

5. Diskussion

5.1 Allgemeine Betrachtung

In der vorliegenden Arbeit wurde mit den Untersuchungen zur Schwermetallhomöostase und Detoxifikation von Metallen in Primärblättern der Gerste (*Hordeum vulgare*) für die Arbeitsgruppe „Neuland“ betreten.

Der Schwerpunkt der Arbeit lag dabei in der Identifikation und Charakterisierung von Metallothioneinen (MTs), kleinen cysteinreichen Proteinen, die in Form ihrer cDNAs nur die für dikotyledone Pflanze wie *Arabidopsis*¹ zu einem großen Teil identifiziert und teilweise auch charakterisiert wurden. Bei Vertretern der monokotyledonen Süßgräsern (*Poaceae*), zu denen auch die Gerste (*Hordeum*) zählt, bestanden nur einzelne Untersuchungen zur stress- und entwicklungsabhängigen Expression von MTs (*Triticum*², *Oryza*³, *Zea*⁴). Basierend auf diesen bestehenden Arbeiten sollte eine umfassende parallele Analyse des Expressionsverhaltens der ganz unterschiedlichen MTs einer Pflanze während verschiedener Stadien der Blattentwicklung und während des Schwermetallstresses in Blättern untersucht werden. Begleitend dazu sollten mittels Differential Display neue, bisher unbekannte cadmiuminduzierte Gene identifiziert und charakterisiert werden.

Zudem sollten anhand beschriebener Sequenzmotive weitere cDNAs von Faktoren der Metallhomöostase / Detoxifikation isoliert und in Expressionsstudien eingesetzt werden. Diese Faktoren sind die Phytochelatin-Synthase sowie aus der dikotyledonen Modellpflanze *Arabidopsis* bekannte Komponenten der zellulären Kupferdistribution (*CCH*, *BCB*). Ziel der Arbeit war es, zunächst auf Transkriptebene parallel die Expression von vielen verschiedenen an der Schwermetallhomöostase und -entgiftung beteiligten Faktoren an zwei definierten Versuchssystemen (Blattseneszenz und Schwermetallbehandlung) zu untersuchen. Beide

¹ *Arabidopsis thaliana*: *MT1a*, *MT1c*, *MT2a*, *MT2b*, (Zhou und Goldsbrough, 1994, 1995; Murphy und Taiz, 1995, Hernandez et al. 1998), *MT3* (Murphy et al. 1997)

² *Triticum aestivum*: *Ec* (Hanley-Bowdin und Lane 1983), *Wali1* (Snowden und Gardner 1993)

³ *Oryza sativa*: *OsMT-1* (Hsieh et al. 1995), *OsMT-2* (Hsieh et al. 1996), *RicMT* (Yu et al. 1998)

⁴ *Zea mays*: *MT1* (Chevalier et al. 1995)

Systeme gehen mit Veränderungen in der intrazellulären Schwermetall-Homöostase einher (siehe Diskussion unten). Am Beispiel der Metallothioneine sollten anschließend Analysen der Veränderungen auf Proteinebene erfolgen.

Da in den verschiedenen in der Literatur beschriebenen Experimenten für Pflanzen keine normierten Anzuchtbedingungen verwendet wurden, und zudem Schwermetallexpositionen nicht durchweg in vergleichbarer Länge und Konzentration durchgeführt wurde, lassen sich die Daten sowohl auf physiologischer, biochemischer als auch molekularer Ebene nur bedingt vergleichen. Dies sollte bei der folgenden Diskussion der Daten berücksichtigt werden. So wurden beispielsweise Expressionsstudien von MTs aus *Arabidopsis* nach 48stündiger Kupferexposition durchgeführt (Guo et al. 2003), bei denen die Kupferkonzentrationen um das 20-50fache niedriger waren als in der vorliegenden Arbeit. Das Typ 2 Metallothionein aus *Arabidopsis MT2b* wird bei Kupferkonzentrationen von 50 μM verstärkt exprimiert, während das Typ 2 Metallothionein aus Gerste bei einer 20fach höheren Kupferkonzentration weiterhin konstitutiv exprimiert während eine 50fach höhere Kupferkonzentration (2,5 mM) zu einer völligen Repression des Gens führt (siehe Abb. 13).

5.2 Physiologische Charakterisierung

Frühere Arbeiten (Miersch et al. 2000) zeigten, dass die beiden Messparameter Chlorophyllgehalt und Photosystem II Effizienz sich sehr gut zur Charakterisierung der Blattseneszenz eignen. Dabei beruhen Veränderungen im Chlorophyllgehalt und in der Effizienz von Photosystem II Zentren im Zuge des Seneszenzprozesses auf zwei verschiedenen Kinetiken. Während Chlorophyllmoleküle sukzessive mit dem Beginn der Seneszenz abgebaut werden, spiegeln weiterhin hohe Effizienzen von noch verbleibenden PS II Zentren ihre andauernde Funktionalität wieder (siehe Abb. 4). Erst in den späten Phasen der Blattseneszenz, kommt es zu einem rapiden Abfall in der PS II Effizienz, welcher ein Zusammenbrechen der funktionellen Organisation des Photosyntheseapparates anzeigt.

Da Veränderungen in beiden Messparametern auch sehr sensibel Reaktionen von Pflanzen auf verschiedene Stressoren anzeigen, wurden zur Charakterisierung des Schwermetallstresses auf

Primärblätter der Gerste ebenso die Veränderungen im Chlorophyllgehalt und in der Photosystem II Effizienz bestimmt. Dafür wurden Primärblätter im Zustand der Blattrife für 48 h mit Kupfer, als essentielles, bzw. mit Cadmium als nicht-essentielles, rein toxisches Schwermetall exponiert. Es zeigte sich, dass sowohl die Expositionsdauer als auch die Konzentration des jeweiligen Schwermetalls einen großen Einfluss auf diese photosynthetischen Parameter haben (siehe Abb. 5 und 6).

Eine Exposition der Pflanzen mit toxischen Konzentrationen an Schwermetallen hat eine Abnahme des Chlorophyllgehaltes zu Folge, wobei dieses nicht nur für Kupfer und Cadmium gezeigt werden konnte, sondern auch für andere Metalle wie Eisen, Zink, Nickel und Aluminium gilt (Daten nicht gezeigt). Erhöhungen der jeweiligen Schwermetallkonzentrationen erhöhen den Abbau von Chlorophyll. Nur bei sehr hohen Konzentrationen von Schwermetallen kommt es offensichtlich zu einer Inhibierung des Chlorophyllabbaus, der auf einen völligen Zusammenbruch der zellulären Funktionalität deutet. Dieses wird durch Veränderungen der PS II Effizienzen deutlich. Während einer 48 h Exposition der Pflanzen mit toxischen Konzentrationen von 0,1-1 mM Kupfer- oder Cadmiumchlorid wird die PS II Effizienz in Primärblättern nicht deutlich beeinflusst. Nur sehr hohe Konzentrationen von 5 mM Kupferchlorid bzw. Cadmiumchlorid führen zu einem deutlichen Abfall der PS II Effizienzen.

Damit wird deutlich, dass zu einer physiologischen Charakterisierung von Schwermetallstress beide Parameter (Chlorophyllgehalt / PS II Effizienz) notwendig sind. Nur einer dieser Parameter allein, vermag es nicht, schwermetallinduzierte Effekte auf den Photosyntheseapparat zu beschreiben (siehe Kapitel 4.1.1 und 4.1.2.).

5.3 Tocopherole

Sowohl während des sukzessiven Abbaus von Photosyntheseeinheiten in der Blattseneszenz als auch durch die Exposition der Pflanzen mit Schwermetallen kommt es unter anderem zu Störungen in der photosynthetischen Elektronentransport-Kette (siehe dazu Dietz et al. 1999, Prasad und Strzalka 1999, Krupinska und Humbeck 2004). Dadurch erhöht sich deutlich die Gefahr, dass es zu einer Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kommt. Dieser

Gefahr stellt die pflanzliche Zelle eine ganze Reihe von Faktoren entgegen, die eine Formierung von ROS verhindern, bzw. ROS entgiften. Dazu gehören neben Antioxidanzien Enzyme, die entweder direkt in die ROS-Entgiftung integriert sind (SOD, Katalase, Peroxidase, Glutathion-S-Transferase) oder die Antioxidanzien wieder in den reduzierten Status bringen (z.B. Glutathion-Reduktase). Zu den Antioxidanzien gehören vor allem drei Substanzen: Ascorbinsäure (Vitamin C), Glutathion (GSH) und die Tocopherole (α -, β -, γ -, δ -Tocopherol).

Tocopherole sind im Chloroplasten lokalisiert und dort an die äußere Chloroplastenmembran und an Thylakoide gebunden. Es wird diskutiert, dass sie zum einen am Schutz von Membranlipidien vor oxidativer Schädigung beteiligt sind und zum anderen die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies, die während der Photosynthese entstehen, verhindern (siehe dazu Bergmüller et al. 2003).

α -Tocopherol besitzt gegenüber den anderen Tocopherolen die größte Wirksamkeit als Antioxidanz (Kamal-Eldin und Appelqvist 1996) und kommt im Vergleich zu seiner Vorstufe γ -Tocopherol in deutlich höheren Konzentrationen vor (Collakova und DellaPenna 2003a, Bergmüller et al. 2003, Falk et al. 2003). Die Isoformen β - und δ -Tocopherol sind in Blättern nur in sehr geringem Maße nachweisbar (DellaPenna 1999) und wurden deshalb nicht in die Analysen einbezogen.

Die Untersuchung von α -Tocopherol und seiner Vorstufe dem γ -Tocopherol in kupfer- und cadmiumgestressten Gerstenblättern sowie den entsprechenden Kontrollen ergab, dass es unter Kupferstress zu keinen signifikanten Veränderungen sowohl im α - als auch im γ -Tocopherolgehalt kommt, der Gehalt dieser Tocopherole unter Cadmiumstress aber um das 2-3fache zunimmt (siehe Abb. 8a und 8b). Daher ist zu vermuten, dass die Akkumulation von α -Tocopherol durch eine Reihe von cadmiuminduzierten Effekten hervorgerufen wird, die zur Bildung von ROS im Chloroplasten führen.

Da Cadmium im Gegensatz zu Kupfer nicht zu den redoxaktiven Metallen gehört, kann es nicht direkt, mittels Fenton-Reaktion, zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies beitragen. Oxidativer Stress kann aber in hohem Maße durch cadmiumvermittelte Sekundäreffekte entstehen. Durch toxische Mengen an Cadmium kommt es in Pflanzen beispielsweise zu einer

verminderten Aufnahme von essentiellen Ionen wie Zink, Mangan, Kupfer und Eisen (Sandalio et al. 2001). Außerdem konkurrieren Cadmiumionen mit essentiellen Ionen um die Metallbindestellen in metallhaltigen Proteinen wie dem kupferbindenden Plastocyanin oder dem manganhaltigen wasserspaltenden Apparat (OEC). Dadurch kann die funktionelle Organisation des Photosyntheseapparates erheblich beeinträchtigt werden, was wiederum die Gefahr der Bildung von ROS steigert (siehe dazu Prasad und Strzalka 1999). Weiterhin inhibiert Cadmium die Biosynthese von Carotinoiden und Chlorophyllen und führt sogar zur Destruktion dieser Lichtenergie akkumulierender Pigmente (Somashekaraiyah et al. 1992, Bazzaz et al. 1992).

Eine Zunahme von α -Tocopherol unter Cadmiumexposition könnte auch durch abnehmende Glutathionkonzentrationen (GSH) zu erklären sein. Unter Langzeitexposition mit Cadmium kommt es in Gerstenblättern zu einer Akkumulation von GSH-Syntheseprodukten, den schwermetallbindenden Phytochelatinen (siehe Kapitel 5.4). Dieses führt zu einem Absinken des GSH-Spiegels (Dietz et al. 1999), was wiederum eine Zunahme an reaktiven Sauerstoffspezies nach sich führt (Gallego et al. 1996). Einer Zunahme an ROS stellt die Pflanze eine vermehrte Synthese von Antioxidanzien wie α -Tocopherol entgegen. Da es nicht ausgeschlossen werden kann, dass Phytochelatine auch im Chloroplasten synthetisiert werden, was, wie beschrieben, zu einer Abnahme des GSH-Spiegels führt, ist auch ein Zusammenhang von α -Tocopherol, GSH und Phytochelatinen unter Cadmiumstress denkbar.

Das zumindest α -Tocopherol und Glutathion einer gemeinsamen Regulation unterliegen könnten, zeigen Untersuchungen in Ratten. Hier kommt es interessanterweise unter Cadmiumstress zu gemeinsamen Erhöhung von α -Tocopherol und GSH (Singh und Rana 2002), was zeigt, dass diese beiden Antioxidanzien einer gemeinsamen Regulation unterliegen könnten. Säugetiere sind aber nicht, im Gegensatz zu Pflanzen, zu einer Synthese von GSH-Syntheseprodukten, den Phytochelatinen befähigt.

Erhöhte Mengen an Kupfer führen nicht zu einer Akkumulation von Tocopherolen. Dies spricht dafür, dass Kupfer und Cadmium unterschiedliche Schadwirkungen auslösen. Dass Kupfer durchaus zu Schädigungen im Photosyntheseapparat führt, zeigen zum Beispiel die

Veränderungen in den physiologischen Parametern (siehe Abb. 6). Dies hat aber offenbar keine Auswirkungen auf die Tocopherolmengen. Denkbar ist, dass nach Kupferbehandlung eine erhöhte Aktivität von solchen Faktoren (Katalasen, Peroxidasen, SODs) auftritt, die an der Entgiftung von ROS beteiligt sind.

5.4 Phytochelatine

Dass Kupfer und Cadmium zu einer verschiedenartigen Stressantwort führen, zeigen auch Untersuchungen von Phytochelatinen (PCs) in Blättern (siehe Abb. 25). Phytochelatine sind kleine, cysteinreiche Peptide, die zusammen mit den nachfolgend diskutierten Metallothioneinen zu den wichtigsten metallbindenden Peptiden in Pflanzen gehören. Anders als die MTs sind die PCs jedoch keine direkten Genprodukte, sondern werden enzymatisch durch die Phytochelatin-Synthase (PCS) aus Glutathioneinheiten zu γ -Glu-Cys Polymeren synthetisiert (siehe Kapitel 1.4.2).

In *Arabidopsis* zeigen sowohl eine Exposition der Pflanzen mit Cadmium (Ha et al. 1999, Vatamaniuk et al. 2000) als auch mit Kupfer (Vatamaniuk et al. 2000) keine Auswirkungen auf die Genexpression der PCS in Wurzeln und Blättern. In beiden Organen wird die PCS konstitutiv exprimiert. In den Wurzeln von Weizen hingegen wird die PCS unter Cadmiumexposition verstärkt exprimiert (Clemens et al. 1999). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die PCS in Pflanzen unterschiedlich reguliert ist und eine Regulation zum Teil schon auf Transkriptionsebene stattfinden kann.

Allerdings scheinen die Transkriptgehalte der PCS in Weizen sowohl in Blättern als auch in Wurzeln sehr niedrig zu sein. Vermutlich wurden deswegen die Transkripte der PCS in dieser Arbeit auch nicht über Northern Analysen, sondern mittels PCR nachgewiesen.

Nachdem aus Weizen (Clemens et al. 1999) und Reis (Cobett et al., nicht publiziert) das Gen der Phytochelatin-Synthase identifiziert wurde, durfte ein homologes Gen auch in Gerste erwartet werden. So konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus den Primärblättern der Gerste zwei cDNA-Fragmente isoliert werden, die eine nahezu vollständige Homologie zu der

PCS aus Weizen (*TaPCSI*) zeigen (siehe Kapitel 4.3.1). Die Transkripte dieser für eine putative PCS aus Gerste codierenden Fragmente konnte in Northern Analysen jedoch nicht detektiert werden, wobei die Expression in Primärblättern sowohl unter verschiedenen Entwicklungsstadien, als auch nach Cadmium- und Kupferexposition untersucht wurde. Die mit Hilfe einer sensitiveren semi-quantitativen RT-PCR durchgeführten Untersuchungen deuten auch bei Gerste auf eine konstitutive Genexpression hin (siehe Abb. 23). Ein Vergleich der Transkriptmengen aus Wurzeln und Primärblättern zeigt, dass der mRNA-Gehalt jedoch in Wurzeln wesentlich höher als in Primärblättern ist, diese aber in beiden Organen konstitutiv, das heißt unabhängig von der Schwermetallbehandlung exprimiert werden (siehe Abb. 24). Um diese Aussagen zu verifizieren, ist jedoch eine Analyse der Transkriptmengen mittels quantitativer Real-Time PCR (RTQ-PCR) notwendig.

Die Analyse der PC-Gehalte in Primärblättern nach Exposition mit toxischen Kupfer- und Cadmiumlösungen zeigte, dass PCs in Blättern ausschließlich nach einer Exposition mit Cadmium über einen langen Zeitraum von 120 h gebildet werden (siehe Abb. 25). In Primärblättern von kupferexponierten oder seneszenten Pflanzen konnten keine PCs nachgewiesen werden.

Dabei konnten in den cadmiumexponierten Blättern PC₂ [(γ -Glu-Cys)₂-Gly] und PC₃ [(γ -Glu-Cys)₃-Gly] nachgewiesen werden (siehe Abb. 25). Die chromatographischen Analysen deuten zudem auf mindestens jeweils eine Isoform von PC₂ und PC₃ hin (siehe Abb. 25). Diese möglichen Isoformen konnten - anders als die in höheren Mengen vorkommenden PC₂ und PC₃ - aufgrund der zu geringen Menge an fraktionierten Material allerdings mittels Massenspektrometrie noch nicht bestätigt werden. Arbeiten zur cadmiuminduzierten Expression von Phytochelatinen in Weizen kommen zu einem sehr ähnlichen Ergebnis (McMahon und Anderson 1998). Auch hier kommt es als Reaktion auf eine langanhaltende Exposition (36 Tage) mit verschiedenen Cadmiumkonzentrationen (0,1 – 1,0 mM) zu einer Synthese von PC₂ und PC₃. Dabei sind die Gehalte an PCs in Blättern um das 5-10fache niedriger, als in Wurzeln.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente zur Genexpression der Phytochelatin-Synthase zeigen, dass die Bildung der PCs offenbar nicht auf Transkriptebene, sondern post-

transkriptionell reguliert ist (siehe Abb. 23 und 24). Dies entspricht den Ergebnissen aus *Arabidopsis* (Vatamaniuk et al. 2000). Eine Ausnahme dazu mögen die oben im Text erwähnten Transkriptzunahmen der PCS mRNA bei Weizen bilden.

Durch Aktivitätsmessungen der PCS mit verschiedenen Metallen konnte gezeigt werden, dass Cadmium ein sehr viel stärkerer Induktor der PCS zur Biosynthese von PCs ist als Kupfer (Chen et al. 1997, Ha et al. 1999, Vatamaniuk et al. 2000). Damit wäre es denkbar, dass in Blättern die PCS in geringen Mengen vorliegt und das Enzym nur durch den potenten Aktivator Cadmium induziert wird. Die offensichtlich höheren Transkriptmengen der PCS in Wurzeln von Gerste (siehe Abb. 24), die jedoch nicht differentiell durch Cadmium beeinflusst werden, lassen eine stärkere Abundanz des Enzyms in Wurzeln als in Blättern vermuten.

Die Untersuchungen zu PC-Gehalten in Wurzeln der Gerste nach Cadmiumexposition dauern zu diesem Zeitpunkt noch an. Erste Ergebnisse zeigen aber, dass die Konzentrationen an PCs in Wurzeln nach Cadmiumexposition deutlich höher sind als in Blättern und zudem in Wurzeln ein sehr viel komplexeres Muster aus verschiedenen Homo- und Iso-PCs besteht (Dr. Menge, pers. Mitteilung). Damit ist anzunehmen, dass die Rolle der PCs in Gerste vornehmlich auf die Wurzeln beschränkt ist, so wie es auch für Tomate (Chen et al. 1997) und Weizen (Clemens et al. 1999) gezeigt werden konnte.

Dass Phytochelatine ein wichtiger Detoxifikationsmechanismus vor allem in der Wurzel sind, weniger aber in Blättern eine Rolle spielen, macht Sinn. Der Transport von toxischen Mengen an Metallen von der Wurzel in andere Organe bringt ein hohes Risiko mit sich und würde z.B. für nicht-essentielle Metalle wie Cadmium, die Gefahr von zahlreichen toxischen Prozessen erhöhen. Dieses wird auch dadurch verdeutlicht, dass gemessene Cadmiumkonzentrationen in Wurzeln nach Cadmiumexposition 10-20fach höher als in den Blättern sind (McMahon und Anderson 1998, Sandalio et al. 2001).

Inwieweit die in der Wurzel vorliegenden Cadmium- oder Kupferionen an PCs gebunden und in die Vakuole als Low-Molecular-Weight-Komplexe (LMW) transportiert werden, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. In *Arabidopsis* werden Cd-PC Komplexe in die Vakuole transportiert, wobei der dafür verantwortliche Transporter noch nicht identifiziert werden konnte. Für *Saccharomyces pombe* konnte der Transport von Cd-PC-Komplexen

über einen ATP-abhängigen ABC-Transporter (*HMT1*) in die Vakuole gezeigt werden (Ortiz et al. 1992).

5.5 Metallothioneine

5.5.1 Identifikation / Genexpressionsmuster

Metallothioneine (MTs) sind kleine, cysteinreiche Proteine, die ubiquitär verbreitet sind. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Metallhomöostase und Detoxifikation (Vasak und Hasler 2000, Cobett und Goldsbrough 2002). MTs wurden erstmalig aus Pferdenieren als cadmiumbindende Proteine identifiziert (Margoshes undVallee 1957). Weitere Untersuchungen zeigten, dass es eine Vielzahl von z.T. organ- und gewebespezifischen verschiedenen MTs gibt, die einer unterschiedlichen Genexpression unterliegen (Vasak und Hasler 2000, Cobett und Goldsbrough 2002).

Für Pflanzen sind vier verschiedene Metallothionein-Typen bekannt (Typ 1-4, siehe Abb. 9). Diese einzelnen MT-Typen unterscheiden sowohl in der Länge ihrer Peptidkette von 45-87 Aminosäuren⁵ als auch in einer charakteristischen Anzahl und Verteilung von Cysteinen. Für eine Vielzahl von MT-Typen existieren Isoformen, also MTs, welche die gleiche Peptidlänge und Cysteinanzahl aufweisen, jedoch in einigen Positionen Substitutionen von Aminosäuren aufzeigen. Für bekannte Vertreter der Süßgräser zeigt sich dabei, dass die Anzahl und Verteilung von Cysteinen des jeweiligen MT Typs in dieser Familie streng konserviert sind.

Im Zuge dieser Arbeit konnten mittels Reverser Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) die cDNAs sechs neuer Metallothioneine (MTs) aus Gerste identifiziert werden. Zusammen mit den bereits bekannten Gersten MTs, *Ids-1* (Typ 1), *B22E* (Typ 2) und der aus

⁵ Das MT 2 aus Gerste *B22E* hat eine Peptidlänge von 115 Aminosäuren. Das carboxyterminalen Ende weist einen Rest von 46 aa auf, zudem sich bei keinem anderen bekannten MT 2 aus Pflanzen eine Homologie findet. *B22E* wurde daher in diese Betrachtung nicht hineingenommen.

der Datenbank abgeleiteten Sequenz des EST BQ768005, ergibt sich daraus eine Summe von neun verschiedenen MT cDNAs aus Gerste.

Nach der Klassifizierung pflanzlicher Metallothioneine, die auf die eingeführte Nomenklatur von Robinson et al. (1993) zurückgeht, lassen sich die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der aus Gerste isolierten cDNAs den vier verschiedenen MT-Typen zuordnen. Für Typ 1 MTs konnten vier Isoformen (*HvMT-1a*, *HvMT-1d*, *Ids-1*, EST BQ768005), für Typ 2 drei Isoformen (*HvMT-2a*, *HvMT-2b* and *HvMT-2c*) sowie für Typ 3 (*HvMT-3a*) und Typ 4 (*HvMT-4a*) jeweils ein MT identifiziert werden.

Diese hohe Anzahl von MTs ist bisher für keine andere Pflanzenspezies publiziert worden. Zusammen mit den vier literaturbekannten MTs aus Reis⁶ (*OsMT-1*, *OsMT-2*, *ricMT*, *MTE*) ergibt sich erst nach gezielter Suche von MT cDNAs in Datenbanken eine Anzahl von ebenfalls neun verschiedenen MTs. Für Weizen und Mais sind bisher nur je drei MTs identifiziert worden. Für *Arabidopsis* sind acht² MTs bekannt. Die Verteilung der einzelnen MTs der Süßgräser und der MTs von *Arabidopsis* auf die einzelnen Typen ist jedoch unterschiedlich. Zur leichteren Übersicht ist dieses in Tabelle 5 dargestellt.

MT-Typ (Anzahl)	1	2	3	4
<i>Hordeum vulgare</i>	4	3	1	1
<i>Oryza sativa</i>	2	4	2	1
<i>Triticum aestivum</i>	1	-	1	1
<i>Zea mays</i>	1	1	-	1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	3*	2	1	2

Tab. 5 Anzahl und Verteilung der MT-Typen ausgesuchter Poaceen und *Arabidopsis*. Die Protein-Identifikationsnummern sind in Tabelle 1 des Ergebnisteils, bzw. in Tabelle 6 der Diskussion aufgeführt. **Arabidopsis MT1b* wird vermutlich nicht translatiert (Hernandez et al. 1998). *Hordeum vulgare* (Gerste), *Oryza sativa* (Reis), *Triticum aestivum* (Weizen), *Zea mays* (Mais).

⁶ Zu Protein-Identifikationsnummern und zitierten Arbeiten siehe Tab. 6 im Diskussionsteil.

² Bei einem achtem MT aus *Arabidopsis thaliana MT1b* handelt es sich vermutlich um ein Pseudogen, welches nicht translatiert wird.

Die hohe Anzahl von verschiedenen MTs wirft die Frage auf, wo und wann diese exprimiert werden und welche Funktion sie haben könnten. Sowohl Daten aus der Literatur als auch die Expressionsanalysen dieser Arbeit zeigen, dass jedes MT einer eigenen, spezifischen Regulation der Genexpression unterliegt. Eine verallgemeinernde Aussage bezüglich der Expressionsmuster der verschiedenen MTs auf der Basis der bekannten Literatur lässt sich aber kaum treffen, da die verschiedenen Untersuchungen unter ganz unterschiedlichen Versuchsbedingungen durchgeführt wurden.

Auch die vorliegenden Experimente zeigen, dass z.B. die Reaktion auf Schwermetallstress stark abhängig von Dauer und Konzentration der verwendeten Metalle ist. So lässt sich *HvMT-2a* mRNA nach einer 48 h Exposition mit 1 mM CuCl₂ in Primärblättern in hohem Maße nachweisen, während bei einer Exposition mit 2,5 mM CuCl₂-Lösungen nach 48 h das Transkript nicht mehr detektierbar ist (siehe Abb. 13). Somit können Expressionsmuster sowohl während des Schwermetallstresses als auch Untersuchungen zur Genexpression während der Blattseneszenz nur bedingt miteinander verglichen werden, da, wenn überhaupt, oft keine einheitlichen Marker zur Charakterisierung der Blattseneszenz und des Schwermetallstresses verwendet wurden.

Dennoch lassen sich aus bekannten Literaturdaten und den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten Aussagen bezüglich der Expression der verschiedenen MT-Gentypen ableiten. In der Literatur wird diskutiert, dass Typ 1 MTs vorwiegend in Wurzeln, Typ 2 MTs vornehmlich in Blättern, Typ 3 in Früchten und Typ 4 MTs während der Embryonalentwicklung exprimiert werden (siehe dazu Cobett und Goldsbrough 2002). Doch schon bei genauer Betrachtung der bereits publizierten Expressionsmuster in verschiedenen pflanzlichen Spezies zeigt sich, dass dieses einfache Bild nicht pauschalisiert werden kann.

5.5.1.1 Typ 1 Metallothioneine

Wie auch *HvMT-1a* werden eine Vielzahl Typ 1 MTs auch oder sogar nur in Blättern exprimiert (z.B. Reis *OsMT-1*, Hsieh et al. 1995; Weizen *Wali1*, Snowden et al. 1993; Rotschwingel *mcMT*, Ma et al. 2003; Raps *LSC54*, Buchanan-Wollaston und Ainsworth 1997; *Arabidopsis MT1a* Hernandez et al. 1998, Guo et al. 2003).

Allgemein gültig für Typ 1 MTs ist, dass die Genexpression unter Stressbedingungen zunimmt. Eine Vielzahl von Typ 1 MTs werden in der Regel durch toxische Konzentrationen von Schwermetallen exprimiert (Reis *OsMT-1*, Hsieh et al. 1995; Weizen *Wali1*, Snowden et al. 1993; Rotschwingel *mcMT*, Ma et al. 2003; *Arabidopsis MT1a*, Zhou und Goldsbrough 1994, Guo et al. 2003). Zudem wurde die Genexpression von Typ 1 MTs während der natürlichen Blattseneszenz in einer Reihe von Pflanzen beschrieben (Reis *OsMT-1*, Hsieh et al. 1995; Raps *LSC54*, Buchanan-Wollaston und Ainsworth 1997; Ackerbohne *MT1a*, Foley et al. 1997; *Arabidopsis MT1a*, Hernandez et al. 1998, Guo et al. 2003). Aber auch Stressfaktoren wie Glukosemangel (Mais *MT1*, Chevalier et al. 1995) oder der Mangel an Eisen (Gerste *Ids-1*, Okumura et al. 1991) führen zu einer Genexpression von Typ 1 MTs.

Entsprechend zeigt das in dieser Arbeit identifizierte Typ 1 MT *HvMT-1a* in Blättern unter Kupfer-, Cadmium- und Zinkstress eine deutlich verstärkte Genexpression. Doch untypisch für MTs des Typ 1 lässt sich die mRNA von *HvMT-1a* nicht in Wurzeln nachweisen (siehe Abb. 14). Interessanterweise wird das nahezu identische Homolog (97 % Homologie) zu *HvMT-1a* aus Weizen (*Wali1*) sowohl in Blättern als auch Wurzeln durch Exposition mit Aluminium exprimiert, nicht aber durch die Exposition mit Cadmium (Snowden und Gardner 1993). Die Diskrepanz in der Genexpression trotz der hohen Homologie spricht dafür, dass es Unterschiede in den Regulationsmechanismen gibt, was z.B. in einer unterschiedlichen Struktur des Promotors begründet sein könnte.

Genauere Untersuchungen der Genexpression von *HvMT-1a* unter Cadmiumbehandlung (1 mM) zeigten, dass es nach 24 h zu einer starken Zunahme des Transkriptes kommt, die nach 72 h Exposition mit Cadmium ein anhaltendes Maximum erreicht (siehe Abb. 15c).

Eine Erhöhung der toxischen Kupferkonzentration von 1,0 mM auf 2,5 mM bei gleichbleibender Expositionsdauer von 48 h führt bei *HvMT-1a* zu einer gleichbleibend hohen Genexpression, während eine gleichartige Behandlung mit hohen Schwermetallkonzentrationen bei anderen MTs (*HvMT-2a*) dagegen zu einer Repression führt (siehe Abb. 11 und 13). Dieses Expressionsverhalten von *HvMT-1a* spricht daher für eine mögliche Rolle unter Stressbedingungen.

Die Untersuchung von *HvMT-1a* während der Blattseneszenz zeigt, dass es schon ab den frühen Phasen der Seneszenz (21 Tage nach Aussaat) zu einer Zunahme dieses Transkriptes in den Primärblättern kommt. In der späten Phase dieses letzten Entwicklungsschrittes (39 Tage nach Aussaat) nimmt die Genexpression von *HvMT-1a* weiter zu. Beide Stadien, sowohl das frühe als auch das späte Stadium der Blattseneszenz, sind durch einen sukzessiven Abbau von Makromolekülen gekennzeichnet (Miersch et al. 2000). Durch den Abbau von metallhaltigen Proteinen kommt es zu einer Freisetzung von Metallen (beispielsweise Kupfer aus dem Plastocyanin des Chloroplasts) und zum Transport dieser Metalle aus seneszentem Gewebe in andere Teile der Pflanze (Himmelblau und Amasino 2000; Mauk und Noodén 1992; Drossopoulos et al. 1994, 1996; Hocking 1994).

Transkripte des bekannten Gersten MT *Ids-1* ließen sich in Blättern unter Schwermetallstress nicht nachweisen. Doch auch das reife Transkript, welches unter Eisenmangel in Wurzeln exprimiert wird (Okumura et al. 1991), konnte unter toxischen Mengen an Cadmium in Wurzeln nicht detektiert werden. Mittels RT-PCR lies sich nur die unreife prä-mRNA von *Ids-1* nachweisen (siehe Abb. 14). In Blättern sind Transkripte dieses Typ 1 MTs in Northern Analysen weder während des Schwermetallstresses, noch unter Metallmangel, noch während der Blattseneszenz nachzuweisen. Die Rolle von *Ids-1* ist damit auf die Wurzel beschränkt, während sich die Expression von *HvMT-1a* eindeutig auf das Blatt reduziert.

Eine Isoform von *Ids-1*, *HvMT-1d* wurde als schwach amplifiziertes PCR-Produkt aus cadmiumgestressten Wurzeln isoliert und konnte nach Klonierung und Reamplifikation identifiziert werden. Die Rolle von *HvMT-1d* ist derzeit noch unklar, jedoch lässt die geringe Menge an amplifizierter cDNA während der RT-PCR auf eine nur geringe Abundanz dieses Transkriptes schließen.

Ein Sequenzvergleich auf Proteinebene von mono- und dikotyledonen MTs des Typ 1 zeigt, dass die dikotyledonen MT 1 *LSC54* aus *Brassica napus* sowie *Arabidopsis MT1a* und *MT1c* zwar eine große Homologie zueinander aufweisen, aber deutlich von den Typ 1 MTs der Süßgräser wie Weizen *Wali1* oder Gerste *HvMT-1a* abweichen (Abb. 31).

Die Typ 1 MTs der monokotyledonen Süßgräser haben eine Länge von 74-75 Aminosäuren und weisen N- und C-Terminal je sechs Cysteine auf. Die MT Typ 1 der dikotyledonen

Pflanzen *Arabidopsis* und *Brassica* hingegen haben eine Länge von 45 Aminosäuren. Zusätzlich weisen sie zu den je sechs amino- und carboxyterminalen Cysteinen noch ein weiteres Cystein im sogenannten *Spacer*, also dem verbindenden Peptidteil, auf. Durch weiterführende Analysen muss geklärt werden, inwieweit die verschiedenen Typ 1 MTs ähnliche Funktionen und Regulationsmechanismen aufweisen, oder ob diese MT-Klasse noch weiter in Untergruppen mit unterschiedlichen Charakteristika aufzuteilen ist.

```

HvMT-1a MS---CNCGSGCSCGSDCKCGKMYPDLTEQGSATAQVAAVUULGMAPEN-KAGQFEVAAGQSGEGCSCGDNCKC-NPENC
T.a. Wal11 MS---CNCGSGCSCGSDCKCGKMYPDLTEQGSAAAQVAAVUULGVAPEN-KAGQFEVAAGQSGEGCSCGDNCKC-NPENC
A.t. MT1a MADSNCGCGSSCKCGDSCSCEKN-----Y---NKEEDN-----CSCGSNCSGSSNENC
A.t. MT1c MAGSNCGCGSSCKCGDSCSCEKN-----Y---NKEEDN-----CSCGSNCSGSSNENC
B.n. LSC54 MAGSNCGCGSGCKCGDSCSCEKN-----Y---NTEEDS-----CSCGSNCSGDSNENC
V.f. MT1a MSG--CGCGSSCNCGDSCKCNKRSSGLSYSEMETKETKETVVLGFGPAKIHFDGAEMSVASKEEGCKCGDKTCDPENC
    
```

Abb. 31 Sequenzvergleich der translatierten Aminosäuren verschiedener Typ 1 MTs. H.v. – *Hordeum vulgare*, T.a. – *Triticum aestivum*, A.t. – *Arabidopsis thaliana*, B.n. – *Brassica napus*, V.f.- *Vicia faba*. Cysteinreste sind rot hervorgehoben. Die Typ 1 MTs der dikotyledonen Pflanzen *Arabidopsis* und *Brassica* zeigen einen zusätzlichen Cysteinrest.

Eine Gemeinsamkeit aller Typ 1 MTs ist die Induktion unter verschiedenen Stressbedingungen. Über die zugrundeliegende Signalkette ist allerdings bis jetzt kaum etwas bekannt. Ein mögliches Signal wäre oxidativer Stress als ein gemeinsames Signal für die verschiedenen Stressoren (Schwermetalle, Hitze, Glukosemangel) und der Blattseneszenz. Das seneszenzinduzierte Typ 1 MT *LSC54* aus Raps (*Brassica napus*) wurde bereits bezüglich der Rolle von oxidativem Stress bei der Induktion untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Hemmung der in die ROS-Detoxifikation involvierten Katalase⁷, als auch die Induktion von ROS⁸ zu einer starken Genexpression von *LSC54* führt (Navabpour et al. 2003).

⁷ Zur Hemmung der Katalase wurde 3-Amino-1,2,4-Triazol verwendet.

⁸ Die Induktion von ROS wurde durch Exposition der Pflanzen mit Silbernitrat erreicht.

5.5.1.2 Typ 2 Metallothioneine

Ein von Typ 1 MTs in Blättern abweichendes Expressionsmuster zeigen Typ 2 MTs. Während Typ 1 MTs unter Stressbedingungen exprimiert werden, zeigen Typ 2 MTs i.d.R. einen gleichbleibenden oder sinkenden Transkriptgehalt während des Metallstresses bzw. während der Blattseneszenz. Dieses Expressionsmuster deutet darauf hin, dass die Typ 2 MTs nicht spezifisch unter Stressbedingungen exprimiert werden, wie es für Komponenten der Detoxifikation von Schwermetallen zu erwarten wäre, sondern eher in die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase involviert sein könnten.

Beispiele für abnehmende Transkriptgehalte von Typ 2 MTs unter hohen Mengen von Kupfer zeigen die MTs der Süßgräser aus Reis *OsMT-2* (Hsieh et al. 1996) und Gerste *HvMT-2a* (siehe Abb. 13). Auch andere Metalle führen zu einer Genrepression von Typ 2 MTs. So zeigt Gerste *HvMT-2b* unter Cadmiumexposition eine drastische Abnahme im Transkriptgehalt (siehe Abb. 11). Bei *HvMT-2a* führt auch eine Exposition mit Nickel zu einer Repression. Dabei stellt sich die Frage, ob Nickel und Kupfer ein gemeinsames Signal einer wie auch immer gearteten Signalkette auslösen. Grund für diese Annahme ist die Feststellung, dass sowohl Nickel und hohe Mengen Kupfer zu einer Repression bei *HvMT-2a* führen (siehe Abb. 13 und 16), zugleich Nickel- und Kupferexposition zu einer Repression des Typ 3 MT *HvMT-3a* führt (siehe Abb. 16), für das gezeigt werden konnte, dass dieses bei Kupfermangel exprimiert wird (siehe Abb. 11 und 12). Die Befunde in dieser Arbeit zeigen also, dass Nickel und Kupfer im Gegensatz zu den anderen untersuchten Metallen gleichartige Antworten hervorrufen.

Die äußerst hohe Abundanz von *HvMT-2a* Transkripten in Blättern ist auch für das homologe MT aus Reis *MTE* (AAB18814) bekannt. Wie durch eine serielle Analyse der Genexpression (SAGE) in etiolierten Reiskeimlingen festgestellt wurde, machen die *MTE* Transkripte sogar 1,5 % des gesamten Transkriptoms aus (Matsumura et al. 1999). Damit zeigt sich, dass dieses Typ 2 MT, wenn die ansonsten dominanten Transkripte von Photosynthesegenen nicht gebildet werden, eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. Zahlreiche Komponenten der Zelle, wie zinkabhängige Transkriptionsfaktoren, Komponenten der mitochondrialen Atmungskette

oder in Blättern Proteine des Photosyntheseapparates, sind auf eine Versorgung mit verschiedenen Metallen wie Kupfer, Zink oder Eisen angewiesen. Diese Versorgung bedarf einer gezielten Metallaufnahme, temporärer Speicherung und ebenso gezielter Distribution, für die MTs als wichtige Faktoren diskutiert werden (Vasak und Hasler 2000, Guo et al. 2003). Die starke Expression von *HvMT-2a* unter Normalbedingungen könnte auch darauf hinweisen, dass dieses MT bei den erwähnten Prozessen eine Rolle spielt.

HvMT-2a wird während frühen (21 Tage nach Aussaat) und späten Phasen (39 Tage nach Aussaat) der Blattseneszenz weiterhin stark exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass die Genrepression von *HvMT-2a* bei Zugabe von Schwermetallen wie Kupfer und Zink über eine Signalkette erfolgt, die bei der Blattseneszenz offenbar keine Rolle spielt. Da es während der Blattseneszenz zur Akkumulation von ROS kommt (Navabpour et al. 2003), scheiden diese als Signal aus. Vergleichbare Untersuchungen zu homologen MT 2 Genen aus *Zea mays* und *Poa secunda* wurden nicht durchgeführt. Das MT 2 aus Mais wird während der Embryogenese exprimiert (Carbonnel-Campaa et al. 2000), für das MT 2 aus *Poa secunda* besteht nur der Eintrag der cDNA-Sequenz in der Datenbank zur Verfügung (AAK38824), Expressionsmuster wurden bis zu diesem Zeitpunkt nicht publiziert.

Im Gegensatz zu den Typ 1 MTs, zeigen die abgeleiteten Peptidsequenzen der dikotyledonen Typ 2 MTs eine große Ähnlichkeit zu den monokotyledonen Vertretern der Süßgräser, die dem Gerste Typ 2b entsprechen (Abb. 32). Die Expressionsmuster hingegen zeigen nur zum Teil Ähnlichkeiten zu den in dieser Arbeit identifizierten Typ 2 MTs. Das Typ 2 MT *Arabidopsis MT2a* (Zhou und Goldsbrough 1994; Murphy und Taiz 1995, Guo et al. 2003) und das MT Typ 2 der Lichtnelke (*Silene vulgaris*) *SvMT2b* (van Hoof et al. 2001) werden unter Kupferstress stärker exprimiert, während die Transkripte des MT 2 aus Tabak (*Nicotiana glutinosa*) (Choi et al. 1996) wie auch von Gerste *HvMT-2a* durch hohe Konzentrationen an Kupfer herunterreguliert werden.

Die mRNA des Typ 2 MTs der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) *LEMT1* nimmt wie *HvMT-2a* unter Eisenexposition zu (Giritch et al. 1998). Dieses ist besonders bemerkenswert, denn für Metallothioneine sind cadmium-, kupfer- und zinkbindene Eigenschaften gezeigt worden (siehe dazu Vasak und Hasler 2000), jedoch sind bisher keine eisenbindenden Eigenschaften bekannt. Für die Eisendistribution der Zelle werden wahrscheinlich eigene Wege beschritten

(siehe dazu Freitas et al. 2003), wobei Nicotianamin ein Faktor ist, der zumindest für die Versorgung der Zelle mit Eisen diskutiert wird (Stephan und Scholz 1993). Um eine mögliche Rolle von MTs in die Eisenhomöostase zu untersuchen, wären gezielte Metallbindesstudien notwendig.

```

HvMT-2a  MSCCGGNCGGSGCKKCGNGCGGCKMYPEU---EAGA---T-LLVAAAATHKAS---SGGHEMAAE---NGGCGTQKCGTS-CGSCSC
HvMT-2b  MSCCGGNCGGSGCKKCGNGCGGCKMYPGMD---EGUSTTATSSQALUMGVAPSKGN---GPSFE-----AAAENGCGCKGPNCTEMPCTCK
A.t. MT2a MSCCGGNCGGSGCKKCGNGCGGCKMYPDLGFSGET-TT---TETFULGVAP&-H---KNQYASGE--SN-NAENDACKGSDC-KKDPCTCK
A.t. MT2b MSCCGGNCGGSGCKKCGNGCGGCKRYPDL---EN-TA---TETLULGVAP&-M---NSQYASGE--TF-UAENDACKGSDC-KKMPCTCK
B.n. MT2  MSCCGGNCGGSGCKKCGNGCGGCKMYPDLGFSGES-TT---TETFULGVAP&-H---KNQYASGE--G--VAENDRCKGSDC-KKDPCTCK
V.f. MT2  MSCCGGNCGGSGCKKCGNGCGGCKMYADLSYT-ES-TT---SETLIMGVG-S-E---KAQYSAEM--G---AENDGCKGANC-TEMPCTCK
L.e. LEMT1 MSCCGGNCGGSGCKKCGNGCGGCKMYPDMSYT-ESSTT---TETLULGVG-P-E---KTSFGAMEM--GESPVAENGCKGSDC-KKMPCTCK
    
```

Abb. 32 Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Typ 2 MTs. H.v. – *Hordeum vulgare*, A.t. – *Arabidopsis thaliana*, B.n. – *Brassica napus*, V.f. – *Vicia faba*, L.e. – *Lycopersicon esculentum*. Cysteinreste sind rot hinterlegt. *HvMT-2a* weist (wie Reis *MTE*, siehe Abb. 6) im Vergleich zu dikotyledonen MTs drei zusätzliche Cysteinreste auf.

Die Typ 2 MTs der dikotyledonen Pflanzen *Arabidopsis MT2b* (Hernandez et al. 1998, Guo et al. 2003), Raps *LSC 210* (Buchanan-Wollaston und Ainsworth 1997) und Saubohne (*Vicia faba*) *MT 2* (Foley et al. 1997) zeigen eine zunehmende oder gleichbleibend hohe Genexpression während der Blattseneszenz, wie es auch für das MT Typ 2 der monokotyledonen Gerste *HvMT-2a* gezeigt werden konnte (siehe Abb. 11). Damit könnten Typ 2 MTs auch in Prozesse der Blattseneszenz involviert sein, werden allerdings nicht spezifisch während dieser Stresssituation exprimiert. Eine mögliche Rolle dieser MTs bei der Blattseneszenz ist aber noch zu beweisen.

5.5.1.3 Typ 3 Metallothioneine

In Süßgräsern wurden bisher noch keine Untersuchungen der Genexpression von Typ 3 MTs durchgeführt. Bekannte Studien gibt es aus Früchten, wo es während der Fruchtreife zu einer Akkumulation der MT 3 mRNA kommt (Kiwi, *Actinidia deliciosa*, Ledger und Gardner 1994; Banane, *Musa paradisiaca*, Clendennen und May 1997; Apfel, *Malus domestica*, Reid und Gross 1997). In der gleichen Analyse wie für Typ 2 MTs beschrieben, konnte die mRNA eines

Typ 3 MTs jedoch als dritthäufigstes Transkript in fünf Tage alten, etiolierten Reiskeimlingen identifiziert werden (Matsumura et al. 1999), was wiederum zeigt, dass auch dieses MT eine wichtige Funktion besitzen könnte. Allerdings finden sich in der Literatur keine weitere Angaben zur Expression des Reis MT 3.

Für Typ 3 MTs sind zur Genexpression in Blättern nur Arbeiten in *Arabidopsis* publiziert. Diese zeigen, dass *Arabidopsis MT3* in jungen und reifen Blättern konstitutiv, in seneszenten Blättern und unter Kupferstress erhöht exprimiert werden (Guo et al. 2003). Die aus Datenbanken abgeleiteten Proteinsequenzen von Reis und Weizen der Typ 3 MTs sowie das in dieser Arbeit isolierte MT aus Gerste (*HvMT-3a*) unterscheiden sich von *Arabidopsis MT3* durch zwei zusätzliche Cysteinreste im carboxyterminalen Teil (Abb. 33). Aussagen zur Genexpression dieser Süßgräser können aber nur für *HvMT-3a* gemacht werden, da, wie erwähnt, andere Arbeiten nicht bestehen.

Northern Analysen mit *HvMT-3a* zeigen, dass das Gen in jungen, reifen und seneszenten Blättern konstitutiv exprimiert wird (siehe Abb. 11). Eine Erhöhung der Genexpression erfolgt nicht wie bei *Arabidopsis* unter Kupferstress, sondern unter Kupfermangel (siehe Abb. 11 und 12). Eine Zugabe von 0,5 µM Kupfer in Kupfermangellösungen von 10 Tage alten Gerstenkeimlingen und Inkubation für 48 h führt zur Abnahme des Transkriptes in Primärblättern auf das Niveau von nicht kupferdefizitären Pflanzen (siehe Abb. 12). Interessanterweise führt auch Nickel zu einer Repression des Gens. Eine Erklärung hierfür kann aus den experimentellen Daten nicht gezogen werden.

Vielleicht führen zukünftige Studien von z.B. Reis oder Weizen Typ 3 MTs zu eindeutigeren Aussagen über die Rolle dieser MTs in Blättern.

```

HvMT-3a  MADKCGMDCADKTQCVKKGDSYGIVMVDTEKSH---LEVQETAENDGK---CKCGTSCSTINCTDGH
T.a. (EST) MADKCGMDCADKTQCVKKGDSYGIVMVDTEKSH---FEVQEAAENDGK---CKCGASCTEINCTDGH
O.s. MT3  MSDKCGMDCADKSQCCKGTSYGVVVLVDAEKTTSKMLRRSATKKTGG---CKCTTGCSGAGCNDGK
A.t. MT3  MSSNCGSDCADKTQCVKKGTSYTFDIVETQESYKEAMIMDVGAEENNAKCKCKGSSCSVNCIDCPN
    
```

Abb. 33 Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Typ 3 MTs. H.v. – *Hordeum vulgare*, T.a. *Triticum aestivum*, O.s. *Oryza sativa*, A.t. – *Arabidopsis thaliana*, Cysteinreste sind rot hinterlegt. Im Gegensatz zu den Typ 3 MTs der Poaceen, weist *Arabidopsis MT3* zwei zusätzliche Cysteinreste im carboxyterminalen Teil des Peptides auf.

5.5.1.4 Typ 4 Metallothioneine

Über die Expression von Typ 4 MT Genen ist wenig bekannt, obwohl dieser Typ als erstes pflanzliches MT 1983 (von den Autoren als „early cysteine-labelled protein - *E_c*-protein“ bezeichnet) von Hanley-Bowdin und Lane isoliert und als zinkhaltiges Protein beschrieben (Lane et al. 1987) wurde. Genexpressionsanalysen zeigten, dass Transkripte der *E_c* mRNA nur während der Embryonalentwicklung nachzuweisen sind, nicht aber in Keimlingen detektiert werden können (Kawashima et al. 1992). Auch durch exogen appliziertes Zink kommt es zu keiner gesteigerten Expression des Gens (Kawashima et al. 1992).

Aus anderen Süßgräsern sind nur MT 4 Homologe in Form von ESTs aus Reis bekannt (siehe Tab. 6), Arbeiten dazu sind nicht publiziert. In *Arabidopsis* sind die Transkripte zweier Typ 4 MTs, *MT4a* und *MT4b*, ausschließlich in Samen nachweisbar. In Blättern und Wurzeln zeigen Northern Analysen keine detektierbaren Mengen an *MT4* Transkripten (Guo et al. 2003).

Die Annahme, dass das Typ 4 MT aus Weizen (*E_c*) während der Embryonalentwicklung an der Insertion („Einbau“) von Metallen in Metalloapoproteine beteiligt ist (Lane et al. 1987, Kawashima et al. 1992), führte zu der Überlegung, dass dieses MT auch während der Freisetzung („Ausbau“) von Metallen während der Blattseneszenz (siehe Kapitel 5.1) eine Rolle spielen könnte. Daher wurde in dieser Arbeit versucht, eine der dem Weizen *E_c* homologe mRNA in seneszenten Gerstenblättern (39 Tage) nachzuweisen. Mittels RT-PCR konnte eine cDNA aus 39 d altem Blattmaterial amplifiziert werden, welche als *HvMT-4a* bezeichnet, eine 89 %ige Homologie zu dem Weizen *E_c* zeigt. Transkripte von *HvMT-4a* konnten jedoch weder nach Schwermetallstress (Cu, Cd, Ni, Fe, Al, Zn), noch während der Blattseneszenz durch Northern Analysen detektiert werden, was auf einen geringen Transkriptgehalt schließen lässt. Mittels der sehr viel sensitiveren RT-PCR konnte die cDNA allerdings eindeutig aus seneszenten, nicht aber aus jungen, 4 d alten Primärblättern, isoliert werden (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass *HvMT-4a* vielleicht eine Rolle während der Blattseneszenz und der damit verbundenen Freisetzung von Metallen eine Rolle spielt. Andererseits könnten geringe Transkriptmengen auf niedrige Proteinmengen deuten, was wiederum dafür sprechen würde, dass dieses MT nicht an der allgemeinen Aufnahme der freigesetzten Metalle beteiligt ist, sondern eine eher spezifische Funktion ausübt. Zur Klärung

dieser offenen Fragen wären weitere Untersuchungen auf Proteinebene bzw. genetische Ansätze wie *knock-out* Mutanten vonnöten.

Für Weizen *E_c* wurde in der 5'-flankierenden Region ein mit Abscisinsäure (ABA) interagierendes Element (ABA-responsive Element, ABRE) identifiziert. Untersuchungen mit diesem MT Typ 4 zeigten, dass die Genexpression durch Zugabe von ABA gesteigert werden konnte (Kawashima et al. 1992).

In Blättern wird ABA unter anderem durch osmotischen Stress induziert, welcher auch in den späten Phasen der Blattseneszenz auftritt. In nachfolgenden Arbeiten sollte daher eine mögliche Induktion von *HvMT-4a* durch die exogene Applikation von ABA untersucht werden.

Nur bei MTs des Typs 4 ist die Anzahl und Verteilung von Cysteinen bei den monokotyledonen Poaceen und dikotyledonen Pflanzen wie beispielsweise der Sojabohne (*Glycine maxium*) oder *Arabidopsis* vollkommen gleich. Unterschiedlich sind jedoch auch hier die Länge der cysteinfreien Bereiche (Abb. 34).

```

HvMT-4a      MG-----CDDKCG-CAVFCPPGGTGCRRTSARSGA---E-HTTACGGEHCGGNPCACGREGTPSGRENRRRNCSGGAACNCSGSS-TA
T.a. Ec      MG-----CDDKCG-CAVFCPPGGTGCRRTSARSGAAAGE-HTTACGGEHCGGNPCACGREGTPSGRANRRRANCSGGAACNCSGSSATA
Z.m. Ec-like MG-----CDDKCG-CAVFCPPGGKDCRRTSAGSGGQR--E-HTTACGGEHCGGNPCACGREGTPSGRANRRRANCSGGAACNCSGSSATA
G.m. Ec-like MADTSGGDVAVRPVVICDNKCG-CTVPCCTGGSTCRRTSVGMTTGGGN-HVTSCGGEHCGGNPCACGREGTPSGRANRRRANCSGGAACNCSGSSATA
G.m. Ec-like 2 MADTGGGDVAVRPVVICDNKCG-CTLPCCTGGSTCRRTSAGTATGGGD-HVTSCGGEHCGGNPCACGREGTPSGRANRRRANCSGGAACNCSGSSATA
A.t. MT4a    MADTGKGSVAVG---CNDSCG-CPSPCPGGNSCRGRMR-EASAGDQGHMVCPGGEHCGGNPCACGREGTPSGRANRRRANCSGGAACNCSGSSATA
A.t. MT4b    MADTGKGSASAS---CNDRCG-CPSPCPGGESCRKMMSEASGGDQEHHTVCPGGEHCGGNPCACGREGTPSGRANRRRANCSGGAACNCSGSSATA
    
```

Abb. 34 Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Typ 4 MTs. H.v. – *Hordeum vulgare*, T.a. – *Triticum aestivum*, Z.m. – *Zea mays*, G.m. – *Glycine max*, A.t. – *Arabidopsis thaliana*, Cysteinreste sind rot hinterlegt. Die Anzahl und Verteilung von Cysteinen des Typ 4 sind sowohl bei den Vertretern der Süßgräser als auch bei *Glycine* und *Arabidopsis* gleich.

5.5.2 Metallothioneine: Klassifizierung und Nomenklatur

Die Sequenzvergleiche von Peptiden der MTs aus Poaceen mit *Arabidopsis* und anderen Vertretern dikotyledoner Pflanzen (siehe Abb. 9 und 31-34) zeigt, dass sich die Anzahl von Cysteinen und die Peptidlänge zum Teil deutlich unterscheiden. Die bisher verwendete Nomenklatur der pflanzlichen MTs, die auf eine Klassifizierung durch Robison et al. (1993) zurückgeht und von Cobbett und Goldsbrough erweitert (2000, 2002) und als weiterhin gültig vorgeschlagen wurde, teilt die pflanzlichen MTs in vier Typen ein und übergeht diese Abweichungen. Obwohl die verwendete MT-Klassifizierung sehr einfach ist (weshalb sich die kompliziertere Nomenklatur von Binz und Kägi (1999) bis dato wahrscheinlich nicht hat durchsetzen können), zeigt sie in sich Ungenauigkeiten und kann neu-identifizierte MTs zum Teil in dieses System nicht aufnehmen.

Dieses wird bei der Klassifizierung der Typ 2 MTs der Süßgräser deutlich. Die homologen MTs der Süßgräser, wie beispielsweise Reis *OsMT-2* und Gerste *HvMT-2b*, zu *Arabidopsis MT2a* und *MT2b* ließen sich anhand dieser Nomenklatur als Typ MT-2a und bei Auftreten von Isoformen (gleiche Peptidlänge, gleiche Anzahl an Cysteinen, Austausch einiger weniger Aminosäuren) mit MT-2b, MT-2c usw. klassifizieren. Doch anders als bei *Arabidopsis* gibt es bei Süßgräsern weitere Formen, welche die Charakteristika von Typ 2 MTs aufweisen, sich aber durch zusätzliche Cysteinreste von *Arabidopsis MT2a/2b* deutlich unterscheiden. Als Beispiele sind zu nennen: Gerste *HvMT-2a* und B22E, Reis *MTE* und *ricMT* sowie das Reis MT mit der Protein-Identifikationsnummer AAB70545.

Tabelle 6 stellt noch einmal die verschiedenen MTs aus Reis, *Arabidopsis* und Gerste zusammen, verweist auf die untersuchte Genexpression in Blättern und ordnet diese MTs zugleich nach einem sehr einfach, doch überschaubaren Kriterium, nämlich der Anzahl von Cysteinen in den Cysteindomänen. So werden die verschiedenen Typ 2 MTs in drei Formen eingeteilt: 8/9 (z.B. *HvMT-2a*), 8/6 (z.B. *OsMT-2*) und 8/4 (z.B. *B22E*).

Anzahl der Cysteine	Arabidopsis		Gerste		Reis		Kennzeichen	Genexpression in Blättern
	MT-Typ	Gen	MT-Typ	Gen	MT-Typ	Gen		
MT (4/6)	-	-	3a	<i>HvMT-3a</i> ¹	-	Os MT (AAB53811), Os MT (AAB65698)	-	¹ Expression bei Cu-Mangel
MT (4/8)	3	<i>MT 3</i>	-	-	-	-	C-Terminal Cys-Cys	konstitutiv, leicht erhöht unter Cu-Stress und Blattseneszenz
MT (6/6)	-	-	1a	<i>HvMT-1a</i> ¹ , <i>ids-1</i> , <i>HvMT-1d</i> , EST (BQ766316)	1	<i>OsMT-1</i> ² , Os MT (AAB70546)	-	^{1,2} Expression während der Seneszenz; Expression bei ^{1,2} Cu, ^{1,2} Cd, ^{1,2} Zn
MT (6/11/6)	1	<i>MT 1a</i> ¹ , <i>1c</i> <i>MT 1b</i> *	-	-	-	-	Cys im Spacer -	¹ Expression während der Seneszenz; Expression bei ¹ Cd, ¹ Zn, ¹ Cu
MT (6/6/5)	4	<i>MT 4a</i> ¹ , <i>4b</i> ²	4a	<i>HvMT-4a</i>	-	Os MT (AAG13588)	3 Cys- Domänen	^{1,2} auf Samen beschränkt in Weizen Expression während der Embryogenese
MT (8/4)	-	-	2c	<i>B22E</i>	-	-	N-Terminal Cys-Cys	nicht untersucht, Expression während der Embryogenese
MT (8/6)	2	<i>MT 2a</i> ¹ , <i>2b</i> ²	2b	<i>HvMT-2b</i> ³	2	<i>OsMT-2</i> ⁴	N-Terminal Cys-Cys	^{1,2,3} konstitutiv, ¹ Expression bei Cu, Cd, Zn ³ Repression bei Cd ^{1,2} Zunahme bei Seneszenz
MT (8/9)	-	-	2a	<i>HvMT-2a</i> ¹	2	<i>MTE</i> ² , <i>ricMT</i> ³ , Os MT ⁴ (AAB70545)	N+C- Terminal Cys-Cys	¹ konstitutiv, erhöht bei Zn, Fe, Al, Repression bei Ni und hohen Cu-Mengen ^{2,4} nicht untersucht ³ in Blättern konstitutiv, im Stamm erhöht bei Cu, Zn, Cd, Fe, Pb, Al

Tab. 6 Cystein Domänen der verschiedenen *Arabidopsis*, Reis und Gerste MTs und deren Genexpression in Blättern. *Arabidopsis*: *MT1a*, *MT1b** Homolog zu EST N38326, *MT1c*, *MT2a*, *MT2b*, *MT2c*, (Zhou und Goldsbrough, 1994, 1995; Hernandez et al. 1998, Guo et al. 2003); *MT3*, *MT4a*, *MT4b* (Guo et al. 2003). Reis: *OsMT-1*, Hsieh et al. (1995); *OsMT-2*, Hsieh et al. (1996); *ricMT*, Yu et al. (1998); *MTE* (AAB18814). Gerste: *B22E*, Klemsdal et al. (1991), *Ids-1*, Okumura et al. (1991), *HvMT-1a*, *HvMT-1d*, *HvMT-2a*, *HvMT-2b*, *HvMT-3a*, *HvMT-4a* (diese Arbeit)

Inwieweit diese weitere Unterteilung notwendig sein wird, muss die Zukunft zeigen. Sicher ist, dass die Anzahl an identifizierten MTs aus Pflanzen weiter zunehmen wird. So sind beispielsweise aus Weizen bisher nur drei MTs bekannt, bzw. nach eigener Recherche in Datenbanken identifiziert worden. Es bleibt abzuwarten, ob dann ein einfaches Klassifizierungssystem wie das bisher verwendete (Typ 1-4) mit seinen Schwächen ausreicht, oder ob ein genaueres wie das in dieser Arbeit vorgeschlagene System benötigt wird.

Der Vergleich der Genexpression in Blättern zeigt ein nicht eindeutiges Bild. So gibt es zum Teil große Ähnlichkeiten in der Genexpression (Typ 1 MTs und Typ 4 *Arabidopsis-Poaceae*), die verschiedenen Typ 2 weisen aber ein komplexeres Expressionsmuster auf.

Vielleicht wird die Lokalisation und die Charakterisierung der Genprodukte helfen, dieses Bild zu vereinheitlichen. Einige Ansätze, um die Lokalisation der MT-Proteine zu untersuchen, wurden bereits in der Literatur beschrieben. So wurden beispielsweise die Promotoren der Gene *Arabidopsis MT1a*, *MT2a*, *MT2b* und *MT3* mit GUS (β -Glucuronidase) als Reporter gen fusioniert und transgene, homozygote T3-*Arabidopsis*-Pflanzen hergestellt (Gou et al. 2003). Die Analysen dieser Konstrukte in den transgenen Pflanzen zeigte, dass *Arabidopsis MT1a* und *MT2b* im Phloem nachzuweisen und durch Kupfer induzierbar sind. *MT2a*- und *MT3*-Promotor-GUS-Konstrukte führen vornehmlich zu einer Expression im Mesophyll von Blättern. Die Expression aller getesteten MTs nahm während der Blattseneszenz deutlich zu.

5.5.3 Metallothioneine auf Proteinebene

Die Nachweis von MT-Proteinen hat sich bisher als äußerst schwierig erwiesen. Murphy et al. (1997) gelang es in einer sehr aufwendigen Prozedur erstmalig bei *Arabidopsis*, Proteine des MT Typ 1 und Typ 2 zu isolieren und immunologisch nachzuweisen. Dabei wurden Glutathion-S-Transferase-MT fusionierte Proteine in *E. coli* überexprimiert und gegen diese polyklonale Antikörper hergestellt. Die Antikörper interagierten jedoch nicht direkt mit isolierten Proteinen aus *Arabidopsis*. Erst nach mehreren Reinigungsschritten (selektive

Präzipitation, Gelfiltration, Kupfer- und Thiolaffinitäts-Chromatographie) war es möglich, sowohl MT 1 als auch MT 2 immunologisch nachzuweisen. Ein quantitativer Vergleich der MTs nach Kupferexposition mit der in Kontrollen in der Arbeit von Murphy et al. (1997) ist schwierig, da die analysierten Proteinmengen von Kontrolle und Kupferanzucht sich um den Faktor 1:4 (MT 1) beziehungsweise den Faktor 1:6 (MT 2) unterscheiden. Unter beiden Anzuchtbedingungen werden in ungefähr gleich starke Proteinbanden erhalten.

Trotz der weltweit intensiven Beschäftigung mit MTs sind weitere Arbeiten mit pflanzlichen MT-Antikörpern nach eigener Recherche, bis auf eine in Russisch publizierte Arbeit über einen Gurken MT-Antikörper (Melkonyan und Nalbandyan 1989), nicht publiziert. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die Antikörperherstellung bei den relativ kleinen und extrem cysteinhaltigen MTs äußerst problematisch ist. Deswegen bedarf es zur Identifikation und Charakterisierung von MT-Proteinen anderer Nachweisverfahren, die auf den sehr effizienten und genauen Trenn- und Detektionsverfahren der chemischen Analytik beruhen. Beispielsweise konnten Virtanen und Bordin (1998) und Bordin et al. (1998) tierische MTs mittels RP-HPLC (Reverse Phase high Performance Liquid Chromatography) trennen sowie Charakteristika der Apoproteine (Thioneine) zu den metallbeladenen Proteinen (Metallothioneinen) mittels CZE (Capillar Zone Electrophoresis) sehr gut chromatographisch charakterisieren. Beruhend auf diesem Ansatz wurden von El Ghazie et al. (2004) MTs der Muschel *Mytilus galloprovincialis* aufgetrennt und der Gehalt an gebundenen Metallen mittels GF-AAS (Graphite Furnace - Atomic Absorbance Spectroscopy) bestimmt.

In dieser Arbeit wurde daher der gleiche, relativ einfache Zugang zur Isolation und Identifikation von MTs, wie von El Ghazie et al. (2004) beschrieben, versucht. Hierzu wurden cysteinreiche Proteine isoliert und mittels Gelfiltration aufgetrennt. Der Vergleich zu einem cadmiumhaltigen MT-Standard aus Kaninchenleber zeigte, dass in cadmiumexponierten Pflanzen eine Proteinfraction (39,8 min) induziert wird, welche mit einem Absorptionsmaximum von 254 nm (Absorption der Cadmiumsulfid-Bande) nachzuweisen ist (siehe Abb. 17). Nach Eichung der Säule mit Eichproteinen liegt das scheinbare Molekulargewicht dieser Fraktion (39,8 min) bei ca. 14,5 kDa. Dies würde keinem monomeren MT, sondern einer Dimerisierung des Proteins entsprechen. El Ghazie et al. (2004) konnten sowohl mit dem

gleichen MT-Standard als auch mit isolierten Muschel-MTs ebenfalls eine Dimerisierung des Proteins beobachten.

Die isolierten Proteine (39,8 min) konnten mittels CZE weiter charakterisiert werden. Dabei zeigte sich, dass der mittels Gelfiltration getrennte cadmiuminduzierbare Proteinpeak (39,8 min, siehe Abb. 18) die MT-typische geringe Absorption bei 280 nm aufweist (geringer Gehalt an Aromaten, siehe Abb. 20). Zudem zeigt dieser Proteinpeak zink- und cadmiumbindungstypische Absorptionsmaxima (siehe Abb. 21). Eine genauere Bestimmung von Cadmium mittels GF-AAS konnte zeigen, dass dieser Proteine mit der Retentionszeit 39-43 min der SEC den höchsten Gehalt an Cadmium aufweist (siehe Abb. 19). Zudem konnten die Proteine des Proteinpeaks 39,8 min nach Fällung, thiol-spezifischer Markierung⁹ und gelelektrophoretischer Auftrennung als stark cysteinreiche Proteine charakterisiert werden (PD. DR. J. Miersch, pers. Mitteilung). Obwohl eine massenspektrometrische Identifikation dieser Proteine noch aussteht, deuten alle bisherigen Untersuchungen auf ein zink- / cadmiumbindendes Metallothionein hin.

5.5.4 Zusammenfassung der MT-Ergebnisse

Zusammenfassend zeigt sich für die vier in Blättern detektierbaren Transkripte von *HvMT-1a*, *HvMT-2a*, *HvMT-2b* und *HvMT-3a*, dass diese unterschiedlich exprimiert werden. Die mRNAs der Typ 2 MTs werden konstitutiv oder unter nicht-stressenden Bedingungen exprimiert, während Typ 1 MT *HvMT-1a* nur unter Stressbedingungen wie Metallstress oder der Blattseneszenz exprimiert wird. Für Typ 1 MT untypisch wird *HvMT-1a* unter Cadmiumstress in Blättern, jedoch nicht in Wurzeln exprimiert.

Die Expression von *HvMT-3a* ist an Kupfermangel gebunden und kann durch die Zugabe von Kupfer, aber auch von Nickel unterdrückt werden.

Ob die bisher verwendete Nomenklatur für die Klassifizierung von MTs weiterhin sinnvoll ist, müssen weitere Studien in der Gen- und Proteinexpression zwischen mono- und dikotyledonen

⁹ Die Markierung und Detektion von cysteinreichen Proteinen erfolgte durch einen thiol-spezifischen Marker (SBD-F) nach einer von Miyairi et al. (1998) abgeleiteten und von El Ghazie et al. (2004) optimierten Methode.

Pflanzen zeigen. Die in dieser Arbeit identifizierten Untertypen von Typ 2 MTs (Gerste, Reis), lassen sich in die bestehende Nomenklatur nicht einfügen, weil es sich nicht um Isoformen handelt. Präziser wäre auf jeden Fall die hier vorgeschlagene Bezeichnung der einzelnen MTs.

Für die wohl momentan interessanteste Frage, pflanzliche MT-Proteine zu charakterisieren bzw. ihre Metallbindungseigenschaften zu bestimmen, konnte ein einfacher, aber verheißungsvoller Ansatz gezeigt werden. Unter Cadmiumstress kommt es zu einer deutlichen Zunahme eines Proteins, welches alle Charakteristika eines cadmiumbindenden Metallothioneins aufweist (Größe, hoher Cysteingehalt, geringes Vorkommen von aromatischen Aminosäuren, hoher Cadmiumgehalt). Trotz zweier Versuche konnten aus technischen Gründen eine massenspektrometrische Untersuchung bisher nicht gelingen. Dennoch sollte in Zukunft dieser Weg weiter beschritten werden, um MT-Proteine auch unter Kupfer- und Zinkstress vor allem aber auch während der Blattseneszenz zu charakterisieren. Zur Trennung und Charakterisierung von MTs könnten dabei vielleicht zusätzliche analytische Verfahren wie RP-HPLC und ICP-MS genutzt werden. Eine Untersuchung zur zellulären Lokalisation mittels GFP-Fusionskonstrukten sollte es ermöglichen, genauere Aussagen über die scheinbar vielfältige Rolle von Metallothioneinen machen zu können.

5.6 Kupferbindende Proteine CCH und BCB

Die in *Arabidopsis* identifizierten kupferbindenden Proteine CCH und AtBCB sind möglicherweise in Seneszenzprozesse involviert (Himmelblau et al. 1998, Himmelblau und Amasino 2000) und, im Falle von AtBCB, möglicherweise an der Schwermetalldetoxifikation (Ezaki et al. 2000, 2001) beteiligt. Deshalb wurde versucht, auch in Gerste homologe cDNAs dieser beiden kupferbindenden Proteine zu isolieren.

5.6.1 Copper Chaperon (CCH)

Die abgeleitete Proteinsequenz der mittels RT-PCR aus Gerstenblättern identifizierten cDNA *HvCCH* zeigt Homologien von 68 % zu *Arabidopsis CCH* bzw. 76 % zu Reis *OsCCH* (siehe Abb. 26). Im Vergleich zu dem homologen Gen aus Hefe *Atx1* zeigen die translatierten Proteinsequenzen von Reis *OsCCH*, Gerste *HvCCH* und *Arabidopsis CCH* einen um 39-63 Aminosäuren verlängerten Teil am carboxyterminalen Ende des Peptids (siehe Abb. 26). Der aminoterminalen Teil der abgeleiteten Proteinsequenz weist das für die Kupferbindung verantwortliche Cysteinmotiv (MxCxxC) auf und ist bei *Arabidopsis* für die Funktion als Kupferchaperon notwendig und hinreichend (Mira et al. 2001a). Die carboxyterminale Elongation des Proteins hingegen erweitert die Funktion des cytosolischen Kupferchaperons auf ein interzelluläres und phloemmobiles Transportprotein (Mira et al. 2001b).

Zusätzlich zu *OsCCH*, welches diese carboxyterminale Elongation aufweist, kommt in Reis ein zweites Kupferchaperon vor (*OsATX*, Ganesh et al. 2002,), welches wie auch das Kupferchaperon *Atx1* aus Hefe diese Erweiterung nicht aufweist (siehe Abb. 26). Eine *OsATX* entsprechende cDNA konnte in Gerste nicht identifiziert werden.

Die Genexpression von *Arabidopsis CCH* ist während der Blattseneszenz und unter Kupferstress gegensätzlich. Während der Blattseneszenz kommt es zu einer deutlichen Zunahme der *CCH* mRNA (Himmelblau et al. 1998), unter Kupferstress dagegen zu einer Abnahme des Transkriptes (Mira et al. 2001a). Bei dem verkürzten Kupferchaperon *OsATX* führen hohe Kupfermengen zu einer verstärkten Expression des Gens (Agrawal et al. 2002).

Untersuchungen von seneszentem Blattmaterial wurden mit *OsATX* nicht durchgeführt. Untersuchungen zu *OsCCH* sind nicht publiziert.

Anders als bei *Arabidopsis CCH* konnten mittels Northern Analysen Transkripte von *HvCCH* jedoch weder in Blättern verschiedener Entwicklungsstadien (etiolierte, junge, reife, seneszente Blätter) noch unter Schwermetallstress (Kupfer, Cadmium) detektiert werden. Die Menge an *HvCCH* mRNA liegt wahrscheinlich unterhalb der Detektionsgrenze von Northern Analysen, zumindest unter den getesteten Bedingungen (Blattentwicklung, Kupfer- und Cadmiumexposition). Eine Untersuchung der Genexpression von *HvCCH* müsste hiermit mittels Quantitativer Real-Time PCR (RTQ-PCR) erfolgen.

5.6.2 Blue-Copper-Binding-Protein (BCB)

Mittels RT-PCR konnte ein cDNA-Fragment isoliert werden (*HvBCB*), dessen abgeleitete Aminosäuresequenz 75 % Homologie zu dem aus Weizen bekannten Blue-Copper-Binding-Protein *TaBCB* zeigt.

Die Transkriptmengen von *HvBCB* (siehe Abb. 28) nehmen während der Blattseneszenz und sowohl unter Cadmium- als auch Kupferstress deutlich zu, was darauf hindeutet, dass es hier einen gemeinsamen Regulationsmechanismus gibt. Leider ist ein Vergleich der Genexpression von *HvBCB* mit dem homologen Gen *TaBCB* aus Weizen ist nicht möglich, da bisher keine Untersuchungen publiziert wurden.

Genauere Untersuchungen zur Genexpression bestehen nur zu *Arabidopsis AtBCB*. Ein Proteinsequenzvergleich von *Arabidopsis AtBCB* und Gerste *HvBCB* zeigt jedoch, dass diese abgeleiteten Proteinsequenzen nur 26 % Homologie zueinander aufweisen (siehe Abb. 27). Es ist daher fraglich, ob die Genprodukte eine gleiche Funktion besitzen. Aber selbst für *Arabidopsis* ist die Funktion von *AtBCB* immer noch unklar. Das Protein ist möglicherweise in die Schwermetalldetoxifikation involviert, da eine funktionelle Expression von *AtBCB* in *Saccharomyces cerevisiae* zu einer gesteigerten Aluminiumresistenz führt (Ezaki et al. 1999). Es gibt zudem einige Hinweise, dass *AtBCB* an Peroxidasen gebunden ist (Ezaki et al. 2001).

In transgenen *Arabidopsis erecta* Ecotyp „Landsberg“ Pflanzen zeigt die Expression von AtBCB einen verminderten Aluminiumgehalt in Wurzelspitzen (Ezaki et al. 2001), was von den Autoren auf eine verminderte Aluminiumabsorption schließen lässt

Ein Proteinvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *HvBCB* mit Sequenzen aus der Datenbank verweist dieses Protein in die Familie von solchen Proteinen, die eine kupferbindende Domäne ähnlich dem Plastocyanin besitzen (Plastocyanin-like-domain) und damit dem Plastocyanin nahestehend sind. Es bedarf also eine Reihe von weiteren Untersuchungen, um die Funktion von *HvBCB* und seines Genproduktes während der Blattseneszenz und unter Schwermetallstress aufzuklären.

5.7 Cadmiuminduzierte RFDD-PCR cDNA-Fragmente

Alle bisher diskutierten Arbeiten fußen auf aus anderen Spezies bekannten Genen, die im Rahmen dieser Arbeit aufgrund von bestehenden Sequenzdaten durch RT-PCR auch in Gerste nachgewiesen und charakterisiert werden konnten.

Um jedoch neue, unbekannte Gene zu isolieren, welche in die Detoxifikation von Schwermetallen involviert sind, wurden cDNAs von cadmiuminduzierten Genen mittels Restriction Fragment Differential Display-PCR (RFDD-PCR) isoliert. Für dieses „Screening“ wurde mRNA aus nichtgestressten und cadmiumexponierten Blättern eingesetzt und differentiell exprimierte cDNA Banden isoliert, kloniert und sequenziert (siehe Kapitel 4.5.1). Ein Teil dieser cDNA Fragmente wurde in Northern Analysen auf eine differentielle Expression hin untersucht, wobei zwei isolierte cDNA Fragmente keine differentielle Expression zeigten (Daten nicht gezeigt). Nachfolgend werden die über RFDD-PCR identifizierten cDNA-Fragmente (*Cdi1*, *Cdi2*, *Bsi1*, *Cdi4-7*) diskutiert.

5.7.1 *Cdi1*

Das mittels RFDD-PCR nach Cadmiumexposition identifizierte cDNA Fragment *Cdi1* zeigt nach Translation eine 87 %ige Homologie zu einer Untereinheit der ClpD-Protease (*OsClpD*) aus Reis.

Clp-Proteasen spielen zum einen eine Rolle in der Regulation von enzymatischen Prozessen, in dem sie den Gehalt von Schlüsselenzymen („key rate-limiting enzymes“) regulieren. Zum anderen sind sie im Abbau von abnormalen Proteinen beteiligt (Porankiewicz et al. 1999). Diese Funktion erhält besondere Wichtigkeit, wenn die Anzahl an abnormalen Proteinen und damit potentiell toxischen Polypeptiden durch zellulären Stress (Hitze, Wassermangel, Schwermetalle) stark zunimmt (Gottesman 1996).

In pflanzlichen Plastiden gehören ATP-abhängige Clp-Proteasen zu einem von bisher drei identifizierten proteolytischen Systemen, die homolog zu den gut charakterisierten Proteasen der Eubakterien sind (Porankiewicz et al. 1999; Adam et al. 2001). Alle drei Systeme bilden einen Komplex bestehend aus Chaperon und Protease, wobei die löslichen Clp-Proteasen aus separaten Chaperon- und proteolytischen Untereinheiten bestehen.

Die ClpD-Protease gehört zu der Familie der Hsp100/Clp-Proteine (ClpA-ClpE), welche zwei ATP-bindende Domänen aufweisen. In *Arabidopsis* sind sowohl die Transkripte (*ERD1*) als auch die Proteine (Erd1) von ClpD im Stroma des Chloroplasten lokalisiert (Weaver et al. 1999). Interessanterweise wurde *ERD1* unter anderem auch als SAG (senescence associated gene) identifiziert (Lohmann et al. 1994). Die Transkripte von *ERD1* akkumulieren während der natürlichen Blattseneszenz in *Arabidopsis*, das Genprodukt Erd1 zeigt allerdings eine gegenläufige Rhythmik. Erd1 lässt sich in Western Analysen ausschließlich in jungen Blättern nachweisen, bei denen die Transkripte für *ERD1* nur in geringen Mengen akkumulieren (Weaver et al. 1999). Die Autoren diskutieren als eine Möglichkeit dieses Phänomens, dass *ERD1* im Zuge einer allgemeinen Stressantwort während der Seneszenz exprimiert wird, jedoch ein zusätzliches, notwendiges Signal zur Translation des Proteins fehlt.

Zheng et al. (2002) zeigten ebenfalls für *Arabidopsis*, dass die Proteinmengen von ClpD durch einen moderaten 2-4stündigen Stress (Salz, Hitze, Kühle, Verwundung) nicht beeinflusst

werden. Nach 2stündigem oxidativen Stress (H_2O_2) und auch nach 4stündiger Starklichtexposition nehmen die Proteinmengen allerdings deutlich zu. Eine verstärkte Expression auf mRNA- und Proteinebene wurde durch einen länger anhaltenden Stress (72 h) durch Starklichtbedingungen und durch Kühlestress erreicht, andere Stressbedingungen wurden nicht getestet (Zheng et al. 2002).

Die Akkumulation von *Cdi1* sowohl während der Blattseneszenz als auch nach Exposition der Pflanzen mit toxischen Mengen an Kupfer oder Cadmium reiht sich so in das Bild der seneszenz- und stressinduzierten Gene ein. Eine Induktion der Genexpression durch oxidativen Stress scheint als gemeinsame Faktor möglich, da dieser sowohl während Starklichtbehandlungen, Kühle- und Schwermetallexposition sowie während der Seneszenz zunimmt. Da die Expressionsdaten auf Proteinebene in *Arabidopsis* jedoch nicht eindeutig sind, wäre eine weitere Untersuchung des Genproduktes von *Cdi1* sowohl während der Blattseneszenz als auch unter Schwermetallstress sehr interessant.

Anders als bei *Cdi1* nehmen sowohl Transkriptgehalte und zudem auch die Proteingehalte einer anderen Clp-Protease, ClpP, während der Blattseneszenz in Fahnenblättern der Gerste ab (Humbeck und Kruspinka 1996).

Für beide Clp-Proteasen, ClpD (für das *Cdi1* vermutlich eine Untereinheit codiert) und Clp P, ist die Funktion bisher noch unklar. ClpD gehört zusammen mit ClpC und ClpP zu den im Stroma des Chloroplasten lokalisierten Clp-Proteasen. Da die anderen beiden chloroplastidären Proteasen miteinander assoziiert sind (Desimone et al. 1997), wird auch eine Proteininteraktion von ClpD mit dem ClpC/ClpP Komplex diskutiert (Zheng et al. 2002). Zudem lässt der bifunktionelle Charakter von ClpC, -D und -P als Hsp100 Chaperon und Clp-Protease vermuten, dass diese nicht nur in die Proteolyse involviert sind, sondern auch als Proteinchaperon fungieren, wie beispielsweise während des Imports von Proteinen (Nielsen et al. 1997). Beide Funktionen könnten bei Schwermetallstress und bei der Blattseneszenz eine Rolle spielen.

5.7.2 *Cdi2*

Die Funktion des unter Kupfer- und Cadmiumstress als auch während der Blattseneszenz differentiell exprimierten Gens *Cdi2* liegt völlig im Dunklen. Sequenzvergleiche auf Nukleotidebene zeigen eine hohe Homologie (83 %) zu einem EST aus Mais, das aber nicht weiter charakterisiert ist. Eine mögliche abgeleitete Peptidsequenz von *Cdi2* zeigt eine 65 %ige Homologie zu einem putativen Protein aus *Arabidopsis* (BAB11228). Um *Cdi2* weiter zu charakterisieren, sollte zunächst das Expressionsverhalten weiter analysiert werden (z.B. oxidativer Stress, Hormone). Ebenso könnte ein 5' bzw. 3'-RACE (Rapid amplification of cDNA ends) durchgeführt werden. Nach Erhalt des vollständigen ORFs (open reading frame) könnten, wie für die MTs beschrieben GUS-Konstrukte hergestellt werden und die zelluläre Lokalisation von *Cdi2* untersucht werden. Auch die Charakterisierung einer entsprechenden *Arabidopsis*-Mutante, welche kommerziell erwerblich ist (www.signal-salk.edu) bietet einen weiteren Ansatz, die Funktion von *Cdi2* zu ermitteln.

5.7.3 *Bsi1*

Mehrere cDNA-Fragmente, deren Konsensussequenz eine 97 %ige Homologie zu einem Bowman-Birk-Typ Proteinase Inhibitor (BB-PI) aus Gerste (*Bsi1*) aufweist, konnten unabhängig voneinander aus cadmiumexponierten Gerstenblättern isoliert werden. Dieses spricht für die hohe Abundanz der *Bsi1* mRNA in den cadmiumexponierten Primärblättern. *Bsi1* ist ein kleines Protein von 89 Aminosäuren mit einem hohen Cysteingehalt von 11 %. In den Koleoptilen von Gerste wird *Bsi1* durch Infektion mit dem Pilz *Stagonospora nodorum* induziert (Stevens et al 1996). Das entsprechende Homolog in Mais (*Wip1*) wird in Segmenten von Koleoptilen durch Abschneiden schon nach 30 min induziert (Rohrmeier und Lehle 1993). In Wurzeln von Weizen, nicht aber in Blättern wird das *Bsi1* Homolog *Wali5* durch toxische Mengen von Aluminium induziert (Snowden und Gardner 1993).

Stevens et al. (1996) verweisen auf die aminoternale Sequenz von *Bsi1*, welche auf einen Export des Peptides in die Zellwand hindeutet. Darüber hinaus diskutieren die Autoren, dass *Bsi1* als Proteinase Inhibitor möglicherweise die Aktivität von Thioninen erhöhen können.

Thionine sind kleine, cysteinreiche, toxische Proteine, die durch verschiedene Faktoren wie Schwermetalle, pilzliche Pathogene oder Jasmonsäure induziert werden (Terras et al. 1993; Holtorf et al. 1995).

Northern Analysen von *Bsil* zeigen, dass dieses Gen nicht nur durch Exposition der Gerstenblätter mit 1mM Cadmium induziert wird, sondern dass auch eine 1 mM Kupferexposition zu einer deutlichen Expression des Gens führt. Interessanterweise wird *Bsil* auch während der späten Blattseneszenz (39 Tage nach Aussaat) in den Primärblättern der Gerstenkeimlinge induziert.

5.7.4 *Cdi4*

Das cDNA Fragment *Cdi4* zeigt eine 94 %ige Homologie zu einem möglichen TGF- β -Rezeptor interagierenden Protein aus Reis (BAC92643). Die Nukleotidsequenzen aus Reis sind bisher nur als Eintrag in der Datenbank vorhanden und nicht publiziert (Stand Februar 2004). In *Arabidopsis* ist das homologe Gen (*AtTRIP-1*) notwendig für die Entwicklung der Pflanze und wird durch Brassinosteroide (BRs) reguliert (Jiang und Clouse 2001). In Pflanzen regulieren Brassinosteroide (BRs) die Expression von Genen, welche in die Entwicklung der Pflanze integriert sind (Clouse und Sasse 1998). Dabei ist dieser Prozess an eine funktionelle Serin/Threonin (Ser/Thr) Rezeptor Kinase gebunden (Oh et al. 2000). Transgene *Arabidopsis* Antisense-Konstrukte dieses Proteins (antisense TRIP-1 RNA) zeigen Entwicklungsdefekte (Zwergwuchs, verzögerte Pflanzenentwicklung, veränderete Blattstellung), die BR-defizitären *Arabidopsis* Mutanten ähneln (Jiang und Clouse 2001).

In 48 d alten *Arabidopsis* Pflanzen nimmt die Genexpression von *AtTRIP-1* deutlich zu, wobei ein Zeitraum von 15-48 Tagen untersucht wurde. Damit ist *AtTRIP-1* möglicherweise auch in Seneszenzprozesse involviert.

In tierischen Systemen ist diese Ser/Thr Rezeptor Kinase als TGF- β Rezeptor Kinase (Transforming Growth Factor- β) bekannt und ebenso essentiell in die Zellentwicklung involviert (Massague 1998). Das in tierischen Systemen *Cdi4* homologe Genprodukt TRIP-1 (TGF- β receptor-interacting protein) ist zum einen ein Substrat für eine Ser/Thr Rezeptor

Kinase (TGF- β Typ II Rezeptor Kinase), die eine große Rolle in der TGF- β Signaltransduktion spielt (Chen et al. 1995). Zum anderen fungiert TRIP-1 als essentielle Untereinheit des Translations Initiations Faktors eIF3 in eukaryontischen Zellen (Asano et al. 1997). Damit ist TRIP-1 sowohl in die Signalkette von Entwicklungsprozesse integriert als auch direkt in die Protein Translation.

Ser/Thr Kinasen sind eine wichtige Komponente der Signaltransduktion bei Pflanzen. Bei Tomate ist das Gen *pto*, welches für eine Ser/Thr Kinase codiert, in die Pathogenerkennung und Signaltransduktion eingebunden (Zhou et al. 1997).

Mit *Cdi4* gelang es damit, ein cDNA Fragment eines offensichtlich in die Signaltransduktion involviertes Gens zu isolieren. Leider konnten Transkripte von *Cdi4* nicht mittels Northern Analysen detektiert werden. Eine Untersuchung mittels quantitativer Real-Time PCR bietet sich damit an.

5.7.5 *Cdi5*

Cdi5 zeigt eine 99 %ige Homologie zu einer putativen Heparanase (Endo- β -Glucuronidase) aus Gerste (CAD42650), welche von den Autoren als mehltauinduziertes Gen identifiziert wurde (Eckey et al. 2002).

Endo- β -Glucuronidasen gehören zu einer Familie von Glycosylhydrolasen (Heparanasen), die in die Hydrolyse von extrazellulärer Matrix involviert sind. Heparan Sulfat Proteoglykane (HSPGs) spielen dabei eine Schlüsselrolle als unlösliche Barrieren. Ein Ab- und Umbau dieser HSPGs wirkt sich daher auf die Integrität und Funktionalität von Geweben aus (Levy-Adam et al. 2003). Eine Aufbau von Zellwandmaterial ist u.a. als Reaktion der pflanzlichen Zelle auf Pathogenbefall bekannt (Coupe et al. 1995, 1997). Aber auch Schwermetalle induzieren Veränderungen der Zellwand. So kommt es unter Aluminiumexposition in Wurzeln von *Arabidopsis* zu einer verstärkten Kallosebildung (Ezaki et al. 2000, 2001).

Mit *Cdi5* wurde damit vermutlich ein Gen identifiziert, welches sowohl unter Pathogenbefall, als auch während des Schwermetallstress ein Rolle spielt. Da es auch während der Seneszenz

zu Abbauprozessen von Zellwandmaterial kommt, sollte die Rolle von *Cdi5* auch hier untersucht werden. Da sich das Transkript allerdings nicht in Northern Analysen nachweisen lies, ist eine Untersuchung mittels Real-Time PCR dafür notwendig.

5.7.6 *Cdi6*

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *Cdi6* zeigt nach einem Vergleich mit Sequenzen in der Datenbank an, dass es sich hierbei vermutlich um eine 20S Untereinheit des katalytischen Kerns eines 26S Proteasom handelt (siehe Kapitel 4.5.2).

Wie die schon diskutierten Clp-Proteasen sind auch 26S Proteasome am Abbau von abnormalen, nichtfunktionellen Proteinen beteiligt (Sassa et al. 2000) und spielen damit unter anderem während der Stressantwort eine Rolle (Coux et al. 1996). 26S Proteasome sind multikatalytische Protease-Komplexe, welche in eukaryontischen Systemen aus einem 20S proteolytischen Kern sowie aus zwei 19/22S regulatorischen Komplexen bestehen. Der katalytische Kern wiederum besteht aus mindestens 14 Untereinheiten, wobei diese, basierend auf den Homologien zu Proteasomen der Archebakterien, in α - und β -Ketten unterschieden werden. In Archebakterien sind die α - Ketten der 20S Kern-Untereinheiten in die Struktur des Proteasoms integriert, während die β -Untereinheiten als eigentliche Protease-Untereinheit fungieren (Ito et al. 1997).

In Spinat (*Spinacia oleracea*) wird die Expression des homologen Gens *SOPSC8* während der Blattseneszenz von 20 d alten Keimblättern deutlich hochreguliert (Ito et al. 1997). Die Expression des homologen Gens aus Reis *Q9LSU0* wurde von den Autoren nicht untersucht (Sassa et al. 2000). In *Arabidopsis* wird das homologe Gen *TAS-g64* unter sowohl unter Hitze als auch Verwundung hochreguliert (Genschik et al. 1992). Die Untersuchungen aus *Arabidopsis* und Spinat zeigen, dass die homologen Gene sowohl während der Blattseneszenz als auch unter Stressbedingungen exprimiert werden. Auch unter Schwermetallstress kommt es zu einer Zunahme von abnormalen Proteinen, indem zum Beispiel Cadmium an

Thiolgruppen von Proteinen bindet und deren Funktion inhibiert. Damit wird eine verstärkte Expression von Proteasen notwendig, für das die isolierten RFDD-PCR Fragmente *Cdi6* und *Cdi1* ein wichtiges Beispiel sein könnten.

5.7.7 *Cdi7*

Cdi7 zeigt eine 96 %ige Homologie zu einem möglichen Seneszenzgen (BAB33421) aus Erbse (*Pisum sativum*). Für die Sequenz des möglichen Seneszenzgens besteht jedoch nur ein Eintrag in der Datenbank. Northern Analysen mit *Cdi7* wurden bisher nicht durchgeführt. Für eine weitere Untersuchung dieses unbekanntes Gens bieten sich die gleichen Schritte an, wie für *Cdi2* (siehe Kapitel 5.7.2) beschrieben.

5.7.8 Zusammenfassung der mittels RFDD-PCR isolierten cDNA-Fragmente

Zusammenfassend für die mittels RFDD-PCR isolierten cDNA-Fragmente lässt sich sagen, dass nur die Transkripte von *Cdi1*, *Cdi2* sowie von *Bsi1* mittels Northern Analysen nachzuweisen waren. Transkripte von *Cdi4*, *Cdi5* und *Cdi6* konnten mittels Northern Analysen weder in der Kontrolle, noch in Kupfer- oder Cadmiumproben nachgewiesen werden, wobei ein methodischer Fehler durch wiederholte Untersuchungen ausgeschlossen werden kann. Damit liegen die Transkriptmengen von *Cdi4*, *Cdi5* und *Cdi6* vermutlich unterhalb der Nachweisgrenze von Northern Analysen. Zur Untersuchung der Genexpression müssen die Analysen mittels Real-Time PCR durchgeführt werden, die jedoch im Zuge dieser Arbeit nicht mehr realisiert werden konnten. Untersuchungen zur Genexpression von *Cdi7* wurden bisher noch nicht durchgeführt.

Die drei in Northern Analysen differentiell exprimierten cDNA Fragmente *Cdi1*, *Cdi2* und *Bsi1* zeigen ein übereinstimmendes Expressionsmuster (siehe Abb. 30). Alle drei Gene werden sowohl während der Blattseneszenz als auch durch Kupfer- und Cadmiumstress induziert. Die Transkripte von *Bsi1* sind auch in nicht-gestressten Blattmaterial nachweisbar, allerdings

kommt es zu einer deutlich Zunahme der mRNA-Menge während der Seneszenz und des Schwermetallstresses. Dies ist für die Transkripte von *Cdi1* und *Cdi2* nicht der Fall. Diese werden im Vergleich zu ungestressten Blättern unter Schwermetallstress und während der Seneszenz deutlich stärker exprimiert. Allerdings zeigt das unbekannte Gen *Cdi2* einen generell niedrigeren Transkriptgehalt, der durch nicht-radioaktiv markierten Sonden in Northern Analysen nur schwer zu detektieren ist. Die Gemeinsamkeiten in der Genexpression dieser mittels RFDD-PCR isolierten Fragmente (*Cdi1*, *Cdi2* und *Bsi1*) werden in Kapitel 5.8 und 5.9 diskutiert.

Auch wenn die differentielle Expression von *Cdi4* (TGF- β -Rezeptor interagierendes Protein), *Cdi5* (Endo- β -Glucuronidase) und *Cdi6* (Untereinheit 26S Proteasom) bisher nicht gezeigt werden konnte, weil die Transkriptmengen vermutlich unterhalb der Nachweisgrenze von Northern Analysen liegen, so lassen doch die im obigen Text erwähnten Expressionsstudien homologer Gene anderer Pflanzen (Kapitel 5.7.1 – 5.7.7) eine Rolle dieser Gene unter Stressbedingungen (Schwermetall, Blattseneszenz) auch in Gerste als sehr wahrscheinlich erscheinen.

5.8 Cadmiumstress, oxidativer Stress, Seneszenz

Sandalio et al. (2001) untersuchten den Gehalt von Metallen nach Exposition mit Cadmium in Wurzeln und Blättern von Erbsenkeimlingen (*Pisum sativum*). Dabei zeigte sich, dass der Gehalt von Cadmium in der Wurzel 20fach höher ist, als im Blatt. Untersuchungen aus cadmiumexponierten Weizenpflanzen bestätigen dieses (McMahon und Anderson 1998). Hier wurde ein 10fach höherer Cadmiumgehalt in den Wurzeln im Vergleich zu Blättern ermittelt. Diese Untersuchungen lassen zum einen auf eine effiziente Detoxifikation von Cadmium in der Wurzel schließen, zum anderen aber auch auf einen schlechten Transport dieses Schwermetalls über gerichtete Transportsysteme. Obwohl sich nach Cadmiumexposition auch Phytochelatine in Blättern von Primärblättern der Gerste nachweisen lassen (Weizen: McMahon und Anderson 1998, Gerste: diese Arbeit), sind PCs in erster Linie als

Komponenten der Metalldetoxifikation in der Wurzel anzusehen (Cobbett und Goldsbrough 2002).

Dennoch kommt es zu in Blättern deutlichen physiologischen, biochemischen und molekularen Veränderungen nach Cadmiumexposition (Prasad und Strzalka 1999, Barcelo und Poschenrieder 1999, McCarthy et al 2001, Sandalio et al 2001).

Allerdings sind in die Detoxifikation von Cadmium in Blättern offensichtlich aber andere Komponenten als die Phytochelatine involviert. Hohe Expressionsraten des Metallothioneins *HvMT-1a* unter Cadmiumstress und möglicherweise auch seines Genproduktes, könnten diesem Metallothioneinen eine bedeutende Funktion nicht nur bei der Detoxifikation von Cadmium zuweisen.

Es stellt sich die Frage, welcher Faktor für die Genexpression, sowohl unter Schwermetallexposition als auch während der natürlichen Blattseneszenz, verantwortlich ist.

Für die überwiegende Anzahl aluminiuminduzierter Gene konnte gezeigt werden, dass diese zu den allgemeinen stressinduzierbaren Genen gehören, welche durch oxidativen Stress, Pathogeninfektion, Hormone oder andere Schwermetalle induzierbar sind (Ezaki et al. 2001).

Für Cadmium konnte gezeigt werden, dass dieses nicht-redoxaktive Metall oxidativen Stress induziert (Chen et al. 1995). Oxidativer Stress wird zudem als größte Konsequenz der pflanzlichen Zelle in der Reaktion auf Schwermetallstress angesehen (Dietz et al. 1999).

Auch während der Blattseneszenz kommt es, bedingt durch zahlreiche Prozesse wie den Abbau von metallhaltigen Proteinen (Himmelblau und Amasino 2000), dem Abbau von Komponenten des Photosyntheseapparates (Miersch et al. 2000), einem zunehmendem Verlust der Kompartimentierung und Ultrastruktur (McCarthy et al. 2001) und vielen weiteren Vorgängen, zu einer Zunahme des oxidativen Stresses (Dietz et al. 1999, Prasad und Strzalka 1999, Krupinska und Humbeck 2004).

Für das als Seneszenzgen bekannte Metallothionein *LSC 54* aus *Brassica napus* konnte gezeigt werden, dass dieses, unabhängig von der Blattseneszenz, durch oxidativen Stress induziert wird (Navabpour et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit zeigen das Metallothionein *HvMT-1a*, das Blue-Copper-Binding-Protein *HvBCB*, ein Bowman-Birk-Protease Inhibitor (*Bsi-1*), ein Gen für eine Untereinheit einer CplD-Protease (*Cdil*) sowie das noch zu

identifizierende Gen *Cdi2* eine Expression in Primärblättern nicht nur als Antwort auf toxische Konzentrationen an Kupfer oder Cadmium, sondern auch eine starke Expression während der späten Phase der Blattseneszenz. Dieses lässt aus den oben angeführten Gründen vermuten, dass oxidativer Stress ein gemeinsames Signal zur Expression dieser Gene darstellt. Aber nicht nur die Entstehung von ROS ist eine Gemeinsamkeit des Schwermetallstresses und der Blattseneszenz. So führt eine Cadmiumexposition in Blättern zu einer Reihe von Seneszenzprozessen, wie zum Beispiel der Expression von Endopeptidasen, der Expression von Enzymen des Glyoxalzyklus und gleichartigen Veränderungen in der Ultrastruktur des Chloroplasten (McCarthy et al. 2001).

Zudem zeigen auch Untersuchungen mit ozonbehandelten *Arabidopsis* Blättern, dass nicht alle aluminiuminduzierten Gene auch durch Ozon¹⁰ exprimiert werden können (Richards et al. 1998).

Ob reaktive Sauerstoffspezies also verantwortlich für die Genexpression der in dieser Arbeit identifizierten Gene sind, welche sowohl während der natürlichen Blattseneszenz als auch als Antwort auf Schwermetallstress induziert werden, lässt sich nicht sagen. Die Ergebnisse des sowohl seneszenz- als auch durch oxidativen Stress induzierten Typ 1 MT *LSC54* (Navabpour et al. 2003) sprechen dafür, Untersuchungen von Richards et al. (1998) eher dagegen. Diese Autoren konnten zeigen, dass *HvMT-1a* und *Bsi-1* homologe Sequenzen nicht durch Ozonbehandlung, wohl aber durch Aluminiumexposition induziert werden. Die Autoren diskutieren allerdings, dass es Unterschiede in der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies geben könnte, die in einer unterschiedlichen Expression von ROS-induzierten Genen mündet.

Damit zeigt sich, dass auch hier weitere Untersuchungen notwendig sind.

¹⁰ Ozon ist wasserlöslich und wird vermutlich im Mesophyll der Blätter in das Superoxid Anion, Hydroxylradikale und Wasserstoffperoxid umgewandelt (Sharma und Davis 1994).