

2. Zielsetzung

Trotz umfassender Untersuchungen zum Schwermetallstress mit den Modellorganismen *Arabidopsis thaliana* und *Saccharomyces cerevisiae* sind noch viele Fragen der komplexen Regulation der Schwermetallhomöostase und der Entgiftungsmechanismen offen. Ein Grund dafür ist, dass an diesen Prozessen offenbar eine Vielzahl von unterschiedlich wirkenden Faktoren beteiligt sind. Viele der bisher durchgeführten molekularen Arbeiten zum Schwermetallstress wurden mit der dikotyledonen Pflanze *Arabidopsis* durchgeführt, bzw. bestimmte Fragestellungen auch am Hefesystem überprüft. Aufbauend auf den Ergebnissen von *Arabidopsis* sollte in der vorliegenden Arbeit versucht werden, die an der Metallhomöostase beteiligte Faktoren in der monokotyledonen Modellpflanze Gerste (*Hordeum vulgare*) zu identifizieren. Ein Schwerpunkt bei diesen Untersuchungen sollte die Analyse überlappender Muster bei Schwermetallstress und Blattseneszenz sein, da es bei dem Prozess der Blattseneszenz auch zu einer Freisetzung von Schwermetallen kommt, welche dann in anderen Pflanzenteilen wiederverwertet werden. Dieser Aspekt der Blattseneszenz wurde bisher noch nicht genauer untersucht. Ein weiterer Vorteil der Gerste ist, neben der ökonomischen Relevanz als Kulturpflanze, dass hier bereits ein experimentelles System zur standardisierten Untersuchung der Blattseneszenz vorliegt.

Da die Thematik „Schwermetallstress und Schwermetallhomöostase“ bisher in der Arbeitsgruppe nicht behandelt, also mit den Arbeiten „Neuland“ betreten wurde, musste zunächst ein System zur gezielten Schwermetallbehandlung von Gerste etabliert werden.

Nach einer vergleichenden Charakterisierung des Schwermetallstress und der Blattseneszenz auf physiologischer Ebene, bei der auch begleitend die Bestimmung von Gehalten des im Chloroplasten lokalisierten Antioxidanz Tocopherol umfassen sollte, sollten auf RNA-Ebene möglicherweise beteiligte Faktoren identifiziert werden. Um ein möglichst umfassendes Bild zu erhalten, sollte dies auf folgenden Wegen geschehen:

1. Ausgehend von bekannten Sequenzen anderer Pflanzenspezies sollten cDNAs von Metallothioneinen des Blattes identifiziert werden.

2. Zusätzlich zur Identifikation von bis dato unbekanntem Metallothionein-Genen der Gerste sollten cDNAs von aus anderen Organismen bekannten Faktoren der Metallhomöostase in Gerstenblättern identifiziert werden. Beispiele dafür sind das in *Arabidopsis* identifizierte Kupferchaperon *CCH*, welches möglicherweise auch in Seneszenzprozesse involviert ist (Himmelblau et al. 1998), und das Blue-Copper-Binding-Protein (*AtBCB*), ein membran-assoziiertes Protein, dessen kupferbindende Domäne große Homologien zu der kupferbindenden Domäne des Plastocyanins aufweist. *AtBCB* wird sowohl während des Schwermetallstresses induziert (Ezaki et al. 2000, 2001), als auch während der natürlichen Blattseneszenz (Himmelblau und Amasino 2000). Die Funktion von *AtBCB* ist jedoch bis dato nicht geklärt.

3. Um neue, bisher unbekannte cadmiuminduzierte Gene in Primärblättern der Gerste identifizieren zu können, sollte parallel zu den anderen Arbeiten ein Differential-Display durchgeführt werden.

In weiteren Studien sollten die Expressionsmuster der so identifizierten, möglicherweise an der Schwermetallhomöostase und Schwermetallentgiftung beteiligten Gene analysiert werden. Dabei sollten zwei Zustände untersucht werden:

Zum einen sollten Veränderungen in der Expression in Reaktion auf einen exogen applizierten Schwermetallstress sowohl mit Cadmium als nicht-essentielles, rein toxisches Schwermetall, als auch mit Kupfer, als essentielles Metall, untersucht werden.

Zum anderen sollte eine mögliche Regulation von MTs während der natürlichen Blattseneszenz untersucht werden, wenn es durch massive Abbauvorgänge vor allem im Chloroplasten zu einer Freisetzung und Translokation von Metallen aus ihren Metalloproteinen kommt.

Schließlich sollten Nachweise zur Identifikation von Metallothioneinen auf Proteinebene durchgeführt werden. Der Nachweis von MT-Proteinen ist dabei nicht trivial. Zwar konnten in

den letzten 20 Jahren ungefähr 100 verschiedene MTs in Form ihrer cDNA identifiziert werden, doch sind Nachweise der korrespondierenden Proteinen i.d.R. noch zu erbringen. Mit diesen Arbeiten zur Identifikation und Charakterisierung von Schwermetall- und/oder Seneszenz-induzierten Genen, sollte eine Basis für zukünftige Untersuchungen zur komplexen Regulation der Schwermetallhomöostase gesetzt werden (Abb. 3).

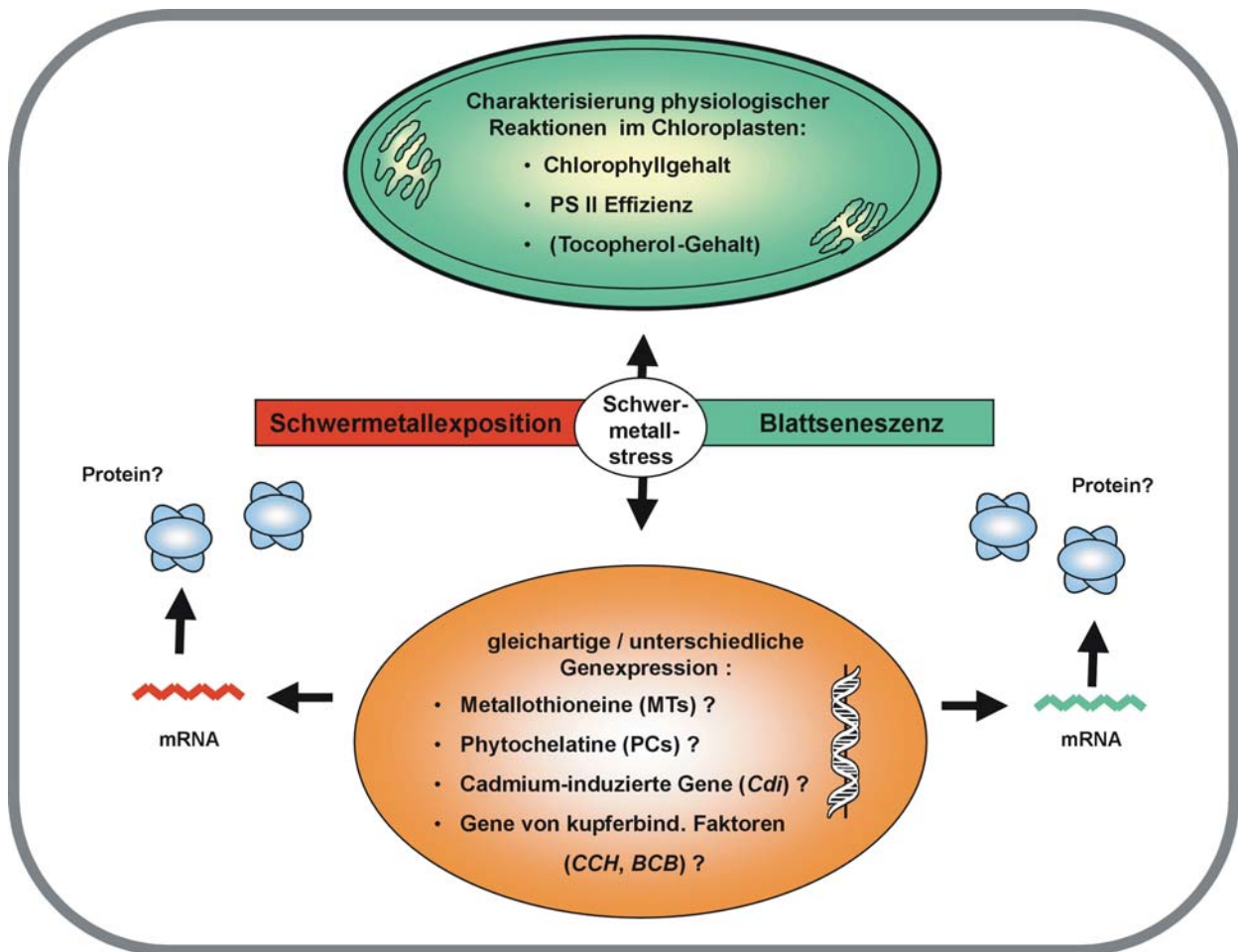


Abb. 3 Modell des methodischen Ansatzes zur Untersuchung der Metallhomöostase und Detoxifikation von Metallen während des Schwermetallstress und der Blattseneszenz. Unter diesen Bedingungen kommt es zu einer möglichen Toxifikation der Zelle mit Schwermetallen. Gleichartige oder unterschiedliche Regulationsmechanismen führen zu überlappenden oder unterschiedlichen Expressionsmustern. Zur physiologischen Charakterisierung der Stressbedingungen werden Parameter untersucht, die besonders sensibel auf sich ändernde Umweltbedingungen reagieren (Chlorophyllgehalt / PS II Effizienz).