf die Eisenaufnahme, sondern auch auf die Eisentranslokation zwischen verschiedenen Organen genauer beschrieben werden und Ethylen als systemisches Signal der Eisenhomöostase bestätigt werden, welches von Eisen-„sink“ Geweben abgegeben wird, um in der Wurzel die Eisenaufnahme zu stimulieren.

Um den Einfluss des EIN3/EIL1 Proteins auf die Expression von IRT1 und FRO2 genauer zu beschreiben, wäre es hilfreich, Promoterbindestudien mit FIT an den Promotoren von IRT1 und FRO2 durchzuführen, z.B. mittels CHIP Analyse. Im Falle der direkten Bindung könnte dieses Experiment nach Ausschalten der EIN3/EIL1 Gene bzw. der EBF1/2 Gene wiederholt werden und so ein Vergleich in der Bindungsstärke stattfinden (CHIP on a CHIP).

Interessant ist auch eine Untersuchung der Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Faktoren, die für eine Regulation der Eisenaufnahme bekannt sind, wie NO, Auxin oder den Cytokinin, da sie möglicherweise mit dem Pflanzenhormon Ethylen in einer „Crosstalk“ Situation stehen könnten, um die Eisenaufnahme sehr genau zu konzertieren.

Zusammengefasst birgt die Entdeckung der Protein-Protein Interaktion zwischen dem Eisentranskriptionsfaktor FIT und den Ethylentranskriptionsfaktoren

EIN3/EIL1 und der damit verbundenen Verknüpfung der beiden Signalwege großes Potential zur Verbesserung der Eisenaufnahme, indem die hier gewonnenen Kenntnisse genutzt und durch weitere Studien ergänzt werden und so die Grundlage geschaffen wird, Ethylen als Verstärker der Eisenaufnahme zu nutzen.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich zu allererst sehr herzlich bei Frau Prof. Dr. Petra Bauer bedanken, die mir über die Jahre meiner Diplomarbeit und meiner Promotion die Freiheiten gegeben hat, meine Arbeit nach meinen Wünschen zu organisieren und durchzuführen. Ihre hilfreiche Unterstützung war mir dabei stets gewiss. Im Besonderen danke ich ihr für die Übernahme des Referats.

Herrn Prof. Uli Müller danke ich besonders für die Übernahme des Ko-Referats.

Ein besonderer Dank geht auch an Dr. Thomas Potuschak des Institut de Biologie Moléculaire des Plantes der Université de Strasbourg für seine großzügige Überlassung wichtiger Materialien sowie seine stete Bereitschaft zur fachlichen Diskussion.

Mit großer Freude bedanke ich mich bei Dr. Tzvetina Brumbarova, die mir bereits während meines Studiums grundlegende Einblicke in die Vielfalt der molekularbiologischen Möglichkeiten gegeben hat sowie mir die Arbeit mit Hefe gezeigt hat, auf der am Ende diese gesamte Arbeit basiert. Danke Tzveti, für alles!!

Auch bei Dr. Rumen Ivanov möchte ich mich bedanken für die immer sehr interessanten und umfassenden Diskussionen und seine Hilfe bei der Beschaffung der pBiFP Vektoren.

Von besonderer Wichtigkeit für mich war während der gesamten Zeit der Promotion meine Zusammenarbeit mit Siva Lingam, mit dem ich zu jeder (Uhr-) Zeit höchst interessante Gespräche und Diskussionen führen konnte und mit dem mich durch unsere gemeinsame Arbeit eine tiefe Freundschaft verbindet.

Bei meiner Arbeitsgruppe, vor allem bei meinen Kollegen Mara Schuler, Johannes Meiser und Felix Maurer, habe ich immer, wenn ich es dringend brauchte, ein offenes Ohr und Zuspruch gefunden. Dies hat mir, nicht nur in Zeiten des Zweifels und der Not, sehr geholfen. Dafür danke ich Euch von ganzem Herzen.

Mein Dank gilt auch meinen Kollegen Cham Ti Tuyet Le, Hans-Jörg Mai sowie den Diplomanden Anna Jantke, Sara Hofmann und Marco Lehmann.

Ohne unsere technische Assistentin Angelika Anna und unserer Sekretärin Monika Schäfer wäre organisatorische Belange während meiner Arbeitszeit völlig

untergegangen. Für ihre Unterstützung bin ich ihnen daher zu großem Dank verpflichtet.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Sabine Müller und Eva Weber für unsere schönen Zeiten der Zusammenarbeit während ihren Diplomarbeiten.

Zu Allerletzt bedanke ich mich bei meinem lieben Ehemann Thomas Mohrbacher für seine Unterstützung in den letzten beiden Jahren, vor allem für seine uneingeschränkte Hilfe während meiner Krankheit und nun auch seiner entlastenden Unterstützung in der Zeit des Wartens auf unseren Sohn Henrik.

Literaturverzeichnis

- [Abeles u. a. 1992] ABELES, FB ; MORGAN, PW ; SALTVEIT, ME J.: *Ethylene in plant biology*. New York: Academic Press., 1992
- [Achard u. a. 2007] ACHARD, Patrick ; BAGHOUR, Mourad ; CHAPPLE, Andrew ; HEDDEN, Peter ; STRAETEN, Dominique Van D. ; GENSHIK, Pascal ; MORITZ, Thomas ; HARBERD, Nicholas P.: The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007), S. 6484–6489
- [Alonso u. a. 1999a] ALONSO, J. M. ; HIRAYAMA, T. ; ROMAN, G. ; NOURIZADEH, S. ; ECKER, J. R.: EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. In: *Science* 284 (1999), S. 2148–2152
- [Alonso u. a. 1999b] ALONSO, J. M. ; HIRAYAMA, T. ; ROMAN, G. ; NOURIZADEH, S. ; ECKER, J. R.: EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. In: *Science* 284 (1999), S. 2148–2152
- [Alonso u. a. 2003] ALONSO, Jose M. ; STEPANOVA, Anna N. ; SOLANO, Roberto ; WISMAN, Ellen ; FERRARI, Simone ; AUSUBEL, Frederick M. ; ECKER, Joseph R.: Five components of the ethylene-response pathway identified in a screen for weak ethylene-insensitive mutants in Arabidopsis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003), S. 2992–2997
- [An u. a. 2010] AN, Fengying ; ZHAO, Qiong ; JI, Yusi ; LI, Wenyang ; JIANG, Zhiqiang ; YU, Xiangchun ; ZHANG, Chen ; HAN, Ying ; HE, Wenrong ; LIU, Yidong ; ZHANG, Shuqun ; ECKER, Joseph R. ; GUO, Hongwei: Ethylene-Induced Stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 Is Mediated by Proteasomal Degradation of EIN3 Binding F-Box 1 and 2 That Requires EIN2 in Arabidopsis. In: *Plant Cell* (2010)
- [Arnaud u. a. 2006] ARNAUD, Nicolas ; MURGIA, Irene ; BOUCHEREZ, Jossia ; BRIAT, Jean-François ; CELLIER, Françoise ; GAYMARD, Frédéric: An iron-induced nitric oxide burst precedes ubiquitin-dependent protein degradation for Arabidopsis AtFer1 ferritin gene expression. In: *J Biol Chem* 281 (2006), S. 23579–23588

- [Bagg und Neilands 1987] BAGG, A. ; NEILANDS, J. B.: Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. In: *Microbiol Rev* 51 (1987), S. 509–518
- [Bailey u. a. 2003] BAILEY, Paul C. ; MARTIN, Cathie ; TOLEDO-ORTIZ, Gabriela ; QUAIL, Peter H. ; HUQ, Enamul ; HEIM, Marc A. ; JAKOBY, Marc ; WERBER, Martin ; WEISSHAAR, Bernd: Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant Cell* 15 (2003), S. 2497–2502
- [Bailey-Serres 1999] BAILEY-SERRES, J.: Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants. In: *Trends Plant Sci* 4 (1999), S. 142–148
- [Bari und Jones 2009] BARI, Rajendra ; JONES, Jonathan D G.: Role of plant hormones in plant defence responses. In: *Plant Mol Biol* 69 (2009), Mar, Nr. 4, S. 473–488. – URL <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-008-9435-0>
- [Bates und Lynch 1996] BATES, TR ; LYNCH, JP: Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. In: *Plant Cell Environ* 19 (1996), S. 529–538
- [Bauer u. a. 2004a] BAUER, P. ; THIEL, T. ; KLATTE, M. ; BERECZKY, Z. ; BRUMBAROVA, T. ; HELL, R. ; GROSSE, I.: Analysis of Sequence, Map Position, and Gene Expression Reveals Conserved Essential Genes for Iron Uptake in *Arabidopsis* and Tomato. In: *Plant Physiol* 136 (2004), S. 4169–4183
- [Bauer u. a. 2004b] BAUER, P ; Z, Berezky ; T, Brumbarova ; M, Klatte ; HY, Wang: Molecular regulation of iron uptake in the dicot species *Lycopersicon esculentum* and *Arabidopsis thaliana*. In: *Soil Sci Plant Nutr* 50 (2004), S. 997–1001
- [Bauer u. a. 2007] BAUER, Petra ; LING, Hong-Qing ; GUERINOT, Mary L.: FIT, the FER-LIKE IRON DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR in *Arabidopsis*. In: *Plant Physiol Biochem* 45 (2007), S. 260–261
- [Baur und Yang 1969a] BAUR, A. ; YANG, S. F.: Ethylene production from propanal. In: *Plant Physiol* 44 (1969), Feb, Nr. 2, S. 189–192
- [Baur und Yang 1969b] BAUR, A. H. ; YANG, S. F.: Precursors of ethylene. In: *Plant Physiol* 44 (1969), Sep, Nr. 9, S. 1347–1349
- [Beinert u. a. 1996] BEINERT, Helmut ; KENNEDY, Mary C. ; STOUT, C. D.: Aconitase as Iron-Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein. In: *Chem Rev* 96 (1996), S. 2335–2374
- [Benfey und Weigel 2001] BENFEY, P. N. ; WEIGEL, D.: Transcriptional networks controlling plant development. In: *Plant Physiol* 125 (2001), S. 109–111
- [Berezky u. a. 2003] BERECZKY, Z. ; WANG, H-Y. ; SCHUBERT, V. ; GANAL, M. ; BAUER, P.: Differential regulation of *nramp* and *irt* metal transporter genes in

- wild type and iron uptake mutants of tomato. In: *J. Biol. Chem.* 278 (2003), S. 24697–704. – reprint
- [Bethke u. a. 2009] BETHKE, Gerit ; UNTHAN, Tino ; UHRIG, Joachim F. ; PÖSCHL, Yvonne ; GUST, Andrea A. ; SCHEEL, Dierk ; LEE, Justin: Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009), S. 8067–8072
- [Bienfait 1985] BIENFAIT, H. F.: Regulated redox processes at the plasmalemma of plant root cells and their function in iron uptake. In: *J Bioenerg Biomembr* 17 (1985), S. 73–83
- [Binder u. a. 2007] BINDER, B.M. ; WALKER, J.M. ; GAGNE, J.M. ; EMBORG, T.J. ; HEMMANN, G. ; BLEECKER, A.B. ; VIERSTRA, R.D.: The *Arabidopsis* EIN3 Binding F-Box Proteins EBF1 and EBF2 Have Distinct but Overlapping Roles in Ethylene Signaling. In: *Plant Cell* 19 (2007), S. 509–523
- [Bisson u. a. 2009] BISSON, Melanie M A. ; BLECKMANN, Andrea ; ALLEKOTTE, Silke ; GROTH, Georg: EIN2, the central regulator of ethylene signalling, is localized at the ER membrane where it interacts with the ethylene receptor ETR1. In: *Biochem J* 424 (2009), S. 1–6
- [Bleecker u. a. 1998] BLEECKER, A. B. ; ESCH, J. J. ; HALL, A. E. ; RODRÍGUEZ, F. I. ; BINDER, B. M.: The ethylene-receptor family from *Arabidopsis*: structure and function. In: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353 (1998), S. 1405–1412
- [Bleecker u. a. 1988] BLEECKER, A. B. ; ESTELLE, M. A. ; SOMERVILLE, C. ; KENDE, H.: Insensitivity to Ethylene Conferred by a Dominant Mutation in *Arabidopsis thaliana*. In: *Science* 241 (1988), S. 1086–1089
- [Blume und Grierson 1997] BLUME, B. ; GRIERSON, D.: Expression of ACC oxidase promoter-GUS fusions in tomato and *Nicotiana plumbaginifolia* regulated by developmental and environmental stimuli. In: *Plant J* 12 (1997), S. 731–746
- [Boyd u. a. 1990] BOYD, J. ; OZA, M. N. ; MURPHY, J. R.: Molecular cloning and DNA sequence analysis of a diphtheria toxin iron-dependent regulatory element (dtxR) from *Corynebacterium diphtheriae*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990), S. 5968–5972
- [Brenner u. a. 2005] BRENNER, Wolfram G. ; ROMANOV, Georgy A. ; KÖLLMER, Ireen ; BÜRKLE, Lukas ; SCHMÜLLING, Thomas: Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. In: *Plant J* 44 (2005), S. 314–333

- [Briat u. a. 2010] BRIAT, Jean-Francois ; RAVET, Karl ; ARNAUD, Nicolas ; DUC, Céline ; BOUCHEREZ, Jossia ; TOURAINE, Brigitte ; CELLIER, Françoise ; GAYMARD, Frédéric: New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. In: *Ann Bot* 105 (2010), S. 811–822
- [Briat u. a. 1995] BRIAT, JF ; I, Fobis-Loisy ; N, Grignon ; S, Lobréaux ; N, Pascal ; G, Savino ; S, Thoiron ; OV, Von Wieren Nand W.: Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. In: *Biol Cell* 84 (1995), S. 69–81
- [Brown und Ambler 1974] BROWN, JC ; AMBLER, JE: Iron-stress response in tomato (*Lycopersicon esculentum*). 1. Sites of Fe reduction, absorption and transport. In: *Physiol Plant* 31 (1974), S. 221–224
- [Brown u. a. 1971] BROWN, J.C. ; CHANEY, R. L. ; AMBER, J.E.: A new tomato mutant inefficient in the transport of iron. In: *Physiol. Plant.* 25 (1971), S. 45–53
- [Brumbarova und Bauer 2005] BRUMBAROVA, Tzvetina ; BAUER, Petra: Iron-mediated control of the basic helix-loop-helix protein FER, a regulator of iron uptake in tomato. In: *Plant Physiol* 137 (2005), Mar, Nr. 3, S. 1018–1026. – URL <http://dx.doi.org/10.1104/pp.104.054270>
- [Brüggemann u. a. 1993] BRÜGGEMANN, W ; K, Maas-Kantel ; PR, Moog: Iron uptake by leaf mesophyll cells: The role of the plasma membrane-bound ferric-chelate reductase. In: *Planta* 190 (1993), S. 151–155
- [Buckhout u. a. 1989] BUCKHOUT, T.J. ; BELL, P. F. ; LUSTER, D. G. ; CHANEY, R. L.: Iron-Stress Induced Redox Activity in Tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) Is Localized on the Plasma Membrane. In: *Plant Physiol* 90 (1989), S. 151–156
- [Buckhout u. a. 2009] BUCKHOUT, T.J. ; YANG, TJW ; SCHMIDT, W.: Early iron-deficiency-induced transcriptional changes in Arabidopsis roots as revealed by microarray analyses. In: *BMC Genomics* 10 (2009), S. 147
- [Byrne u. a. 2002] BYRNE, Mary E. ; SIMOROWSKI, Joseph ; MARTIENSSEN, Robert A.: ASYMMETRIC LEAVES1 reveals knox gene redundancy in Arabidopsis. In: *Development* 129 (2002), S. 1957–1965
- [Callis und Vierstra 2000] CALLIS, J. ; VIERSTRA, R. D.: Protein degradation in signaling. In: *Curr Opin Plant Biol* 3 (2000), S. 381–386
- [Calvo u. a. 2004] CALVO, Angel P. ; NICOLÁS, Carlos ; NICOLÁS, Gregorio ; RODRÍGUEZ, Dolores: Evidence of a cross-talk regulation of a GA 20-oxidase (FsGA20ox1) by gibberellins and ethylene during the breaking of dormancy in *Fagus sylvatica* seeds. In: *Physiol Plant* 120 (2004), S. 623–630

- [Cao u. a. 2009] CAO, Shuqing ; CHEN, Zhengyi ; LIU, Guoqing ; JIANG, Li ; YUAN, Huaibo ; REN, Guang ; BIAN, Xiaohui ; JIAN, Hongyong ; MA, Xinliang: The Arabidopsis Ethylene-Insensitive 2 gene is required for lead resistance. In: *Plant Physiol Biochem* 47 (2009), S. 308–312
- [Cao u. a. 2007] CAO, Wan-Hong ; LIU, Jun ; HE, Xin-Jian ; MU, Rui-Ling ; ZHOU, Hua-Lin ; CHEN, Shou-Yi ; ZHANG, Jin-Song: Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses. In: *Plant Physiol* 143 (2007), S. 707–719
- [Casas u. a. 1997] CASAS, C. ; ALDEA, M. ; ESPINET, C. ; GALLEGO, C. ; GIL, R. ; HERRERO, E.: The AFT1 transcriptional factor is differentially required for expression of high-affinity iron uptake genes in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Yeast* 13 (1997), S. 621–637
- [Castillon u. a. 2007] CASTILLON, Alicia ; SHEN, Hui ; HUQ, Enamul: Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. In: *Trends Plant Sci* 12 (2007), Nov, Nr. 11, S. 514–521. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2007.10.001>
- [Chae u. a. 2003] CHAE, Hyun S. ; FAURE, Francois ; KIEBER, Joseph J.: The *eto1*, *eto2*, and *eto3* mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* by increasing the stability of ACS protein. In: *Plant Cell* 15 (2003), S. 545–559
- [Chaney u. a. 1972] CHANEY, R. L. ; BROWN, J. C. ; TIFFIN, L. O.: Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. In: *Plant Physiol* 50 (1972), S. 208–213
- [Chang u. a. 1993] CHANG, C. ; KWOK, S. F. ; BLEECKER, A. B. ; MEYEROWITZ, E. M.: Arabidopsis ethylene-response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators. In: *Science* 262 (1993), S. 539–544
- [Chao u. a. 1997] CHAO, Q. ; ROTHENBERG, M. ; SOLANO, R. ; ROMAN, G. ; TERZAGHI, W. ; ECKER, J.R.: Activation of the Ethylene Gas Response Pathway in *Arabidopsis* by the Nuclear Protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and Related Proteins. In: *Cell* 89 (1997), S. 1133–1144
- [Cholodny 1931] CHOLODNY, N.: Zur Physiologie des pflanzlichen Wuchshormons. In: *Planta* 14 (1931), S. 207–216
- [Clark u. a. 1998] CLARK, K. L. ; LARSEN, P. B. ; WANG, X. ; CHANG, C.: Association of the Arabidopsis *CTR1* Raf-like kinase with the *ETR1* and *ERS* ethylene receptors. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), S. 5401–5406
- [Clemens u. a. 2002] CLEMENS, Stephan ; PALMGREN, Michael G. ; KRÄMER, Ute: A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. In: *Trends Plant Science* 7 (2002), S. 309–15

- [Cockman u. a. 2000] COCKMAN, M. E. ; MASSON, N. ; MOLE, D. R. ; JAAKKOLA, P. ; CHANG, G. W. ; CLIFFORD, S. C. ; MAHER, E. R. ; PUGH, C. W. ; RATCLIFFE, P. J. ; MAXWELL, P. H.: Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. In: *J Biol Chem* 275 (2000), S. 25733–25741
- [Colangelo und Guerinot 2004] COLANGELO, Elizabeth P. ; GUERINOT, Mary L.: The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. In: *Plant Cell* 16 (2004), S. 3400–12
- [Colangelo und Guerinot 2006] COLANGELO, Elizabeth P. ; GUERINOT, Mary L.: Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. In: *Curr Opin Plant Biol* Volume 9, Issue 3 (2006), S. 322–330
- [Connolly u. a. 2003] CONNOLLY, E.L. ; CAMPBELL, N.H. ; GROTZ, N. ; PRICHARD, C.L. ; GUERINOT, M.L.: Overexpression of the FRO2 ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control. In: *Plant Physiol.* 133 (2003), S. 1102–1110
- [Connolly u. a. 2002] CONNOLLY, E.L. ; FETT, J.P. ; GUERINOT, M.L.: Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. In: *Plant Cell* 14 (2002), S. 1347–57
- [Corda und Girolamo 2003] CORDA, Daniela ; GIROLAMO, Maria D.: Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. In: *EMBO J* 22 (2003), May, Nr. 9, S. 1953–1958. – URL <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdg209>
- [Crosa 1997] CROSA, J.H.: Signal Transduction and Transcriptional and Posttranscriptional Control of Iron-Regulated Genes in Bacteria. In: *Microbiol and Mol Biol Rev* 61(3) (1997), S. 319–336
- [Curie u. a. 2000] CURIE, C. ; ALONSO, J. M. ; JEAN, M. L. ; ECKER, J. R. ; BRIAT, J. F.: Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. In: *Biochem. J.* 347 Pt 3 (2000), S. 749–55
- [Curie u. a. 2001] CURIE, C. ; PANAVIENE, Z. ; LOULERGUE, C. ; DELLAPORTA, S.L. ; BRIAT, J.F. ; WALKER, E.L.: Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. In: *Nature* 409 (2001), S. 346–9
- [Curie u. a. 2009] CURIE, Catherine ; CASSIN, Gaëlle ; COUCH, Daniel ; DIVOL, Fanchon ; HIGUCHI, Kyoko ; JEAN, Marie L. ; MISSON, Julie ; SCHIKORA, Adam ; CZERNIC, Pierre ; MARI, Stéphane: Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. In: *Ann Bot (Lond)* 103 (2009), S. 1–11
- [Delhaize 1996] DELHAIZE, E.: A metal-accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant Physiol* 111 (1996), S. 849–855

- [Delledonne 2005] DELLEDONNE, Massimo: NO news is good news for plants. In: *Curr Opin Plant Biol* 8 (2005), S. 390–396
- [Deshaies 1999] DESHAIES, RJ: SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. In: *Annu Rev Cell Dev Biol* 15 (1999), S. 435–467
- [Desikan u. a. 2004] DESIKAN, Radhika ; CHEUNG, Man-Kim ; BRIGHT, Jo ; HENSON, Dan ; HANCOCK, John T. ; NEILL, Steven J.: ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. In: *J Exp Bot* 55 (2004), S. 205–212
- [Downes und Vierstra 2005] DOWNES, B. ; VIERSTRA, R. D.: Post-translational regulation in plants employing a diverse set of polypeptide tags. In: *Biochem Soc Trans* 33 (2005), S. 393–399
- [Durrett u. a. 2007] DURRETT, Timothy P. ; GASSMANN, Walter ; ROGERS, Elizabeth E.: The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. In: *Plant Physiol* 144 (2007), S. 197–205
- [Eide u. a. 1996] EIDE, D. ; BRODERIUS, M. ; FETT, J. ; GUERINOT, M. L.: A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996), S. 5624–8
- [Eide 1998] EIDE, D. J.: The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Annu Rev Nutr* 18 (1998), S. 441–469
- [Eng u. a. 1998] ENG, B. H. ; GUERINOT, M. L. ; EIDE, D. ; SAIER, M. H.: Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins. In: *J Membr Biol* 166 (1998), S. 1–7
- [der Ent u. a. 2008] ENT, Sjoerd V. der ; VERHAGEN, Bas W M. ; DOORN, Ronald V. ; BAKKER, Daniel ; VERLAAN, Maarten G. ; PEL, Michiel J C. ; JOOSTEN, Ruth G. ; PROVENIERS, Marcel C G. ; LOON, L. C. V. ; TON, Jurriaan ; PIETERSE, Corné M J.: MYB72 is required in early signaling steps of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. In: *Plant Physiol* 146 (2008), S. 1293–1304
- [Farazi u. a. 2001] FARAZI, T. A. ; WAKSMAN, G. ; GORDON, J. I.: The biology and enzymology of protein N-myristoylation. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Oct, Nr. 43, S. 39501–39504. – URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R100042200>
- [Fenton 1894] FENTON, H.: Oxidation of tartaric acid in presence of iron. In: *Journal of the Chemical Society, Transactions* 65 (1894), S. 899–910
- [Fleischer 2007] FLEISCHER, J.: *Proteininteraktionsstudien von FIT, einem essentiellen Transkriptionsfaktor für Eisenaufnahme und -Mobilisierung in*

- Arabidopsis thaliana*, Universität des Saarlandes, Diplomarbeit, 2007. – Diplomarbeit
- [Fox und Guerinot 1998] FOX, Tama C. ; GUERINOT, Mary L.: MOLECULAR BIOLOGY OF CATION TRANSPORT IN PLANTS. In: *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49 (1998), S. 669–696
- [Franco-Zorrilla u. a. 2002] FRANCO-ZORRILLA, José M. ; MARTIN, Ana C. ; SOLANO, Roberto ; RUBIO, Vicente ; LEYVA, Antonio ; PAZ-ARES, Javier: Mutations at CRE1 impair cytokinin-induced repression of phosphate starvation responses in Arabidopsis. In: *Plant J* 32 (2002), S. 353–360
- [Franco-Zorrilla u. a. 2005] FRANCO-ZORRILLA, José M. ; MARTÍN, Ana C. ; LEYVA, Antonio ; PAZ-ARES, Javier: Interaction between phosphate-starvation, sugar, and cytokinin signaling in Arabidopsis and the roles of cytokinin receptors CRE1/AHK4 and AHK3. In: *Plant Physiol* 138 (2005), S. 847–857
- [Frary u. a. 2000] FRARY, A. ; NESBITT, T. C. ; GRANDILLO, S. ; KNAAP, E. ; CONG, B. ; LIU, J. ; MELLER, J. ; ELBER, R. ; ALPERT, K. B. ; TANKSLEY, S. D.: fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. In: *Science* 289 (2000), S. 85–88
- [Gitan und Eide 2000] GITAN, R. S. ; EIDE, D. J.: Zinc-regulated ubiquitin conjugation signals endocytosis of the yeast ZRT1 zinc transporter. In: *Biochem J* 346 Pt 2 (2000), S. 329–336
- [Gitan u. a. 1998] GITAN, R. S. ; LUO, H. ; RODGERS, J. ; BRODERIUS, M. ; EIDE, D.: Zinc-induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. In: *J Biol Chem* 273 (1998), S. 28617–28624
- [Gray u. a. 2001] GRAY, W. M. ; KEPINSKI, S. ; ROUSE, D. ; LEYSER, O. ; ESTELLE, M.: Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. In: *Nature* 414 (2001), S. 271–276
- [Gray u. a. 1999] GRAY, WM ; POZO JC del ; L, Walker ; L, Hobbie ; E, Risseeuw ; T, Banks ; WL, Crosby ; M, Yang ; H, Ma ; M, Estelle: Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in Arabidopsis thaliana. In: *Genes Dev* 13 (1999), S. 1678–1691
- [Graziano u. a. 2002] GRAZIANO, Magdalena ; BELIGNI, María V. ; LAMATTINA, Lorenzo: Nitric oxide improves internal iron availability in plants. In: *Plant Physiol.* 130 (2002), S. 1852–9
- [Graziano und Lamattina 2005] GRAZIANO, Magdalena ; LAMATTINA, Lorenzo: Nitric oxide and iron in plants: an emerging and converging story. In: *Trends Plant Sci* 10 (2005), S. 4–8

- [Graziano und Lamattina 2007] GRAZIANO, Magdalena ; LAMATTINA, Lorenzo: Nitric oxide accumulation is required for molecular and physiological responses to iron deficiency in tomato roots. In: *Plant J* 52 (2007), S. 949–960
- [Green und Rogers 2004] GREEN, L.S. ; ROGERS, E.E.: FRD3 Controls Iron Localization in *Arabidopsis*. In: *Plant Physiol.* 136 (2004), S. 2523–2531
- [Grotewold u. a. 2000] GROTEWOLD, E ; MB, Sainz ; L, Tagliani ; JM, Hernandez ; B, Bowen ; VL, Chandler: Identification of the residues in the Myb domain of maize C1 that specify the interaction with the bHLH cofactor R. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000), S. 13579– 13584
- [Grusak und Pezeshgi 1996] GRUSAK, M.A. ; PEZESHGI, S.: Shoot-to-Root Signal Transmission Regulates Root Fe(III) Reductase Activity in the dgl Mutant of Pea. In: *Plant Physiol.* 110 (1996), S. 329–334
- [Grusak u. a. 1990] GRUSAK, Michael A. ; WELCH, Ross M. ; KOCHIAN, Leon V.: Does Iron Deficiency in *Pisum sativum* Enhance the Activity of the Root Plasmalemma Iron Transport Protein? In: *Plant Physiol* 94 (1990), S. 1353–1357
- [Guerinot 2000] GUERINOT, M. L.: The ZIP family of metal transporters. In: *Biochim Biophys Acta* 1465 (2000), S. 190–198
- [Guerinot und Yi 1994] GUERINOT, M. L. ; YI, Y.: Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available. In: *Plant Physiol.* 104 (1994), S. 815–820
- [Gunshin u. a. 1997] GUNSHIN, H. ; MACKENZIE, B. ; BERGER, U. V. ; GUNSHIN, Y. ; ROMERO, M. F. ; BORON, W. F. ; NUSSBERGER, S. ; GOLLAN, J. L. ; HEDIGER, M. A.: Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. In: *Nature* 388 (1997), S. 482–488
- [Guo u. a. 1995] GUO, B. ; BROWN, F. M. ; PHILLIPS, J. D. ; YU, Y. ; LEIBOLD, E. A.: Characterization and expression of iron regulatory protein 2 (IRP2). Presence of multiple IRP2 transcripts regulated by intracellular iron levels. In: *J Biol Chem* 270 (1995), S. 16529–16535
- [Guo und Ecker 2003] GUO, Hongwei ; ECKER, Joseph R.: Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. In: *Cell* 115 (2003), S. 667–677
- [Guo u. a. 2005] GUO, Hui-Shan ; XIE, Qi ; FEI, Ji-Feng ; CHUA, Nam-Hai: MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for arabidopsis lateral root development. In: *Plant Cell* 17 (2005), S. 1376–1386
- [Guzmán und Ecker 1990] GUZMÁN, P. ; ECKER, J. R.: Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. In: *Plant Cell* 2 (1990), S. 513–523

- [Hantke 1981] HANTKE, K.: Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. In: *Mol Gen Genet* 182 (1981), S. 288–292
- [Hantke 2001] HANTKE, K.: Iron and metal regulation in bacteria. In: *Curr Opin Microbiol* 4 (2001), S. 172–177
- [Harrison und Arosio 1996] HARRISON, P. M. ; AROSIO, P.: The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. In: *Biochim Biophys Acta* 1275 (1996), S. 161–203
- [Hatakeyama und Nakayama 2003] HATAKEYAMA, Shigetsugu ; NAKAYAMA, Keiichi I.: Ubiquitylation as a quality control system for intracellular proteins. In: *J Biochem* 134 (2003), S. 1–8
- [He u. a. 2004] HE, X-J. ; ZHANG, Z-G. ; YAN, D-Q. ; ZHANG, J-S. ; CHEN, S-Y.: A salt-responsive receptor-like kinase gene regulated by the ethylene signaling pathway encodes a plasma membrane serine/threonine kinase. In: *Theor Appl Genet* 109 (2004), S. 377–383
- [He u. a. 2005] HE, Xin-Jian ; MU, Rui-Ling ; CAO, Wan-Hong ; ZHANG, Zhi-Gang ; ZHANG, Jin-Song ; CHEN, Shou-Yi: AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. In: *Plant J* 44 (2005), S. 903–916
- [Heim u. a. 2003] HEIM, Marc A. ; JAKOBY, Marc ; WERBER, Martin ; MARTIN, Cathie ; WEISSHAAR, Bernd ; BAILEY, Paul C.: The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. In: *Mol. Biol. Evol.* 20 (2003), S. 735–747
- [Hell und Stephan 2003] HELL, R. ; STEPHAN, U.W.: Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. In: *Planta* 216 (2003), S. 541–551. – reprint
- [Henriques u. a. 2002] HENRIQUES, R. ; JASIK, J. ; KLEIN, M. ; MARTINOIA, E. ; FELLER, U. ; SCHELL, J. ; PAIS, M.S. ; KONCZ, C.: Knock-out of *Arabidopsis* metal transporter gene IRT1 results in iron deficiency accompanied by cell differentiation defects. In: *Plant Mol. Biol.* 50 (2002), S. 587–97
- [Hentze u. a. 2004] HENTZE, Matthias W. ; MUCKENTHALER, Martina U. ; ANDREWS, Nancy C.: Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. In: *Cell* 117 (2004), S. 285–297
- [Hentze und Kühn 1996] HENTZE, MW ; KÜHN, LC: Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA- based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), S. 8175–8182

- [Hobo u. a. 1999] HOBBO, T ; Y, Kowiyama ; T, Hattori: A bZIP factor, TRAB1, interacts with VP1 and mediates abscisic acid-induced transcription. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), S. 15348–15353
- [Holdsworth u. a. 1987a] HOLDSWORTH, M. J. ; BIRD, C. R. ; RAY, J. ; SCHUCH, W. ; GRIERSON, D.: Structure and expression of an ethylene-related mRNA from tomato. In: *Nucleic Acids Res* 15 (1987), S. 731–739
- [Holdsworth u. a. 1987b] HOLDSWORTH, M. J. ; SCHUCH, W. ; GRIERSON, D.: Nucleotide sequence of an ethylene-related gene from tomato. In: *Nucleic Acids Res* 15 (1987), S. 10600
- [Hua u. a. 1998] HUA, J. ; SAKAI, H. ; NOURIZADEH, S. ; CHEN, Q. G. ; BLEECKER, A. B. ; ECKER, J. R. ; MEYEROWITZ, E. M.: EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in Arabidopsis. In: *Plant Cell* 10 (1998), S. 1321–1332
- [Iliopoulos u. a. 1996] ILIOPOULOS, O. ; LEVY, A. P. ; JIANG, C. ; KAELIN, W. G. ; GOLDBERG, M. A.: Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), S. 10595–10599
- [Itai u. a. 2000] ITAI, R. ; SUZUKI, K. ; YAMAGUCHI, H. ; NAKANISHI, H. ; NISHIZAWA, N. K. ; YOSHIMURA, E. ; MORI, S.: Induced activity of adenine phosphoribosyltransferase (APRT) in iron-deficiency barley roots: a possible role for phytosiderophore production. In: *J Exp Bot* 51 (2000), S. 1179–1188
- [Ito u. a. 2008] ITO, Yasuhiro ; KITAGAWA, Mamiko ; IHASHI, Nao ; YABE, Kimiko ; KIMBARA, Junji ; YASUDA, Junichi ; ITO, Hirotaka ; INAKUMA, Takahiro ; HIROI, Seiji ; KASUMI, Takafumi: DNA-binding specificity, transcriptional activation potential, and the rin mutation effect for the tomato fruit-ripening regulator RIN. In: *Plant J* 55 (2008), S. 212–223
- [Iwakawa u. a. 2002] IWAKAWA, Hidekazu ; UENO, Yoshihisa ; SEMIARTI, Endang ; ONOUCHI, Hitoshi ; KOJIMA, Shoko ; TSUKAYA, Hirokazu ; HASEBE, Mitsuyasu ; SOMA, Teppei ; IKEZAKI, Masaya ; MACHIDA, Chiyoko ; MACHIDA, Yasunori: The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of Arabidopsis thaliana, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper. In: *Plant Cell Physiol* 43 (2002), S. 467–478
- [Jackson 1960] JACKSON, WT: Effect of indoleacetic acid on rate of elongation of root hairs of *Agrostis alba* L. In: *Physiol Plant* 13 (1960), S. 36–45
- [Jakoby u. a. 2004] JAKOBY, Marc ; WANG, Hong-Yu ; REIDT, Wim ; WEISSHAAR, Bernd ; BAUER, Petra: FRU (BHLH029) is required for induction of iron mobilization genes in Arabidopsis thaliana. In: *FEBS Lett* 577 (2004), S. 528–534

- [Jean u. a. 2005] JEAN, Marie L. ; SCHIKORA, Adam ; MARI, Stéphane ; BRIAT, Jean-François ; CURIE, Catherine: A loss-of-function mutation in AtYSL1 reveals its role in iron and nicotianamine seed loading. In: *Plant J.* 44 (2005), S. 769–782
- [Johnson und Ecker 1998] JOHNSON, P. R. ; ECKER, J. R.: The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. In: *Annu Rev Genet* 32 (1998), S. 227–254
- [Jolley u. a. 1986] JOLLEY, VD and Brown J. ; TD, Davies ; RH, Walser: Increased iron efficiency in soybeans (*Glycine max*) through plant breeding related to increased response to iron deficiency stress. I. Iron stress response. In: *J Plant Nutr* 9 (1986), S. 373–386
- [Jung u. a. 2009] JUNG, JY ; R, Shin ; SCHACHTMAN, DP.: Ethylene mediates response and tolerance to potassium deprivation in *Arabidopsis*. In: *Plant Cell* 21 (2009), S. 607–621
- [Kanazawa u. a. 1994] KANAZAWA, K ; K, Higuchi ; NK, Nishizawa ; S, Fushiya ; C, Mitsuo ; S, Mori: Nicotianamine aminotransferase activities are correlated to the phytosiderophore secretions under Fe-deficient conditions in Gramineae. In: *J Exp Bot* 45 (1994), S. 1903–1906
- [Kanazawa u. a. 1995] KANAZAWA, K ; K, Higuchi ; NK, Nishizawa ; S, Fushiya ; S, Mori: Detection of two distinct isozymes of nicotianamine aminotransferases in Fe-deficient barley roots. In: *J Exp Bot* 46 (1995), S. 1241–1244
- [Kang u. a. 2003] KANG, Dae-Kyung ; JEONG, Jinsook ; DRAKE, Steven K. ; WEHR, Nancy B. ; ROUAULT, Tracey A. ; LEVINE, Rodney L.: Iron regulatory protein 2 as iron sensor. Iron-dependent oxidative modification of cysteine. In: *J Biol Chem* 278 (2003), S. 14857–14864
- [Kazan 2003] KAZAN, Kemal: Alternative splicing and proteome diversity in plants: the tip of the iceberg has just emerged. In: *Trends Plant Sci* 8 (2003), S. 468–471
- [Kepinski und Leyser 2002] KEPINSKI, Stefan ; LEYSER, Ottoline: Ubiquitination and auxin signaling: a degrading story. In: *Plant Cell* 14 Suppl (2002), S. S81–S95
- [Kerkeb u. a. 2008] KERKEB, Loubna ; MUKHERJEE, Indrani ; CHATTERJEE, Iera ; LAHNER, Brett ; SALT, David E. ; CONNOLLY, Erin L.: Iron-induced turnover of the *Arabidopsis* IRON-REGULATED TRANSPORTER1 metal transporter requires lysine residues. In: *Plant Physiol* 146 (2008), S. 1964–1973
- [Kieber u. a. 1993] KIEBER, J. J. ; ROTHENBERG, M. ; ROMAN, G. ; FELDMANN, K. A. ; ECKER, J. R.: CTR1, a negative regulator of the ethylene response

- pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. In: *Cell* 72 (1993), S. 427–441
- [Kim u. a. 2009] KIM, Jin H. ; WOO, Hye R. ; KIM, Jeongsik ; LIM, Pyung O. ; LEE, In C. ; CHOI, Seung H. ; HWANG, Daehee ; NAM, Hong G.: Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in Arabidopsis. In: *Science* 323 (2009), S. 1053–1057
- [Kim u. a. 2006] KIM, Sun A. ; PUNSHON, Tracy ; LANZIROTTI, Antonio ; LI, Liangtao ; ALONSO, José M. ; ECKER, Joseph R. ; KAPLAN, Jerry ; GUERINOT, Mary L.: Localization of iron in Arabidopsis seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. In: *Science* 314 (2006), S. 1295–1298
- [Klatte u. a. 2009] KLATTE, Marco ; SCHULER, Mara ; WIRTZ, Markus ; FINK-STRAUBE, Claudia ; HELL, Rüdiger ; BAUER, Petra: The analysis of Arabidopsis nicotianamine synthase mutants reveals functions for nicotianamine in seed iron loading and iron deficiency responses. In: *Plant Physiol* 150 (2009), S. 257–271
- [Klausner u. a. 1993] KLAUSNER, R. D. ; ROUAULT, T. A. ; HARFORD, J. B.: Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. In: *Cell* 72 (1993), S. 19–28
- [Kobayashi u. a. 2003] KOBAYASHI, Takanori ; NAKAYAMA, Yuko ; ITAI, Reiko N. ; NAKANISHI, Hiromi ; YOSHIHARA, Toshihiro ; MORI, Satoshi ; NISHIZAWA, Naoko K.: Identification of novel cis-acting elements, IDE1 and IDE2, of the barley IDS2 gene promoter conferring iron-deficiency-inducible, root-specific expression in heterogeneous tobacco plants. In: *Plant J.* 36 (2003), S. 780–93
- [Konishi und Yanagisawa 2008a] KONISHI, Mineko ; YANAGISAWA, Shuichi: Ethylene signaling in Arabidopsis involves feedback regulation via the elaborate control of EBF2 expression by EIN3. In: *Plant J* 55 (2008), S. 821–831
- [Konishi und Yanagisawa 2008b] KONISHI, Mineko ; YANAGISAWA, Shuichi: Two different mechanisms control ethylene sensitivity in Arabidopsis via the regulation of EBF2 expression. In: *Plant Signal Behav* 3 (2008), S. 749–751
- [Kopriva u. a. 2001] KOPRIVA, S. ; BÜCHERT, T. ; FRITZ, G. ; SUTER, M. ; WEBER, M. ; BENDA, R. ; SCHALLER, J. ; FELLER, U. ; SCHÜRMAN, P. ; SCHÜNEMANN, V. ; TRAUTWEIN, A. X. ; KRONECK, P. M. ; BRUNOLD, C.: Plant adenosine 5'-phosphosulfate reductase is a novel iron-sulfur protein. In: *J Biol Chem* 276 (2001), S. 42881–42886
- [Kouzarides 2000] KOUZARIDES, T.: Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? In: *EMBO J* 19 (2000), Mar, Nr. 6, S. 1176–1179. – URL <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/19.6.1176>

- [Krueger u. a. 2002] KRUEGER, C ; O, Berkowitz ; UW, Stephan ; R, Hell: A Metal-binding Member of the Late Embryogenesis Abundant Protein Family Transports Iron in the Phloem of *Ricinus communis* L. In: *J Biol Chem* 277 (2002), S. 25062–25069
- [Lafuse u. a. 2000] LAFUSE, W. P. ; ALVAREZ, G. R. ; ZWILLING, B. S.: Regulation of Nramp1 mRNA stability by oxidants and protein kinase C in RAW264.7 macrophages expressing Nramp1(Gly169). In: *Biochem J* 351 Pt 3 (2000), S. 687–696
- [Lamattina u. a. 2003] LAMATTINA, Lorenzo ; GARCÍA-MATA, Carlos ; GRAZIANO, Magdalena ; PAGNUSSAT, Gabriela: Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. In: *Annu Rev Plant Biol* 54 (2003), S. 109–136
- [Landsberg 1984] LANDSBERG, E.C.: Regulation of iron-stress-response by whole plant activity. In: *J Plant Nutr* 7 (1984), S. 609–621
- [Landsberg 1996] LANDSBERG, EC.: Hormonal regulation of iron-stress response in sunflower roots: a morphological and cytological investigation. In: *Protoplasma* 194 (1996), S. 69–80
- [Lanquar u. a. 2005] LANQUAR, Viviane ; LELIÈVRE, Françoise ; BOLTE, Susanne ; HAMÈS, Cécile ; ALCON, Carine ; NEUMANN, Dieter ; VANSUYT, Gérard ; CURIE, Catherine ; SCHRÖDER, Astrid ; KRÄMER, Ute ; BARBIER-BRYGOO, Hélène ; THOMINE, Sebastien: Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. In: *EMBO J.* 24 (2005), S. 4041–4051
- [Lee u. a. 2006] LEE, Jae-Hoon ; DENG, Xing W. ; KIM, Woo T.: Possible role of light in the maintenance of EIN3/EIL1 stability in Arabidopsis seedlings. In: *Biochem Biophys Res Commun* 350 (2006), S. 484–491
- [Lemon und Tjian 2000] LEMON, B. ; TJIAN, R.: Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. In: *Genes Dev* 14 (2000), S. 2551–2569
- [Leon-Reyes u. a. 2009] LEON-REYES, Antonio ; SPOEL, Steven H. ; LANGE, Elvira S D. ; ABE, Hiroshi ; KOBAYASHI, Masatomo ; TSUDA, Shinya ; MILLENAAR, Frank F. ; WELSCHEN, Rob A M. ; RITSEMA, Tita ; PIETERSE, Corné M J.: Ethylene modulates the role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. In: *Plant Physiol* 149 (2009), S. 1797–1809
- [Li u. a. 2004] LI ; CHENG ; LING: Isolation and characterization of Fe(III)-chelate reductase gene LeFRO1 in tomato. In: *Plant Mol Biol* 54 (2004), S. 125–136

- [Lidder u. a. 2005] LIDDER, Preetmoninder ; GUTIÉRREZ, Rodrigo A. ; SALOMÉ, Patrice A. ; MCCLUNG, C. R. ; GREEN, Pamela J.: Circadian control of messenger RNA stability. Association with a sequence-specific messenger RNA decay pathway. In: *Plant Physiol* 138 (2005), S. 2374–2385
- [Lin u. a. 2008] LIN, Zhefeng ; HONG, Yiguo ; YIN, Mingan ; LI, Chunyang ; ZHANG, Ke ; GRIERSON, Don: A tomato HD-Zip homeobox protein, LeHB-1, plays an important role in floral organogenesis and ripening. In: *Plant J* 55 (2008), S. 301–310
- [Lin u. a. 2009] LIN, Zhefeng ; ZHONG, Silin ; GRIERSON, Don: Recent advances in ethylene research. In: *J Exp Bot* 60 (2009), Nr. 12, S. 3311–3336. – URL <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erp204>
- [Lindermayr und Durner 2009] LINDERMAYR, Christian ; DURNER, Jörg: S-Nitrosylation in plants: pattern and function. In: *J Proteomics* 73 (2009), S. 1–9
- [Ling u. a. 1996] LING, H.-Q. ; PICH, A. ; SCHOLZ, G. ; GANAL, M.W.: Genetic analysis of two tomato mutants affected in the regulation of iron metabolism. In: *Mol Gen Genet* 252 (1996), S. 87–92
- [Ling u. a. 2002] LING, H.Q. ; BAUER, P. ; BERECZKY, Z. ; KELLER, B. ; GANAL, M.: The tomato fer gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002), S. 13938–43. – reprint
- [Ling u. a. 1999] LING, H.Q. ; KOCH, G. ; BAUMLEIN, H. ; GANAL, M.W.: Map-based cloning of chloronerva, a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthase. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999), S. 7098–7103
- [Litwin und Calderwood 1993] LITWIN, C. M. ; CALDERWOOD, S. B.: Role of iron in regulation of virulence genes. In: *Clin Microbiol Rev* 6 (1993), S. 137–149
- [Liu und Zhang 2004] LIU, Yidong ; ZHANG, Shuqun: Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in Arabidopsis. In: *Plant Cell* 16 (2004), Dec, Nr. 12, S. 3386–3399. – URL <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.104.026609>
- [Long u. a. 2010] LONG, Terri A. ; TSUKAGOSHI, Hironaka ; BUSCH, Wolfgang ; LAHNER, Brett ; SALT, David E. ; BENFEY, Philip N.: The bHLH Transcription Factor POPEYE Regulates Response to Iron Deficiency in Arabidopsis Roots. In: *Plant Cell* (2010)
- [Lucena u. a. 2006] LUCENA, Carlos ; WATERS, Brian M. ; ROMERA, F. J. ; GARCÍA, María J. ; MORALES, María ; ALCÁNTARA, Esteban ; PÉREZ-VICENTE,

- Rafael: Ethylene could influence ferric reductase, iron transporter, and H⁺-ATPase gene expression by affecting FER (or FER-like) gene activity. In: *J. Exp. Bot.* 57 (2006), S. 4145–4154
- [López-Millán u. a. 2000] LÓPEZ-MILLÁN, A. F. ; MORALES, F. ; ABADÍA, A. ; ABADÍA, J.: Effects of iron deficiency on the composition of the leaf apoplastic fluid and xylem sap in sugar beet. Implications for iron and carbon transport. In: *Plant Physiol* 124 (2000), S. 873–884
- [Ma u. a. 2003] MA, Zhong ; BASKIN, Tobias I. ; BROWN, Kathleen M. ; LYNCH, Jonathan P.: Regulation of root elongation under phosphorus stress involves changes in ethylene responsiveness. In: *Plant Physiol* 131 (2003), S. 1381–1390
- [Maas u. a. 1988] MAAS, F. M. ; WETERING, D. A. van de ; BEUSICHEM, M. L. van ; BIENFAIT, H. F.: Characterization of Phloem iron and its possible role in the regulation of Fe-efficiency reactions. In: *Plant Physiol* 87 (1988), S. 167–171
- [Mallory u. a. 2005] MALLORY, Allison C. ; BARTEL, David P. ; BARTEL, Bonnie: MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. In: *Plant Cell* 17 (2005), S. 1360–1375
- [Marschner 1995] MARSCHNER: *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press 2. Auflage, 1995
- [Marschner und Römheld 1994] MARSCHNER, Horst ; RÖMHELD, Volker: Strategies of plants for acquisition of iron. In: *Plant Soil* 165 (1994), S. 375–388
- [Maruyama-Nakashita u. a. 2004] MARUYAMA-NAKASHITA, Akiko ; NAKAMURA, Yumiko ; YAMAYA, Tomoyuki ; TAKAHASHI, Hideki: A novel regulatory pathway of sulfate uptake in Arabidopsis roots: implication of CRE1/WOL/AHK4-mediated cytokinin-dependent regulation. In: *Plant J* 38 (2004), S. 779–789
- [McKie u. a. 2000] MCKIE, A. T. ; MARCIANI, P. ; ROLFS, A. ; BRENNAN, K. ; WEHR, K. ; BARROW, D. ; MIRET, S. ; BOMFORD, A. ; PETERS, T. J. ; FARZANEH, F. ; HEDIGER, M. A. ; HENTZE, M. W. ; SIMPSON, R. J.: A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. In: *Mol Cell* 5 (2000), S. 299–309
- [Mersmann u. a. 2010] MERSMANN, Sophia ; BOURDAIS, Gildas ; RIETZ, Steffen ; ROBATZEK, Silke: Ethylene signalling regulates accumulation of the FLS2 receptor and is required for the oxidative burst contributing to plant immunity. In: *Plant Physiol* (2010)
- [Meyron-Holtz u. a. 2004a] MEYRON-HOLTZ, Esther G. ; GHOSH, Manik C. ; IWAI, Kazuhiro ; LAVAUTE, Timothy ; BRAZZOLOTTO, Xavier ; BERGER, Urs V. ; LAND, William ; OLLIVIERRE-WILSON, Hayden ; GRINBERG, Alex ; LOVE, Paul ;

- ROUAULT, Tracey A.: Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. In: *EMBO J* 23 (2004), S. 386–395
- [Meyron-Holtz u. a. 2004b] MEYRON-HOLTZ, Esther G. ; GHOSH, Manik C. ; ROUAULT, Tracey A.: Mammalian tissue oxygen levels modulate iron-regulatory protein activities in vivo. In: *Science* 306 (2004), S. 2087–2090
- [Miller und Olsen 1986] MILLER, RO ; OLSEN, RA: Changes in the roots of sunflower under iron stress. In: *J Plant Nutr* 9 (1986), S. 815–822
- [van de Mortel u. a. 2008] MORTEL, Judith E. van de ; SCHAT, Henk ; MOERLAND, Perry D. ; THEMAAT, Emiel Ver L. van ; ENT, Sjoerd van der ; BLANKESTIJN, Hetty ; GHANDILYAN, Artak ; TSIATSIANI, Styliani ; AARTS, Mark G M.: Expression differences for genes involved in lignin, glutathione and sulphate metabolism in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana* and the related Zn/Cd-hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. In: *Plant Cell Environ* 31 (2008), S. 301–324
- [Muckenthaler u. a. 2008] MUCKENTHALER, Martina U. ; GALY, Bruno ; HENTZE, Matthias W.: Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. In: *Annu Rev Nutr* 28 (2008), S. 197–213. – URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.nutr.28.061807.155521>
- [Murgia u. a. 2002] MURGIA, Irene ; DELLEDONNE, Massimo ; SOAVE, Carlo: Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. In: *Plant J* 30 (2002), S. 521–528
- [Mäser u. a. 2001] MÄSER, P. ; THOMINE, S. ; SCHROEDER, J. I. ; WARD, J. M. ; HIRSCHI, K. ; SZE, H. ; TALKE, I. N. ; AMTMANN, A. ; MAATHUIS, F. J. ; SANDERS, D. ; HARPER, J. F. ; TCHIEU, J. ; GRIBSKOV, M. ; PERSANS, M. W. ; SALT, D. E. ; KIM, S. A. ; GUERINOT, M. L.: Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. In: *Plant Physiol.* 126 (2001), S. 1646–67
- [Nakamura u. a. 2001] NAKAMURA, S. ; LYNCH, T. J. ; FINKELSTEIN, R. R.: Physical interactions between ABA response loci of *Arabidopsis*. In: *Plant J* 26 (2001), S. 627–635
- [Nakanishi u. a. 1993] NAKANISHI, H. ; OKUMURA, N. ; UMEHARA, Y. ; NISHIZAWA, N. K. ; CHINO, M. ; MORI, S.: Expression of a gene specific for iron deficiency (*Ids3*) in the roots of *Hordeum vulgare*. In: *Plant Cell Physiol* 34 (1993), S. 401–410
- [Nakanishi u. a. 2000] NAKANISHI, H. ; YAMAGUCHI, H. ; SASAKUMA, T. ; NISHIZAWA, N.K. ; MORI, S.: Two dioxygenase genes, *Ids3* and *Ids2*, from

- Hordeum vulgare are involved in the biosynthesis of mugineic acid family phytosiderophores. In: *Plant Mol. Biol.* 44 (2000), S. 199–207
- [Negi u. a. 2008] NEGI, Sangeeta ; IVANCHENKO, Maria G. ; MUDAY, Gloria K.: Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant J* 55 (2008), S. 175–187
- [Ogo u. a. 2006] OGO, Yuko ; ITAI, Reiko N. ; NAKANISHI, Hiromi ; INOUE, Haruhiko ; KOBAYASHI, Takanori ; SUZUKI, Motofumi ; TAKAHASHI, Michiko ; MORI, Satoshi ; NISHIZAWA, Naoko K.: Isolation and characterization of IRO2, a novel iron-regulated bHLH transcription factor in graminaceous plants. In: *J Exp Bot* 57 (2006), S. 2867–2878
- [Ohata u. a. 1993] OHATA, T. ; S, Mihashi ; NK, Nishizawa ; S, Fushiya ; S, Nozoe ; M, Chino ; S, Mori: Biosynthetic pathway of phytosiderophores in iron-deficient gramineous plants. In: *Soil Sci Plant Nutr* 39 (1993), S. 745–749
- [Okumura u. a. 1994] OKUMURA, N ; NK, Nishizawa ; Y, Umehara ; T, Ohata ; H, Nakanishi ; T, Yamaguchi ; M, Chino ; S, Mori: A dioxygenase gene (*Ids2*) expressed under iron deficiency conditions in the roots of *Hordeum vulgare*. In: *Plant Mol Biol* 25 (1994), S. 705–719
- [Olmedo u. a. 2006] OLMEDO, Gabriela ; GUO, Hongwei ; GREGORY, Brian D. ; NOURIZADEH, Saeid D. ; AGUILAR-HENONIN, Laura ; LI, Hongjiang ; AN, Fengying ; GUZMAN, Plinio ; ECKER, Joseph R.: ETHYLENE-INSENSITIVE5 encodes a 5'→3' exoribonuclease required for regulation of the EIN3-targeting F-box proteins EBF1/2. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006), S. 13286–13293
- [Pelletier u. a. 2002] PELLETIER, Benoit ; BEAUDOIN, Jude ; MUKAI, Yukio ; LABBÉ, Simon: Fep1, an iron sensor regulating iron transporter gene expression in *Schizosaccharomyces pombe*. In: *J Biol Chem* 277 (2002), S. 22950–22958
- [Pelletier u. a. 2003] PELLETIER, Benoit ; BEAUDOIN, Jude ; PHILPOTT, Caroline C. ; LABBÉ, Simon: Fep1 represses expression of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* siderophore-iron transport system. In: *Nucleic Acids Res* 31 (2003), S. 4332–4344
- [Peng u. a. 2005] PENG, Hsiao-Ping ; LIN, Ter-Yun ; WANG, Ning-Ning ; SHIH, Ming-Che: Differential expression of genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis* during hypoxia. In: *Plant Mol Biol* 58 (2005), S. 15–25
- [Peng u. a. 1999] PENG, J. ; RICHARDS, D. E. ; HARTLEY, N. M. ; MURPHY, G. P. ; DEVOS, K. M. ; FLINTHAM, J. E. ; BEALES, J. ; FISH, L. J. ; WORLAND, A. J. ; PELICA, F. ; SUDHAKAR, D. ; CHRISTOU, P. ; SNAPE, J. W. ; GALE, M. D. ;

- HARBERD, N. P.: 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. In: *Nature* 400 (1999), S. 256–261
- [Petit u. a. 2001] PETIT, J. M. ; WUYTSWINKEL, O. van ; BRIAT, J. F. ; LOBRÉAUX, S.: Characterization of an iron-dependent regulatory sequence involved in the transcriptional control of AtFer1 and ZmFer1 plant ferritin genes by iron. In: *J. Biol. Chem.* 276 (2001), S. 5584–90
- [Pich u. a. 2001] PICH, A. ; MANTEUFFEL, R. ; HILLMER, S. ; SCHOLZ, G. ; SCHMIDT, W.: Fe homeostasis in plant cells: does nicotianamine play multiple roles in the regulation of cytoplasmic Fe concentration? In: *Planta* 213 (2001), S. 967–976. – Journal Club: 24.04.2003
- [Pich und Scholz 1996] PICH, A. ; SCHOLZ, G.: Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem. In: *J. Exp. Bot.* 47 (1996), S. 41–47. – Journal Club: 24.04.2003 (Marco)
- [Potuschak u. a. 2003] POTUSCHAK, Thomas ; LECHNER, Esther ; PARMENTIER, Yves ; YANAGISAWA, Shuichi ; GRAVA, Sandrine ; KONCZ, Csaba ; GENSHIK, Pascal: EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2. In: *Cell* 115 (2003), S. 679–689
- [Potuschak u. a. 2006] POTUSCHAK, Thomas ; VANSIRI, Amérin ; BINDER, Brad M. ; LECHNER, Esther ; VIERSTRA, Richard D. ; GENSHIK, Pascal: The exoribonuclease XRN4 is a component of the ethylene response pathway in Arabidopsis. In: *Plant Cell* 18 (2006), S. 3047–3057
- [Puig u. a. 2005] PUIG, Sergi ; ASKELAND, Eric ; THIELE, Dennis J.: Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. In: *Cell* 120 (2005), S. 99–110
- [Qiao u. a. 2009] QIAO, Hong ; CHANG, Katherine N. ; YAZAKI, Junshi ; ECKER, Joseph R.: Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in Arabidopsis. In: *Genes Dev* 23 (2009), S. 512–521
- [Rakwal u. a. 2004] RAKWAL, Randeep ; YANG, Guangxiao ; KOMATSU, Setsuko: Chitinase induced by jasmonic acid, methyl jasmonate, ethylene and protein phosphatase inhibitors in rice. In: *Mol Biol Rep* 31 (2004), S. 113–119
- [Ratledge und Dover 2000] RATLEDGE, C. ; DOVER, L. G.: Iron metabolism in pathogenic bacteria. In: *Annu Rev Microbiol* 54 (2000), S. 881–941
- [Ravet u. a. 2009] RAVET, Karl ; TOURAINE, Brigitte ; BOUCHEREZ, Jossia ; BRIAT, Jean-François ; GAYMARD, Frédéric ; CELLIER, Françoise: Ferritins

- control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. In: *Plant J* 57 (2009), S. 400–412
- [Riechmann u. a. 2000] RIECHMANN, J. L. ; HEARD, J. ; MARTIN, G. ; REUBER, L. ; JIANG, C. ; KEDDIE, J. ; ADAM, L. ; PINEDA, O. ; RATCLIFFE, O. J. ; SAMAHA, R. R. ; CREELMAN, R. ; PILGRIM, M. ; BROUN, P. ; ZHANG, J. Z. ; GHANDEHARI, D. ; SHERMAN, B. K. ; YU, G.: Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. In: *Science* 290 (2000), S. 2105–2110
- [Roberts u. a. 2004] ROBERTS, Louis A. ; PIERSON, Abbey J. ; PANAVIENE, Zivile ; WALKER, Elsbeth L.: Yellow stripe1. Expanded roles for the maize iron-phytosiderophore transporter. In: *Plant Physiol.* 135 (2004), S. 112–20
- [Robinson u. a. 1999] ROBINSON, N.J. ; PROCTER, C.M. ; CONNOLLY, E.L. ; GUERINOT, M.L.: A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. In: *Nature* 397 (1999), S. 694–7
- [Rogers und Guerinot 2002] ROGERS, E.E. ; GUERINOT, M.L.: FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in *Arabidopsis*. In: *Plant Cell* 14 (2002), S. 1787–1799
- [Roman u. a. 1995] ROMAN, G. ; LUBARSKY, B. ; KIEBER, J. J. ; ROTHENBERG, M. ; ECKER, J. R.: Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. In: *Genetics* 139 (1995), S. 1393–1409
- [Romera u. a. 1999] ROMERA, F.J. ; A., Esteban ; DE LA GUARDIA, M.: Ethylene Production by Fe-deficient Roots and its Involvement in the Regulation of Fe-deficiency Stress Responses by Strategy I Plants. In: *Annals of Botany* 83 (1999), S. 51?55
- [Romera und Alcantara 1994] ROMERA, F.J. ; ALCANTARA, E.: Iron-Deficiency Stress Responses in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Roots (A Possible Role for Ethylene?). In: *Plant Physiol.* 105(4) (1994), S. 1133?1138
- [Rouault und Klausner 1997] ROUAULT, T. ; KLAUSNER, R.: Regulation of iron metabolism in eukaryotes. In: *Curr Top Cell Regul* 35 (1997), S. 1–19
- [Ruegger u. a. 1998] RUEGGER, M. ; DEWEY, E. ; GRAY, W. M. ; HOBBIIE, L. ; TURNER, J. ; ESTELLE, M.: The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast *grr1p*. In: *Genes Dev* 12 (1998), S. 198–207
- [Ríos u. a. 2002] RÍOS, Gabino ; LOSSOW, Andrea ; HERTEL, Britta ; BREUER, Frank ; SCHAEFER, Sabine ; BROICH, Melanie ; KLEINOW, Tatjana ; JÁSIK, Ján ; WINTER, Jochen ; FERRANDO, Alejandro ; FARRÁS, Rosa ; PANICOT, Mireia ; HENRIQUES, Rossana ; MARIAUX, Jean-Baptist ; OBERSCHALL, Attila ;

- MOLNÁR, Gergely ; BERENDZEN, Kenneth ; SHUKLA, Vijaya ; LAFOS, Marcel ; KONCZ, Zsuzsanna ; RÉDEI, George P. ; SCHELL, Jeff ; KONCZ, Csaba: Rapid identification of Arabidopsis insertion mutants by non-radioactive detection of T-DNA tagged genes. In: *Plant J* 32 (2002), Oct, Nr. 2, S. 243–253
- [Römheld und Marschner 1983] RÖMHELD, V. ; MARSCHNER, H.: Mechanism of iron uptake by peanut plants : I. Fe reduction, chelate splitting, and release of phenolics. In: *Plant Physiol* 71 (1983), S. 949–954
- [Römheld 1987] RÖMHELD, Volker: Different strategies for iron acquisition in higher plants. In: *Physiol Plant* 70 (1987), S. 231–234
- [Römheld und Marschner 1986] RÖMHELD, Volker ; MARSCHNER, Horst: Evidence for a Specific Uptake System for Iron Phytosiderophores in Roots of Grasses. In: *Plant Physiol.* 80 (1986), S. 175–180
- [Sakai u. a. 1998] SAKAI, H. ; HUA, J. ; CHEN, Q. G. ; CHANG, C. ; MEDRANO, L. J. ; BLEECKER, A. B. ; MEYEROWITZ, E. M.: ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in Arabidopsis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), S. 5812–5817
- [Sambrook u. a. 2001] SAMBROOK, J. ; FRITSCH, E. F. ; MANIATIS, T.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001
- [Schaaf u. a. 2006] SCHAAF, Gabriel ; HONSBEIN, Annegret ; MEDA, Anderson R. ; KIRCHNER, Silvia ; WIPF, Daniel ; WIRÉN, Nicolaus von: AtIREG2 encodes a tonoplast transport protein involved in iron-dependent nickel detoxification in *Arabidopsis thaliana* roots. In: *J. Biol. Chem.* 281 (2006), S. 25532–25540
- [Schaaf u. a. 2004] SCHAAF, Gabriel ; LUDEWIG, Uwe ; ERENOGLU, Bülent E. ; MORI, Satoshi ; KITAHARA, Takeshi ; WIRÉN, Nicolaus von: ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals. In: *J. Biol. Chem.* 279 (2004), S. 9091–6
- [Schaller und Bleecker 1995] SCHALLER, G. E. ; BLEECKER, A. B.: Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis ETR1 gene. In: *Science* 270 (1995), S. 1809–1811
- [Schaller und Kieber 2002] SCHALLER, GE ; KIEBER, JJ.: Ethylene. In: *In: The Arabidopsis book*. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists (2002)
- [Schikora und Schmidt 2001] SCHIKORA, A. ; SCHMIDT, W.: Acclimative changes in root epidermal cell fate in response to Fe and P deficiency: a specific role for auxin? In: *Protoplasma* 218 (2001), S. 67–75

- [Schmidt und Walter 1994] SCHMIDT, H. H. ; WALTER, U.: NO at work. In: *Cell* 78 (1994), S. 919–925
- [Schmidt 1999] SCHMIDT, W.: Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. In: *New Phytol* 141 (1999), S. 1–26
- [Schmidt und Bartels 1996] SCHMIDT, W. ; BARTELS, M.: Formation of Root Epidermal Transfer Cells in *Plantago*. In: *Plant Physiol* 110 (1996), S. 217–225
- [Schmidt u. a. 1996] SCHMIDT, W ; BOOMGAARDEN, B ; AHRENS, V: Reduction of root iron in *Plantago lanceolata* during recovery from Fe deficiency. In: *Physiol Plant* 98 (1996), S. 587–593
- [Schmidt u. a. 2000] SCHMIDT, W. ; TITTEL, J. ; SCHIKORA, A.: Role of hormones in the induction of iron deficiency responses in *Arabidopsis* roots. In: *Plant Physiol* 122 (2000), S. 1109–1118
- [Schmitt und Holmes 1991] SCHMITT, M. P. ; HOLMES, R. K.: Iron-dependent regulation of diphtheria toxin and siderophore expression by the cloned *Corynebacterium diphtheriae* repressor gene *dtxR* in *C. diphtheriae* C7 strains. In: *Infect Immun* 59 (1991), S. 1899–1904
- [Schneider und Leibold 2000] SCHNEIDER, B. D. ; LEIBOLD, E. A.: Regulation of mammalian iron homeostasis. In: *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 3 (2000), S. 267–273
- [Schofield und Ratcliffe 2004] SCHOFIELD, Christopher J. ; RATCLIFFE, Peter J.: Oxygen sensing by HIF hydroxylases. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 (2004), S. 343–354
- [Scholz u. a. 1992] SCHOLZ, G. ; BECKER, R. ; PICH, A. ; STEPHAN, U.W.: Nicotianamine - A common constituent of strategy I and II of iron acquisition by plants: a review. In: *J. Plant Nutr.* 15 (1992), S. 1647–1665
- [Schurr 1999] SCHURR, U: Dynamics of nutrient transport from the root to the shoot. In: *Prog Bot* 60 (1999), S. 234–253
- [Scrimshaw 1991] SCRIMSHAW, N. S.: Iron deficiency. In: *Sci Am* 265 (1991), S. 46–52
- [Sebastià u. a. 2004] SEBASTIÀ, Cinta H. ; HARDIN, Shane C. ; CLOUSE, Steven D. ; KIEBER, Joseph J. ; HUBER, Steven C.: Identification of a new motif for CDPK phosphorylation in vitro that suggests ACC synthase may be a CDPK substrate. In: *Arch Biochem Biophys* 428 (2004), S. 81–91
- [Shi u. a. 2002] SHI, Huazhong ; XIONG, Liming ; STEVENSON, Becky ; LU, Tiegang ; ZHU, Jian-Kang: The *Arabidopsis* salt overly sensitive 4 mutants uncover a critical role for vitamin B6 in plant salt tolerance. In: *Plant Cell* 14 (2002), S. 575–588

- [Shojima u. a. 1990] SHOJIMA, S. ; NISHIZAWA, N. K. ; FUSHIYA, S. ; NOZOE, S. ; IRIFUNE, T. ; MORI, S.: Biosynthesis of Phytosiderophores : In Vitro Biosynthesis of 2'-Deoxymugineic Acid from L-Methionine and Nicotianamine. In: *Plant Physiol* 93 (1990), S. 1497–1503
- [Solano u. a. 1998] SOLANO, R. ; STEPANOVA, A. ; CHAO, Q. ; ECKER, J. R.: Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. In: *Genes Dev* 12 (1998), S. 3703–3714
- [Sorin u. a. 2005] SORIN, Céline ; BUSSELL, John D. ; CAMUS, Isabelle ; LJUNG, Karin ; KOWALCZYK, Mariusz ; GEISS, Gaia ; MCKHANN, Heather ; GARCION, Christophe ; VAUCHERET, Hervé ; SANDBERG, Göran ; BELLINI, Catherine: Auxin and light control of adventitious rooting in Arabidopsis require ARGONAUTE1. In: *Plant Cell* 17 (2005), S. 1343–1359
- [Spiro 2002] SPIRO, Robert G.: Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. In: *Glycobiology* 12 (2002), Apr, Nr. 4, S. 43R–56R
- [Stamler u. a. 1992] STAMLER, J. S. ; SINGEL, D. J. ; LOSCALZO, J.: Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. In: *Science* 258 (1992), S. 1898–1902
- [Stephan und Gruen 1989] STEPHAN, U.W. ; GRUEN, M.: Physiological disorders of the nicotianamine-auxotroph tomato mutant chloronerva at different levels of iron nutrition: I. growth characteristics and physiological abnormalities related to iron and nicotianamine supply. In: *Acta Bot. Neerl.* 38 (1989), S. 147–153
- [Stephan u. a. 1994] STEPHAN, UW ; SCHMIDKE, I ; PICH, A: Phloem translocation of Fe, Cu, Mn, and Zn in Ricinus seedlings in relation to the concentrations of nicotianamine, an endogenous chelator of divalent metal ions, in different seedling parts. In: *Plant Soil* 165 (1994), S. 181–188
- [Stephan u. a. 1996] STEPHAN, UW. ; SCHMIDKE, I. ; STEPHAN, VW. ; SCHOLZ, G.: The nicotianamine molecule is made-to-measure for complexation of metal micronutrients in plants. In: *Biometals* 9 (1996), S. 84–90
- [Stephan und Scholz 1993] STEPHAN, U.W. ; SCHOLZ, G.: Nicotianamine: mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem? In: *Physiol. Plant.* 88 (1993), S. 522–529
- [Stinson und Spencer 1969] STINSON, R. A. ; SPENCER, M.: beta-Alanine as an Ethylene Precursor. Investigations Towards Preparation, and Properties, of a Soluble Enzyme System From a Subcellular Particulate Fraction of Bean Cotyledons. In: *Plant Physiol* 44 (1969), Sep, Nr. 9, S. 1217–1226

- [Sussman 1999] SUSSMAN, M. R.: Pumping iron. In: *Nat Biotech* 17 (1999), S. 230–231
- [Sussman 1994] SUSSMAN, M.R.: Molecular analysis of proteins in the plant plasma membrane. In: *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45 (1994), S. 211–234
- [Suzuki u. a. 1999] SUZUKI, K. ; HIGUCHI, K. ; NAKANISHI, H. ; NISHIZAWA, N.K. ; MORI, S.: Cloning of Nicotianamine Synthase Genes from *Arabidopsis thaliana*. In: *Soil Sci. Plant Nutr.* 45 (1999), S. 993–1002
- [Séguéla u. a. 2008] SÉGUÉLA, Mathilde ; BRIAT, Jean-François ; VERT, Grégory ; CURIE, Catherine: Cytokinins negatively regulate the root iron uptake machinery in *Arabidopsis* through a growth-dependent pathway. In: *Plant J* 55 (2008), S. 289–300
- [Takagi 1976] TAKAGI, S.: Naturally occurring iron-chelating compounds in oat- and rice-root washing. In: *J. Soil Sci Plant Nutr* 22 (1976), S. 423–422
- [Takagi 1993] TAKAGI, S.: Production of phytosiderophores. In: *L. Barton, B. Hemming, eds, Iron chelation in plants and soil microorganisms.* (1993), S. 111–131
- [Takahashi u. a. 2003] TAKAHASHI, M. ; TERADA, Y. ; NAKAI, I. ; NAKANISHI, H. ; YOSHIMURA, E. ; MORI, S. ; NISHIZAWA, N.K.: Role of Nicotianamine in the Intracellular Delivery of Metals and Plant Reproductive Development. In: *Plant Cell* 15 (2003), S. 1263–1280
- [Tamaoki u. a. 2003] TAMAOKI, Masanori ; NAKAJIMA, Nobuyoshi ; KUBO, Akihiro ; AONO, Mitsuko ; MATSUYAMA, Takashi ; SAJI, Hikaru: Transcriptome analysis of O₃-exposed *Arabidopsis* reveals that multiple signal pathways act mutually antagonistically to induce gene expression. In: *Plant Mol Biol* 53 (2003), S. 443–456
- [Tautz 2000] TAUTZ, D.: Evolution of transcriptional regulation. In: *Curr Opin Genet Dev* 10 (2000), S. 575–579
- [Thomine u. a. 2003] THOMINE, Sébastien ; LELIÈVRE, Françoise ; DEBARBIEUX, Elise ; SCHROEDER, Julian I. ; BARBIER-BRYGOO, Hélène: AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. In: *Plant J.* 34 (2003), S. 685–95
- [Tiffin 1966a] TIFFIN, L. O.: Iron translocation I. Plant culture, exudate sampling, iron-citrate analysis. In: *Plant Physiol* 41 (1966), S. 510–514
- [Tiffin 1966b] TIFFIN, L. O.: Iron Translocation II. Citrate/Iron Ratios in Plant Stem Exudates. In: *Plant Physiol* 41 (1966), S. 515–518

- [Toledo-Ortiz u. a. 2003] TOLEDO-ORTIZ, G. ; HUQ, E. ; QUAIL, P.H.: The *Arabidopsis* Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family. In: *Plant Cell* 15(8) (2003), S. 1749–1770
- [Tsuchisaka und Theologis 2004] TSUCHISAKA, Atsunari ; THEOLOGIS, Athanasios: Unique and overlapping expression patterns among the *Arabidopsis* 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. In: *Plant Physiol* 136 (2004), S. 2982–3000
- [Varotto u. a. 2002] VAROTTO, C. ; MAIWALD, D. ; PESARESI, P. ; JAHNS, P. ; SALAMINI, F. ; LEISTER, D.: The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant J.* 31 (2002), S. 589–99
- [Vert u. a. 2002] VERT, G. ; GROTZ, N. ; DEDALDECHAMP, F. ; GAYMARD, F. ; GUERINOT, M.L. ; BRIAT, J.F. ; CURIE, C.: IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. In: *Plant Cell* 14 (2002), S. 1223–33
- [Vert u. a. 2003] VERT, G.A. ; BRIAT, J.F. ; CURIE, C.: Dual regulation of the *Arabidopsis* high-affinity root iron uptake system by local and long-distance signals. In: *Plant Physiol.* 132 (2003), S. 796–804
- [Voronova und Baltimore 1990] VORONOVA, A. ; BALTIMORE, D.: Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein map to distinct domains. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990), S. 4722–4726
- [Vorwieger u. a. 2007] VORWIEGER, A. ; GRYCZKA, C. ; CZIHAL, A. ; DOUCHKOV, D. ; TIEDEMANN, J. ; MOCK, H-P. ; JAKOBY, M. ; WEISSHAAR, B. ; SAALBACH, I. ; BÄUMLEIN, H.: Iron assimilation and transcription factor controlled synthesis of riboflavin in plants. In: *Planta* 226 (2007), S. 147–158
- [Waggoner und Dimond 1954] WAGGONER, PR ; DIMOND, AE: Non-specificity of the triple response for ethylene. In: *Science* 199 (1954), S. 123–124
- [Wang u. a. 1995] WANG, G. L. ; JIANG, B. H. ; RUE, E. A. ; SEMENZA, G. L.: Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995), S. 5510–5514
- [Wang und Semenza 1995] WANG, G. L. ; SEMENZA, G. L.: Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. In: *J Biol Chem* 270 (1995), S. 1230–1237
- [Wang u. a. 2007a] WANG, Hong-Yu ; KLATTE, Marco ; JAKOBY, Marc ; BÄUMLEIN, Helmut ; WEISSHAAR, Bernd ; BAUER, Petra: Iron deficiency-mediated stress regulation of four subgroup Ib BHLH genes in *Arabidopsis thaliana*. In: *Planta* 226 (2007), S. 897–908

- [Wang u. a. 2007b] WANG, H.Y. ; KLATTE, M. ; JAKOBY, M. ; BAEUMLEIN, H. ; WEISSHAAR, B. ; BAUER, P.: Iron deficiency-mediated stress regulation of four subgroup Ib BHLH genes in *Arabidopsis thaliana*. In: *Planta* in press (2007)
- [Wang u. a. 2004] WANG, Kevin L-C ; YOSHIDA, Hitoshi ; LURIN, Claire ; ECKER, Joseph R.: Regulation of ethylene gas biosynthesis by the *Arabidopsis* ETO1 protein. In: *Nature* 428 (2004), S. 945–950
- [Wang u. a. 1999] WANG, R. L. ; STEG, A. ; HEY, J. ; LUKENS, L. ; DOEBLEY, J.: The limits of selection during maize domestication. In: *Nature* 398 (1999), S. 236–239
- [Wang u. a. 2007c] WANG, Youning ; LIU, Chuang ; LI, Kexue ; SUN, Feifei ; HU, Haizhou ; LI, Xia ; ZHAO, Yankun ; HAN, Chunyu ; ZHANG, Wensheng ; DUAN, Yunfeng ; LIU, Mengyu ; LI, Xia: *Arabidopsis* EIN2 modulates stress response through abscisic acid response pathway. In: *Plant Mol Biol* 64 (2007), S. 633–644
- [Waters u. a. 2002] WATERS, B.M. ; BLEVINS, D.G. ; EIDE, D.J.: Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. In: *Plant Physiol.* 129 (2002), S. 85–94
- [Waters u. a. 2007] WATERS, Brian M. ; LUCENA, Carlos ; ROMERA, Francisco J. ; JESTER, Gena G. ; WYNN, April N. ; ROJAS, Carmen L. ; ALCÁNTARA, Esteban ; PÉREZ-VICENTE, Rafael: Ethylene involvement in the regulation of the H(+)-ATPase CsHA1 gene and of the new isolated ferric reductase CsFRO1 and iron transporter CsIRT1 genes in cucumber plants. In: *Plant Physiol Biochem* 45 (2007), S. 293–301
- [Wendehenne u. a. 2004] WENDEHENNE, David ; DURNER, Jörg ; KLESSIG, Daniel F.: Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. In: *Curr Opin Plant Biol* 7 (2004), S. 449–455
- [White 1981] WHITE, M. C.: Metal Complexation in Xylem Fluid : II. THEORETICAL EQUILIBRIUM MODEL AND COMPUTATIONAL COMPUTER PROGRAM. In: *Plant Physiol* 67 (1981), S. 301–310
- [Wilusz und Wilusz 2004] WILUSZ, Carol J. ; WILUSZ, Jeffrey: Bringing the role of mRNA decay in the control of gene expression into focus. In: *Trends Genet* 20 (2004), S. 491–497
- [von Wiren u. a. 1999] WIREN, N. von ; KLAIR, S. ; BANSAL, S. ; BRIAT, J.F. ; KHODR, H. ; SHIOIRI, T. ; LEIGH, R.A. ; HIDER, R.C.: Nicotianamine chelates both FeIII and FeII. Implications for metal transport in plants. In: *Plant Physiol.* 119 (1999), S. 1107–1114

- [Wiren u. a. 1994] WIREN, N. V. ; MORI, S. ; MARSCHNER, H. ; ROMHELD, V.: Iron Inefficiency in Maize Mutant *ys1* (*Zea mays* L. cv Yellow-Stripe) Is Caused by a Defect in Uptake of Iron Phytosiderophores. In: *Plant Physiol* 106 (1994), S. 71–77
- [von Wirén 2004] WIRÉN, N. von: Progress in research on iron nutrition and interactions in plants. In: *Soil Sci Plant Nutr* 50 (2004), S. 955–964
- [World Health Organization 2001] WORLD HEALTH ORGANIZATION: Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control. A guide for programme managers. (2001)
- [World Health Organization 2008] WORLD HEALTH ORGANIZATION: Worldwide prevalence of anaemia 1993 - 2005. (2008)
- [Xu u. a. 2008] XU, Juan ; LI, Yuan ; WANG, Ying ; LIU, Hongxia ; LEI, Lei ; YANG, Hailian ; LIU, Guoqin ; REN, Dongtao: Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in *Arabidopsis*. In: *J Biol Chem* 283 (2008), Oct, Nr. 40, S. 26996–27006. – URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M801392200>
- [Yamagami u. a. 2003] YAMAGAMI, Takeshi ; TSUCHISAKA, Atsunari ; YAMADA, Kayoko ; HADDON, William F. ; HARDEN, Leslie A. ; THEOLOGIS, Athanasios: Biochemical diversity among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase isozymes encoded by the *Arabidopsis* gene family. In: *J Biol Chem* 278 (2003), S. 49102–49112
- [Yamaguchi-Iwai u. a. 1995] YAMAGUCHI-IWAI, Y. ; DANCIS, A. ; KLAUSNER, R. D.: AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *EMBO J* 14 (1995), S. 1231–1239
- [Yamaguchi-Iwai u. a. 1996] YAMAGUCHI-IWAI, Y. ; STEARMAN, R. ; DANCIS, A. ; R. D., Klausner: Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulon in yeast. In: *EMBO J*. 15(13) (1996), S. 3377?3384.
- [Yamaguchi-Iwai u. a. 2002] YAMAGUCHI-IWAI, Yuko ; UETA, Ryo ; FUKUNAKA, Ayako ; SASAKI, Ryuzo: Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *J Biol Chem* 277 (2002), S. 18914–18918
- [Yamanaka u. a. 2003] YAMANAKA, Koji ; ISHIKAWA, Haruto ; MEGUMI, Yuzuru ; TOKUNAGA, Fuminori ; KANIE, Masato ; ROUAULT, Tracey A. ; MORISHIMA, Isao ; MINATO, Nagahiro ; ISHIMORI, Koichiro ; IWAI, Kazuhiro: Identification of the ubiquitin-protein ligase that recognizes oxidized IRP2. In: *Nat Cell Biol* 5 (2003), S. 336–340

- [Yamashino u. a. 2003] YAMASHINO, Takafumi ; MATSUSHIKA, Akinori ; FUJIMORI, Toru ; SATO, Shusei ; KATO, Tomohiko ; TABATA, Satoshi ; MIZUNO, Takeshi: A Link between circadian-controlled bHLH factors and the APRR1/TOC1 quintet in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant Cell Physiol* 44 (2003), S. 619–629
- [Yang und Hoffmann 1984] YANG, SF ; HOFFMANN, NE.: Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. In: *Annual Review of Plant Physiology* 35 (1984), S. 155–189
- [Yen u. a. 2001] YEN, MR ; YH, Tseng ; SAIER MH, Jr.: Maize Yellow Stripe1, an iron-phytosiderophore uptake transporter, is a member of the oligopeptide transporter (OPT) family. In: *Micobiology* 147 (2001), S. 2881–2883
- [Yi und Guerinot 1996] YI, Y. ; GUERINOT, M.L.: Genetic evidence that induction of root Fe(III) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency. In: *Plant J.* 10 (1996), S. 835–44
- [Yoo u. a. 2008] YOO, Sang-Dong ; CHO, Young-Hee ; TENA, Guillaume ; XIONG, Yan ; SHEEN, Jen: Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C₂H₄ signalling. In: *Nature* 451 (2008), Feb, Nr. 7180, S. 789–795. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature06543>
- [Yoo u. a. 2009] YOO, Sang-Dong ; CHO, Younghee ; SHEEN, Jen: Emerging connections in the ethylene signaling network. In: *Trends Plant Sci* 14 (2009), S. 270–279
- [Yoshida u. a. 2009] YOSHIDA, Seiji ; TAMAOKI, Masanori ; IOKI, Motohide ; OGAWA, Daisuke ; SATO, Yuko ; AONO, Mitsuko ; KUBO, Akihiro ; SAJI, Shoko ; SAJI, Hikaru ; SATOH, Shinobu ; NAKAJIMA, Nobuyoshi: Ethylene and salicylic acid control glutathione biosynthesis in ozone-exposed *Arabidopsis thaliana*. In: *Physiol Plant* 136 (2009), S. 284–298
- [Yuan u. a. 2005] YUAN, You X. ; ZHANG, Juan ; WANG, Dao W. ; LING, Hong Q.: AtbHLH29 of *Arabidopsis thaliana* is a functional ortholog of tomato FER involved in controlling iron acquisition in strategy I plants. In: *Cell Res* 15 (2005), S. 613–621
- [Yuan u. a. 2008] YUAN, Youxi ; WU, Huilan ; WANG, Ning ; LI, Jie ; ZHAO, Weina ; DU, Juan ; WANG, Daowen ; LING, Hong-Qing: FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in *Arabidopsis*. In: *Cell Res* 18 (2008), S. 385–397
- [Zhang u. a. 2009] ZHANG, Zhijin ; ZHANG, Haiwen ; QUAN, Ruidan ; WANG, Xue-Chen ; HUANG, Rongfeng: Transcriptional regulation of the ethylene response factor LeERF2 in the expression of ethylene biosynthesis genes controls ethylene production in tomato and tobacco. In: *Plant Physiol* 150 (2009), S. 365–377

- [Zhao und Eide 1996a] ZHAO, H. ; EIDE, D.: The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), S. 2454–2458
- [Zhao und Eide 1996b] ZHAO, H. ; EIDE, D.: The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *J Biol Chem* 271 (1996), S. 23203–23210
- [Zhao und Qi 2008] ZHAO, S ; QI, X.: Signaling in plant disease resistance and symbiosis. In: *J Integr Plant Biol* 50 (2008), S. 799–807
- [Zhong u. a. 2009] ZHONG, Shangwei ; ZHAO, Mantong ; SHI, Tianying ; SHI, Hui ; AN, Fengying ; ZHAO, Qiong ; GUO, Hongwei: EIN3/EIL1 cooperate with PIF1 to prevent photo-oxidation and to promote greening of *Arabidopsis* seedlings. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009), S. 21431–21436
- [Zhou u. a. 2002] ZHOU, Jing ; ROCKLIN, Amy M. ; LIPSCOMB, John D. ; QUE, Lawrence ; SOLOMON, Edward I.: Spectroscopic studies of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase: molecular mechanism and CO(2) activation in the biosynthesis of ethylene. In: *J Am Chem Soc* 124 (2002), S. 4602–4609
- [Zipfel u. a. 2004] ZIPFEL, Cyril ; ROBATZEK, Silke ; NAVARRO, Lionel ; OAKELEY, Edward J. ; JONES, Jonathan D G. ; FELIX, Georg ; BOLLER, Thomas: Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. In: *Nature* 428 (2004), Apr, Nr. 6984, S. 764–767. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature02485>