

Die essentielle Rolle des Transkriptionsfaktors SPL7 bei der
Aufrechterhaltung der Kupfer-Homöostase
in *Arabidopsis thaliana*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Arne Vincent Grande

aus Bremen

Köln, 2010

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung in Köln in der Abteilung für Molekulare Pflanzengenetik (ehemals Prof. Dr. Heinz Saedler) in der Arbeitsgruppe von Dr. Peter Huijser angefertigt.

Berichterstatter:	Prof. Dr. Wolfgang Werr
Zweiter Berichterstatter:	Prof. Dr. Klaus Theres
Prüfungsvorsitzende:	Prof. Dr. Ute Höcker
Tag der mündlichen Prüfung:	12.04.2010

Zusammenfassung:

Das Spurenelement Kupfer ist für höhere Pflanzen lebensnotwendig und wird als Kofaktor in Proteinen hauptsächlich wegen seines geringen Redoxpotentials eingesetzt, zum Beispiel im Plastocyanin, einem wichtigen Elektronentransporter der Photosynthesekomplexe. Ohne Kupfer als Kofaktor des Plastocyanins könnten keine Elektronen vom Cytochrom-b₆/f-komplex auf das Photosystem I übertragen werden, wodurch die Photosynthese in höheren Pflanzen nicht möglich wäre. So wichtig Kupfer auch ist, so toxisch ist es auch in ungebundener Form. Deswegen ist es für Pflanzen unerlässlich, dass sie eine gut funktionierende Kupfer-Homöostase besitzen, damit sie ihre Metalloproteine ausreichend versorgen können, aber dennoch keine toxischen Mengen aufnehmen.

Um eine bessere Kenntnis über die molekulargenetischen Mechanismen zu erlangen, die der Kupfer-Homöostase in höheren Pflanzen zugrunde liegen, wurde die Funktion von *SPL7* (*SQUAMOSA PROMOTOR BINDING PROTEIN LIKE7*) in *Arabidopsis thaliana* studiert. *SPL7* ist das Homolog des SBP-Box Transkriptionsfaktor *CRR1* (*COPPER RESPONSE REGULATORY*) aus *Chlamydomonas*, das für das transkriptionelle Umschalten bei Kupfermangel verantwortlich ist. Für die Analyse wurden Funktionsverlustmutanten von *SPL7* unter unterschiedlichen Bedingungen kultiviert und ihr Phänotyp analysiert. Dabei zeigte sich, dass unter Kupfermangelkonzentrationen, bei denen der Wildtyp keine Mangelerscheinungen hatte, die Mutanten ein stark verlangsamtes Wachstum und einen deutlich späteren Übergang in die reproduktive Phase aufwiesen. Darüber hinaus zeigten sie große Defizite in der Samenproduktion, so dass sich unter Kurztagbedingungen gar keine Samen entwickelten oder aber die Pflanzen starben, bevor sie in die reproduktive Phase übergehen konnten. Auch das Wurzelsystem war wesentlich schlechter ausgebildet und wuchs deutlich langsamer. Die phänotypische Analyse der *spl7*-Mutanten zeigte außerdem, dass die Pflanzen eine gestörte Lignifizierung aufwiesen. So waren beispielsweise die Leitbündel in allen Geweben, wenn überhaupt, nur sehr gering lignifiziert. Auch die Defizite in der Samenproduktion ließen sich auf eine gestörte Lignifizierung zurückführen, da auch das Endothecium der Antheren kaum lignifiziert war, wodurch eine Selbstung sehr erschwert

wurde. Zusammen mit den anderen phänotypischen Merkmalen der *spl7*-Mutanten, deutete dies auf eine Mangelversorgung der gesamten Pflanze mit Nährstoffen hin.

Interessanter Weise verschwanden sämtliche phänotypische Unterschiede zwischen Wildtypen und *spl7*-Mutanten, sobald die Kupferkonzentration im Substrat erhöht wurde. Unter diesen Bedingungen hatten die *spl7*-Mutanten ein wildtypisches Phänotyp.

Eine differentielle Transkriptom-Analyse der *spl7*-Mutante und des Wildtyps unter optimalen und pessimalen Kupferbedingungen gab Hinweise darauf, dass *SPL7* eine regulierende Funktion in der Kupfer-Homöostase von *A. thaliana* haben könnte. Durch unterschiedliche Genexpression in den Wurzeln (Kupfer-aufnehmendes Gewebe) und den überirdischen Teilen der Pflanze (Kupfer verbrauchendes Gewebe) kann man folgern, dass *SPL7* nicht nur für die erhöhte Aufnahme von Kupfer über die Wurzeln, sondern auch für das Remobilisieren desselben aus anderen Geweben verantwortlich sein könnte. Schließlich ist der Transport von Kupfer vermutlich auch, wenn auch nur indirekt, von *SPL7* abhängig, da die Lignifizierung der Leitbündel gestört ist. Diese Beobachtungen werden von den kürzlich veröffentlichten Forschungsergebnissen von Yamasaki und Mitarbeitern (2009) bestätigt.

Diese Doktorarbeit bestätigt nicht nur, dass *SPL7* für die allgemeine Kupfer-Homöostase wichtig ist, sondern offenbart darüber hinaus differenzierte Regulationsmechanismen, die über die Verteilung zwischen den Geweben einer Pflanze die optimale Kupferversorgung der einzelnen Zelle gewährleisten. Durch Übertragung dieser Erkenntnisse wäre es möglich, landwirtschaftliche Nutzpflanzen für Böden mit geringem Kupfergehalt zu optimieren, so dass die derzeitigen durch Kupfermangel bedingten Ertragseinbußen verringert würden.

Abstract:

Copper is an essential trace element in higher plants and is used mainly because of its low redox potential. Photosynthesis in higher plants, for example, would not be possible without copper as a cofactor of PLASTOCYANIN. Despite its indispensability, copper in an unbound form is toxic. Therefore it is of utmost importance that plants can rely on a well functioning copper homeostasis.

To come to a better understanding of the molecular genetic mechanisms underlying copper homeostasis in higher plants, the function of *SPL7* (*SQUAMOSA PROMOTOR BINDING PROTEIN LIKE7*) was studied in *Arabidopsis thaliana*. *SPL7* is highly homologous to the SBP-box transcription factor *CRR1* (*COPPER RESPONSE REGULATORY1*) in *Chlamydomonas*, which is required for a transcriptional reprogramming in response to copper deficiency. Mutants of *SPL7* were grown on different substrates and their phenotypic changes analysed. The mutants showed already severe developmental defects under suboptimal copper conditions, while these did not yet cause deficiency phenotypes in the wildtype. The growth rate of the whole plant, including the root system, was strongly reduced and the developmental switch from vegetative to reproductive growth was significantly delayed. The seed production strongly declined up to no seeds in days with short light periods where most of the mutants failed to survive long enough to switch to reproductive growth.

The lignification of the vasculature in all tissues was nearly abolished in the *spl7*-mutant and, like the other phenotypic differences, indicated major failures in uptake, transport and distribution of nutrients. The reduced lignification of the endothecium also leads to poor selfing of the flowers.

Either application of additional copper or insertion of the wild type genomic *SPL7* locus into the mutant plants complemented all these phenotypic differences.

Differential transcriptome analysis of the Wildtyp and *spl7*-mutant plants grown under either sufficient or deficient copper conditions revealed *SPL7* to be a major regulator in copper homeostasis. A similar finding was recently published by Yamasaki and co-workers (2009).

Our gene expression data in combination with the experimental setup, i.e. separating the roots as importing/source tissue from the rosettes as the sink/source tissue, showed that *SPL7* is not only responsible for boosting copper-uptake, but also for a redistribution of copper throughout the whole plant.

The study presented in this thesis not only confirms the role of *SPL7* in the copper homeostasis, but also unravels the molecular genetic mechanisms and physiological responses involved in different plant tissues or even in single cells. These insights may provide a way for genetic improvement of crop plants to cope with copper deficiency and to reduce yield loss.

Inhaltsverzeichnis:

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	METALLIONEN, DIE ESSENTIELL FÜR FORM UND FUNKTION VON PROTEINEN SIND, EVOLVIERTEN ALS KOFAKTOREN ZUSAMMEN MIT DEN ORGANISMEN	1
1.1.1	KUPFERMANGEL UND SEINE AUSWIRKUNG AUF DIE PFLANZE	2
1.1.2	LIGNINE UND LIGNIFIZIERUNG	3
1.1.3	EINHALTUNG DER KUPFER-HOMÖOSTASE	5
1.1.4	AUFNAHME UND VERTEILUNG VON KUPFER IN DER PFLANZE	7
1.2	SBP-BOX-GENE IN HÖHEREN PFLANZEN	11
1.3	ZIEL DIESER ARBEIT	14
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	15
2.1	MATERIAL	15
2.1.1	CHEMIKALIEN	15
2.1.2	ENZYME UND CO	15
2.1.3	LÖSUNGEN UND PUFFER	16
2.1.4	OLIGOS	19
2.1.5	VERWENDETE ORGANISMEN:	19
2.1.6	VERWENDETES PLASMID	19
2.1.7	MISCHUNGSVERHÄLTNIS DER NORMALEN ERDE	20
2.2	METHODEN	20
2.2.1	STANDARMETHODEN FÜR DIE ISOLATION UND BEHANDLUNG VON DNA	20
2.2.2	STANDARMETHODEN FÜR DIE ISOLATION UND BEHANDLUNG VON RNA	25
2.2.3	METHODEN ZUR FÄLLUNG VON DNA UND RNA	26
2.2.4	POLYMERASE KETTENREAKTION	28
2.2.5	QUANTITATIVE ECHTZEIT-PCR	29
2.2.6	SOLEXA-SEQUENZIERUNG	30
2.2.8	FÄRBUNG MIT BASISCHEM FUCHSIN	30
2.2.9	KONZENTRATIONEN VON ANTIBIOTIKA	31
2.2.10	WACHSTUMSBEDINGUNGEN FÜR PFLANZEN	31
2.3	STATISTIK	32
3	<u>ERGEBNISSE</u>	33
3.1	T-DNA INSERTIONSLINIEN UND KOMPLEMENTIERTE LINIEN	33
3.1.1	ANALYSE DER EXPRESSION UND LOKALISATION VON <i>SPL7</i> IN DER PFLANZE	37
3.2	ANALYSE DES PHÄNOTYPS	38
3.2.1	PHÄNOTYP DER <i>SPL7</i> -MUTANTEN AUF ERDE	38
3.2.2	ANALYSE DER REPRODUKTION <i>SPL7</i> -MUTANTER PFLANZEN	46
3.2.3	PHÄNOTYP DER <i>SPL7</i> -MUTANTEN AUF AGAR-MEDIUM	50
3.3	QUALITATIVE ANALYSE DES LIGNINS DURCH FÄRBUNG MIT BASISCHEM FUCHSIN	54

3.3.1	DIE LIGNIFIZIERUNG DES LEITBÜNDELSYSTEMS IN DEN <i>SPL7</i> -MUTANTEN UNTER KUPFERMANGEL	55
3.3.2	DIE LIGNIFIZIERUNG DER INFLORESZENZEN IN DEN <i>SPL7</i> -MUTANTEN UNTER KUPFERMANGEL	56
3.3.3	DIE LIGNIFIZIERUNG DER LEITBÜNDEL DER WURZELN IN DEN <i>SPL7</i> -MUTANTEN UNTER KUPFERMANGEL	58
3.4	TRANSKRIPТОM-ANALYSE MITTELS SOLEXA-SEQUENZIERUNG VON WURZEL- UND ROSETTENMATERIAL	60
3.4.1	REGULATION VON TRANSPORTERN UND CHAPERONEN FÜR METALLIONEN	60
3.4.2	REGULATION DES PHENYLPROPANOID- BIOSYNTHESEWEGES	64
3.4.3	TRANSKRIPTIONELLE KONTROLLE DER GENFAMILIE DER LACCASEN	67
4	<u>DISKUSSION</u>	70
4.1	IN DEN T-DNA-INSERTIONSLINIEN <i>SPL7-1</i> UND <i>SPL7-2</i> IST DIE FUNKTION VON <i>SPL7</i> GESTÖRT	70
4.2	<i>SPL7</i> IST DER HAUPTREGULATOR FÜR DEN KUPFERHAUSHALT IN <i>A. THALIANA</i>	71
4.2.1	DIE KUPFERAUFNAHME ÜBER DIE WURZELN WIRD ÜBER SPEZIELLE FAMILIEN VON TRANSPORTERN GEREGLT, DIE UNTER DER KONTROLLE VON <i>SPL7</i> STEHEN	72
4.2.2	OHNE <i>SPL7</i> IST DIE VERTEILUNG VON KUPFER IN DER PFLANZE GESTÖRT	75
4.2.3	OHNE <i>SPL7</i> IST DIE KUPFER-HOMÖOSTASE JEDER EINZELNEN PFLANZENZELLE GESTÖRT	76
4.3	UNZUREICHENDE LIGNIFIZIERUNG ERKLÄRT VIELE PHÄNOTYPISCHE UNTERSCHIEDE DER <i>SPL7</i>-MUTANTEN GEGENÜBER DEM WILDТYP	79
4.3.1	DIE LIGNINBIOSYNTHESE IST IN ABHÄNGIGKEIT VON <i>SPL7</i> UNTER KUPFERMANGEL VERÄNDERT UND DIE RADIKALISCHE POLYMERISATION DER MONOMERE ZUM LIGNIN GESTÖRT	79
4.4	DIE <i>SPL7</i>-MUTANTEN WERDEN UNTER KUPFERMANGEL NICHT AUSREICHEND LIGNIFIZIERT	81
4.4.1	DIE WURZELN VON <i>SPL7</i> -MUTANTEN WACHSEN UNTER KUPFERMANGEL LANGSAMER ALS DER WILDТYP	83
4.4.2	<i>SPL7</i> -MUTANTEN SIND UNTER KUPFERMANGEL IN IHRER GESAMTEN ENTWICKLUNG VERLANGSAMT	85
4.4.3	DIE SAMENPRODUKTION WIRD DURCH KUPFER BEEINFLUSST	87
4.5	REGULATION VON DER AKTIVITÄT VON <i>SPL7</i>	88
4.5.1	MÖGLICHE REGULATION VON <i>SPL7</i> ÜBER DIE DNA-BINDUNG	89
4.5.2	MÖGLICHE REGULATION VON <i>SPL7</i> ÜBER EINE TRANSMEMBRAN-DOMÄNE	90
4.6	<i>SPL7</i> IST ESSENTIELL FÜR DIE AUFRECHTERHALTUNG DER KUPFER-HOMÖOSTASE – IMMER NOCH OFFENE FRAGEN –	92
5	<u>LITERATUR</u>	94
6	<u>ANHANG</u>	102
7	<u>ABKÜRZUNGEN</u>	109
7.1	VERWENDETE OLIGOS	110
7.2	DANKSAGUNG	111
7.3	LEBENSЛАUF	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

1 Einleitung

1.1 Metallionen, die essentiell für Form und Funktion von Proteinen sind, evolvierten als Kofaktoren zusammen mit den Organismen

Metallionen spielen als Kofaktoren für viele Proteine eine wichtige Rolle, da sie für die Aufrechterhaltung der Form der Proteine und deren Domänen eine grundlegende Funktion besitzen; ein Beispiel ist die "Zinkfinger"-Struktur in Transkriptionsfaktoren, über die die Bindung an die DNA stattfindet. An deren Aufrechterhaltung der funktionellen „Finger-Form“ ist mindestens ein Zn^{2+} -Ion beteiligt. Am Häufigsten werden Metallionen allerdings aufgrund ihrer Redox-Eigenschaften genutzt, da sie leicht ein Elektron abgeben und aufnehmen können, wie es beispielsweise für Transportproteine von Elektronen der Fall ist. So überträgt Plastocyanin, das Kupfer als Kofaktor benötigt, Elektronen vom Cytochrom b_6-f -Komplex auf das Photosystem I. FD (FERREDOXIN), ein Protein das Eisen-Schwefel-Komplexe bindet, überträgt das Elektron bei der Photosynthese unter anderem auf die FNR (FD:NADPH-REDUKTASE), um zusammen mit den Protonen aus der Photolyse des Wassers das Reduktionsäquivalent $NADPH+H^+$ wieder herzustellen (Hanke and Hase 2008). Auch an diversen enzymatischen Reaktionen sind Metallionen als Kofaktoren von Enzymen beteiligt, wie zum Beispiel in den CSDs CU-ZN-SUPEROXID-DISMUTASE), die Hydroxylradikale zu Wasserstoffperoxid umwandeln. Für die Biosynthese von Chlorophyll und Häm werden ebenfalls Enzyme die Eisen als Kofaktor binden benötigt (Burkhead et al. 2009; Merchant et al. 2006; Mori 1999; Pilon et al. 2009). Rezeptoren für Hormone können auch Metallionen als Kofaktoren benötigen. ETR1 (ETHYLEN RESPONSE REGULATOR 1) ein Rezeptor für Ethylen benötigt Kupfer als Kofaktor (Yruela 2009).

Die Entwicklung der Eisen- und Kupferionen als Kofaktoren von Proteinen während der Evolution ist eng mit der Entwicklung der Photosynthese betreibenden Organismen verknüpft (Burkhead et al. 2009). Als die Atmosphäre nur geringe Mengen von Sauerstoff enthielt, war Eisen hauptsächlich frei als zweiwertiges Ion im Wasser verfügbar. Durch die von den oxigene Photosynthese betreibenden Organismen durchgeführte Umwandlung von Wasser und Kohlenstoffdioxid zu Sauerstoff und Zucker erhöhte sich der Sauerstoffanteil in der Atmosphäre und das gut lösliche Fe^{2+} wurde in Verbindung mit Sauerstoff zu im Wasser schwer löslichen Eisenoxiden (Fe_2O_3 , Fe_3O_4 und FeO) abgelagert (Burkhead et al. 2009). Gleichzeitig wurde allerdings auch Kupfer oxidiert und somit als in Wasser gut löslicher Form als Kofaktor verfügbar. Dies wird als einer der Gründe angenommen, warum Organismen zwei komplett unterschiedliche Systeme mit jeweils anderen Metallen als Kofaktoren für die gleiche Reaktion besitzen (Merchant et al. 2006), zwischen denen sie je nach Bedingungen wechseln können. *Chlamydomonas reinhardtii* kann bei Kupfermangel Plastocyanin als Elektronentransporter in der Photosynthese durch Cytochrom c6, dass auf Eisen als Kofaktor beruht, ersetzen (Kropat et al. 2005; Page et al. 2009). *Arabidopsis thaliana* nutzt bei Kupfermangel anstelle von der kupferbasierenden SODs (SUPEROXID-DISMUTASE) CSD2 die eisenbasierende FSD1 (FE SUPEROXID-DISMUTASE 1) im Chloroplasten, um die entstehenden Hydroxylradikale zu entgiften (Burkhead et al. 2009; Pilon et al. 2009; Puig et al. 2007a; Yruela 2009).

1.1.1 Kupfermangel und seine Auswirkung auf die Pflanze

Es gibt große Unterschiede in den Konzentrationen von Metallen wie Kupfer im Boden und in ihrer Verfügbarkeit für die Pflanze. Je höher der pH-Wert des Bodens ist, umso geringer ist die Löslichkeit von Kupferionen. Des Weiteren kann Kupfer an organische Säuren gebunden und somit der Pflanze nicht zugänglich sein (Basta et al. 2005; Burkhead et al. 2009; Yruela 2009). Kupfermangel in Pflanzen ist seit Langem aus der Landwirtschaft bekannt und führt zu beträchtlichen Einbußen bis zu kompletten Verlusten in der Ernte (Loneragan et al. 1980; Mengel et al. 2007). Wenn der Pflanze nicht ausreichend Kupfer zur Verfügung steht, verringert sich ihr Wachstum und besonders die jungen Blätter zeigen Anzeichen von

Gelbblättrigkeit und deformiertem Wachstum (Burkhead et al. 2009; Puig et al. 2007a). Durch Kupfermangel wird auch die Transition vom juvenilen zum adulten und vom vegetativen zum reproduktiven Wachstum verzögert. Es treten Probleme bei der Lignifizierung auf, die sich unter anderem in einem Absterben des Apikalmeristems durch eine Unterversorgung mit Nährstoffen, aber auch ein Fehlen der mechanischen Stabilität des Xylems und dadurch ein leichtes Umknicken von Stängeln zeigen (Downes and Turvey 1990; Mengel et al. 2007). Stärker als die vegetative Wachstumsphase ist die reproduktive Phase vom Kupfermangel betroffen, da sich in den Pollen der Stärkegehalt bei Kupfermangel stark verringert. Durch unzureichende Lignifizierung des Endothecium, das nach Reifen der Pollen aufreißt und diese freigibt, ist darüber hinaus die Befruchtung beeinträchtigt (Dell 1980; Mengel et al. 2007).

1.1.2 Lignine und Lignifizierung

30% des organischen Kohlenstoffs der Biosphäre sind in Lignin gebundenen, das ein Polymer aus Phenolen ist und nach Zellulose das zweithäufigste Biopolymer der Erde darstellt. Als Lignifizierung bezeichnet man die radikalische Polymerisation von Ligninmonomeren. Die Pflanzenzellwand kann aus bis zu drei Schichten bestehen und die Lignifizierung tritt erst als letzter Schritt bei der Bildung der sekundären Zellwand auf (Boerjan et al. 2003; Campbell 2001; Vanholme et al. 2008). Dabei wird Lignin zwischen die Zellulosefibrillen, Hemizellulosen, Pektinen und Proteinen der pflanzlichen Zellwand eingelagert, wodurch diese an Festigkeit gewinnt. Das Lignin wird dabei kovalent an die Hemizellulosen der Zellwand gebunden (Vanholme et al. 2008), wodurch die Zellwände noch fester und undurchlässiger für Wasser und Ionen werden.

Lignin wird aus Monomeren aufgebaut, die Derivate der Aminosäure Phenylalanin sind. Die Hauptkomponenten sind Coumaryl-Alkohol, Coniferyl-Alkohol und Sinapyl-Alkohol (siehe Abbildung 1.1). Allerdings wurde gezeigt, dass das Lignin selbst größere Änderung in der Zusammensetzung ohne schwerwiegende Probleme in seiner Funktion verträgt (Boerjan et al. 2003; Vanholme et al. 2008).

Die einzelnen Ligninmonomere werden in der Zelle häufig über ihre Phenolgruppe an Monosaccharide gebunden, da somit ihre Reaktivität herabgesetzt wird und sie einfacher zu speichern und zu transportieren sind (Vanholme et al. 2008). Für die Polymerisation werden sie vom Zytosol in die Zellwand sekretiert, wo sie über eine radikalische Polymerisation mit einander verbunden werden. Die Polymerisation soll über Oxidasen, Peroxidasen und Laccasen erfolgen (Boerjan et al. 2003). Wobei hier besonders die Laccasen interessant sind, da sie vier Kupferionen als Kofaktoren benötigen und mehrfach gezeigt wurde, dass sie in vitro die radikalische Polymerisation von Ligninmonomeren einleiten können (Bao et al. 1993; Liang et al. 2006; Richardson et al. 2000; Sato and Whetten 2006; Sterjiades et al. 1992).

Lignin wird neben Zellulose für die Stabilität der Zellwand und der gesamten Pflanze genutzt. Unter anderem wird im vaskulären Gewebe das Xylem stark lignifiziert, um ein Kollabieren der Tracheen zu verhindern. Auch der Stamm von Bäumen und sogar der Blütenstand von *A. thaliana* ist auf die Lignifizierung angewiesen, um ein Umknicken zu verhindern (Boerjan et al. 2003; Jaramillo-Carmona et al. 2008; Zhao et al. 2000). Neben der mechanischen Stabilisierung verringert die Lignifizierung von bestimmten Geweben darüber hinaus deren Wasserdurchlässigkeit und verhindert dadurch eine Austrocknung der Pflanze. Eine erhöhte Lignifizierung ist auch bei der Pathogenabwehr von Vorteil, da dadurch die Zellwand an der Eintrittsstelle des Pathogens verstärkt wird, um somit das Eindringen des Pathogens zu erschweren (Boerjan et al. 2003).

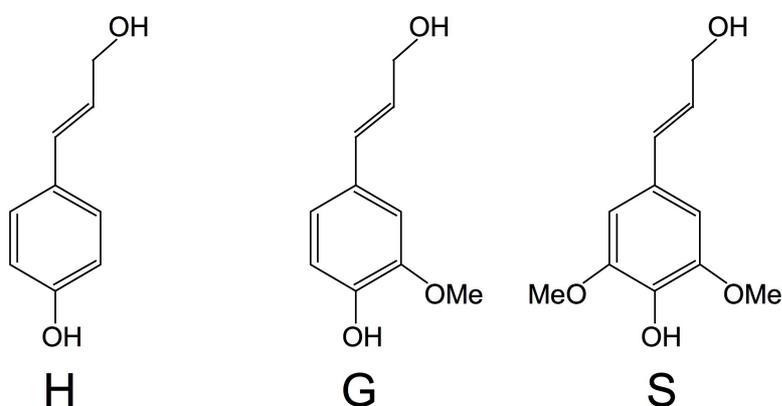


Abb.1.1: Strukturformel der drei Monolignole, die die häufigsten Bausteine von Lignin sind. H: Coumaryl-Alkohol; G: Coniferyl-Alkohol; S: Sinapyl-Alkohol

Diese Verknüpfung von Lignin mit der Zellwand ist auf industrieller Seite unerwünscht, da man die beiden Biopolymere für die Aufarbeitung zu Papier oder für die Herstellung von Bioethanol als Treibstoff trennen muss und es dadurch kostenintensiver und uneffektiv wird (Boerjan et al. 2003).

1.1.3 Einhaltung der Kupfer-Homöostase

Sämtliche Organismen müssen die Bedingungen in ihren Zellen so konstant wie möglich halten, um die Konformation und Funktion der in Lösung befindlichen Proteine sicherzustellen. Dabei spielen nicht nur der Wassergehalt und die ionische und osmotische Stärke des Zytosols eine Rolle für die Proteinfaltung, sondern auch das Gleichgewicht der unterschiedlichen Substanzen zu einander. Besonders sich in Lösung befindende Ionen werden genutzt, um über Membranen einen Gradienten aufzubauen, der für zelluläre Prozesse wie zum Beispiel die ATP-Gewinnung genutzt werden kann. Des Weiteren werden Metallionen als Kofaktoren in bestimmten Proteinen genutzt und können nicht gegeneinander ausgetauscht werden, ohne dass die Funktion beeinträchtigt wird. Gerade sessile Organismen wie Pflanzen, die an die externen Umweltbedingungen gebunden sind und ihren Standort nicht wechseln können, müssen in der Lage sein, Differenzen der im Boden verfügbaren Nährstoffe auszugleichen. Organismen können unterschiedliche Strategien nutzen, um einen Mangel an Kupfer, einem essentiellen Metallion, auszugleichen:

I: Die Ionenaufnahme kann erhöht werden. Hierfür erhöht *A. thaliana* zuerst die Anzahl eher unspezifischer Transporter, die verschiedene Metallionen transportieren können, solange deren Ladung gleich ist. Hier wäre die Erhöhung von ZIP2 (ZRT-/IRT-LIKE PROTEIN 2) oder HMA1 (HEAVY METAL ATPASE 1) zu nennen. ZIP2 ist ein Transporter für zweiwertige Metallionen wie Cu^{2+} und Zn^{2+} (Palmer and Guerinot 2009) während HMA1 zweiwertige Ionen wie Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} und Co^{2+} transportiert (Puig and Penarrubia 2009). Die erhöhte Menge solcher Transporter aufgrund des Mangels an einem bestimmten Metallion würde aber in der Zelle zu einem Ungleichgewicht in der Zusammensetzung der verschiedenen Metallionen zueinander führen. Dadurch würde der Mangel eines Metallions zu einem potentiell toxischen Überschuss an kotransportierten Ionen führen. Um dies zu vermeiden existieren außerdem hochspezifische Transporter, die nur eine einzige Art von

Metallionen transportieren können, und die Pflanze aufgrund ihrer hohen Affinität selbst aus Umgebungen mit sehr geringen Konzentrationen mit ausreichend Ionen versorgen können. Ein gutes Beispiel in *A. thaliana* hierfür sind die COPT-Transporter (COPPER TRANSPORTER). Sie transportieren Cu^+ als Symporter mit Kalium aus dem umgebenden Substrat in die Zelle (Penarrubia et al. 2009). Die COPT-Transporter sind spezifisch für Cu^+ und Mitglieder der Familie sind auch in der Vakuolenmembran lokalisiert (Penarrubia et al. 2009; Puig et al. 2007a; Sancenon et al. 2003). Diese Transporter werden besonders stark unter Kupfermangel genutzt (Yamasaki et al. 2009).

II: Eine andere Möglichkeit mit Mangel umzugehen ist das Umschalten auf ein System, in dem ein anderes Metallion als Kofaktor genutzt wird. Es gibt verschiedene Beispiele für analoge Systeme, auf die die Zelle beim Mangel eines Kofaktors zurückgreifen kann.

So besitzen Cyanobakterien und auch einzellige Grünalgen wie *Chlamydomonas reinhardtii* das Protein Cytochrom c6. Es nutzt Eisen als Kofaktor und vollführt den Elektronenübertragungsschritt vom Cytochrom b_6f -Komplex auf das Photosystem I anstelle des kupferhaltigen PC (PLASTOCYANIN), wie es höhere Pflanzen nutzen. Im Gegensatz zu Cyanobakterien und einzelligen Grünalgen haben höhere Pflanzen wie *A. thaliana* kein eisenbasiertes Äquivalent für PC. Somit ist PC für die Photosynthese und das Überleben höherer Pflanzen essentiell (Abdel-Ghany 2009; Kropat et al. 2005; Page et al. 2009; Weigel et al. 2003).

Ein Beispiel für das Umschalten auf ein anderes Protein in höheren Pflanzen wie *A. thaliana* ist das von kupfer- und zinkbasierenden SODs auf eisenbasierende SODs. SODs katalysieren die Entgiftung von ROS (REACTIVE OXYGEN SPECIES), zu dem deutlich weniger reaktiven Wasserstoffperoxid. Sauerstoffradikale können bei hohen Lichtintensitäten oder auch Trockenstress während der Photosynthese entstehen, wenn die Elektronen nicht zusammen mit den Protonen aus der Photolyse des Wassers auf NADP^+ übertragen werden können. Anschließend entsorgen weitere Enzyme das Wasserstoffperoxid (Campbell 2001; Yamasaki et al. 2007; Yruela 2009).

Abbildung 1.2 zeigt die drei verschiedenen CSDs von *A. thaliana*. CSD1 ist im Zytosol, CSD2 im Chloroplastenstroma und CSD3 in den Peroxisomen an der Beseitigung von Superoxidradikalen beteiligt. CSD1 und CSD2 werden bei ausreichender Kupferversorgung auch als Speicher für Kupferionen in der Zelle verwendet, damit diese nicht frei in der Zelle sind. Unter Kupfermangel werden ihre Transkripte durch die *miR398* (*MIRCORNA398*) für

den Abbau gekennzeichnet und somit die Kupferionen für die CSDs für das PC aufgespart. Im Chloroplasten wird anstelle von CSD2 das eisenbasierende FSD1 genutzt, um die Superoxidradikale zu entsorgen. CSD3 ist in deutlich geringeren Mengen als CSD1 und CSD2 in der Zelle vorhanden und steht nicht unter der Kontrolle der *miR398* (Yamasaki et al. 2007). III: Als dritte Strategie kann die Pflanze auf nicht überlebenswichtige Prozesse, in denen kupferhaltige Proteine benötigt werden, verzichten. Unter ausreichend Kupfer ist beispielsweise die Expression von *PLANTACYANIN* sehr hoch in den Wurzeln, bei Kupfermangel wird es aber durch die *miR408* herunterreguliert. Es ist kein Äquivalent für *PLANTACYANIN* bekannt, das seine Funktion übernehmen würde (Yamasaki et al. 2009). Über *PLANTACYANIN* ist bis jetzt bekannt, dass es die Pollenschläuche vom Stigma durch den Griffel zu den Oozyten führt (Dong et al. 2005).

1.1.4 Aufnahme und Verteilung von Kupfer in der Pflanze

Bei höheren Organismen stehen nicht alle Zellen in direktem Kontakt zur Umwelt und somit nicht im Kontakt zu extern verfügbaren Nährstoffen. Für deren Aufnahme und Verteilung in der gesamten Pflanze wurden darauf spezialisierte Gewebe entwickelt. Dabei geschieht die Aufnahme von Metallionen in höheren Pflanzen fast ausschließlich über die Wurzeln und wird zum größten Teil über das vaskuläre Gewebe verteilt. Unter Bedingungen, in denen ausreichend Kupfer verfügbar ist, findet die Aufnahme hauptsächlich über ZIP2 und ZIP4 statt, zwei Transporter, die neben Kupfer auch Zink als zweiwertiges Kation transportieren (Abb. 1.2) (Guerinot 2000; Talke et al. 2006). Darüber hinaus kann Kupfer auch als einwertiges Ion von den COPT-Transportern im Symport mit Kalium aufgenommen werden. Allerdings ist der größte Teil an pflanzenverfügbarem Kupfer in der Form von Cu^{2+} und nicht als Cu^+ im Boden gelöst (Alloway 1995). Daher wird vermutet dass ein reduzierendes Enzym, wie ein FRO (FERRIC REDUCTION OXIDASE), wie es aus der Eisenaufnahme bekannt ist, das Kupfer umwandelt und somit für den Transport über COPTs bereitstellt (Yruela 2009). Am Transport von Kupfer aus dem Zytosol in die Organelle und aus der Zelle heraus sind die bereits erwähnten HMA-Transporter beteiligt. HMA1, HMA6/PAA1 (P-TYPE ATPASE) und HMA8/PAA2 transportieren Kupfer in den Chloroplasten und weiter in den

Thylakoidinnenraum zum Plastocyanin. HMA7 transportiert Kupfer in das trans-Golgi-Netzwerk zum Ethylenrezeptor ETR1 und HMA5 ist für den Transport aus der Zelle für die Entgiftung verantwortlich. HMA5 transportiert Kupfer auch in den apoplastischen Bereich, damit Zellen, die nicht über Plasmodesmata an das vaskuläre Gewebe angeschlossen sind, es aufnehmen können (Abb. 1.2) (Burkhead et al. 2009; Puig et al. 2007a; Puig and Penarrubia 2009; Williams and Mills 2005; Yruela 2009).

In der Zelle ist Kupfer als ungebundenes Metallion sehr toxisch, da es durch die leichte Bereitstellung eines Elektrons beim Oxidieren von Cu^+ zu Cu^{2+} Hydroxylradikale erzeugen kann, die wiederum die Zelle schädigen. Außerdem steht es am Anfang der so genannten Irving-Williams-Reihe, welche Aussagen über die relative Stabilität der gebildeten Metallionen-Komplexe macht. Somit bindet Kupfer am stärksten von allen Metallionen an Proteine und kann andere Metallionen verdrängen (Burkhead et al. 2009; Yruela 2009). Dadurch kann die Funktion der Proteine verändert oder verhindert werden, was bei einer Konformationsänderung der Proteine der Fall wäre. So ist beispielsweise beim Austausch von Zink gegen Kupfer in Zinkfingerproteinen eine Bindung an die DNA nicht mehr möglich (Yamasaki et al. 2004).

Freie Kupferionen in der Zelle können außerdem an Thiolgruppen von Proteinen binden, wodurch der Ladungszustand des Proteins verändert wird (Burkhead et al. 2009; Penarrubia et al. 2009; Puig et al. 2007a; Puig and Penarrubia 2009; Yruela 2009), was wiederum die Funktion des Proteins verändern kann. Deswegen ist es absolut wichtig, dass Kupfer in der Zelle nicht ungebunden vorkommt. Um das sicherzustellen, gibt es verschiedene Chaperone, die Kupfer binden und transportieren. Diese sind besonders gut in *A. thaliana* beschrieben (Abb. 1.2). So ist das Chaperon CCS (COPPER CHAPERONE FOR SUPEROXIDE DISMUTASE) für den Transport von Kupfer zu den CSDs verantwortlich. Für den Transport von Kupfer zu CSD2 in den Chloroplasten gibt es eine weitere Variante von CCS, die auf einem alternativen Schneiden der Exone beruht, so dass ein Signal für den Import und die weitere Translation im Chloroplasten angehängt wird (Chu et al. 2005; Puig et al. 2007b). Für ATX1 (ARABIDOPSIS HOMOLOG OF ANTI-OXIDANT 1), ein weiteres Kupfer-Chaperon, wurde gezeigt, dass es mit den HMAs interagieren kann (Puig et al. 2007b) und am Transport von Kupfer in die Vakuole, den Golgi-Apparat und den Chloroplasten beteiligt ist (Puig and Penarrubia 2009). Der Transport von Kupfer über das Phloem wird vermutlich durch das Chaperon CCH (COPPER CHAPERONE) durchgeführt (Mira et al. 2001). Es

kommt im Phloemsaft von *A. thaliana* vor und wird bei Kupfertransport benötigten Bedingungen, Seneszenz oder auch oxidativem Stress angereichert (Himmelblau and Amasino 2000; Puig et al. 2007b).

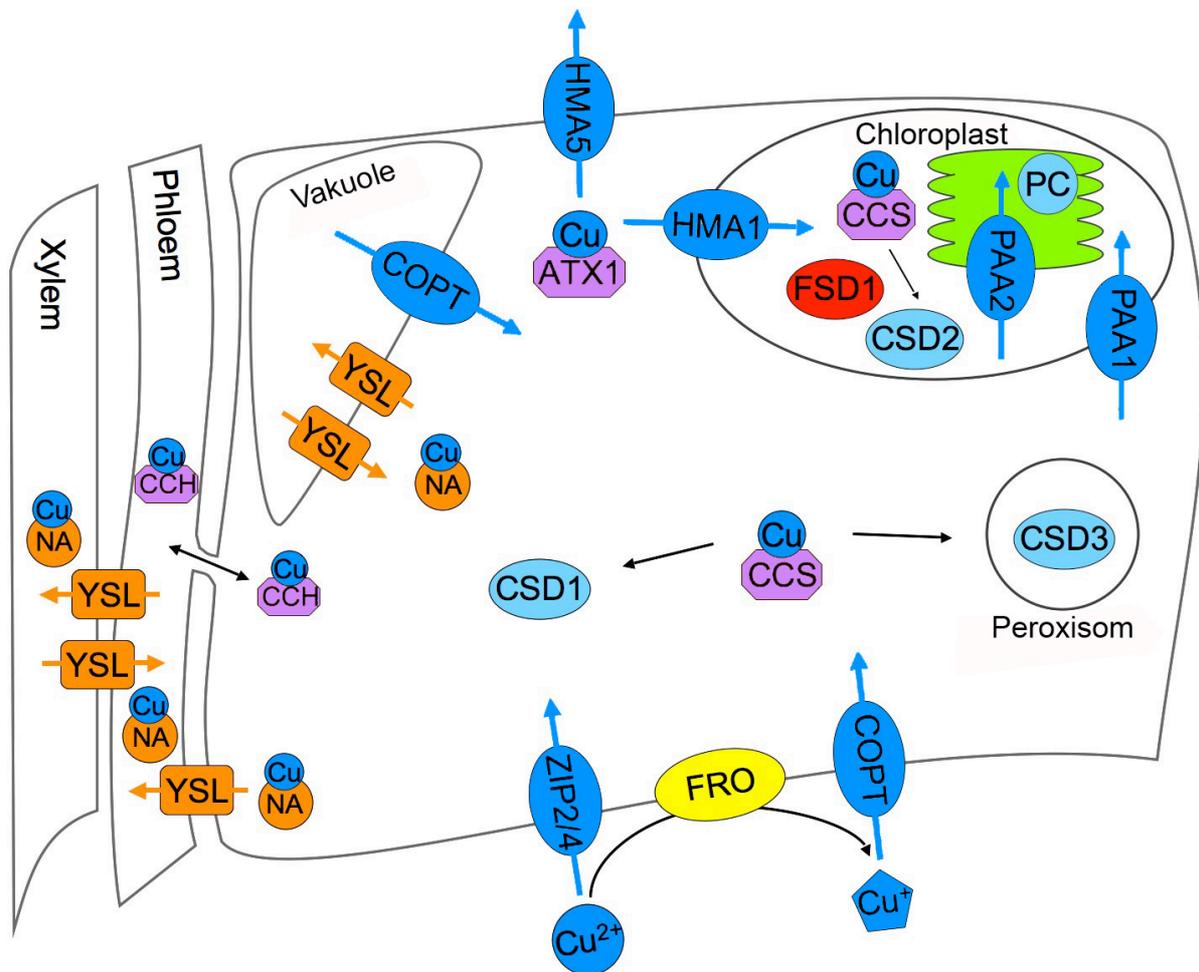


Abb.1.2: Aufnahme und Transport von Kupferionen in *A. thaliana*. Blau sind Kupferionen und Transporter für Kupferionen. Hellblau sind Enzyme und Elektronentransporter die Kupfer als Kofaktor benutzen. In gelb sind die FRO-Enzyme, die Kupfer reduzieren. In lila sind Chaperone für Kupfer dargestellt, in orange der Chelator Nicotianamin und die dazugehörigen Transporter und in rot FSD1, eine auf Eisen basierende Superoxid-Dismutase. Kombiniert aus (Burkhead et al. 2009; Curie et al. 2009; Yruela 2009)

Eine weitere Möglichkeit des sicheren Transportes und der Speicherung von Metallionen ist die Kopplung an Zitronensäure oder Chelatoren wie NA (NICOTIANAMINE) (Curie et al. 2009; Yruela 2009). NA bindet nicht nur Cu²⁺ sondern auch Eisen-, Zink-, Magnesium- und weitere Metallionen.

In gebundener Form sind die Metallionen ungefährlich und können in der Vakuole gespeichert werden (Curie et al. 2009). Für den Transport von diesen chelatierten Metallen gibt es die Familie der YSL-Transporter (YELLOW STRIPE LIKE). Diese besteht in *A. thaliana* aus neun Mitgliedern (Curie et al. 2009). Die unterschiedlichen YSLs sind in verschiedenen Geweben exprimiert, was eine Versorgung aller Zellen mit Metallionen gewährleistet. Auch Pollen, die keine Anbindung an andere Zellen über Plasmodesmata haben, können mit Hilfe der YSL-Transporter Kupfer importieren (Curie et al. 2009; DiDonato et al. 2004; Schaaf et al. 2005; Waters et al. 2006).

Die Aufrechterhaltung der Kupfer-Homöostase einer Zelle und auch eines gesamten Organismus ist, neben der Notwendigkeit von Kupfer als Kofaktor für Enzyme, wichtig, da Kupfer in ungebundener Form ebenfalls toxisch sein kann. Diese Homöostase wird über verschiedene Transporter für In- und Export, Transport in der Pflanze oder auch das Anlegen von Speichern in Vakuolen oder über Speicherproteine gewährleistet. Des Weiteren müssen Pflanzen und die einzelnen Zellen die Verteilung von Kupfer je nach der ihnen zur Verfügung stehenden Konzentration koordinieren, um mit ihm Haushalten zu können. Für *A. thaliana* sind viele dieser Gene, die dabei helfen die Kupfer-Homöostase aufrecht zu erhalten, bekannt. Die Regulation von ihnen erfolgt mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren (Burkhead et al. 2009; Pilon et al. 2009; Yruela 2009).

Der erste Transkriptionsfaktor, der mit dem Kupferhaushalt einer Pflanze in Verbindung gebracht wurde, ist *CRR1* (*COPPER RESPONSE REGULATORY*) aus *Chlamydomonas reinhardtii* (Kropat et al. 2005; Yruela 2009). Er gehört zu der Familie der SBP-Box-Gene. Es wurde gezeigt, dass CRR1 als Transkriptionsfaktor direkt an so genannte CuREs (Cu Response Elements) bindet (Kropat et al. 2005). CuREs sind konservierte Bereiche in Promotoren von Genen, die bei Kupfermangel aktivierend auf die Transkription ihres Gens wirken. Im Fall von *Cyc6* bestehen sie aus ca. 40bp mit dem Kernmotiv GTAC. Der Austausch einer einzigen Base dieser Kernsequenz zerstört die Funktion der CuREs und das Gen wird bei Kupfermangel nicht höher transkribiert (Quinn et al. 2000). Wenn das Gen *CRR1* mutiert ist, kann die Grünalge nicht mehr auf Kupfermangel reagieren und die entsprechenden Gene werden nicht korrekt reguliert. Dies bedeutet, dass das oben beschriebene Umschalten von dem kupferbasierten PC auf das eisenbasierte *Cyc6* nicht mehr stattfindet und das Wachstum von *Chlamydomonas* stagniert (Kropat et al. 2005; Merchant et al. 2006; Page et al. 2009).

Erst kürzlich wurde *SPL7* (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 7*) in *A. thaliana* als das homologe Gen von *CRR1* in *Chlamydomonas* beschrieben (Yamasaki et al. 2009). Bei Kupfermangel werden abhängig von *SPL7* mehrere Protein-kodierende Gene, wie *FSD1*, *CCH*, *COPT1* und *COPT2* aktiviert (Abb. 1.2) (Yamasaki et al. 2009). Des Weiteren bindet *SPL7* auch an GTAC-Sequenzen von verschiedenen Genen die für miRNAs kodieren. Diese regulieren ihrerseits diverse für kupferhaltige Proteine kodierende Gene wie *CSD1* und *CSD2* (Abb. 1.2). Somit ist *SPL7* für die Regulation der Kupfer nutzenden CSDs und die Aktivierung der Eisen nutzende FSD im Chloroplasten zuständig (Yamasaki et al. 2007; Yamasaki et al. 2009).

1.2 SBP-Box-Gene in höheren Pflanzen

Die SBP-Box-Gene (*SQUAMOSA PROMOTOR BINDING PROTEIN*) bilden eine recht heterogene Familie von Transkriptionsfaktoren, die pflanzenspezifisch (Birkenbihl et al. 2005) und von der einzelligen Alge *Chlamydomonas* (Kropat et al. 2005) über das Moos *Physcomitrella patens* (Riese et al. 2007) sowie Monokotyledonen wie Mais (Cardon et al. 1999) oder Reis (Guo et al. 2008) beschrieben sind. Auch aus Eudikotyledonen wie der Modellpflanze *A. thaliana* sind sie bekannt. Die Familie der SBP-Box Gene wurde zuerst für *Anthriscum* beschrieben. Sowohl SBP1 als auch SBP2 erkennen spezifisch die Sequenz GTAC in der Promotor-Region des Blütenmeristemidentitäts-Gens *SQUAMOSA* (*SQUA*). *SQUA* ist das Homolog von *Anthriscum majus* zu *APETALA1* (*API*) in *A. thaliana* (Klein et al. 1996). Daher werden die Mitglieder dieser Familie in *A. thaliana* SPL-Gene (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE*) genannt (Cardon et al. 1999). GTAC scheint auch in *A. thaliana* die Kernsequenz zu sein, die die Transkriptionsfaktoren in Promotoren aber vermutlich auch in intronischen Sequenzen als Bindemotiv erkennen (Yamaguchi et al. 2009). Dieses scheint teilweise vergrößert worden zu sein, denn *SPL3* präferiert CGTAC als Bindungssequenz (Birkenbihl et al. 2005; Liang et al. 2008) und für *SPL14* wurde CCGTAC(A/G) beschrieben (Nagae et al. 2008).

Die SBP-Box codiert für zwei Zinkfinger. Der zweite Zinkfinger hat das Motiv CxxCxxxHxxxxxxxxxxC und ist in allen bekannten SBP-Domän-Proteinen hoch

konserviert. Der erste Finger hat das Motiv CxxxxCxxxxxxxxxxxxxxxxxxCxxH und ist ebenfalls von der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* bis zu den höheren Pflanzen hochkonserviert. Der Austausch von Aminosäuren im zweiten Zinkfinger haben gezeigt, dass er für die Spezifität der DNA-Bindung zuständig ist, wohingegen der erste hauptsächlich für die Struktur der SBP-Domäne gebraucht wird (Yamasaki et al. 2006). Nur die SPL7-ähnlichen Proteine haben im zweiten Zinkfinger statt Histidin ein Cystein (Birkenbihl et al. 2005).

Die SBP-Box-Familie in *A. thaliana* im Ekotyp Columbia umfasst 17 Mitglieder, die nur die SBP-Box als konserviertes Motiv miteinander gemeinsam haben. Die SPL-Gene können grob in zwei Gruppen aufgeteilt werden.

Die erste besteht aus den komplexer strukturierten SPL-Genen, die aus zehn Exons aufgebaut sind. Zu ihnen gehören *SPL1*, *SPL12*, *SPL14*, *SPL16* und *SPL7*. Alle von diesen Genen kodierten Proteine haben, neben der DNA-bindenden SBP-Domäne, weitere konservierte Domänen: Eine, die dem AHA-Motiv ähnlich ist und wahrscheinlich aktivierend auf die Transkription wirkt, eine noch funktionell unbekannt Domäne mit den konservierten Aminosäuren IRPGC und eine *in silico* vorhergesagte Transmembran-Domäne. Alle bis auf *SPL7* haben zusätzlich konservierte Ankyrin-Wiederholungen die für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sein könnten (Riese et al. 2007).

Die zweite große Gruppe der *SPL*-Gene umfasst *SPL2*, *SPL3*, *SPL4*, *SPL5*, *SPL6*, *SPL8*, *SPL9*, *SPL10*, *SPL11*, *SPL13A*, *SPL13B* und *SPL15* und sind mit 2-4 Exons im Vergleich zur ersten Gruppe weniger komplex strukturiert (Riese et al. 2007). Obwohl diese Gruppe weniger einheitlich ist und ihre Mitglieder, soweit bekannt, unterschiedliche Funktionen erfüllen können, stehen alle, bis auf *SPL8*, unter der Kontrolle der mikroRNAs *miR156* und *miR157* und waren bis jetzt im Fokus des Interesses der Forschung. Da insgesamt elf Gene durch diese miRNAs kontrolliert werden, und Einzelmutanten durch Redundanz häufig keinen oder nur einen sehr schwachen phänotypischen Unterschied zum Wildtyp aufweisen, werden Überexpressoren der Loci der *miR156* und Überexpressoren der entsprechenden SPL Gene in die Analyse mit einbezogen.

SPL3, *SPL4* und *SPL5* führen, wenn sie unter dem CaMV 35S Promotor konstitutiv exprimiert werden und ihre miRNA-Bindestelle im 3'-UTR mutiert wurde, zu einem verfrühten Wechsel zur reproduktiven Phase und bilden dadurch früher als der Wildtyp Blüten (Gandikota et al. 2007). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die Blütezeit in den

entsprechenden Überexprimierern nicht so deutlich früher als im Wildtyp beginnt, solange die miRNA-Bindestelle intakt ist, obwohl die Gene unter dem CaMV 35S Promoter exprimiert werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die *miRNA156/157* ein verfrühtes Blühen, durch Überexpression der entsprechenden SPL-Gene, unterdrückt (Cardon et al. 1997; Gandikota et al. 2007; Wu and Poethig 2006). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass SPL3 direkt die Blütenmeristem-Identitätsgene *FRUITFUL*, *LEAFY* und *APETALA1* aktiviert. Des Weiteren ist SPL3 an einem zusätzlichen Kontrollweg für die Bestimmung der Blütezeit beteiligt, der nicht von dem Signalweg für Photoperiode, Lichtqualität, Vernalisierung oder dem des Pflanzenhormons Gibberellin abhängig ist (Wang et al. 2009; Wu et al. 2009; Yamaguchi et al. 2009).

Die T-DNA-Insertionsmutanten in *spl9*, *spl15*, die Doppelmutante *spl9spl15* und zusammen mit einem konstitutiven *miR156b*-Überexprimierer (*35S::miR156b*; (Schwab et al. 2005)), zeigen ein verkürztes Plastochron. Außerdem ist die juvenile Phase in diesen Mutanten gegenüber dem Wildtyp verlängert (Schwarz et al. 2008; Wang et al. 2008).

In Mutanten von *SPL8*, dem einzigen SPL-Gen der zweiten Gruppe das nicht unter der Kontrolle einer miRNA steht, ist die Entwicklung der Pollensäcke gestört, sodass die ersten Blüten steril sind und die Pflanzen immer eine geringere Samenproduktion gegenüber dem Wildtyp aufweisen (Unte et al. 2003).

Was die erste Gruppe der SPL-Gene betrifft, so ist deren Funktion im Vergleich zu der zweiten hauptsächlich unerforscht. Es ist lediglich eine Verbindung von SPL1 und SPL12 mit der Resistenz in Tabak gegen das Tabak-Mosaik-Virus beschrieben (Shen and Schulze-Lefert 2007). T-DNA Mutanten in *SPL14* haben eine erhöhte Resistenz gegenüber Fumonisin B1, einem Pilztoxin, und ihre Rosettenblätter sind stärker gelappt als im Wildtyp. GUS-Konstrukte zeigen eine Expression von *SPL14* hauptsächlich im vaskulären Gewebe (Stone et al. 2005). Dennoch ist die Funktion der SPL-Gene dieser Gruppe weitestgehend unbekannt.

1.3 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die molekulargenetischen Mechanismen in die das *A. thaliana* SBP-Box Gen *SPL7* involviert ist, zu erforschen. Hierbei deutete sich schon eine mögliche funktionelle Beziehung zu Kupfermangel an, da ein eng verwandter Transkriptionsfaktor in *Chlamydomonas*, CRR1, unter diesen Bedingungen aktiviert wird und das Umschalten in der Photosynthese von PLASTOCYANIN auf CYTOCHROM C6 initialisiert (Kropat et al 2005). In den letzten Jahren ist das Puzzle um die Kupfer-Homöostase in *A. thaliana* immer weiter zusammengetragen worden und auch *SPL7* wurde als ein Regulator bei Kupfermangel identifiziert (Yamasaki et al. 2007; Yamasaki et al. 2009). Die während dieser Dissertation durchgeführten Versuche helfen dabei, dieses Puzzle zusammensetzen und zu vervollständigen.

Hierfür wurden *spl7*-Mutante Pflanzen, komplementierte Linien und der Wildtyp auf unterschiedlichen Substraten mit unterschiedlichen Konzentrationen an Kupfer und in verschiedenen Tageslängen kultiviert und genau charakterisiert. Die phänotypischen Unterschiede, die dabei beobachtet wurden, zusammen mit einer differentiellen Transkriptom-Analyse beweisen die vorher ungeahnten Reichweite, in der *SPL7* an der Aufnahme, Verteilung und Homöostase von Kupfer beteiligt ist.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Sämtliche Chemikalien und Antibiotika wurden von den folgenden Firmen bezogen:

BioRad (USA), Clontech (Deutschland), Difco Lab (USA), Duchefa (Niederlande), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), MBI Fermentas (Deutschland), Merck (Deutschland), Pharmacia (USA), Promega (Deutschland), Roche (Deutschland), Roth (Deutschland) and SigmaAldrich (Deutschland).

2.1.2 Enzyme und Co

Die verwendeten Restriktionsenzyme und die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase wurden von New England Biolabs (USA) bezogen. T4 DNA Ligase, RNase Inhibitor und RNase freie DNase kamen von Roche (Deutschland). Superscript II Reverse Transkriptase wurde von Invitrogen (Deutschland), dNTPs und die 1kb DNA-Leiter von Fermentas (Deutschland) bezogen.

Die Enzyme wurden, falls nicht anders angegeben, nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

2.1.3 Lösungen und Puffer

Tris-Lösung

1M Tris pH=8

EDTA-Lösung

0,5M EDTA pH=8

Blauladepuffer (5x)

2% Bromphenolblau

30% Glycerin

50mM EDTA

25mM Tris

pH=8

TELT-Lösung

50mM Tris pH=8

62,5mM EDTA

2,5M LiCl

0,4% Triton X 100 (Nach dem Autoklavieren)

Lysozym-Lösung

10mg/ml Lysozym

10mM Tris pH=8

0,1mM EDTA pH=8

RNase Lösung

10µg/ml RNase
10mM Tris
1 mM EDTA
pH=8

TE (Tris/EDTA)-Puffer

10mM Tris
1 mM EDTA
pH=8

Edwards Puffer

200mM Tris pH=8
0,25M NaCl
25mM EDTA
0,5% SDS
pH=7,5

CTAB Puffer

100mM Tris pH=8
1,4M NaCl
20mM EDTA pH=8
2% CTAB

Pepton Medium

1,6% Pepton / Trypton
1% Hefeextrakt
0,5% NaCl
wahlweise 1,5% Agar

LB Medium

0,5% Hefeextrakt

1% Trypton

0,5% Kochsalz

pH=7

wahlweise 1,5% Agar

YEB Medium

0,5% Rinderextrakt

0,1% Hefeextrakt

0,1% Peptonmedium

0,5% Saccharose

pH=7,4

wahlweise 1,5% Agar

2mM MgSO₄ (nach dem Autoklavieren hinzugeben)

Infiltrationsmedium

2,205g/l MS Salze (mikro und makro)

50µl/l B5 Vitamine

5% Saccharose

pH=5,7

200µl/l SILWET L-77

MS-Medium für Gewebekultur

0,22% MS-Medium mit Vitaminen

0%, 1% oder 3% Saccharose

0,8% Agar Kobel

pH=5,8

Ethidiumbromid-Lösung 5%

Ethidiumbromid: 5g

Wasser bidest.: auf 100ml auffüllen

2.1.4 Oligos

Sämtliche Oligos wurden von Operon bestellt und in 10mM Tris pH=8 als 100mM Stock gelagert.

2.1.5 Verwendete Organismen:

Escherichia coli: DH5 α

Agrobacterium tumefaciens: GV3101 (pMP90RK) (Koncz 1986)

A. thaliana Columbia-0 Wildtyp

A. thaliana Columbia-0 SALK_093849 (*spl7-1*) (Alonso et al. 2003)

A. thaliana Columbia-0 SALK_125385 (*spl7-2*) (Alonso et al. 2003)

2.1.6 Verwendetes Plasmid

pGJ2148 freundlicher Weise von Guido Jach zur Verfügung gestellt

2.1.7 Mischungsverhältnis der normalen Erde

8 Säcke Minitray (Balster Einheitserdewerk GmbH, Fröndenberg, Deutschland)

800ml Osmocote Start (Düngekügelchen; Scotts-Sierra, USA)

250g BioMükk® (gegen Insekten; Biofa, Münsingen, Deutschland)

auf 50 l Wasser

2.2 Methoden

Falls nicht anders aufgeführt, wurden die Methoden so durchgeführt wie es in der Anleitung des dazugehörigen Kits steht.

2.2.1 Standardmethoden für die Isolation und Behandlung von DNA

„Quick and dirty“ DNA Isolierung

Ein kleines Stück Pflanzenmaterial $\leq 0,25\text{cm}^2$ in einem Eppendorfgesäß legen

+ 500 μL Edwards Puffer

Zermörsern

2min 13.000 rpm zentrifugieren

350 μL des Überstandes in ein neues Eppendorfgesäß überführen

+350 μL Isopropanol und kurz vortexen

2min bei Raumtemperatur

5min 13.000 rpm zentrifugieren

Überstand abnehmen und verwerfen

2x mit 70% Ethanol waschen

Eppendorfgesäß 10min an der Luft bei RT trocken lassen

Pellet in 100 μL TE aufnehmen

Edwards DNA

Ein ca. 4 mm² großen Stück von einem Blatt in ein Eppendorfggefäß zusammen mit zwei Metallkügelchen legen und in flüssigem Stickstoff einfrieren

In der Kugelrätische von Qiagen (Deutschland) für eine Minute bei 30 Bewegungen pro Sekunde zerkleinern

400µl EB hinzugeben und 5 sec vortexen

5 min bei 13.000 rpm bei RT runterzentrifugieren

250µl des Überstandes abnehmen und mit 250µl 100% Isopropanol mischen

5 min 5 min bei 13.000 rpm bei RT runterzentrifugieren

Überstand verwerfen

Zweimal mit 70% Ethanol waschen (+500µl 70% EtOH, 13:000 rpm, Überstand verwerfen)

Pellet für 5 min bei RT trocknen lassen

Wiederaufnahme des Pellets in 200 µl TE

DNA kann über ein Jahr bei 4°C aufgehoben werden

C-TAB genomische DNA

Mit dieser Methode wird die DNA sehr geschont und sie eignet sich besonders für das Klonieren von größeren Fragmenten

1-1,5g Pflanzenmaterial ernten und unter flüssigem Stickstoff zermörsern

10ml C-TAB-Puffer hinzugeben, gründlich resuspendieren und bei gelegentlichem Schütteln für 30 min bei 60°C inkubieren

1 Volumen Chloroform hinzugeben, schütteln und bei 4000 rpm zentrifugieren

zum Überstand 1/10 Volumen einer 3 molaren Natriumacetat-Lsg. und 0,8 Volumen 100% Isopropanol geben

5 min bei RT Fällern

15 min bei 4000 rpm pellettieren und den Überstand verwerfen

Pellet zweimal mit 70% Ethanol waschen (+5ml 70% EtOH, 10 min 4000 rpm)

Pellet im Liegen trocken lassen und in 1880µl TE mit 3,8µl RNase (10mg/ml) lösen und für 30 min bei 37°C inkubieren

120µl einer fünf molaren NaCl-Lsg. hinzugeben und schütteln

Eine Qiagen Tip20 Säule mit 1ml QBT äquilibrieren

Die Probe auftragen

Zweimal mit 1 ml QC waschen

Zweimal die Säule mit 400µl QF eluieren

Zum Eluat werden 500µl 100% Isopropanol hinzugegeben

30 min bei 13.000 rpm, den Überstand verwerfen

Zweimal Waschen mit 70% Ethanol (1ml 70% EtOH, 10 min 13.000 rpm)

Das Pellet für 5 min an der Luft trocken

Das Pellet in 50-100µl TE aufnehmen

Aufreinigung von PCR-Fragmenten aus 0,8-1% Agarosegelen durch das Fermentas Silica-Beats DNA-Extraktions Kit

Ausschneiden der Bande aus dem Agarosegel und mit dem dreifachen Volumen an „Binding Solution“ mischen

5 min im Heizblock bei 55°C lösen; Immer wieder vortexen

5µl Silica-Lsg. hinzugeben

5 min im Heizblock bei 55°C; jede Minute kurz vortexen um die Lsg. homogen zu halten

5 sec bei 13.000rpm die Silica-Beats herunterzentrifugieren, den Überstand verwerfen

500µl eiskalter Wasch-Lsg. hinzugeben und pipettieren / vortexen bis die Silica-Beats wieder homogen verteilt sind

5 sec bei 13.000rpm die Silica-Beats herunterzentrifugieren, den Überstand verwerfen
insgesamt viermal „waschen“

10-15 min das Pellet an der Luft trocknen

die DNA von dem Pellet mit H₂O /TE über drei Aliquots lösen

jeweils 5 min bei 55°C lösen, herunterzentrifugieren und den Überstand sammeln

die zusammengeführten Aliquots erneut zentrifugieren um restliche Silica-Beats zu entfernen

Plasmidminiprep nach der TELT-Methode

Bakterienkolonien picken (oder 10µl aus dem PCR-Röhrchen vom Kolonien checken) und ein

15ml Falcon mit 8ml Medium mit Antibiotikum animpfen

Über Nacht bei 37°C schütteln

1ml der Kultur in einem Eppendorfgefäß bei 13.000 für 2 min runterzentrifugieren und den Überstand verwerfen

Das Bakterienpellet in 200µl TELT-Lösung die 1mg/ml Lysozym enthält lösen

5 min bei 37°C inkubieren

3 min bei 95°C inkubieren

5 min auf Eis kühlen

15 min bei 13.000rpm bei 4°C runterzentrifugieren und das schleimige Pellet mit einem autoklavierten Zahnstocher entfernen

Zum Überstand 100µl 100% Isopropanol geben und gut mischen

15 min bei 13.000 bei 4°C zentrifugieren und den Überstand verwerfen

Pellet zweimal in 200µl 70% EtOH waschen (5 min 13.000rpm; Überstand verwerfen)

Das Pellet trocken und in 50µl TE mit 10µg/ml RNase auf einem Schüttler lösen

Das Pellet für mindestens eine Nacht bei 4°C weiter lösen

Nach Umpufferung kann man das Plasmid zum Sequenzieren und Klonieren einsetzen (Lösungen für Sequenzierungen dürfen kein EDTA enthalten).

Plasmidmidiprep

Plasmidmidipreps wurden mit dem Kit von Qiagen nach dem dazugehörigen Protokoll durchgeführt

Schneiden mit Restriktionsenzymen

Ansatz: 2µg Vektor oder aufgereinigtes PCR-Fragment

Minimumansatz: 30 µl

10-20 Einheiten des Restriktionsenzym verwenden

Mindestens 90 min bei 37°C schneiden lassen

Falls mehrere Fragmente entstehen, muss der Ansatz vor der Ligation über ein Gel aufgereinigt werden (danach Gelaufreinigung über Silica-Beats)

Dephosphorilieren

Der Ansatz sollte ca. 100µl betragen

10µl Puffer

5µl alkalische Phosphatase

30 min bei 37°C

20 min bei 65°C für die Inaktivierung der Phosphatase

Ligation mit der T4-DNA-Ligase von Roche

Nachdem der Vektor und das zu inserierende DNA-Fragment mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten wurden, werden sie in einem molaren Verhältnis von Vektor zu DNA-Fragment (1 / 3-5) gemischt

Vektor:	200ng	Max 1µg
DNA-Fragm.:	3-5 fache des Vektors	Max 1µg
Ligase:	1-5 Einheiten	
Puffer:	1µl	
H ₂ O:	X	
<hr/>		
Gesamt:	10-30µl	

Die Ligation wird im Kühlschrank bei 4°C über Nacht durchgeführt

Dialyse des Ligationsansatzes

Für eine spätere Verwendung des Ligationsansatzes für eine Elektrottransformation muss ein Großteil der Ionen des Puffers entfernt werden, damit die Elektroporation der Bakterien erfolgreich ist und nicht „durchknallt“

Eine Dialysemembran auf einen Wasserfilm (bidest.) in eine Petrischale legen und 20 min warten

Bakterientransformation

Elektroküvette, Eppendorfgefäße und Medium auf Eis vorkühlen

Aliquotierte (40-50µl) Bakterienzellen auf Eis auftauen

10-15µl des dialysierten Ligationsansatzes zu den Bakterien geben und vorsichtig mischen (leicht schnippen oder mit der Pipette rühren, auf keinen Fall hoch und runter pipettieren)

Elektroporation in Eppendorf Elektroporator 2510:

1mm Küvette: 1600-1800V

2mm Küvette: 2400-2800V

Nach der Elektroporation sofort 0,5ml eiskaltes Medium zum Ansatz hinzugeben und in ein leeres Eppendorfgefäß überführen. Diesen Schritt wiederholen.

Den Ansatz ca. 60 min bei 37°C schütteln

Jeweils 100 und 500µl des Ansatzes auf Agarplatten mit Restriktionsenzymen überführen und ausplattieren

E. coli: Platten 14 Stunden bei 37°C inkubieren, danach Kolonien picken

A. tumefaciens: Platten zwei Tage bei 28°C inkubieren, danach Kolonien picken

2.2.2 Standardmethoden für die Isolation und Behandlung von RNA

RNA-Isolation

RNA-Isolation wurde mit dem RNeasy-Kit von Qiagen durchgeführt.

DNase-Verdau

DNase-Verdau erfolgte mit der RNase freien DNase recombinant I von Roche unter Verwendung des RNase Inhibitors von Roche.

Erststrangsynthese

Erststrangsynthese erfolgte über die Verwendung der Superscript II von Invitrogen unter Verwendung des RNase Inhibitors von Roche.

2.2.3 Methoden zur Fällung von DNA und RNA

Isopropanolfällung:

1/10 Volumen 3M NaAcetat-Lsg. pH=5.2

1 Volumen 100% Isopropanol

15-30 min auf Eis

30 min zentrifugieren mit 14.000 rpm bei 4°C

Überstand verwerfen

500µl 70% Ethanol zum Pellet geben

10 min bei 4-10°C stehen lassen

für 10 min 14.000 rpm bei 4°C zentrifugieren

Überstand verwerfen

5-10 min bei Raumtemperatur trocknen

Pellet im gewünschten Volumen TE, Tris oder H₂O aufnehmen

Ethanol-fällung:

1/10 Volumen 3M KaAcetat-Lsg. pH=7,5

2,5 Volumen 100% Ethanol

15-30 min auf Eis

40 min 14.000 rpm 4°C

Überstand verwerfen

500µl 70% Ethanol zum Pellet geben
10 min bei 4-10°C stehen lassen
für 10 min 14.000 rpm bei 4°C zentrifugieren
Überstand verwerfen
5-10 min bei Raumtemperatur trocknen
Pellet im gewünschten Volumen TE, Tris oder H₂O aufnehmen

Hochsalzfällung:

1 Volumen 4M Ammoniumacetat-Lsg. pH=6
4 Volumen 100% Ethanol
40 min 14.000 rpm 4°C
Überstand verwerfen
500µl 70% Ethanol zum Pellet geben
5 min bei 4-10°C stehen lassen
für 5 min 14.000 rpm bei 4°C zentrifugieren
Überstand verwerfen
Waschschritt wiederholen
5-10 min bei Raumtemperatur trocknen
Pellet im gewünschten Volumen TE, Tris oder H₂O aufnehmen

2.2.4 Polymerase Kettenreaktion

PCR mit der Taq Polymerase von Ampliquon

Für PCRs um den Genotyp über ein folgendes Agarosegel zu testen

PCR-Mix

H ₂ O:	16,7 µl
Puffer 5x:	2 µl
10nM dNTP's:	0,25 µl
Oligo 1:	0,25 µl
Oligo 2:	0,25 µl
Matritze ca. 50-100ng:	0,5 µl
Polymerase:	0,3 µl
Gesamt:	20 µl

PCR-Programm:

Schritt	Temp. °C	Zeit sec.	Zyklen
1	95	180	1
2	95	30	
3	58	30	38
4	72	60-180	
5	72	420	1

PCR: PHUSION Polymerase

Für PCRs dessen Produkte in Vektoren kloniert werden sollen da die Polymerase „Korrektur“ liest

Ansatz für Ligationen: 50-100µl

H ₂ O:	32 µl
Puffer 5x:	10 µl
10nM dNTP's:	1 µl
Oligo 1:	3 µl
Oligo 2:	3 µl
Matritze ca. 50-100ng:	0,5 µl
Polymerase:	0,5 µl
Gesamt:	50 µl

PCR-Programm:

Schritt	Temp. °C	Zeit sec.	Zyklen
1	98	60	1
2	98	10	
3	62	15	32
4	72	30-140	
5	72	600	1

Transformierte Kolonien checken nach Judith Schleppenbäumer

PCR-Streifen mit 100µl Medium mit Antibiotikum füllen

Kolonien mit weißen Pipettenspitzen picken und in die PCR-Röhrchen stellen

3min warten und zwischendurch die Pipettenspitzen drehen

PCR-Streifen schließen und 300 min auf dem „Roller“ bei 37°C

Für die PCR jeweils 1µl des Ansatzes als Matritze einsetzen

2.2.5 Quantitative Echtzeit-PCR

PCR-Mix:

SYBR-Green Master Mix	12,5µl
2,5mM Oligo A	1,25µl
2,5mM Oligo B	1,25µl
cDNA	10µl
Gesamt	25µl

Programm mit Schmelzkurve:

Schritt	Temp. °C	Zeit sec.	Zyklen
1	95	180	1
2	95	10	
3	58	30	45
4	72	45	
5	95	180	1
5	55	180	1
7	55-95	Schmelzkurve	

Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der Biorad Software des iQ5 Thermocyclers

2.2.6 Solexa-Sequenzierung

Die Solexa-Sequenzierung wurde von der Firma FASTERIS SA (Plan-les-Ouates, Switzerland) mit dem „Illumina Solexa Genome Analyzer“ durchgeführt

2.2.8 Färbung mit basischem Fuchsin

Entfärben der Präparate mit 70% EtOH bei 60°C für zwei Tage

EtOH wechseln bis keine Färbung mehr auftritt

Entfärbtes Material in Leitungswasser waschen bis man keinen kein EtOH mehr riechen kann
ca. 2h

12h (oder über Nacht) bei 60°C in (1% Diamantfuchsin 10% NaOH) färben

12h (oder über Nacht) durch leicht fließendes Leitungswasser waschen bis es sich
nicht mehr färbt

Entwässerung und Entfernung von Überschüssigem Farbstoff über eine Ethanolreihe (50%,
70% und 92%) erst in die nächst höhere EtOH-Stufe überführen wenn sich die Lösung
nicht mehr färbt

Material wieder über rückläufige EtOH-Reihe wässern und in 30% Glycerin lagern

Material in 30% Glycerin auf Objektträgern anordnen und Deckgläschen mit Nagelack
abdichten

Abgewandelt nach: Fuchsin staining with NaOH clearing for lignified elements of whole
plants or plants organs CH. Fuchs Biotechnic & Histochemistry Jan 1963, Vol. 38, No. 3,
Pages 141-144

2.2.9 Konzentrationen von Antibiotika

Antibiotikum	Stamm-Lösung	verwendete Konzentration
Ampicillin	50 mg/ml in Wasser	100 mg/l
Kanamycin	50 mg/ml in Wasser	250 mg/l
Spectomycin	50 mg/ml in Wasser	50 mg/l
Riffampicin	25 mg/ml in DMSO	100 mg/l
Gentamycin	25 mg/ml in Wasser	25 mg/l
Carbancillin	50 mg/ml in Wasser	50 mg/l

2.2.10 Wachstumsbedingungen für Pflanzen

	Lichtintensität MW [$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$]	Tageslänge [h]	Temperatur [°C]		relative Luft- feuchtigkeit [%]
			Tagsüber	Nachts	
Lichtraum 'Mäusekeller' (LD)	99	16	22	18	50
Lichtraum 'Keller' (SD)	290	8	20	18	50
Vötsch 3 (SD)	300	9	20	18	50
Vötsch 4 (LD)	207	16	20	18	50
Vötsch 8 (CL)	309	24	20		50

Sämtliche Pflanzen wurden für mindestens vier Tage stratifiziert (4°C und dunkel). Dieses erfolgte wahlweise auf Erde, feuchtem Filterpapier oder auf Agarplatten. Die Aufzucht erfolgte in Klimakammern (siehe Tabelle). Pflanzen die transformiert wurden waren entweder Col-0 Wildtyp oder homozygot für *spl7-2*.

2.3 Statistik

Student's t-Test für die signifikanten Phänotypischen Unterschiede

Der Student's t-Test wurde über die Funktion von Excel durchgeführt mit zweiseitiger Verteilung und unterschiedlichen Varianzen der beiden zu vergleichenden Gruppen.

Auswertung der Solexa-Daten

Die statistische Auswertung der Solexa-Daten wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Pellegrini (UCLA, USA) durchgeführt (Allison et al. 2002; Audic and Claverie 1997; Bullard et al.).

3 Ergebnisse

3.1 T-DNA Insertionslinien und komplementierte Linien

Um die Funktion von *SPL7* zu studieren, wurden vier verschiedene T-DNA-Insertionslinien für *SPL7* vom Nottingham *A. thaliana* Stock Centre (NASC) bezogen und analysiert. Für die Linie „SAIL_1236_A11“ lag die T-DNA Insertion im putativen Promotorbereich vor der kodierenden Sequenz von *SPL7* und zeigte keine Änderung des Phänotyps im Vergleich zum Wildtyp. Für die Linie „SALK_109908“ konnte die angegebene T-DNA-Insertion in *SPL7* nicht nachgewiesen werden. Die Linien *spl7-1* (SALK_093849) und *spl7-2* (SALK_125385) allerdings wiesen eindeutige morphologische Änderungen im Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp (Ekotyp Col-0) auf. Der mutante Phänotyp dieser beiden Linien wird später noch beschrieben. Die Position der T-DNAs im Gen ist in Abbildung 3.1.1 dargestellt, zusammen mit den konservierten Motiven von *SPL7* (Riese et al. 2007).

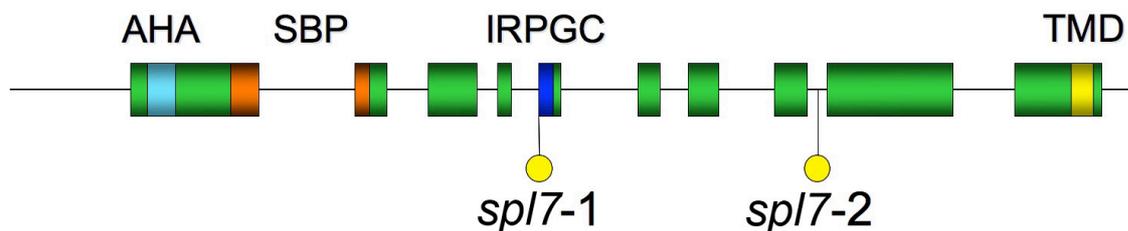


Abb. 3.1.1: Darstellung der Intron und Exon Struktur von *SPL7*. Die beiden untersuchten T-DNA-Insertionsmutanten von SALK sind mit ihrer genomischen Position als gelbe Kreise angezeigt. In den folgenden Farben sind kodierende Bereiche dargestellt: hellblau: AHA-Motiv; rot: SBP-Motiv, dunkelblau: IRPGC-Motiv; gelb: Motiv der in silico vorhergesagten Transmembran-Domäne.

Die von NASC gelieferten Samenlinien waren heterozygot für ihre Insertionen in *SPL7*, so dass unter deren Nachkommen nach homozygoten Linien gesucht wurde. Für diesen Test wurden die Kombinationen von Oligonukleotiden aus Tabelle 3.1.1 für die Polymerase-Kettenreaktionen (Abb. 3.1.2) verwendet. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass zum Nachweis einer wildtypischen Sequenz in der Linie *spl7-1* ein Fragment der Größe 1020bp amplifiziert werden würde. Für den Nachweis der T-DNA Insertion wurde eine Primerkombination gewählt, mit deren Hilfe ein Fragment von 510 bp amplifiziert werden

kann, dessen 5'-Bereich einen Sequenzteil der T-DNA enthält. Die Abwesenheit oder Präsenz eines Amplifikats gibt also Aufschluss über eine wildtypische oder mutante Pflanze. Das Fehlen der Wildtyp-Bande bei der PCR von *spl7-1* und die Bande für die T-DNA in *spl7-1* stellen die Homozygotie dieser Linie sicher.

Ebenso konnte mithilfe der Primerkombinationen (c) und (d) die Insertion der T-DNA in der Linie *spl7-2* nachgewiesen und homozygote Linien gezüchtet werden. Für *spl7-2* wurde versucht, die Linie mit dem genomischen Lokus von *SPL7* (Abb. 3.1.3), der aus dem Wildtyp kloniert wurde, zu komplementieren. Im Falle der Komplementation kann mit beiden Primerkombinationen (c) und (d) immer ein Fragment amplifiziert werden, da im Falle des mutanten Allels die T-DNA-Insertion als Matrize dient und im Falle des komplementierenden Allels das inserierte *SPL7*-Wildtypkonstrukt als Matrize dient. Eine weitere Oligo-Kombination (e), in der der rückläufige Primer hinter dem 3'Ende von *SPL7* liegt, beweist, dass die Pflanzen homozygot für *spl7-2* sind und die Komplementation auf der Insertion des Konstruktes beruht. Die verschiedenen Oligos und wo sie binden sind in Abb. 3.1.3 noch mal dargestellt.

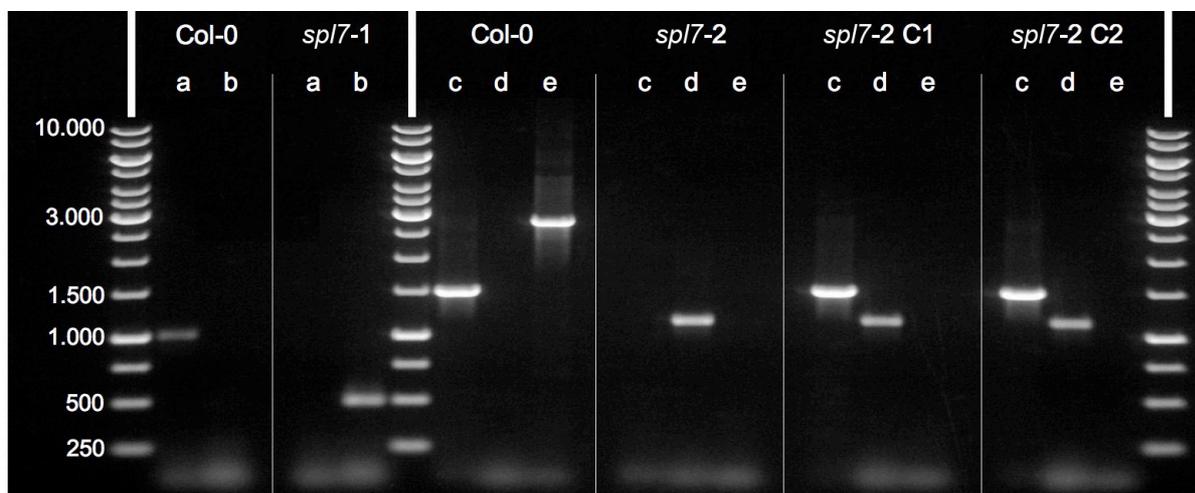


Abb. 3.1.2: Polymerase-Kettenreaktion zum Test auf homozygote T-DNA-Insertionslinien für *SPL7* (*spl7-1* und *spl7-2*) und komplementierte Linien (*spl7-2* C1 und C2) mit den Oligo-Kombinationen aus Tabelle 3.1. Die Größen der Leiter sind am linken Bildrand vermerkt (in bp).

Tab. 3.1.1: Verwendete Oligo-Kombinationen für die Polymerase-Kettenreaktion aus Abb. 3.1.2 und deren zu erwartende Größe in bp und die genotypischen Bedingungen für eine erfolgreiche Amplifikation

Oligo-kombination	Oligo 1	Oligo2	Produkt [bp]	Genotyp
a	ST74	ST35	1020	WT
b	ST74	SH521	510	T-DNA <i>spl7-1</i>
c	AG17	AG04	1486	WT
d	AG17	SH521	1100	T-DNA <i>spl7-2</i>
e	AG17	AG112	2764	WT

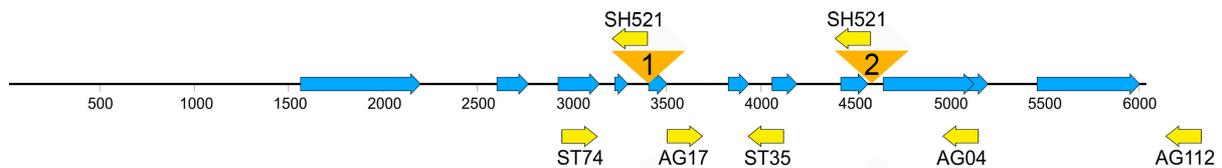


Abb. 3.1.3: Darstellung des Fragmentes des genomischen Lokus der für die Komplementation von *spl7-2* verwendet wurde. Des Weiteren sind die Positionen der Oligos für die Kontrolle der T-DNA-Insertionen angegeben. Kodierende Bereiche sind in blau, die T-DNA-Insertionen sind durch orangene Dreiecke mit der Nummer der Insertion (1:*spl7-1*; 2:*spl7-2*) und die Primer als gelbe Pfeile dargestellt. Primer, die in der genomischen Sequenz von *SPL7* binden, sind unterhalb, solche, die in den T-DNAs binden, oberhalb der Sequenz angezeigt. AG112 liegt innerhalb der genomischen Sequenz, aber außerhalb der Sequenz, die für das Konstrukt zur Komplementation verwendet wurde.

Um zu überprüfen, inwieweit die Insertion der T-DNAs in *spl7-1* und *spl7-2* (Abb. 3.1.1) die Expression von *SPL7* beeinflussten, wurden die Transkripte von *SPL7* in den verschiedenen Linien mit einer quantitativen Reversen Transkriptions-PCR (qRT-PCR) untersucht. Dazu wurde RNA aus Infloreszenzen sechs Stunden nach Tagesbeginn isoliert und mit einer reversen Transkriptase in cDNA übersetzt. Mit Hilfe von cDNA spezifischen Primern für *SPL7* konnte die Transkriptmenge von *SPL7* in den isolierten Geweben bestimmt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die relative Menge an *SPL7* Transkript in den Linien *spl7-1* und *spl7-2* zur Menge im Wildtyp deutlich geringer ist. Dies galt sowohl für Pflanzen, die unter Kurztag gehalten wurden als auch für Pflanzen, die unter Langtagbedingungen wuchsen. Darüber hinaus wurde mit Hilfe der qRT-PCR nachgewiesen, dass die Komplementation von *spl7-2* auf transkriptioneller Ebene erfolgreich war, da eine höhere Menge Transkript im Vergleich zu *spl7-2* nachgewiesen wurde, die im Kurztag sogar deutlich über der Menge im Wildtyp war (Abb. 3.1.4).

Die Transkriptionsmenge eines Gens lässt keine Rückschlüsse darüber zu, ob das kodierte Protein translatiert wird oder ob es funktionell ist. Allerdings wird angenommen, dass T-DNA Insertionen in Genen entweder die Funktion des Proteins stark reduzieren oder komplett

unterbinden (Krysan et al. 1999). Daher lassen die deutlich geringeren Transkriptmengen von *SPL7* in den Mutanten gegenüber dem Wildtyp noch keine Aussage zu, ob das *SPL7*-Transkript in den *spl7-1* und *spl7-2* Mutanten translatiert wird oder ob das daraus folgende Protein funktionell ist.

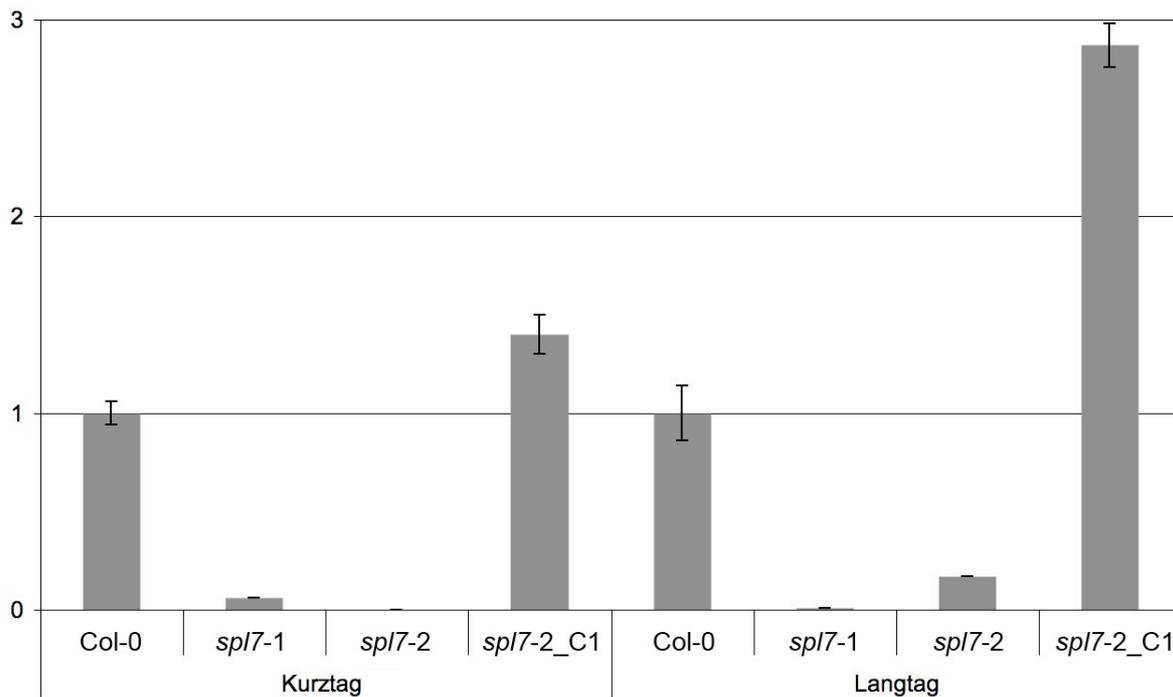


Abb. 3.1.4: Expressionsanalyse von *SPL7* im Wildtyp (Col-0), den *spl7*-Mutanten (*spl7-1* und *spl7-2*) und von der komplementierten Linie (*spl7-2_C1*) unter Kurztag (9 Stunden Licht, 15 Stunden Dunkelheit) und Langtag (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit). Das Pflanzenmaterial wurde jeweils nach den ersten sechs Stunden der Lichtperiode geerntet. Es wurde für die Expression des Gens *PP2A* normalisiert. Oligos für *SPL7*: AG105, AG106 (vergleich Abb. 3.1.3); Oligos für *PP2A*: SH286, SH287

Ein Beispiel für eine T-DNA-Insertion die dennoch in einem partiellen Transkript resultiert, das nicht zu einem nachweisbaren Protein führt ist *cdka1*. Nowack und Kollegen zeigten, dass trotz eines verkürzten Transkriptes kein Protein mit der zu erwartenden Größe nachweisbar ist (Nowack et al. 2006). Der Grund könnte NMD (Nonsense Mediated mRNA Decay) sein (Baker and Parker 2004). NMD ist eine Qualitätskontrolle der transkribierten mRNA, die sicherstellt, dass die gesamte mRNA abgelesen und translatiert wird. Nur eine vollständig translatierte mRNA wird nicht frühzeitig abgebaut. Damit stellen eukariotische Zellen sicher, dass fehlerhafte mRNAs so schnell wie möglich abgebaut werden und ihre „fehlerhaften“ Proteine die Zelle nicht schädigen (Baker and Parker 2004). Durch T-DNA-Insertionen in Gene wird zum einen ein zusätzliches Stück inseriert und meistens auch das Leseraster

verändert, so dass es zu einem verfrühten Stopp kommt. Dies wird durch NMD erkannt und die mRNA wird nicht für die weitere Translation stabilisiert (Krysan et al. 1999).

3.1.1 Analyse der Expression und Lokalisation von *SPL7* in der Pflanze

Die Expression von Transkriptionsfaktoren unterliegt meistens einer lokalen und zeitlichen Begrenzung, um die Regulation der Zielgene so spezifisch wie möglich zu halten (Campbell 2001). Die Expression von *SPL7* ist, laut Internetdatenbanken, ubiquitär über die gesamte Pflanze verteilt dabei aber in bestimmten Geweben, wie zum Beispiel Pollen, erhöht (Abb. 6.4 und 6.5). Im Gegensatz zu den gesammelten Expressionsdaten wird die Expression von *SPL7* ein Promotor-GUS-Konstrukt als auf die Wurzeln beschränkt beschrieben (Yamasaki et al. 2009).

Um eine bessere optische Auftrennung zu erhalten, wurde das Konstrukt mit dem der Phänotyp der *spl7-2*-Pflanzen erfolgreich komplementiert wurde mit GFP (Grün Fluoreszierendes Protein) an zwei unterschiedlichen Stellen inseriert und mit diesen Konstrukten *spl7-2*-mutante Pflanzen transformiert.

Das erste Konstrukt enthielt das GFP im ersten Exon (Abb. 3.1.5), direkt vor der SBP-Domäne. Dieses GFP enthielt kein Stopp-Codon, so dass zu erwarten war, dass das komplette Protein von *SPL7* (Abb. 3.1.1) mit dem GFP und allen konservierten Motiven hergestellt wurde.

Ein weiteres Konstrukt enthielt das GFP im achten Exon, so dass es nach allen konservierten Motiven bis auf die Transmembran-Domäne (Abb. 3.1.1) kam. Dieses GFP enthielt ein Stopp-Codon, so dass zu erwarten war, dass das *SPL7*-Protein mit allen konservierten Motiven (Abb. 3.1.1) bis zu dem GFP hergestellt und nur die Transmembran-Domäne fehlen wurde.

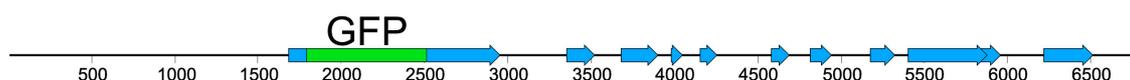


Abb. 3.1.5: Darstellung des Fragmentes des genomischen Lokus das für die Komplementierung von *spl7-2* verwendet wurde. Kodierende Bereiche von *SPL7* sind in blau und vom GFP in grün dargestellt.

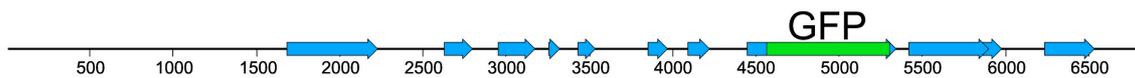


Abb .3.1.6: Darstellung des Fragmentes des genomischen Lokus das für die Komplementation von *spl7-2* verwendet wurde. Bedeutung der Farben wie in Abb. 3.1.5. Das GFP endet mit einem Stopp-Triplet, so dass die Transmembrandomäne nicht mehr translatiert wird.

Beide Konstrukte (Abb. 3.1.5 und 3.1.6) komplementieren die *spl7-2*-Mutante, so dass sie wieder einen wildtypischen Phänotyp hat (ohne Abbildung). Allerdings war es bis jetzt erfolglos ein GFP-Signal nachzuweisen (ohne Abbildung).

3.2 Analyse des Phänotyps

3.2.1 Phänotyp der *spl7*-Mutanten auf Erde

Um den Phänotyp der *spl7*-Mutanten zu analysieren, wurden homozygote Pflanzen zusammen mit dem Wildtyp (Col-0) und der komplementierten Linie (*spl7-2_C1*) auf normaler Erde gezogen. Beide *spl7*-Mutanten hatten gegenüber dem Wildtyp ein insgesamt gedrungenes Erscheinungsbild. Sowohl die Größe der Rosetten, als auch die Gesamtgröße der Mutanten waren geringer (Abb. 3.2.1). Wenn die gebildeten Blüten sich überhaupt geöffnet haben, dann waren die gebildeten Schoten kurz und enthielten keine bis wenige Samen. Die Hauptinfloreszenz starb vorzeitig ab und Meristeme an den proximalen adaxialen Stellen zwischen Blatt und Stängel wuchsen verfrüht zu sekundären Infloreszenzen aus (Abb. 3.2.1), diese starben wiederum ab und es entstanden tertiäre Infloreszenzen, so dass mit der Zeit ein gedrungenes und buschiges Aussehen entstand (Abb. 6.6). Die komplementierte Linie glich phänotypisch dem Wildtyp (Abb. 3.2.1).

Da für SPL7 bereits eine Funktion in der Kupfer-Homöostase beschrieben wurde (Yamasaki et al. 2009), wurden die Hälfte aller Pflanzen nach dem Aussäen einmalig mit einem Liter einer 5mM CuSO₄-Lösung pro Tray gedüngt. Daraufhin verringerten sich die für die *spl7*-Mutanten beschriebenen phänotypischen Unterschiede gegenüber dem Wildtyp deutlich und verschwanden beinahe gänzlich (Abb. 3.2.2). Die Hauptinfloreszenzen der Mutanten

erreichten fast wieder die gleiche Höhe wie die des Wildtyps, die Schoten waren lang und verdickt und enthielten Samen und die Rosetten erreichten fast wieder die gleiche Größe wie der Wildtyp (Abb. 3.2.2).

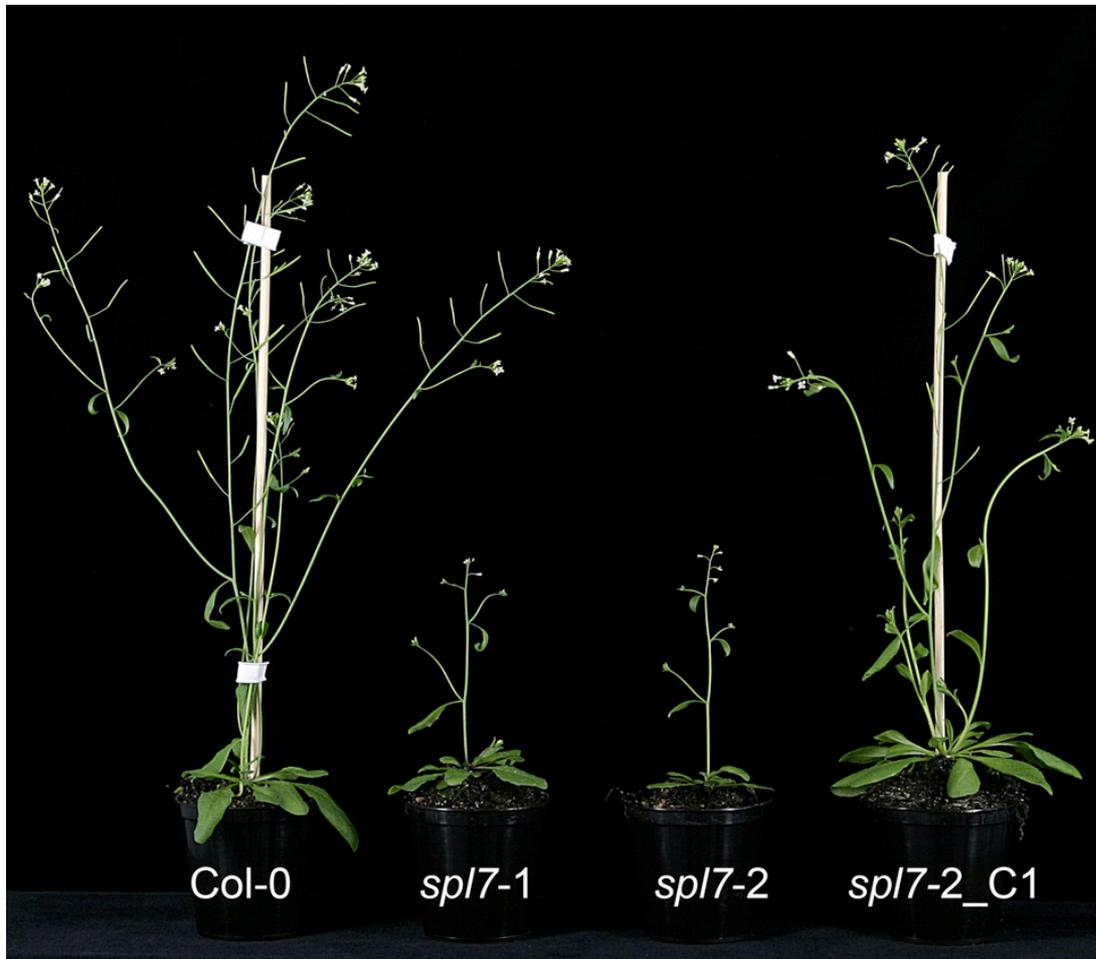


Abb. 3.2.1: Die beiden T-DNA-Insertionslinien (mittig) im Vergleich zu dem Wildtyp (links) und der komplementierten Linie (rechts) nachdem sie unter Langtag auf normaler Erde gewachsen sind.



Abb. 3.2.2: Die beiden T-DNA-Insertionslinien (mittig) im Vergleich zu dem Wildtyp (links) und der komplementierten Linie (rechts) die unter Langtag auf Erde, die nach dem Aussäen mit 1l einer 5mM CuSO₄-Lösung gedüngt wurde, gewachsen sind.

Im Folgenden wurden die *spl7*-Mutanten weiter phänotypisch charakterisiert, wozu die Pflanzen unter verschiedenen Lichtregimen (Kurztag, Langtag und Dauerlicht) angezogen wurden. In sämtlichen untersuchten Tageslängen (Kurztag, KT, 09h/15h Lichtperiode/Dunkelperiode: Tab. 3.3.1; Langtag, LT, 16h/08h Lichtperiode/Dunkelperiode: Tab. 3.2.2; Dauerlicht, LL, 24h/00h Lichtperiode/Dunkelperiode: Tab. 3.2.3) sprießen und blühten die beiden T-DNA-Insertionsmutanten immer signifikant später als der Wildtyp, sogar wenn der Boden mit einer 5mM CuSO₄-Lösung gedüngt wurde (Tab. 3.3.1-3.3.3). Auch die komplementierte Linie blühte meistens signifikant später als der Wildtyp, allerdings war dieser Unterschied gering (LL max. 1 Tag (Tab. 3.2.3), LT: 2 Tage (Tab. 3.2.2); KT: 4 Tage (Tab. 3.2.1)) und der p-Wert liegt nur knapp unter dem Schwellenwert von 0,05. Bei den *spl7-1* und *spl7-2* Pflanzen war der Unterschied im Vergleich zum Wildtyp in der Zeit die sie bis zum Sprießen deutlich größer (KT Tab. 3.2.1: *spl7-1* 18 Tage, *spl7-2* 29 Tage; LT Tab. 3.2.2:

spl7-1 4 Tage, *spl7-2* 5 Tage; LL Tab. 3.2.3: *spl7-1* 2,4 Tage, *spl7-2* 3,9 Tage Unterschied zum Wildtyp), er nahm mit der Zugabe von CuSO₄ allerdings leicht ab (KT Tab. 3.2.1: *spl7-1* 11 Tage, *spl7-2* 10 Tage; LT Tab. 3.2.2: *spl7-1* 3 Tage, *spl7-2* 3,7 Tage; LL Tab. 3.2.3: *spl7-1* 1,6 Tage, *spl7-2* 1,9 Tage Unterschied zum Wildtyp).

Weitere Entwicklungsdefizite konnten beobachtet werden, wenn die Pflanzen ohne zusätzliches Gießen von CuSO₄ unter KT Bedingungen (Tab. 3.2.1) gehalten wurden. Unter diesen Umständen entwickelten sich nämlich nur zwei von 21 *spl7-1*-Pflanzen (ca. 10%) und keine von *spl7-2* vom Sprießen bis zum Öffnen der ersten Blüte. Bei den restlichen Pflanzen starben die Infloreszenzmeristeme bevor sich sichtbare Blüten entwickeln konnten. Im LT blühten von *spl7-1*-Pflanzen immerhin 71% und von *spl7-2* 52% (Tab. 3.2.2), und im LL 67% und 38% (Tab. 3.2.3) der jeweiligen mutanten Linien. Diese Entwicklungsdefizite verschwanden jedoch sofort, sobald die Erde mit Kupfer gedüngt wurde (Tab. 3.2.1-3.2.3), so dass maximal nur noch eine Pflanze pro Linie ausfiel. Dies trat beim Wildtyp der sowohl mit wie auch ohne Kupferzusatz wuchs ebenfalls auf.

Das Sprießen von *A. thaliana* ist ein leicht zu erkennendes Anzeichen, dass die Pflanze vom vegetativen zum reproduktiven Wachstum übergegangen ist. Das Öffnen der ersten Blüte (Anthese) wird gleichgesetzt mit der ersten Befruchtung und somit dem Beginn der Samenproduktion (Bowman et al. 1991; Sanders et al. 1999; Smyth et al. 1990). Die Anthese folgt zeitlich immer dem Sprießen. Wenn der Abstand zwischen dem Sprießen und der Anthese konstant bleibt, verschieben sich die Zeiten des Öffnens der ersten Blüte mit denen des Sprießens. In den Experimenten war die Anthese der Mutanten unter Kupfermangel, im Vergleich zu Wildtyp, ebenfalls signifikant unterschiedlich (KT Tab. 3.2.1: *spl7-1* 47 Tage, *spl7-2* keine Anthese; LT Tab. 3.2.2: *spl7-1* 7,6 Tage, *spl7-2* 5,6 Tage; LL Tab. 3.2.3: *spl7-1* 3,3 Tage, *spl7-2* 8,8 Tage Unterschied zum Wildtyp), der Unterschied nahm mit der Zugabe von CuSO₄ allerdings leicht ab (KT Tab. 3.2.1: *spl7-1* 10 Tage, *spl7-2* 10 Tage; LT Tab. 3.2.2: *spl7-1* 2,8 Tage, *spl7-2* 4,1 Tage; LL Tab. 3.2.3: *spl7-1* 1 Tag, *spl7-2* 1,3 Tage Unterschied zum Wildtyp).

Um zu erfahren, inwieweit die Mutanten bei der Entwicklung von dem ersten optischen Anzeichen des reproduktiven Wachstums (Sprießen) bis zum Öffnen der ersten Blüte (Anthese) verändert waren, wurden diese beiden Werte von einander subtrahiert. Unter KT-Bedingungen ohne Kupferzusatz blühten von den *spl7*-Mutanten nur sehr wenig (Tab. 3.2.1), allerdings blühten unter Kupferzusatz fast alle Pflanzen (Mutanten und Wildtyp) und, obwohl

die Zeiten die die Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zum Sprießen und der Anthese brauchten signifikant länger sind, sind die Unterschiede vom Sprießen bis zur Anthese nicht signifikant unterschiedlich (Tab. 3.2.1: $p \gg 0,05$; *spl7-2* -0,4 Tage; *spl7-2* -0,4 Tage Unterschied zum Wildtyp). Unter LT und LL hingegen blühten mehr Mutanten unter Kupfermangel und der Unterschied im Wachstum vom Sprießen bis zur Anthese ist signifikant länger ($p < 0,05$; LT Tab. 3.2.2: *spl7-1* 4,6 Tage, *spl7-2* 1,1 Tage; LL Tab. 3.2.3: *spl7-1* 1,5 Tage; *spl7-2* 8,6 Tage Unterschied zum Wildtyp). Durch die zusätzliche Kupferdüngung glichen sich die Werte der Mutanten denen des Wildtypes und der komplementierten Linie wieder an (LT Tab. 3.2.2: *spl7-1* 0,1 Tage, *spl7-2* 2,1 Tage; LL Tab. 3.2.3: *spl7-1* -0,2 Tage; *spl7-2* -0,2 Tage Unterschied zum Wildtyp).

Die Standardabweichung ist definiert als ein Maß für die Streuung der Einzelwerte um ihren Mittelwert (Horstmann 2008). Die Signifikanz des t-Tests ist ebenfalls an sie gebunden, da Unterschiede zwischen zwei Populationen umso signifikanter werden, je geringer die Streuung der Einzelwerte ist (Horstmann 2008). Beim Vergleich der Standardabweichungen der einzelnen Linien fällt auf, dass sich unter Kupfermangel die Einzelwerte der Mutanten über einen deutlich größeren Zeitraum streuen als der Wildtyp oder die komplementierte Linie. Am Beispiel der Standardabweichungen des Sprießens wird dieses offensichtlich (KT Tab. 3.2.1: Wildtyp SD=3,6, *spl7-1* SD=7,6, *spl7-2* SD=7,9, *spl7-2_C1* SD=5,1; LT Tab. 3.2.2: Wildtyp SD=1,3, *spl7-1* SD=4,6, *spl7-2* SD=3,2, *spl7-2_C1* SD=1,5; LL Tab. 3.2.3: Wildtyp SD=1,2, *spl7-1* SD=1,6, *spl7-2*, SD=3,0 *spl7-2_C1*, SD=1,4), die Standardabweichung nimmt mit der Zugabe von CuSO_4 ab und gleicht sich dem Wert des Wildtypes und der komplementierten Linie an (KT Tab. 3.2.1: Wildtyp SD=2,2, *spl7-1* SD=4,7, *spl7-2* SD=4,9, *spl7-2_C1* SD=3,2; LT Tab. 3.2.2: Wildtyp SD=0,9, *spl7-1* SD=1,6, *spl7-2* SD=1,8, *spl7-2_C1* SD=1,8; LL Tab. 3.2.3: Wildtyp SD=1,3, *spl7-1* SD=1,7, *spl7-2* SD=1,3, *spl7-2_C1* SD=0,8).

Bezüglich der Anzahl der Rosetteblätter fiel auf, dass die Mutanten durchschnittlich weniger Blätter bildeten (*spl7-1*: 9,7 und *spl7-2*: 9,6) als der Wildtyp (11,5) oder die komplementierte Linie (12,4), obwohl sie mehr Zeit zum Sprießen benötigten (Tab. 3.2.2 und 3.2.3). Man hätte aufgrund der längeren Zeit bis zum Sprießen jedoch erwartet, dass die Anzahl der Rosettenblätter größer war als beim Wildtyp. Auch die Anzahl der Hochblätter war signifikant um ca. ein Blatt im LT und LL geringer (Tab. 3.2.2 und 3.2.3). Besonders im LT konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Kupfer die Anzahl der Rosetten- und Hochblätter

wieder näher an die des Wildtyps und der *spl7-2_C1*-Linie brachte. Der Unterschied war zwar immer noch signifikant, aber deutlich geringer. Im Durchschnitt hatten die Mutanten 1,5-2 Rosettenblätter im LL und nur ein halbes Hochblatt weniger im LT bei der Zugabe von Kupfer. Bei der Kupferzugabe war die Anzahl der Rosettenblätter der Mutanten im LT (Tab. 3.2.2) identisch mit denen des Wildtyps genauso wie die Anzahl der Hochblätter im LL (Tab. 3.2.3).

Tab. 3.2.1: Unterschiede in der Dauer bis zum Sprießen und Blühen des Wildtyp, der beiden Mutanten und einer komplementierten Linie unter Kurztag (9 Stunden Licht und 15 Stunden Dunkelheit)

Kurztag	ohne Zugabe von CuSO ₄				Zugabe von 5mM CuSO ₄ pro Tray			
	Col-0	spl7-1	spl7-2	spl7-2_C1	Col-0	spl7-1	spl7-2	spl7-2_C1
Sprießen TnS	55,9	74,0	84,7	59,1	48,0	58,7	58,4	52,1
Anzahl	24	21	22	17	23	24	24	15
% von Keimlingen	100	88	92	94	96	100	100	83
Standardabweichung	3,4	7,6	7,9	5,1	2,2	4,7	4,9	3,2
students t-Test (gegen Col-0) (p)		2,0E-13	2,4E-20	1,9E-02		9,6E-13	4,8E-12	4,8E-05
students t-Test (gegen +5 mM Cu) (p)	4,6E-12	2,5E-10	1,4E-17	8,7E-05				
1. offene Blüte TnS	62,2	109,5	x	65,5	54,4	64,1	64,4	58,1
Anzahl	24	2	0	16	23	23	24	14
% der Pflanzen	100	10	0	94	100	96	100	93
Standardabweichung	4,0	14,8	x	5,5	2,2	4,5	5,0	2,9
students t-Test (gegen Col-0)		2,1E-12	x	3,4E-02		8,8E-12	3,3E-11	1,1E-04
students t-Test (gegen +5 mM Cu)	1,3E-10	6,4E-11	x	1,0E-04				
1. Blüte-Sprießen TnS	6,3	37,5	x	6,1	6,4	6,0	6,0	6,2
Standardabweichung	1,5	12,0	x	1,5	1,1	1,3	0,9	1,1
students t-Test (gegen Col-0) (p)	8,8E-01	1,6E-13	x	8,6E-01				
students t-Test (gegen +5 mM Cu) (p)		1,6E-13	x	6,8E-01	2,8E-01	2,0E-01	6,4E-01	

TnS: Tage nach Aussaat; rote Zahlen entsprechen einem $p \leq 0,05$

Tab. 3.2.2: Unterschiede in der Anzahl der Blätter und der Dauer bis zum Sprießen und Blühen des Wildtyp, der beiden Mutanten und einer komplementierten Linie unter Langtag (18 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit)

	ohne Zugabe von CuSO ₄				Zugabe von 5mM CuSO ₄ pro Tray			
Langtag	Col-0	spl7-1	spl7-2	spl7-2_C1	Col-0	spl7-1	spl7-2	spl7-2_C1
Sprießen TnS	19,8	23,7	25,0	21,1	19,9	22,9	23,6	21,9
Anzahl	24	24	21	16	24	22	22	18
% von Keimlingen	100	100	88	89	100	92	92	100
Standardabweichung	1,3	4,6	3,2	1,5	0,9	1,6	1,8	1,8
students t-Test (gegen Col-0) (p)		2,5E-04	5,8E-09	8,0E-03		9,8E-10	1,7E-11	3,1E-05
students t-Test (gegen +5 mM Cu) (p)	8,0E-01	4,5E-01	9,2E-02	1,4E-01				
1. offene Blüte TnS	23,9	31,5	29,5	25,4	24,3	27,1	28,4	27,9
Anzahl	24	17	11	16	24	22	22	18
% der Pflanzen	100	71	52	100	100	100	100	100
Standardabweichung	1,5	8,5	2,7	1,4	1,3	1,4	3,4	1,8
students t-Test (gegen Col-0)		1,2E-04	3,0E-09	2,7E-03		1,5E-08	1,8E-06	2,0E-04
students t-Test (gegen +5 mM Cu)	3,6E-01	2,3E-02	3,2E-01	1,5E-01				
1. Blüte-Sprießen TnS	4,1	8,7	5,2	4,4	4,4	4,2	4,7	4,3
Standardabweichung	0,5	8,5	1,6	0,6	0,6	0,5	2,6	0,6
students t-Test (gegen Col-0) (p)		1,1E-02	4,1E-03	1,1E-01		2,3E-01	5,2E-01	8,2E-01
students t-Test (gegen +5 mM Cu) (p)	6,8E-02	1,7E-02	6,0E-01	3,6E-01				
Anzahl Rosetteblätter	11,5	9,7	9,6	12,4	11,1	10,8	10,8	11,8
Standardabweichung	1,1	1,1	1,1	0,9	1,2	1,1	1,0	1,0
students t-Test (gegen Col-0) (p)		1,2E-06	1,5E-06	1,4E-02		3,0E-01	3,5E-01	4,7E-02
Anzahl Hochblätter	3,5	2,4	2,4	3,6	3,6	3,0	3,0	3,7
Standardabweichung	0,5	0,6	0,6	0,6	0,5	0,7	0,5	0,8
students t-Test (gegen Col-0) (p)		1,6E-07	1,8E-10	6,2E-01		5,8E-08	1,0E-08	3,4E-01

TnS: Tage nach Aussaat; rote Zahlen entsprechen einem $p \leq 0,05$

Tab. 3.2.3: Unterschiede in der Anzahl der Blätter und der Dauer bis zum Sprießen und Blühen des Wildtyp, der beiden Mutanten und einer komplementierten Linie unter Dauerlicht (24 Stunden Licht)

Dauerlicht	ohne Zugabe von CuSO ₄				Zugabe von 5mM CuSO ₄ pro Tray			
	Col-0	spl7-1	spl7-2	spl7-2_C1	Col-0	spl7-1	spl7-2	spl7-2_C1
Sprießen TnS	16,4	18,8	20,3	17,1	15,9	17,5	17,8	17,0
Anzahl	24	24	24	17	24	24	23	16
% von Keimlingen	100	100	100	94	100	100	96	89
Standardabweichung	1,2	1,6	3,0	1,4	1,3	1,7	1,3	0,8
students t-Test (gegen Col-0) (p)		8,4E-07	4,5E-07	1,1E-01		6,0E-04	5,9E-06	4,9E-03
students t-Test (gegen +5 mM Cu) (p)	2,2E-01	1,2E-02	7,9E-04	8,8E-01				
1. offene Blüte TnS	20,5	23,8	29,3	21,1	20,4	21,4	21,7	21,0
Anzahl	24	16	9	17	24	24	23	16
% der Pflanzen								
Standardabweichung	1,0	2,1	9,5	0,9	0,9	1,5	1,3	0,9
students t-Test (gegen Col-0)		9,4E-08	6,9E-05	7,2E-02		9,6E-03	3,9E-04	5,6E-02
students t-Test (gegen +5 mM Cu)	6,6E-01	1,1E-04	5,6E-04	7,1E-01				
1. Blüte-Sprießen TnS	4,2	5,5	10,2	4,1	4,5	3,9	3,9	4,0
Standardabweichung	0,8	2,3	9,4	0,7	0,8	0,6	0,6	0,7
students t-Test (gegen Col-0) (p)		1,3E-02	3,0E-03	6,7E-01		3,4E-03	3,8E-03	4,9E-02
students t-Test (gegen +5 mM Cu) (p)	1,5E-01	2,1E-03	2,3E-03	8,2E-01				
Anzahl Rosetteblätter	13,0	10,3	10,0	12,9	10,33	8,87	7,99	11,21
Standardabweichung	1,2	1,4	1,4	1,1	1,08	1,17	1,06	1,15
students t-Test (gegen Col-0) (p)		3,8E-09	1,0E-10	7,8E-01		5,8E-08	1,1E-14	4,4E-01
Anzahl Hochblätter	2,7	2,0	2,0	2,9	2,2	2,1	2,1	2,4
Standardabweichung	0,6	0,8	0,7	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5
students t-Test (gegen Col-0) (p)		4,0E-03	1,4E-03	1,6E-01		2,1E-01	6,6E-02	5,4E-01

TnS: Tage nach Aussaat; rote Zahlen entsprechen einem $p \leq 0,05$

3.2.2 Analyse der Reproduktion *spl7*-mutanter Pflanzen

3.2.2.1 Samenproduktion bei verschiedenen Tageslängen

Wie bereits erwähnt, waren die beiden mutanten Linien *spl7-1* und *spl7-2* in ihrer Samenentwicklung gestört. In Abbildung 3.2.1 wird deutlich, dass sich die Schoten weder verdickten noch verlängerten, wenn die Pflanzen ohne zusätzliche Kupferdüngung gehalten wurden. Eine kurze Tageslänge begünstigte diesen sterilen Phänotyp zusätzlich (Tab. 3.2.4). Zwar zeigen oft auch die Schoten der ersten gebildeten Blüten des Wildtyps einen geringeren Samenansatz, jedoch ist die volle Fertilität bei den folgenden Blüten hergestellt (Unte et al. 2003). Im Folgenden wurde für je 10 Pflanzen pro Genotyp die Anzahl der gebildeten Samen in den Schoten der ersten Blüten bestimmt. Dabei wurden die Pflanzen unter Lang- oder Kurztagbedingungen gehalten und die jeweiligen Trays nach der Aussaat zusätzlich mit einem Liter Wasser oder 5mM CuSO₄-Lösung gegossen. Aufgrund des verfrühten Absterbens der Hauptinfloreszenz der beiden Mutanten unter Kupfermangel, bildeten diese nur ein paar Blüten (Abb.3.2.1). Zusätzlich bildeten die Mutanten unter Kupfermangel deutlich weniger Blüten als unter Langtag. Deswegen wurde für die Pflanzen unter Kurztagbedingungen die erste bis dritte Blüte ausgewertet, während für die Pflanzen, die unter Langtagbedingungen wuchsen, die erste, dritte und fünfte Schote ausgewertet wurde. (Tab. 3.2.5).

Im Kurztag unter normalen Wachstumsbedingungen ohne zusätzliche Kupferdüngung waren der Wildtyp und die komplementierte Linie nicht signifikant unterschiedlich und bildeten durchschnittlich zwischen 14 und 30 Samen pro Schote, wohingegen die *spl7*-Mutanten überhaupt keine Samen produzierten ($p \ll 0,05$). Wenn die Pflanzen nach dem Aussäen allerdings mit der CuSO₄-Lösung versetzt wurden, war das Problem der Sterilität aufgehoben und die beiden Mutanten hatten vergleichbare Mengen von Samen wie der Wildtyp in ihren Schoten, so dass der Unterschied nicht mehr signifikant ist ($p > 0,05$). Unter Langtagbedingungen ergab sich ein ähnliches Bild. Allerdings produzierten die beiden Mutanten hier auch ohne Kupferzusatz noch Samen, aber deutlich weniger als mit zusätzlicher Kupferdüngung und deutlich weniger als der Wildtyp (Tab. 3.2.5). Bei zusätzlicher Kupferdüngung waren die *spl7*-Mutanten allerdings weniger im Nachteil und produzierten mehr Samen als ohne Kupferzusatz, allerdings immer noch signifikant weniger wie der Wildtyp.

Tab. 3.2.4: Anzahl der Samen pro Schote vom Wildtyp, *spl7-1*, *spl7-2* und *spl7-2_C1* auf normaler Erde gewachsen und nach der Aussaat mit einem Liter einer 5mM CuSO₄-Lösung oder mit einem Liter Wasser versetzt wurde. Die Pflanzen wuchsen unter Kurztag.

Kurztag	ohne zusätzlichen Kupfer			mit zusätzlichem Kupfer		
	1. Blüte	2. Blüte	3. Blüte	1. Blüte	2. Blüte	3. Blüte
Col-0						
Anzahl analysierter Schoten	10	10	10	10	10	10
Durchschnitt Samen pro Schote	14,4	21,7	30,5	30,0	41,0	37,4
Standardabweichung	12,2	12,0	16,2	20,7	9,2	8,6
t-Test +Cu				5,5E-02	7,8E-04	2,5E-01
t-Test gesamt Cu						4,6E-04
<i>spl7-1</i>						
Anzahl analysierter Schoten	10	10	10	10	10	10
Durchschnitt Samen pro Schote	0,0	0,0	0,0	33,1	31,8	39,3
Standardabweichung	0,0	0,0	0,0	18,0	19,1	15,3
t-Test +Cu				1,7E-05	5,2E-05	2,0E-07
t-Test WT	4,6E-03	5,5E-06	2,2E-04	6,7E-01	3,2E-01	6,4E-01
t-Test gesamt WT			2,9E-10			9,4E-01
t-Test gesamt Cu						7,3E-16
<i>spl7-2</i>						
Anzahl analysierter Schoten	10	10	10	10	10	10
Durchschnitt Samen pro Schote	0	0	0	34,6	39,1	40,8
Standardabweichung	0,0	0,0	0,0	13,5	14,1	6,8
t-Test +Cu				2,0E-07	6,4E-08	2,5E-13
t-Test WT	4,6E-03	5,5E-06	2,2E-04	5,0E-01	9,0E-01	2,5E-01
t-Test gesamt WT			2,9E-10			3,9E-01
t-Test gesamt Cu						4,6E-25
<i>spl7-2_C1</i>						
Anzahl analysierter Schoten	9	9	9	10	10	10
Durchschnitt Samen pro Schote	14,7	14,7	22,3	33,2	34,9	43,5
Standardabweichung	14,6	14,9	15,1	16,5	15,2	8,5
t-Test +Cu				1,9E-02	9,4E-03	1,4E-03
t-Test WT	8,1E-01	3,0E-01	6,5E-01	6,5E-01	4,6E-01	1,1E-01
t-Test gesamt WT			4,7E-01			5,9E-01
t-Test gesamt Cu						2,8E-06

rote Zahlen entsprechen einem $p \leq 0,05$

Tab. 3.2.5: Anzahl der Samen pro Schote vom Wildtyp, *spl7-1*, *spl7-2* und *spl7-2_C1* auf normaler Erde gewachsen, die nach der Aussaat mit einem Liter einer 5mM CuSO₄-Lösung oder mit einem Liter Wasser versetzt wurde. Die Pflanzen wuchsen unter Langtag.

Langtag	ohne zusätzlichen Kupfer			mit zusätzlichem Kupfer		
	1. Blüte	2. Blüte	3. Blüte	1. Blüte	2. Blüte	3. Blüte
Col-0						
Anzahl analysierter Schoten	10	11	11	11	11	11
Durchschnitt Samen pro Schote	43,2	52,6	65,7	48,7	61,5	65,7
Standardabweichung	20,9	16,3	3,1	13,9	3,2	3,5
t-Test +Cu				4,8E-01	9,3E-02	1,0E+00
t-Test gesamt Cu						2,7E-01
<i>spl7-1</i>						
Anzahl analysierter Schoten	11	11	11	10	10	10
Durchschnitt Samen pro Schote	7,5	21,5	19,2	38,7	53,5	60,8
Standardabweichung	13,0	23,6	22,8	16,0	6,8	5,8
t-Test +Cu				9,5E-05	5,7E-04	2,1E-05
t-Test WT	1,4E-04	1,8E-03	1,6E-06	1,4E-01	2,5E-03	2,8E-02
t-Test gesamt WT			5,3E-17			7,4E-04
t-Test gesamt Cu						1,2E-13
<i>spl7-2</i>						
Anzahl analysierter Schoten	11	11	11	10	10	10
Durchschnitt Samen pro Schote	6,3	7,8	20,2	31,9	50,7	57,8
Standardabweichung	8,3	8,5	22,6	16,9	7,3	3,3
t-Test +Cu				3,5E-04	1,3E-10	2,8E-05
t-Test WT	6,2E-05	2,5E-07	2,4E-06	1,9E-02	2,2E-04	2,7E-05
t-Test gesamt WT			3,3E-21			1,0E-05
t-Test gesamt Cu						7,2E-16
<i>spl7-2_C1</i>						
Anzahl analysierter Schoten	11	11	11	11	11	11
Durchschnitt Samen pro Schote	55,5	62,2	65,6	55,9	59,5	65,0
Standardabweichung	8,4	3,5	3,6	4,6	5,4	3,5
t-Test +Cu				8,8E-01	1,9E-01	6,8E-01
t-Test WT	8,8E-02	7,2E-02	9,5E-01	1,2E-01	3,2E-01	6,3E-01
t-Test gesamt WT			1,8E-02			2,3E-01
t-Test gesamt Cu						7,1E-01

rote Zahlen entsprechen einem $p \leq 0,05$

3.2.2.2 Blüten- und Antherenentwicklung in den *spl7*-mutanten Pflanzen

Die Entwicklung der Blüte vom Primordium über die offene Blüte bis zum reifen Schote ist in unterschiedliche Stadien eingeteilt (Bowman et al. 1991; Smyth et al. 1990). Die Entwicklung der einzelnen Blütenorgane ist synchronisiert und kann über diese Stadien verfolgt werden. Die Pollenreifung in den Antheren ist kurz vor dem Öffnen der Blüte vollendet und beim Öffnen der Blüte reißen auch die Endothecien der Antheren, damit die Pollen das Stigma befruchten können (Sanders et al. 1999). Unter allen getesteten Lichtbedingungen öffneten sich bei beiden Mutanten nicht alle Blüten, wenn der Boden nicht mit zusätzlichem Kupfer versetzt wurde. Auch die Blüten die sich öffneten blieben meistens steril und setzten keine Samen an (Tab. 3.2.4 und 3.2.5). Eine detaillierte Betrachtung der Blütenmorphologie lieferte zunächst keinen Hinweis auf den Grund der Sterilität, da offensichtlich alle Blütenorgane ausgebildet wurden (Abb. 3.2.3). Bei genauerer Untersuchung der Blütenorgane fiel jedoch auf, dass in den *spl7*-mutanten Linien die ohne Kupferzusatz wuchsen, die Antheren immer geschlossen blieben und nicht aufrissen (Abb. 3.2.3). Dadurch konnten die Pollen der Anthere nicht den Stempel des Fruchtknotens erreichen und somit die Eizellen nicht befruchten. Wenn das Stigma der Mutanten mit den Wildtyp-Pollen bestäubt wurde, entwickelten sich Samen in den Schoten (ohne Abbildung). Die Blüten von *spl7-1* und *spl7-2* die auf kupfergedüngtem Boden wuchsen wiesen nicht diesen Unterschied zum Wildtyp und der komplementierten Linie auf. Die Antheren rissen auf (Abb. 3.2.3) und die Pollen konnten das Stigma befruchten. Eine erfolgreiche Pollenkeimung konnte man eindeutig an den Pollen auf dem Stigma und den zusammengefallenen Papillae erkennen (Abb. 3.2.3). Ein weiterer Hinweis auf die Fertilitätsprobleme der Mutanten war die Anzahl der in den Schoten produzierten Samen (Tab. 3.2.4 und 3.2.5).

Viele der Blüten der Mutanten hatten ohne den Zusatz von Kupfer schon Probleme beim Öffnen. Es trat keine Befruchtung auf und sie öffneten sich erst im vertrockneten Zustand (Abb. 6.1).



Abb. 3.2.3: Sterilität bedingt durch fehlende Bestäubung aufgrund des Ausbleibens der Dehiscenz der Antheren. Die Pflanzen wuchsen im LT; -Cu: pro Tray wurde 1l Wasser direkt nach der Aussaat hinzugegeben; +Cu: pro Tray wurde 1l einer 5mM CuSO₄-Lsg. direkt nach der Aussaat hinzugegeben; Balken entspricht 1mm

3.2.3 Phänotyp der *spl7*-Mutanten auf Agar-Medium

Da die Wachstumsbedingungen der Pflanzen auf Erde stark von ihrer Zusammensetzung, insbesondere von der Verteilung der in der Erde enthaltenen Langzeitdüngekügelchen (Osmocote Start, siehe Material und Methoden) und schließlich auch von der Menge und der Verteilung des Wassers abhängt, wurden die Pflanzen außerdem auf Agar-Platten herangezogen. Dadurch sollten graduelle Unterschiede in der Verteilung von Nährstoffen und Wasser, wie sie auf Erde vorkommen können, vermieden und eine höhere Reproduzierbarkeit der Wachstumsergebnisse gewährleistet werden. Das verwendete MS-Medium hatte keinen Einfluss auf den Phänotyp des Wildtyps oder der komplementierten Linie, unabhängig davon, ob mit zusätzlichem Kupfer versetzt wurde oder nicht (Abbildung 3.2.4). Die beiden *spl7*-Mutanten allerdings wuchsen deutlich schlechter ohne den Zusatz von CuSO₄ ein Unterschied im Phänotyp der bereits auf Erde beobachtet wurde (Abb. 3.2.1), aber auf Agarplatten noch deutlicher und stärker zu beobachten war. Wurde die Kupferkonzentration im Agar jedoch auf 5 µM erhöht, wuchsen auch die *spl7*-Mutanten gut und es ließ sich kein phänotypischer Unterschied zum Wildtyp mehr feststellen. Bei zusätzlicher Kupferdüngung auf Erde

hingegen waren die Mutanten immer noch vom Wildtyp zu unterscheiden (vergleiche Abb. 3.2.1 und 3.2.2). Ähnliche phänotypische Unterschiede im Wachstum auf Agar-Medium haben auch Yamasaki und Mitarbeiter (2009) herausgefunden.

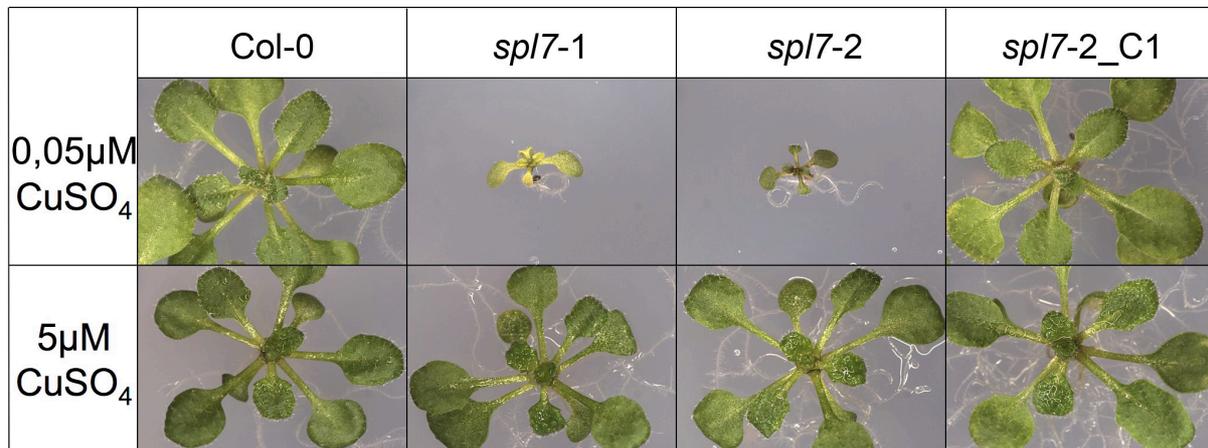


Abb. 3.2.4: 16 Tage alte Keimlinge von Wildtyp, den beiden *SPL7* T-DNA-Insertions-Linien und der komplementierten Linie, die auf Agar mit MS-Medium unter LT mit entweder 0,05 oder 5 µM CuSO₄wuchsen.

Im Folgenden wurde die Veränderung der Wurzellänge bei Kupferdüngung untersucht. Messungen der Wurzellänge von auf Agar gewachsenen Pflanzen zeigten eine sehr deutliche Abweichung der Hauptwurzellänge und der Anzahl der Seitenwurzeln bei Wildtyp und *spl7*-Mutanten in Abhängigkeit der verwendeten CuSO₄-Konzentration (Abb. 3.2.5 und 3.2.6). Die Länge der Hauptwurzel und auch die Anzahl der Seitenwurzeln der beiden Mutanten war unter Verwendung des MS-Mediums ohne Kupferzusatz deutlich geringer als die des Wildtyps, aber durch die Zugabe von CuSO₄ in das Agar-Medium konnte das verringerte Wachstum der Mutanten gegenüber dem Wildtyp wieder aufgehoben werden, so dass die Wurzellänge der Mutanten wieder der des Wildtyps bzw. der komplementierten Linie glich. Eine Erhöhung der Kupferkonzentration auf bis zu 50 µM hatte auf alle Linien einen toxischen Effekt und auch das Wachstum der beiden T-DNA Insertionslinien verringerte sich unter toxischen Kupferkonzentrationen (>5 µM CuSO₄) im gleichen Maße wie beim Wildtyp.

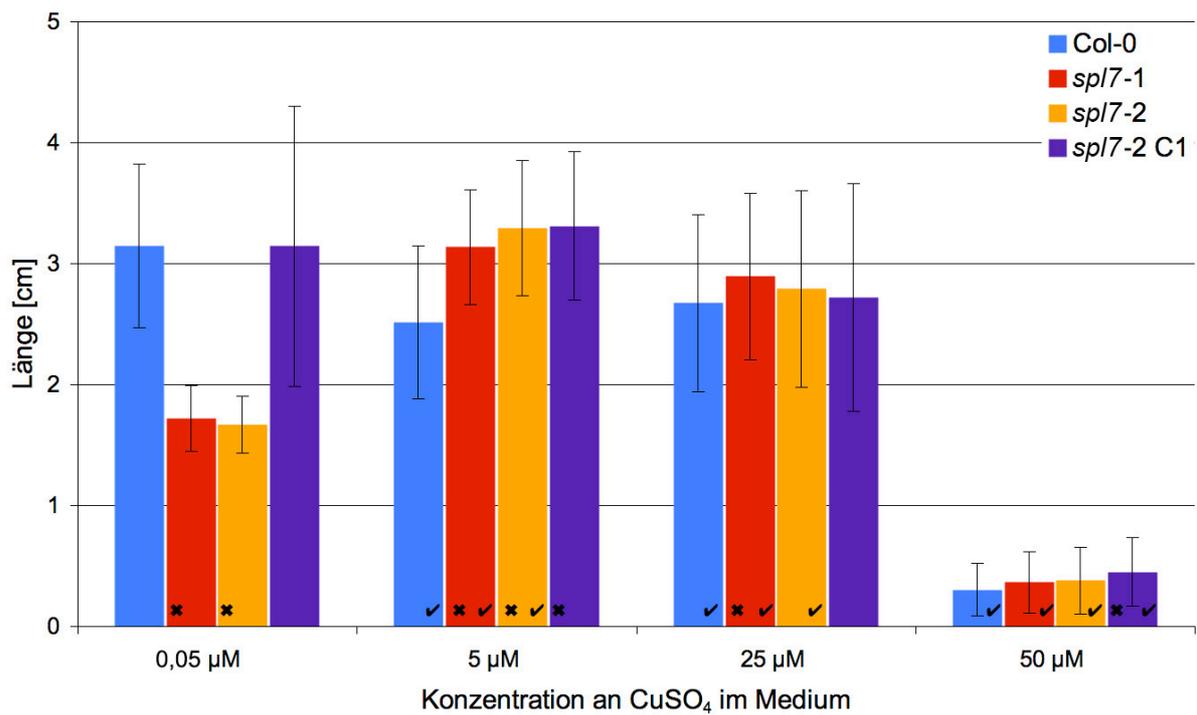


Abb. 3.2.5: Wurzellänge nach zehn Tagen (LT) mit unterschiedlichen CuSO₄-Konzentrationen im MS-Medium (✕=t-Test gegen Col-0 p ≤ 0,005; ✓=t-Test gegen 0 μM CuSO₄ p ≤ 0,005)

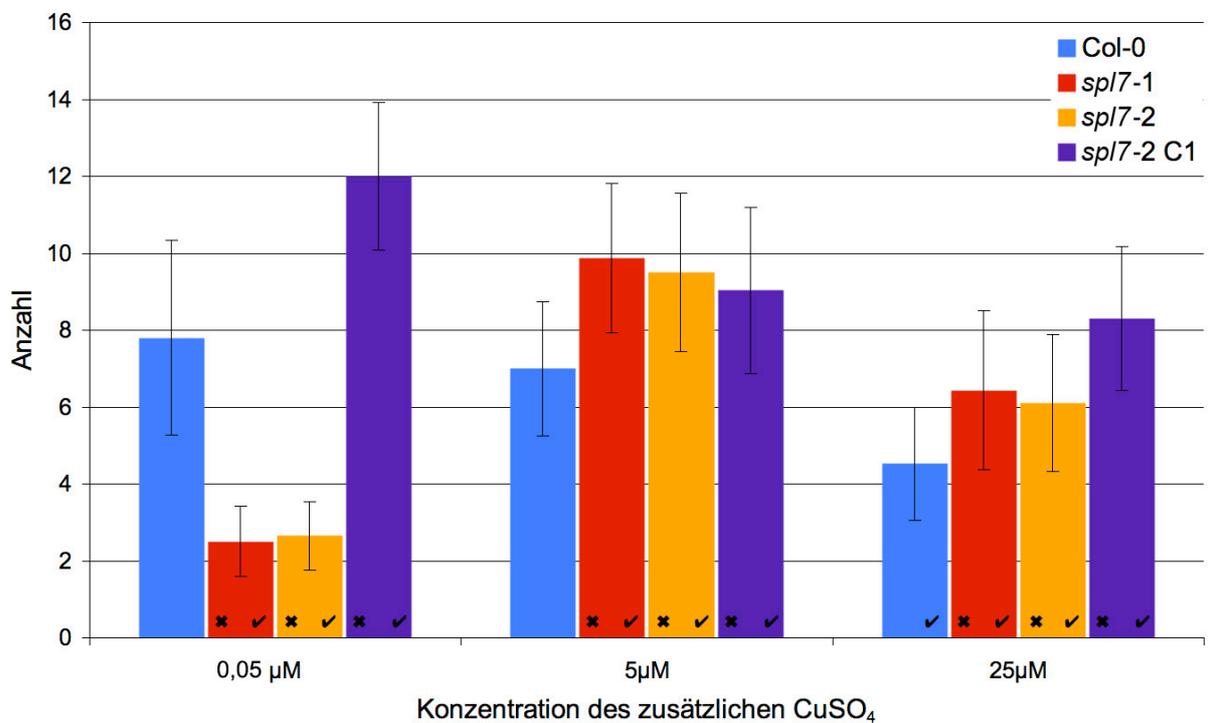


Abb. 3.2.6: Anzahl der Seitenwurzeln nach zehn Tagen (LT) mit unterschiedlichen CuSO₄-Konzentrationen im MS-Medium (✕=T-Test gegen Col-0 p ≤ 0,005; ✓=T-Test gegen 0 μM CuSO₄ p ≤ 0,005)

Um zu überprüfen ob die geringere Länge der Hauptwurzel der Mutanten unter Kupfermangel im Vergleich zum Wildtyp die Folge einer verfrühten Stagnation des Wachstums, oder eines insgesamt verlangsamten Wachstums war, wurde der Wildtyp, die Mutanten und eine komplementierte Linie unter Dauerlicht auf Agarplatten gezogen und alle 30 Minuten fotografiert. Die grafische Auswertung ist in Abb. 3.2.7 für eine Konzentration von $0,05 \mu\text{M}$ CuSO_4 und in Abb. 3.2.8 für eine von $5 \mu\text{M}$ CuSO_4 angegeben.

Unter $0,05 \mu\text{M}$ CuSO_4 wuchsen die beiden T-DNA-Insertionslinien nur halb so schnell wie der Wildtyp oder die komplementierte Linie (Abb. 3.2.7). Bei einer Kupferkonzentration von $5 \mu\text{M}$ gab es keinen Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit zwischen Mutanten und Wildtyp (Abb. 3.2.8).

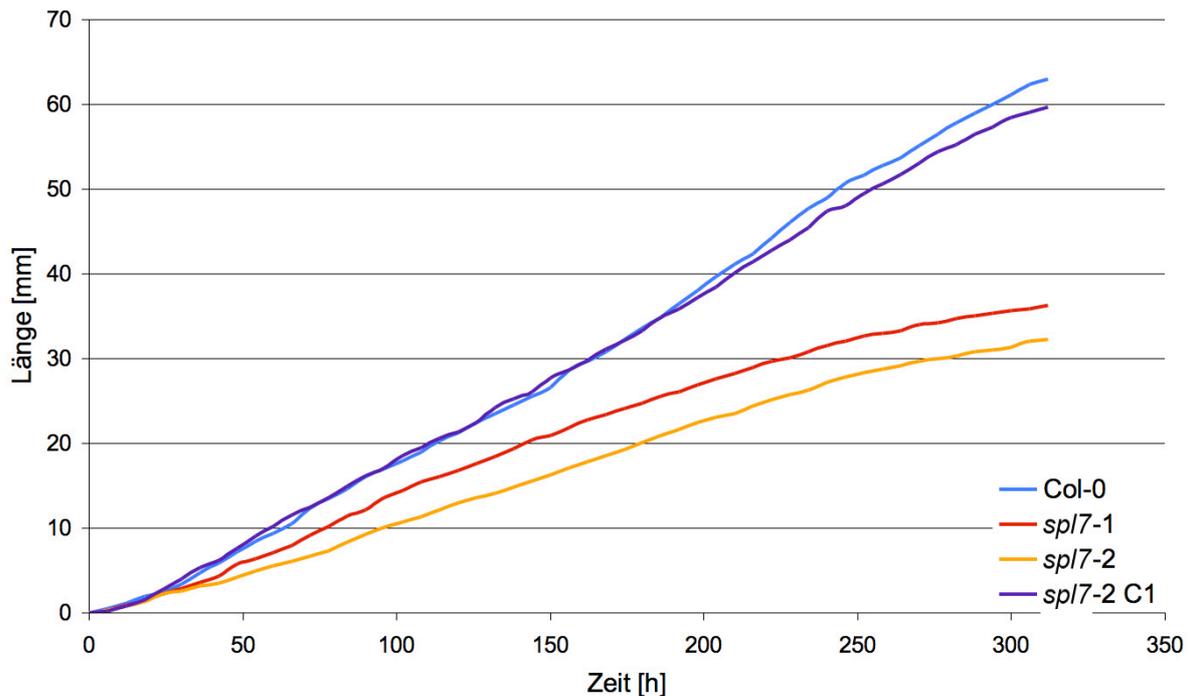


Abb. 3.2.7: Wurzelwachstum auf Medium mit $0,05 \mu\text{M}$ CuSO_4 . Die Pflanzen wuchsen unter Dauerlicht und es ist jeweils die Durchschnittslänge von 4 Pflanzen pro Linie dargestellt.

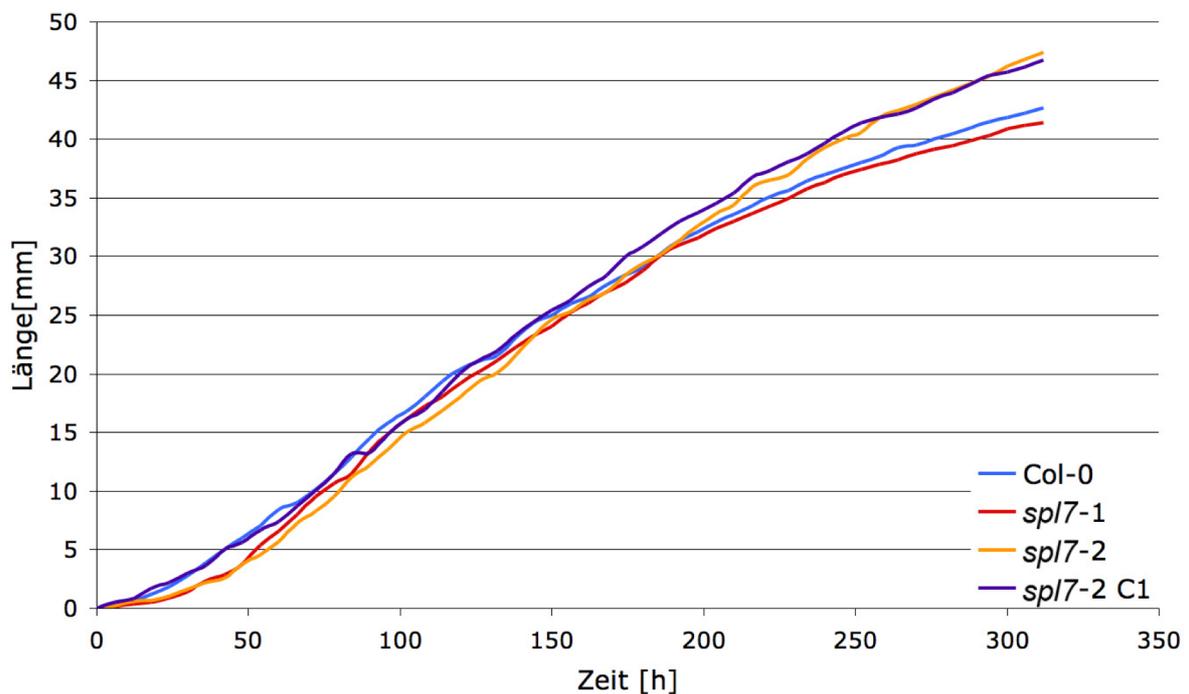


Abb. 3.2.8: Wurzelwachstum auf Medium mit 5 μM CuSO_4 . Die Pflanzen wuchsen unter Dauerlicht und es ist jeweils die Durchschnittslänge von 4 Pflanzen pro Linie dargestellt.

3.3 Qualitative Analyse des Lignins durch Färbung mit basischem Fuchsin

Wie Yamasaki und Mitarbeiter (2009) beschrieben haben, ist SPL7 ein Hauptschalter für die Erkennung von Kupfermangel. Nicht nur reguliert es direkt die Transkription der *miR398b* und *c*, die wiederum die Transkripte von *CSD1* und *CSD2* negativ regulieren, so dass der in diesen Proteinen gespeicherte Kupfer für andere Proteine zur Verfügung steht, sondern SPL7 aktiviert auch die Expression von *FSD1*, dessen Protein die Funktion der CSDs als Hydroxylradikalfänger übernimmt. Des Weiteren aktiviert SPL7 mehrere miRNAs (397a, 408 und 857 siehe Tab. 3.4.4). Diese inaktivieren unter anderem Transkripte von fünf Laccasen (Abdel-Ghany and Pilon 2008), deren aktive Zentren vier Kupferionen enthalten, und die eine wichtige Rolle bei der Oxidoreduktion in der Zellwand spielen können. Laccasen, genauso wie Oxidasen und Peroxidasen erzeugen in der Zellwand Radikale, die für die Polymerisation von Mono-, Di- und Trilignolen zu Lignin verantwortlich sind. Peroxidasen und Oxidasen

benötigen allerdings keine Kupferionen und können somit auch unter Kupfermangel einwandfrei als Radikalbilder funktionieren.

3.3.1 Die Lignifizierung des Leitbündelsystems in den *spl7*-Mutanten unter Kupfermangel

Um das Lignin in den Pflanzen zu untersuchen, wurden sie unterschiedlich lang auf Agar-Medium im Langtag wachsen gelassen und verschiedene Pflanzenteile mit basischem Fuchsin gefärbt, das dafür bekannt ist lignifiziertes Gewebe zu färben (siehe Material und Methoden). Die Kotyledonen der beiden Mutanten waren deutlich kleiner. Das vaskuläre Gewebe, das im Wildtyp und *spl7-2_C1* sehr deutlich gefärbt wurde, ist in ihnen unter normalen Kupferbedingungen nur leicht bis gar nicht angefärbt worden (Abb. 3.3.1). Sobald die Kupferkonzentration im Agar-Medium auf 5 μM erhöht wurde, sind die beiden Mutanten nicht mehr vom Wildtyp zu unterscheiden und das vaskuläre Gewebe wurde in allen Pflanzen gleich stark und durchgehend gefärbt. Dies deutet auf eine fehlende Lignifizierung der Leitbündel der Mutanten unter Kupfermangel hin.

Die Färbung des Leitgewebes von echten Blättern fiel genauso aus wie von den Kotyledonen, außer dass die echten Blätter der Mutanten bei 0,05 μM Kupfer deutlich kleiner blieben als die des Wildtypes oder der komplementierten Linie, so dass sie als Vergleich nicht mit herangezogen wurden (ohne Abb.). Als Größenvergleich dient Abbildung 3.2.4. Man erkennt, dass die Kotyledonen der Mutanten bei 0,05 μM CuSO_4 die mit Abstand größten gebildeten Blätter waren.

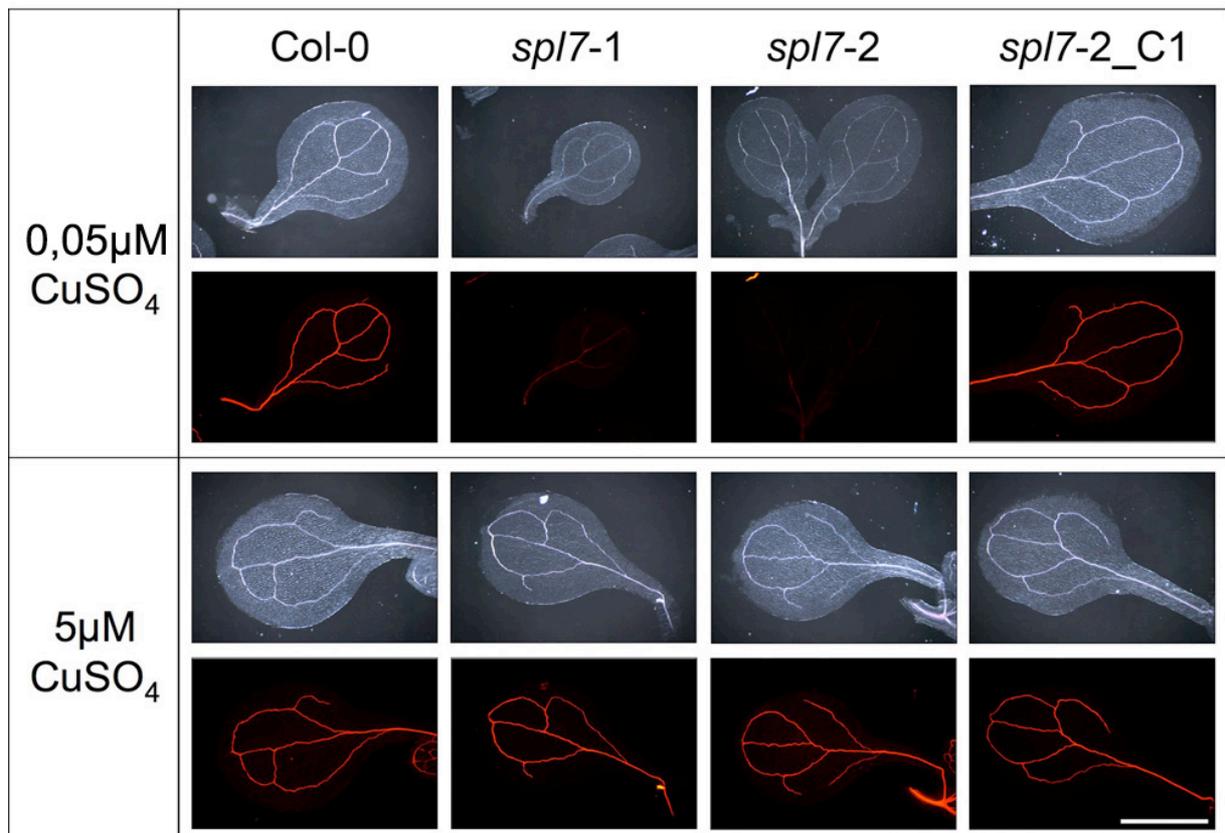


Abb.3.3.1: Durchlicht- und Fluoreszenzbilder von Keimblättern des Wildtypes, *spl7-1*, *spl7-2* und der komplementierten Linie die auf 1/2x MS-Medium entweder mit 0,05 oder 5 μ M CuSO₄ wuchsen und mit basischem Fuchsin angefärbt wurden. Der Balken entspricht 1mm.

3.3.2 Die Lignifizierung der Infloreszenzen in den *spl7*-Mutanten unter Kupfermangel

In den Infloreszenzen ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei den Keimblättern (Abb. 3.3.2). Unter normalen Bedingungen wurde das vaskuläre Gewebe in den Mutanten nicht gefärbt, sobald aber die Kupferkonzentration auf 5 μ M erhöht wurde, entsprach die Färbung der des Wildtypes. Bei 0,05 μ M Kupfer kann man aber erkennen, dass die Antheren teilweise von dem basischen Fuchsin gefärbt wurden (Abb. 3.3.2). Die Färbung war allerdings deutlich geringer als im Wildtyp oder der *spl7-2_C1*-Linie und die gefärbten Bereiche sind auch wesentlich kleiner. Dies deutet wiederum auf eine fehlende Lignifizierung der Leitbündel der Mutanten unter Kupfermangel hin.

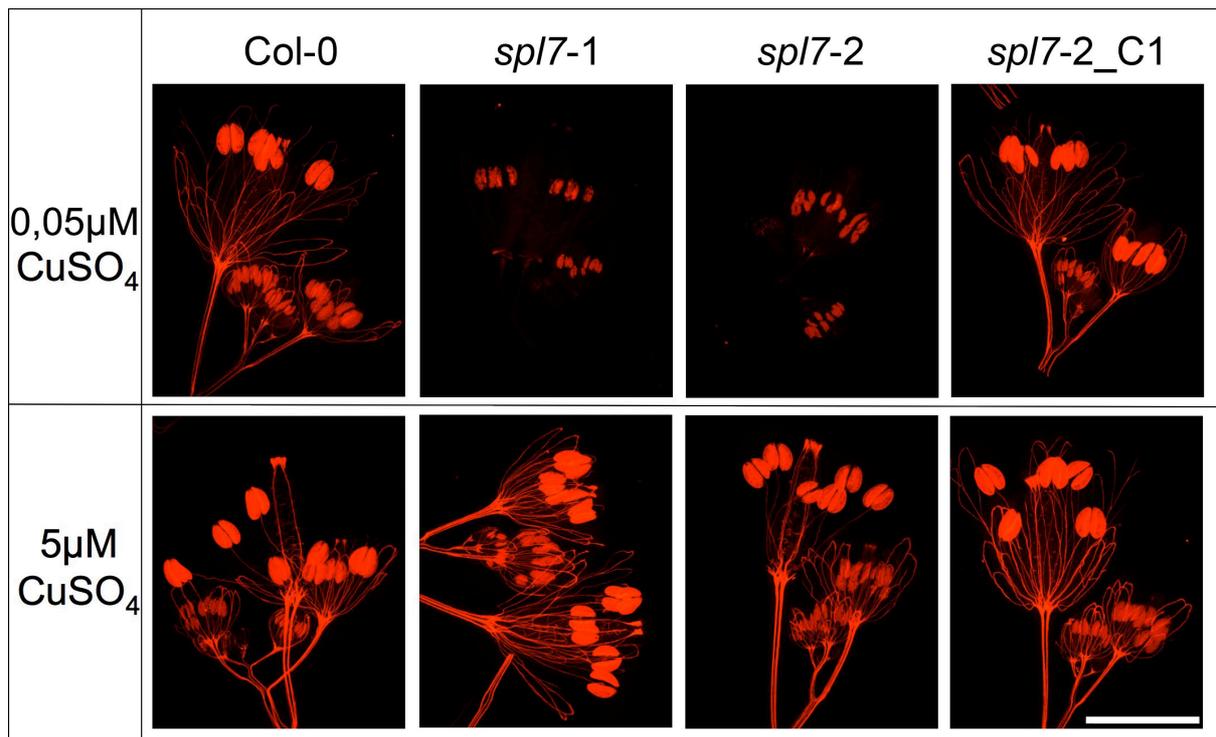


Abb.3.3.2: Fluoreszenzbilder von Infloreszenzen des Wildtypes, *spl7-1*, *spl7-2* und der komplementierten Linie die auf 1/2x MS-Medium entweder mit 0,05 oder 5µM CuSO₄ wuchsen und mit basischem Fuchsin angefärbt wurden. Der Balken entspricht 1mm.

Die Aufnahmen der Antheren mit dem konfokalen Lasermikroskop zeigen deutlich, dass unter normalen Bedingungen in den beiden Mutanten die Antheren, und hierbei das Endothecium, nur sehr gering gefärbt wurden. Es ist nur die Färbung einer dünnen Schicht zu erkennen (Abb. 3.3.3). Die hauptsächliche Färbung die auch in den Infloreszenzen erkennbar ist (Abb. 3.3.2), ging von den Pollen selber aus (Abb. 3.3.3). Somit ist die Anthere der Mutanten unter Kupfermangel wahrscheinlich deutlich geringer lignifiziert als der Wildtyp.

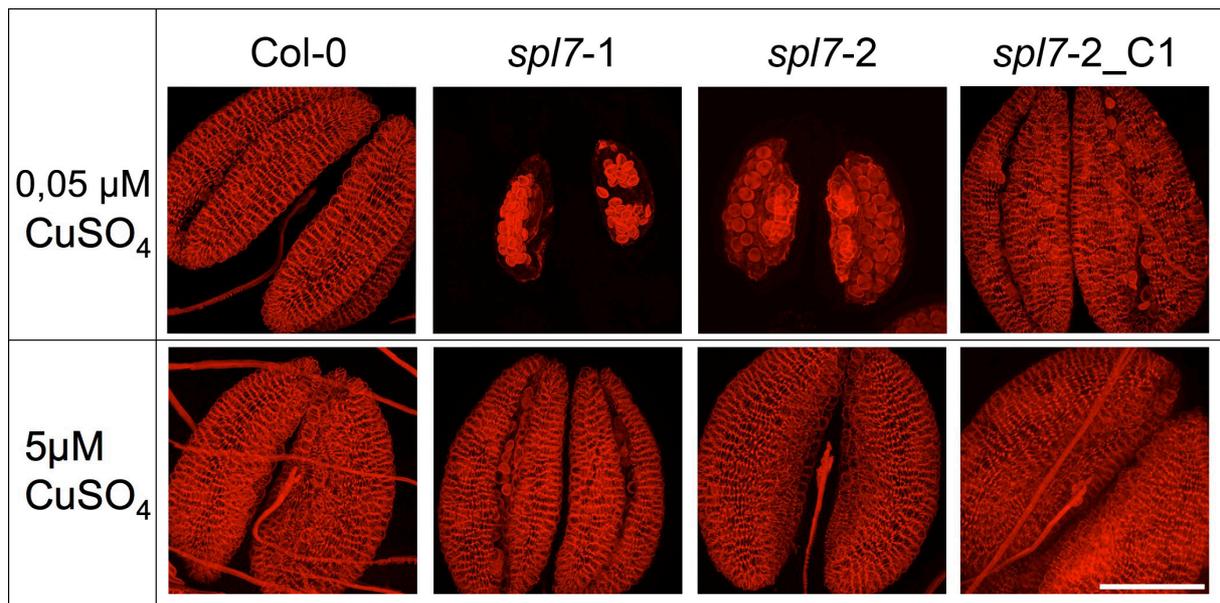


Abb.3.3.3: Fluoreszenzbilder von Infloreszenzen des Wildtypes, *spl7-1*, *spl7-2* und der komplementierten Linie, die auf 1/2x MS-Medium entweder mit 0,05 oder 5 μM CuSO_4 wuchsen und mit basischem Fuchsin angefärbt wurden. Die Fluoreszenzbilder sind aus 40 verschiedenen Ebenen zusammengesetzt. Der Balken entspricht 100 μm .

3.3.3 Die Lignifizierung der Leitbündel der Wurzeln in den *spl7*-Mutanten unter Kupfermangel

Die Wurzeln der *spl7*-Mutanten wuchsen unter normalen Bedingungen deutlich langsamer als der Wildtyp (Abb. 3.2.7). Bei der Färbung der Wurzeln mit basischem Fuchsin ist auch in ihnen der gleiche deutliche phänotypische Unterschied wie auch schon in den Keimblättern und Infloreszenzen zu erkennen. Das vaskuläre Gewebe wurde in den Mutanten nicht mit angefärbt und ist somit wahrscheinlich nicht lignifiziert (Abb. 3.3.4 und Abb. 6.2 im Anhang). Allerdings wurde der Caspary-Streifen gefärbt, der eine Abgrenzung für den Transport von Wasser und Ionen zwischen den Zellwänden darstellt (Pollard et al. 2008) (Abb. 3.3.4 und Abb. 6.2). Unter 5 μM Kupfer im Medium wurden die Wurzeln der Mutanten wieder genauso gefärbt wie der Wildtyp (Abb.3.3.5 und Abb. 6.3 im Anhang).

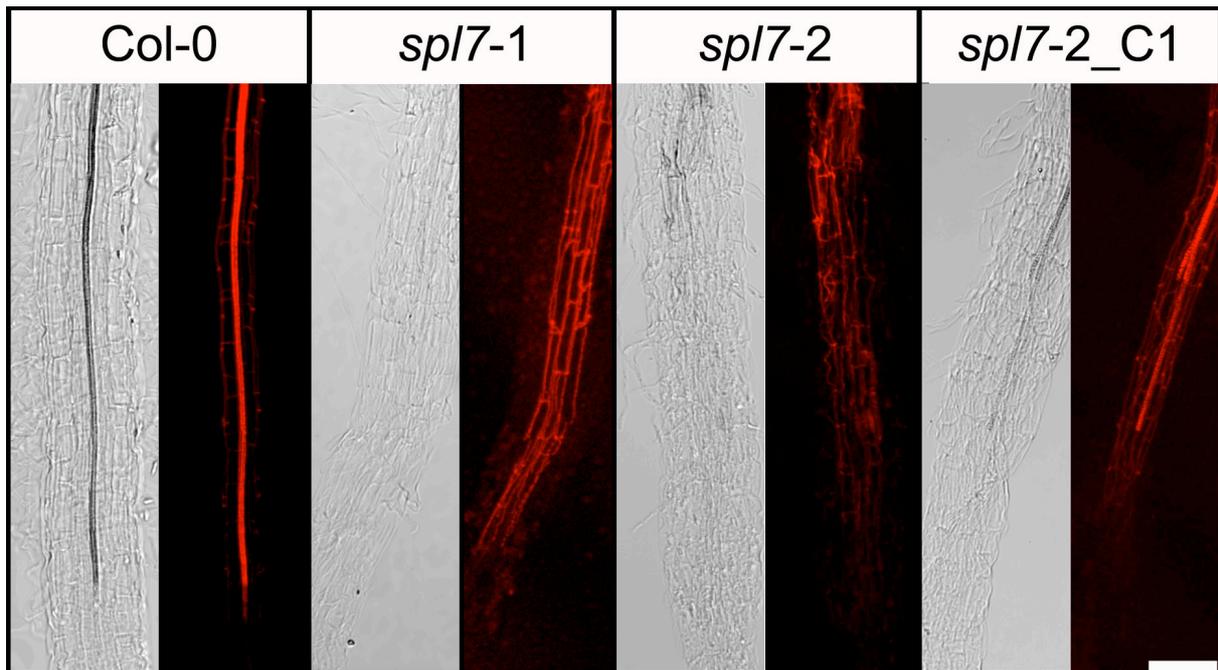


Abb.3.3.4: Durchlichtbilder und entsprechende Fluoreszenzbilder der Differenzierungszone von Wurzelspitzen von 10 Tage alten Keimlingen, die auf 1/2x MS-Medium mit 0,05µM CuSO₄ wuchsen und mit basischem Fuchsin angefärbt wurden. Die Bilder sind jeweils aus 20 verschiedenen Ebenen zusammengesetzt. Der Balken entspricht 100 µm.

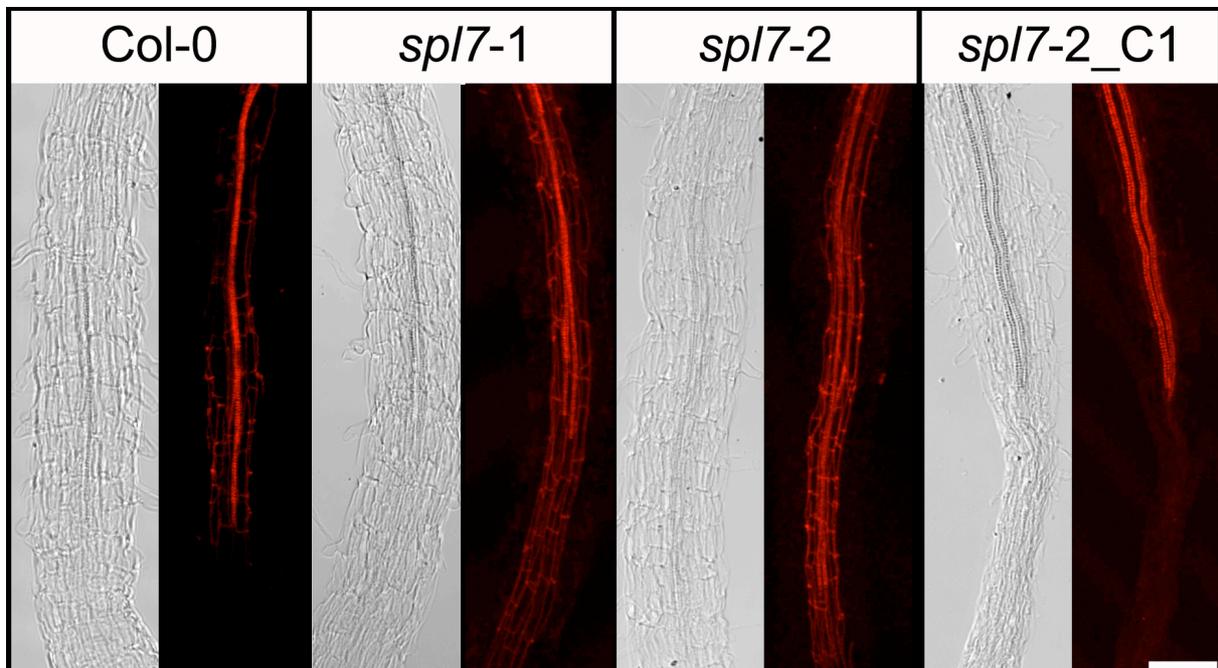


Abb.3.3.5: Durchlichtbilder und entsprechende Fluoreszenzbilder der Differenzierungszone von Wurzelspitzen von 10 Tage alten Keimlingen, die auf 1/2x MS-Medium mit 0,05µM CuSO₄ wuchsen und mit basischem Fuchsin angefärbt wurden. Die Bilder sind aus 20 verschiedenen Ebenen zusammengesetzt. Der Balken entspricht 100 µm.

Insgesamt lässt sich aufgrund der Färbung mit basischem Fuchsin sagen, dass die Lignifizierung des Leitbündelsystems und der Antheren in den *spl7*-Mutanten unter normalen Wachstumsbedingungen im Vergleich zum Wildtyp geringer bzw. nicht vorhanden ist. Diese fehlende Lignifizierung ist aber bei Kupferdüngung nicht mehr nachzuweisen, stattdessen gleicht sie der des Wildtyps.

3.4 Transkriptom-Analyse mittels Solexa-Sequenzierung von Wurzel- und Rosettenmaterial

Um einen tieferen Einblick in die durch *SPL7* bestimmte Regulation bei Kupfermangel zu gewinnen, wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Sabeeha Merchant (UCLA, USA) und Prof. Dr. Ute Krämer (Ruhr-Universität Bochum) die *spl7-2*-Mutante und der Wildtyp bezüglich ihres Transkriptoms unter Kupfermangelbedingungen und Kupferdüngung untersucht. Dazu wurden die Pflanzen hydroponisch unter ausreichend- und Mangel-Kupfer Bedingungen in dem Labor von Prof. Dr. Ute Krämer von Dr. Maria Bernal angezogen, Wurzeln und Rosetten getrennt geerntet und die RNA extrahiert. Diese wurde dann mithilfe der Solexa-Sequenzierung analysiert. Die Analyse wurde in den USA von der Bioinformatik-Arbeitsgruppe von Dr. Matteo Pelligrini (UCLA, USA) durchgeführt und bestätigte viele Ergebnisse, die kurze Zeit später von Yamasaki und Mitarbeitern (2009) veröffentlicht wurden.

3.4.1 Regulation von Transportern und Chaperonen für Metallionen

Durch die Trennung von Rosette- und Wurzelmaterial vor der Solexa-Sequenzierung ist es möglich, die Unterschiede in der Genregulation von den kupferaufnehmenden Geweben (Wurzeln) und dem in unserem Experiment Hauptverbraucher (Rosetten) zu analysieren. Des Weiteren ist es, über den Vergleich der gleichen Gewebe bei unterschiedlicher Kupferkonzentration möglich, die Regulation in diesem Gewebe und dem möglichen

Transport von Kupfer zu machen. Durch den Vergleich der Änderungen bei den beiden Kupferkonzentrationen zwischen dem Wildtyp und der *spl7*-Mutante ist es des Weiteren möglich Aufschluss über den Beitrag von *SPL7* an der Kupfer-Homöostase zu machen.

Durch den Vergleich der Transkriptmenge von bekannten Transportern und Chaperonen für Kupfer wird deutlich, dass im Wildtyp in der Wurzel eine Erhöhung der Transkriptlevel von Kupfer-Transportern unter Kupfermangelbedingungen statt fand, was eine erhöhte Aufnahme von Kupfer zur Folge haben könnte. In der Mutante wurde in der Wurzel unter Kupfermangelbedingungen die Transkriptionsrate dieser Transporter und Chaperone jedoch nicht erhöht, was auf eine mangelhafte Versorgung der Pflanze mit Kupfer schließen lässt.

Die ZIP-Transporter sind bekannt für den Import von zweiwertigen Metallionen, unter anderem Kupfer (Guerinot 2000; Puig et al. 2007a; Yruela 2009). So wurden beispielsweise im Wildtyp und nicht in der Mutante besonders *ZIP2* (FDR<<0,02; 17fach; Tab. 3.4.1) unter Kupfermangel erhöht.

Die COPT-Transporter sind im Gegensatz zu den ZIPs hochspezifisch für den Import von einwertigen Kupferionen (Burkhead et al. 2009; Penarrubia et al. 2009; Sancenon et al. 2003). Die Transkriptmenge von *COPT2* in der Rosette (Tab. 3.4.1 24fach FDR<<0,02) und in den Wurzeln (Tab. 3.4.1 22fach FDR<<0,02) des Wildtyps war unter Kupfermangel hoch. Auch die Transkriptionsrate von *COPT1* wurde in den Wurzeln des Wildtypes erhöht (Tab. 3.4.1 17fach FDR<<0,02). In der Mutante gingen die Transkriptionsraten von *COPT1* in der Rosette runter (Tab. 3.4.1 0,8fach FDR<<0,02) und für *COPT2* in der Wurzel verdoppelten sie sich nur (Tab. 3.4.1 FDR<<0,02). In dem jeweils anderen Gewebe der Mutante waren diese *COPT*-Transporter nicht signifikant reguliert (Tab. 3.4.1).

In *spl7-2* gingen im Gegensatz zum Wildtyp die Transkriptmengen für *COPT4*, dem einzigen COPT ohne die Kupferbindedomäne (Penarrubia et al. 2009), runter (Tab. 3.4.1 0,15fach FDR<<0,02).

Aus der Eisenaufnahme sind die FRO-Enzyme bekannt, die Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduzieren, damit sie durch IRT-Transporter aufgenommen werden können (Burkhead et al. 2009; Puig et al. 2007a). Aus den Solexa-Daten geht hervor, dass die Transkriptmengen vieler *FROs* in der Wurzel vom Wildtyp signifikant unter Kupfermangel anstiegen. Besonders die von *FRO4* und *FRO5* stiegen um ein vielfaches (*FRO4* mehr als 50fache und *FRO5* mehr als 7000fache;

Tab. 3.4.1 FDR<<0,02) in den Wurzeln an. In der Mutante hingegen sanken die Transkriptmengen der *FROs* unter Kupfermangel tendenziell, sind aber nicht signifikant (Tab. 3.4.1 FDR>0,02). Auch die Transkripte der IRT-Transporter, die zweiwertigen Eisenionen importieren, stiegen sowohl in der Mutante wie auch im Wildtyp leicht an, bis auf IRT3, der im Wildtyp in der Wurzel schwach runterreguliert wurde (Tab. 3.4.1 FDR<<0,02).

YSL-Transporter transportieren Metall-Chelat-Komplexe mit Nicotianamin (Abb. 1.1.1). Viele YSL-Transporter waren im Wildtyp signifikant höher unter Kupfermangel exprimiert als unter Kupferdüngung. Besonders die Level der *YSL2* und *YSL3* mRNA wurden sowohl in den Wurzeln (Tab. 3.4.1 FDR<<0,02; *YSL2* 7fach und *YSL3* 2,6fach) als auch in den Rosetten des Wildtypes (Tab. 3.4.1 FDR<<0,02; *YSL2* 25fach und *YSL3* 4,4fach) stark erhöht. Allerdings kann keine starke Zunahme der Transkription der Enzyme für die Synthese des Chelators Nicotianamin festgestellt werden, obwohl sie teilweise einen FDR-Wert unter 2% haben (Tab. 6.3 Anhang). Lediglich ein Gen, *At1g56430*, ging in seiner Expression um den Faktor zwei in der *spl7-2* Mutante unter Kupfermangel runter (Tab. 6.3 FDR<<0,02).

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sind Kupferionen in ungebundener Form, aufgrund der Bildung von Hydroxylradikalen, dem Austausch anderer Metallionen als Kofaktor oder auch die Bindung an Thiolgruppen, toxisch für die Zelle. Deswegen werden sie immer an Proteine oder Chelatoren gebunden. Bestimmte Proteine wie *CSD1*, *CSD2* oder auch *CCS* werden zusätzlich zu ihrer enzymatischen oder Transport-Funktion auch noch als Speicher für Kupfer eingesetzt (Burkhead et al. 2009; Pilon et al. 2009; Yruela 2009). Im Wildtyp gingen unter Kupfermangel die Transkriptmengen von *CSD1*, *CSD2* und des Chaperon *CCS* mindestens um das 14fache in der Rosette und mindestens um das vierfache in der Wurzel herunter (Tab. 3.4.1 FDR<<0,02). In der Mutante von *spl7* blieben die Transkriptionsraten nahezu gleich. Diese Regulation ist abhängig von *SPL7* (Yamasaki et al. 2009).

Das Gen für das Chaperon *CCH*, dass für den Transport von Kupfer zwischen Zellen via Plasmodesmata und dem Transport über das Phloem zuständig ist, wurde im Wildtyp um ein fünffaches sowohl in den Wurzeln wie auch in den Rosetten erhöht (Tab. 3.4.1 FDR<0,02). Dieses Regulation geschieht nicht in der Mutante und ist somit, wie von (Yamasaki et al. 2009) beschrieben, auch abhängig von *SPL7*.

Tab. 3.4.1: SPL7, bekannte Kupfertransporter, Chaperone und Proteine, die den Hauptteil an Kupfer in der Pflanze enthalten. Dargestellt sind nur die Gene die einen FDR-Wert von unter 2% hatten. Die restlichen bekannten Transporter und Proteine der gezeigten Genfamilien die einen FDR von über 2% hatten sind im Anhang in Tab. 6.1.

Von links nach rechts: Gen-Name in Form des AGI-Codes; Gewebe: R: Rosette; W: Wurzel; Expressions-Daten in „reads per Million“ von Wildtyp und *spl7-2* mit und ohne Kupfer gewachsen; Verhältnisse von Wildtyp und *spl7-2* zwischen + und -Cu Rot: Verhältnis um den Faktor 2 geändert FRD: False Discovery Rate

AGI-Code	Gewebe	Name	WT +Cu	WT Cu	spl7 +Cu	spl7 Cu	WT +/-	FDR	spl7 +/-	FDR
AT5G18830	R	SPL7	23,8	26,5	7,4	8,8	0,90	0,351	0,84	0,342
AT5G18830	W	SPL7	45,4	50,9	11,5	7,8	0,89	0,063	1,48	0,107
AT1G66240	R	ATX1	115,8	163,4	145,0	135,4	0,71	0,000	1,07	0,175
AT1G66240	W	ATX1	231,1	204,8	176,5	222,9	1,13	0,000	0,79	0,000
AT3G56240	R	CCH	97,8	511,9	110,9	90,0	0,19	0,000	1,23	0,000
AT3G56240	W	CCH	125,2	670,0	91,2	69,2	0,19	0,000	1,32	0,000
AT1G12520	R	CCS1	165,1	11,3	173,8	168,5	14,59	0,000	1,03	0,466
AT1G12520	W	CCS1	108,5	25,8	106,6	142,7	4,20	0,000	0,75	0,000
AT5G59030	R	COPT1	39,7	54,2	43,5	34,6	0,73	0,000	1,26	0,012
AT5G59030	W	COPT1	0,3	5,3	1,4	1,8	0,06	0,000	0,78	0,510
AT3G46900	R	COPT2	0,7	16,8	0,8	0,7	0,04	0,000	1,24	0,470
AT3G46900	W	COPT2	15,5	347,9	10,9	25,4	0,04	0,000	0,43	0,000
AT2G37925	W	COPT4	5,6	5,1	6,0	0,9	1,10	0,202	6,65	0,000
AT2G26975	R	COPT6	22,2	33,3	24,7	19,4	0,67	0,000	1,27	0,077
AT1G08830	R	CSD1	502,9	29,4	536,9	616,0	17,11	0,000	0,87	0,000
AT1G08830	W	CSD1	483,2	32,5	540,0	490,5	14,85	0,000	1,10	0,000
AT2G28190	R	CSD2	570,6	12,2	637,3	436,6	46,94	0,000	1,46	0,000
AT2G28190	W	CSD2	150,1	15,2	138,3	158,0	9,89	0,000	0,88	0,085
AT1G01580	W	FRO2	160,1	170,5	194,1	342,3	0,94	0,008	0,57	0,000
AT1G23020	R	FRO3	23,0	29,4	36,0	47,7	0,78	0,053	0,75	0,000
AT1G23020	W	FRO3	43,6	80,8	47,8	64,2	0,54	0,000	0,75	0,000
AT5G23980	W	FRO4	1,9	96,9	1,4	0,8	0,02	0,000	1,79	0,209
AT5G23990	R	FRO5	0,1	3,5	0,1	0,1	0,03	0,000	1,00	0,490
AT5G23990	W	FRO5	0,1	705,0	0,4	0,1	0,00	0,000	3,57	0,288
AT5G49730	R	FRO6	168,2	160,2	167,5	102,7	1,05	0,279	1,63	0,000
AT5G49730	W	FRO6	0,2	1,3	1,9	1,0	0,14	0,003	1,81	0,379
AT5G49740	R	FRO7	57,1	66,5	61,9	46,0	0,86	0,029	1,34	0,000
AT5G50160	R	FRO8	83,8	77,5	101,0	83,0	1,08	0,144	1,22	0,000
AT4G25100	R	FSD1	13,7	1565,5	0,8	0,8	0,01	0,000	0,96	0,590
AT4G25100	W	FSD1	18,7	1112,1	0,1	0,4	0,02	0,000	0,23	0,186
AT4G37270	R	HMA1	44,1	57,1	61,4	53,4	0,77	0,002	1,15	0,046
AT4G30110	R	HMA2	22,0	22,0	36,8	13,0	1,00	0,601	2,83	0,000
AT4G30110	W	HMA2	12,5	17,0	12,6	3,8	0,73	0,004	3,33	0,000
AT2G19110	R	HMA4	26,8	18,3	23,8	21,4	1,46	0,002	1,12	0,349
AT2G19110	W	HMA4	311,7	318,9	311,1	368,5	0,98	0,063	0,84	0,000
AT1G63440	W	HMA5	36,4	46,4	48,7	62,8	0,79	0,002	0,78	0,000
AT5G44790	R	HMA7 RAN1	70,6	73,5	75,9	97,2	0,96	0,442	0,78	0,000
AT5G44790	W	HMA7 RAN1	372,7	394,1	363,5	374,9	0,95	0,003	0,97	0,093
AT5G21930	W	HMA8/PAA2	14,0	12,8	12,5	20,1	1,09	0,180	0,62	0,011
AT4G19690	R	IRT1	0,7	1,2	1,2	3,0	0,62	0,389	0,39	0,011
AT4G19690	W	IRT1	45,3	63,5	58,1	95,4	0,71	0,000	0,61	0,000
AT4G19680	W	IRT2	2,2	4,5	5,3	8,4	0,50	0,012	0,63	0,019
AT1G60960	W	IRT3	34,7	32,0	30,2	21,0	1,08	0,318	1,44	0,019
AT1G20340	R	PETE1	1680,6	1528,6	1711,0	923,8	1,10	0,000	1,85	0,000
AT1G20340	W	PETE1	0,6	0,1	1,6	0,5	6,03	0,020	3,15	0,013
AT1G76100	R	PETE2	182,4	129,0	169,7	122,5	1,41	0,000	1,38	0,000
AT2G02850	R	PLANTACYANIN	22,7	1,3	17,5	22,8	17,73	0,000	0,77	0,028
AT2G02850	W	PLANTACYANIN	36,0	9,7	28,1	38,5	3,70	0,000	0,73	0,005
AT4G24120	R	YSL1	27,1	35,1	20,2	32,9	0,77	0,009	0,61	0,000
AT4G24120	W	YSL1	1,5	2,5	1,2	0,3	0,63	0,050	3,72	0,012
AT5G24380	R	YSL2	2,7	68,2	2,2	2,2	0,04	0,000	0,97	0,490
AT5G24380	W	YSL2	8,1	55,2	6,3	4,5	0,15	0,000	1,39	0,021
AT5G53550	R	YSL3	25,6	112,4	20,3	34,1	0,23	0,000	0,59	0,000
AT5G53550	W	YSL3	43,8	112,3	46,3	64,9	0,39	0,000	0,71	0,000
AT5G41000	R	YSL4	6,1	7,0	5,1	9,2	0,88	0,480	0,56	0,002
AT5G41000	W	YSL4	7,3	8,3	8,6	3,6	0,88	0,171	2,35	0,001
AT3G17650	R	YSL5	40,5	28,7	48,1	38,4	1,41	0,001	1,25	0,007
AT1G65730	R	YSL7	1,9	3,3	0,4	3,7	0,58	0,161	0,11	0,000
AT1G48370	R	YSL8	19,0	18,3	16,2	28,9	1,04	0,510	0,56	0,000
AT5G59520	W	ZIP2	17,0	300,0	2,3	3,5	0,06	0,000	0,66	0,112
AT2G32270	W	ZIP3	66,6	50,6	89,7	75,9	1,32	0,000	1,18	0,000
AT1G31260	W	ZIP10	1,0	3,1	1,3	0,2	0,32	0,009	7,02	0,047
AT1G55910	R	ZIP11	15,9	46,2	21,9	35,9	0,34	0,000	0,61	0,000
AT1G55910	W	ZIP11	8,1	21,1	10,3	11,7	0,38	0,000	0,89	0,506

Das Transkript für das Chaperon *ATX1*, das für den Transport und die Interaktion mit den HMA-Transportern zuständig ist, war im Wildtyp bei Kupfermangel in der Rosette leicht erhöht und in der Wurzel leicht reduziert (Tab. 3.4.1 $FDR \ll 0,02$). In der Mutante war die Regulation dieses Gens in Abhängigkeit von der Kupferkonzentration genau umgekehrt. HMA-Transporter sind für den Transport von Metallionen vom Cytosol in Zellorganelle oder den Apoplast zuständig (Burkhead et al. 2009; Pilon et al. 2009; Yruela 2009). Die Veränderung der Transkriptmengen der HMA-Transporter war sowohl im Wildtyp wie auch in der *spl7*-Mutante im Vergleich zwischen den beiden Kupferkonzentrationen zwar signifikant, aber nicht besonders stark (Tab. 3.4.1 $FDR < 0,02$). Der einzige HMA-Transporter der in der Mutante hochreguliert wurde ist HMA2. HMA2 ist zusammen mit HMA4 für den Transport von Zink und Cadmium zuständig (Wong et al. 2009).

3.4.2 Regulation des Phenylpropanoid- Biosyntheseweges

Bisher zeigten die Solexa Daten eine Veränderung der Expression von Genen, die für Kupfertransporter und Chelatoren unter Kupfermangel im Wildtyp und nicht in der *spl7*-Mutante auftrat. Diese sind aber nicht die einzigen Gene, deren Expressionsmuster verändert sind. Bei weiterer Untersuchung der Solexa Daten fiel auf, dass der Phenylpropanoid-Biosyntheseweg ebenfalls vom Kupfermangel beeinflusst wird.

In der Phenylpropanoid-Biosynthese werden aus einem Produkt des Phenylalanins über verschiedene enzymatische Schritte die drei Ligninmonomere Coumaryl-, Coniferyl- und Sinapyl-Alkohol hergestellt. Diese bilden den Hauptbestandteil des Lignins in der Zellwand (Boerjan et al. 2003). Keines dieser an der Phenylpropanoid-Biosynthese beteiligten Enzyme benötigt Kupfer als Kofaktor. In Tabelle 3.4.2 und 3.4.3 sind die einzelnen Enzyme aufgelistet, die signifikant beim Vergleich der unterschiedlichen Kupferkonzentrationen im Wildtyp und in der Mutante verändert waren. Die Nummern sind den von ihnen wahrscheinlich katalysierten Reaktionen in der Phenylpropanoid-Biosynthese Abbildung 3.4.1 zugeordnet. Die Transkripte der Enzyme für das Anhängen des Coenzym A (Reaktion(1)) waren im Wildtyp von +Cu zu -Cu erhöht und in der Mutante verringert (Tab. 3.4.2 und 3.4.3 $FDR < 0,02$). Die Enzyme für die spätere Abspaltung des Coenzym A (Reaktion(2)) und des Oxidierens des Carbonyls zu einer Alkoholgruppe (Reaktion(3)) war

sowohl im Wildtyp wie auch in der Mutante in ihren Transkriptmengen unter –Cu-Bedingungen erhöht (Tab. 3.4.2 und 3.4.3 FDR<0,02). In der Mutante waren allerdings deutlich mehr Gene der Reaktionen (2) und (3) signifikant betroffen als im Wildtyp (Tab. 3.4.2 und 3.4.3 FDR<0,02). Der Schritt für die Addition einer weiteren Alkohol-Gruppe an den Phenylring (Reaktion (4)) ist sowohl im Wildtyp wie auch in der Mutante in den Transkriptmengen leicht geringer unter Kupfermangel (Tab. 3.4.2 und 3.4.3 FDR<0,02). Die Transkripte des Enzyms des Schrittes für die erste Ethergruppe an dem aromatischen Ring (Reaktion(5)) waren ebenfalls unter -Cu geringer im Wildtyp wie in der Mutante (Tab. 3.4.2 und 3.4.3 FDR<0,02) genauso wie der Schritt für das Anhängen der zweiten Ethergruppe (Reaktion(6)).

Tab. 3.4.2: Solexa-Daten der Gene des Wildtypes die an der Phenylpropanoid-Biosynthese beteiligt sind. Dargestellt sind nur die Gene die einen FDR-Wert hatten, der unter 2% liegt. Die restlichen bekannten Transporter und Proteine der gezeigten Genfamilien die einen FDR von über 2% hatten sind im Anhang in Tab. 6.2.

AGI-Code	Gewebe	Name	Reaktion	WT +Cu	WT -Cu	WT +/-	FDR
AT1G20480	W	4-coumarate-CoA ligase-like 2 identical	1	1,9	3,9	0,47	0,018
AT1G80820	W	CCR2 (CINNAMOYL COA REDUCTASE)	2	28,8	33,8	0,85	0,010
AT1G76470	R	cinnamoyl-CoA reductase	2	1,0	9,9	0,11	0,000
AT1G72680	R	cinnamyl-alcohol dehydrogenase	3	27,1	48,4	0,56	0,000
AT5G19440	R	cinnamyl-alcohol dehydrogenase	3	95,5	130,2	0,73	0,000
AT1G09480	R	cinnamyl-alcohol dehydrogenase family similar	3	3,3	7,1	0,46	0,002
AT5G48930	W	transferase family protein	4	265,6	242,5	1,10	0,004
AT4G34050	R	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase	5	164,3	255,2	0,64	0,000
AT4G34050	W	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase	5	429,3	570,1	0,75	0,000
AT1G67980	R	CCoAMT (caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase)	5	5,1	11,6	0,45	0,000
AT4G36220	R	FAH1 (FERULATE-5-HYDROXYLASE 1)	6	94,3	121,0	0,78	0,000
AT4G36220	W	FAH1 (FERULATE-5-HYDROXYLASE 1)	6	31,4	22,8	1,38	0,000

Von links nach rechts: Gen-Zuordnung nach dem AGI-Code; Gewebe: R: Rosette; W: Wurzel; Expressionsdaten in reads per Million von Wildtyp mit und ohne Kupfer; Verhältnisse von Wildtyp und *spl7-2* zwischen + und –Cu und Statistik; Rot: Verhältnis um den Faktor 2 geändert; FRD: False Discovery Rate

Tab. 3.4.3: Solexa-Daten der Gene der *spl7* Mutante die an der Phenylpropanoid-Biosynthese beteiligt sind. Dargestellt sind nur die Gene die einen FDR-Wert hatten, der unter 2% liegt. Die restlichen bekannten Transporter und Proteine der gezeigten Genfamilien die einen FDR von über 2% hatten sind im Anhang in Tab. 6.2.

AGI-Code	Gewebe	Name	Reaktion	spl7 +Cu	spl7 -Cu	spl7 +/-	FDR
AT5G38120	R	4-coumarate-CoA ligase family protein	1	3,4	1,0	3,28	0,002
AT5G63380	R	4-coumarate-CoA ligase family protein	1	17,2	11,0	1,56	0,002
AT1G80820	W	CCR2 (CINNAMOYL COA REDUCTASE)	2	21,0	39,8	0,53	0,000
AT1G76470	R	cinnamoyl-CoA reductase	2	1,6	15,9	0,10	0,000
AT1G76470	W	cinnamoyl-CoA reductase	2	0,1	1,6	0,06	0,002
AT2G23910	R	cinnamoyl-CoA reductase-related	2	4,1	10,5	0,39	0,000
AT4G30470	R	cinnamoyl-CoA reductase-related	2	23,9	32,0	0,75	0,001
AT1G09500	R	CAD family	3	13,5	48,0	0,28	0,000
AT1G72680	R	cinnamyl-alcohol dehydrogenase	3	23,5	51,7	0,46	0,000
AT5G19440	R	cinnamyl-alcohol dehydrogenase	3	108,1	184,4	0,59	0,000
AT5G19440	W	cinnamyl-alcohol dehydrogenase	3	55,0	72,9	0,75	0,001
AT1G09480	R	cinnamyl-alcohol dehydrogenase family similar	3	3,2	6,4	0,50	0,005
AT1G09510	R	cinnamyl-alcohol dehydrogenase family similar	3	0,1	1,6	0,09	0,001
AT1G09480	W	cinnamyl-alcohol dehydrogenase family similar	3	1,5	4,7	0,31	0,000
AT5G48930	W	transferase family protein	4	286,2	223,7	1,28	0,000
AT4G34050	W	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase	5	479,1	428,7	1,12	0,000
AT1G67980	R	CCoAMT (caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase)	5	4,7	29,0	0,16	0,000
AT1G67980	W	CCoAMT (caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase)	5	29,6	70,8	0,42	0,000
AT4G36220	R	FAH1 (FERULATE-5-HYDROXYLASE 1)	6	98,1	149,3	0,66	0,000
AT4G36220	W	FAH1 (FERULATE-5-HYDROXYLASE 1)	6	32,0	14,3	2,24	0,000

Von links nach rechts: Gen-Zuordnung nach dem AGI-Code; Gewebe: R: Rosette; W: Wurzel; Expressionsdaten in reads per Million von *spl7-2* mit und ohne Kupfer gewachsen; Verhältnisse von Wildtyp und *spl7-2* zwischen + und -Cu und Statistik; Rot: Verhältnis um den Faktor 2 geändert; FRD: False Discovery Rate

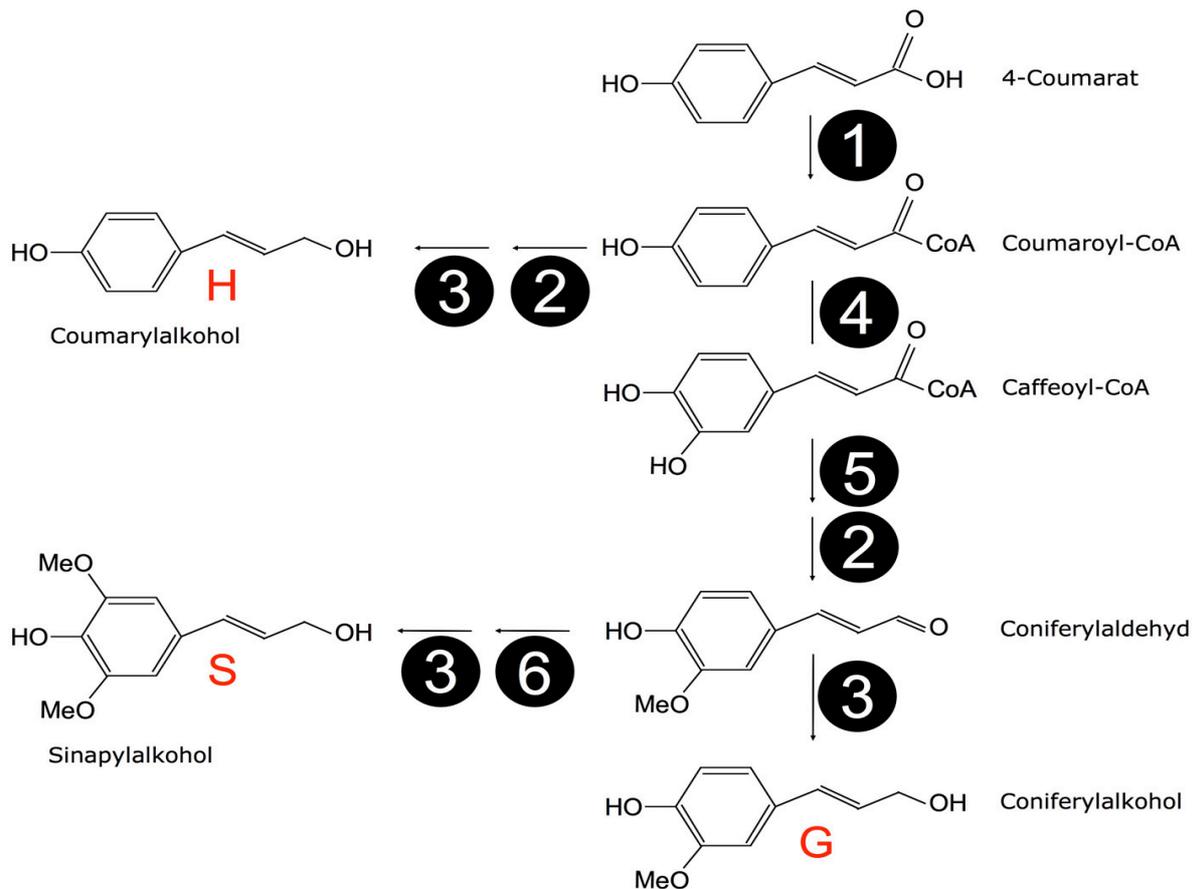


Abb. 3.4.1: Vereinfachte Darstellung des Phenylpropanoid-Biosyntheseweges zur Herstellung der drei Monolignole. In Rot dargestellt sind die Abkürzungen für die bekannten Monolignole und die schwarzen Kreise mit den Nummern verweisen auf die enzymatische Schritte, die in Tab. 3.4.2 verändert sind.

3.4.3 Transkriptionelle Kontrolle der Genfamilie der Laccasen

Laccasen sind oxidierende Enzyme die für ihre Funktion vier Kupferionen in ihrem aktiven Zentrum benötigen (Cai et al. 2006). Laccasen werden mit der Radikalbildung während der Lignifizierung in Verbindung gebracht und werden in einer *SPL7*-abhängigen Weise wahrscheinlich durch verschiedene miRNAs unter Kupfermangel runterreguliert (Yamasaki et al. 2009), um die Kupferionen einzusparen. Analysen von mikroRNAs und deren über eine Computeranalyse berechneten Zieltranskripte deuten darauf hin, dass die *miR397* die Transkripte von *LAC2*, *LAC4* und *LAC17* (Jones-Rhoades and Bartel 2004), die *miR408* die Transkripte von *LAC3*, *LAC13* und *PLANTACYANIN* und die *miR857* die Transkripte von

LAC7 reguliert, außerdem gibt es eine negative Korrelation zwischen den Transkriptmengen von *PLANTACYANIN* und der *miR408* (Abdel-Ghany and Pilon 2008).

Aus den Solexa-Daten geht eindeutig hervor, dass die Vorläufer für die *miR397b*, *miR408* und *miR857a* unter Kupfermangel im Wildtyp höher exprimiert waren als bei ausreichend Kupfer (Tab. 3.4.4 FDR<0,02), wohingegen sie in der Mutante bei Kupfermangel genauso gering in ihrer Expression blieben wie unter ausreichend Kupfer (Tab. 3.4.4 FDR>0,02). Die in silico vorhergesagten Ziele der einzelnen miRNAs hingegen gingen im Wildtyp nur teilweise runter. Die Ziele der am stärksten hochregulierten *miR408*, *LAC3* (Tab. 3.4.4) und *PLANTACYANIN* (Tab. 3.4.1) waren beide stark bei Kupfermangel im Wildtyp runterreguliert. Der *LAC13*-Transkriptlevel hingegen sank im Wildtyp nur in den Wurzeln bei Kupfermangel, obwohl der Vorläufer der *miR408* in beiden Geweben um mehr als das 100fache anstieg (Tab. 3.4.4 FDR<<0,02). Die *LAC13* Transkripte gingen in gleicher Weise in den Wurzeln der Mutante unter Kupfermangel runter, obwohl in ihr die *miR408* nicht aktiviert wurde. Die Ziele der *miR397* verhielten sich im Wildtyp bei Kupfermangel ähnlich wie die der *miR408* (Tab. 3.4.4). *LAC2* und *LAC4* gingen im Wildtyp in beiden Geweben stark runter (Tab. 3.4.4 FDR<0,02) und veränderten sich kaum in der Mutante (Tab. 3.4.4 FDR>0,02). *LAC17* hingegen veränderte sich im Wildtyp kaum unter Kupfermangel, wurde aber in der Mutante verstärkt exprimiert (Tab. 3.4.4 FDR<0,02). Die meisten anderen bekannten Laccasen, die nicht unter der Kontrolle einer miRNA stehen, veränderten sich in ihren Expressionsleveln weder in Wildtyp noch in der Mutante stark (Tab. 3.4.4).

Tab. 3.4.4: Solexa-Daten der Genfamilie der Laccasen und der in silico Laccasen regulierenden miRNAs.

AGI-Code	Gewebe	Name	WT +Cu	WT -Cu	spl7 +Cu	spl7 -Cu	WT +/-	FDR	spl7 +/-	FDR
AT1G18140	W	LAC1	2,5	2,1	1,7	6,0	1,22	0,123	0,29	0,000
AT2G29130	R	LAC2	4,4	0,1	3,4	2,0	43,65	0,000	1,75	0,124
AT2G29130	W	LAC2	46,7	9,1	39,1	48,2	5,16	0,000	0,81	0,054
AT2G30210	R	LAC3	6,3	1,3	3,3	4,2	4,89	0,000	0,79	0,402
AT2G30210	W	LAC3	76,7	37,3	84,2	39,6	2,05	0,000	2,13	0,000
AT2G38080	R	LAC4/IRX12	8,8	3,1	10,1	6,7	2,87	0,000	1,51	0,076
AT2G38080	W	LAC4/IRX12	50,0	17,9	56,8	56,8	2,79	0,000	1,00	0,380
AT2G40370	W	LAC5	6,0	9,1	8,3	6,1	0,66	0,014	1,37	0,085
AT3G09220	R	LAC7	1,1	1,7	0,4	4,1	0,66	0,429	0,10	0,000
AT3G09220	W	LAC7	93,4	52,6	93,1	76,1	1,78	0,000	1,22	0,041
AT5G01040	R	LAC8	0,1	0,6	0,1	0,2	0,18	0,194	0,76	0,490
AT5G01040	W	LAC8	23,5	17,9	19,0	13,4	1,32	0,002	1,42	0,007
AT5G01050	W	LAC9	17,7	14,2	13,3	10,0	1,25	0,003	1,33	0,054
AT5G03260	R	LAC11	8,7	6,1	12,7	10,9	1,42	0,096	1,17	0,417
AT5G03260	W	LAC11	69,2	90,7	77,2	85,7	0,76	0,000	0,90	0,432
AT5G05390	W	LAC12	1,7	1,1	2,1	2,1	1,62	0,134	1,03	0,410
AT5G07130	W	LAC13	7,8	6,3	14,5	8,8	1,25	0,081	1,64	0,000
AT5G58910	W	LAC16	1,1	1,1	2,0	0,2	1,01	0,285	11,36	0,000
AT5G60020	R	LAC17	11,0	6,8	8,4	13,2	1,62	0,019	0,64	0,006
AT5G60020	W	LAC17	36,6	37,0	42,0	79,2	0,99	0,281	0,53	0,000
AT4G13555	W	MIR397B	0,1	1,3	0,1	0,1	0,08	0,000	1,00	0,433
AT2G47015	R	MIR408	0,1	12,8	0,1	0,1	0,01	0,000	1,00	0,490
AT2G47015	W	MIR408	0,1	14,6	0,1	0,1	0,01	0,000	1,00	0,433
AT4G13554	R	MIR857a	0,1	1,5	0,1	0,1	0,07	0,003	1,37	0,476
AT4G13554	W	MIR857a	0,1	2,6	0,1	0,1	0,04	0,000	1,00	0,433

Von links nach rechts: Gen-Name in Form des AGI-Codes; Gewebe: R: Rosette; W: Wurzel; Expressionsdaten in reads per Million von Wildtyp und *spl7-2* mit und ohne Kupfer gewachsen; Verhältnisse von Wildtyp und *spl7-2* zwischen + und -Cu und Statistik; Rot: Verhältnis um den Faktor 2 geändert; FRD: False Discovery Rate

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die molekulargenetischen Mechanismen von *SPL7* zu erforschen. Die beschriebenen phänotypischen Unterschiede der Mutanten, wie das insgesamt verlangsamte Wachstum, die Fertilitätsprobleme, das verfrühte Absterben des Apikalmeristems und die nur sehr geringe Lignifizierung deuteten alle auf eine gestörte Kupfer-Homöostase hin. Besonders die Tatsache, dass diese Unterschiede zum Wildtyp über eine Erhöhung des zur Verfügung stehenden Kupfers verschwanden, führte zu der Transkriptom-Analyse. Aufgrund dieser Solexa-Daten ist es möglich nicht nur viele bekannte Regulationsmechanismen der Kupfer-Homöostase mit *SPL7* zu verknüpfen, sondern darüber hinaus die untersuchten Phänotypen auf transkriptioneller Ebene zu erklären und Aussagen über weitere Forschungsansätze zu machen.

4.1 In den T-DNA-Insertionslinien *spl7-1* und *spl7-2* ist die Funktion von *SPL7* gestört

Um *SPL7* in *A. thaliana* zu studieren wurden vier verschiedene T-DNA-Insertionslinien von NASC bezogen und analysiert. Zwei von ihnen *spl7-1* und *spl7-2* zeigten im Vergleich zum Wildtyp phänotypische Unterschiede und auch die Transkription von *SPL7* war geringer als im Wildtyp (Abb .3.1.4). Über eine Komplementation mit dem genomischen *SPL7* wurden sämtliche Unterschiede im Phänotyp aufgehoben und auch die Transkription von *SPL7* war mit dem Wildtyp vergleichbar (Abb .3.1.4), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die T-DNA-Insertionen in *SPL7* für den Phänotyp verantwortlich waren und somit die analysierten Phänotypen auf einer fehlenden Regulation durch *SPL7* beruhten.

4.2 SPL7 ist der Hauptregulator für den Kupferhaushalt in *A. thaliana*

Um die Funktion von SPL7 in der Kupfer-Homöostase zu untersuchen und die vielen Aspekte der Kupfer-Homöostase zu durchleuchten, war es notwendig die *spl7* Mutanten auf unterschiedlichen Substraten und Medien wie Erde, Agar oder in hydroponischer Nährlösung wachsen zu lassen.

Aus der Literatur ist schon viel über die unterschiedlichen Mechanismen bekannt, die an der Kupfer-Homöostase beteiligt sind (Abb.1.2) (Burkhead et al. 2009; Penarrubia et al. 2009; Yruela 2009). Die meisten Gene, welche Teile dieser Mechanismen ausmachen wurden bei Kupfermangel, laut dem Solexa-Datensatz, differentiell zwischen Wildtyp und *spl7*-Mutante reguliert. Die Produktion der Daten und deren Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Sabeeha Merchant, Prof. Dr. Ute Krämer und Dr. Matteo Pellegrini erstellt. Durch die Trennung von Wurzeln und Rosetten ist es möglich, Aussagen über die Unterschiede in der Aufnahme und Verteilung von Kupfer in der Pflanze und den an der Kupfer-Homöostase beteiligten Proteinen zu machen. Die Bedingungen von 0,5 μM Kupfer, die für das hydroponische Wachsen der Pflanzen als optimale Kupferkonzentration gewählt wurde, weicht deutlich von den Konzentrationen ab, die für das Wachsen auf Agarplatten (5 μM CuSO_4) oder auf Erde (+ 11 5mM CuSO_4 -Lsg.) gewählt wurden. Dies hängt mit der Tatsache zusammen, dass die Pflanzenverfügbarkeit von einer bestimmten Konzentration von Nährstoffen von Erde zu Agar zu Hydroponik sehr stark zunimmt (Burkhead et al. 2009). Konzentrationen von Nährstoffen die im Agar-Medium optimal sind, können so in Flüssigkultur toxisch sein (Talke et al. 2006).

In dem verwendeten MS-Medium sind schon 0,05 μM CuSO_4 enthalten, so dass eine weitere Reduktion der Kupferkonzentration ein Umsteigen auf ein anderes Medium erforderlich machen würde. Durch die beiden verwendeten Kupferkonzentrationen waren Bedingungen gegeben, in denen der Wildtyp, durch die Möglichkeit sich auf die unterschiedlichen Konzentrationen einzustellen (von 0,05 auf 5 μM CuSO_4), keine phänotypischen Unterschiede aufwies, die Mutanten hingegen, durch das Fehlen der *SPL7* Funktion, sehr stark in ihrem Wachstum auf Agar mit einer Kupferkonzentration von 0,05 μM gestört waren (Abb. 3.2.4). Bei der Verwendung von 5 μM CuSO_4 waren die *spl7*-mutanten Pflanzen

phänotypisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden (Abb. 3.2.4). Die für *A. thaliana* als optimalen Kupferkonzentration bestimmte Menge von 5 μM CuSO_4 für das Wachsen auf Agar-Medium (Yamasaki et al. 2009) (Abb. 3.2.5 und 3.2.6) würden im hydroponischen System hingegen toxisch sein (Talke et al. 2006). Die in diesem Medium verwendeten 0,5 μM CuSO_4 als ausreichend Kupfer sind zwar leichte Mangelbedingungen, da die *spl7*-Mutanten auch hier geringe Kupferdefizienz-Symptome zeigten, der Wildtyp wächst aber optimal. Durch das Umsetzen der Pflanzen nach drei Wochen von 0,5 μM CuSO_4 Medium in Medium ohne Kupfer, steht den Pflanzen nur das schon in ihnen, beziehungsweise eventuell als Verunreinigungen in der Lösung enthaltene Kupfer zur Verfügung. Dahingegen wären die Mengen an CuSO_4 , die zusätzlich in die Erde gegeben werden (ein Liter einer 5mM CuSO_4 -Lsg. in ein Tray mit ca. 4 Liter Erde), sowohl im Agar- wie auch im hydroponischen Medium hochtoxisch und die Pflanzen würden sterben. Durch die Puffereigenschaften des Bodens, seinen relativ hohen pH-Wert (pH=6,8) und die Kalziumkarbonatkonzentration des Gießwassers, die deren pH erhöht (pH=7,4), sind diese hohen Konzentrationen aber nötig und keinesfalls schädlich, da dadurch der Großteil der Kupferionen nicht pflanzenverfügbar ist, beziehungsweise den Pflanzen nicht frei zur Verfügung steht, da er im Boden gebunden wird (Burkhead et al. 2009; Puig et al. 2007a; Yruela 2009).

4.2.1 Die Kupferaufnahme über die Wurzeln wird über spezielle Familien von Transportern geregelt, die unter der Kontrolle von SPL7 stehen

Kupfer, ebenso wie andere Spurenelemente, kann von der Pflanze nur in ionisch gelöster Form aus dem Boden aufgenommen werden. Dafür gibt es spezielle Klassen von Transportern, die in der Einleitung schon umrissen wurden.

ZIP2 und *ZIP4* aus *A. thaliana* komplementieren beide den Phänotyp der Hefemutante *ctr1*, die im Kupferimport geschädigt ist (Burkhead et al. 2009; Puig and Penarrubia 2009). Allerdings wurde keine Erhöhung der Transkriptmengen von *ZIP4* bei Kupfermangel gefunden (Wintz et al. 2003) und auch in den Solexa-Daten ist die Veränderung von *ZIP4* nicht signifikant (Tab. 6.1). Im Gegensatz dazu wird *ZIP2* sehr stark im Wildtyp unter

Kupfermangel erhöht und scheint für einen zusätzlichen Import von Cu^{2+} zu sorgen (Wintz et al. 2003; Yamasaki et al. 2009). Dies geschah ebenfalls in unserem Experiment in Abhängigkeit von *SPL7* (Tab. 3.4.1).

Um einen Kupfermangel zu simulieren wurde aus der hydroponischen Nährlösung nur Kupfer entfernt. Sämtliche anderen Metallionen waren noch in der gleichen Konzentration vorhanden, so dass sich deren Verfügbarkeit oder der Import in die Pflanze verändern könnte. Zum Beispiel werden optimale Eisenkonzentrationen im Medium toxisch, wenn die Konzentration von Phosphat abnimmt, und das Wachstum der Pflanzen wird inhibiert (Ward et al. 2008). Durch die Senkung der Eisenkonzentration können die Pflanzen wieder normal wachsen (Ward et al. 2008). Durch die erhöhte Expression von *ZIP2* um mehr Kupfer zu importieren, könnte es zu einer Anreicherung von Zink in den Zellen kommen, da die ZIP-Transporter nicht für ein bestimmtes Ion spezifisch sind. Sie transportieren auch gleich geladene Ionen anderer Metalle wie zum Beispiel Zink im Fall von *ZIP2* (Wintz et al. 2003). Dies könnte ein Grund dafür sein, dass *HMA2* und *HMA4* (Tab. 3.4.1), die Cadmium und Zink aus der Zelle transportieren (Williams and Mills 2005), in den Solexa-Daten in ihren Transkripten in der Wurzel erhöht waren, damit sie den überschüssigen Zink aus dem Wildtyp und den *sp17-2* Mutanten transportieren.

In der Literatur sind die COPT-Transporter als hochspezifische Importer für einwertige Kupferionen in die Zelle beschrieben. Mit Hilfe dieser Familie von Kupferimportern ist es zum Beispiel *Chlamydomonas* möglich, Kupferkonzentrationen von bis zu 0,2 nM aus dem Medium in die Zelle zu transportieren (Page et al. 2009). In *A. thaliana* soll *COPT1* hoch in der Wurzel und *COPT2* in dem photosynthetisch aktivem Gewebe exprimiert sein (Sancenon et al. 2004; Wintz et al. 2003). Laut unseren Solexa-Daten ist das genau umgekehrt (Tab. 3.4.1). *COPT1* war hauptsächlich in der Rosette und *COPT2* in der Wurzel während normaler Kupferbedingungen exprimiert (Tab. 3.4.1). Unter Kupfermangel wurde die Transkriptmenge beider Transporter erhöht, allerdings wurde von allen bekannten Kupfertransportern unter Kupfermangel im Wildtyp *COPT2* am Stärksten aktiviert und exprimiert (Tab. 3.4.1). Wie bereits beschrieben fehlte diese Hochregulation als Antwort auf Kupfermangel in der *sp17-* Mutante (Tab. 3.4.1). Somit wurde wahrscheinlich der Kupferimport im Wildtyp unter Kupfermangel erhöht.

COPT-Transporter können nur als Trimere Kupfer importieren (Penarrubia et al. 2009; Sancenon et al. 2003). COPT4 hat als einziger aus dieser Familie nicht die „methionine-rich

motifs“, die für den Kupfertransport essentiell sein sollen (Penarrubia et al. 2009). Wenn man davon ausgeht, dass nur COPT1, 2 und 4 in der äußeren Plasmamembran sitzen (Penarrubia et al. 2009) und gleich verteilt sind, dann macht im Wildtyp unter normalen Kupferkonzentrationen die Menge an *COPT4*-Transkript circa ein Viertel der Gesamttranskriptmengen von diesen *COPT*-Transportern in der Wurzel aus (vergleiche Tab. 3.4.1 und Tab. 6.1) und würde somit den Transport von Kupfer über die *COPT*-Transporter sehr stark einschränken. Im Wildtyp veränderten sich die Transkriptmengen von *COPT4* bei Kupfermangel nicht, allerdings sanken sie in der Mutante bei diesen Bedingungen. Es wäre möglich, dass die *spl7*-Mutante nur auf diesem Weg den Import von Kupfer erhöhen kann, da der normale Regulationsmechanismus durch das Fehlen von *SPL7* blockiert ist (Tab: 3.4.1).

Für den Import von Kupfer durch die *COPT*-Transporter muss Cu^{2+} , die hauptsächliche Ladungsform von Kupfer im Boden, zu Cu^+ reduziert werden. Aus der Literatur sind die FROs (Ferric Reduction Oxidase) bekannt. Sie reduzieren Fe^{3+} zu Fe^{2+} , so dass es von den IRTs in die Pflanze transportiert werden kann (Mukherjee et al. 2006; Wu et al. 2005). Es wird aufgrund des Anstieges des Transkriptmengen bei Kupfermangel vermutet, dass *FRO3* diese Rolle für Kupfer übernimmt (Mukherjee et al. 2006). Mithilfe der Solexa-Daten konnten wir eine Verdopplung der Transkriptmengen für *FRO3* (Tab. 3.4.1) im Wildtyp feststellen, allerdings stiegen die Transkriptlevel von *FRO4* und *FRO5* (Tab. 3.4.1) in der Wurzel deutlich stärker an. Falls dies mit einem Anstieg der Proteinmenge einhergehen würde, so sind *FRO4* und *FRO5* die wahrscheinlicheren Kandidaten für die Reduktion von Cu^{2+} (Tab. 3.4.1). Des Weiteren werden sie im Gegensatz zu *FRO3* nicht unter Eisenmangel erhöht (Feng et al. 2006; Mukherjee et al. 2006; Wu et al. 2005), was ebenfalls für eine exklusive Funktion von *FRO4* und *FRO5* bei der Reduktion von Cu^{2+} sprechen könnte. Die Mutante konnte wiederum nicht in der gleichen Weise wie der Wildtyp reagieren, sondern verdoppelte stattdessen die Transkription von *FRO2* (Tab. 3.4.1). *FRO2* Expression steigt allerdings im Wildtyp besonders stark bei Eisenmangel an (Mukherjee et al. 2006). Die Mutante erhöhte auch die Transkription von *IRT1* in einem deutlich stärkeren Maß als der Wildtyp (Tab. 3.4.1). *IRT1* ist verantwortlich für den Import von Eisen, nachdem es von *FRO2* reduziert wurde (Puig et al. 2007a).

Im Boden ist Cu^{2+} die häufigste Ionisationsform von Kupfer und Cu^+ ist nur in sehr geringen Konzentrationen enthalten (Alloway 1995). In den Solexa-Daten war die Menge an *FRO4*- und *FRO5*- Transkripten unter ausreichend Kupfer sehr gering, so dass nur wenig Cu^{2+} -Ionen

zu Cu^+ reduziert wurden. Somit stand wenig Cu^+ für den Import mittels der COPT-Transporter zur Verfügung. Dies könnte neben geringen Konzentrationen von COPT-Transportern und dem Verhältnis von COPT4 zu COPT1 und COPT2 eine weitere Möglichkeit des Wildtypes sein, den Import über die COPT-Transporter bei ausreichend verfügbarem Kupfer im Medium zu drosseln.

Insgesamt ist aufgrund der Solexa-Daten zu schließen, dass sämtliche für *A. thaliana* aus der Literatur bekannten Importwege für Kupfer in der *spl7*-Mutante nicht auf Kupfermangel reagieren. Damit stellt SPL7 einen Hauptschalter für die Regulation des Kupferimportes dar.

4.2.2 Ohne *SPL7* ist die Verteilung von Kupfer in der Pflanze gestört

Mindestens genauso wichtig wie die Aufnahme ist auch die Verteilung von Kupfer von der Wurzel in die verschiedenen Gewebe. Ein Chelator an den Metalle gebunden und über Phloem und Xylem transportiert werden können ist NA. In Tomatenpflanzen die in der Biosynthese von NA gestört sind (Ling et al. 1999), ist die Kupferkonzentration im Xylem bis um das Fünffache reduziert (Takahashi et al. 2003). Die Blätter weisen einen starken Kupfermangel auf und die Mengen an kupferhaltigen Proteinen wie CSDs oder PC sind umso geringer, je später die Blätter angelegt wurden (Curie et al. 2009). Die Wurzeln dieser Mutante haben dagegen einen erhöhten Level an Kupfer (Curie et al. 2009). Bei der Analyse der Unterschiede der Transkriptmengen der YSL-Transporter *YSL2* und *YSL3* des Wildtypes in den Solexa-Daten (Tab. 3.4.1) fällt auf, dass diese sowohl in der Wurzel als auch in der Rosette bei Kupfermangel stark erhöht waren. *YSL2* ist im vaskulären Gewebe exprimiert (DiDonato et al. 2004; Schaaf et al. 2005) und sorgt somit im Xylem und Phloem für den Transport von NA-Metallchelaten. *YSL3* ist zusammen mit *YSL1* in den das vaskuläre Gewebe umgebenden Bereichen exprimiert (Waters et al. 2006). Wenn beide Gene mutiert sind, ist die Rückgewinnung von Kupfer aus seneszierendem Gewebe um über 80% geringer als im Wildtyp (Curie et al. 2009; Waters et al. 2006). Somit werden sie höchstwahrscheinlich für den Transport der NA-Metall-Komplexe aus Geweben für ein Recycling von Ionen benötigt.

Durch das Umsetzen von optimalen Kupferbedingungen zu Mangel müssen die Pflanzen mit dem ihnen zur Verfügung stehenden Kupfer haushalten. Ein Großteil dessen ist in der Pflanze selbst in der Form von CSDs und CCS gespeichert und kann remobilisiert und in sich noch entwickelnden Geweben eingesetzt werden. Hierfür sprechen die in den Solexa-Daten sichtbar erhöhten Transkriptionsraten von *CCH* (Tab. 3.4.1), das als Chaperon Kupfer durch Plasmodesmata und über den Phloemsaft transportieren kann (Burkhead et al. 2009) und die erhöhten *YSL*-Transporter (Tab. 3.4.1). Eine derartige Erhöhung der *YSL*-Transporter ist bis jetzt nur während der Seneszenz beobachtet worden (Himelblau and Amasino 2000; Yruela 2009). Die im Wildtyp drastisch fallenden Transkriptmengen von *CSD1*, *CSD2* und *CCS* (Tab. 3.4.1) werden normalerweise ebenfalls mit dem Absterben von Pflanzenteilen und dem Recyceln der Nährstoffe in Verbindung gebracht (Curie et al. 2009; Himelblau and Amasino 2000). Diese Regulation trat nicht in der Mutante auf. Bei Problemen mit der Kupferaufnahme könnte somit *SPL7* genutzt werden, um die Infloreszenzen, zu Lasten der restlichen vegetativem Gewebe, optimal zu versorgen und somit eine erfolgreiche Reproduktion zu gewährleisten. Wahrscheinlich spielt *SPL7* auch während der Seneszenz eine wichtige Rolle, damit essentielle Nährstoffe wie Kupfer remobilisieren werden können, so dass wichtige Gewebe mit Nährstoffen aus unwichtigeren Geweben versorgt werden.

4.2.3 Ohne *SPL7* ist die Kupfer-Homöostase jeder einzelnen Pflanzenzelle gestört

Wenn der Pflanze unzureichende Mengen an Kupfer im Substrat zur Verfügung stehen, muss sie mit dem gespeicherten Kupfer haushalten und das beginnt mit den einzelnen Zellen. Wie bereits erwähnt, ist es für die Photosynthese betreibenden Gewebe und damit für die gesamte Pflanze essentiell, dass das Plastocyanin mit Kupfer versorgt wird und somit funktionstüchtig ist (Abdel-Ghany 2009; Burkhead et al. 2009; Puig et al. 2007a).

Um dies zu gewährleisten werden im Wildtyp *CSD1* und *CSD2* herunterreguliert, womit der an sie gebundene Kupfer frei wird, und *FSD1* für die benötigte Funktion einer Superoxid-Dismutase im Chloroplastenstroma aktiviert wird (Yamasaki et al. 2007). Des Weiteren wird das Chaperon *CCS*, das die CSDs mit Kupfer versorgt, ebenfalls herunterreguliert (Yamasaki

et al. 2009; Yruela 2009). Das Gen für das Chaperon CCH, das Kupfer über Plasmodesmata zwischen den Zellen transportiert, wird dagegen aktiviert (Puig et al. 2007b). In der *spl7*-Mutante funktionieren diese Regulationsmechanismen nicht mehr (Tab. 3.4.1) (Yamasaki et al. 2009).

In dem Solexa-Datensatz war die gleiche Regulation im Wildtyp offensichtlich und fehlte in der *spl7*-Mutante (Tab. 3.4.1). Allerdings wurde in dem Datensatz das Gen für das Chaperon *ATX1*, das mit HMA-Transportern interagieren kann (Williams and Mills 2005) unterschiedlich exprimiert. So war *ATX1* im Wildtyp in den Wurzeln unter Kupfermangel geringer und in den Rosetten höher exprimiert. In der Mutante war die Regulation genau umgekehrt, *ATX1* war unter Kupfermangel höher in den Wurzeln und geringer in den Rosetten. *ATX1* ist für den Transport von Kupfer zu HMA5, HMA7 und vermutlich auch zu HMA6/PAA1 zuständig (Puig et al. 2007b; Williams and Mills 2005). Damit könnte *ATX1* im Wildtyp unter Kupfermangel für den Transport von Kupfer in den Chloroplasten über PAA1, (Williams and Mills 2005), und über HMA7 für das endoplasmatische Retikulum zuständig sein (Puig et al. 2007b). In der untersuchten *spl7*-Mutante hingegen waren die Transkripte für *ATX1* in den Rosetten leicht reduziert. Dagegen waren die Transkripte für *PAA2*, dem Transporter für Kupfer vom Stroma in den Thylakoidinnenraum, also nach dem Import von Kupfer in den Chloroplasten durch PAA1 (Williams and Mills 2005), bei Kupfermangel erhöht (Tab. 3.4.1). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Mutante, trotz des Fehlens der SPL7-vermittelten Kupfer-Homöostase, den Mangel an Kupfer für PC bemerkt. Es könnte sein, dass die Pflanzen, durch eine Erhöhung des Importes von Kupfer vom Chloroplastenstroma in die Thylakoiden mit Hilfe von PAA2, versucht Kupfer zum PC zu leiten.

Im Gegensatz zu rezenten Reviews (Burkhead et al. 2009; Puig et al. 2007a; Yruela 2009) sind Transkript und Protein von FSD1 nicht nur im Chloroplasten, sondern auch im Zytosol vorhanden (Myouga et al. 2008). Dadurch kann FSD1, neben der Funktion von CSD2 als Superoxid-Dismutase im Chloroplasten, auch die von CSD1 im Zytosol übernehmen. Somit könnte man die erhöhten Level von *FSD1* in den Wurzeln der Solexa-Daten erklären (Tab. 3.4.1).

Höhere Pflanzen wie *A. thaliana* können nicht, wie Cyanobakterien oder auch einzellige Algen wie *Chlamydomonas*, anstelle von Plastocyanin auf einen auf Eisen basierenden Elektronenträger umsteigen. Daher ist die beschriebene Einsparung von Kupfer durch die

CSDs auch so wichtig. In *A. thaliana* gibt es zwei Gene die für PC codieren (*PETE1* und *PETE2*) (Abdel-Ghany 2009). Die Transkription beider Gene ist unter unterschiedlichen Kupferkonzentrationen im Medium nahezu konstant. Nur die Transkription von *PETE2* ist etwas geringer unter Kupfermangel (Abdel-Ghany 2009). Des Weiteren ist *PETE2* sowohl in der Transkriptmenge, als auch auf Proteinebene als das häufigste PC beschrieben, und es wird vermutet, dass *PETE2* zusätzlich als Speicher für Kupfer verwendet wird, da die Proteinmenge mit der Zugabe von Kupfer ansteigt (Abdel-Ghany 2009). Laut den Solexa-Daten sank die Transkriptlevel von *PETE2* im Wildtyp unter Kupfermangel stärker als die von *PETE1*, allerdings ist *PETE1* ca. 10fach höher exprimiert als *PETE2* und damit in unserem Datensatz die dominante Form für PC (Tab. 3.4.1). Dies könnte unter anderem daran liegen, dass die Pflanzen für die Solexa-Sequenzierung nicht in Saccharose-haltigem Medium wuchsen. Die Zugabe von Saccharose in hydroponischen Wachstumssystemen, wie sie von Abdel-Ghany (2009) verwendet wurden, hemmt die Expression von Genen, die an der Photosynthese beteiligt sind, unter anderem auch die Gene für PC (Dijkwel et al. 1996; Oswald et al. 2001). Allerdings wurde damals noch nicht zwischen den beiden *PC*-Genen differenziert. Durch die Unterschiede in den verwendeten Wachstumsmedien könnte sich das von den Pflanzen am stärksten verwendeten PC, *PETE1* oder *PETE2*, ändern. In der *sp17*-Mutante sanken die Transkripte von *PETE1* fast um die Hälfte bei Kupfermangel (Tab. 3.4.1).

Im Wildtyp erfolgte somit bei Kupfermangel eine Reduktion des Chaperons für die CSDs (SOD-Funktion und Speicherprotein für Kupfer in den Zellen) und von *CSD1* und *CSD2* selber. Das von diesen Zellen freigegebene Kupfer wurde mit Hilfe der CCHs durch das Phloem zu Geweben transportiert die Kupfer benötigten. Gleichzeitig stellte eine Erhöhung des Chaperons *ATX1* den Transport von Kupfer in die Chloroplasten und das endoplasmatische Retikulum sicher. Über die Erhöhung der YSL-Transporter wurde des Weiteren ein verbesserter Transport von Kupfer über die Leitbündel erhöht bzw. sichergestellt.

Durch das Ausbleiben dieser Regulation in der *sp17*-Mutante bei Kupfermangel wurde mit dem der Pflanze zur Verfügung stehendem Kupfer nicht effizient gehaushaltet. Kupfer, der während der ersten Wochen aufgenommen wurde, konnte weder in den einzelnen Zellen selber, noch zwischen unterschiedlichen Geweben remobilisiert werden.

4.3 Unzureichende Lignifizierung erklärt viele phänotypische Unterschiede der *spl7*-Mutanten gegenüber dem Wildtyp

Mit dem Landgang der Pflanzen wurde der Bedarf an Stütz- und Transportgeweben wesentlich größer (Volkman and Baluska 2006). Dadurch ist Lignin, als zweithäufigstes Biopolymer der Erde (Baucher et al. 2003), für die höheren Pflanzen unverzichtbar geworden. Aufgrund seiner Hydrophobizität ist es unverzichtbar für das Abdichten gegenüber Wasser und Ionen, es verleiht dem Xylem auch Zug- und Biegefestigkeit und verhindert ein Kolabieren der Leitbündel (Boerjan et al. 2003; Vanholme et al. 2008). Des Weiteren wird es von der Pflanze auch in der Pathogenabwehr als physikalische Barriere eingesetzt. Bei der industriellen Papier- oder Bioethanolherstellung hingegen stört das Lignin, da es den Zugang zur Zellulose erschwert. Es wird an Mutanten geforscht die in der Biosynthese und Polymerisation von Lignin gestört sind. Die bis jetzt untersuchten Pflanzen die weniger Lignin produzieren, wachsen meistens wesentlich schlechter und sind anfälliger für abiotische und biotische Stressfaktoren, so dass ihr industrieller Nutzen stark gemindert wird (Boerjan et al. 2003).

4.3.1 Die Ligninbiosynthese ist in Abhängigkeit von *SPL7* unter Kupfermangel verändert und die radikalische Polymerisation der Monomere zum Lignin gestört

Wie in der Einleitung beschrieben, besteht das Lignin der Zellwand hauptsächlich aus drei Bestandteilen (Abb.1.1), deren Biosynthese auf der Aminosäure Phenylalanin beruht. Sowohl der Wildtyp als auch die Mutante waren in der Expression der an der Biosynthese beteiligten Enzyme unter Kupfermangel signifikant verändert (Tab. 3.4.2 und 3.4.3), wobei in der Mutante allerdings deutlich mehr Gene betroffen waren als im Wildtyp. Die Gene die Phenylalanin zu 4-Coumarat umwandeln (der Schritt vor der Phenylpropanoid-Biosynthese) waren weder im Wildtyp noch in den Mutanten signifikant betroffen.

Reaktion (1) in Abb. 3.4.1 ist für den enzymatischen Schritt der Umwandlung von 4-Coumarat zu Coumaroyl-CoA verantwortlich. Im Wildtyp war ein katalysierendes Enzym dieses Schrittes unter Kupfermangel erhöht (Tab. 3.4.2 $FDR < 0,02$) und in der Mutante waren

zwei Enzyme signifikant niedriger exprimiert (Tab. 3.4.3 $FDR \ll 0,02$). 4-Coumarat wird auch noch in der Synthese von Suberin benötigt, das wiederum ein Hauptbestandteil des Caspary-Streifens ist. Er verhindert den apoplastischen Transport von Wasser und Ionen (Baxter et al. 2009; Molina et al. 2009; Pollard et al. 2008). Die Färbungen der Wurzeln mit Fuchsin zeigen, dass die Mutanten in *SPL7* auch unter Kupfermangel einen Caspary-Streifen ausgebildet haben (Abb. 3.3.4, 3.3.5, 6.2 und 6.3). Allerdings besteht das Suberin nur zu maximal 10% aus phenolischen Bestandteilen, den Hauptteil bilden verschiedenste Fettsäuren, langkettige Alkohole und Glycerin (Pollard et al. 2008). Dennoch könnte es möglich sein, dass die Lignifizierung in den *spl7*-Mutanten aufgrund eines funktionstüchtigen Caspary-Streifens vernachlässigt wird. Die Transkripte für die Enzyme der Suberin-Synthese waren nicht auffallend signifikant verändert (ohne Abb.).

Die Enzyme, die an den enzymatischen Schritten (4) beteiligt sind, sind nicht signifikant verändert (Tab. 3.4.2 und 3.4.3), die von Schritt (5) (Abb. 3.4.1) allerdings im Wildtyp und in der Mutante, wohingegen wieder mehr Gene und diese deutlich stärker in der Mutante betroffen sind. Der enzymatische Schritt (6) ist in der Wurzel der Mutante unter Kupfermangel signifikant geringer (Tab. 3.4.3).

Die Enzyme für das Abspalten des Coenzym A (Reaktion (2)) und des Umwandeln der Carbonyl-Gruppe in eine Alkohol-Gruppe (Reaktion (3)) sind für alle drei Monolignole gleich und es sind wiederum deutlich mehr in der Mutante signifikant unter Kupfermangel hochreguliert (Tab. 3.4.2 und 3.4.3). Lignin in *A. thaliana* besteht hauptsächlich aus G und S Untereinheiten (Franke et al. 2000). Falls die geschwindigkeitsbeschränkenden Schritte in dem Lignin-Biosyntheseweg die Reaktionen (2) und (3) sind, so würde es durch eine Erhöhung dieser Enzyme zu einer Verschiebung in der Zusammensetzung der einzelnen Mengen von Ligninmonomeren zueinander kommen, so dass das Lignin der Mutanten unter Kupfermangel am meisten H, danach G und danach S enthält (Abb. 3.4.1). Eingriffe in den Phenylpropanoid-Biosyntheseweg haben nachweislich zu Änderungen in der Ligninzusammensetzung und sogar zum Einbau von Zwischenprodukten dieses Biosyntheseweges in das spätere Lignin geführt (Boerjan et al. 2003; Franke et al. 2002; Vanholme et al. 2008). Deswegen wurde eine Kollaboration mit der Gruppe von Prof. Dr. Wout Boerjan (VIB Gent, Belgien) initiiert, um über LCMS und GCMS die primären und sekundären Metabolite der Wurzeln vom Wildtyp und den beiden *spl7*-Mutanten, die unter verschiedenen Kupferkonzentrationen auf Agar gewachsen sind, zu analysieren.

Nach der Produktion der Ligninmonomere werden diese, zur Heruntersetzung ihrer Reaktivität und Speicherung, höchstwahrscheinlich an Zucker gekoppelt und später in die Zellwand sekretiert (Boerjan et al. 2003). In der Zellwand werden sie über eine radikalische Polymerisation die durch Oxidasen, Peroxidasen und Laccasen durchgeführt wird, verknüpft (Boerjan et al. 2003). Leider ist noch nicht viel über die Gene bekannt, die die Aufgabe der Radikalbildung und Polymerisierung in der Zellwand übernehmen (Boerjan et al. 2003; Vanholme et al. 2008).

Laccasen werden aus der Zelle sekretiert und eine bekannte Laccase *LAC15* (*TRANSPARENT TESTA10*, *TT10*) führt, wenn mutiert, zu einem 30% geringeren Ligningehalt der Samen und zu einer verkürzten Wurzel (Liang et al. 2006). Laccasen benötigen für ihre Funktion vier Kupferionen (Abdel-Ghany and Pilon 2008) und unter Kupfermangel werden, abhängig von *SPL7*, die mikroRNAs *miR397*, *miR408* und *miR857* aktiviert, die verschiedene Laccasen runterregulieren (Abdel-Ghany and Pilon 2008; Yamasaki et al. 2009). In den *spl7*-Mutanten wurden die Laccasen zwar exprimiert, aufgrund des Kupfermangels aber wahrscheinlich nicht mit Kupfer versorgt und sind damit nicht funktionstüchtig, so dass eine Polymerisation und somit Lignifizierung der Zellwand nicht stattfinden konnte. Sobald der Kupferlevel im Medium anstieg und für *A. thaliana* ausreichend Kupfer verfügbar wurde, konnten auch die Mutanten ihre Proteine mit Kupfer versorgen und deren Funktion wieder sicherstellen (Abb. 3.3.1-3.3.5, 6.2 und 6.3).

4.4 Die *spl7*-Mutanten werden unter Kupfermangel nicht ausreichend lignifiziert

In den Versuchen auf Agar-Medium mit unterschiedlichen Kupferkonzentrationen, war die Lignifizierung mit basischem Fuchsin in *spl7*-mutierten Pflanzen, die unter Kupfermangel wuchsen, nur in sehr geringen Mengen nachweisbar (Abb. 3.3.1-3.3.5, 6.2 und 6.3). Der Versuch Lignin in Wurzeln und anderen Pflanzenteilen mit der Phloroglucinol oder der Mäule-Färbung sichtbar zu machen, war weder im Wildtyp noch in den Mutanten unter

sämtlichen Kupferkonzentration erfolgreich (ohne Abbildung). Dies könnte daran liegen, dass diese Färbungen normalerweise in Schnitten eingesetzt werden und hierbei immer ältere Pflanzen und meistens deren Stängel benutzt werden. Diese enthalten deutlich mehr Lignin. Darüber hinaus ist der in der Lignin-Forschung bevorzugte Modellorganismus die Pappel, da sie wesentlich mehr Lignin produziert als *A. thaliana* (Do et al. 2007; Jouanin et al. 2000; Weng et al. 2008). Außerdem fluoreszieren diese Färbungen nicht, was ein entscheidender Vorteil der basischen Fuchsin-Färbung ist, da die Sensitivität durch die Fluoreszenz erheblich erhöht wird.

Durch das Entfärben des Materials bei 68°C mit 70% Ethanol für zwei Tage, das Färben in einer zehnpromzentigen NaOH-Lösung für 24h und das Waschen für 18h (Vergleich Material und Methoden), ist die basische Fuchsin-Färbung an sich sehr aggressiv gegenüber den Zellinhalten, so dass davon ausgegangen werden kann, dass außer polymerisierten Molekülen nichts mehr in dem gefärbten Gewebe enthalten war. Eine Schwachstelle des Färbens mit basischem Fuchsin bleibt jedoch, dass nicht bekannt ist, an welche Moleküle und funktionelle Gruppen es bindet. Dennoch ist das gleichzeitige Färben des Caspary-Streifens neben dem Lignin ein weiterer Hinweis auf den direkten Nachweis von phenolischen Komponenten in Polymeren (Abb. 3.3.4, 3.3.5, 6.2 und 6.3).

Geringe und nicht durchgängige Lignifizierung in den Mutanten unter Kupfermangel wurde in der Hauptader des Petiolus der Kotyledonen (Abb. 3.3.1), in dem Leitgewebe des Blütenbodens (Abb. 3.3.2) und in dem Leitgewebe von älteren Wurzeln (ohne Abbildung), älterem Hypokotyl (ohne Abbildung) und den Stängeln (ohne Abbildung) in älteren Geweben wurde mit basischem Fuchsin nachgewiesen. Wie bereits erwähnt, sind nicht nur Laccasen für die radikalische Polymerisation zuständig, sondern auch Oxidasen und Peroxidasen (Boerjan et al. 2003) können für die Radikalbildung genutzt werden. Allerdings entstehen mit der Zeit auch Radikale durch Umwelteinflüsse oder auch Zellvorgänge, die ebenfalls für die Polymerisation verantwortlich sein könnten.

Das Fehlen der Lignifizierung der Leitbündel könnte den Transport beeinträchtigen, so dass nicht nur die Versorgung der Rosette und der Meristeme mit Kupfer, sondern auch mit anderen im Xylem transportierten Nährstoffen beeinträchtigt wird. So ist zum Beispiel in Pappel die Höhe der Pflanzen, die Biomasse und das Wurzelwerk signifikant geringer, wenn der Phenylpropanoid-Biosyntheseweg durch RNAi gestört wird (Coleman et al. 2008). Außerdem korreliert die Stärke der Lignifizierung des Xylems nicht nur mit der Festigkeit

gegen das Kolabieren von Gefäßen, sondern auch mit dem Transport von Wasser und verschiedenen Ionen (Boyce et al. 2004). Zum Beispiel werden in *Lycopersicon esculentum* (Tomate) die Leitbündel bei Salzstress stärker lignifiziert, um einem Wasserverlust und unerwünschte Ionenaufnahme vorzubeugen (Sanchez-Aguayo et al. 2004). Somit könnte die fehlende Lignifizierung des Xylems der Mutanten (Abb. 3.3.1-3.3.5), die unter Kupfermangel wuchsen, die Verminderung des Transports von Wasser und Ionen und das ungewollte Ausströmen von im Xylem transportierten Ionen zur Folge haben. Demnach wäre eine Versorgung der oberirdischen Pflanzenteile mit Nährstoffen und Wasser eingeschränkt, und je weiter sich diese von der Aufnahmequelle, den Wurzeln, befinden, umso größer wären die Defizite in der Versorgung. Das würde zum Absterben des Apikalmeristems führen und zum Auswachsen der Sproßmeristeme. Diese würden wiederum absterben und weitere ruhende Meristeme würden aktiviert werden, so dass mit der Zeit ein buschiger Habitus entsteht (Abb. 6.6). Sobald die Kupferkonzentration im Medium anstieg und für *A. thaliana* ausreichend verfügbar wurde, konnten auch die in der Kupfer-Homöostase gestörten *spl7*-Mutanten ihre Proteine mit Kupfer versorgen und deren Funktion sicherstellen, so dass die phänotypischen Unterschiede zwischen ihnen und dem Wildtyp aufgehoben wurden (Abb. 3.2.1-3.3.3, 3.3.5, 6.2, 6.3 und 6.6).

4.4.1 Die Wurzeln von *spl7*-Mutanten wachsen unter Kupfermangel langsamer als der Wildtyp

Das Wurzelwerk einer Pflanze versorgt diese nicht nur mit den benötigten Nährstoffen und Wasser, es verankert sie auch im Boden (Hochholdinger and Zimmermann 2008; Peret et al. 2009). Die Form und das Wachstum des Wurzelwerks werden unter anderem durch die Nährstoffe, die ungleich konzentriert im Boden vorliegen, bestimmt (Iyer-Pascuzzi et al. 2009). Die Auswirkung auf das Wachstum von lateralen Wurzeln und Wurzelhaaren von verschiedenen Nährstoffen außer Kupfer ist bekannt (Desnos 2008). Es ist anzunehmen, dass sich die Wurzeln in ähnlicher Weise bei Kupferionen verhalten, so dass eine Vergrößerung des Wurzelwerks an Stellen mit erhöhtem (aber nicht toxischen) Kupferkonzentrationen im Boden auftritt.

Aus den Versuchen wird deutlich, dass die *spl7*-mutanten Pflanzen unter Kupfermangel langsamer wachsen (Abb. 3.2.7) und nicht vorzeitig in ihrem Wachstum stagnieren. Des Weiteren ist es den *spl7*-Pflanzen genauso wenig wie dem Wildtyp möglich toxische Konzentrationen von Kupfer zu tolerieren. Das Wachstum der Hauptwurzel genauso wie die Anzahl der Seitenwurzeln verringert sich unter toxischen Kupferkonzentrationen bei den Mutanten im gleichen Maße wie beim Wildtyp (Abb. 3.2.5 und 3.2.6).

Wenn *COPT1*-Transkripte über antisense-mRNA (RNAi) unterdrückt werden, dann erhöhen sich die Transkriptlevel von *CCH* und *COPT2* und die Menge an Kupfer in den Pflanzen ist fast auf die Hälfte reduziert (Sancenon et al. 2004). Des Weiteren werden die Wurzeln dieser RNAi-Pflanzen unter Kupfermangel länger, besonders, wenn dem Medium zusätzlich der Metallchelator BCS hinzugegeben wird (Sancenon et al. 2004). Einzelmutanten von *copt2* oder Doppelmutanten von *copt1copt2* sind leider noch nicht beschrieben worden, aber in den *spl7*-Mutanten werden, im Gegensatz zum Wildtyp, beide Transporter nicht verstärkt unter Kupfermangel exprimiert.

In dem Fall, dass nur *COPT1* in den *spl7*-mutanten Pflanzen nicht funktionieren würde, würde man ebenfalls eine Vergrößerung der Wurzel und damit der Ionen-aufnehmenden Fläche der Pflanze erwarten. Entweder ist *SPL7* an der Regulation des stärkeren Wachstums der Wurzel der *copt1*-RNAi-Pflanzen beteiligt (vielleicht indirekt über die Aktivierung von *CCH* und *COPT2*), oder das verlangsamte Wachstum der Wurzeln der *spl7*-Mutanten unter Kupfermangel ist auf eine Kupfer-Unterversorgung zurückzuführen (Abb. 3.2.7). Die Verringerung der Länge der Hauptwurzel und der Anzahl der Seitenwurzeln der *spl7*-Mutanten (Abb. 3.2.5 und 3.2.6) ist, genauso wie die geringere Größe der Rosette (Abb. 3.2.1), auf eine zu geringe Menge an Kupfer, beziehungsweise eine uneffiziente Verteilung des zur Verfügung stehenden Kupfers, in der Pflanze zurückzuführen. Die Photosyntheserate würde sich, durch das Fehlen von Kupfer für das Plastocyanin verringern (Abdel-Ghany 2009). Genauso wie die Effizienz der Photosynthese, da durch geringere Mengen an funktionierenden Superoxid-Dismutasen weniger Hydroxylradikale abgefangen werden, die somit mehr Schaden anrichten können (Myouga et al. 2008). Dadurch würden wiederum weniger Assimilate für das Wachstum zur Verfügung stehen. Des Weiteren könnte zu wenig Kupfer für weitere wichtige enzymatische Prozesse vorhanden sein, so dass die Pflanze insgesamt im Wachstum gestört würde.

Eine weitere Erklärung für das geringere Wachstum der Hauptwurzel und die reduzierte Anzahl der gebildeten lateralen Wurzeln könnte die Toxizität eines anderen Metalls, das die gleichen Transporter wie Kupfer benutzt, sein. Eisen kann unter Phosphatmangel durch die Benutzung der gleichen Transporter toxische Konzentrationen erreichen und somit das Pflanzen- und besonders das Wurzelwachstum fast vollständig inhibieren (Ward et al. 2008).

4.4.2 *spl7*-Mutanten sind unter Kupfermangel in ihrer gesamten Entwicklung verlangsamt

Für einjährige Pflanzen wie *A. thaliana* ist der Übergang von vegetativem zu reproduktivem Wachstum sehr stark an die äußeren Faktoren wie Tageslänge und Temperatur sowie an innere Faktoren wie ihr Alter gebunden. Das Blühen zur falschen Jahreszeit kann große Einbußen in der Samenproduktion und dadurch in der Anzahl der Nachkommen und somit für die Fitness der Pflanze haben (Corbesier and Coupland 2006).

Um die Bedingungen in den einzelnen Geweben und Zellen konstant im optimalen Bereich zu halten, ist es für die Pflanze erforderlich sowohl den Zustand innerhalb wie auch außerhalb der Zellen zu überwachen, um sich schnell auf Veränderungen einzustellen zu können. Durch das Fehlen der von *SPL7* ausgeführten Kupfer-Homöostase (Yamasaki et al. 2009) ist diese in den *spl7*-Mutanten gestört und die Pflanze muss unter suboptimalen Bedingungen wachsen.

Mangel an Kupfer führt in der Landwirtschaft nicht nur zu Ertragseinbußen, auch die Erntezeiten verschieben sich nach hinten (Loneragan et al. 1980). Die *spl7*-Mutanten zeigten in allen untersuchten Tageslängen eine signifikant spätere Entwicklung zum reproduktiven Wachstum (Tab. 3.2.1-3.2.3). Ein Großteil der Pflanzen konnte sogar gar nicht in die reproduktive Phase eintreten. Sobald mit Kupfer gedüngt wurde, konnten alle Pflanzen wieder blühen und Samen produzieren und auch die Blütezeiten sind denen vom Wildtyp und der komplementierten Linie wieder näher (Tab. 3.2.1-3.2.3).

Besonders auffällig beim Sprießen und Blühen war nicht nur die zeitliche Verzögerung dieser beiden Vorgänge, sondern auch die Reduktion in der Anzahl der Rosettenblätter. So brauchten *spl7*-1 und -2 Pflanzen zum Beispiel im KT 1/3 länger für die sichtbare Entwicklung von Anzeichen der reproduktiven Phase und stellten in dieser Zeit deutlich

weniger Rosettenblätter her. Sämtliche phänotypischen Unterschiede wurden in den komplementierten *spl7-2* Pflanzen fast vollständig aufgehoben und beweisen, dass die T-DNA-Insertionen in *SPL7* für den Phänotyp verantwortlich sind.

Die Standardabweichungen unterschiedlicher Entwicklungsparameter der Mutanten in den verschiedenen Tageslängen sind deutlich größer als die vom Wildtyp oder der komplementierten Linie, wenn sie ohne Kupferzusatz wuchsen (Tab.3.2.1-3.2.3). Erde ist an sich keine homogene Substanz in der sämtliche Stoffe gleichmäßig verteilt sind, so dass rund um die Wurzeln Unterschiede in der Nährstoffkonzentration auftreten. Dadurch entstehen Unterschiede in den pflanzenverfügbaren Nährstoffen jedes einzelnen Pflanzgefäßes mit Erde. Des Weiteren gibt es keine Möglichkeit, die Trays mit den Pflanzen absolut horizontal zu stellen, um eine identische Bewässerung zu gewährleisten. Diese Unterschiede hatten auf die *spl7*-mutierten Pflanzen höchstwahrscheinlich einen deutlich größeren Einfluss, da die Homöostase der Zellen schon im Kupferhaushalt gestört ist. Da die mangelnde Lignifizierung des Xylems den Transport von Wasser vermutlich schon behindert, kommt somit ein weiterer negativer Einfluss auf die Einzelpflanzen hinzu, gerade da Lignin auch gegen Austrocknung aufgebaut wird (Hu et al. 2009).

Pflanzen, deren Wurzeln von mehr Osmocote Start Düngekügelchen, ein Langzeitdünger der der Erde hinzugegeben wird, umgeben waren, hatten höchstwahrscheinlich einen Vorteil gegenüber den anderen und konnten deswegen besser wachsen. Dies ist mit einer der Gründe, warum für die Färbungen und weiteren phänotypischen Analysen später auf das auf Agar basierende Aufzuchtssystem umgestiegen wurde, da die Nährstoffe in diesem Medium wesentlich homogener verteilt sind.

Beim Vergleich der Prozentzahl der Pflanzen, die nach der Entwicklung eines erfolgreichen Sprosses auf normaler Erde auch mindestens eine Blüte geöffnet haben, fällt auf, dass beim KT, LT und LL die beiden untersuchten *spl7* Mutanten signifikant unter dem Wildtyp und der komplementierten Linie liegen (Tab. 3.2.1-3.2.3). Die Prozentzahl der blühenden Mutanten ohne Kupferzusatz war im Kurztag am geringsten (Tab. 3.2.1). *A. thaliana* ist eine fakultative Langtagpflanze und braucht unter Kurztag deutlich länger um in die reproduktive Phase überzugehen (Tab. 3.2.1 und 3.2.2).

Die Tomaten-Mutante "Chloronerva" kann Kupfer nicht über NA-Komplexe transportieren. Deswegen ist der Gehalt an Kupfer eines Organes geringer, je später es angelegt wurde (Curie

et al. 2009). Somit könnte ein Ausbleiben des Öffnens der Blüten in der *spl7*-Mutanten damit zu erklären sein, dass die Pflanzen zu geringe Kupfermengen besitzen, um das Apikalmeristem zu versorgen. Im Langtag entwickeln sich deutlich weniger Blätter (Tab. 3.2.1 und 3.2.2) und die Pflanze beginnt deutlich früher zu sprießen als im Kurztag (Tab. 3.2.1 und 3.2.2), so dass eine höhere Kupfermenge in dem Apikalmeristem zu vermuten ist, wodurch es mehr Pflanzen schaffen ihre Blüten zu öffnen.

Ein deutliches Zeichen in dem Mutanten auf normaler Erde für die Unterversorgung der Infloreszenzmeristeme in allen Tageslängen ist das verfrühte Absterben des Apikalmeristems und das Auswachsen sekundärer und tertiärer Sproßmeristeme, so dass ein buschiger Habitus entsteht (Mengel et al. 2007). Dies wurde ebenfalls in den *spl7*-Mutanten beobachtet (Ab. 6.6).

Ein weiteres Zeichen für Kupfermangel in Pflanzen ist das Aufrollen der Blätter, möglicherweise um der Strahlung zu entgehen, da zum Beispiel gebildete Hydroxylradikale nicht schnell genug entsorgt werden können (Mengel et al. 2007). Dies wurde auch unter Dauerlicht im Wildtyp und den Mutanten beobachtet, wenn sie auf normaler Erde wuchsen (ohne Abbildung). Durch die Zugabe der Kupfersulfat-Lsg. verschwand das Aufrollen der Blätter. Dies ist ein Anzeichen dafür, dass die von uns verwendete Erde einen leichten Kupfermangel aufwies. Eine weitere Beobachtung war, dass unter KT der Wildtyp und die komplementierte Linie früher sprießten und ihre erste Blüte öffneten, wenn das Tray mit Kupfer gedüngt wurde (Tab. 3.2.1). Dies wurde auch bei Kupfermangel in Freilandversuchen an Getreide schon festgestellt (Loneragan et al. 1980).

4.4.3 Die Samenproduktion wird durch Kupfer beeinflusst

Die Samenproduktion sagt nicht nur etwas über die Fitness der Pflanze in einem bestimmten ökologischen System aus, sondern ist auch wichtig für die Ertragsmenge vieler Nutzpflanzen in der Landwirtschaft. Die *spl7*-Mutanten hatten, wenn die Erde nicht mit zusätzlichem Kupfer gedüngt wurde, deutlich geringere (LT: Tab. 3.2.5) bis gar keine (KT: Tab. 3.2.4) Samen in ihren Schoten. Die Sterilität würde auch schon im Ausbleiben der Elongation und Verdickung der Schoten deutlich (Abb. 3.2.1). Das Fehlen der Lignifizierung in den Antheren

der Mutanten die auf 0,05 μM CuSO_4 -Agar wuchsen (Abb. 3.3.2 und 3.3.3), zusammen mit dem Sterilitätsproblem auf normaler Erde (Tab. 3.2.4 und Tab. 3.2.5) und den sich nicht öffnenden Antheren der Blüten (Abb. 3.2.1, 3.2.3 und 6.1) ergibt sich eindeutig das Bild einer Sterilität, die aufgrund von fehlender Lignifizierung des Endotheciums auftrat, so dass es nicht aufreißen konnte, um die Pollen freizugeben (Abb. 3.2.3 und 6.1). Diese mechanische Form der Sterilität ist auch von anderen Mutanten bekannt die Defizite in der Lignifizierung des Endotheciums zeigen (Yang et al. 2007).

Auch der Wildtyp und die komplementierte Linie zeigten unter Kurztag einen signifikanten Unterschied, wenn man die Anzahl der Samen mit und ohne zusätzlichem Kupfer vergleicht (Tab. 3.2.4 und 3-2-5). Dies könnte ein weiterer Hinweis auf einen leichten Kupfermangel in dem verwendeten Boden sein.

4.5 Regulation von der Aktivität von SPL7

Transkriptionsfaktoren regulieren, wie ihr Name schon sagt, die Transkription einzelner Gene. Über die Transkription ist es der Zelle möglich, ihre zellulären Vorgänge und ihre Homöostase aufrechtzuerhalten oder auch kurz zu stören, um dadurch Veränderungen in sich und ihrer Umgebung herbeizuführen, wie zum Beispiel bei dem Anlegen von Primordien in einem auswachsenden Meristem. Die Regulation von Transkriptionsfaktoren kann über ihre Transkription, posttranslationale Veränderungen, Import in bzw. Export aus den Nukleus oder auch über Interaktionen mit andere Proteine erfolgen.

SPL7 wird, auf Grund gesammelter Affymetrix Ath1-Array Expression Daten, welche in öffentlich zugänglichen Datenbanken wie Genevestigator (www.genevestigator.com) analysiert werden können (Abb. 6.4), besonders hoch in Pollen, im Xylem und bei der Differenzierung von Gefäßelementen exprimiert. *SPL7* ist aber auch immer in allen anderen Geweben exprimiert. In dem *A. thaliana* eFP-Browser (<http://www.bar.utoronto.ca/>; (Winter et al. 2007)) ergibt sich ein ähnliches Bild (Abb. 6.5). *SPL7* wird in allen Geweben leicht transkribiert und ist besonders hoch in reifen Pollen, Xylem und den unteren Stängelabschnitten (Abb. 6.5; B, E und G).

Aus den Solexa-Daten geht eindeutig hervor, dass die Menge *SPL7* bei Bedarf nicht durch die Kontrolle der Expression bestimmt wird (Tab. 3.4.1). Die Expression von *SPL7* kann in verschiedenen Geweben unterschiedlich sein (Abb. 6.4 und 6.5), bleibt aber bei unterschiedlichen Bedingungen, wie zum Beispiel Kupfermangel, im gleichen Gewebe (Tab. 3.4.1) konstant. Auch die Transkription von *CRR1*, dem Ortholog für die Kupfer-Homöostase in *Chlamydomonas*, ändert sich nicht bei Kupfermangel (Kropat et al. 2005). Somit ist für die Regulation der Aktivität von *SPL7* wahrscheinlich ein Schritt nach der Transkription verantwortlich. In *SPL7* gibt es konservierte Domänen, die die Aktivität von *SPL7* posttranslational beeinflussen könnten. In dieser Richtung wurde noch nicht viel geforscht, sie gibt aber Aufschluss über mögliche Regulationsmechanismen und daraus folgende Forschungsansätze, um diese zu überprüfen.

4.5.1 Mögliche Regulation von *SPL7* über die DNA-Bindung

Die SBP-Box bindet an die DNA über zwei Zinkfinger, wovon der erste für die Stabilität der Konformation der SBP-Box zuständig ist und der zweite für die Spezifität der DNA-Bindung (Yamasaki et al. 2006). Der erste Zinkfinger von *SPL7* hat anstelle des konservierten Histidins ein weiteres Cystein und unterscheidet sich damit von allen anderen *SPL*-Proteinen (Yamasaki et al. 2004). Da aus ersten Untersuchungen der Doppelmutanten *spl1 spl12* und *spl14 spl16* nicht ein den *spl7*-Mutanten ähnlicher Phänotyp hervorgegangen ist (Daten werden nicht gezeigt), könnte der Unterschied der Aktivität dieser Untergruppe von *SPL*-Genen in der Bindung der Kofaktoren liegen. Es wurde gezeigt, dass die Konformation der Aminosäuren für die Bindung des Kofaktors beim Austausch des Zinkions gegen ein Kupferion von tetraedisch zu planar wechselt (Yamasaki et al. 2006). Durch diese Konformationsänderung wird höchstwahrscheinlich eine Änderung der Zinkfingerform bewirkt, so dass *SPL7* nicht mehr an die DNA binden kann. Dies könnte eine Möglichkeit für die Regulierung von *SPL7* Aktivität sein, wobei seine Aktivität umgekehrt proportional wäre mit der Konzentration an Kupfer in den Zellen.

4.5.2 Mögliche Regulation von SPL7 über eine Transmembran-Domäne

In *A. thaliana* werden 85 Transkriptionsfaktoren mit einer Transmembran-Domäne vorhergesagt, darunter auch SPL7 (Kim et al. 2009). Transmembran-Transkriptionsfaktoren (TMF) haben eine Transmembran-Domäne, über die sie in einer Membran verankert sind (Zupicich et al. 2001). Erst nach der proteolytischen Spaltung von dieser Domäne können sie in den Zellkern wandern und ihre Funktion als Transkriptionsfaktor erfüllen. Diese Membrandomänen sind häufig mit destabilisierenden Aminosäuren wie Glycin oder Prolin versetzt, um die Proteolyse aus der Membran zu ermöglichen bzw. zu erleichtern (Seo et al. 2008). Einen Transkriptionsfaktor in einer inaktiven Form zu synthetisieren hat für die Zelle den Vorteil, dass sie, durch das proteolytische Aktivieren des TMFs, sehr schnell auf Änderungen reagieren kann. Beispiele finden sich in der Pathogenabwehr wie zum Beispiel der TMF NTL6, der bei der Salizylsäure vermittelten Pathogenabwehr gegen Bakterien eine Rolle spielt (Kim et al. 2007). Bei abiotischen Stress wie zum Beispiel einer zu hohen Salzkonzentration wird bZIP17 aktiviert (Liu et al. 2007).

Es gibt zwei verschiedene Wege die TMFs mit einer Transmembran-Domäne aus der Membran zu schneiden:

1) RUP (Regulated Ubiquitin/proteasome-dependent Processing): Der TMF hängt in der Membran und es werden durch eine Ligase Ubiquitin-Einheiten angehängt. Danach dockt das Proteasom an, schneidet den Transkriptionsfaktor von dem ihn in der Membran verankernden Stück ab und verdaut den in der Membran übrig gebliebenen Rest (Chen et al. 2008; Hoppe et al. 2001; Seo et al. 2008). Ein Beispiel von ein über RUP regulierten TMF ist NTL6 (Kim et al. 2007).

2) RIP (Regulated Intermembrane Proteolysis): Der Transkriptionsfaktor ist über zwei verschiedene Transmembran-Domänen verankert und muss zuerst durch die erste Protease (S1P: Site-1-Protease) geschnitten werden, bevor die S2P (Site-2-Protease) den letzten Schnitt für die Befreiung des Transkriptionsfaktors vollführen kann. Für die unterschiedlichen Proteasen muss der Transkriptionsfaktor meistens in verschiedene Organelle über Vesikel transportiert werden (Chen et al. 2008; Hoppe et al. 2001; Kinch et al. 2006; Seo et al. 2008).

Ein Beispiel *A. thaliana* wo ein RIP Mechanismus eine Rolle spielt in ist die Aktivierung von bZIP17 (Liu et al. 2007).

Ob SPL7 tatsächlich ein Membran-gebundener Transkriptionsfaktor ist bleibt unklar. Bisherige Versuche Konstrukte mit einer Fusion von SPL7 und einem fluoreszenten Marker (Abb. 3.1.5 und 3.1.6) haben keine Lokalisation von SPL7 in der Pflanzenzelle ermöglicht. Allerdings konnten die Konstrukte, wenn sie stabil in *A. thaliana* inseriert wurden, den Phänotyp der *spl7*-Mutante retten, so dass die Sterilität und das verlangsamte Wachstum der Wurzeln und gesamten Pflanze wieder aufgehoben wurde (Abb. 3.1.5 und 3.1.6).

Da TMF häufig für schnelle Reaktionen auf Stressfaktoren eingesetzt werden, ist es für die Zelle essentiell, die Halbwertszeit von der aktivierten Form so gering wie möglich zu halten, um optimal und schnell auf Veränderungen reagieren zu können (Seo et al. 2008). Auch die inaktive, in der Membran verankerte Form des Transkriptionsfaktors ist oft einem schnellen Abbau unterlegen (Seo et al. 2008). Dies könnte den bis jetzt erfolglosen Nachweis mit den erzeugten SPL7-GFP-Fusions-Konstrukten (Abb. 3.1.5 und 3.1.6) über das Gewebe und wo in der Zelle SPL7 hängt erklären. Es mussten teilweise Cocktails von unterschiedlichsten Proteasom-Inhibitoren eingesetzt werden, um den Abbau und das Schneiden von TMFs aus der Membran zu verlangsamen (Seo et al. 2008).

Eine so schnelle Veränderung der Kupferkonzentration im Boden, die eine derart schnelle Reaktion der Zellen darauf rechtfertigen würde, ist unwahrscheinlich. Allerdings sind die für den Import von Kupfer in die Zellen verantwortlichen Transporter in der Plasmamembran verankert und eine direkte Interaktion von SPL7 mit diesen Transportern ist nicht auszuschließen. Des Weiteren ist SPL7 an der Regulation vieler Enzyme beteiligt, die ROS abbauen (Yamasaki et al. 2009). Lichtintensitäten können sich schnell verändern (wie zum Beispiel durch Wolken) und auch weitere Stressfaktoren (wie Wasser oder Kohlenstoffdioxid) können zu reaktiven Sauerstoffspezies bei der Photosynthese führen (Scheibe et al. 2005). Aufgrund der hohen Reaktivität dieser Radikale ist es für die Pflanze unverzichtbar sie so schnell wie möglich zu entfernen (Yamasaki et al. 2007), dies könnte eine Verankerung von SPL7 als TMF in der Membran für eine schnelle Reaktion auf ROS erklären.

4.6 *SPL7* ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Kupfer-Homöostase – immer noch offene Fragen –

Der SBP-Box Transkriptionsfaktor *SPL7* ist der Hauptschalter für die Kupfer-Homöostase (Yamasaki et al. 2009). Die *spl7* Mutante ist allem Anschein nach blind gegenüber Kupfermangel. Sie erhöht weder die entsprechenden Transporter für den hochaffinen und exklusiven Import von Kupfer (*COPT1* und *COPT2*) noch geht sie an die Kupferreserven der Zelle (*CSDs* und *CCS*) oder exprimiert analoge Enzyme mit einem anderen Kofaktor als Kupfer (*FSD1*) noch sorgt sie für einen erhöhten Transport von Kupfer in der Pflanze (*YSLs* und *CCH*). Doch nicht alle Aspekte der Kupfer-Homöostase können durch die *SPL7* Funktion erklärt werden.

Interessanterweise geben die *spl7* mutanten Pflanzen ein Hinweis auf einen zweiten Regulationsmechanismus für Kupfermangel der unabhängig von *SPL7* funktioniert. Unter Kupfermangel wurde in den *spl7* Mutante, im Gegensatz zum Wildtyp, *COPT4* runterreguliert. *COPT*-Transporter agieren als Trimere beim Import von Kupfer und *COPT4* fehlt das Bindemotiv für Kupfer, so dass es als Inhibitor funktionieren könnte (Penarrubia et al. 2009). Da dieser Mechanismus nur in der *spl7* Mutante und nicht im Wildtyp aktiviert wurde, könnte es möglich sein, dass dieser Mechanismus erst greift, wenn der in der Pflanze gespeicherte Kupfer knapp wird und nicht mehr ausreicht. Es bleibt die Frage offen, ob die Transkription von *COPT4* in Wildtyp-Wurzeln unter Kupfermangel ebenfalls abfällt, wenn die Pflanzen bereits Samen angesetzt haben. Hier könnten einjährige und mehrjährige Pflanzen sich unterscheiden da einjährige Pflanzen die erforderlichen Nährstoffe, falls diese nicht über die Wurzel aufgenommen werden können, aus seneszierenden Geweben beziehen könnten.

Ungeklärt ist auch die relativ hohe Expression von *SPL7* in Pollen.

Pollen stehen nicht mit den sie umgebenden Zellen durch Plasmodesmata in Verbindung und sind darauf angewiesen, dass sie Kupfer durch Transporter aus ihrer Umgebung aufnehmen (Burkhead et al. 2009). Während der Pollenentwicklung sind verschiedene *COPT*-Transporter aktiv, unter anderem auch *COPT1* und *COPT2*, die unter der Kontrolle von *SPL7* in den

untersuchten Geweben bei Kupfermangel aktiviert wurden. Da *SPL7* in allen Pollenstadien und in den Pollenschläuchen exprimiert ist (Abb. 6.4 und 6.5), wäre es interessant zu untersuchen, welche Rolle *SPL7* in der Pollenentwicklung und Keimung spielt. Falls *SPL7* für die Transkription der unterschiedlichen *COPTs* direkt verantwortlich ist, wären Pollen ein gutes Gewebe, um nach Interaktionspartnern für *SPL7* zu forschen. Es wäre zu untersuchen inwieweit *SPL7* direkt an die Promotor der *COPT*-Gene bindet und welche Partner bei der Bindung die Spezifität ausmachen, um in den verschiedenen Pollenstadien die richtigen *COPTs* zu exprimieren.

Wie oben bereits erwähnt ist ein wichtiger aber weiterer bis jetzt noch ungeklärter Aspekt die Regulation von *SPL7* und damit der Mechanismus wie die Pflanze den Kupfermangel in sich und ihren Zellen erfasst. Über die Verwendung der bereits vorhandenen transgenen Pflanzen die *SPL7*, mit einem GFP angehängt, exprimieren und verschiedene Proteasom- und Metalloprotease-Inhibitoren, könnte man diese und den Mechanismus, mit dem *SPL7* von der Membran geschnitten wird, nachweisen. Außerdem könnten Konstrukte, die ein Reportergen und nur die Transmembran-Domäne enthalten, Auskunft über die Membran in der *SPL7* verankert ist geben.

Die Kupfer-Homöostase in Pflanzen ist ein sehr interessanter Forschungsbereich, in dem in den letzten Jahren viele neue Erkenntnisse veröffentlicht wurden, so dass für die grobe Aufnahme und Regulation von Kupfer mittlerweile ein sehr gutes Model vorhanden ist. Nichtsdestotrotz bleiben immer noch viele Fragen offen wobei deren Beantwortung weitere Untersuchungen an *SPL7* und dessen Mutanten sehr Hilfreich sein könnte.

5 Literatur

1. Abdel-Ghany SE (2009) Contribution of plastocyanin isoforms to photosynthesis and copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana* grown at different copper regimes. *Planta* 229: 767-779
2. Abdel-Ghany SE, Pilon M (2008) MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 283: 15932-15945
3. Allison DB, Gadbury GL, Heo M, Fernandez JR, Lee C-K, Prolla TA, Weindruch R (2002) A mixture model approach for the analysis of microarray gene expression data. *Computational Statistics & Data Analysis* 39: 1-20
4. Alloway BJ (1995) Schwermetalle in Böden
5. Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseeuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657
6. Audic S, Claverie JM (1997) The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res* 7: 986-995
7. Baker KE, Parker R (2004) Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr Opin Cell Biol* 16: 293-299
8. Bao W, O'Malley D M, Whetten R, Sederoff RR (1993) A Laccase Associated with Lignification in Loblolly Pine Xylem. *Science* 260: 672-674
9. Basta NT, Ryan JA, Chaney RL (2005) Trace element chemistry in residual-treated soil: key concepts and metal bioavailability. *J Environ Qual* 34: 49-63
10. Baucher M, Halpin C, Petit-Conil M, Boerjan W (2003) Lignin: genetic engineering and impact on pulping. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38: 305-350
11. Baxter I, Hosmani PS, Rus A, Lahner B, Borevitz JO, Muthukumar B, Mickelbart MV, Schreiber L, Franke RB, Salt DE (2009) Root suberin forms an extracellular barrier that affects water relations and mineral nutrition in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 5: e1000492
12. Birkenbihl RP, Jach G, Saedler H, Huijser P (2005) Functional dissection of the plant-specific SBP-domain: overlap of the DNA-binding and nuclear localization domains. *J Mol Biol* 352: 585-596
13. Boerjan W, Ralph J, Baucher M (2003) Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 54: 519-546
14. Bowman JL, Smyth DR, Meyerowitz EM (1991) Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* 112: 1-20
15. Boyce CK, Zwieniecki MA, Cody GD, Jacobsen C, Wirick S, Knoll AH, Holbrook NM (2004) Evolution of xylem lignification and hydrogel transport regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 17555-17558
16. Bullard J, Purdom E, Hansen K, Dudoit S Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. *BMC Bioinformatics* 11: 94

17. Burkhead JL, Reynolds KA, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Pilon M (2009) Copper homeostasis. *New Phytol*
18. Cai X, Davis EJ, Ballif J, Liang M, Bushman E, Haroldsen V, Torabinejad J, Wu Y (2006) Mutant identification and characterization of the laccase gene family in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 57: 2563-2569
19. Campbell NA (2001) *Biology*.
20. Cardon G, Hohmann S, Klein J, Nettekheim K, Saedler H, Huijser P (1999) Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes. *Gene* 237: 91-104
21. Cardon GH, Hohmann S, Nettekheim K, Saedler H, Huijser P (1997) Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene SPL3: a novel gene involved in the floral transition. *Plant J* 12: 367-377
22. Chen YN, Slabaugh E, Brandizzi F (2008) Membrane-tethered transcription factors in *Arabidopsis thaliana*: novel regulators in stress response and development. *Curr Opin Plant Biol* 11: 695-701
23. Chu CC, Lee WC, Guo WY, Pan SM, Chen LJ, Li HM, Jinn TL (2005) A copper chaperone for superoxide dismutase that confers three types of copper/zinc superoxide dismutase activity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139: 425-436
24. Coleman HD, Samuels AL, Guy RD, Mansfield SD (2008) Perturbed lignification impacts tree growth in hybrid poplar--a function of sink strength, vascular integrity, and photosynthetic assimilation. *Plant Physiol* 148: 1229-1237
25. Corbesier L, Coupland G (2006) The quest for florigen: a review of recent progress. *J Exp Bot* 57: 3395-3403
26. Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Le Jean M, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S (2009) Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann Bot* 103: 1-11
27. Dell B (1980) Male Sterility and Anther Wall Structure in Copper-deficient Plants *Annals of Botany* 48: 599-608
28. Desnos T (2008) Root branching responses to phosphate and nitrate. *Curr Opin Plant Biol* 11: 82-87
29. DiDonato RJ, Jr., Roberts LA, Sanderson T, Easley RB, Walker EL (2004) *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *Plant J* 39: 403-414
30. Dijkwel PP, Kock P, Bezemer R, Weisbeek PJ, Smeekens S (1996) Sucrose Represses the Developmentally Controlled Transient Activation of the Plastocyanin Gene in *Arabidopsis thaliana* Seedlings. *Plant Physiol* 110: 455-463
31. Do CT, Pollet B, Thevenin J, Sibout R, Denoue D, Barriere Y, Lapierre C, Jouanin L (2007) Both caffeoyl Coenzyme A 3-O-methyltransferase 1 and caffeic acid O-methyltransferase 1 are involved in redundant functions for lignin, flavonoids and sinapoyl malate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Planta* 226: 1117-1129
32. Dong J, Kim ST, Lord EM (2005) Plastocyanin plays a role in reproduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138: 778-789
33. Downes GM, Turvey ND (1990) The effect of nitrogen and copper on characteristics of wood tissue in *pinus radiata*. *Ca. J. For. Res.* 20: 1369-1377
34. Feng H, An F, Zhang S, Ji Z, Ling HQ, Zuo J (2006) Light-regulated, tissue-specific, and cell differentiation-specific expression of the *Arabidopsis* Fe(III)-chelate reductase gene AtFRO6. *Plant Physiol* 140: 1345-1354

35. Franke R, Hemm MR, Denault JW, Ruegger MO, Humphreys JM, Chapple C (2002) Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the ref8 mutant of *Arabidopsis*. *Plant J* 30: 47-59
36. Franke R, McMichael CM, Meyer K, Shirley AM, Cusumano JC, Chapple C (2000) Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the *Arabidopsis* gene encoding ferulate 5-hydroxylase. *Plant J* 22: 223-234
37. Gandikota M, Birkenbihl RP, Hohmann S, Cardon GH, Saedler H, Huijser P (2007) The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the *Arabidopsis* SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *Plant J* 49: 683-693
38. Gueriot ML (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta* 1465: 190-198
39. Guo AY, Zhu QH, Gu X, Ge S, Yang J, Luo J (2008) Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. *Gene* 418: 1-8
40. Hanke GT, Hase T (2008) Variable photosynthetic roles of two leaf-type ferredoxins in *Arabidopsis*, as revealed by RNA interference. *Photochem Photobiol* 84: 1302-1309
41. Himelblau E, Amasino RM (2000) Delivering copper within plant cells. *Curr Opin Plant Biol* 3: 205-210
42. Hochholdinger F, Zimmermann R (2008) Conserved and diverse mechanisms in root development. *Curr Opin Plant Biol* 11: 70-74
43. Hoppe T, Rape M, Jentsch S (2001) Membrane-bound transcription factors: regulated release by RIP or RUP. *Curr Opin Cell Biol* 13: 344-348
44. Horstmann D (2008) *Mathematik für Biologen*. Spektrum Akademischer Verlag
45. Hu Y, Li WC, Xu YQ, Li GJ, Liao Y, Fu FL (2009) Differential expression of candidate genes for lignin biosynthesis under drought stress in maize leaves. *J Appl Genet* 50: 213-223
46. Iyer-Pascuzzi A, Simpson J, Herrera-Estrella L, Benfey PN (2009) Functional genomics of root growth and development in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol* 12: 165-171
47. Jaramillo-Carmona S, Fuentes-Alventosa JM, Rodriguez-Gutierrez G, Waldron KW, Smith AC, Guillen-Bejarano R, Fernandez-Bolanos J, Jimenez-Araujo A, Rodriguez-Arcos R (2008) Characterization of asparagus lignin by HPLC. *J Food Sci* 73: C526-532
48. Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 14: 787-799
49. Jouanin L, Goujon T, de Nadai V, Martin MT, Mila I, Vallet C, Pollet B, Yoshinaga A, Chabbert B, Petit-Conil M, Lapiere C (2000) Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid O-methyltransferase activity. *Plant Physiol* 123: 1363-1374
50. Kim SG, Lee S, Seo PJ, Kim SK, Kim JK, Park CM (2009) Genome-scale screening and molecular characterization of membrane-bound transcription factors in *Arabidopsis* and rice. *Genomics*
51. Kim SY, Kim SG, Kim YS, Seo PJ, Bae M, Yoon HK, Park CM (2007) Exploring membrane-associated NAC transcription factors in *Arabidopsis*: implications for membrane biology in genome regulation. *Nucleic Acids Res* 35: 203-213
52. Kinch LN, Ginalski K, Grishin NV (2006) Site-2 protease regulated intramembrane proteolysis: sequence homologs suggest an ancient signaling cascade. *Protein Sci* 15: 84-93

53. Klein J, Saedler H, Huijser P (1996) A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene SQUAMOSA. *Mol Gen Genet* 250: 7-16
54. Koncz (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204
55. : 383–396
56. Kropat J, Tottey S, Birkenbihl RP, Depege N, Huijser P, Merchant S (2005) A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18730-18735
57. Krysan PJ, Young JC, Sussman MR (1999) T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11: 2283-2290
58. Liang M, Davis E, Gardner D, Cai X, Wu Y (2006) Involvement of AtLAC15 in lignin synthesis in seeds and in root elongation of *Arabidopsis*. *Planta* 224: 1185-1196
59. Liang X, Nazarenus TJ, Stone JM (2008) Identification of a consensus DNA-binding site for the *Arabidopsis thaliana* SBP domain transcription factor, AtSPL14, and binding kinetics by surface plasmon resonance. *Biochemistry* 47: 3645-3653
60. Ling HQ, Koch G, Baumlein H, Ganai MW (1999) Map-based cloning of chloronerva, a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7098-7103
61. Liu JX, Srivastava R, Che P, Howell SH (2007) Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *Plant J* 51: 897-909
62. Loneragan JF, Snowball K, Robson AD (1980) Copper Supply in Relation to Content and Redistribution of Copper Among Organs of the Wheat Plant. *Ann Bot* 45: 621-632
63. Mengel, et, al (2007) Copper Chapter 16. BIOL695 ppt-Vortrag
64. Merchant SS, Allen MD, Kropat J, Moseley JL, Long JC, Tottey S, Terauchi AM (2006) Between a rock and a hard place: trace element nutrition in *Chlamydomonas*. *Biochim Biophys Acta* 1763: 578-594
65. Mira H, Vilar M, Perez-Paya E, Penarrubia L (2001) Functional and conformational properties of the exclusive C-domain from the *Arabidopsis* copper chaperone (CCH). *Biochem J* 357: 545-549
66. Molina I, Li-Beisson Y, Beisson F, Ohlrogge JB, Pollard M (2009) Identification of an *Arabidopsis* feruloyl-coenzyme a transferase required for suberin synthesis. *Plant Physiol* 151: 1317-1328
67. Mori S (1999) Iron acquisition by plants. *Curr Opin Plant Biol* 2: 250-253
68. Mukherjee I, Campbell NH, Ash JS, Connolly EL (2006) Expression profiling of the *Arabidopsis* ferric chelate reductase (FRO) gene family reveals differential regulation by iron and copper. *Planta* 223: 1178-1190
69. Myouga F, Hosoda C, Umezawa T, Iizumi H, Kuromori T, Motohashi R, Shono Y, Nagata N, Ikeuchi M, Shinozaki K (2008) A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 3148-3162

70. Nowack MK, Grini PE, Jakoby MJ, Lafos M, Koncz C, Schnittger A (2006) A positive signal from the fertilization of the egg cell sets off endosperm proliferation in angiosperm embryogenesis. *Nat Genet* 38: 63-67
71. Oswald O, Martin T, Dominy PJ, Graham IA (2001) Plastid redox state and sugars: interactive regulators of nuclear-encoded photosynthetic gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2047-2052
72. Page MD, Kropat J, Hamel PP, Merchant SS (2009) Two *Chlamydomonas* CTR copper transporters with a novel cys-met motif are localized to the plasma membrane and function in copper assimilation. *Plant Cell* 21: 928-943
73. Palmer CM, Guerinot ML (2009) Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nat Chem Biol* 5: 333-340
74. Penarrubia L, Andres-Colas N, Moreno J, Puig S (2009) Regulation of copper transport in *Arabidopsis thaliana*: a biochemical oscillator? *J Biol Inorg Chem*
75. Peret B, De Rybel B, Casimiro I, Benkova E, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T, Bennett MJ (2009) *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci* 14: 399-408
76. Pilon M, Cochu CM, Ravet K, Abdel-Ghany SE, Gaymard F (2009) Essential transition metal homeostasis in plants. *Curr Opin Plant Biol* 12: 347-357
77. Pollard M, Beisson F, Li Y, Ohlrogge JB (2008) Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci* 13: 236-246
78. Puig S, Andres-Colas N, Garcia-Molina A, Penarrubia L (2007a) Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant Cell Environ* 30: 271-290
79. Puig S, Mira H, Dorcey E, Sancenon V, Andres-Colas N, Garcia-Molina A, Burkhead JL, Gogolin KA, Abdel-Ghany SE, Thiele DJ, Ecker JR, Pilon M, Penarrubia L (2007b) Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 385-390
80. Puig S, Penarrubia L (2009) Placing metal micronutrients in context: transport and distribution in plants. *Curr Opin Plant Biol* 12: 299-306
81. Quinn JM, Barraco P, Eriksson M, Merchant S (2000) Coordinate copper- and oxygen-responsive *Cyc6* and *Cpx1* expression in *Chlamydomonas* is mediated by the same element. *J Biol Chem* 275: 6080-6089
82. Richardson A, Duncan J, McDougall GJ (2000) Oxidase activity in lignifying xylem of a taxonomically diverse range of trees: identification of a conifer laccase. *Tree Physiol* 20: 1039-1047
83. Riese M, Hohmann S, Saedler H, Munster T, Huijser P (2007) Comparative analysis of the SBP-box gene families in *P. patens* and seed plants. *Gene* 401: 28-37
84. Sancenon V, Puig S, Mateu-Andres I, Dorcey E, Thiele DJ, Penarrubia L (2004) The *Arabidopsis* copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. *J Biol Chem* 279: 15348-15355
85. Sancenon V, Puig S, Mira H, Thiele DJ, Penarrubia L (2003) Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 51: 577-587
86. Sanchez-Aguayo I, Rodriguez-Galan JM, Garcia R, Torreblanca J, Pardo JM (2004) Salt stress enhances xylem development and expression of S-adenosyl-L-methionine synthase in lignifying tissues of tomato plants. *Planta* 220: 278-285

87. Sanders PM, Bui AQ, Weterings K, McIntire KN, Hsu Y-C, Lee PY, Truong MT, Beals TP, Goldberg RB (1999) Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sexual Plant Reproduction* 11: 297-322
88. Sato Y, Whetten RW (2006) Characterization of two laccases of loblolly pine (*Pinus taeda*) expressed in tobacco BY-2 cells. *J Plant Res* 119: 581-588
89. Schaaf G, Schikora A, Haberle J, Vert G, Ludewig U, Briat JF, Curie C, von Wiren N (2005) A putative function for the *Arabidopsis* Fe-Phytosiderophore transporter homolog AtYSL2 in Fe and Zn homeostasis. *Plant Cell Physiol* 46: 762-774
90. Scheibe R, Backhausen JE, Emmerlich V, Holtgreffe S (2005) Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. *J Exp Bot* 56: 1481-1489
91. Schwab R, Palatnik JF, Rieger M, Schommer C, Schmid M, Weigel D (2005) Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev Cell* 8: 517-527
92. Schwarz S, Grande AV, Bujdosó N, Saedler H, Huijser P (2008) The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 67: 183-195
93. Seo PJ, Kim SG, Park CM (2008) Membrane-bound transcription factors in plants. *Trends Plant Sci* 13: 550-556
94. Shen QH, Schulze-Lefert P (2007) Rumble in the nuclear jungle: compartmentalization, trafficking, and nuclear action of plant immune receptors. *EMBO J* 26: 4293-4301
95. Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2: 755-767
96. Sterjiades R, Dean JF, Eriksson KE (1992) Laccase from Sycamore Maple (*Acer pseudoplatanus*) Polymerizes Monolignols. *Plant Physiol* 99: 1162-1168
97. Stone JM, Liang X, Nekl ER, Stiers JJ (2005) *Arabidopsis* AtSPL14, a plant-specific SBP-domain transcription factor, participates in plant development and sensitivity to fumonisin B1. *Plant J* 41: 744-754
98. Takahashi M, Terada Y, Nakai I, Nakanishi H, Yoshimura E, Mori S, Nishizawa NK (2003) Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell* 15: 1263-1280
99. Talke IN, Hanikenne M, Kramer U (2006) Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiol* 142: 148-167
100. Unte US, Sorensen AM, Pesaresi P, Gandikota M, Leister D, Saedler H, Huijser P (2003) SPL8, an SBP-box gene that affects pollen sac development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 1009-1019
101. Vanholme R, Morreel K, Ralph J, Boerjan W (2008) Lignin engineering. *Curr Opin Plant Biol* 11: 278-285
102. Volkmann D, Baluska F (2006) Gravity: one of the driving forces for evolution. *Protoplasma* 229: 143-148
103. Wang JW, Schwab R, Czech B, Mica E, Weigel D (2008) Dual effects of miR156-targeted SPL genes and CYP78A5/KLUH on plastochron length and organ size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20: 1231-1243
104. Wang Y, Hu Z, Yang Y, Chen X, Chen G (2009) Function Annotation of an SBP-box Gene in *Arabidopsis* Based on Analysis of Co-expression Networks and Promoters. *Int J Mol Sci* 10: 116-132

105. Ward JT, Lahner B, Yakubova E, Salt DE, Raghothama KG (2008) The effect of iron on the primary root elongation of *Arabidopsis* during phosphate deficiency. *Plant Physiol* 147: 1181-1191
106. Waters BM, Chu HH, Didonato RJ, Roberts LA, Easley RB, Lahner B, Salt DE, Walker EL (2006) Mutations in *Arabidopsis* yellow stripe-like1 and yellow stripe-like3 reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds. *Plant Physiol* 141: 1446-1458
107. Weigel M, Varotto C, Pesaresi P, Finazzi G, Rappaport F, Salamini F, Leister D (2003) Plastocyanin is indispensable for photosynthetic electron flow in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 278: 31286-31289
108. Weng JK, Li X, Stout J, Chapple C (2008) Independent origins of syringyl lignin in vascular plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7887-7892
109. Williams LE, Mills RF (2005) P(1B)-ATPases--an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends Plant Sci* 10: 491-502
110. Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007) An "electronic fluorescent pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* 2: e718
111. Wintz H, Fox T, Wu YY, Feng V, Chen W, Chang HS, Zhu T, Vulpe C (2003) Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *J Biol Chem* 278: 47644-47653
112. Wong CK, Jarvis RS, Sherson SM, Cobbett CS (2009) Functional analysis of the heavy metal binding domains of the Zn/Cd-transporting ATPase, HMA2, in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 181: 79-88
113. Wu G, Park MY, Conway SR, Wang JW, Weigel D, Poethig RS (2009) The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell* 138: 750-759
114. Wu G, Poethig RS (2006) Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development* 133: 3539-3547
115. Wu H, Li L, Du J, Yuan Y, Cheng X, Ling HQ (2005) Molecular and biochemical characterization of the Fe(III) chelate reductase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 46: 1505-1514
116. Yamaguchi A, Wu MF, Yang L, Wu G, Poethig RS, Wagner D (2009) The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1. *Dev Cell* 17: 268-278
117. Yamasaki H, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Kobayashi Y, Shikanai T, Pilon M (2007) Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 282: 16369-16378
118. Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, Kobayashi Y, Shikanai T (2009) SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like7 Is a Central Regulator for Copper Homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 347-361
119. Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tatenno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Nunokawa E, Ishizuka Y, Terada T, Shirouzu M, Osanai T, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S (2004) A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of *Arabidopsis* SBP-family transcription factors. *J Mol Biol* 337: 49-63
120. Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Tomo Y, Terada T, Shirouzu M, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S (2006) An

Arabidopsis SBP-domain fragment with a disrupted C-terminal zinc-binding site retains its tertiary structure. FEBS Lett 580: 2109-2116

121. Yang C, Xu Z, Song J, Conner K, Vizcay Barrena G, Wilson ZA (2007) Arabidopsis MYB26/MALE STERILE35 regulates secondary thickening in the endothecium and is essential for anther dehiscence. Plant Cell 19: 534-548

122. Yruela I (2009) Copper in plants: acquisition, transport and interactions. Functional Plant Biology

123.

124. Zhao C, Johnson BJ, Kositsup B, Beers EP (2000) Exploiting secondary growth in Arabidopsis. Construction of xylem and bark cDNA libraries and cloning of three xylem endopeptidases. Plant Physiol 123: 1185-1196

125. Zupicich J, Brenner SE, Skarnes WC (2001) Computational prediction of membrane-tethered transcription factors. Genome Biol 2: RESEARCH0050

126.

127.

6 Anhang



Abb. 6.1: Blüten vom Wildtyp und den beiden T-DNA-Insertionsmutanten *spl7-1* und *spl7-2*, die auf normaler Erde unter Langtag gewachsen sind. Die Blüten der Mutanten haben sich erst beim Austrocknen geöffnet. Die vorderen Petalen wurden jeweils entfernt, um den Blick in die Blüte freizugeben. Der Balken entspricht 1mm.

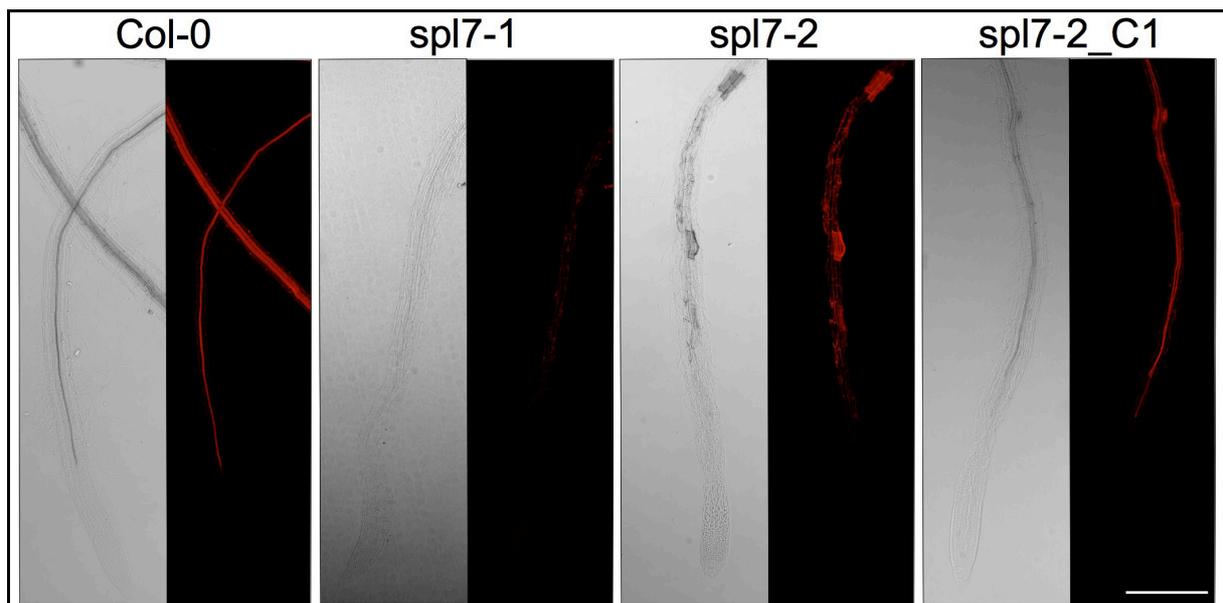


Abb. 6.2: Durchlichtbilder und entsprechendes Fluoreszenzbilder der Wurzeln von 10 Tage alten Keimlingen die auf 1/2xx MS-mit $0,05 \mu\text{M}$ CuSO_4 gewachsen sind und mit basischem Fuchsin gefärbt wurden. Diese Bilder umfassen den Bereich, der in Abb.3.3.4 vergrößert wurde. Die Fluoreszenzbilder sind aus 20 verschiedenen Ebenen zusammengesetzt. Der Balken entspricht $600\mu\text{m}$.

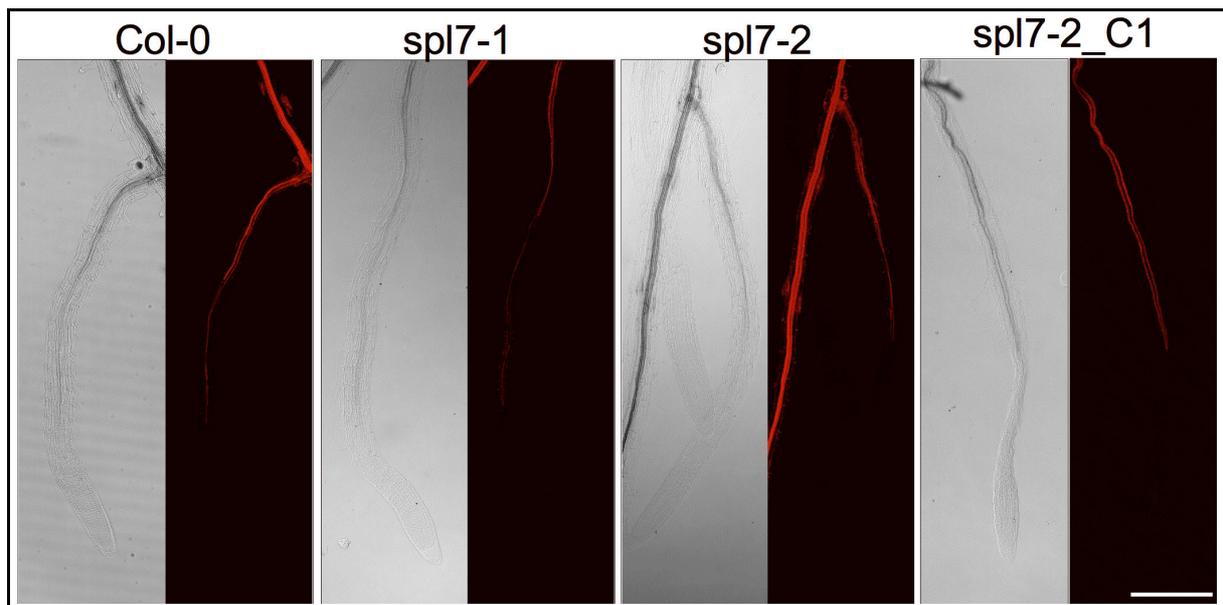


Abb. 6.3: Durchlichtbilder und entsprechende Fluoreszenzbilder der Wurzeln von 10 Tage alten Keimlingen, die auf 1/2x MS-Medium mit $5\mu\text{m CuSO}_4$ gewachsen sind und mit basischem Fuchsin gefärbt wurden. Diese Bilder umfassen den Bereich, der in Abb.3.3.5 vergrößert wurde. Die Fluoreszenzbilder sind aus 20 verschiedenen Ebenen zusammengesetzt und umfassen den Bereich, der in Abb.3.3.5 vergrößert wurde. Der Balken entspricht $600\mu\text{m}$.

Tab. 6.1: Restliche bekannte Transporter und Proteine, die für die Kupfer-Homöostase wichtig sind, aber einen höheren FDR als 2% haben und nicht in Tab. 3.4.1 aufgelistet sind.

AGI-Code	Rosette / Wurzel	Name	WT +Cu	WT - Cu	spl7 +Cu	spl7 - Cu	WT +/-	FDR WT +/-	spl7 +/-	FDR spl7 +/-
AT2G37925	R	COPT4	0,9	0,7	0,8	0,2	1,36	0,51	4,14	0,23
AT5G20650	R	COPT5	55,7	54,5	61,4	51,0	1,02	0,54	1,20	0,02
AT5G20650	W	COPT5	128,1	121,1	119,2	104,5	1,06	0,11	1,14	0,10
AT2G26975	W	COPT6	0,2	0,2	0,1	0,4	0,88	0,31	0,26	0,19
AT5G18100	W	CSD3	3,8	3,6	3,5	4,1	1,06	0,30	0,84	0,50
AT1G66340	R	ETR1	23,8	22,8	23,7	29,0	1,04	0,60	0,82	0,05
AT1G01590	R	FRO1	0,9	0,1	0,6	0,5	9,03	0,02	1,09	0,49
AT1G01590	W	FRO1	0,1	0,1	0,1	0,1	1,00	0,32	1,00	0,46
AT1G01580	R	FRO2	3,7	5,7	5,3	7,2	0,65	0,20	0,74	0,17
AT5G23980	R	FRO4	6,2	5,3	6,5	6,8	1,17	0,39	0,95	0,49
AT5G49740	W	FRO7	0,1	0,1	0,1	0,1	1,00	0,32	1,00	0,46
AT5G50160	W	FRO8	1,5	2,7	3,3	3,2	0,56	0,02	1,01	0,50
AT5G51100	R	FSD2	16,4	12,9	11,2	10,9	1,27	0,21	1,03	0,49
AT5G51100	W	FSD2	3,9	2,9	2,9	3,9	1,34	0,14	0,75	0,40
AT5G23310	W	FSD3	14,6	11,4	11,9	12,6	1,28	0,02	0,95	0,28
AT4G37270	W	HMA1	23,8	18,3	22,6	18,3	1,30	0,04	1,24	0,23
AT4G30120	R	HMA3	0,1	0,1	0,9	0,1	1,00	0,55	8,67	0,05
AT4G30120	W	HMA3	12,2	10,8	15,2	13,9	1,13	0,19	1,10	0,38
AT1G63440	R	HMA5	4,6	4,5	4,5	3,5	1,03	0,61	1,26	0,36
AT4G33520	R	HMA6/PAA1	12,2	9,5	12,7	9,6	1,29	0,21	1,32	0,16
AT4G33520	W	HMA6/PAA1	2,8	4,7	6,2	3,5	0,60	0,02	1,76	0,23
AT5G21930	R	HMA8/PAA2	26,6	20,4	31,0	27,9	1,30	0,03	1,11	0,28
AT4G19680	R	IRT2	0,1	0,4	0,1	0,2	0,23	0,28	0,55	0,38
AT1G60960	R	IRT3	10,8	14,9	14,4	15,1	0,73	0,08	0,96	0,49
AT1G76100	W	PETE2	0,2	0,1	0,1	0,4	2,22	0,15	0,23	0,19
AT3G17650	W	YSL5	35,8	41,3	45,9	39,8	0,87	0,01	1,15	0,11
AT3G27020	R	YSL6	53,2	49,1	47,3	42,5	1,08	0,39	1,11	0,14
AT3G27020	W	YSL6	31,0	26,7	31,0	28,8	1,16	0,12	1,08	0,50
AT1G65730	W	YSL7	5,7	5,5	6,7	7,4	1,03	0,23	0,90	0,32
AT1G48370	W	YSL8	12,2	12,8	15,4	12,4	0,96	0,20	1,24	0,41
AT3G12750	R	ZIP1	11,6	10,6	11,9	9,7	1,09	0,50	1,23	0,26
AT3G12750	W	ZIP1	11,0	11,3	11,5	10,5	0,98	0,27	1,10	0,19
AT5G59520	R	ZIP2	0,2	1,5	0,1	0,1	0,16	0,02	1,37	0,48
AT2G32270	R	ZIP3	1,2	2,0	1,3	1,4	0,62	0,33	0,93	0,49
AT1G10970	R	ZIP4	13,5	10,6	17,0	12,2	1,28	0,16	1,39	0,02
AT1G10970	W	ZIP4	7,3	4,8	6,6	4,9	1,50	0,04	1,35	0,11
AT1G05300	R	ZIP5	8,7	7,3	7,3	5,0	1,19	0,33	1,46	0,13
AT1G05300	W	ZIP5	9,3	7,4	4,7	3,5	1,27	0,22	1,34	0,50
AT2G30080	R	ZIP6	4,2	3,1	5,7	5,0	1,38	0,24	1,15	0,45
AT2G30080	W	ZIP6	13,1	12,2	16,5	11,3	1,07	0,25	1,46	0,02
AT2G04032	R	ZIP7	4,2	2,7	3,0	2,4	1,55	0,21	1,26	0,40
AT2G04032	W	ZIP7	0,1	0,1	0,4	0,1	1,00	0,32	3,57	0,29
AT5G45105	R	ZIP8	0,1	0,1	0,1	0,2	1,00	0,55	0,76	0,49
AT5G45105	W	ZIP8	1,5	1,6	4,2	2,3	0,96	0,27	1,81	0,18
AT4G33020	R	ZIP9	0,1	0,8	0,5	0,7	0,13	0,08	0,74	0,49
AT4G33020	W	ZIP9	5,1	7,2	4,8	2,5	0,71	0,08	1,97	0,09
AT1G31260	R	ZIP10	0,1	0,1	0,1	0,1	1,00	0,55	1,00	0,49

Von links nach rechts: Gen-Zuordnung nach dem AGI-Code; Gewebe: R: Rosette; W: Wurzel; Expressionsdaten in reads per Million von Wildtyp mit und ohne Kupfer; Verhältnisse von Wildtyp und *spl7-2* zwischen + und -Cu und Statistik; Rot: Verhältnis um den Faktor 2 geändert; FRD: False Discovery Rate

Tab. 6.2: Die restlichen Enzyme der Phenylpropanoid-Biosynthese, die einen größeren FDR als 2% haben und nicht in Tab. 3.4.2 aufgelistet sind.

AGI-Code	Rosette / Wurzel	Name	WT +Cu	WT Cu	log10 WT +/-	FDR WT +/-
AT4G05160	R	4-coumarate-CoA ligase	61,0	66,8	0,91	0,39
AT4G05160	W	4-coumarate-CoA ligase	64,0	60,5	1,06	0,03
AT4G19010	R	4-coumarate-CoA ligase family protein	10,3	7,3	1,41	0,17
AT4G19010	W	4-coumarate-CoA ligase family protein	11,7	11,7	1,00	0,28
AT5G38120	R	4-coumarate-CoA ligase family protein	5,0	3,1	1,60	0,10
AT5G38120	W	4-coumarate-CoA ligase family protein	0,1	0,1	1,00	0,32
AT5G63380	R	4-coumarate-CoA ligase family protein	17,6	16,6	1,06	0,47
AT5G63380	W	4-coumarate-CoA ligase family protein	10,9	10,6	1,02	0,22
AT1G20490	R	4-coumarate-CoA ligase-like identical	14,0	10,0	1,40	0,11
AT1G20490	W	4-coumarate-CoA ligase-like identical	6,8	7,5	0,91	0,19
AT1G20510	R	4-coumarate-CoA ligase-like identical	120,4	119,6	1,01	0,47
AT1G20510	W	4-coumarate-CoA ligase-like identical	52,7	56,8	0,93	0,12
AT1G62940	R	4-coumarate-CoA ligase-like identical	0,1	0,1	1,00	0,55
AT1G62940	W	4-coumarate-CoA ligase-like identical	0,2	0,2	1,09	0,28
AT1G09500	R	CAD family	13,4	17,5	0,77	0,18
AT1G67990	W	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase	0,1	0,4	0,29	0,06
AT1G67990	R	caffeoyl-CoA O-methyltransferase identical	0,1	0,1	1,00	0,55
AT2G23910	R	cinnamoyl-CoA reductase-related	3,4	4,3	0,79	0,44
AT4G30470	R	cinnamoyl-CoA reductase-related	23,6	31,0	0,76	0,03
AT4G30470	W	cinnamoyl-CoA reductase-related	9,1	8,6	1,07	0,17
AT5G14700	R	cinnamoyl-CoA reductase-related	18,1	13,3	1,37	0,04
AT5G14700	W	cinnamoyl-CoA reductase-related	4,7	4,0	1,19	0,26
AT1G09490	R	cinnamyl-alcohol dehydrogenase family similar	37,0	37,6	0,99	0,48
AT1G09490	W	cinnamyl-alcohol dehydrogenase family similar	9,6	9,6	1,00	0,30
AT1G09500	W	cinnamyl-alcohol dehydrogenase family similar	0,1	0,1	1,00	0,32
AT1G09510	R	cinnamyl-alcohol dehydrogenase family similar	0,1	0,1	1,00	0,55
AT1G09510	W	cinnamyl-alcohol dehydrogenase family similar	0,1	0,2	0,49	0,19
AT2G23910	W	cinnamyl-alcohol dehydrogenase family similar	1,5	1,1	1,30	0,14

AGI-Code	Rosette / Wurzel	Name	WT +Cu	WT - Cu	log10 spl7 +/-	FDR spl7 +/-
AT4G05160	R	4-coumarate-CoA ligase	61,0	66,8	0,96	0,41
AT4G05160	W	4-coumarate-CoA ligase	64,0	60,5	1,03	0,41
AT4G19010	R	4-coumarate-CoA ligase family protein	10,3	7,3	0,70	0,10
AT4G19010	W	4-coumarate-CoA ligase family protein	11,7	11,7	0,90	0,50
AT1G20480	R	4-coumarate-CoA ligase-like identical	0,6	0,9	2,19	0,36
AT1G20480	W	4-coumarate-CoA ligase-like identical	1,9	3,9	1,26	0,39
AT1G20490	R	4-coumarate-CoA ligase-like identical	14,0	10,0	0,80	0,12
AT1G20490	W	4-coumarate-CoA ligase-like identical	6,8	7,5	1,40	0,14
AT1G20510	R	4-coumarate-CoA ligase-like identical	120,4	119,6	0,89	0,04
AT1G20510	W	4-coumarate-CoA ligase-like identical	52,7	56,8	0,92	0,13
AT1G62940	R	4-coumarate-CoA ligase-like identical	0,1	0,1	0,76	0,49
AT1G62940	W	4-coumarate-CoA ligase-like identical	0,2	0,2	3,57	0,29
AT1G67990	W	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase	0,1	0,4	2,72	0,17
AT1G67990	R	caffeoyl-CoA O-methyltransferase identical	0,1	0,1	0,76	0,49
AT5G14700	R	cinnamoyl-CoA reductase-related	18,1	13,3	0,77	0,15
AT5G14700	W	cinnamoyl-CoA reductase-related	4,7	4,0	1,53	0,23
AT1G09490	R	cinnamyl-alcohol dehydrogenase family similar	37,0	37,6	1,09	0,42
AT1G09490	W	cinnamyl-alcohol dehydrogenase family similar	9,6	9,6	0,98	0,50

Von links nach rechts: Gen-Zuordnung nach dem AGI-Code; Gewebe: R: Rosette; W: Wurzel; Expressionsdaten in reads per Million von Wildtyp mit und ohne Kupfer; Verhältnisse von Wildtyp und *spl7-2* zwischen + und -Cu und Statistik; Rot: Verhältnis um den Faktor 2 geändert; FRD: False Discovery Rate

Tab. 6.3 Gene, die an der Nicotianamin-Biosynthese beteiligt sind

AGI-Code	Gewebe	Name	WT +Cu	WT -Cu	spl7 +Cu	spl7 -Cu	WT +/-	FDR	spl7-2 +/-	FDR
AT5G04950	W	NA synthase	42,0	31,0	51,7	72,9	1,36	0,01	0,71	0,00
AT5G56080	R	NA synthase	0,1	0,1	0,1	0,2	1,00	0,60	0,76	0,49
AT1G56430	W	NA synthase	6,6	4,1	5,1	6,3	1,62	0,07	0,81	0,29
AT1G09240	R	NA synthase	19,6	32,8	15,4	17,1	0,60	0,00	0,91	0,47
AT1G09240	W	NA synthase	0,1	0,1	0,1	0,1	1,00	0,33	1,00	0,46
AT5G56080	W	NA synthase	7,2	4,6	13,9	12,2	1,55	0,10	1,14	0,50
AT5G04950	R	NA synthase	48,6	42,9	78,3	40,7	1,13	0,16	1,93	0,00
AT1G56430	R	NA synthase	24,3	25,9	36,6	13,6	0,94	0,46	2,68	0,00

Von links nach rechts: Gen-Zuordnung nach dem AGI-Code; Gewebe: R: Rosette; W: Wurzel; Expressionsdaten in reads per Million von Wildtyp mit und ohne Kupfer; Verhältnisse von Wildtyp und *spl7-2* zwischen + und -Cu und Statistik; Rot: Verhältnis um den Faktor 2 geändert; FRD: False Discovery Rate

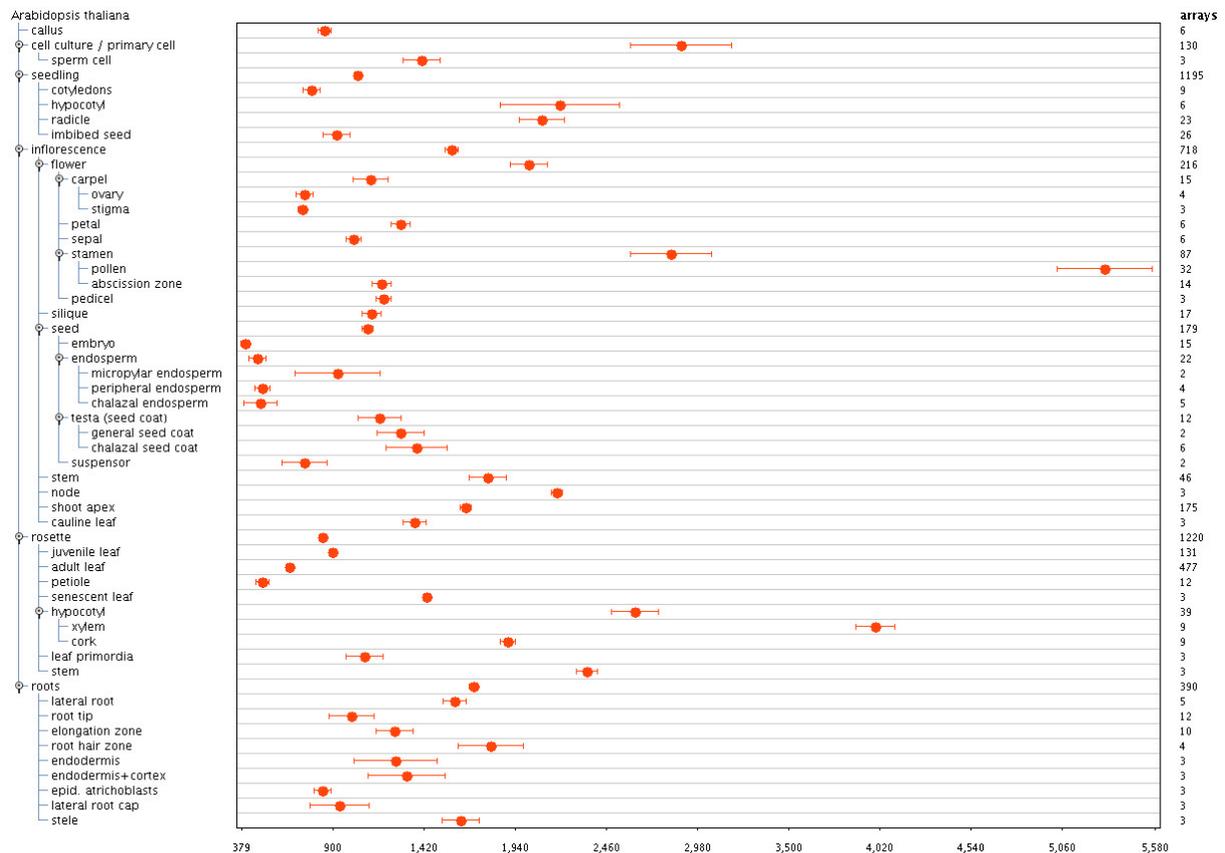


Abb. 6.4: Expressionsdaten von der Webseite www.genevestigator.com für das Gen *SPL7* AT5G18830. Besonders hoch ist die Expression in Pollen, Xylem und Zellkulturen sich differenzierender Leitbündelgewebezellen.

Abb. 6.5: Expressionsdaten für das Gen SPL7 AT5G18830 aus verschiedenen Affymetrix ATH1-Chips von der Website <http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>. Der Schwellenwert mit der Legende für die Falschfarben ist für alle Bereiche gleich mit dem von A.

A: Übersicht über verschiedene Gewebe während der Entwicklung von *A. thaliana*.

B: Vergleich unterschiedlicher Stängelabschnitte (der Wert für den unteren liegt bei 500)

C: Darstellung des Fruchtknotens

D: Pollen und Pollenkeimung

E: Stängelabschnitte

F: Die Wurzelspitze mit den drei Zonen: 1:Teilungs-, 2:Streckungs- und 3:Differenzierungszone

G: Pollenentwicklung

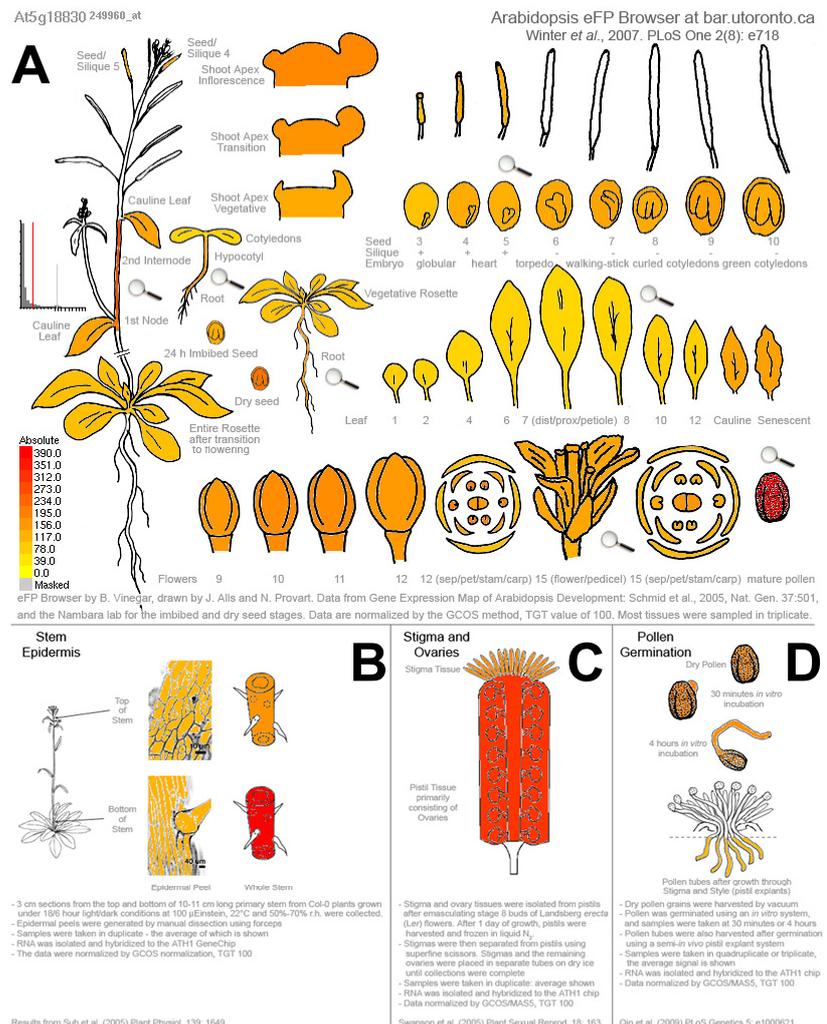




Abb. 6.6: Eine *spl7-2*-mutante Pflanze, die für 50 Tage unter Langtag auf normaler Erde (ohne Kupferdüngung) gewachsen ist.

7 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
μM	micromolar	KT	Kurztag
μm	Micrometer	LAC	LACcase
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	LL	Dauerlicht
Abb.	Abbildung	LT	Lantag
AP1	APetalal	mg	Milligramm
ATX1	Arabidopsis homolog of anTi-oXidant1	min	Minute
BCS	BathoCuproine Sulphonate	<i>MIR</i>	mikroRNA
bp	Basenpaare	mM	millimolar
CCH	Copper CHaperone	MS-Medium	Murashige und Skoog Medium
CCS	Copper Chaperone for Superoxide dismutase	NA	Nicotianamine
COPT	COPper Transporter	NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
CRR1	Copper Response Regulator 1	nm	Nanometer
CSD	Cu-Zn-Superoxid-Dismutase	PAA	P -type ATPase
-Cu	Kupfermangelbedingung	PC	PlastoCyanin
+Cu	optimale Kupferbedingungen	PCR	Polymerasekettenreaktion
Cu+	positiv geladenes Kupferion	PETE	Plastocyanin
Cu ²⁺	zweifach positiv geladenes Kupferion	ppde	Posterior Probability of Different Expression
CuRE	Cu Response Element	PSI	Photosystem 1
CuSO ₄	Kupfer-(II)-sulfat Pentahydrat	RIP	Regulated Intermembrane Proteolysis
DNA	DesoxyriboNucleic Acid	RNA	RiboNucleic Acid
ETR1	ETHylen Response factor 1	RUP	Regulated Ubiquitin/proteasome-dependent Processing
FDR	False Discovery Rate	S	Sinapylalkohol
Fe	Eisen	SBP	Squamosa promotor Binding Protein
Fe ²⁺	zweifach positiv geladenes Eisenion	SOD	SuperOxid-Dismutase
Fe ³⁺	dreifach positiv geladenes Eisenion	SPL	Squamosa promotor binding Protein Like
FRO	Ferric Reduction Oxidase	<i>spl7-2_C1</i>	Komplementierte Linie von <i>spl7-2</i> Pflanzen
FSD	Fe-Superoxid-Dismutase	SQUA	SQUAmosa
G	Coniferylalkohol	Tab.	Tabelle
h	Stunde	TT10	Transparent Testa10
H	Coumarylalkohol	WT	Wildtyp
H ₂ O	Wasser	YSL	Yellow Stripe Like
HMA	Heavy Metal ATPase	ZIP	ZRT-/IRT-like Protein
IRT	Iron Regulated Transporter	Zn ²⁺	zweifach positiv geladenes Zinkion

7.1 Verwendete Oligos

Name	Sequenz 5'-3'
ST35	GCTGGAGGGCTATATCCGCCAGG
ST74	CGCAGACAACCTTTGTCTCTGTTACAGG
SH521	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT
AG04	CATGTAGAAGCCTCACGTCGCAGTC
AG17	GTAGGTTGTAGTCTCGAGATATGCTC
AG112	CAGTGCCGATTTCTCAATCC
AG105	GTACCTGTGACTGCGACGTG
AG106	GCCGCTATCTGGTGAACAGT
SH286	TAACGTGGCCAAAATGATGC
SH287	GTTCTCCACAACCGCTTGGT

7.2 Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Wolfgang Werr bedanken, dass er so unkompliziert den Posten des Erstgutachters übernommen hat. Für die spontane Einwilligung, das Zweitgutachten zu schreiben, bedanke ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Klaus Theres, Prof. Dr. Ute Höcker danke ich für den Prüfungsvorsitz und Dr. John Chandler für den Beisitz während meiner Verteidigung.

Prof. Dr. Heinz Saedler möchte ich für die Möglichkeit danken, diese Doktorarbeit in seiner Abteilung anzufangen und Prof. Dr. Maarten Koornneef dafür, dass ich sie in seiner Abteilung beenden dürfte.

Für die Kollaboration in der Solexa-Sequenzierung und darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Sabeeha Merchant, Prof. Dr. Ute Krämer, Dr. Maria Bernal und Dr. Matteo Pelligrini bedanken.

Für die Kollaboration in der Monolignol-Forschung mit dem LC-MS und GC-MS möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Wout Boerjan und seinem Team bedanken.

Vielen Dank auch an Maria, Anja, Susanne, Rita, Shuping, Stefan, Maike, Vanessa, Judith, Michiel, Simone und allen weiteren Kollegen, für die Einführung in die Molekulargenetischen Grundlagen, immer wieder ein offenes Ohr für mich zu haben, Spontangrillen, und das eine oder andere Bierchen. Ohne Euch hätte ich diese Zeit niemals durchgestanden!

Peter, ohne Dich wäre ich niemals so weit gekommen und ich danke Dir für Deine Zuversicht in mich und, dass Du mir den Kopf für das wissenschaftliche Denken geöffnet hast. Ich glaube auch nicht, dass es viele Gruppenleiter gibt, die Nachts und am Wochenende regelmäßig ihre Mails abrufen! Außerdem lernte ich durch die nicht nur Macs kennen und lieben, Du hast auch deutlich mehr als die Grundlagen des „anständige Bilder machen“ und der folgenden Bildbearbeitung beigebracht!

Nora, ohne Dich hätte ich niemals am MPIZ angefangen und die Zeit die wir nicht nur im Labor gemeinsam verbracht haben möchte ich keinesfalls missen! Besonders Bedanken möchte ich mich außerdem für die intensive Korrektur dieser Arbeit!

Daniela, es gibt keine Möglichkeit, dass was Du für mich getan hast in Worte zu fassen! Ich kenne keine Person die so selbstlos und aufopferungsbereit ist wie Du! Vielen Dank für die viele Hilfe, besonders wenn ich mich nicht getraut habe zu fragen.

Mit Euch beiden kann man nachweislich ohne Probleme Nächte durcharbeiten und selbst dann noch konstruktive Kritik austauschen!

Meiner Familie möchte ich für die tatkräftige Unterstützung und das Ertragen meiner Launen danken! Ohne Euch wäre mir schon längst die Kraft und Zuversicht ausgegangen, dass ich dieses Projekt überhaupt beenden kann, Besonders danke ich meiner Zwillingsschwester Jasmin. Obwohl Du auch gerade an Deiner „Diss“ sitzt hast Du die Zeit gefunden meine zu korrigieren und mir eine Menge Fotos zur Aufmunterung zu schicken (es lebe die WebCam)!

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung in Köln durchgeführt

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Wolfgang Werr betreut worden.

Arne Grande