

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnten in die Metallhomöostase der Gerste integrierte Faktoren identifiziert und bezüglich ihrer Expression charakterisiert werden. Dabei wurden zwei unterschiedliche Situationen, bei denen es zu Verschiebungen in der zellulären Metallhomöostase kommt, untersucht. Zum einen wurden Untersuchungen an seneszierenden Primärblättern durchgeführt, bei denen durch Abbauprozesse vor allem in den Chloroplasten Metalle aus metallhaltigen Proteinen freigesetzt und teilweise in andere Organe der Pflanze transportiert und wiederverwertet werden. Zum anderen wurden Gerstenkeimlinge mit toxischen Konzentrationen von essentiellen und nicht-essentiellen Metallen exponiert und die Auswirkungen auf das Primärblatt analysiert. Vergleicht man die Reaktionen der Pflanze in diesen beiden Situationen, so zeigt sich, dass sowohl auf physiologischer als auch auf molekularer Ebene große Ähnlichkeiten bestehen. Sowohl während der Blattseneszenz als auch nach einer Exposition mit Schwermetallen kommt es zu einer deutlichen Abnahme im Chlorophyllgehalt, während die Funktionalität von bestehenden Photosystem II Einheiten bis zu späten Phasen der Seneszenz bzw. über einen langen Zeitraum der Schwermetalexposition erhalten bleibt.

Als wichtige Komponenten der Metaldetoxifikation wurden in diesem Zusammenhang die Phytochelatine und Metallothioneine untersucht. Es ist bekannt, dass Phytochelatine eine Rolle bei der Metaldetoxifikation in der Wurzel spielen. In der vorliegenden Arbeit konnte nun entsprechend dieser postulierten Rolle der Phytochelatine gezeigt werden, dass sowohl der Transkriptgehalt des synthetisierenden Enzyms (Phytochelatin-Synthase) als auch der Gehalt des Syntheseproduktes - die Phytochelatine - in Wurzeln der Gerste deutlich höher sind als in Blättern. Allerdings zeigten HPLC-Analysen der Phytochelatine, dass diese auch in Gerstenblättern akkumulieren. Eine Akkumulation war hier aber nur unter langanhaltender Exposition mit hohen Mengen an Cadmium und nicht nach Kupferzugabe oder während der Blattseneszenz zu beobachten. Interessanterweise konnten in den Blättern durch HPLC-Analysen und anschließender ESI-MS eindeutig zwei verschiedene Phytochelatine (PC₂ und PC₃) identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass Gerste mindestens neun verschiedene Metallothionein-Gene besitzt, wobei die mRNAs von sechs dieser Gene erstmals in Form ihrer cDNAs identifiziert werden konnten. Die Analyse der Genexpression zeigte, dass die verschiedenen Metallothioneine bezüglich ihrer Organspezifität, ihrer Entwicklungsabhängigkeit und ihrer Reaktion auf Schwermetallstress unterschiedlich exprimiert werden. Dies spricht für unterschiedliche Funktionen der verschiedenen Metallothioneine bei der Detoxifikation von Metallen bzw. bei der Aufrechterhaltung der Metallhomöostase. Die Untersuchungen von Metallothionein-Proteinen ist aufgrund ihrer besonderen biochemischen Eigenschaften nicht mit einfachen biochemischen oder immunologischen Verfahren durchzuführen. In einem ersten Ansatz konnte in dieser Arbeit über eine thiol-spezifische Proteinextraktion, anschließender Gelchromatographie und kapillarelektrophoretischer Zonen-Elektrophorese in Verbund mit Atom-Absorptions-Spektroskopie gezeigt werden, dass unter Cadmiumeinfluss vermutlich ein Cadmium und Zink-bindendes Protein akkumuliert, welches eindeutige Charakteristika eines Metallothioneins aufweist. Diese Untersuchungen stellen die Basis für weitere, zukünftige Analysen der Metallothionein-Proteine und deren zelluläre Funktionen dar.

Um weitere, bis jetzt noch nicht identifizierte Faktoren zu identifizieren, die bei der Detoxifikation bzw. Metallhomöostase in Gerstenblättern eine Rolle spielen, wurden mittels RFDD-PCR cDNAs isoliert, die spezifisch nach einer Exposition mit Cadmium akkumulieren. Die Expressionsanalyse von drei dieser so identifizierten Gene (*Cdi1*, *Cdi2*, *Bsi1*) zeigte eine eindeutige Induktion sowohl nach Schwermetallstress als auch während der Blattseneszenz. Diese Befunde wie auch die oben beschriebenen Analysen zur Expression der Metallothioneine belegen, dass es Überlappungen bei der Antwort der Pflanzen auf Schwermetallstress und dem Seneszenzprogramm gibt. Eine Charakterisierung der Genexpression aller neu identifizierten und durch Cadmium induzierten Gene, konnte aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden.

Die Untersuchungen von fünf Cadmium-induzierten Genen (*HvMT-1a*, *HvBCB*, *Cdi1*, *Cdi2*, *Bsi1*) zeigte, dass sie nicht nur durch das nicht-essentielle, nicht-redoxaktive Cadmium, sondern auch durch hohe Konzentrationen des essentiellen redoxaktiven Metalls Kupfer

induziert werden. Zudem erfolgt eine Expression dieser Gene auch während der späten Phase der Blattseneszenz, die durch einen beginnenden Zusammenbruch der zellulären Integrität gekennzeichnet ist. Bis jetzt herrscht noch Unklarheit über die dieser Regulation der Expression zugrunde liegende(n) Signalkette(n). Ein mögliches Signal, das bei all diesen Situationen eine Rolle spielt, könnte die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies sein. Diese werden sowohl durch freie, redoxaktive Metalle wie Kupfer, aber auch indirekt durch Schädigungen von Elektronentransportketten oder Chlorophyllen generiert, wie sie durch Cadmiumtoxifikation oder während der natürlichen Blattseneszenz hervorgerufen werden. Allerdings steht der Beweis für diese Vermutung wie auch die weitere Aufklärung der Signalkette(n) noch aus.

Die vorliegenden Ergebnisse geben erste Hinweise zur Regulation und Funktion der verschiedenen metallbindenden Faktoren im Blatt. Sie stellen eine Basis für folgende Analysen zur Aufklärung der komplexen in pflanzlichen Zellen ablaufenden Prozesse der Metallhomöostase und Detoxifikation dar.

6. Summary

In this work, factors involved in the metal homeostasis in barley were identified and their expression characterized. By this, two different situations when changes in metal homeostasis occur were analyzed: firstly, analyses of senescencing primary leaves, when due to cellular decomposition (especially of the chloroplast), formerly bound metals are released from their metal containing proteins and to some extent transported to other parts of the plant. Secondly, barley seedlings exposed to toxic amounts of either essential or non-essential metals and effects on the primary leaves were investigated. The comparison of the plant response to both situations reveals that both the physiological and the molecular level show great similarities. Leaf senescence as well as exposure of the plants to toxic concentrations of heavy metals leads clearly to a decrease in chlorophyll content while the functionality of the remaining photosystem II units stays intact until the late stage of senescence, respectively, over a long period of heavy metal exposure.

In this respect, important components of the metal detoxification, the phytochelatins and the metallothioneins, were analyzed. It is known that phytochelatins are involved in the metal detoxification in roots. In this work this predicted role of the phytochelatins for root detoxification could be supported by higher transcript content of the phytochelatin synthesizing enzyme (Phytochelatin-Synthase) and by higher concentrations of phytochelatins in roots than in leaves. HPLC analyses show phytochelatin accumulation in leaves though. This accumulation occurred only following a long term exposure of plants to cadmium, but not to copper or during leaf senescence. Interestingly, in leaves using HPLC analyses followed by ESI-MS, two different phytochelatins (PC₂ and PC₃) were identified

Furthermore, this work revealed that barley possesses at least nine different metallothionein genes and the mRNA of six of these genes were identified as cDNAs for the first time. Gene expression analyses showed that the different metallothioneins are expressed differently with respect to their tissue specificity, their developmental regulation, and their response to heavy metal stress. This indicates different functions of the various

metallothioneins in the detoxification of metals, respectively, in the maintenance of the metal homeostasis. However, investigations of metallothionein proteins cannot be performed with simple biochemical or immunological analyses due to their unusual biochemical characteristics. In this work, a first approach after cadmium treatment revealed, that thiol-specific protein extraction, followed by size exclusion chromatography, capillary zone electrophoresis and atomic absorbance spectroscopy led to an accumulation of a cadmium and zinc binding protein, which shows distinct characteristics of a metallothionein. These investigations provide the basis for further experiments of the metallothionein proteins and their cellular function in the future.

In order to identify new, unknown factors involved in the detoxification and metal homeostasis in barley leaves, RFDD-PCR led to the isolation of different cDNAs after exposure of the plants to cadmium. Gene expression studies showed that three of these genes (*Cdi1*, *Cdi2*, *Bsi1*) are clearly induced during leaf senescence and by heavy metal stress.

These results as well as the findings of the expression of the metallothioneins indicate an overlap in the plant response to heavy metal stress and the senescence program. The characterization of the gene expression of all newly cadmium induced genes was due to limited time not possible.

The analyses of five cadmium induced genes (*HvMT-1a*, *HvBCB*, *Cdi1*, *Cdi2*, *Bsi1*) showed that their expression does not depend only on the non-essential, non-redoxactive metal cadmium but can be triggered by high concentrations of the essential, redox-active metal copper. Furthermore, gene expression occurs also during late stages of leaf senescence, which is characterized by the onset of the loss of cellular integrity. Up to now the regulation of the signal cascade(s) remains unknown. A putative signal involved in this signal cascade(s) could be the formation of reactive oxygen species. These are formed by free redox-active metals like copper as well as indirectly by deterioration of electron transport chains or chlorophylls which occurs by cadmium toxicification and during leaf

senescence. Clarification of the hypothesis and revealing of the signal cascade(s) remain to be performed.

This work provides insights into the regulation and the function of the different metal binding factors in barley leaves. Thus, it provides the basis for further analyses in order to elucidate the complex processes of metal homeostasis and detoxification in plant cells.