

**Regulation von Faktoren der Metallhomöostase und der Metalldetoxifikation  
unter Schwermetallstress und während der Blattseneszenz in Gerste**

*(Hordeum vulgare)*



**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt der**

**Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg**

**von Herrn Dipl.-Biol. Jan Heise  
geb. am 03.08.71 in Flensburg**

**Gutachter:**

**1: Prof. Dr. K. Humbeck (Inst. f. Pflanzenphysiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)**

**2: Prof. Dr. G.J. Krauss (Inst. f. Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)**

**3: Prof. Dr. D. Tomos (School of Biological Sciences, University of Wales, Bangor, UK)**

**Halle (Saale), 20.02.04**

**Die Dissertation wurde am 23.06.04 erfolgreich verteidigt.**

**urn:nbn:de:gbv:3-000006909**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006909>]

# **Inhaltsverzeichnis**

## **Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen**

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Schwermetalle: Definition, natürliche Vorkommen und Verfügbarkeit.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Schwermetalle als Lebensnotwendigkeit und als Gefahrenpotenzial.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3</b>	<b>Vom Boden in die Zelle: Metallaufnahme und Distribution.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3.1</b>	<b>Metallaufnahme in die Wurzel.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Xylem-Transport.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3.3</b>	<b>Aufnahme von Cadmium.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3.4</b>	<b>Zelluläre Metallaufnahme und Distribution.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4.</b>	<b>Zelluläre metallbindende Faktoren in Pflanzen.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4.1</b>	<b>Metallothioneine.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Phytochelatine.....</b>	<b>13</b>
<b>1.5</b>	<b>Blattseneszenz und Schwermetallstress.....</b>	<b>14</b>
<b>1.5.1</b>	<b>Allgemeine Aspekte der Blattseneszenz.....</b>	<b>14</b>
<b>1.5.2</b>	<b>Regulation der Blattseneszenz.....</b>	<b>16</b>

<b>2.</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>18</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.</b>	<b>Pflanzenanzucht und Exposition mit Schwermetallen.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2</b>	<b>Bestimmung des Chlorophyllgehaltes.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3</b>	<b>Bestimmung der Photosystem II Effizienz.....</b>	<b>22</b>
<b>3.4.</b>	<b>RT-PCR / PCR Reaktionen / Primer.....</b>	<b>22</b>
<b>3.5</b>	<b>Bakterienstämme und Vektoren.....</b>	<b>24</b>
<b>3.6</b>	<b>DNA / RNA Größenstandards.....</b>	<b>25</b>
<b>3.7</b>	<b>DNA-Isolation.....</b>	<b>25</b>
<b>3.8</b>	<b>Isolierung von Gesamt-RNA.....</b>	<b>26</b>
<b>3.9</b>	<b>Isolierung von poly(A)<sup>+</sup>-RNA.....</b>	<b>28</b>
<b>3.10</b>	<b>Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese.....</b>	<b>28</b>
<b>3.11</b>	<b>Northern-Blotting.....</b>	<b>29</b>
<b>3.12</b>	<b>RFDD-PCR (Restriction Fragment Differential Display – PCR).....</b>	<b>30</b>
<b>3.12.1</b>	<b>cDNA Synthese.....</b>	<b>32</b>

<b>3.12.2</b>	<b>Template Herstellung.....</b>	<b>33</b>
<b>3.12.3</b>	<b><sup>33</sup>P-Endmarkierung, Vervielfältigung der cDNA-Fragmente und Detektion.....</b>	<b>35</b>
<b>3.12.4</b>	<b>Herstellung von cDNA-Sonden.....</b>	<b>37</b>
<b>3.13</b>	<b>DNA-Agarosegelelektrophorese.....</b>	<b>38</b>
<b>3.14</b>	<b>Reinigung von DNA aus Agarosegelen.....</b>	<b>38</b>
<b>3.15</b>	<b>Ligation von DNA-Fragmenten.....</b>	<b>38</b>
<b>3.16</b>	<b>Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i>-Zellen und Transformation von Vektoren.....</b>	<b>39</b>
<b>3.17</b>	<b>Kolonie-PCR.....</b>	<b>40</b>
<b>3.18</b>	<b>Herstellung von <i>E. coli</i>-Gefrierkulturen.....</b>	<b>41</b>
<b>3.19</b>	<b>Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>3.20</b>	<b>DNA-Sequenzierung.....</b>	<b>41</b>
<b>3.21</b>	<b>Protein-Isolation.....</b>	<b>42</b>
<b>3.22</b>	<b>SEC (Size-Exclusion-Chromatography).....</b>	<b>42</b>
<b>3.23</b>	<b>GF-AAS (Graphit-Furnace-Atomic-Absorbance-Spectroscopy).....</b>	<b>43</b>
<b>3.24</b>	<b>CZE (Capillary-Zone-Electrophoresis).....</b>	<b>43</b>

<b>3.25</b>	<b>ESI-MS (Electrospray-Ionisation-Mass-Spectrometry).....</b>	<b>44</b>
<b>3.26</b>	<b>Phytochelatin-Isolation, Derivatisierung und Nachweis.....</b>	<b>44</b>
<b>3.27</b>	<b>Tocopherol-Bestimmung.....</b>	<b>45</b>
<b>3.28</b>	<b>Medien, Puffer, Lösungen und Stammlösungen.....</b>	<b>46</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>52</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Etablierung des Versuchssystems und physiologische Charakterisierung von Primärblättern der Gerste während der natürlichen Blatt- seneszenz und nach Exposition der Pflanzen mit den Schwermetallen Cadmium und Kupfer.....</b>	<b>52</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Charakterisierung des Schwermetallstress.....</b>	<b>54</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Einfluss von Kupfer- und Cadmium auf die <math>\alpha</math>-und <math>\gamma</math>-Tocopherolsynthese.....</b>	<b>57</b>
<b>4.2.</b>	<b>Metallothioneine.....</b>	<b>59</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Isolation von Gersten Metallothionein cDNAs und Charakterisierung der Genexpression.....</b>	<b>59</b>
<b>4.2.1.1</b>	<b>Isolation von Gersten Metallothionein cDNAs.....</b>	<b>59</b>

4.2.1.2 Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen der isolierten Gersten MTs mit bekannten MTs der Familie der Poaceen.....	63
4.2.1.2 Expressionsanalysen der identifizierten MTs in Primärblättern nach Schwermetallexposition und während der natürlichen Blattseneszenz.....	67
4.2.1.3 Vergleich der Genexpression von <i>HvMT-1a</i> und <i>HvMT-2a</i> bei 48h Exposition mit einer 2,5mM Kupferchloridkonzentration.....	71
4.2.1.4 Vergleich der Genexpression von <i>HvMT-1a</i> und <i>Ids-1</i> in Wurzeln und Primärblättern nach 48h Cd-Exposition.....	72
4.2.1.5 Genexpression von <i>HvMT-1a</i> nach längerer Cd-Exposition (0-96h).....	73
4.2.1.7 Metallothionein-Expression nach Exposition mit anderen Schwermetallen....	75
4.2.2 Nachweis von Metallothioneinen auf Proteinebene.....	77
4.2.2.1 Auftrennung von cysteinreichen Proteinen mittels Gelchromato- graphie .....	77
4.2.2.2 Bestimmung des Cadmiumgehaltes der durch SEC aufgetrennten Protein- fraktionen mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie (GF-AAS).....	79
4.2.2.3 Sensitive Auftrennung der mutmaßlichen MT-Proteinfraktion mittels Kapillar-Zonen-Elektrophorese .....	80
4.3. Phytochelatin-Synthase /Phytochelatine.....	83
4.3.1 Isolation von cDNA-Fragmenten der Phytochelatin-Synthase (PCS) aus Primärblättern der Gerste.....	83

4.3.2	Analyse zur Genexpression der PCS.....	84
4.3.3	Isolation und Identifikation von Phytochelatinen mittels HPLC.....	87
4.4	Faktoren der Kupferhomöostase: <i>CCH</i> und <i>BCB</i> .....	88
4.4.1	Isolation von cDNAs codierend für mögliche Faktoren der Kupferhomöostase: <i>CCH</i> und <i>BCB</i> .....	88
4.4.2	Expressionsanalysen von <i>HvBCB</i> und <i>HvCCH</i> in Primärblättern nach Schwermetallexposition und während der natürlichen Blattseneszenz...	91
4.5	Identifikation von cadmiuminduzierten Genen.....	92
4.5.1	Isolation von cDNAs nach 48 h Cadmiumexposition mittels Restriction Fragment Differential Display-PCR (RFDD-PCR).....	92
4.5.2	Sequenzvergleiche der mittels RFDD-PCR erhaltenen cDNA-Fragmente.....	94
4.5.3	Expressionsanalysen von isolierten cDNA-Fragmenten mittels RFDD-PCR in Primärblättern nach Schwermetallexposition und während der natürlichen Blattseneszenz.....	97
5.	Diskussion.....	98
5.1	Allgemeine Betrachtung.....	98
5.2	Physiologische Charakterisierung.....	99
5.3	Tocopherole.....	100

<b>5.4</b>	<b>Phytochelatine.....</b>	<b>103</b>
<b>5.5</b>	<b>Metallothioneine.....</b>	<b>106</b>
<b>5.5.1</b>	<b>Identifikation / Genexpressionsmuster.....</b>	<b>106</b>
<b>5.5.1.1</b>	<b>Typ 1 Metallothioneine.....</b>	<b>108</b>
<b>5.5.1.2</b>	<b>Typ 2 Metallothioneine.....</b>	<b>112</b>
<b>5.5.1.3</b>	<b>Typ 3 Metallothioneine.....</b>	<b>114</b>
<b>5.5.1.4</b>	<b>Typ 4 Metallothioneine.....</b>	<b>117</b>
<b>5.5.2</b>	<b>Metallothioneine: Klassifizierung und Nomenklatur.....</b>	<b>118</b>
<b>5.5.3</b>	<b>Metallothioneine auf Proteinebene.....</b>	<b>120</b>
<b>5.5.4</b>	<b>Zusammenfassung der MT-Ergebnisse.....</b>	<b>122</b>
<b>5.6</b>	<b>Kupferbindende Proteine CCH und BCB.....</b>	<b>124</b>
<b>5.6.1</b>	<b>Copper Chaperon (CCH).....</b>	<b>124</b>
<b>5.6.2</b>	<b>Blue-Copper-Binding-Protein (BCB).....</b>	<b>125</b>
<b>5.7</b>	<b>Cadmiuminduzierte RFDD-PCR cDNA-Fragmente.....</b>	<b>126</b>
<b>5.7.1</b>	<b><i>Cdi1</i>.....</b>	<b>127</b>
<b>5.7.2</b>	<b><i>Cdi2</i>.....</b>	<b>129</b>

<b>5.7.3</b>	<b><i>Bsi1</i></b> .....	<b>129</b>
<b>5.7.4</b>	<b><i>Cdi4</i></b> .....	<b>130</b>
<b>5.7.5</b>	<b><i>Cdi5</i></b> .....	<b>131</b>
<b>5.7.6</b>	<b><i>Cdi6</i></b> .....	<b>132</b>
<b>5.7.7</b>	<b><i>Cdi7</i></b> .....	<b>133</b>
<b>5.7.8</b>	<b>Zusammenfassung der mittels RFDD-PCR isolierten cDNA-Fragmente.....</b>	<b>133</b>
<b>5.8</b>	<b>Cadmiumstress, oxidativer Stress, Seneszenz.....</b>	<b>134</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>137</b>
<b>6.</b>	<b>Summary.....</b>	<b>140</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>143</b>

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Verwendete Abkürzungen werden in der Regel im Text nachfolgend erklärt. Die hier aufgeführten Abkürzungen wurden im Text i.d.R. nicht weiter erläutert. Außerdem wurde auf die Erklärung von „dudenkonformen“ Abkürzungen, sowie Maßeinheiten, die auf dem SI-System beruhen, verzichtet.

Englische Termini, für welche es keine gebräuchlichen deutschen Ausdrücke gibt und die mittlerweile Eingang in die deutschsprachige Fachliteratur gefunden haben, wurden als solche beibehalten. So wird zum Beispiel für den Begriff Oligonukleotid das gebräuchlichere englische Wort *Primer* verwendet.

Abkürzungen für Gene sind kursiv geschrieben (z.B. *CCH*), die Abkürzungen der Proteine hingegen aufrecht (z.B. CCH). Die Groß- und Kleinschreibung dieser Abkürzungen erfolgte in Anlehnung an die Originalliteratur und ist daher nicht einheitlich (z.B. *Atx1*, *OsMT-2*).

aa	Aminosäure(n)
AAS	Atomic Absorbance Spectroscopy
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
cDNA	"copy DNA" (DNA, welche aus RNA durch reverse Transkription entsteht)
CZE	Capillary Zone Electrophoresis
d	day(s) (Tag(e))
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dUTP	desoxyUridin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-Essigsäure
ESI-MS	Electrospray Ionisation –Mass Spectrometry
EST	cDNA-Fragment (" <u>e</u> xpressed <u>s</u> equen <u>ce</u> <u>t</u> ag")
et al.	<i>et alii</i> (lateinisch für "und andere")
FW	fresh weight (Frischmasse)

GFP	Green Fluorescent Protein
GSH	Glutathion
h	hour(s) (Stunde(n))
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICP-MS	Inductively-Coupled-Plasma Mass-Spectrometry
LHC	Light Harvesting Complex
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
MT	Metallothionein
NCBI	National Center for Biotechnology Information ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> )
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von X nm
OEC	Oxygen Evolving Complex
PC	Phytochelatin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PS	Photosystem
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	Reversed Phased High Performance Liquid Chromatography
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Size Exclusion Chromatography
UE	Untereinheit
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
UV	ultraviolett
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
VT	Volumenteil
w/v	Masse pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid
xg	~faches der Erdbeschleunigung $g = 9,81 \text{ m s}^{-1}$

## 1. Einleitung

### 1.1 Schwermetalle: Definition, natürliche Vorkommen und Bioverfügbarkeit

Die Definition für Schwermetalle ist in der Literatur nicht einheitlich. Die Gruppe der den Schwermetallen zuzuordnenden chemischen Elemente ist inhomogen und weist nur wenig biochemische Gemeinsamkeiten auf. Als ein Charakteristikum wird im Allgemeinen eine Dichte von größer als  $5 \text{ g cm}^{-3}$  angegeben, wie z.B. Nickel ( $8,7 \text{ g cm}^{-3}$ ), Zink ( $7,1 \text{ g cm}^{-3}$ ), Kupfer ( $8,9 \text{ g cm}^{-3}$ ) oder Cadmium ( $8,6 \text{ g cm}^{-3}$ ). Obwohl Aluminium mit einer Dichte von nur  $2,7 \text{ g cm}^{-3}$  nicht zu den Schwermetallen gezählt wird, spielt es aufgrund seines häufigen Vorkommens eine wichtige Rolle für die Aufnahme und damit für die Toxifikation von lebenden Systemen. Schwermetalle sind mit Ausnahme von Quecksilber und den sehr selten vorkommenden Metallen Cäsium und Gallium unter Normalbedingungen Feststoffe. Natürlich kommen Schwermetalle als freie Ionen, meist aber löslich oder unlöslich an Liganden (Oxide, Sulfate, Sulfide, Carbonate) gebunden im Boden vor.

Zwar beträgt der Anteil an Schwermetallen (u.a. As, Cd, Co, Cu, Cr, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, Zn) weniger als 1 % der Erdkruste, doch sind durch anthropogene Umwelteinflüsse wie den Emissionen aus der Verbrennung fossiler Brennstoffe, dem Bergbau, der Eisen- und Stahlindustrie, der chemischen Industrie oder auch der Ausbringung von Klärschlamm weltweit große Flächen mit bestimmten Schwermetallen um ein Vielfaches gegenüber dem natürlichen Vorkommen angereichert. Diese Anreicherung von Schwermetallen ist aufgrund ihrer Persistenz ein ernstzunehmendes Problem. Da Schwermetalle nicht abgebaut werden können, kommt es unter anderem zu einer starken Belastung in Gliedern von Nahrungsketten-Endverbrauchern.

Für Pflanzen hängt die Verfügbarkeit von Metallen aus dem Boden von drei Faktoren ab. Erstens bestimmt die Bodenbeschaffenheit, inwieweit Schwermetalle im Boden fixiert werden können. Als zweiter Faktor kommt hinzu, in welchem Maße Metalle im Boden frei verfügbar sind, bzw. als lösliche Verbindungen vorkommen und nicht Teil unlöslicher Verbindungen sind (z.B. Kupferoxid) (Norvell 1991). Zum Dritten hängt die Verfügbarkeit stark vom pH-

Wert des Bodens ab. Sie nimmt mit der Erniedrigung des pH-Wertes exponentiell zu (Hartner 1983).

## **1.2. Schwermetalle als Lebensnotwendigkeit und als Gefahrenpotenzial**

Leben bedingt die Fähigkeit, lokal begrenzt, kontrolliert chemische Reaktionen durchführen zu können. In letzter Konsequenz könnte man Leben sogar auf eine fein regulierte Verschiebung von elektrischen Ladungen reduzieren. Daraus lässt sich erkennen, wie essentiell z.B. Redoxreaktionen für lebende Zellen sind. Schwermetalle wie Eisen oder Kupfer sind aufgrund ihrer Redoxeigenschaften in der Regel integrale Bestandteile von Enzymen der Elektronen-Transport-Ketten. Eisen ist entweder zentral in Hämgruppen gebunden (z.B. Cytochrom c) oder in Fe/S Komplexe integriert (z.B. NADH-Q-Reduktase).

Wie Eisen ist auch Kupfer ein essentieller Bestandteil einer Vielzahl von Elektronentransportsystemen, wie beispielsweise zusammen mit Eisen in der mitochondrialen Cytochrom-Oxidase oder als alleiniger Cofaktor im pflanzlichen Plastocyanin. Ungefähr ein Drittel aller Enzyme beinhalten Metalle wie z.B. Zink in RNA-Polymerasen, DNA-Transkriptionsfaktoren oder der cytosolischen Superoxid-Dismutase (SOD1).

Doch neben der essentiellen Funktion von Schwermetallen als Elektronenakzeptoren oder -donatoren, birgt ihre Gegenwart auch ein hohes Risiko. Freie Schwermetallionen besitzen eine enorm hohe Toxizität. Phänotypisch lässt sich eine toxische Schwermetallexposition von Pflanzen an zunehmenden Chlorosen bis hin zu Nekrosen beobachten (siehe dazu Prasad und Strzalka 1999). Außerdem kommt es zu einer Inhibierung der Blattentwicklung und vor allem des Wurzelwachstums (Marschner 1995, Matsumoto 2000).

Auf zellulärer Ebene können freie Metallionen wie Kupfer Thiolbindungen in Proteinen oxidieren und damit deren Sekundärstruktur auflösen (Himmelblau und Amasino 2000).

Durch Substitution der natürlicherweise im aktiven Zentrum bestimmter Enzyme vorkommenden Metalle mit anderen Schwermetallen können Enzymaktivitäten inhibiert bzw. sogar restlos ausgeschaltet werden. Beispielsweise wird Calcium bevorzugt durch Cadmium-

ionen substituiert. Über die Fenton-Reaktion können freie redoxaktive Metalle wie Eisen und Kupfer reaktive Sauerstoffspezies (ROS) generieren. Unter anderen zeigten Halliwell und Gutteridge (1984), dass Hydroxylradikale, für die es keine enzymatischen Entgiftungsmechanismen gibt (Belles-Boix und Inze 2002), erhebliche Schäden an Lipiden, Proteinen sowie der DNA verursachen.

Die Auswirkungen von toxischen Konzentrationen von Kupfer, Nickel, Zink oder nichtessentiellen Metallionen wie Cadmium auf den Chloroplasten sind besonders hoch. Dieses liegt unter anderem an der sehr komplexen, hochregulierten Struktur der Thyllakoide, die eine große Menge an metallbindenden Faktoren enthalten (z.B. LHCS, PS II, Plastocyanin [membranassoziiert], Cytochrom  $b_6/f$ , OEC [membranassoziiert], PS I). Zum einen führt eine Substitution der in den photosynthetischen Elektronentransport involvierten Metalle (z.B. Cu, Fe, Mn, Mg) durch andere Metalle zu einer Inhibierung der jeweiligen Komponente des Photosyntheseapparates, zum anderen führen Störungen in der Energieweiterleitung immer zu einer potentiellen Bildung von ROS.

Als Beispiele für Schadwirkungen auf den Chloroplasten sollen hier nur die Wirkungen von Cadmium auf Chlorophylle, bei dem es zu einer Substitution des zentral gebundenem Mg-Atoms durch Cadmium kommt (Kupper et al. 1996) und die Inhibierung der RuBisCO (Ribulose-Bisphosphat-Carboxygenase/Oxygenase) durch toxische Schwermetalle (Malik et al. 1992) genannt werden. Eine weiterführende Lektüre bieten dazu Prasad und Strzalka (1999).

Um zum einen eine ausreichende Versorgung mit essentiellen Schwermetallen zu gewährleisten, zum anderen aber toxisch wirkende Metallkonzentrationen zu vermeiden, muss die Metallaufnahme aus der Umwelt, der inter- und intrazelluläre Transport, die Insertion in die Metalloproteine und die Chelatierung von metallhaltigen Abbauprodukten äußerst fein reguliert sein. Diese Abläufe werden unter dem Begriff der Metallhomöostase zusammengefasst.

### 1.3 Vom Boden in die Zelle: Metallaufnahme und Distribution

#### 1.3.1 Aufnahme in die Wurzel

Die Aufnahme von Metallen aus dem Boden erfolgt über die Wurzel. Dabei kann nur die an die Wurzelhaare angrenzende Region (Rhizosphäre) genutzt werden. Doch ist die zur Verfügung stehende Gesamtoberfläche von Wurzelhaaren unglaublich hoch. Für eine einzelne Roggenpflanze (*Secale cereale*) wurde eine Anzahl von  $1,4 \times 10^7$  lebenden Wurzeln einschließlich aller Seitenwurzeln und Verzweigungen errechnet. Diese wiederum tragen  $1,4 \times 10^{10}$  Wurzelhaare, woraus sich schätzungsweise eine Gesamtoberfläche von über  $600\text{m}^2$  ergibt (Dittmer 1937).

Für die verschiedenen Metalle wie Eisen, Kupfer oder Zink stehen der Pflanze unterschiedliche Aufnahmemechanismen zur Verfügung. Die Aufnahme von Eisen ist bisher am besten untersucht worden. Diese erfolgt, je nach Pflanzengattung, durch zwei unterschiedliche Strategien. Alle Pflanzen mit Ausnahme der Süßgräser (*Poaceae*) verfolgen eine sogenannte Typ I-Strategie: Sie pumpen Protonen mit Hilfe von  $\text{H}^+$ -ATPasen über das Plasmalemma der Rhizodermis in die Rhizosphäre, um einen für die Metallaufnahme notwendige elektrische Potentialdifferenz an der Plasmalemmamembran zu erzeugen und durch die Erniedrigung des pH-Wertes Fe(III)-Ionen aus dem Bodenmilieu zu lösen. Fe(III) wird anschließend durch Eisen-Reduktasen (z.B. *FRO2*, *Arabidopsis*, Robinson et al. 1999) zu Fe(II) reduziert und über spezifische Transporter (z.B. *IRT1*, *Arabidopsis*, Korshunova et al. 1999) in die Wurzelzelle aufgenommen.

Pflanzen aus der Familie der *Poaceen* verfolgen die sogenannte Typ II-Strategie der Eisenaufnahme, wie sie auch bei Bakterien zu finden ist. Fe(III) wird über ausgeschiedene Phytosiderophore chelatiert und als Fe(III)-Phytosiderophor-Komplexe über einen spezifischen Transporter in den Symplasten der Wurzelzelle aufgenommen (Marschner und Römheld 1994, Curie et al. 2001).

Die Synthese der Phytosiderophore wurde weitgehend in Gerste untersucht. Ausgehend von drei Molekülen S-Adenosyl-L-Methionin, wird durch die Nicotianamin-Synthase (NAS) Nicotianamin synthetisiert (Kawai et al. 1988, Shojima et al. 1989). Anschließend wird durch die Nicotianamin-Aminotransferase (NAAT) eine Aminogruppe transferiert, wodurch nach

Hydroxylierung am Carboxylende die reduzierte 2'-Deoxymugin-Säure (DMA) gebildet wird, welche durch nachfolgende Hydroxylierung in die Muginsäure (MA) überführt wird (Kawai et al. 1988, Shojima et al. 1989).

Interessanterweise wurden im Zuge der Arbeiten zur Aufklärung der Biosynthese der Muginsäure (MA) mittels substraktiver Hybridisierung nicht nur die Gene *Ids2* (Dioxygenase) und *Ids3* (MA-Synthase) identifiziert, die für die Synthese von Muginsäure verantwortlich sind, sondern auch *Ids1*, das erste für Gerste beschriebene Metallothionein (Okumura et al. 1991, 1994). Die Aufnahme von Fe(III)-Phytosiderophor-Komplexen in den Symplasten der Wurzeln erfolgt über einen spezifischen Transporter (*Ys1*), welcher 2001 von Curie et al. in Mais identifiziert wurde. Die weiteren Transportwege von Eisen oder auch anderen Metallen innerhalb des Wurzelgewebes sind vielfach noch unverstanden. Eine Sequestrierung von Metallen beginnt bereits in der Wurzelzelle, indem z.B. Eisen über einen ABC-Transporter in die Vakuole aufgenommen wird (Yamaguchi et al. 2002).

### **1.3.2 Xylem-Transport**

Für den Weitertransport von Metallen aus dem Symplasten der Wurzelzellen in das Xylem wird eine symplastische Beladung des Xylems diskutiert (Clemens et al. 2003). Die dafür verantwortlichen Transporter bedürfen noch der Identifikation. Bekannt ist bisher nur ein spezifischer Transporter, der Kaliumionen in das Xylem transferiert (Gaymard et al. 1998).

Mit Fe(III) beladene Phytosiderophore wurden von Kawai et al. (2001) im Xylem identifiziert. Die spätere Entladung von Metallen aus dem Xylem ist ebenso wie die Beladung jedoch noch weitgehend unklar.

### **1.3.3 Aufnahme von Cadmium**

Cadmium ist für lebende Systeme ein ausschließlich toxisches Schwermetall. Obwohl es mit großer Wahrscheinlichkeit keine cadmiumspezifischen Aufnahmesysteme gibt, kommt es doch zu einer Aufnahme von Cadmium. Der Grund hierfür liegt in der geringen Spezifität von

Metalltransportern, die oft nicht zwischen verschiedenen divalenten Kationen unterscheiden können. So konnte z.B. gezeigt werden, dass ein in Weizen (*Triticum aestivum*) identifizierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter (*LCT1*, low-affinity calcium transporter), nach Expression in Hefe zu einer Aufnahme von Cadmium führte (Clemens et al. 1998).

Zu den bisher am besten charakterisierten Transportern zur Schwermetall-Aufnahme gehören Proteine der ZIP-Familie, zu denen auch die IRTs (Iron-uptake-Transporter) gehören. Transporter der ZIP-Familie sind in einer Vielzahl von Organismen beschrieben worden, in Arabidopsis wurden bis dato acht ZIP-Transporter identifiziert (u.a. *IRT1*, *ZIP1-ZIP4*). In Hefe exprimiert, vermitteln IRTs nicht nur eine Aufnahme von Eisen, sondern auch von anderen Metallen wie Cadmium (Eide et al. 1996, Fox et al. 1998, Korshunova et al. 1999).

### **1.3.4 Zelluläre Metallaufnahme und Distribution**

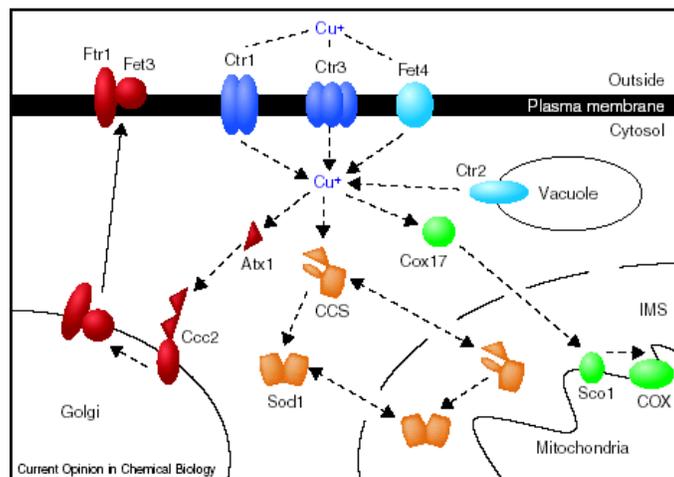
Die Aufnahme und Distribution von Metallen innerhalb eukaryontischer Zellen ist bisher ebenfalls nur unvollständig geklärt. Als Modellorganismus für die zelluläre Distribution in Eukaryonten wird Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) verwendet (siehe Abb. 1). Doch auch bei Hefe liegt für die am besten untersuchten Metalle Eisen und Kupfer noch kein vollständiges Bild vor. Literaturdaten belegen, dass intrazellulär mehrere Faktoren an der Bindung, am Transport und an der Entgiftung der Schwermetalle beteiligt sind, die über komplexe Wechselwirkungen miteinander interagieren (siehe dazu Puig und Thiele 2002, Freitas et al. 2003).

Obwohl in Bäckerhefe eine große Anzahl von Eisen- und Eisen-Kupfer-Aufnahmesystemen gut untersucht sind (siehe dazu Freitas et al. 2003), ist die zelluläre Eisendistribution noch weitgehend ungeklärt. Jensen und Culotta (2000) konnten erstmals zwei Eisenchaperone (*ISA1* und *ISA2*) identifizieren, die an der mitochondrialen Eisenversorgung beteiligt sind und im IMS (Inter-Membran-Raum) der Mitochondrien (*Isa2*) bzw. in der mitochondrialen Matrix lokalisiert (*Isa1*) sind. Besser untersucht ist in Hefe die zelluläre Distribution von Kupfer, die hier kurz skizziert werden soll (Abb. 1).

Kupfer wird über Reduktasen (z.B. Fre1, Fre2) von Cu(II) zu Cu(I) an der Außenseite des Plasmalemmas reduziert und über Aufnahmesysteme in die Zelle transportiert. Abhängig von der extracytosolischen Kupferkonzentration stehen entweder „Low-affinity“- (z.B. Fet4) oder „High-affinity“-Transporter (z.B. Ctr1, Ctr3; *Arabidopsis* Copt1 und Copt2, Kampfenkel et al. 1995, Sancenon et al. 2003) zur Verfügung. Der genaue Mechanismus der Weitergabe an zelluläre Chaperone ist unklar, vermutet wird aber eine direkte Beladung von spezifischen Metall-Chaperonen an der Membran-Innenseite (Field et al. 2002). Cytosolische Eisen-chaperone sind derzeit nicht bekannt. Die Lokalisation der bekannten Eisenchaperone Isa1 und Isa2 ist auf die Mitochondrien beschränkt (Jensen und Culotta 2000).

Für *Saccharomyces cerevisiae* wurden bisher drei Kupferchaperone identifiziert, die für die organellspezifische Kupferversorgung zuständig sind (siehe Überblicksartikel von Puig und Thiele 2002): Atx1 ist ein Kupferchaperon (*Arabidopsis* CCH, Himelblau et al. 1998), welches Kupfer an einen ABC-Transporter (Ccc<sub>2</sub>) im sekretorischen Apparat (Golgi-Apparat) liefert. CCS, ein weiteres Kupferchaperon, versorgt spezifisch die cytosolische Cu/Zn Superoxid-Dismutase (Sod1) mit Kupfer.

Schließlich wurde mit dem Chaperon Cox17 ein Kupferlieferant für Sco1 identifiziert, ein Protein, welches in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert ist und exklusiv für die Distribution von Kupfer an die Cu<sub>A</sub>-Untereinheit (Cox2) der Cytochrom-Oxidase (COX) verantwortlich ist (Punter und Glerum 2003).



**Abb. 1** Modell der zellulären Kupferdistribution in dem eukaryotischen Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (aus Puig und Thiele 2002). Erklärung siehe Text.

## 1.4 Zelluläre metallbindende Faktoren in Pflanzen

### 1.4.1 Metallothioneine

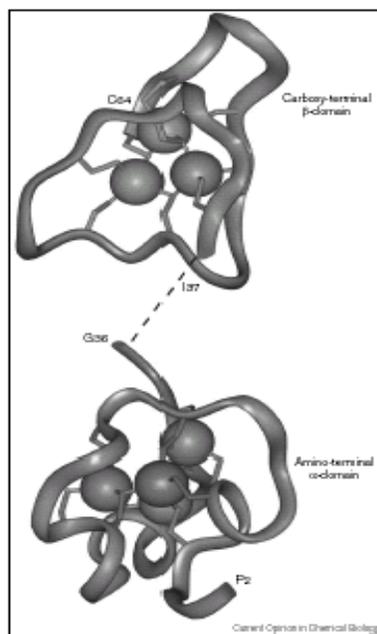
Neben den oben beschriebenen hochspezifischen Metallchaperonen gibt es weitere metallbindende Faktoren, zu denen auch die cysteinreichen Metallothioneine und Phytochelatine gehören. Welche Rolle diese Faktoren im Rahmen der Aufrechterhaltung der Metallhomöostase spielen, ist aber noch unklar. Sie könnten neben einer Funktion als Metallchaperone auch als Puffer fungieren, in dem Metalle temporär gespeichert werden. Neben Phytochelatinen und Metallothioneinen sind zudem weitere Metabolite mit niedrigem Molekulargewicht wie beispielsweise Glutathion (GSH), Citrat, Histidin, oder Nicotianamin in die Metallhomöostase involviert.

Metallothioneine (MTs) wurden erstmals 1957 als cadmiumbindende Proteine in Pferdenieren identifiziert (Margoshes und Vallee) und seitdem in einer Vielzahl von Säugetieren (*Mammalia*) nachgewiesen. Diese 60-68 Aminosäure langen Peptide mit einem Molekulargewicht von 6-7 kDa weisen einen Cysteingehalt von bis zu 30 % auf. In den Geweben der Säugetiere (*Mammalia*) kommen vier verschiedene MTs (MT 1-4) vor, die aufgrund nur geringfügiger Substitutionen von Aminosäuren im Peptid nicht in Typen, sondern in Isoformen unterteilt werden. Die Isoformen MT-1 und MT-2 kommen in allen Geweben vor, MT-3 Isoformen vorwiegend im Gehirn, und das Vorkommen der Isoform 4 (MT-4) ist auf bestimmte Epithelzellen beschränkt ist (siehe dazu Vasak und Hasler 2000). Die Isoformen 2-4 von humanen Metallothioneinen werden jeweils durch ein einzelnes Gen repräsentiert, für MT-1 Isoformen ist allerdings ein Gencluster mit dreizehn MT-1 Isoformen bekannt, wobei alle MTs einer differentiellen Genexpression unterliegen (Quaife et al. 1994). Traditionell werden die MTs der Säugetiere als Klasse I MTs bezeichnet. Sie weisen keine aromatischen Aminosäuren auf und besitzen 20 hochkonservierte Cysteine, die auf eine aminoterminal Domäne mit neun, bzw. auf eine carboxyterminale Domäne mit elf Cysteinen verteilt sind.

Die Chelatierung von freien Metallionen erfolgt durch die Thiolgruppen der Cysteinreste der MTs. Das metallfreie, in seiner Sekundärstruktur nahezu ungefaltete Apoprotein (Thionein)

erfährt durch die Metallbindung eine charakteristische Faltung der Cysteindomänen in eine hantelähnliche Struktur und wird als Metallothionein bezeichnet (siehe Abb. 2). NMR-Studien von humanen MTs (Faller et al. 1999), MT aus Mäusen (Zangger et al. 1999) oder dem Seeigel *Strongylocentrotus purpuratus* (Riek et al. 1999) konnten diese hantelförmige Struktur belegen und zudem zeigen, dass MTs der Klasse I eine Bindung mit sieben Metallionen ( $\text{Me}^{\text{II}}_7\text{-MT}$ ) eingehen, wobei die essentiellen Metalle Kupfer und Zink sowie die rein toxischen Metalle Cadmium und Quecksilber als Bindungspartner beschrieben sind (Suhy et al. 1999).

Metallbindungsstudien des humanen MT-2 konnten zeigen, dass diese MT-Isoform eine sehr hohe Affinität zu Zink aufweist ( $K_{\text{Zn}} = 3,2 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$  bei pH 7,4; Jacob et al. 1998). Im Falle von Cadmium ist dieser Wert sogar noch um den Faktor 10.000 ( $K_{\text{Cd}} = 3,2 \times 10^{17} \text{ M}^{-1}$  bei pH 7,4; Jacob et al. 1998) erhöht. Dieses führt dazu, dass an Metallothioneine gebundene Zinkionen ( $\text{Zn}_7\text{-MT}$ ) vollständig durch Cadmiumionen ( $\text{Cd}_7\text{-MT}$ ) substituiert werden können (Zangger et al. 1999). Unvollständige Substitutionen führen dagegen zu Mischformen von Metallbeladungen, wie ein beschriebenes  $\text{Cd}_5\text{Zn}_2\text{-MT-2}$  aus Kaninchen (Jacob et al. 1998) verdeutlicht.



**Abb. 2** Dreidimensionale NMR Struktur des  $\text{Cd}_7\text{-MTA}$  aus dem Seeigel *Strongylocentrotus purpuratus* (Riek et al. 1999). Die Aminosäuren 2-36 bilden ein aminoterminales  $\text{Cd}_4\text{Cys}_{11}$ -Cluster, die Aminosäuren 37-64 das  $\text{Cd}_3\text{Cys}_9$  Cluster des Carboxyterminus. Die gestrichelte Linie zwischen beiden Domänen resultiert aus fehlenden NMR Informationen über Orientierung der Domänen zueinander (aus: Vasak und Hasler, 2000).

Aufgrund der enorm hohen Bindungsaffinitäten der MTs zu Zink oder Cadmium schien es zunächst undenkbar, dass MTs auch zu einer Abgabe von chelatierten Metallen an Apoproteine von z.B. zinkhaltigen Enzymen in der Lage sind. Daher wurden MTs zunächst nur als reine Komponenten der Metalldetoxifikation betrachtet. Doch MTs vermögen durchaus chelatierte Metallionen wieder freizusetzen. In *in vivo* spielt dabei vermutlich der Redoxstatus der Zelle eine wichtige Rolle, da in *in vitro* zahlreiche Autoren zeigen konnten, dass erhöhte Mengen an Disulfiden im Medium zu einer Freisetzung von gebundenen Metallen aus Metallothioneinen führen. Dabei untersuchten die Autoren auch den Einfluss von dem für den Redoxstatus der Zelle verantwortlichen Verhältnis von Gluthation (GSH) zu seiner oxidierten Form (GSSG) (Jacob et al. 1998, Jiang et al. 1998, Maret und Vallee 1998).

Übereinstimmend zeigte sich dabei, dass MTs sowohl Metalldonator als auch -akzeptor sind und die unterschiedliche Funktion durch das Verhältnis durch GSH/GSSG beeinflusst wird. Daraus ergibt sich folgendes Gleichgewicht:



Die eigentliche Funktion der bisher am besten charakterisierten Metallothioneine der Vertebraten und Invertebraten lassen sich immer noch nicht eindeutig belegen. Eine Vielzahl von Arbeiten zeigen, dass MTs eine herausragende Position in der Aufnahme, Speicherung und Distribution von Zink an zinkhaltige Enzyme besitzen (siehe dazu Vasak und Hasler 2000). Zink und Cadmium stellen für Genexpression von MT-1 und MT-2 in Säugetieren starke Induktoren dar, wobei für die zinkinduzierte Genexpression ein zinkabhängiger Transkriptionsfaktor (MFT1, Auf der Maur et al. 1999), für die cadmiuminduzierte Genexpression ein *upstream stimulator factor* (USF) verantwortlich ist (Li et al. 1998). Obwohl MTs der Säugetiere auch Kupfer chelatieren, ist sowohl die Struktur als auch die Funktion von kupferbindenden MTs unklar. Eine Rolle dieser MTs für die Versorgung von bestimmten kupferabhängigen Faktoren wird diskutiert (Vasak und Hasler 2000).

Darüber hinaus spielen MTs sowohl während der Detoxifikation von Metallen als auch unter Mangelbedingungen an essentiellen Metallen (Suhy et al. 1999, Vasak und Hasler 2000) eine wichtige Rolle.

Neben den Säugetieren kommen MTs auch in anderen Vertebraten, Invertebraten, bei eukaryotischen Mikroorganismen (Hefe), bei Pilzen, einigen Prokaryoten (Cyanobakterien) sowie bei Pflanzen vor. Die Struktur aller MTs ist dabei nicht einheitlich, doch generell lassen sich MTs als Genprodukte mit einem Molekulargewicht unter 8 kDa, hohem Cysteingehalt und geringem Gehalt an aromatischen Aminosäuren definieren, die eine charakteristische Verteilung von Cysteindomänen aufweisen (siehe auch MT Homepage: <http://www.unizh.ch/~mtpage/intro.html>).

Es ist mehrfach versucht worden, die Vielzahl von MTs im Tier- und Pflanzenreich systematisch einzuordnen. Eine Klassifizierung aller bekannten pflanzlichen MTs wurde zunächst von Robinson et al. (1993) vorgenommen, später durch Rauser (1999) erweitert und schließlich von Binz und Kägi (1999) auf das gesamte MT-Reich übertragen.

In aktuellen Publikationen wird für die Systematik der MTs im Reich der höheren Pflanzen aus Gründen der Einfachheit immer noch die von Robinson et al. (1993) eingeführte und inzwischen erweiterte Nomenklatur verwendet (siehe dazu Cobbett und Goldsbrough 2000, 2002). Danach werden die Metallothioneine in drei bzw. zwei Klassen unterteilt:

Klasse I MTs beinhalten die MTs der Vertebraten, welche 20 hochkonservierte Cysteinreste aufweisen.

Klasse II MTs sind solche, die von dieser Struktur abweichen und beinhalten damit alle MTs der Invertebraten, Pflanzen, Pilze und Prokaryoten.

Phytochelatine wurden von Robinson et al. (1993) noch als Klasse III MTs bezeichnet. Dies entspricht nicht mehr dem Stand der heutigen Sicht, da Phytochelatine keine direkten Genprodukte sind, sondern über Glutathioneinheiten durch die Phytochelatin-Synthase zu Phytochelatin synthetisiert werden (s. u.). In der aktuellen Literatur werden Phytochelatine mittlerweile als solche bezeichnet und nicht mehr zu den MTs gezählt (siehe dazu Cobbett und Goldsbrough 2000, 2002).

Das erste pflanzliche Metallothionein wurde 1983 in Weizenkeimlingen identifiziert (wheat *E<sub>c</sub>*, Hanley-Bowdin und Lane), welches in weiteren Untersuchungen als zinkbindendes Protein charakterisiert wurde (Lane et al. 1987, Kawashima et al. 1992). Seit der Entdeckung eines pflanzlichen MTs vor nunmehr 20 Jahren, wurden eine Vielzahl von schätzungsweise 100

MTs in mono- und dikotyledonen Pflanzen meist in Form ihrer cDNA publiziert. Alle pflanzlichen MTs besitzen eine Länge von 65-85 Aminosäuren<sup>1</sup>. Auffällig ist auch hier der große Anteil von Cysteinen in der Polypeptidkette, welcher bis zu 29 % der im Peptid vorhandenen Aminosäuren ausmachen kann (*Arabidopsis MT1a*, *MT1c*; *Brassica napus LSC 54*).

Diese Vielzahl von pflanzlichen MTs wird in vier Typen unterteilt (Cobett und Goldsbrough 2002). Typ 1 MTs weisen zwei Cysteindomänen mit je sechs Cysteinen (Cys-Xaa-Cys) auf, welche i.d.R. durch einen ungefähr 40 Aminosäure langen cysteinfreien Teil getrennt sind, der als „Spacer“ bezeichnet wird. Wie Typ 1 besitzen auch Typ 2 MTs zwei Cysteindomänen, allerdings mit einer anderen Anzahl von Cysteinresten.

Aminoterminal weisen Typ 2 MTs ein hochkonserviertes aminotermiales Motiv auf (MSCCGGNCGCS) mit einer für Typ 2 charakteristischen Cys-Cys Konformation an aminoterminaler Position 3 und 4 in der Peptidkette. Typ 3 MTs zeigen Ähnlichkeiten mit Typ 1 MTs, besitzen allerdings nur vier Cysteine im Aminoterminal, carboxyterminal jedoch, in der gleichen Konstellation wie Typ 1, weisen Typ 3 MTs sechs Cysteine<sup>2</sup> auf. Typ 4 MTs unterscheiden sich in ihren Cysteindomänen von den anderen drei MT Typen durch eine zusätzliche, dritte Cysteindomäne zwischen den amino- und carboxyterminalen Domänen. Im Gegensatz zu den anderen drei MT Typen, unterscheiden sich die Typ 4 MTs von di- und monokotyledonen Pflanzen nicht in der Anzahl und Verteilung der Cysteinreste.

Durch die zur Verfügung stehenden Genomsequenzen von *Arabidopsis thaliana* und dem der Gerste phylogenetisch eng verwandten Reis (*Oryza sativa*) sowie von Southern-Analysen von vier MTs aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*, Giritch et al. 1998) zeigt sich, dass die verschiedenen MTs nicht auf einem Chromosom liegen, sondern über mehrere Chromosomen verteilt sind. Damit wird deutlich, dass die pflanzlichen MT-Typen und ihre Isoformen nicht durch posttranskriptionelles Spleißen entstehen.

Ein großes Problem stellt immer noch der Nachweis von MTs auf Proteinebene dar. Bis heute sind lediglich das aus Weizen isolierte *E<sub>c</sub>*-MT (Lane et al. 1987, Kawashima et al. 1992) sowie

---

<sup>1</sup> Eine Ausnahme bilden die bisher identifizierten Typ 1 MTs mit je 45 Aminosäuren *Arabidopsis MT1a* und *MT1c* und *Brassica napus LSC 54* sowie das Typ2 MT *B22E* aus Gerste mit 115 Aminosäuren.

<sup>2</sup> *Arabidopsis MT3* weist in der carboxyterminalen Domäne nicht sechs, sondern acht Cysteine auf.

MTs aus *Arabidopsis* (*MT1* und *MT2* Murphy et al. 1997) untersucht worden. Die immunochemischen Arbeiten von Murphy et al. (1997) fußen allerdings auf Metallothionein-GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteinen, die nicht zwischen den jeweiligen Isoformen *MT1a* und *MT1b* bzw. *MT2a* und *MT2b* unterschieden können. Immunochemische Untersuchungen mit dem Weizen MT wurden nicht gemacht. Der Grund für die Schwierigkeiten, spezifische Antikörper gegen die verschiedenen MTs zu generieren, scheint unter anderem an deren Instabilität in der Gegenwart von Sauerstoff zu liegen (Cobett und Goldsbrough 2002).

Die Funktionalität der Genprodukte indessen konnte in einer Reihe von Untersuchungen mittels funktioneller Komplementation belegt werden. Dabei wurden MTs entweder in der Kupfer-MT-defizienten Hefemutante *cup1<sup>Δ</sup>* (Zhou und Goldsbrough 1994, Ma et al. 2003) oder in der Zink-MT-defizienten Grünalge *Synechococcus* (Robinson et al. 1996) exprimiert.

#### **1.4.2 Phytochelatine**

Schon 1921 wurde von Hopkins aus Muskelzellen das Tripeptid Glutathion (GSH:  $\gamma$ -GluCysGly) isoliert. Im Verlauf der weiteren Forschung an Glutathion zeigte sich, dass diese Substanz eine Vielzahl von überaus wichtigen Aufgaben auch in Pflanzen wahrnimmt (siehe dazu Foyer et al. 2001). GSH ist in Pflanzen ein Hauptspeicher an reduziertem Schwefel. Außerdem reguliert es zusammen mit anderen Faktoren wie z.B. Ascorbinsäure als Antioxidant den Redoxstatus der Zelle. Drittens dienen Glutathionkonjugate (GS-X) zur Entgiftung von Schwermetallen und Xenobiotica, welche nach Bindung an GSH über spezifische Transporter in die Vakuole transportiert werden. Und schließlich dienen Glutathione zur Biosynthese von Phytochelatinen, welche als solche von Grill et al. (1985) bezeichnet wurden.

Die Synthese von Phytochelatinen durch eine Transpeptidase wurde von Grill et al. 1989 erstmalig beschrieben, das für die Synthese verantwortliche Enzym Phytochelatin-Synthase (PCS) wurde 1995 von Howden et al. mit Hilfe einer cadmiumsensitiven, Phytochelatin-

defizienten *Arabidopsis*-Mutante (*cad1*) identifiziert. Das Gen der PCS wurde 1999 von drei Arbeitsgruppen unabhängig isoliert (*Arabidopsis*: Ha et al. 1999; Vatamaniuk et al. 1999; Weizen: Clemens et al. 1999). Clemens und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die PCS nicht nur in Pflanzen vorkommt, sondern auch in der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* und der Nematode *Caenorhabditis elegans* eine funktionelle PCS exprimiert wird (Clemens et al. 1999, 2001, Clemens und Simm 2003).

*Arabidopsis thaliana* besitzt zwei Gene für die PCS, *AtPCS1* und *AtPCS2*. Allerdings wird in Blättern und Wurzeln nur die *AtPCS1* exprimiert. Warum es zu keiner nennenswerten Expression von *AtPCS2* kommt, ist bislang unklar (Cazalé und Clemens 2001).

Wie erwähnt, dient GSH als Substrat für Biosynthese von PCs. Dabei werden  $\gamma$ -Glutamylcysteine ( $\gamma$ -GluCys) mit einem abschließenden Glycin verknüpft [ $(\gamma$ -GluCys)<sub>n</sub>-Gly], wobei n = 2-11 ist (Cobbett und Goldsbrough 2002). Werden für die Synthese zwei Glutamylcysteine verbraucht, so wird das entstandene PC als PC<sub>2</sub> bezeichnet, bei drei Glutamylcysteinen als PC<sub>3</sub> usw. Zudem kommt es zu einer Synthese von Isoformen, bei denen als abschließende Aminosäure nicht Glutamat, sondern Glycin, Serin, oder  $\beta$ -Alanin kondensiert werden (Zenk 1996).

## 1.5 Seneszenz und Metallstress

### 1.5.1 Allgemeine Aspekte zur Seneszenz

Im Lebenszyklus von höheren Pflanzen wird die letzte Entwicklungsphase, welche schließlich zum Tod führt, als Seneszenz (lat.: senex = Greis) bezeichnet. Dabei lassen sich verschiedene Typen der Seneszenz charakterisieren (siehe dazu Noodén und Leopold 1988). Süßgräser (*Poaceen*) sterben nach Ablauf einer Vegetationsperiode gänzlich ab (Ganzpflanzen-Seneszenz), während bei Laucharten (*Allium*) zum Beispiel nur die oberirdischen Pflanzenteile absterben. Buchen (*Fagaceen*) zeigen im Herbst eine simultane Blattseneszenz, während Tabak (*Nicotiana*) ein Beispiel für eine sukzessive Blattseneszenz ist.

Starke morphologische, physiologische und molekulare Veränderungen zeichnen die Seneszenz aus. Dabei stellt dieser letzte Entwicklungsschritt der Zellentwicklung einen hochregulierten Prozess dar. Zeichnen sich junge Blätter durch Aufbauprozesse aus, so ist seneszierendes Blattgewebe durch Abbauprozesse von Makromolekülen wie Proteinen, Lipiden oder auch Ribonukleinsäuren charakterisiert.

Phänotypisch lässt sich der Verlauf der Blattseneszenz durch einen zunehmenden Abbau an Chlorophyllen erkennen. Bei einer Bestimmung des Chlorophyllgehaltes an Primärblättern der Gerste während der natürlichen Blattseneszenz zeigt sich, dass der Gehalt an Chlorophyllen unmittelbar nach Erreichen der Blattrife (maximales Wachstum, maximale Photosyntheseleistung) schon wieder kontinuierlich abnimmt (Miersch et al. 2000). Parallel dazu nimmt auch der Gesamtproteingehalt im seneszierenden Blatt ab, was zum einem an einer verstärkten Proteaseaktivität liegt, zum anderen aber auch in der Abnahme der Proteinbiosynthese begründet ist (Noodén et al. 1997). Dabei verläuft der Abbau an Proteinen, wie beispielsweise der unterschiedliche Abbau von Proteinen der Lichtsammelkomplexe LHC II und LHC I (Humbeck und Krupinska 1999), mit einer fein regulierten Kinetik, um bis zu einem späten Zeitpunkt der Seneszenz die zelluläre Homöostase aufrecht erhalten zu können und weiterhin Photosyntheseleistungen zu erbringen (Humbeck et al. 1996).

Der differentielle Abbau von Proteinen des Photosyntheseapparates führt damit auch zu einer Veränderung im Verhältnis von funktionellem Photosystem I und Photosystem II während der Blattseneszenz (Miersch et al. 2000). Die Blattseneszenz geht mit einem bevorzugten Abbau von Photosystem I Komplexen einher, sodass sich das Verhältnis von Photosystem II zu Photosystem I während der Blattseneszenz bei Gerste von 2:1 auf 3:1 verschiebt (Miersch et al. 2000). Messungen zur Effizienz von Photosystem II Einheiten zeigten zudem, dass die verbleibenden PS II Einheiten auch bis zu einem späten Zeitpunkt ihre Funktionalität wahren und es parallel mit dem Zusammenbruch des Wasserhaushaltes auch zu einem Zusammenbruch der PS II Effizienz kommt (Heise 1999, Miersch et al. 2000).

Seneszenzprozesse können zumindest teilweise auch durch Stresssituationen ausgelöst werden. So kommt es z.B. bei einem Trockenstress zu einer verfrühten Blattseneszenz (Noodén et al. 1997). Auch die Reaktionen der Pflanzen auf Schwermetallstress ähneln in

Teilbereichen dem Seneszenzprozess. Eine Exposition der Pflanzen mit toxischen Konzentrationen an Cadmium führt ebenfalls zu einer Abnahme im Chlorophyllgehalt und zu Beeinträchtigungen der Photosynthesefunktionen, sowie zu seneszenztypischen Veränderungen in der chloroplastidären Ultrastruktur (McCarthy et al. 2001).

Die während der Blattseneszenz aus dem sukzessiven Abbau von Chloroplasten und anderen Zellkomponenten gewonnenen Mengen an Stickstoff, Kohlenstoff, Schwefel oder Phosphor werden remobilisiert und in jüngere, sich entwickelnde Gewebe transportiert. Der aus dem Proteinabbau mobilisierte Stickstoff zum Beispiel wird in Form von Glutamin oder Asparagin über das Phloem der Pflanze von seneszierenden Blatteilen hin zu jüngeren Geweben transportiert (Simpson und Dailing 1981, Kamachi et al. 1992).

Auch Schwermetalle wie Eisen, Kupfer, Mangan oder Zink werden beim Abbau von Metalloproteinen während der Blattseneszenz freigesetzt. Zahlreiche Autoren konnten für Kupfer die Remobilisation aus seneszierenden Pflanzenteilen und den Transfer in andere Teile der Pflanze zeigen (Mauk and Noodén 1992, Drossopoulos et al. 1994, 1996, Hocking 1994). Es ist daher anzunehmen, dass es während der natürlichen Blattseneszenz zu einem entwicklungsbedingten Schwermetallstress kommt.

### **1.5.2 Regulation der Seneszenz**

Die der Seneszenz zugrunde liegenden Regulationsmechanismen sind immer noch weitgehend unklar. Da es sich bei der Seneszenz um einen vielschichtigen, komplexen Prozess handelt, der mit dem Begriff Seneszenzsyndrom beschrieben wird, ist es nicht möglich, die Steuerung der Seneszenz auf nur einen Faktor zu reduzieren. So hängt der Beginn der Blattseneszenz nicht allein vom Alter des Blattes ab, sondern kann, wie oben schon beschrieben, durch Stress wie Dunkelheit, Pathogenbefall oder Trockenheit induziert werden (Smart 1994, Kleber-Janke und Krupinska 1997, Bleecker et al. 1997, Humbeck und Krupinska 2003).

Mittlerweile wurde eine Vielzahl von Genen isoliert, die während der Seneszenz hochreguliert werden (SAG: senescence associated genes). Andere Gene wie z.B. viele Photosynthesegene werden während der Seneszenz herunter reguliert. Allerdings kommt es während der

Seneszenz zu einem massiven Abbau von RNA, sodass es bei Untersuchungen zu Änderungen von Transkriptmengen schwierig ist, zwischen Transkripten zu unterscheiden, welche neu transkribiert wurden und solchen, welche einem verzögerten Abbau unterliegen. *Run-On*-Untersuchungen zeigten jedoch, dass einige der während der Seneszenz beobachteten Veränderungen im Gehalt bestimmter Transkripte tatsächlich auf der Ebene der Transkription reguliert sind (Krause et al. 1998). Zu den bisher identifizierten SAGs gehören eine Vielzahl von katabolen Enzymen wie Proteasen, Lipasen oder RNasen (siehe dazu Quirino et al. 2000), dazu gehören aber auch interessanterweise Metallothioneine als metallbindene Faktoren (Buchanan-Wollaston und Ainsworth 1997, Guo et. al. 2003).

## 2. Zielsetzung

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

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

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

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

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

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

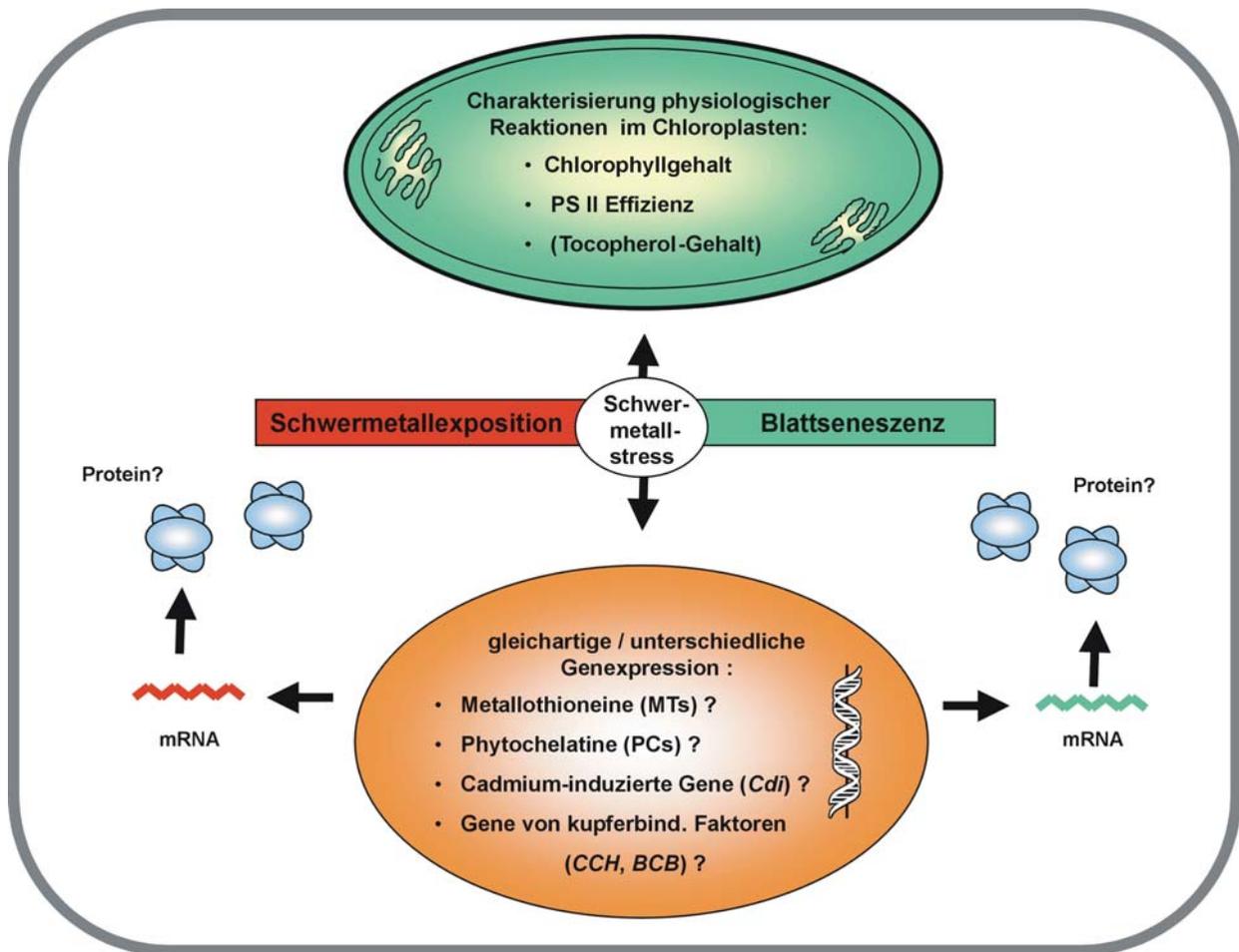
In weiteren Studien sollten die Expressionsmuster der so identifizierten, möglicherweise an der Schwermetallhomöostase und Schwermetallentgiftung beteiligten Gene analysiert werden. Dabei sollten zwei Zustände untersucht werden:

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

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

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

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



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

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Pflanzenanzucht und Exposition mit Schwermetallen

Saatgut der Sommergerste (*Hordeum vulgare* L. cv. Steffi) wurde auf Perlite® ausgesät, mit MS-Medium gewässert und unter konstanten Wachstumsbedingungen (16 h: 21 °C, 100  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; 8 h: 16 °C, 0  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 60 % rel. Luftfeuchtigkeit) in einem Klimaschrank (KBWF 720 - WTS Binder Labortechnik GmbH, Tutlingen, Deutschland) angezogen. Für die Schwermetallbegiftung wurden zehn Tage nach Aussaat je 50 Keimlinge in Bechergläser mit Watte transferiert und mit schwermetallhaltigen Lösungen inkubiert. Die Schwermetalle wurde als folgende Salze in MS-Medium (Murashige-Skoog Medium, St. Louis, MO, USA,) gelöst:

Cadmium:  $\text{CdCl}_2$ , Kupfer:  $\text{CuCl}_2$ , Eisen:  $\text{FeSO}_4$ , Nickel:  $\text{NiCl}_2$ , Aluminium:  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ , Zink:  $\text{ZnCl}_2$ .

Im Falle von Eisen wurden Fe(III)-Ionen durch Titration mit gesättigter Zitronensäure chelatiert. Der daraus resultierende pH-Wert von 2,2, bedingte eine mitgeführte Wasserkontrolle, deren pH-Wert ebenfalls auf 2,2 eingestellt wurde. Dieses gilt für die Versuche in Kapitel 4.2.1.7 beschrieben.

Für die Untersuchung von Kupfer- und Cadmiumstress wurden die Pflanzen 48 h schwermetall-exponiert, für alle anderen Metalle wurden 72 h Schwermetall-expositionen gewählt. Kontrollen wurden mit denselben Lösungen ohne zugesetzte Schwermetalle exponiert. Primärblätter wurden nach Schwermetall-exposition in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

Für die Untersuchungen zur natürlichen Blattseneszenz wurden Gerstenpflanzen in Mitscherlich-Gefäßen auf Erde angezogen, welcher mit  $4\text{ g l}^{-1}$  Chrysal-Langzeitdünger (Multicote, Paka & Chrysal, Naarden, Niederlande) versehen war und unter den oben genannten Bedingungen geführt. Primärblätter wurden 9, 21 und 39 Tage nach Keimung geerntet und unmittelbar danach in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

### **3.2 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes**

Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes beruhte auf einer Transmissionsmessung an intakten Blättern. Dazu wurde ein SPAD-Analyzer (Soil Plant Analysis Development, Minolta / Hydro Agri, Dülmen, Deutschland) eingesetzt, welcher die Transmission von Wellenlängen misst, die von Chlorophyllen absorbiert werden. Pro Blattfläche wird hierbei ein relativer Chlorophyllgehalt ermittelt. Kalibrierungsexperimente zeigten für Gerstenblätter, dass die relativen SPAD-Werte über einen großen Bereich linear vom Chlorophyllgehalt abhängig sind (pers. Mitteilung Prof. Dr. Humbeck).

Für jede Bestimmung wurden zehn mittlere Segmente von Gerstenblättern gemessen.

### **3.3 Bestimmung der Photosystem II Effizienz**

Die Bestimmung der Photosystem II Effizienz erfolgte nach der Methode von Humbeck et al. (1996), die auf der von Schreiber et al. (1989) entwickelten Methode der Chlorophyll-Fluoreszenz beruhen. Die Messungen wurden mittels eines Chlorophyll-Fluorometers (Mini PAM, Walz, Effeltrich, Deutschland) durchgeführt.

Hierzu wurde nach einer 20minütigen Dunkeladaptation die Grundfluoreszenz des Chlorophylls ( $F_0$ ) durch Schwachlichtimpulse ( $650 \text{ nm}$ ,  $0,1 \mu\text{E} / \text{m}^2\text{s}$ ) und die maximale Fluoreszenz ( $F_m$ ) durch zusätzliche Weißlichtbestrahlung ( $4000 \mu\text{E} / \text{m}^2\text{s}$ ) bestimmt. Die Photosystem II (PS II) Effizienz ist durch das Verhältnis ( $F_v/F_m$ ) von variabler Fluoreszenz ( $F_v$ ) zu maximaler Fluoreszenz ( $F_m$ ) gegeben, wobei  $F_v = F_m - F_0$  ist (Genty et al. 1989). Für jede Bestimmung wurden zehn mittlere Segmente von Gerstenblättern gemessen.

### **3.4 RT-PCR / PCR-Reaktionen**

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem T<sub>3</sub> Thermocycler (Biorad, München, Deutschland) oder einem Robocycler Gradient 40 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Primer wurden mit Hilfe von Jellyfish Version 3.0 Software (Labvelocity Inc., San Francisco, CA, USA) entworfen und von der Firma Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Als Taq-Polymerase wurde eine in einem *E. coli*-Stamm überexprimierte und mittels Säulenchromatographie gereinigte Polymerase verwendet, welche freundlicherweise von Prof. Dr. Johannigmeier zur Verfügung gestellt wurde. Als Puffer wurde ein Standardpuffer (siehe Medien, Puffer, Lösungen und Stammlösungen) verwendet. Optimierungen der Annealing-Temperatur für Primerpaare wurden mit Hilfe von genomischer DNA aus Gerste durchgeführt (siehe DNA-Isolation).

RT-PCR Reaktionen wurden mittels eines One-Step RT-PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) gemäß der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Für die cDNA-Synthese wurde jeweils 1µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die Isolierung erfolgte aus Blättern unterschiedlicher Blattentwicklung, bzw. nach Schwermetallbegiftung. Für die PCR bzw. RT-PCR-Reaktionen wurden u.a. folgende Oligonukleotide verwendet:

PCR-Produkt	Länge (bp)	for /rev Primer
<i>HvMT-1a</i> *	360	for 5'-GCCGATACCAAAGCTCATCT-3' rev 5'-CCGACTCCATCAGATCATCA-3'
<i>HvMT-1a</i> *	225	for 5'-ATGTCTTGCAARYTGTGAATCAAGC-3' rev 5'-GCAGTTGCAAGGTCGCACTT-3'
<i>ids-1</i> * (bzw. <i>ids-1</i> pre-mRNA)	409 <sup>1</sup>	for 5'-GGCACGAGCAGAGGTTATAGCAGAATT3' rev 5'-CCAGCACCAGCCGGTTGGTC-3'
<i>ids-1</i> (bzw. <i>ids-1</i> pre-mRNA) nested	238 <sup>1</sup>	for 5'-GGATCAAGCTGCGGCTGCG-3' rev 5'-GAGGCCGCCCATGGCTGC-3'
<i>HvMT-2a</i> *	208	for 5'-ATGTCTTGCTGCGGAGAAAAGTGC-3' rev 5'-GCGGCAGCGCCTGCAAGT-3'
<i>HvMT-2b</i> *	241	for 5'-ATGTCGTGCTGCGGAGGAARCTGC-3' rev 5'-GCAGMTGCAYGGGTTGCAG-GTGC-3'
<i>HvMT-3a</i>	152	for 5'-AGGCACTCTCCGATCACAAG-3' rev 5'-TCTGTTGTGTTGTTGCCGTG-3'
<i>HvMT-4a</i>	400	for 5'- AACGCCTGAAAAGATCGAGA -3' rev 5'- TTGTGCGTGTGTGGAAAGT -3'
<i>HvBCB</i>	866	for 5'-CCTTCCGGTCACAAGAGCAAT- 3' rev 5'-TATGTTGATCAGCTGCTGCG -3'

<i>HvBCB*</i> nested PCR	371	for 5'-CCTTGGACACCGACTACAGC-3' rev 5'-CTTCTGCCGCTACCTCTGTC-3'
<i>HvCCH</i>	486	for 5'-CCAGGCTCTTCCTCTCCTCT-3' rev 5'-GACAGAGTCATGTGTGGGGA'-3'
<i>HvCCH*</i> nested PCR	250	for 5'-GTGCTCACCAAATGGAAGG-3' rev 5'-CTGCACCGGAGGTAACCC-3'
PCS	466	for 5'-CATGTCCTGCTACCTCACGA-3' rev 5'-ATACCACGGTGCCTGAGATA-3'
PCS*	199	for 5'-GGAGGGGAAGCGGCTGTT-3' rev 5'-GTTCTGCTGCCGAGAAACAT-3'
$\beta$ -Actin	403	for 5'-TGAGCTGCCTGATGGGCAGG-3' rev 5'-GCGATTGTCCACCGGAAGTGC-3'

Bei den mit einem \* markierten Primerpaaren handelt es sich um Primer für PCR-Produkte, welche als RNA-Sonde Digoxigenin-UTP markiert wurden. Bei einigen RT-PCR-Produkten wurde das erhaltene PCR-Fragment als „Template“ für eine „nested-PCR“ eingesetzt. Dies ist durch den Zusatz „nested PCR“ angegeben. <sup>1</sup>Das PCR-Produkt enthält ein zusätzliches 70 bp-DNA-Intron.

### 3.5 Bakterienstämme und Vektoren

Als Vektor für die Klonierung der aus der RFDD-PCR Analyse resultierenden cDNA-Fragmente wurde der "pGEM<sup>®</sup>-T Vector" benutzt. Dieses Plasmid ist Teil des von der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) vertriebenen "Kits" zur Klonierung von PCR-Produkten "pGEM<sup>®</sup>-T Vector System I". Der Vektor trägt neben einem *E. coli*-Replikationsursprung für Multicopyplasmide, T7- und SP6-RNA Polymerase-Transkriptionsinitiationsstellen und Promotoren, welche die "Multiple cloning region" (MCR) flankieren. Die MCR befindet sich im offenen Leseraster (ORF, engl. open reading frame) des *lacZ*-Gens. *lac*-Operon-Sequenzen, einschließlich der *lac*-Repressorbindestelle sind ebenfalls vorhanden. Des weiteren

besitzt der Vektor den Replikationsursprung vom Phagen  $\phi$ 1 und ein Ampicillinresistenzgen, das eine  $\beta$ -Lactamase codiert.

Die Vektoren wurden in kompetente Zellen eines der unten erwähnten Bakterienstammes transformiert:

<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	<i>supE44</i>	$\Delta$ <i>lac</i> U169( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15)
	<i>hsdR17</i>	<i>recA1</i> <i>endA1 gyrA96</i>
	<i>thi-1</i>	<i>relA1</i>

### 3.6 DNA / RNA Größenstandards

Für die Größen- oder Längenbestimmung von DNA-Fragmenten nach Agarosegelelektrophorese wurde "GeneRuler™" eine 100 bp "DNA-Leiter" der Firma MBI Fermentas (St-Leon-Rot, Deutschland) verwendet.

Für die Bestimmung von Transkriptlängen wurden der "RNA-Längenstandard I, Digoxigenin-markiert (0,3 bis 6,9 kb)" der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) benutzt.

### 3.7 DNA-Isolation

Ca. 100 mg Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert, in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt und mit 0,9 ml CTAB-Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde für 30 min bei 60 °C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Danach wurde ein Volumenteil (VT) Chloroform / Isoamylalkohol 24:1 zugefügt und 2 min per Hand geschüttelt. Daraufhin wurde die Lösung für 10 min bei maximaler Drehzahl in einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt, mit 0,8 VT Isopropanol gemischt und wie oben beschreiben zentrifugiert. Anschließend wurde die Lösung dekantiert und das verbliebene DNA-haltige Pellet mit

500 µl eisgekühltem 80 %igen Ethanol überschichtet. Diese Suspension wurde nochmals unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend dekantiert und das DNA-Pellet für 10 min bei RT getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und die Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt,

wobei  $C_{\text{DNA}} = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} [\mu\text{g} / \mu\text{l}]$  ist.

### 3.8 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial erfolgte nach der von Chergwin et al (1979) beschriebenen Methode.

Zunächst wurde das Pflanzenmaterial in einem vorgekühlten Mörser unter flüssigem Stickstoff zerrieben und in vorgekühlte 50 ml Flaschen überführt. Nachdem das Pflanzenmaterial auf ca. 0 °C aufgetaut war, wurden 15 ml Lysis-Puffer (RNA, pH 7,5) zugegeben und mit einem "IKA Ultra-Turrax<sup>®</sup> T25 basic" (IKA<sup>®</sup> Labortechnik, Staufen) bei maximaler Drehzahl (24000 rpm) für ca. 3 min zu einem homogenen Masse vermischt. Dieses Homogenat wurde daraufhin für 15 min bei 37°C und 390 rpm in einem Thermoschüttler (G24 environmental incubator shaker, New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen, Deutschland) inkubiert. Um zu starke Schaumbildung zu vermeiden, wurden kurz vor Ende dieser Inkubation 2-3 Tropfen n-Octanol zugesetzt. Danach wurden Zellwandbruchstücke und andere unlösliche Zellbestandteile bei 10 °C und 9400 g für 20 min pelletiert.

Nach Bestimmung des Volumens des Überstandes, wurde dieser in 50 ml Zentrifugenröhrchen ("Centrifuge bottles polyallomer 50ml", Beckmann Coulter Inc., Unterschleissheim-Lohhof, Deutschland ) überführt und durch die Zugabe des 0,02fachen Volumens 3 M NaAc-Puffers (pH 5,0) und des 0,75fachen Volumens 96 %igem Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt.

Das durch Zentrifugieren bei 10.000 g und 4 °C für 20 min erhaltene Pellet wurde in 12 ml TES-Puffer (pH 7,4) mit Hilfe des Ultra-Turrax<sup>®</sup>-Homogenisators bei mittlerer Drehzahl (9000 rpm) gelöst. Anschließend wurde die homogene Lösung in eine 50 ml Flasche überführt und ein 0,5faches Volumen Phenol (TE-(pH 7,8)-gesättigt), ein 0,5faches Volumen Chloroform sowie ein 0,02faches Volumen Isoamylalkohol zugesetzt. Danach wurde die Flüssigkeit für 15 min bei RT und 390 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert und für 10 min bei RT 15500 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde mit dem gleichen Volumen an Chloroform in eine neue 50 ml Flasche überführt und wie oben beschrieben inkubiert und zentrifugiert. Anschließend wurde das Volumen der oberen Phase bestimmt und nach Überführung in 15 ml Corex<sup>®</sup>II-Zentrifugengefäße (C-8441, LabGlass, Vineland, USA) durch Zugabe des 0,33fachen Volumens 8 M LiCl-Lösung über Nacht bei 4 °C gefällt.

Am darauf folgenden Tag wurde die RNA durch 20minütiges Zentrifugieren bei 4 °C und 10.000 g pelletiert und für ca. 10 min bei RT getrocknet. Danach wurde das Pellet in 5 ml TES-Puffer (pH 7,4) durch mehrmaliges Pipettieren und 10 minütige Inkubation in einem 65 °C warmen Schüttelwasserbad gelöst. Hiernach wurde die Gesamt-RNA durch Zugabe des 0,1fachen Volumens 4 M NaCl-Lösung und des 2,5fachen Volumens 96 %igem Ethanol für 25 min bei -80 °C gefällt.

Anschließend wurde die RNA durch 20 minütiges Zentrifugieren bei 4 °C und 15.500 g pelletiert, wiederum für ca. 10 min bei RT getrocknet und in 1 ml H<sub>2</sub>O durch Pipettieren und 10 minütiger Inkubation im 65 °C Schüttelwasserbad gelöst.

Die Bestimmung der Konzentration erfolgte photometrisch bei 260 nm,

$$\text{wobei } C_{\text{RNA}} = \text{OD}_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor } [\mu\text{g} / \mu\text{l}] \text{ ist.}$$

Der Quotient der Absorptionen von 260 nm und 280 nm lag dabei zwischen 1,8 und 2,0, was für eine hochreine RNA-Isolation spricht und keine nennenswerten Proteinverunreinigungen zeigt. Die Lagerung der RNA-Lösungen erfolgte bei -80 °C.

### 3.9 Isolierung von poly(A)<sup>+</sup>-RNA

Aus den folgenden drei Gesamt-RNA Lösungen wurde die polyadenylierte RNA aufgereinigt:

1. 900 µg Gesamt-RNA, Primärblätter, 12 d, 48 h, MS-Medium (MS)
2. 900 µg Gesamt-RNA, Primärblätter, 12 d, 48 h, 0,5 mM Cadmium, MS
3. 900 µg Gesamt-RNA, Primärblätter, 12 d, 48 h, 1,0 mM Cadmium, MS

Die Isolierung der Poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus Gesamt-RNA erfolgte mit dem "PolyATtract<sup>®</sup> mRNA Isolation System IV" von Promega (Mannheim, Deutschland) gemäß der Vorschrift des Herstellers. Das System beinhaltet biotinylierte Oligo(dT)-Fragmente, welche zunächst mit Poly(A)<sup>+</sup>-Regionen der RNAs hybridisieren. Diese Hybride werden anschließend aufgrund der hohen Affinität zwischen Streptavidin und Biotin an Streptavidin-gekoppelte Magnetpartikel gebunden. In mehreren Waschschritten, bei welchen diese mit der Poly(A)<sup>+</sup>-RNA verbundenen Partikel mit Hilfe eines Magneten im Reaktionsgefäß zurückgehalten werden, entfernt man Poly(A)<sup>-</sup>-RNA (z.B. ribosomale oder transferRNA). Sehr geringe Salzkonzentrationen liefern Bedingungen, unter welchen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen polyadenylierter RNA und biotinylierten oligo(dT)-Fragmenten bei RT energetisch nicht begünstigt sind. Aus diesem Grund ist eine Elution der Poly(A)<sup>+</sup>-RNA mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O möglich. Die Konzentration der Poly(A)<sup>+</sup>-RNA-Lösung kann photometrisch bei 260 nm bestimmt werden.

### 3.10 Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese

Für die elektrophoretische Trennung der mRNA bzw. der Gesamt-RNA wurden denaturierende Agarose-Formaldehyd-Gele verwendet. Die Gele enthielten 1 % (w/v) "Agarose zur DNA/RNA Elektrophorese" (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 6 % (v/v) Formaldehyd und 10 % (v/v) 10x MOPS-Laufpuffer (pH 7,2).

Vor der elektrophoretischen Trennung wurden 15 µg der zu untersuchenden RNA-Probe gefällt und in 18 µl RNA-Probenpuffer aufgenommen, für 10 min bei 65 °C denaturiert und bis zum Auftragen mindestens 2 min auf Eis gestellt. Als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde 1x MOPS verwendet.

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel für 15 min unter fließendem Leitungswasser 15 min gespült, mit 2x SSC-Puffer (pH 7,0), der 0,1 µg ml<sup>-1</sup> Ethidiumbromid enthielt gefärbt und ebenfalls mit 2x SSC 30 min bei RT, sowie über Nacht bei 4 °C entfärbt. Anschließend wurde die Ethidiumbromid gefärbten RNA-Banden mittels UV-Licht detektiert und mittels Video-Imaging gespeichert.

### **3.11 Northern-Blotting**

Nach der elektrophoretischen Trennung der RNA in denaturierenden Agarosegelen, erfolgte der Transfer der RNA auf positiv geladene Nylonmembranen (Roche, Mannheim, Deutschland). Dieser sogenannte "Northern blot" erfolgte mit dem "PosiBlot<sup>®</sup> 30-30 Pressure Blotter and Pressure Control Station" – System (s. Bedienungsanleitung, Stratagene, La Jolla, Ca, USA) im Drucktransferverfahren innerhalb von 60-75 min, mit 10x SSC (pH 7,0) als Transferpuffer und einem Druck von ca. 75 mmHg.

Nach dem Transfer wurde die RNA durch UV-Bestrahlung mit der Membran kovalent gebunden. Die Prähybridisierung mit 20 ml High-SDS-Hybridisierungspuffer erfolgte mit Hilfe eines OV3 Hybridisierungsofens in Borosilikat-Hybridisierungsröhren (beides Whatman-Biometra<sup>®</sup>, Göttingen, Deutschland) für 1,5 h bei 50 °C. Nach dem Abgießen des Prähybridisierungspuffers wurde die Hybridisierung mit der zuvor auf 68 °C für 10 min erwärmten und für 2 min bei -20 °C abgekühlten Sonde (High-SDS-Hybridisierungspuffer mit entsprechender DIG-markierter Sonde) bei 50 °C über Nacht durchgeführt.

Unspezifisch gebundene Sondenmoleküle wurden danach mit Waschpuffer-1 bei RT für je 2x 15 min und mit Waschpuffer-2 bei 50 °C für je 2x 15 min von der Membran gewaschen.

Die Detektion der DIG-markierten Sonden wurde mit Hilfe des "DIG Luminescent Detection Kit" gemäß der Vorschrift der Hersteller (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Die Membran wurde 3min in Waschpuffer-3, danach 45 min in 1x Blocklösung (RNA) zur Absättigung freier unspezifischer Proteinbindestellen und hiernach für 30 min in Antikörperlösung (1x Blocklösung (RNA) mit 1:10000 Anti-Digoxigenin-F<sub>ab</sub>-Fragment-alkalische Phosphatase-Konjugat (Anti-DIG-AP Konjugat)) jeweils bei RT inkubiert. Nicht spezifisch an der Membran haftendes Anti-DIG-AP-Konjugat wurde mit Waschpuffer-3 bei RT für je 2x 15 min abgewaschen.

Nach dem Äquilibrieren der Membran mit 1:10 verdünntem Detektionspuffer (RNA) für 2 min bei RT wurde die Membran zwischen zwei Acetat-Folien gelegt und gleichmäßig mit 1:60 in Detektionspuffer verdünnter CSPD<sup>®</sup>-Lösung benetzt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Die Membran wurde nach dieser Detektionsreaktion zwischen Klarsichtfolie gelegt und je nach Signalstärke für 5 min bis 24 h auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm<sup>™</sup>ECL<sup>™</sup>, Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg, Deutschland ) aufgelegt.

### **3.12 RFDD-PCR (Restriction Fragment Differential Display – PCR)**

Mit der ursprünglich von Liang et al. (1992) publizierten Methode des "Differential display" ist es möglich, zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten eines Organismus, Organs, Gewebes oder auch einzelner Zellen Unterschiede im Expressionsmuster einer großen Anzahl von Genen auf Transkriptebene sichtbar zu machen.

Da die Technik deutliche Grenzen, wie bevorzugte Vervielfältigung der Transkript-3'-Enden, oder nur scheinbar differentiell induzierte cDNAs, aufweist (Debouck 1995), wurde sie zur sogenannten "Restriction fragment differential display-PCR"

(RFDD-PCR) weiterentwickelt (Money et al. 1996, Matz et al. 1997, Habu et al. 1997).

Bei einer "RFDD-PCR" werden die cDNA Populationen nicht direkt per PCR vervielfältigt und anschließend detektiert, sondern zunächst mit einem Restriktionsenzym (4-Basen-Erkennungssequenz) geschnitten. An die dabei entstandenen überhängenden Enden werden Adapter angebracht, welche mit den einzusetzenden selektiven PCR-Primern hybridisieren. Diese Primer sind so gestaltet, dass für eine erfolgreiche Vervielfältigung durch PCR drei Basen ihres 3'-Endes mit drei Basen des Endes der cDNA-Fragmente hybridisieren und deshalb komplementär zu diesem sein müssen.

Die Anzahl der unter Verwendung eines selektiven Primers mittels PCR vervielfältigten, markierten und anschließend detektierten cDNA-Fragmente verringert sich dadurch um über 98 % und ermöglicht so eine sehr viel bessere Auflösung von differentiell exprimierten cDNA-Banden.

Für die Durchführung der RFDD-PCR Technik wurde der "displayPROFILE™ Kit" (Display Systems Biotech, Azigen Bioscience A/S, Kopenhagen, Dänemark) entsprechend der Vorschrift des Herstellers verwendet.

### 3.12.1 cDNA Synthese

Für die Erststrang-cDNA-Synthese wurden von den drei zuvor isolierten polyadenylierten RNA-Lösungen (siehe mRNA-Isolation) je 400 ng RNA entsprechende Volumina in einem Vakuumrotationsverdampfer (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) vollständig eingengt und in je 15  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen.

Der folgende Erststrang-Synthese-Reaktionsansatz und wurde mit jeder der drei Proben durchgeführt:

15,0	$\mu\text{l}$	poly(A) <sup>+</sup> -mRNA Lösung (entsprechend 400 ng RNA)
1,5	$\mu\text{l}$	Oligo 5'-T <sub>25</sub> V (V=A,C or G) Primer (12,5 $\mu\text{M}$ )
2,5	$\mu\text{l}$	10x cDNA Puffer 1 (500 mM Tris-HCL pH 8,3; 800 mM KCl; 100 mM MgCl <sub>2</sub> ; 40 mM DTT)
5,0	$\mu\text{l}$	dNTP-Mix (je 5 mM)
<u>1,0</u>	<u><math>\mu\text{l}</math></u>	displayTHERMO-RT (100 U $\mu\text{l}^{-1}$ )
25,0	$\mu\text{l}$	

Dieser Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 42 °C im Thermocycler (RoboCycler Gradient 40, Stratagene, La Jolla, USA) inkubiert. Zu jedem Erststrang-Reaktionsansatz wurden anschließend je 50  $\mu\text{l}$  des folgenden "Zweitstrang-Synthese-Mastermixes" zugegeben:

22,5	$\mu\text{l}$	10x cDNA Puffer 2 (350 mM Tris-HCl pH 7,4; 40 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 30 mM DTT)
7,5	$\mu\text{l}$	dNTP-Mix (je 5 mM)
3,6	$\mu\text{l}$	DNA Polymerase I (10 U $\mu\text{l}^{-1}$ )
2,4	$\mu\text{l}$	RNase H (1 U $\mu\text{l}^{-1}$ )
<u>114</u>	<u><math>\mu\text{l}</math></u>	H <sub>2</sub> O
3 x 50	$\mu\text{l}$	

Jeder 75 µl Zweitstrang-Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 16 °C inkubiert. Zu jedem 75 µl Reaktionsansatz wurden 125 µl H<sub>2</sub>O, 100 µl TE (pH 7,8) gesättigtes Phenol und 100 µl Chloroform gegeben, kräftig geschüttelt, 5 min bei RT und maximaler Drehzahl in einer Tischzentrifuge ("Biofuge fresco", Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland) zentrifugiert und die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen. Die in dieser Phase vorhandene cDNA wurde durch Zugabe eines 0,1fachen Volumens 3 M NaAc-Puffer (pH 5,0) sowie eines doppelten Volumens 96 %igem Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt.

Anschließend wurde die cDNA durch Zentrifugieren bei 4 °C und maximaler Drehzahl für 20 min in der Tischzentrifuge pelletiert, mit 50 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, 15 min bei RT getrocknet und in 20 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zur Kontrolle der erfolgreichen cDNA Synthese wurden jeweils 10 µl der cDNA-Lösung mittels 1,5 %iger Agarosegel-(TAE)-Elektrophorese getrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht als schwach diffuse Bande von 100-2000 bp detektiert.

### 3.12.2 Template Herstellung

Die verbliebenen 10 µl cDNA Lösung wurden bei folgender Endonuklease-Restriktion eingesetzt:

2,0	µl	10x displayPROFILE Puffer (100 mM Tris-Acetat pH 7,5; 100 mM Magnesiumacetat; 500 mM Kaliumacetat)
10,0	µl	cDNA Lösung
7,5	µl	H <sub>2</sub> O
<u>0,5</u>	<u>µl</u>	<i>TaqI</i> Restriktionsenzyme (10 U µl <sup>-1</sup> )
20,0	µl	

Diese 20 µl Reaktionsansätze wurden für 2 h bei 65 °C in einem Thermocycler inkubiert.

Für die Adapterligation wurde folgender "Mastermix" angesetzt und je 7,5 µl davon zu jedem Restriktionsansatz hinzugefügt.

(siehe nächste Seite)

## Material und Methoden

---

2,25	μl	10x displayPROFILE Puffer
2,25	μl	Adapter Mix (15 μM)
3,75	μl	ATP (10 mM)
13,35	μl	H <sub>2</sub> O
<u>0,9</u>	<u>μl</u>	T4 DNA Ligase (1 U μl <sup>-1</sup> )
3 x 7,5μl		

Die Ligationsansätze (27,5 μl Endvolumen) wurden für 3 h bei 37 °C in einem Thermocycler inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert. Zur Kontrolle von Restriktionsverdauung und Ligation wurde folgende PCR durchgeführt:

8,7	μl	H <sub>2</sub> O
2,0	μl	displayTAQ FL 10x Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl <sub>2</sub> )
0,2	μl	cDNA-Fragmente (Ligationsansatz)
0,8	μl	dNTP-Mix (je 5 mM)
8,0	μl	Kontrollprimer (1 μM)
<u>0,3</u>	<u>μl</u>	displayTAQ FL (5 U μl <sup>-1</sup> )
20	μl	

PCR-Bedingungen:	94 °C	30s	Denaturieren
30 Zyklen:	94 °C	30s	Denaturieren
	55 °C	30s	Annealing
	72 °C	1min	Synthese, 5min Nachsynthese

Zur Überprüfung der cDNA Restriktion und Adapterligation wurden 10 μl des PCR Ansatzes mittels 1,5 %iger Agarosegel-(TAE)-Elektrophorese getrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht als diffuse Bande im Bereich von 50 bp bis 1000 bp detektiert.

### 3.12.3 <sup>33</sup>P-Endmarkierung, Vervielfältigung der cDNA-Fragmente und Detektion

Die Markierung des "0-extension Primers" erfolgte in folgendem einen PCR-Ansatz:

0,28	μl	H <sub>2</sub> O
0,10	μl	10x displayPROFILE Puffer
0,40	μl	"0-extension Primer" (10 μM)
0,20	μl	[γ <sup>33</sup> P]-ATP (3000 Ci mmol <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>
<u>0,02</u>	<u>μl</u>	T4 Polynukleotidkinase (5 U μl <sup>-1</sup> )
1,00	μl	x Anzahl der durchzuführenden Polymerasekettenreaktionen

Die Markierungsreaktion wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Mit dem markierten "0-extension" Primer, je zwei selektiven Primern (Eu-8 und EU-10) und den drei verschiedenen cDNA-Fragment-Lösungen (Kontrolle, 0,5 mM Cadmium; 1,0 mM Cadmium) wurden insgesamt 6 verschiedene PCR-Ansätze nach folgendem Schema angesetzt:

11,6	μl	H <sub>2</sub> O
2,0	μl	displayTAQ FL 10x Reaktionspuffer
0,8	μl	dNTP-Mix (je 5 mM)
1,0	μl	markierter "0-extension" Primer (4 μM)
4,0	μl	displayPROBE Primer (selektive Primer Eu-1, Eu-9 oder Eu16, 1 μM)
0,3	μl	cDNA-Fragmente (Ligationsansatz))
<u>0,3</u>	<u>μl</u>	displayTAQ FL (5 U μl <sup>-1</sup> )
20	μl	

---

<sup>1</sup> Zur radioaktiven Markierung von Oligonukleotiden wurde [γ<sup>33</sup>P]-ATP (3000 Ci mmol<sup>-1</sup>) der Firma Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg, Deutschland) benutzt.

"Touch down"-PCR Bedingungen:

	94 °C	30s	Denaturieren	
10 Zyklen:	94 °C	30s	Denaturieren	
	60 °C	30s	$\Delta T = -0,5 \text{ °C}$	"Annealing" (nach jedem Zyklus wird die
	Annealingtemperatur um 0,5°C gesenkt)			
	72 °C	1min	Synthese	
25 Zyklen:	94 °C	30s	Denaturieren	
	55 °C	30s	Annealing	
	72 °C	1min	Synthese, 5min Nachsynthese	

Nach der PCR wurde jeder Ansatz mit 15  $\mu\text{l}$  Ladepuffer (95 % Formamid (v/v), 20 mM EDTA, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (w/v) Xylencyanol FF) gemischt, für 5 min bei 85 °C erhitzt, unmittelbar danach auf Eis transferiert und anschließend je 2x 3  $\mu\text{l}$  auf ein 8 % Harnstoff Polyacrylamid-Sequenziergel "CastAway™ Precast Sequencing System" von Stratagene (La Jolla, USA) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel getrocknet und für ca. 20- 24 h auf einen Röntgenfilm aufgelegt (BIOMAX™MR, Eastman KODAK Company, Rochester, USA).

Der belichtete Film wurde nach Entwicklung, Fixierung und Trocknung in exakter Position unter die Glasplatte, auf der sich das getrocknete Gel befand, gelegt. Differentiell exprimierte cDNA Fragmente wurden mit Rasierklingschnitten eng begrenzt, mit 20  $\mu\text{l}$  1x TE-Puffer (pH 8,0) rehydratisiert, mit Nadel und Lanzettnadel von der Glasplatte entfernt und in 40  $\mu\text{l}$  1x TE-Puffer (pH 8,0) überführt.

Anschließend wurde das Gelstück 4 h bei 80 °C gelöst. Die so eluierten cDNA-Fragmente wurden mit folgender PCR vervielfältigt:

20,0	$\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O
4,0	$\mu\text{l}$	displayTAQ FL 10x Reaktionspuffer
1,6	$\mu\text{l}$	dNTP-Mix (je 5 mM)
0,8	$\mu\text{l}$	"0-extension" Primer (10 $\mu\text{M}$ ) (siehe nächste Seite)

8,0	μl	displayPROBE Primer (der RFDD-PCR entsprechender selektiver Primer, Eu-1, Eu-9 oder Eu-16, 1 μM)
5,0	μl	Lösung mit dem eluierten cDNA-Fragment
<u>0,6</u>	<u>μl</u>	displayTAQ FL (5 U μl <sup>-1</sup> )
40,0	μl	

PCR-Bedingungen:	94 °C	30s	Denaturieren
	35 Zyklen:	94° C	30s Denaturieren
		55° C	30s Annealing
		72° C	1min Synthese, 5min Nachsynthese

### 3.12.4 Herstellung von cDNA-Sonden

Die durch RFDD-PCR isolierten cDNA-Fragmente wurden mit Hilfe von "DIG DNA Labeling Mix, 10 x conc." (Roche) in folgender PCR markiert.

19,8	μl	H <sub>2</sub> O
4,0	μl	10x PCR Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl <sub>2</sub> )
2,4	μl	dNTP-Mix (je 2,5mM)
- siehe nächste Seite-		
2,0	μl	"DIG DNA labeling Mix, 10x conc." (je 1 mM dATP, dGTP und dCTP, sowie 0,65 mM dTTP und 0,35 mM DIG-11-dUTP)
0,8	μl	"0-extension" Primer (1 μM)
8,0	μl	displayPROBE Primer (entsprechend Eu-8 oder Eu10)
1,0	μl	cDNA-Fragment Lösung (entweder Reamplifikationsansatz oder geeignete Verdünnung von Kolonie-PCR-Ansätzen)
<u>2,0</u>	<u>μl</u>	Johanningmeier <i>Taq</i> DNA Polymerase
40	μl	

Es wurden die gleichen PCR-Bedingungen wie bei der Vervielfältigung der cDNA-Fragmente nach der Isolierung aus dem RFDD-PCR-Gel verwendet. Mindestens 2 x 15 μl jedes PCR-Ansatzes wurden mit einer 1,2 % Agarosegel-(TAE)-Elektrophorese getrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt, unter UV-Licht die

markierten Sonden ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert. Die so hergestellten und gereinigten cDNA-Sonden wurden vollständig in 30 ml High-SDS-Hybridisierungspuffer gelöst.

### **3.13 DNA-Agarosegelelektrophorese**

Zur größenabhängigen Trennung von DNA-Fragmenten diente eine horizontale Agarosegelelektrophorese. DNA-Gele wurden mit 1,2-1,5 %iger (w/v) "Agarose zur DNA/RNA Elektrophorese" (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 1x TAE-Puffer (pH 8,0) gegossen. Nach Abkühlen des Gels auf ca. 60 °C wurden 3 µl / 100 ml Ethidiumbromid zugefügt. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Proben-Ladepuffer versehen und H<sub>2</sub>O auf das jeweilige Ladevolumen aufgefüllt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer (pH 8,0) verwendet. Ein 100 bp DNA-Leiter (MBI Fermentas, St-Leon-Rot, Deutschland) diente als DNA-Größenstandard.

### **3.14 Reinigung von DNA aus Agarosegelen**

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das "QIAquick Gel Extraktion Kit" von QIAGEN gemäß der Vorschrift des Herstellers verwendet.

### **3.15 Ligation von DNA-Fragmenten**

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde das "pGEM<sup>®</sup>-T Vector System" der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) gemäß der Vorschrift des Herstellers verwendet. Die Vervielfältigung der zu klonierenden bei der RFDD-PCR isolierten cDNA-Fragmente erfolgte mittels PCR. Eingesetzt wurden ca. 100 ng PCR-Amplifikat, wobei ggf. in H<sub>2</sub>O eluierte PCR-Fragmente vor der Ligation mit Hilfe

eines Vakuumrotationsverdampfer (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) aufkonzentriert wurden.

### **3.16 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen und Transformation von Vektoren**

Zur Herstellung von transformations-kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen wurde die Rubidiumchlorid-Methode verwendet. 2 ml einer Über-Nach-Kultur des *E. coli* DH5 $\alpha$  Stammes wurden in 100 ml LB-Medium überführt und solange bei 37 °C und 170 rpm in einem Thermoschüttler (INNOVA™ 4000 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen) inkubiert, bis eine OD<sub>590nm</sub> = 0,6 erreicht war. Die Flüssigkultur wurde in ein geeignetes Zentrifugengefäß überführt, für 15 min in einem Eisbad abgekühlt und anschließend durch Zentrifugieren bei 4.000 g und 4 °C für 5 min pelletiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes, wurde das Pellet vorsichtig mit dem 0,4fachen Volumen (der ursprünglichen Flüssigkultur) an eiskaltem TfbI-Puffer resuspendiert, für 10 min in einem Eisbad abgekühlt und die Zellen abermals durch Zentrifugieren bei 4.000 g und 4 °C für 5 min pelletiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet vorsichtig mit dem 0,04fachen Volumen an eiskaltem TfbII-Puffer resuspendiert und für 20 min in einem Eisbad inkubiert. Nachfolgend wurde der Ansatz auf Eis in 1,5 ml Schraubverschluss-Reaktionsgefäße zu je 150  $\mu$ l aliquotiert. Die Aliquots wurde unmittelbar danach in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Transformation bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation der kompetenten Zellen wurde pro 150  $\mu$ l Aliquot 5  $\mu$ l Ligationsansatz hinzugefügt und auf Eis für 20 min inkubiert, wobei nach 10 min der Transformationsansatz einmal vorsichtig gemischt wurde. Im Anschluss daran wurde der Ansatz 1 min bei 41 °C erwärmt, danach für 2 min auf Eis abgekühlt und für 30 min in 950 $\mu$ l LB-Medium bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden je 150  $\mu$ l auf LB/Amp/X-Gal-Platten ausplattiert und für 16-20 h bei 37 °C inkubiert.

### 3.17 Kolonie-PCR

Da nach der Transformation von *E. coli* DH5  $\alpha$  mit dem verwendeten pGEM<sup>®</sup>-T Vektor die wachsenden Bakterienklonien auf den LB/Amp/X-Gal-IPTG-Platten kein "Blau-Weiss-Screening" möglich war<sup>2</sup> enthalten mit Sicherheit einen Vektor. Der verwendete Vektor pGEM<sup>®</sup>-T trägt im Gegensatz zum *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  ein Ampicillinresistenzgen, welches für die Vermehrung der Bakterien auf dem Ampicillin-selektiv-Medium essentiell ist. Um zu klären, welche der auf den Platten sichtbaren Kolonien einen Vektor mit cDNA-Fragment besitzt, konnte das "Blau-Weiss-Screening" nicht herangezogen werden. Aus diesem Grund wurden Kolonie-PCR Reaktionen durchgeführt. Es wurden i.d.R. fünf Kolonien von den Platten entnommen und in je 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O überführt. Die Bakterienlösung wurde für 5min bei 95 °C inkubiert und in hundertfacher Verdünnung als Template in dem unten aufgeführten PCR-Ansatz verwendet. Als Primer wurden die vektorspezifischen Primer NewT7 und SP6 verwendet, welche eine sehr viel besser Amplifikation der cDNA-Inserts ermöglichten, als die zuvor verwendeten Eu-Primer. NewT7 hybridisiert 69-47 Basen "upstream" und SP6 74-96 Basen "downstream" der Insertionsstelle des Vektors pGEM<sup>®</sup>-T. Das daraus resultierende PCR-Produkt besteht damit aus flankierenden Vektoranteil (130 bp) und dem cDNA-Insert.

16,7	$\mu$ l	H <sub>2</sub> O
4,0	$\mu$ l	10x PCR Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl <sub>2</sub> )
3,5	$\mu$ l	dNTP-Mix (je 2,5 mM)
1,0	$\mu$ l	NewT7-Primer (1 $\mu$ M)
1,0	$\mu$ l	SP6-Primer (1 $\mu$ M)
5,0	$\mu$ l	Kolonie Lösung (1:100 verdünnt)
2,0	$\mu$ l	Johanningmeier <i>Taq</i> DNA Polymerase
40	$\mu$ l	

---

<sup>2</sup> Unabhängig von der Zugabe des Induktors IPTG, akkumulierten alle Kolonien den Farbstoff X (5-Bromo-4-chloro-3-Indol) und nahmen so die blaue Farbe an. Eine Erklärung hierfür könnte die geringe Länge der inserierten cDNA-Fragmente sein (mit wenigen oder keinen STOP-Codons), welche ins *lacZ*-Gen des Vektors eingebracht wurden und es so trotz zusätzlicher Aminosäuren im Genprodukt ( $\alpha$ -UE der  $\beta$ -Galactosidase) ein zur  $\alpha$ -Komplementation befähigtes Protein entstehen konnte.

Es wurden die gleichen PCR-Bedingungen wie bei der Vervielfältigung der aus dem RFDD-PCR-Gel isolierten cDNA-Fragmente verwendet. Von jeder PCR-Reaktion wurden 10 µl mit einer 1,5 % Agarosegel-(TAE)-Elektrophorese getrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht detektiert. PCR-Produkte mit einer Größe > 130 bp wurden aus dem Gel eluiert und Sequenziert. Nach der Sequenzierung wurden die cDNA-Fragmente für "Northern" Analysen zu Sonden markiert.

### **3.18 Herstellung von *E. coli*-Gefrierkulturen**

Flüssige *E. coli* LB/Amp (Amp /Tet) ÜNK wurden in 5ml "Cryo-Röhrchen" mit Außengewinde und Silikondichtung (Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurden mit 15 % (v/v) sterilem 99,5 %igen Glycerin vermischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### **3.19 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Plasmide aus den *E. coli* Transformanten wurden mit dem "QIAprep Spin Miniprep Kit" (QIAGEN, San Francisco, CA, USA) gemäß der Vorschrift des Herstellers isoliert.

### **3.20 DNA-Sequenzierung**

Alle PCR-Produkte wurden nach dem von Sanger et al. (1977) entwickelten Kettenabbruchverfahren mit dem "BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit" von Applied Biosystems (s. Bedienungsanleitung des Herstellers) und einem automatischen Sequenziergerät vom Typ ABI Prism™ 370 DNA-Sequencer (Applied Biosystems) sequenziert.

Für die Sequenzierreaktionen wurden folgende Primer verwendet:

NewT7 (for): 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

SP6 (rev): 5'-AGCTATTTAGGTGACACTATAG-3'

### 3.21 Protein-Isolation

Die Isolation cysteinreicher Proteine erfolgte in Anlehnung nach der Vorschrift von Murphy et al. (1997). Je 1,5 g Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit einer Spatelspitze PVP versetzt. Das Homogenat wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und mit Homogemisierungspuffer versetzt. Die nachfolgende Inkubation erfolgte für 15 min unter gelegentlichem Rühren bei 4 °C und unter Lichtausschluß. Anschließend wurde die Suspension durch mehrere Lagen Zellstoff filtriert und für 30 min bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Endkonzentration von 50 % Aceton verdünnt und die Suspension für 20 min bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand auf eine Endkonzentration von 80 % Aceton verdünnt und die Proteine dieser Fraktion für 60 min bei -20 °C gefällt.

Das gefällte Protein wurde nachfolgend für 20 min bei 10.000 g und 4 °C abzentrifugiert, getrocknet und in 500 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Der quantitative Nachweis der Proteinmenge erfolgte durch Messung der Extinktion bei 595 nm nach Zugabe von Proteinreagenz der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) gemäß der Vorschrift des Herstellers.

Die in H<sub>2</sub>O gelösten Proteine wurden nach Bestimmung der Konzentration auf eine Endkonzentration von 1 µg/µl Protein /H<sub>2</sub>O verdünnt und bei -20 °C gelagert.

### 3.22 SEC (Size-Exclusion-Chromatography)

Die Eppendorfgläser mit den isolierten, in Wasser gelösten Proteinproben (siehe Kapitel 2.21) wurden vor der chromatographischen Trennung in einer Tischzentrifuge bei maximaler Drehzahl für 30 s zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile aus dem Überstand zu pelletieren. Zur Trennung wurde eine Superdex 75, 30/10 HR Säule (Amersham

Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) und eine HPLC (LaChrom System, Merck-Hitachi) verwendet (Pumpe: L-7420, Fluoreszenz-Detektor L-7480, Dioden-Array-Detektor L-7450, Interface L-7000). Appliziert wurden 50 µl der Proteinsuspension, entsprechend 50 µg Protein. Als Laufmittel wurde ein 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pH 8,5 Puffer verwendet, die Flussrate betrug 0,4 ml/min.

Als Standard wurde ein kommerzielles, cadmiumhaltiges Metallothionein aus Kaninchenleber unter den gleichen Bedingungen getrennt (MT-2, Lot 80k7013, 4,5 % Cd-Gehalt, Sigma, St.Louis, MO, USA). Die Detektion erfolgte bei 254 nm, dem Absorptionsmaximum der Cadmiumsulfidbindung, sowie bei dem Absorptionsmaximum von aromatischen Aminosäuren bei 280 nm. Die getrennten Proteinproben wurden in 1,6 ml Fraktionen gesammelt.

### **3.23 GF-AAS (Graphit-Furnace-Atomic-Absorbance-Spectroscopy)**

Der Cadmiumgehalt der mittels SEC getrennten Proteine wurde mittels GF-AAS (Analyst 800, Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA) nach der von El Gazhie et al. (2004) beschriebenen Methode ermittelt. Die Bestimmung der Cadmiumgehalte beruht auf dem Mittelwert von drei Analysen. Zuvor wurden Werte für eine Eichgerade mit  $\text{CdCl}_2$ -Konzentrationen zwischen 0-100 µg /L in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ermittelt.

### **3.24 CZE (Capillary-Zone-Electrophoresis)**

Die mittels Gelfiltration (SEC) aufgetrennten Proteine wurden mit 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pH 8,5 eluiert und in 1,6 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktion mit der Retentionszeit 39-43 min wurde gefriergetrocknet und in 100 µl  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert. Die darin enthaltenen Proteine wurden mittels CZE (Hewlett Packard 3D CE) nach der von Virtanen und Bordin (1998) für die Trennung von Metallothionein-Isoformen beschriebenen Methode elektrophoretisch aufgetrennt und die Absorptionen mittels Dioden-Array Detektor (DAAD) analysiert.

### CE -Bedingungen:

Kapillare:	FS (Länge <sub>eff</sub> 58cm)
Spannung:	15 kV /20°C, positive Polarität
Puffer:	100 mM MOPS pH 8,0
Injektion:	50 mbar x 5sec

### **3.25 ESI-MS (Electrospray-Ionisation-Mass-Spectrometry)**

Die Aufnahme der ESI-MS Spektren der thiolhaltigen Peptide erfolgte mittels ESQUIRE-LC Ionentrap-Spektrometer mit ESI Quelle (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland). Die Proben wurden mit einer Kolbenpumpe (Cole-Parmer Instrument Company, Bunker Court Vernon Hills, IL, USA) mit einer Flussrate von 3  $\mu\text{l min}^{-1}$  injiziert.

### **3.26 Phytochelatine: Isolation, Derivatisierung und Nachweis**

Thiolhaltige Peptide, zu denen Glutathion und die Phytochelatine gehören, wurden nach der von Grill et al. (1991) beschriebenen Methode extrahiert. Dazu wurden 100-200 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und in einem Verhältnis von 1:2 mit 1 N NaOH, welcher zuvor 1 mg  $\text{NaBH}_4 \text{ ml}^{-1}$  NaOH zugesetzt wurde, aufgenommen. Diese Suspension wurde homogenisiert und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Homogenat für 10 min bei 11.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit 3,6 N HCl (70  $\mu\text{l}$  /250 $\mu\text{l}$  Überstand) auf pH 2 angesäuert. Nach einer 15 min Inkubation auf Eis und nachfolgender Zentrifugation für 5 min bei 11.000 g und 4 °C wurde der Überstand für die Bestimmung der Phytochelatine unmittelbar danach verwendet.

Der analytische Nachweis der Phytochelatine erfolgte nach der Methode von Grill et al. (1991) mittels Reversed Phase HPLC (RP-HPLC) und Online-Nachsäulenderivatisierung mit 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure(DTNB). Bei der Reaktion von DTNB mit Thiolgruppen kommt es zur Freisetzung von TNB (5-Thio-2-nitrobenzoesäure), dessen spezifische Absorption bei 410 nm detektiert werden kann (Ellman 1959).

### HPLC-Bedingungen:

Säule:		C-18 (SuperPac PEP S, Pharmacia), 5 $\mu\text{m}$ , 4x 250 mm
mobile Phase:	A	H <sub>2</sub> O, pH 3 mit TFA
	B	ACN
Gradient:		2-20 % B in A in 20 min; 20,1-25 min 20 % B; 25,1-30 min 2 % B
Fluss:		1 ml min <sup>-1</sup>

### Nachsäulenderivatisierung:

DTNB:	300 $\mu\text{M}$ in 500 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8,0
Fluss:	0,4 ml min <sup>-1</sup>
Reaktionsschleife:	1 ml
Detektion:	410 nm

### **3.27 Tocopherol-Bestimmung**

Die Bestimmung von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol aus 12 Tage alten Primärblättern nach 48 h Exposition der Pflanzen mit 1 mM Kupfer- bzw. Cadmiumchlorid haltigen Lösugen (MS-Medium) sowie einer mitgeführten Kontrolle (MS-Medium) wurde freundlicher Weise in Kooperation der AG Prof. K. Krupinska, Botanisches Institut, Christian-Albrechts-Universität durchgeführt.

Die Extraktion und Nachweis der Tocopherole erfolgte wie in Falk et al. (2003) beschrieben. Dabei wurden jeweils 100-200 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und in einem zweifachen Volumen an *n*-Heptan/2-Propanol (99,5+0,5) aufgenommen. Die Suspension wurde für 24 h bei -20 °C inkubiert für 20 min bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert. Je 20  $\mu\text{l}$  des Überstandes wurden für die Tocopherol-Bestimmung verwendet. Tocopherolgehalte wurden mittels Fluoreszenzdetektor (RF10AXL, Shimadzu-Deutschland, Duisburg, D) detektiert. Zur Kalibrierung des Systems wurden kommerziell erworbene Standards verwendet (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die erhaltenen Werte beruhen auf drei unabhängigen Extraktionen aus jeweils 50 Primärblättern.

### HPLC-Bedingungen:

Säule:	LiChrosphere Si 100, 5 $\mu\text{m}$ , 10 x 250mm
mobile Phase:	<i>n</i> -Heptan/2-Propanol (99,5+0,5)
Fluss:	1 ml min <sup>-1</sup>
Detektion	$\lambda_{\text{excitation}}=290 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{emission}}=328 \text{ nm}$

### **3.28 Medien, Puffer, Lösungen und Stammlösungen**

Alle Puffer und Lösungen wurden mit Wasser, welches durch eine PURELAB Plus<sup>TM</sup>-Wasserreinigungsanlage (USF Reinstwasser-systeme GmbH, Ransbach Baumbach, Deutschland) gesäubert und anschließend autoklaviert wurde, hergestellt. Dieses sterile Reinstwasser wird im Text als H<sub>2</sub>O angegeben.

#### 10 % SDS-Lösung

10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), autoklavieren

#### 10x Blocklösung (RNA)

10 % (w/v) Blockreagenz (Roche) in Maleinsäure-NaCl-Puffer durch 4minütiges vorsichtiges Erwärmen in der Mikrowelle (alle 30 s schütteln) lösen, autoklavieren und bei 4 °C lagern.

#### 10x PCR-Puffer

100 mM Tris-HCl,

500 mM KCl,

10, 12,5 oder 15 mM MgCl<sub>2</sub>,

pH 8.8 mit HCl einstellen

## Material und Methoden

---

### 10x MOPS-Laufpuffer

0,4 M MOPS,  
0,1 M Natriumacetat,  
10 mM Natrium-EDTA,  
pH 7,2 mit NaOH einstellen, autoklavieren

### 10x TE-Puffer

0,1 M Tris,  
2m M Natrium-EDTA,  
pH 8,0 mit 5 N bzw. 10 N HCL-Lösung einstellen, autoklavieren

### 1 M Na-Phosphatpuffer

1 M Natriumphosphat,  
pH 7,0 mit Phosphorsäure einstellen, autoklavieren

### 1x Blocklösung (RNA)

10 % (v/v) 10x Blocklösung (RNA),  
90 % (v/v) Maleinsäure-NaCl-Puffer

### 10 % N-Lauroylsarcosin-Lösung

10 % N-Lauroylsarcosin, sterilfiltrieren

### 20x SSC

3 M Natriumchlorid,  
0,3 M Natriumcitrat,  
pH 7,0 mit Zitronensäure einstellen, autoklavieren

### 3 M NaAc-Puffer (verschiedene pH-Werte)

3 M Natriumacetat,  
pH 4,6 und pH 5,0 mit konzentrierter Essigsäure einstellen, autoklavieren

## Material und Methoden

---

### 4 M NaCl-Lösung

4 M Natriumchlorid, autoklavieren

### 50x TAE-Puffer

2 M Tris,

50 mM Natrium-EDTA,

pH 8,0 mit Essigsäure einstellen, autoklavieren

### 6x DNA-Proben-Ladepuffer

60 % (v/v) Glycerin (99,8 %),

60 mM Natrium-EDTA,

0,01 % (w/v) Bromphenolblau, autoklavieren

### 8 M LiCl-Lösung

8 M Lithiumchlorid, autoklavieren

### Ampicillin-Stammlösung (50 mg ml<sup>-1</sup>)

5 % (w/v) Natrium-Ampicillinsalz in H<sub>2</sub>O lösen, sterilfiltrieren

### CI (DNA-Isolation)

24 Volumenteile Chloroform

1 Volumenteil Isoamylalkohol

### CTAB-Puffer (DNA-Isolation)

100 mM Tris

2 % N-Cetyl-N,N,N-Trimethylammoniumbromid (CTAB)

1,4 M NaCl

20 mM EDTA

0,2 % Mercaptoethanol (kurz vor Gebrauch hinzufügen)

pH 8,0 mit HCl einstellen, autoklavieren

## Material und Methoden

---

### Detektionspuffer (RNA)

0,1 M Tris,  
0,1 M Natriumchlorid,  
pH 9,5 mit 5 N bzw. 10 N HCl einstellen, autoklavieren

### Dye

50 % (v/v) Glycerin,  
0,04 % (w/v) Bromphenolblau, autoklavieren

### High-SDS-Hybridisierungspuffer

7 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS),  
50 % (v/v) deionisiertes Formamid,  
25 % (v/v) 20x SSC,  
20 % (v/v) 10x Blocklösung (RNA),  
5 % (v/v) 1 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,0),  
1 % (v/v) 10 % N-Lauroylsarcosin-Lösung

### Homogenisierungspuffer (Proteinextraktion)

20 mM Tris,  
0,25 M Saccharose,  
5 mM DDT (Dithiothieitol),  
1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonfluorid),  
0,1 % (w/w) Leupeptin,  
pH 8,2 mit HCl einstellen, anschließend mit Helium entgasen

### LB-Medium und LB-Platten

1 % (w/v) Bacto<sup>®</sup> tryptone,  
0,5 % (w/v) Bacto<sup>®</sup> yeast extract,  
1 % (w/v) Natriumchlorid,  
für LB-Platten 1,5 % (w/v) Agar-Agar zusetzen,  
pH 7,0 mit 5 N NaOH einstellen, autoklavieren

## Material und Methoden

---

### LB/Amp/X-Gal-Platten

Ansatz wie bei LB-Platten, jedoch werden, wenn die Lösung nach Autoklavieren ca. 50 °C erreicht hat,

0,08 % (v/v) X-Gal-Stammlösung (50 mg ml<sup>-1</sup>) und

0,2 % (v/v) Ampicillin-Stammlösung (50 mg ml<sup>-1</sup>) zusetzen. Danach wie Herstellung von LB-Platten

### Lysispuffer (RNA)

4,5 M Guanidinium-Thiocyanat,

50 mM HEPES,

2 % (w/v) N-Lauroylsarcosin,

pH 7,5 mit 5N KOH-Lösung einstellen,

1 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol erst kurz vor Gebrauch zusetzen

### Maleinsäure-NaCl-Puffer

0,15 M Natriumchlorid,

0,1 M Maleinsäure,

pH 7,5 mit NaOH-Plätzchen einstellen, autoklavieren

### RNA-Probenpuffer

40 % (v/v) deionisiertes Formamid,

20 % (v/v) Dye,

16 % (v/v) dest. H<sub>2</sub>O,

14 % (v/v) 37%ige Formaldehyd-Lösung,

10 % (v/v) 10x MOPS-Laufpuffer (pH 7,2)

### TE-Puffer

10 mM Tris-HCl pH 7,5,

1 mM EDTA

### TES-Puffer

10mM Tris,  
5mM EDTA,  
1% (w/v) SDS  
pH 7,4 mit HCL-Lösung einstellen, autoklavieren

### Tfbl-Puffer

20 % (v/v) 0,5 M Rubidiumchlorid-Lösung,  
15 % (v/v) Glycerin (99,8 %, autoklaviert),  
10 % (v/v) 0,5 M Mangan(II)-Chlorid-Lösung,  
6 % (v/v) 0,5 M Kaliumacetat-Lösung,  
2 % (v/v) 0,5 M Calciumchlorid-Lösung,  
pH 5,8 mit verdünnter Essigsäure einstellen, auffüllen und sterilfiltrieren

### TfbII-Puffer

15 % (v/v) 0,5 M Calciumchlorid-Lösung,  
15 % (v/v) Glycerin (99,8 %, autoklavieren),  
2 % (v/v) 0,5 M MOPS-Lösung,  
2% (v/v) 0,5 M Rubidiumchlorid-Lösung,  
pH 6,5 mit 1 N KOH-Lösung einstellen, auffüllen und sterilfiltrieren

### Waschpuffer-1

10 % (v/v) 20x SSC,  
0,1 % (v/v) 10% SDS-Lösung

### Waschpuffer-2

2,5 % (v/v) 20x SSC,  
0,1 % (v/v) 10% SDS-Lösung

### Waschpuffer-3

10 % (v/v) Maleinsäure-NaCl-Puffer,  
0,3 % (v/v) Tween<sup>®</sup>20

### X-Gal-Stammlösung (50 mg ml<sup>-1</sup>)

100 mg 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid (X-Gal) in 2 ml N, N'-Dimethylformamid lösen, in lichtgeschützten Gefäßen bei -20 °C lagern.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Etablierung des Versuchssystems und physiologische Charakterisierung von Primärblättern der Gerste während der natürlichen Blattseneszenz und nach Exposition der Pflanzen mit den Schwermetallen Cadmium und Kupfer**

Der physiologische Zustand von Primärblättern der Gerste sollte während der natürlichen Blattseneszenz und unter Exposition mit Schwermetallen an den zwei Parametern Chlorophyllgehalt und Photosystem II Effizienz charakterisiert werden, die sowohl präzise den Verlauf der Blattseneszenz (Miersch et al. 2000), als auch den Einfluss von Schwermetallen auf die Blattentwicklung charakterisieren.

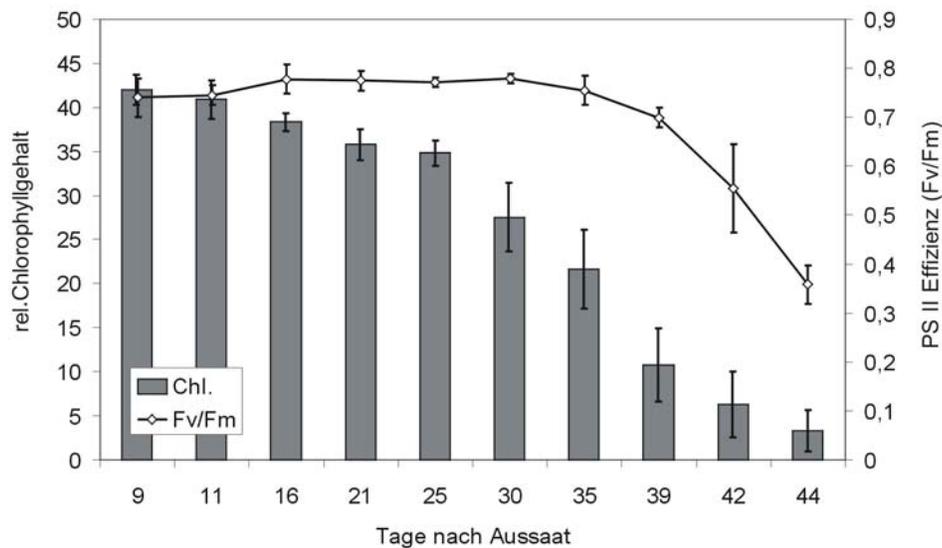
In vielen in der Literatur beschriebenen Experimenten, bei denen die Auswirkungen von Schwermetallstress auf Süßgräser untersucht wurden, wurden Keimlinge schon während der Wachstumsphase der Primärblätter für 96 h oder sogar noch länger schwermetall exponiert (Snowden und Gardner 1993, Brune und Dietz 1995, Blinda et al. 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen gezielt die primäre Antwort der Pflanze auf einen Schwermetallstress im ausgewachsenen Blatt analysiert. Dies sollte eine klarere Erfassung der durch die Schwermetalle ausgelösten Reaktionen unabhängig von während des Wachstums auftretenden Sekundäreffekten ermöglichen, die durch eine längere Exposition nicht ausgeschlossen werden können. Darüber hinaus sollten die durch die Schwermetallbehandlung ausgelösten Prozesse mit denen verglichen werden, die während der natürlichen Blattseneszenz induziert werden.

#### **4.1.1 Charakterisierung der Blattseneszenz**

Zur Analyse der Blattseneszenz wurde das von Miersch et al. (2000) entwickelte Anzuchtssystem verwendet. Hierzu werden Keimlinge der Gerste in einem festen Anzuchtregime unter definierten Umweltbedingungen angezogen. Das Primärblatt reift in

diesem System binnen 9-10 Tagen zu maximaler Länge und Photosyntheseleistung heran. Dieser Zustand bleibt für 48-72 h konstant, danach kommt es mit beginnender Blattseneszenz zu einem graduellen Abbau von Chlorophyllen und Proteinen (Miersch et al. 2000).

Wie aus Abbildung 4 ersichtlich, nimmt der Chlorophyllgehalt nach dem 12. Tag nach Aussaat kontinuierlich ab, während die Effizienz von verbleibenden Photosystem II Zentren über einen langen Zeitraum (ca. 36 d nach Aussaat) konstant bleibt und erst nach dem 36. Tag nach Aussaat drastisch absinkt. Das frühe Absinken im Chlorophyllgehalt spiegelt frühe Seneszenzprozesse wieder, während ein Abfall in der PS II Effizienz das Zusammenbrechen der funktionellen Organisation des Photosyntheseapparates in späten Phasen der Blattseneszenz anzeigt.



**Abb. 4** Chlorophyllgehalt (relative Einheiten) und Photosystem II Effizienz (Fv/Fm) während der Entwicklung von Primärblättern der Gerste unter stringenten Wachstumsbedingungen. Der Chlorophyllgehalt nimmt nach Durchschreiten der Blattrife linear ab, während die PS II Effizienz über einen langen Zeitraum konstant bleibt und dann abrupt absinkt. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus zehn unabhängigen Messungen.

Für die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Untersuchungen wurden Pflanzen unter den beschriebenen, konstanten Umweltbedingungen auf Erde angezogen und RNA für Northern Analysen aus reifen (9 d), früh seneszenten (21 d) und seneszenten (39 d) Blättern isoliert.

#### **4.1.2 Charakterisierung des Schwermetallstresses**

Im Gegensatz zu dem beschriebenen Anzuchtssystem zur Untersuchung seneszenten Blätter, musste im Rahmen der Arbeit ein Versuchsansatz zur Analyse der Reaktionen der Gerstenblätter auf Schwermetallstress etabliert werden. Um die durch Schwermetalle ausgelösten Stressreaktionen mit den Prozessen der Blattseneszenz vergleichen zu können, erfolgte die Exposition mit Schwermetallen genau in dem Zeitfenster zwischen der Blattrife und dem Beginn der natürlichen Blattseneszenz. Als System wurde hierfür eine hydroponische Anzucht gewählt, bei der Gerstenkeimlinge in Bechergläsern auf Watte angezogen und mit Nährmedium (siehe Kapitel 3.1) versorgt wurden.

In diesem System erreichten die Primärblätter nach 10 Tagen ihre maximale Blattlänge und den höchsten Chlorophyllgehalt. Anschließend erfolgte eine 48 h Exposition mit kupfer-, bzw. cadmiumhaltigen Nährlösungen. Zunächst wurden für Kupfer und Cadmium verschiedene Konzentrationen gewählt und die Auswirkungen auf Chlorophyllgehalt und Photosystem II Effizienz in Primärblättern nach 48 h Exposition gemessen.

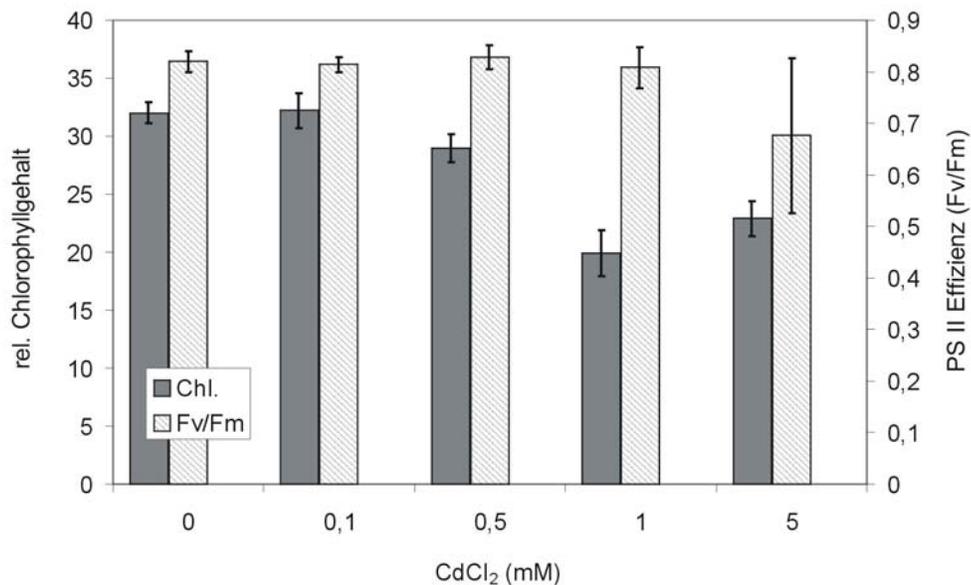
Für die Behandlung mit Cadmium wurden zunächst Cadmiumkonzentrationen von 0,1 mM bis 5 mM getestet. Wie aus Abbildung 5 ersichtlich, sinkt der Chlorophyllgehalt bei Cadmiumkonzentrationen von 0,5 mM nach zweitägiger Exposition um 10 %, bei 1 mM signifikant um 40 % und bei hohen Konzentrationen von 5 mM um 30 % im Vergleich zu Primärblättern von nichtgestressten Pflanzen.

Die Effizienz von Photosystem II wird hingegen erst bei sehr hohen Konzentrationen von Cadmium (5 mM  $\text{CdCl}_2$ ) beeinflusst, sie sinkt bei dieser Konzentration um 20 %.

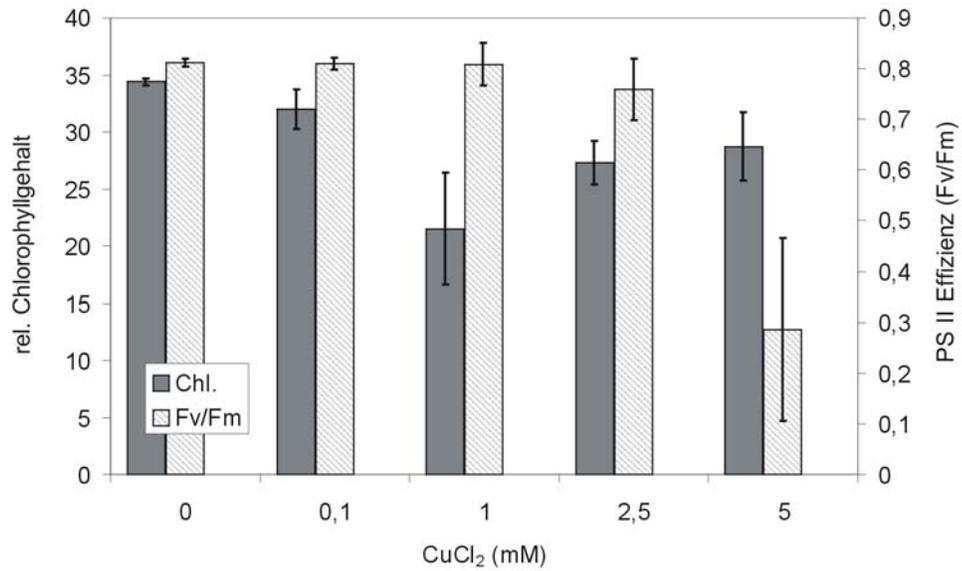
Für mit Kupfer exponierte Primärblätter ergibt sich ein ähnliches Bild (Abb. 6). Bei einer Kupferkonzentrationen von 1 mM  $\text{CuCl}_2$  nimmt der Chlorophyllgehalt im Vergleich zu der

unbelasteten Kontrolle um 30% ab. Höhere Konzentrationen an Kupfer scheinen den Abbau an Chlorophyll jedoch zu inhibieren. Hier liegt der Abbau bei ca. 20 % (2,5 mM CuCl<sub>2</sub>), bzw. bei ca. 15 % (5 mM CuCl<sub>2</sub>) im Vergleich zu Primärblättern ungestresster Pflanzen. Die Effizienz von Photosystem II Zentren wird, wie auch bei hohen Konzentrationen von CdCl<sub>2</sub>, nur durch hohe CuCl<sub>2</sub>-Konzentrationen signifikant beeinträchtigt.

Auf der Basis der physiologischen Messungen wurden für die weiteren Experimente Cadmiumkonzentrationen von 0,5- und 1 mM sowie Kupferkonzentrationen von 1,0- und 2,5 mM gewählt. Abbildung 7 zeigt den phänotypischen Effekt von 48stündiger 1,0 mM Cadmium-, bzw. 1 mM Kupferchlorid Expositionen von 10 Tage alten Gerstenkeimlingen. Der Chlorophyllgehalt nimmt sichtbar ab, das Wachstum der Sekundärblattes wird durch die Schwermetallexposition deutlich gehemmt.



**Abb. 5** Einfluss von verschiedenen Cadmiumkonzentrationen auf Chlorophyllgehalt (relative Einheiten) und Photosystem II Effizienz (Fv/Fm) von 12 d alten Primärblättern der Gerste nach 48 h Exposition. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus zehn unabhängigen Messungen.



**Abb. 6** Einfluss von verschiedenen Kupferkonzentrationen auf Chlorophyllgehalt (relative Einheiten) und Photosystem II Effizienz (Fv/Fm) von 12 d alten Primärblättern der Gerste nach 48 h Exposition. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus zehn unabhängigen Messungen.



**Abb. 7** Gerstenkeimlinge 12 d nach Aussaat hydroponisch auf MS-Medium angezogen. Die Pflanzen im mittleren Becherglas wurden für 48 h mit einer 1 mM Kupferlösung (MS+Cu), die Pflanzen im rechten Becherglas für 48 h in einer 1 mM Cadmiumlösung (MS+Cd) exponiert.

#### 4.1.3 Einfluss von Kupfer und Cadmium auf die $\alpha$ - und $\gamma$ -Tocopherolsynthese

Erhöhte Schwermetallkonzentrationen erhöhen die Gefahr des oxidativen Stresses für lebende Zellen. Eine Stressantwort ist die verstärkte Synthese von Antioxidanzien wie das im Chloroplasten lokalisierte Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) (Blokchina et al. 2003).  $\alpha$ -Tocopherol wird durch die  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase ( $\gamma$ -TMT) aus der Vorstufe  $\gamma$ -Tocopherol synthetisiert.

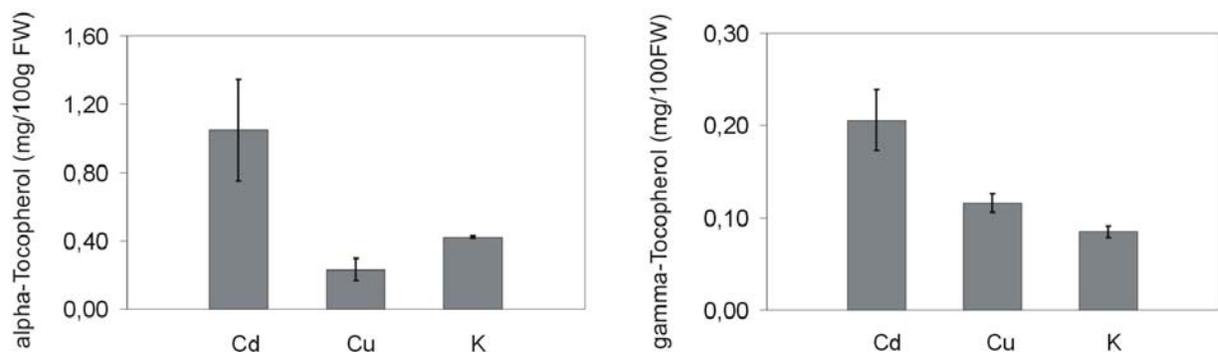
Um Aussagen darüber zu erhalten, ob es während der Behandlung mit den Schwermetallen Kupfer und Cadmium möglicherweise in den Blättern zu einer Akkumulation von  $\alpha$ -Tocopherol kommt, wurde in Zusammenarbeit mit der AG Krupinska (Botanisches Institut, Universität Kiel) der Gehalt von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol aus 48 h 1 mM kupfer- und cadmiumexponierten Primärblättern bestimmt. Abbildung 8a zeigt die mittels HPLC ermittelten Gehalte an  $\alpha$ -Tocopherol, Abbildung 8b die Gehalte an  $\gamma$ -Tocopherol bezogen auf jeweils 100 g Frischmasse (FW).

Während der 48stündigen Exposition der Pflanzen kommt es zu einer signifikanten Abnahme von  $\alpha$ -Tocopherol in kupfergestressten Pflanzen um mehr als die Hälfte (55 %) ( $0,230 \pm 0,066$  mg /100g FW) im Vergleich zu ungestressten Blättern ( $0,421 \pm 0,006$  mg /100g FW). Unter Cadmiumexposition hingegen nimmt der Gehalt an  $\alpha$ -Tocopherol ( $1,049 \pm 0,297$  mg /100 g FW) signifikant um das 2,5fache zu. Dies deutet darauf hin, dass dem Cadmiumstress im Vergleich zum Kupferstress unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen, wobei die durch Cadmiumexposition ausgelösten Prozesse von der Pflanze mit einer erhöhten Produktion an Vitamin E beantwortet werden.

Die deutlich niedrigeren Gehalte an  $\gamma$ -Tocopherol im Verhältnis zu  $\alpha$ -Tocopherol sind für Pflanzenblätter typisch (Collakova und DellaPenna 2003a, Bergmüller et al. 2003, Falk et al. 2003). Die Analyse der  $\gamma$ -Tocopherolgehalte zeigt, dass auch schon die Vorstufe des Vitamin E nur durch eine Exposition der Pflanzen mit Cadmium ( $0,206 \pm 0,033$  mg /100g FW)

im Vergleich ungestressten Kontrollpflanzen ( $0,085 \pm 0,006$  mg /100g FW) deutlich um das 2,5fache erhöht ist.

Der Abnahme von  $\alpha$ -Tocopherol in Primärblättern nach Kupferexposition steht eine leichte Zunahme um 73 % an  $\gamma$ -Tocopherol ( $0,116 \pm 0,010$  mg /100 g FW) entgegen, die aber verglichen mit der 250 %igen Zunahme von  $\gamma$ -Tocopherol unter Cadmiumexposition um das 3,5fache niedriger ist.



**Abb. 8a /8b** Gehalt an  $\alpha$ -Tocopherol (**8a**) und seiner Vorstufe  $\gamma$ -Tocopherol (**8b**) in 12 d alten Primärblättern nach 48 h 1 mM Kupfer- bzw. Cadmiumexposition. Jeder Datenwert repräsentiert den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen.

Um noch genauere Aussagen über die Rolle der Tocopherole machen zu können, müssten begleitende Northern Analysen der  $\gamma$ -TMT, welche in biotisch- und abiotisch-gestressten Blättern das Schlüsselenzym der Tocopherol-Biosynthese darstellt (Collakova und DellaPenna 2003b) sowie der Hydroxyphenylpyruvat-Dehydrogenase (HPPD), welche die Synthese des Vorläufers Homogentisat (HGA) von Tocopherolen katalysiert und eine wichtige regulatorische Funktion besitzt (Garcia et al. 1997, Falk et al. 2003), durchgeführt werden.

## 4.2. Metallothioneine

### 4.2.1 Isolation von Gersten Metallothionein cDNAs und Charakterisierung der Genexpression

#### 4.2.1.1 Isolation von Gersten Metallothionein cDNAs

Zu Beginn dieser Arbeit waren eine Reihe von cDNA-Sequenzen für verschiedene Typen von Metallothioneinen (MTs) aus unterschiedlichen Pflanzen bekannt. Genexpressionsmuster von identifizierten MTs aus Gräsern (Reis *OsMT1*, *OsMT2*; Weizen *Wali1*, *Ec*; Gerste *Ids1*, *B22E*; Rispengras *MT 2*) sowie dikotyledoner Pflanzen wie *Arabidopsis* oder Raps ergaben kein vollständiges Bild zur möglichen Rolle von MTs in Blättern während des Schwermetallstresses und der natürlichen Blattseneszenz.

Um der Frage nachzugehen, ob die verschiedenen MTs möglicherweise unterschiedliche Rollen bei diesen Prozessen spielen, sollte in einem ersten Ansatz geklärt werden, inwieweit die Expression der entsprechenden MT-Gene unter den verschiedenen Bedingungen reguliert wird.

Bis zu diesem Zeitpunkt waren keine Genexpressionsmuster von MTs in Gerstenblättern beschrieben. Die Genexpression der beiden vorher bekannten Gersten MTs, *Ids-1* und *B22E* wurde in Wurzeln unter Eisenmangel (*Ids-1*, Okumura et al. 1991) bzw. während der Embryogenese im Samen (*B22E*, Klemsdal et al. 1991) untersucht.

Deshalb mussten erst mögliche im Blatt der Gerste vorliegende MTs anhand ihrer entsprechenden cDNAs identifiziert werden. Ausgehend von Aminosäuresequenzen bekannter MTs aus Gerste, Reis, Weizen und Mais wurden daher spezifische Primer für Gerste abgeleitet. Mittels RT-PCR wurde dann versucht, aus RNA von seneszenten oder schwermetallbelasteten Primärblättern der Gerste mögliche MT-cDNAs zu amplifizieren. Zusätzlich wurde gezielt nach mutmaßlichen Gersten-MT cDNA Sequenzen in EST-Datenbanken (NCBI) gesucht. In diesem Falle wurden die nachfolgenden RT-PCR Amplifikationen mit solchen oder ähnlichem RNA-Spezies, wie sie auch für die cDNA-Isolation des jeweiligen Gersten-ESTs verwendet wurde, durchgeführt. Im Falle von RT-PCR

Reaktionen, die zahlreiche unspezifische PCR-Produkte amplifizierten, wurde eine PCR-Amplifikation mit *nested*-Primern (zweites Primerpaar, welches am gleichen DNA-Strang bindet, jedoch innerhalb des durch den ursprünglich amplifizierten Bereiches) durchgeführt. Erhaltene PCR-Produkte deren Größe in dem vorhergesagten Basenpaarlängenbereich lagen, wurden kloniert und sequenziert.

Mit Hilfe der oben beschriebenen Techniken konnten sechs neue Gersten MT-cDNAs identifiziert werden, die in Tabelle 1 aufgeführt sind. Zusätzlich wurde das schon bekannte Gersten-MT (*Ids-1*, Okumura et al. 1991) in seiner ungespleißten Form, welche ein zusätzliches DNA-Intron enthält, isoliert. Abgeleitet von der mutmaßlichen Aminosäuresequenz wurden die identifizierten Gersten MTs nach der für *Arabidopsis* verwendete Nomenklatur klassifiziert. Ursprünglich von Robinson et al. (1993) vorgeschlagen, wurde diese Klassifizierung von Cobett und Goldsbrough (2000, 2002) als weiterhin für Pflanzen gebräuchliche Nomenklatur weitergeführt. Demnach werden *HvMT-1a*, *Ids-1* und *HvMT1-d* dem Typ 1 der MTs zugeordnet. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *HvMT-2a* und *HvMT-2b* wurden als Typ 2 klassifiziert. Die identifizierten MTs *HvMT-3a* und *HvMT-4a* zeigen die Charakteristika entsprechend MT Typ 3 bzw. Typ 4.

*HvMT-1a* (AJ51344<sup>1</sup>, 225 bp) wurde aus cadmiumexponierten Primärblättern isoliert. Die aus der Nukleotidsequenz abgeleitete Aminosäuresequenz von 75 Aminosäuren (aa) zeigt eine 97 %ige Homologie (74/75 von 75 aa) zu *Wali 1* (P43400), einem Typ 1 MT aus Weizen (*Triticum aestivum*), welches in Blättern und Wurzeln durch Aluminiumstress induziert wird (Snowden und Gardner 1993).

Mit Hilfe derselben Primer wie für *HvMT-1a*, jedoch mit isolierter RNA aus cadmiumexponierten Wurzeln, wurde ein 222 bp großes RT-PCR Produkt amplifiziert. Die so erhaltene cDNA eines mutmaßlichen Typ 1 MTs zeigt eine 99 %ige Homologie (73/74 von 74 aa) zu

---

<sup>1</sup> Der Alphanummerische Code in Klammern bezeichnet jeweils die Protein-Identifikationsnummer in der Datenbank (NCBI).

einem EST<sup>2</sup> aus Gerste (BQ766316) und wurde in die Datenbank mit dem Namen *HvMT-1d* (AJ555615) eingetragen.

Als dritte Isoform eines Typ 1 MTs wurde versucht, das schon bekannte Gersten MT *Ids-1* zu isolieren. Sowohl in Blättern als auch kupferexponierten Wurzeln wurde mit *Ids-1* spezifischen Primern ein 400 bp großes RT-PCR Produkt erhalten. *Ids-1* (226 bp, D50641) wird unter Eisenmangel in Wurzeln exprimiert (Okumura et al. 1991). Die codierende Sequenz des erhaltenen RT-PCR Produktes (300 bp) zeigte eine 100 %ige Identität (100/100 von 100 aa) zu der ungespleißten mRNA von *Ids-1*, welche ein zusätzliches Intron von 74 bp beinhaltet (226 bp plus 74 bp).

Eine vierte Isoform eines Gersten Typ 1 MT wurde von Sequenzen eines ESTs (BQ768005) aus der Datenbank abgeleitet. Die Sequenz dieses ESTs zeigt eine 93 %ige Homologie (69 /74 von 74 aa) zu Gerste *HvMT-1d*. Auf den Versuch, diese cDNA mittels RT-PCR zu amplifizieren, wurde dieser Arbeit verzichtet.

Mit Hilfe von Primern, die von bekannten Typ 2 MTs von Reis (*Oryza sativa*) und Rispengras (*Poa secunda*) abgeleitet wurden, konnten zwei Typ 2 MT cDNAs der Gerste isoliert werden. *HvMT-2a* (234 bp, AJ511345), welches aus seneszenten Primärblättern isoliert wurde, zeigt eine 73 %ige Homologie (58/79 von 80 aa) zu dem Reis MT *RicMT* (BAA19661). Im Stängel von Reispflanzen wird dieses Typ 2 MT konstitutiv exprimiert (Yu et al. 1998).

Die 241 Basenpaare umfassende Nukleotidsequenz von *HvMT-2b* (AJ511346), ebenfalls aus seneszentem Blattmaterial isoliert, repräsentiert auch ein mögliches Typ 2 MT. *HvMT-2b* weist eine 75 %ige Homologie (60/80 von 80 aa) zu Rispengras (*Poa secunda*) MT 2 (AAK38824) auf, welches während der Lichtexposition abgetrennter Blätter exprimiert wird (Wei et al. 2002).

Die cDNA von *HvMT-3a* (AJ555613, 186 bp) wurde aus jungen, unreifen Primärblättern isoliert. *HvMT-3a* codiert für ein putatives MT-Protein mit 62 Aminosäuren. Dieses Typ 3 MT

---

<sup>2</sup> EST- engl. für *expressed sequence tag*. Bei diesen Nukleotidsequenzen handelt es sich um cDNA-Sequenzen aus den jeweiligen Pflanzenspezies, die nach reverser Transkription aus mRNA und Klonierung sequenziert werden und in Datenbanken zu Verfügung gestellt werden.

zeigt 100 % Homologie (62/62 of 62 aa) zu einem EST BJ460097 aus Gerste, 97 % Homologie (57/62 von 62 aa) zu einem EST aus Weizen (CA687517) sowie 81 % Homologie (50/62 von 62 aa) zu einer MT-Sequenz aus Reis (AAB53811).

Die 231 Basenpaare umfassende Nukleotidsequenz von *HvMT-4a* (AJ555614) wurde aus seneszenten Primärblättern isoliert. Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz von 77 aa zeigt ein 89 % Homologie (72/81 von 81 aa) zu dem Weizen *E<sub>c</sub>-MT* (CAA48350), das in Weizen während der Embryogenese induziert wird (Kawashima et al. 1992).

**Tab. 1** Isolierte Metallothionein cDNAs, amplifiziert mittels RT-PCR. Je 1 µg RNA wurde aus Wurzeln oder Primärblättern von Gerste eingesetzt, die unter den in der Tabelle aufgeführten Wachstumsbedingungen angezogen wurden.

cDNA	Access. No.	Länge der cDNA (bp)	voll- ständ- iger ORF	RNA isoliert aus	mögliche Protein Funktion	Eintrag Datenbank (NCBI) mit höchster Homologie Gen, Access. No. (Organismus) Homologie von x Aminosäuren (aa)
<i>HvMT-1a</i>	AJ511344 CAD54078	360 (ORF <sup>3</sup> 225)	ja	48 h cadmium- exponierte Primär- blätter, 12 d nach Aussaat	Metallothionein Typ 1	<i>wali1</i> , P43400 ( <i>Triticum aestivum</i> ) 74/75 von 75 aa
<i>Ids-1</i> pre- mRNA	D50641 BAA23628	400 (ORF 300)	ja	48 h cadmium- exponierte Primär- blätter, 12 d nach Aussaat	Metallothionein Typ 1	<i>Ids-1</i> pre-mRNA, D50641 ( <i>Hordeum v.</i> ) 100/100 von 100 aa

<sup>3</sup> ORF- *engl für open reading frame*. Der ORF stellt den codierenden Bereich einer Nukleotidsequenz dar, welcher mit einem Startcodon beginnt und mit einem Stoppcodon endet.

**Tab. 1** Isolierte Metallothionein cDNAs (Fortsetzung).

cDNA	Access. No.	Länge	voll-	RNA isoliert aus	mögliche	Eintrag Datenbank (NCBI)
	1) DNA	der	ständ-		Protein	mit höchster Homologie
	2) Protein	cDNA	iger		Funktion	Gen, Access. No.
		(bp)	ORF			(Organismus)
						Homologie von x
						Aminosäuren (aa)
<i>HvMT-1d</i>	AJ555615 CAD88268	222	ja	48 h cadmium- exponierte Wurzeln, 12 d nach Aussaat	Metallothionein Typ 1	EST, BQ766316 ( <i>Hordeum vulgare</i> ) 73/74 von 74 aa
<i>HvMT-2a</i>	AJ 511345 CAD54079	234	ja	unbehandelte Primärblätter, 39 d nach Aussaat	Metallothionein Typ 2	ricMT, BAA19661 ( <i>Oryza sativa</i> ) 58/79 von 80 aa
<i>HvMT-2b</i>	AJ 511346 CAD54080	241	ja	unbehandelte Primärblätter, 39 d nach Aussaat	Metallothionein Typ 2	MT 2, AAK38824 ( <i>Poa secunda</i> ) 60/80 von 80 aa
<i>HvMT-3a</i>	AJ555613 CAD88266	326 (ORF 186)	ja	unbehandelte Primärblätter, 4 d nach Aussaat	Metallothionein Typ 3	EST, BJ460097 ( <i>Hordeum v.</i> ) 62/62 von 62 aa
<i>HvMT-4a</i>	AJ555614 CAD88267	400 (ORF 231)	ja	unbehandelte Primärblätter, 39 d nach Aussaat	Metallothionein Typ 4 (E <sub>c</sub> )	E <sub>c</sub> , CAA48350 ( <i>Triticum aestivum</i> ) 72/81 von 81 aa

#### 4.2.1.2 Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen der isolierten Gersten MTs mit bekannten MTs der Familie der Poaceen

Abbildung 9 zeigt einen Sequenzvergleich („Alignment“) auf Proteinebene der isolierten MT cDNAs sowie der bekannten Gersten MTs *Ids-1*, *B22E* (S16534) und des Gersten ESTs BQ768005. In diesen Vergleich wurden die Sequenzen von 17 bekannten MTs anderer Süßgräser mit einbezogen. Die Analyse der Sequenzen zeigt, dass es große Homologien der

einzelnen MT Typen zueinander gibt. Darüber hinaus zeigt sich, dass die Cystein-Motive der Amino- und Carboxyterminalen Domänen zu 100 % konserviert sind. Aus dieser übereinstimmenden Cysteinverteilung lassen sich die verschiedenen *Poaceae* MTs in sechs verschiedene Typen (MT 1, MT 2a, MT 2b, MT 2c, MT 3 und MT 4) einordnen (Abbildung 10).

Die vier Gersten MTs *HvMT-1a*, *HvMT-1d*, EST BQ768005 und *Ids-1*, die beiden Reis MTs *OsMT-1* und MT 1 (AAB70546), das Weizen MT *Wali1* sowie das MT aus Rotschwingel (*Festuca rubra*) *mcMT 1* weisen konservierte Cysteincluster von je sechs Cysteinen in den Amino- und Carboxyterminalen Domänen (MxCxCxxxCxCxxxCxC.../-...CxCxxxCxCxxCxC) auf. MTs mit dieser Cysteinverteilung wurden als Typ 1 klassifiziert.

Im Gegensatz zu den Typ 1 MTs zeigen die Reis MTs mit den Zugangsnummern der Datenbank AAB53811 und AAB65698, das *HvMT-3a* aus Gerste sowie der EST CA687517 aus Weizen nur vier aminoterminalen Cysteine, während der carboxyterminale Teil ebenfalls wie Typ 1 MTs sechs Cysteine aufweist (MxxxCxxCxCxxxxC.../...CxCxxxCxCxxCxC). Das aus *Arabidopsis* bekannte MT (AAM64769) zeigt große Homologien zu diesen MTs der Süßgräser, besitzt jedoch acht Cysteine im carboxyterminalen Teil. Dieses *Arabidopsis* Homolog wurde gemäß der von Cobbett und Goldsbrough (2002) verwendeten Nomenklatur, als MT 3 klassifiziert. Deshalb wurden die homologen MTs der Süßgräser als MT 3-ähnliche MTs bezeichnet (MT 3-like).

# Ergebnisse

## Type 1

	10	20	30	40	50	60	70	80	
HvMT-1a (CAD54078)	M S C N C G S S C G C G S D C K C G K M Y P D L T E Q G S A T A Q V A A - V V V L G M A P E N K A G - - Q P E V A A - - G Q S G E G C S C G D N C K C N P C N C	75							
Ta Wali1 (P43400)	M S C N C G S G C S C G S D C K C G K M Y P D L T E Q G S A A A Q V A A - V V V L G V A H E N K A G - - Q P E V A A - - G Q S G E G C S C G D N C K C N P C N C	75							
Fr mcMT1 (AAB70464)	M S C S C G S S C G C G S N C K C G K M Y P D L D E Q A S T T T Q - - A - - V V V L G V A H E N K A G - - Q P E M A S - - G - - E S C K C G A N C K C D P C N C	70							
Os MT (AAB70546)	M S C S C G S S C S C G S N C S C G K K Y P D L E E K S S S T K A T - - - A V L G V A P E K K A Q - - H P E A A A E S G E T A H G C S C G S C R C N P C N C	74							
OsMT-1 (AAC49626)	M S C S C G S S C S C G S N C S C G K K Y P D L E E K S S S T K A T - - - V V L G V A P E K K A Q - - Q P E A A A E S G E T A H G C S C G S C R C N P C N C	74							
Zm MT (P30571)	M S C S C G S S C G C G S S C K C G K K Y P D L E E T S T A A Q P T - - - V V L G V A P E K K A A P E F V E A A A E S G E A A H G C S C G S G C K C D P C N C	76							
Hv ids-1 (BAR23628)	M S C S C G S S C G C G S N C N C G K M Y P D L E E K S G A T M Q V - - T M I V L G V G S - A K V Q - - F E E A A A E S G E A A H G C S C G A N C K C N P C N C	74							
HvMT-1d (CAD88268)	M S C N C G S S C G C G S N C N C G K M Y P D L E E K S G A I M Q A - - T A V I L G V R F - A K V F - - F E E V A E S G E A G H G C S C G A S C K C N P C N C	74							
Hv EST (DQ768005)	M S C S C G S S C G C G S N C N C G K M Y P D L E E K S G A I M Q A - - T A V V L G V G P - A K V Q - - F E E A A E S D E A G H G C S C G A S C K C N P C N C	74							

## Type 2a

	10	20	30	40	50	60	70	80	
HvMT-2a (CAD54079)	M S C C G G N C G C G S A C K C G N G C G G C N M Y P E V E A A G A T - L L V A A A A T - - H K A S S G G M E M A A E - - - N G G C G C T Q C K C G T S C - G C S C C S C	78							
Os MTE (AAB18814)	M S C C G G N C G C G S G C Q C G G C G G C K M F P D V E A T A T T K T P V L A A P S - - N K A S S G G M E M A V E S G E N G G C G C N T C K C G T S C S G C S C C S C N	84							
Os ricMT (BAR19661)	M S C C G G N C G C G S S C Q C G N G C G G C K - Y S E V E P T T T T - T P L A D A T N K G S G A A S G G S E M G A E - - - N G S C G C N T C K C G T S C - G C S C C N C N	80							
Os MT (AAB70545)	M S C C G G N C G C G S S C Q C G N G C G G C N - Y S E V E P T T T T - T P L A D A T N K G S G A A S G G S E M G A E - - - N G S C G C G S C K C G T S C - G C S C C N C N	80							

## Type 2b

	10	20	30	40	50	60	70	80	
HvMT-2b (CAD54080)	M S C C G G N C G C G S G C K C G N G C G G C K M Y P G M D E G V S T T A T S S Q A L V M G V A P S K G N G P S F E - - - - A A A A E N G G C K C G P N - C T C N P C T C	80							
Ps MT (AAK38824)	M S C C G G S C G C G S G C Q C G G C G G C K M F P D V E A T A T T K T P V L A A P S - - S K P S F E D A A A A T G A E N G G C K C G D N - C T C N P C T C K	80							
Zm MT (AJ006700)	M S C C G G N C G C G S G C K C G S G C G G C K M Y P D M A E Q V T T - - - - T T T I M G V A P S - - - K G G F E - - - A A A G A E N G G C K C G A A S C T C D P C T C K	75							
OsMT-2 (AAC49627)	M S C C G G N C G C G S G C Q C G S G C G G C K M Y P E M A E E V T T - - - - T Q T V I M G V A P S K G H A E G L E A G A A A G A G A E N G - C K C G D N - C T C N P C N C G K	82							

## Type 2c

	10	20	30	40	50	60	70	
Hv B22E (s16534)	M S C C G G K C G C G A G C Q C G T G C G G C K M F P D V E A T A G A A A H V M P T A S H K G S S G G F E M A G G E T G G C D C A T C K C G T R A A A P A A A							
					80	90	100	110
						A S E P A P A P R P A G R G E H E D E R R T S N T N Q A P S P S P S Y H Q		115

## Type 3-like

	10	20	30	40	50	60	
HvMT-3a (CAD88266)	M A D K C G N C D C A D K T Q C V K K G D S Y G I V M V D T E K S H - - - L E V Q E T A E N D D K C K C G T S C T C T N C T C G H	62					
Ta EST (CA687517)	M A D K C G N C D C A D K T Q C V K K G D G Y G I V M V D T E K S H - - - F E V Q E A A E N D G K C K C G A S C T C T N C T C G H	62					
Os MT (AAB53811)	M S D K C G N C D C A D K S Q C V K K G T S Y G V I V E A E K S H - - - F E E V A A G E E N G G C K C G T S C S C T D C K C G K	62					
Os MT (AAB65698)	M S D K C G N C D C A D K S Q C V K K G T S Y G V L V D A E K T T S K W L R R S A T K K T T G G C K C T T G C S C A G C N C G K	65					

## Type 4

	10	20	30	40	50	60	70	80	
HvMT-4a (CAD88267)	M G C D D K C G C A V P C P G G T G C R C T S - A R S G A - - - E H T T C A C G E H C G C N P C A C G R E G T P S G R E N R R R S N C S G A A C N C A S C G S T A	77							
Ta Ec (CA448350)	M G C D D K C G C A V P C P G G T G C R C T S - A R S G A A A G E H T T C G C G E H C G C N P C A C G R E G T P S G R E N R R R A N C S C G A A C N C A S C G S A T A	81							
Zm MT (CA484233)	M G C D D K C G C A V P C P G G K D C R C T S - G S G G Q R - - - E H T T C G C G E H C E C S P C T C G R A T M P S G R E N R R R A N C S C G A S C N C A S C A S A	77							
Os MT (AAG13588)	M G C D D K C G C A V P C P G G T G C R C A S A R S G G G - - - D H T T C S C G D H C G C N P C R C G R E S Q P T G R E N R R A G C S C G D S C T C A S C G S T T T T A P A A T T	87							

**Abb. 9** Proteinsequenzvergleich bekannter MTs der Poaceen. Die Klassifizierung der verschiedenen MT-Typen basiert auf der Verteilung ihrer Cysteindomänen (siehe Abb. 10). Die Angaben in den Klammern zeigen die Protein-Identifikations-Nummern der NCBI Datenbank. Identische Aminosäuren der aufgeführten Peptidsequenzen sind grau markiert.

Die als Typ 4 bezeichneten MTs differieren deutlich von allen anderen MT Typen. Diese auch als E<sub>c</sub>-MTs bezeichneten MTs, weisen eine dritte Cysteindomäne (sechs Cysteine) zwischen den amino- (sechs Cysteine) und carboxyterminalen (fünf Cysteine) Domänen MxCxxxCxCxxxCxxxxCx.../...CxCxxxCxCxxCx.../...CxCxxxCxCxxC) auf. Das *HvMT-4a* aus Gerste, E<sub>c</sub>-like MT (AAG13588) aus Reis, das Mais (*Zea mais*) E<sub>c</sub>-like MT (CAA84233) sowie das Weizen E<sub>c</sub> (CAA48350) gehören zu diesem Typ 4.

Während die bestehende Nomenklatur, ausgehend von *Arabidopsis thaliana* nur von einem Typ 2 MT ausgeht, dessen Isoformen sich nur in einer Substitution einzelner Aminosäuren unterscheiden, die Anzahl der Cysteine jedoch konstant ist, können für die Typ 2 MTs der *Poaceae* drei Subtypen charakterisiert werden.

Gemeinsam ist allen Typ 2 MTs der Süßgräser ein hochkonservierter 27 Aminosäuren langer Teil im Aminoterminal, der acht Cysteine beinhaltet (MxCCxxxCxCxxxCxCxxxCxxC). Alle Typ 2 MTs aus Reis, Mais, Gerste und Rotschwingel (*Festuca rubra*) zeigen diese Charakteristika. Eine Differenzierung in drei Subtypen (2a, 2b, 2c) jedoch findet durch den carboxyterminalen Teil statt. Das Gersten MT *HvMT-2a* und die drei Reis MTs mit den Proteinidentifikationsnummern BAA19661 (*ricMT*), AAB70545 und AAB18814 (*MTE*) zeigen neun C-terminale Cysteine (CxCxxCxCxxxCxCCxC).

Die Subtypen 2b aus Reis (*OsMT-2*), Rotschwingel (AAK38824) und Gerste (*HvMT-2b*) beinhalten sechs C-Terminale Cysteine (CxCxxxCxCxxCxC), der Subtypus 2c ist sogar nur auf vier Cysteine verkürzt (CxCxxCxC). Für diesen Subtypus ist nur das schon beschriebene MT *B22E* (S16534) aus Gerste bekannt. Dieses als Typ 2 beschriebene MT, zeigt nur vier carboxyterminale Cysteine auf, besitzt jedoch eine MT-untypische cysteinfreie Elongation von 36 Aminosäuren am C-terminalen Teil des Peptides.

Im Vergleich zum aminoterminalen Teil, ist bei allen Typ 2 MTs der carboxyterminale Teil weniger stark konserviert. Allerdings gibt es ein kurzes, vier Aminosäure-langes Motiv (CKCG), welches zu 100 % konserviert ist.

N-Terminus	«Spacer»	C-Terminus	MT Typ
MXCXCXXXCXCXXXCXC	.....	CXCXXXCXCXXXCXC	1
MXXXCXXCXCXXXXXC	.....	CXCXXXCXCXXXCXC	3
MXCXXXCXCXXXCXXXCXC	CXCXXXCXCXXXCXC	CXCXXXCXCXXXCXC	4
MXCCXXXCXCXXXCXCXXXCXC	.....	CXCXXXCXCXXXCXCXXXCXC	2a
MXCCXXXCXCXXXCXCXXXCXC	.....	CXCXXXCXCXXXCXC	2b
MXCCXXXCXCXXXCXCXXXCXC	.....	CXCXXXCXC	2c

**Abb. 10** Verteilung der Cysteinreste in der Peptidkette in den verschiedenen MT Typen der Familie der *Poaceae*. M = Methionin, C = Cystein, X= jede andere Aminosäure außer Cystein. Punktierungen im „Spacer“ indizieren cysteinfreie Bereiche der Peptidkette.

#### 4.2.1.3 Expressionsanalysen der identifizierten MTs in Primärblättern nach Schwermetallexposition und während der natürlichen Blattseneszenz

Die Genexpression der neu-identifizierten Gersten MTs wurde mittels Northern Analysen untersucht. Dabei wurde einerseits die Genexpression während der Blattentwicklung vom reifen zum seneszenten Blatt hin untersucht, andererseits die Expression von MTs als mögliche Antwort auf Kupfer- und Cadmiumstress betrachtet.

Für die Blattentwicklungsstadien wurde RNA aus 9- (reifes Blatt, maximaler Chlorophyllgehalt, maximale Photosystem II Effizienz), 21- (frühe Blattseneszenz, sinkender Chlorophyllgehalt, immer noch maximale Photosystem II Effizienz) und 39 Tage (späte Blattseneszenz, stark reduzierter Chlorophyllgehalt, abnehmende Photosystem II Effizienz) alten Primärblättern isoliert. Für die Untersuchungen zur Genexpression nach Schwermetallexposition wurden für Kupfer und Cadmium Konzentrationen von je 1 mM gewählt. Diese Konzentrationen des jeweiligen Schwermetalls zeigten auf physiologischer Ebene bereits messbare Veränderungen im Chlorophyllgehalt, jedoch keine Abnahme der PS II Effizienzen. Damit wurde angenommen, dass bei diesen Konzentrationen die Pflanze

noch nicht irreversibel geschädigt war und noch in der Lage ist, durch eine differentielle Genexpression auf den Stress zu reagieren.

Abbildung 11 zeigt Northern Analysen von *HvMT-1a*, *HvMT-2a*, *HvMT2b* sowie *HvMT-3a*. Die Transkriptgehalte von *HvMT-1a* nehmen mit zunehmendem Blattalter und damit fortgeschrittener Seneszenz deutlich zu. Auch eine Exposition der Pflanzen mit Kupfer oder Cadmium führt zu einer deutlichen Genexpression von *HvMT-1a* in Primärblättern.

Der Typ 2 MT *HvMT-2a* zeigt unter diesen Umständen eine konstitutive Genexpression. Eine Abnahme im Transkriptgehalt wird nur durch Exposition von Pflanzen bei Kupferkonzentrationen von 2,5 mM erreicht, welche bei *HvMT-1a* zu einer verstärkten Genexpression führen (Abbildung 13).

Die Expressionsanalysen von *HvMT-2b* erwiesen sich als sehr schwierig, da die cDNA-Sonde mit ribosomaler RNA interferiert. In diesem Fall wurde polyA<sup>+</sup> RNA aus Kontroll- und cadmiumexponierten Pflanzen isoliert. Die Northern Analyse zeigt eine deutliche Abnahme im Transkriptgehalt von *HvMT-2b* nach Cadmiumexposition.

*HvMT-3a* wiederum zeigt eine andere Genexpression als *HvMT-1a*, *-2a* und *-2b*. Die mRNA von *HvMT-3a* wird auf einem niedrigen Niveau während der verschiedenen Phasen der Blattentwicklung (9-39 Tage nach Aussaat) transkribiert.

Der Transkriptgehalt nimmt allerdings deutlich in cadmiumexponierten Pflanzen und der dazugehörigen Kontrolle, nicht aber in kupfergestressten Keimlingen zu. Um diese differentielle Expression zu erklären, muss auf die Pflanzenanzucht eingegangen werden.

Zur Untersuchung des Einflusses von Cu und Cd (rechte Seite von Abbildung 11: K, Cu, Cd) wurden die Gerstenkeimlinge bis zum 10. Tag nach Aussaat sowohl auf Leitungswasser als auch auf MS-Medium angezogen und dann für 48 h kupfer- bzw. cadmiumexponiert, wobei die Schwermetalle in destilliertem Wasser bzw. in MS-Medium gelöst waren. Die erhaltenen Northern Analysen von *HvMT-1a* und *HvMT-2a* zeigen dabei keine Unterschiede in der Art der Anzucht (Daten nur für die „Wasseranzucht“ gezeigt). Für die Expressionsuntersuchungen von *HvMT-3a* unter Kupfer- und Cadmiumstress wurde nur RNA aus Primärblättern verwendet, die auf Leitungswasser wuchsen. Dagegen wurden die Pflanzen zur Analyse der

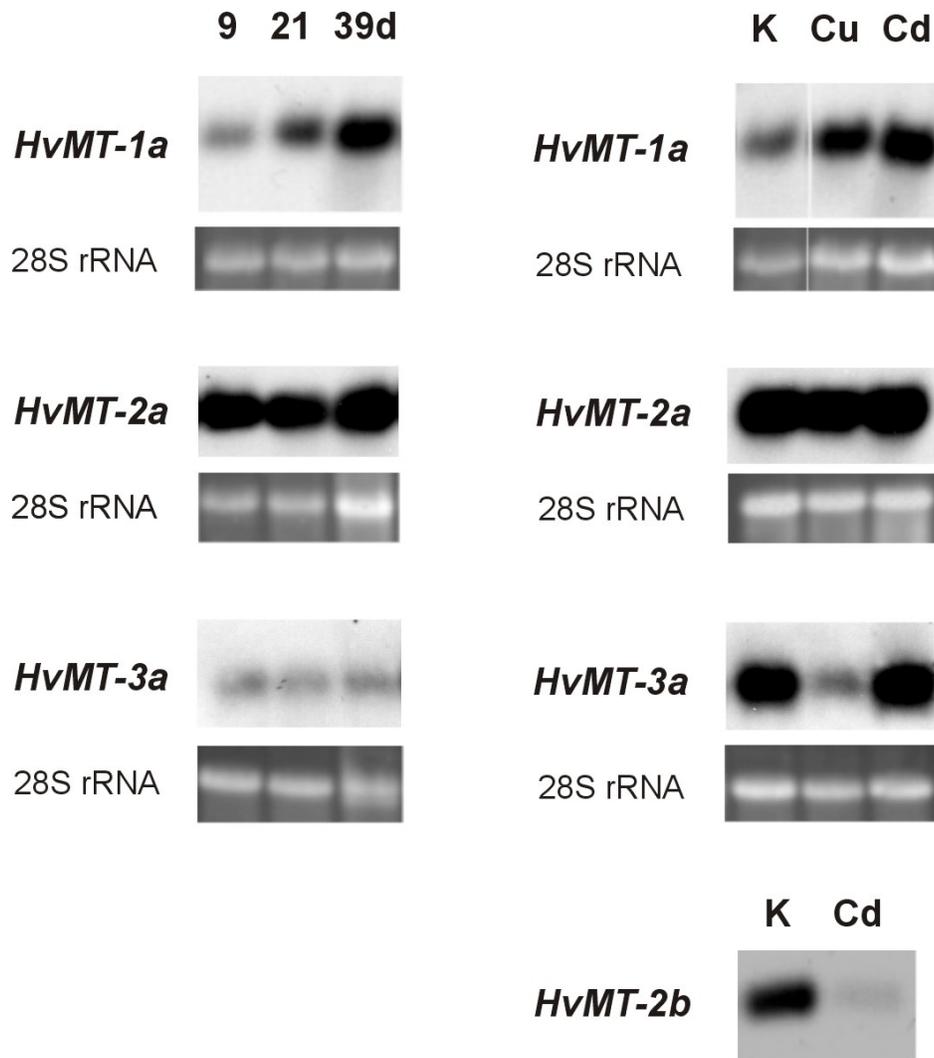
entwicklungsabhängigen Veränderungen 9, 21 und 39 Tage auf Erde und mit einem Langzeitdünger versehen angezogen. Das heißt, dass im Falle von *HvMT-3a* alle Proben bis auf die Kontrolle (K) und die Cd-Probe ausreichend mit Kupfer versorgt waren. Bei der Kontrolle und der Cd-Probe fehlte dagegen Kupfer im Anzuchtmedium, sie waren während ihrer 12tägigen Entwicklung also einem Kupfermangel ausgesetzt.

Eine mögliche Schlussfolgerung ist also, dass die Expression von *HvMT-3a* durch Kupfermangel hervorgerufen wird. Um diese Theorie zu untermauern, wurden Pflanzen für 10 Tage auf Leitungswasser angezogen und dann für 48 h in Lösungen mit verschiedenen Kupferkonzentrationen transferiert.

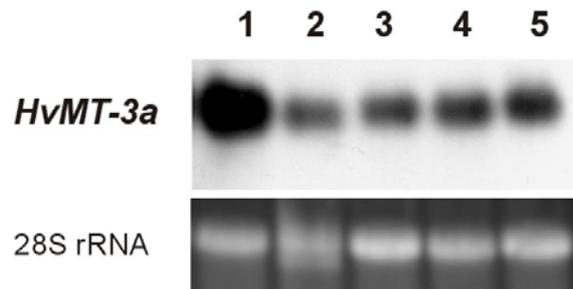
Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, wird *HvMT-3a* bei der Kontrolle, die keine Metalle enthält, stark exprimiert, während eine Exposition mit Kupfermengen von 0,5  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  (Kupfergehalt von MS-Medien) bereits zu einer verminderten Genexpression führt. Ebenso zeigen höhere Kupferkonzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  - 1 mM  $\text{CuCl}_2$  sowie 1 mM kupfer- und cadmiumexponierte Pflanzen deutlich geringere Transkriptmengen von *HvMT-3a*.

Die im Vergleich zu Abbildung 11 höheren Transkriptmengen der kupferhaltigen RNA-Proben aus Abbildung 12 sind auf eine längere Exposition des Films mit dem Northernblot zurückzuführen. Die Verhältnisse an den Transkriptmengen ändern sich dadurch aber nicht.

Die Transkripte der Gersten MTs *Ids-1* prä-mRNA, *HvMT-1d* und *HvMT-4a* konnten nur mittels Amplifikation durch eine RT-PCR nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In Northern Analysen mit der gleichen RNA, wie für die RT-PCR verwendet, konnten Transkripte weder während der verschiedenen Blattentwicklungsphasen noch nach Schwermetallstress nachgewiesen werden. Daraus lässt sich ableiten, dass die Transkriptgehalte in Blättern - zumindest unter den untersuchten Zuständen - nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen.



**Abb. 11** Northern Analysen der verschiedenen Gersten MTs in Primärblättern während der natürlichen Blattseneszenz und nach 48 h Exposition mit Kupfer (Cu) und Cadmium (Cd). Gesamt RNA wurde aus Gerstenkeimlingen verschiedener Entwicklungsstadien des Primärblattes, bzw. aus mit 1 mM  $\text{CuCl}_2$  oder  $\text{CdCl}_2$  exponierten 12 d alten Pflanzen isoliert. Gleiche Mengen von 15  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA wurde elektrophoretisch auf 1 %igen formaldehydhaltigen Agarosegelen aufgetrennt. Für *HvMT-2b* wurde die Analyse mit 300 ng mRNA für 1 mM cadmiumexponierte Pflanzen sowie der korrespondierenden Kontrolle durchgeführt. Der Northern blot mit Hybridisierungen der RNA von Schwermetall-exponierten Pflanzen und der cDNA-Sonde *HvMT-1a* entstammen der gleichen Membran, wurden aber nachträglich in der Reihenfolge verändert.



**Abb. 12** Northern Analyse von *HvMT-3a* in Blättern nach Exposition mit verschiedenen Kupferkonzentrationen. Gerstenkeimlinge wurden hydroponisch auf Wasser angezogen und nach 10 Tagen nach Aussaat für 48 h mit verschiedenen kupferhaltigen Lösungen exponiert: Spur 1 = destilliertes Wasser, Spuren 2-5: Cu 0.5  $\mu$ M, Cu 50  $\mu$ M, Cu 1 mM, Cu 1 mM + Cd 1 mM.

#### 4.2.1.4 Vergleich der Genexpression von *HvMT-1a* und *HvMT-2a* bei 48 h Exposition mit einer 2,5mM Kupferchloridkonzentration

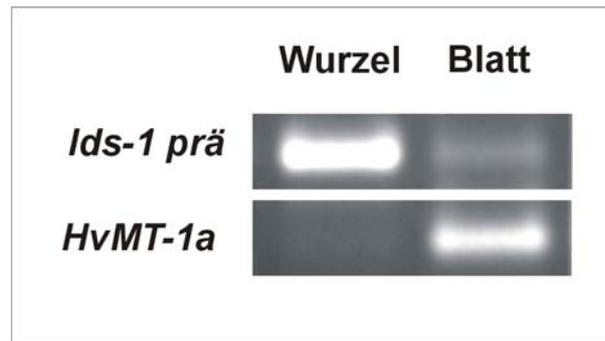
Werden 10 d alte Gerstenkeimlinge für 48 h anstelle einer 1 mM  $\text{CuCl}_2$ -Lösung mit einer 2,5fach höheren Kupferkonzentration exponiert, so zeigt ein Vergleich von *HvMT-1a* und *HvMT-2a* in Primärblättern, dass die Genexpression dieser beiden MTs gegenläufig reguliert ist (Abb. 13). Wird *HvMT-2a* in Primärblättern bei 1 mM  $\text{CuCl}_2$  weiterhin konstitutiv exprimiert, so führt die höhere Kupferchloridkonzentration zu einer Repression des Gens *HvMT-2a* wogegen *HvMT-1a* hochreguliert wird (vergleiche dazu Abb. 11).



**Abb. 13** Vergleich der Genexpression von *HvMT-1a* und *HvMT-2a* in 12 d alten Primärblättern nach 48 h Exposition von Gerstenkeimlingen mit 2,5 mM CuCl<sub>2</sub>.

#### 4.2.1.5 Vergleich der Genexpression von *HvMT-1a* und *Ids-1* in Wurzeln und Primärblättern nach 48h Cd-Exposition

In der Literatur wird diskutiert, dass Typ 1 MTs vorzugsweise in Wurzeln exprimiert werden. Mittels Northern Analysen konnten Transkripte von *Ids-1* nicht in Blättern und *HvMT-1a* nicht in Wurzeln nachgewiesen werden. Die in Abbildung 11 gezeigten Ergebnisse einer mit jeweils 1 µg Gesamt-RNA durchgeführte RT-PCR verdeutlichen die organspezifischen Genexpression. In Wurzeln von Gerstenpflanzen, welche für 48 h mit Cadmium exponiert wurden, lassen sich deutliche Mengen der *Ids-1* prä-mRNA nachweisen, nicht aber in Blättern. In diesen oberirdischen Organen wird das Typ 1 MT *HvMT-1a* exprimiert, welches in Wurzeln cadmiumexponierter Pflanzen nicht nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 14** RT-PCR von *Ids-1* prä-mRNA und *HvMT-1a* mit jeweils 1 µg Gesamt-RNA isoliert aus Wurzeln und Primärblättern von Gerstenkeimlingen nach 48 h Exposition mit Cadmium.

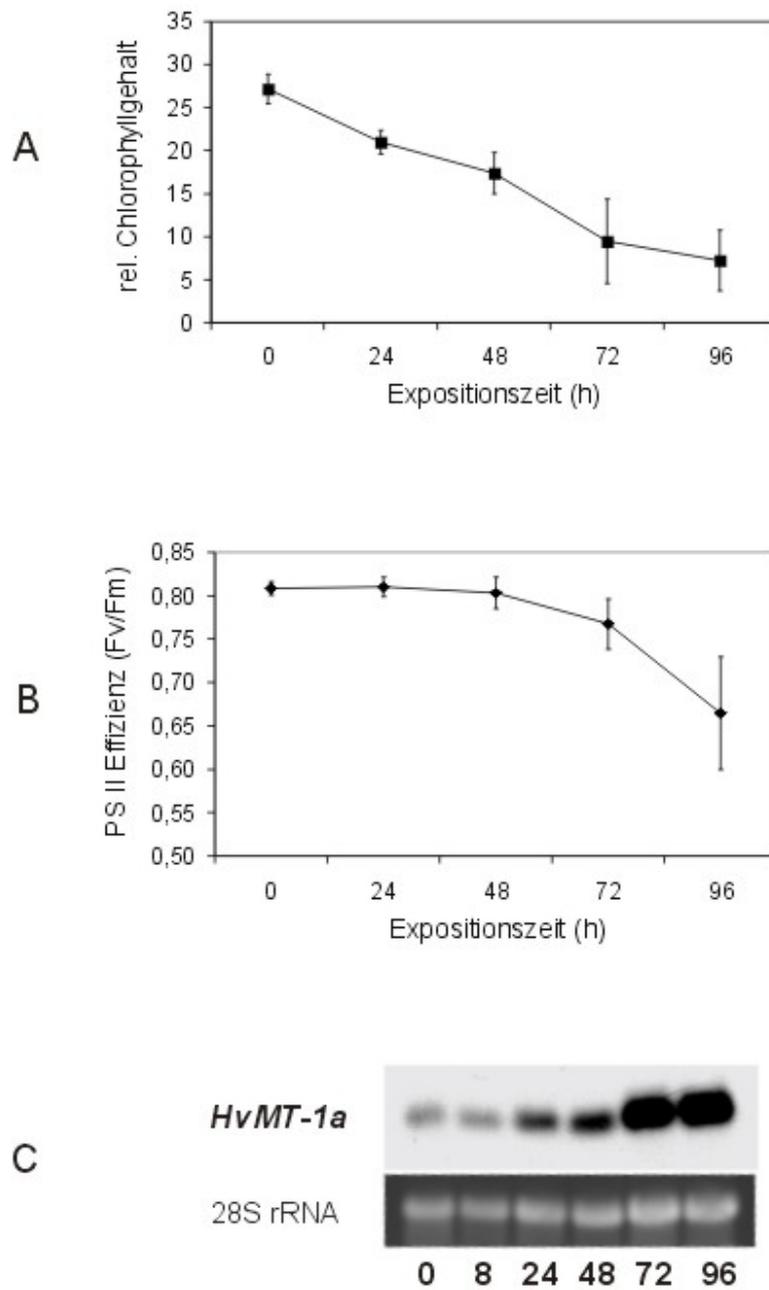
#### 4.2.1.6 Genexpression von *HvMT-1a* nach längerer Cd-Exposition (0-96 h)

Um den Einfluss einer längeren Cadmiumexposition (1 mM) auf Gerstenblätter zu charakterisieren, wurden Gerstenkeimlinge 10 Tage nach Aussaat für 96 h cadmiumexponiert. Dabei wurden die physiologische Parameter PS II Effizienz und relativer Chlorophyllgehalt bestimmt und die Genexpression des Typ 1 MT *HvMT-1a* mittels Northern Analyse untersucht. Die Abbildungen 15 a-c zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchungen.

Der sukzessive Abbau von Chlorophyll erfolgt schon nach 24 h und nach 96stündiger Exposition mit Cadmium ist der Chlorophyllgehalt um 75% gesunken.

Anders hingegen verhält sich der Verlauf der PS II Effizienz. Diese bleibt für 48 h stabil und sinkt dann zunächst leicht (72 h) und nach 96 h Inkubation der Pflanzen mit 1 mM Cadmium signifikant um 20% ab. Aufgrund der hohen Standardabweichungen sollte dieser Verlauf als Tendenz gewertet werden.

Auf Transkriptebene zeigt sich, dass der Gehalt der mRNA von *HvMT-1a* in zwei Stufen zunimmt. Nach 24 h kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der Transkripte von *HvMT-1a*, deren Menge auch nach 48 h Cadmiumexposition unverändert zu detektieren ist. Nach 72 h Cadmiumexposition erreicht der Gehalt von *HvMT-1a* unter den getesteten Bedingungen ein Maximum, dass auch nach 96 h stabil bleibt.



**Abb. 15 a-c** Charakterisierung des Einflusses von 1 mM Cadmium-Lösungen auf den Chlorophyllgehalt (a), die Photosystem II Effizienz (b) und den Transkriptgehalt des Metallothioneins *HvMT-1a* (c) von Primärblättern während 0-96 h Exposition. Gerstenpflanzen wurden für 10 Tage hydroponisch aufgezogen und anschließend cadmiumexponiert. Jeder Datenpunkt der Abbildungen 15a und 15b repräsentiert den Mittelwert aus zehn unabhängigen Messungen.

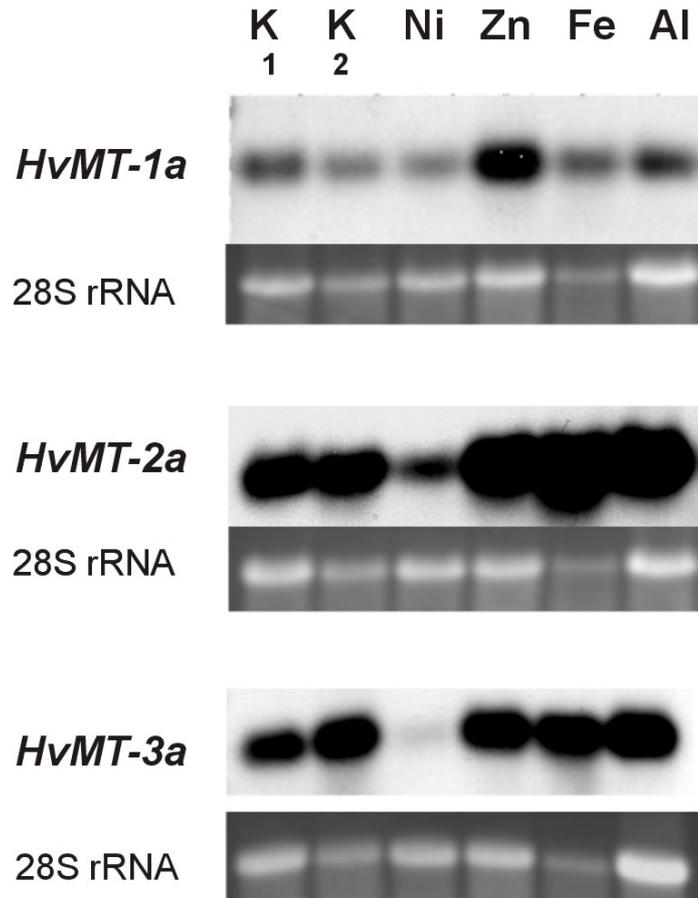
#### 4.2.1.7 Metallothionein-Expression nach Exposition mit anderen Schwermetallen

Wie aus Abbildung 11 zu ersehen ist, zeigen die Metallothioneine *HvMT-1a*, *HvMT-2a* und *HvMT-3a* bei Kupfer- und Cadmiumexposition eine unterschiedliche Genexpression. Um die metallabhängige Genexpression für diese MTs weiter zu charakterisieren, wurden Untersuchungen mit Nickel, Zink, Eisen und Aluminium-exponierten Pflanzen durchgeführt.

In einem ersten Experiment wurden für diese Metalle verschiedene Konzentrationen gewählt und Keimlinge für 72 h exponiert. Wie für Kupfer und Cadmium beschrieben, wurden aus diesen Vorversuchen solche Konzentrationen gewählt, die einen physiologischen aber noch nicht letalen Effekt auf die Blattentwicklung zeigten (Daten nicht gezeigt). Für Nickel ( $\text{NiCl}_2$ ), Eisen ( $\text{FeSO}_4$ ) und Zink ( $\text{ZnCl}_2$ ), wurde eine Konzentration von 5 mM, für Aluminium ( $\text{Al}_2(\text{SO})_4$ ) von 8 mM gewählt. Da Eisen bei stark saurem pH-Wert (2,2) gelöst werden musste, wurde eine zweite Wasserkontrolle mitgeführt, deren pH-Wert auf 2,2 eingestellt wurde.

Da für *HvMT-1a* und *HvMT-2a* gezeigt werden konnte, dass ihre Genexpression nicht von der Anzucht auf Nährlösungen abhängig ist, wohl aber für *HvMT-3a*, erfolgte die Anzucht wie für *HvMT-3a* beschrieben in einem hydroponischen, metallfreiem System für 10 Tage mit einem nachfolgenden Transfer auf die entsprechenden metallhaltigen Lösungen.

Wie aus Abbildung 16 ersichtlich ist, zeigen die drei MT-Gene *HvMT1-a*, *HvMT-2a* und *HvMT-3a* zeigen wiederum eine unterschiedliche Expression. *HvMT-1a* wird nicht nur durch Kupfer und Cadmium exprimiert, sondern auch durch Zink, jedoch nicht unter Nickel-, Eisen- und Aluminiumstress.



**Abb. 16** Northern Analyse von *HvMT-1a*, *HvMT-2a* und *HvMT-3a* in Blättern nach 72stündiger Exposition mit 5 mM Nickel (Ni), 8 mM Zink (Zn), 1 mM Eisen (Fe) sowie 5 mM Aluminium (Al). Gerstenkeimlinge wurden hydroponisch auf Wasser angezogen und nach 10 Tagen nach Aussaat für 72 h mit den verschiedenen schwermetallhaltigen Lösungen exponiert. Eine Menge von je 15 µg RNA wurde elektrophoretisch in 1 %igen (w/v), formaldehydhaltigen Agarosegelen getrennt.

Das durch Kupfermangel induzierte Gen *HvMT-3a* wird unbeeinflusst von Zink, Eisen und Aluminium in allen kupferfreien Lösungen exprimiert. Unter Nickelstress wird *HvMT-3a* nicht exprimiert. Das Expressionsmuster von *HvMT-2a* ähnelt dem von *HvMT-3a*, doch ist seine Expression nicht an Kupfermangel geknüpft (siehe Abb. 11 und 12). Nickel, Eisen und Zinkexpositionen scheinen einen verstärkenden Einfluss auf die Expression von *HvMT-2a* zu haben.

## **4.2.2 Nachweis von Metallothioneinen auf Proteinebene**

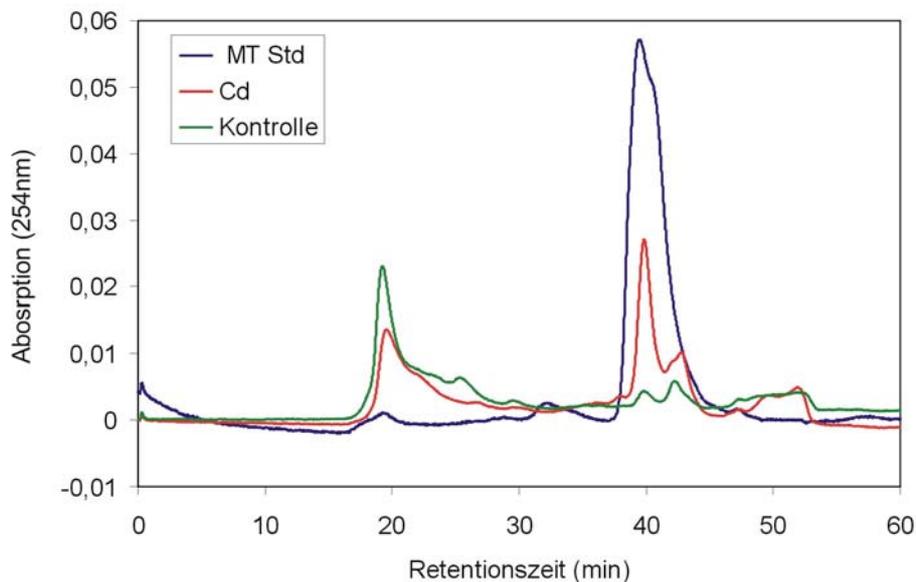
### **4.2.2.1 Auftrennung von cysteinreichen Proteinen mittels Gelchromatographie (SEC)**

Nach den Ergebnissen der Expressionsstudien mit verschiedenen MT-Genen in Gersten Primärblättern ist die Annahme berechtigt, dass möglicherweise verschiedene MTs translatiert werden. Da wie in der Einleitung diskutiert die Herstellung spezifischer MT-Antikörper große Schwierigkeiten bereitet, sollten die MTs mit biochemischen Methoden separiert und weiter analysiert werden. Die Aufreinigung sollte mit dem von El Ghazie et al. (2004) beschriebenen Isolationsverfahren durchgeführt werden. Zur Identifikation von MTs wurden dazu zunächst die cysteinreichen Proteine aus 13 d alten Primärblättern von Pflanzen isoliert, die auf Leitungswasser angezogen und für 72 h mit 1 mM CdCl<sub>2</sub> exponiert wurden. Als Kontrolle dienten auf Leitungswasser kultivierte Pflanzen.

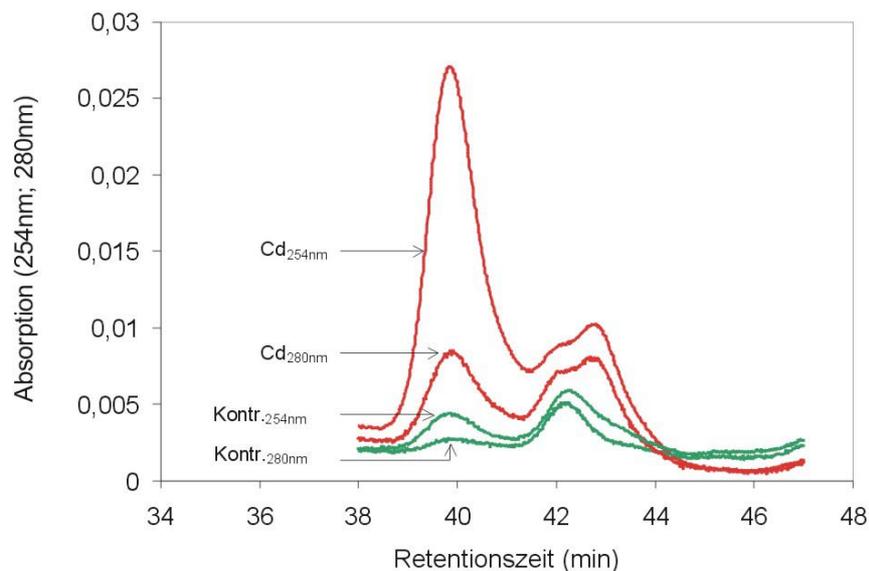
Nach dem Aufschluss wurden Proteine niederen Molekulargewichts durch selektive Präzipitation angereichert und mittels Size-Exclusion-Chromatography (SEC) unter Verwendung einer Superdex HR 75/30 Säule nach ihrem Molekulargewicht getrennt. In einem zweiten Ansatz wurde ein kommerziell erworbenes MT-2 aus Kaninchenleber (4,5 % Cadmiumgehalt) unter den gleichen Bedingungen getrennt. Die jeweiligen Eluate wurden bei 254 nm, dem Absorptionsmaximum der Cadmiumsulfid-Bindung, detektiert und alle 4 min in Fraktionen gesammelt.

Abbildung 17 zeigt das Chromatogramm der Gelfiltration des kommerziell erworbenen Kaninchen MT-2, dass ein Absorptionsmaximum bei einer Retentionszeit von 39,8 min aufweist. Die Trennung cysteinreicher Proteine aus cadmiumexponierten Gerstenblättern und aus nicht-cadmiumexponierten Kontrollblättern zeigen ein Absorptionsmaximum mit der identischen Retention von 39,8 min des MT-2 Standards. Zudem weisen getrennte Proteine aus Proteinisolationen von Kontroll- und cadmiumexponierten Blättern ein zweites Maximum bei 42min auf. Wie aus Abbildung 18 ersichtlich, handelt es sich jedoch nur bei dem Proteinpeak mit der Retentionszeit von 39,8 min um Proteine, die in geringem Maße aromatischen Aminosäuren enthalten (geringe Absorption bei 280 nm), in hohem Maße aber bei ein bei 254 nm absorbieren, bei der die Cadmiumsulfid-Bindung ein Absorptionsmaximum aufweist. Dieses Absorptionsverhalten ist typisch für cadmiumbindende, sulfidreiche Peptide, zu denen die Metallothioneine gehören.

Aus diesem Grund wurde dieser Proteinpeak mittels kapillarelektrophoretischer Zonen Elektrophorese (CZE) genauer charakterisiert (siehe Kapitel 4.2.2.3). Nach einer Trennung von Eichproteinen (64-6,5 kDa) (Daten nicht gezeigt) unter den gleichen Bedingungen, lässt sich für den Proteinpeaks 39,8 min eine ungefähre molare Masse von ca. 14 kDa abschätzen. Dies entspräche einer Dimerisierung der MTs, wie sie unter anderem auch von El Ghazie et al. (2004) beobachtet wurde.



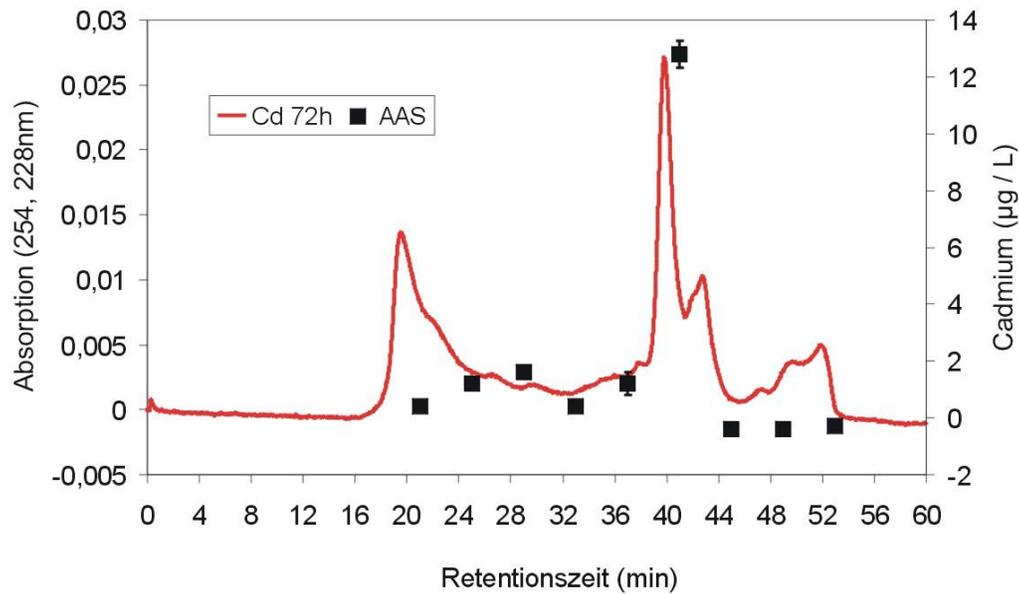
**Abb. 17** Size-Exclusion-Chromatogramm von jeweils 50 µg Protein eines MT-2 Standards (MT Std) aus Kaninchenleber (4,5 % Cadmiumgehalt), einer isolierten Proteinfraction (Cd) aus Primärblättern nach 72h Exposition mit 1 mM Cadmium und einer nicht-cadmiumexponierten Kontrolle. Als stationäre Phase wurde eine Superdex 75 HR 10/30 Säule verwendet, als mobile Phase ein 50 mM Ammoniumcarbonatpuffer pH 8,5. Die Flussrate betrug 0,4 ml/min. Die Detektion erfolgte bei 254 nm, bei welcher die Cadmiumsulfid-Bindung ein Absorptionsmaximum aufweist (siehe Abb. 18).



**Abb. 18** Vergleich der beiden Proteinpeaks (39,8 min, 42 min), die mit der gleichen Retentionszeit wie der MT-2 Standard von der Säule eluiert werden. Die Absorption von Aromaten (280 nm) und der Cadmium-Sulfidbindung (254 nm) von Proteinen aus Kontrollpflanzen (grün) und cadmiumexponierten Pflanzen (rot) zeigt, dass es sich um den Proteinpeak mit der Retentionszeit von 39,8 min um Proteine mit hoher Anzahl von Cadmium-Sulfid-Bindungen handeln muss.

#### 4.2.2.2 Bestimmung des Cadmiumgehaltes der durch SEC aufgetrennten Proteinfraktionen mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie (GF-AAS)

Die Eluate der mittels SEC-getrennten Proteinen wurden fraktioniert und der Cadmiumgehalt der Proteinfraktionen mittels „Graphit-Furnace Atomic-Absorbance-Spectroscopy“ (GF-AAS) bestimmt. Dieses Verfahren beruht auf einer elektrothermischen Atomisierung der Probe in einem Graphitrohr und anschließender Detektion von Cadmiumatomen bei einer distinkten Wellenlänge von 228 nm. Abbildung 19 zeigt den Gehalt an Cadmium ( $\mu\text{g/L}$ ) der einzelnen Proteinfraktionen nach Bestimmung mittels GF-AAS.



**Abb. 19** Kombiniertes Atom-Absorptions-Spektrogramm von Cadmium und der in Abbildung 15 gezeigten Proteinfraktionen aus 13 d alten Primärblättern angereicherten Proteine nach 72 h Cadmiumexposition. Die GF-AAS zeigt ein Absorptionsmaximum von Cadmium-Atomen (228 nm) in der mittels SEC getrennten Proteinfraktion (254 nm) mit einer Retentionszeit von 39-43 min. Jeder Datenwert repräsentiert den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen.

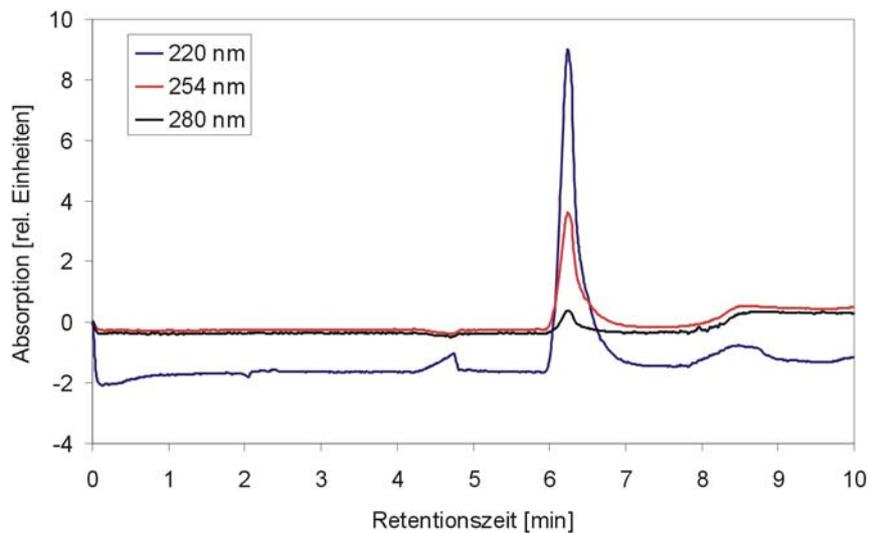
#### 4.2.2.3 Sensitive Auftrennung der mutmaßlichen MT-Proteinfraktion mittels Kapillaren-Zonen-Elektrophorese

Wie aus den Northern Analysen (siehe Abbildung 11) zu sehen ist, werden bei cadmiumexponierten Primärblättern der Gerste die Gene zweier Metallothioneine *HvMT-1a* (74 aa) und *HvMT-2a* (80 aa) exprimiert. Sind die Pflanzen während der Anzucht zudem einem Kupfermangel ausgesetzt, wird auch ein drittes MT *HvMT-3a* (62aa) exprimiert (siehe Abbildung 12). Dieses Muster der Genexpression legte die Grundlage für die Isolation und Auftrennung von cysteinreichen Proteinen aus cadmiumgestressten Pflanzen, welche sowohl auf Wasser als auch auf MS-Medium (Daten nicht gezeigt) angezogen wurden. Dabei zeigte

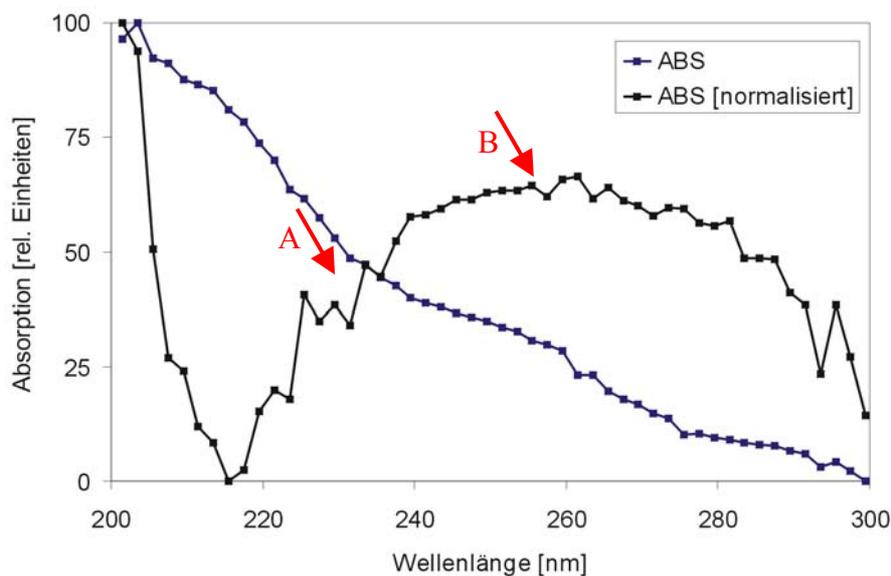
Da durch die Größenausschlusschromatographie (SEC) eine Auftrennung von geringen Differenzen im Molekulargewicht (ca. 10-20 % des Molekulargewichtes) nicht möglich ist, wurde die Proteinfraction bei 39-43 min, welche die gleiche Retentionszeit wie der MT-2 Standard ausweist, mittels CZE getrennt und durch Dioden-Array-Detection (DAAD) weiter im Absorptionsverhalten charakterisiert. Dazu wurden die Proteine der Fraction 39-43 min lyophilisiert und in 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O resuspendiert.

Das Elektropherogramm (Abbildung 20) zeigt, dass die mittels SEC erhaltene Proteinfraction 39-43 min bei Verwendung eines 100 mM MOPS-Puffers einem einzelnen Protein mit einer Retentionszeit von 6,3 min entspricht, was bedeutet, dass der Proteinpeak bei 39,8 min auf ein einzelnes Protein zurückzuführen ist. Der hohe Absorptionswert bei 254 nm ist wie oben schon erwähnt charakteristisch für das Absorptionsmaximum der Cadmiumsulfid-Bindung, die Absorption bei 220 nm für die Peptidbindung. Niedrige Absorptionswerte bei 280 nm zeigen, dass dieses Peptid nur wenige aromatische Aminosäuren enthält. Bei Verwendung von Tris-Borat-Puffern konnte auch der zweite Proteinpeak bei 42 min charakterisiert werden. Dieser zeigte kein Cadmiumsulfidbindungstypisches Absorptionsverhalten (Daten nicht gezeigt).

Die Abbildung 21 zeigt ein UV-Spektrum des Proteinpeaks bei 6,3 min (siehe Abb. 20) von 200-300 nm. An Protein gebundenes Cadmium bewirkt eine Verschiebung des Absorptionsverlaufes zwischen 220 nm und 260 nm. Durch die Normalisation der Peakmaxima erhält man ein Spektrum, welches nicht nur das Maximum der Cadmiumsulfid-Bindung verdeutlicht, sondern auch darauf hindeutet, dass in diesem Peptid Zink sulfidisch gebunden ist (228 nm) (siehe dazu Vitranen und Bordin 1998).



**Abb. 20** Elektropherogramm der CZE. Eingesetzt wurde der Hauptpeaks der über die SEC getrennten Proteinfraktion 39-43 min (siehe Abb. 17). Die Probe wurde in 100 mM MOPS-Puffer pH 8,0 getrennt. Die anliegende Spannung betrug 15 kV positiver Polarität bei 20° C. Für die hydrodynamische Injektion wurden 50 mbar/5 s verwendet. Die Detektion erfolgte bei 220 nm (Peptidbindung), 254 nm (Cadmiumsulfid) und 280 nm (aromatische Aminosäuren).



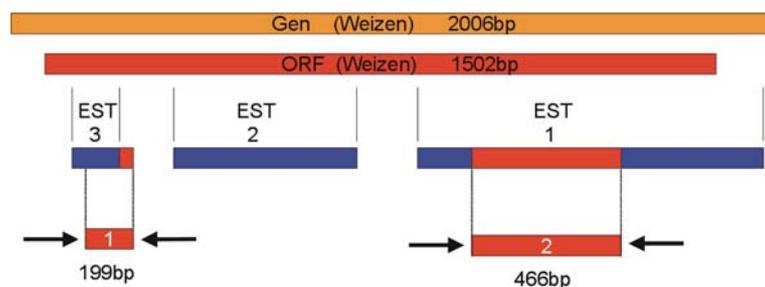
**Abb. 21** UV-Gesamtspektrum des Hauptpeaks bei 6,3 min. Die blaue Linie zeigt die Lichtabsorption des Peaks 6,3 min zwischen 200-300 nm. Die Normalisierung der Peakmaxima verdeutlicht die typischen Absorptionsmaxima von sulfidisch gebundenem Zink (A) und Cadmium (B).

## 4.2 Phytochelatatin-Synthase /Phytochelatine

Wie in der Einleitung beschrieben spielen neben den Metallothioneinen in Pflanzen auch die Phytochelatine eine Rolle bei der Detoxifikation von Metallen. In diesem Kapitel soll nun die Identifizierung von cDNA-Fragmenten des synthetisierenden Enzyms und dessen Regulation auf Transkriptebene sowie eine Analyse der Phytochelatine in Schwermetall gestressten und seneszierenden Pflanzen beschrieben werden.

### 4.3.1 Isolation von cDNA-Fragmenten der Phytochelatatin-Synthase aus Primärblättern der Gerste

Anhand der aus Weizen bekannten Phytochelatatin-Synthase (*TaPCS1*) wurden Primer abgeleitet (Abb. 22). RNA wurde aus Blättern von Kupfer-, Cadmium- und Kontrollpflanzen isoliert und ein 199 bp sowie ein 466 bp großes cDNA-Fragment mittels RT-PCR amplifiziert. Das erhaltene cDNA-Fragment 1 (199 bp) zeigt eine 99 %ige (172/174 von 199 bp) Homologie (AF093752), das cDNA-Fragment 2 (466 bp) eine 93 %ige Homologie (434/466 von 466 bp) zu *TaPCS1*. Weiterhin wurde für die unten beschriebenen Versuche ein cDNA-Fragment isoliert, welches für ein  $\beta$ -Actin codiert.



**Abb. 22** Nucleotid-Alignment der PCS1 aus Weizen (*Triticum aestivum*) und den beiden RT-PCR Produkten (1 + 2) aus Primärblättern der Gerste, sowie allen aus Datenbanken zugänglichen homologen ESTs aus Gerste. EST 1: 633 bp, AV835699, 567/602 von 633 bp (94 %). EST 2: 578 bp, AV834809, 548/566 von 578 bp (96 %). EST 3: 240 bp, AJ472572, 129/134 von 240 bp (86 %).

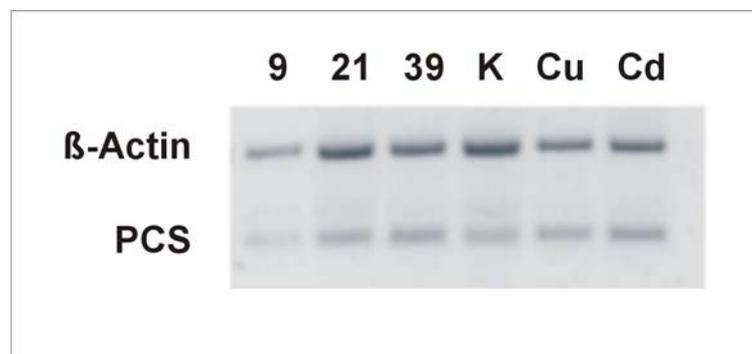
**Tab. 1** Isolierte cDNA-Fragmente der Phytochelatin Synthase, bzw.  $\beta$ -Actin aus Gerste mittels RT-PCR. Je 1  $\mu$ g RNA wurde aus Primärblättern von Gerste eingesetzt, die unter den in der Tabelle aufgeführten Wachstumsbedingungen angezogen wurde.

cDNA	Länge der cDNA (bp)	voll- ständ- iger ORF	RNA isoliert aus	mögliche Protein Funktion	Eintrag Datenbank (NCBI) mit höchster Homologie Gen, Access. No. (Organismus) Homologie von x Basenpaaren (bp)
PCS-199	199	nein	48 h cadmium- exponierte Primär- blätter, 12 d nach Aussaat	Phytochelatin Synthase	<i>TaPCS1</i> , AF093752 ( <i>Triticum aestivum</i> ) 172/174 von 1502 bp
PCS-466	466	nein	48 h cadmium- exponierte Primär- blätter, 12 d nach Aussaat	Phytochelatin Synthase	<i>TaPCS1</i> , AF093752 ( <i>Triticum aestivum</i> ) 434/466 von 1502 bp
$\beta$ -Actin	403	nein	unbehandelte Primärblätter, 21 d nach Aussaat	$\beta$ -Actin	partial. mRNA, AJ234400 ( <i>Hordeum vulgare</i> ) 403/403 von 1050bp

#### 4.3.2 Analysen zur Genexpression der PCS

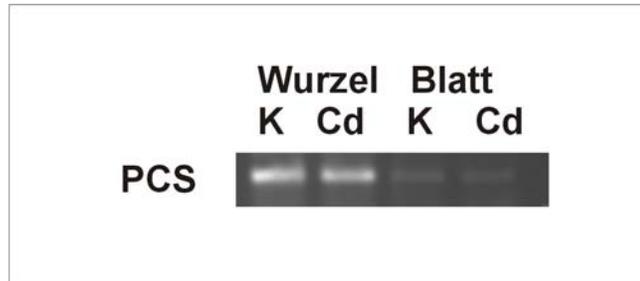
Die erhaltenen RT-PCR Fragmente wurden mittels PCR DIG-UTP-markiert und jeweils als cDNA-Sonde in einer Northern Analyse eingesetzt. Parallel wurde ein funktioneller ORF aus *Oryza sativa*, welcher freundlicherweise von Dr. S. Clemens (IPB Halle) zur Verfügung gestellt wurde, random-primed-DIG-markiert und ebenfalls in Northern Analysen getestet. Alle Sonden zeigten keine sichtbaren Hybridisierungen mit RNA aus Blättern der Gerste. Aus diesem Grund wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Als interner Standard wurden Primer verwendet, die ein 403 bp großes cDNA Produkt amplifizieren, welches eine 100%ige Homologie (403/403 von 1050 bp) zu der mRNA für  $\beta$ -Actin aus Gerste (AJ234400) aufweist.

Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR. Im Vergleich zu dem internen Standard  $\beta$ -Actin konnten keine deutlichen Schwankungen bei dem PCS Transkriptgehalt nachgewiesen werden. Weder bei den verschiedenen Entwicklungsstadien der Blätter, noch nach Exposition mit Kupfer bzw. Cadmium zeigten sich im Vergleich zum internen Standard deutliche Unterschiede. Die PCS-mRNA scheint unter allen untersuchten Bedingungen in den Blättern in einer gleich niedrigen Konzentration vorzuliegen.



**Abb. 23** Semiquantitative RT-PCR eines mutmaßlichen 199 bp Fragmentes der *PCS1* aus Gerste und eines 403 bp Fragmentes codierend für  $\beta$ -Actin. Eingesetzt wurden jeweils gleiche Mengen RNA. Die Zyklenzahl der jeweiligen RT-PCR erfolgte in Abhängigkeit der Amplifikation der  $\beta$ -Actin-Bande.

In einer RT-PCR mit RNA isoliert aus Wurzeln und Blättern von cadmiumexponierten und nichtgestressten Kontrollpflanzen zeigt sich, dass nach reverser Transkription die amplifizierten Mengen an cDNA in Blättern und Wurzeln zwar stark unterschiedlich sind, es jedoch zu keiner Induktion durch Cadmiumstress kommt (Abb. 24). Bei dieser RT-PCR wurden die erhaltenen PCR-Produkte noch während der linearen Amplifikation entnommen.



**Abb. 24** RT-PCR mit jeweils gleichen Mengen an RNA isoliert aus Wurzeln und Blättern ungestresster und cadmium-exponierter Gerstenkeimlinge. Die Abbildung zeigt PCR-Produkte des 199 bp Fragmentes der mutmaßlichen *PCS1* aus Gerste.

#### 4.3.3 Isolation und Identifikation von Phytochelatinen mittels HPLC

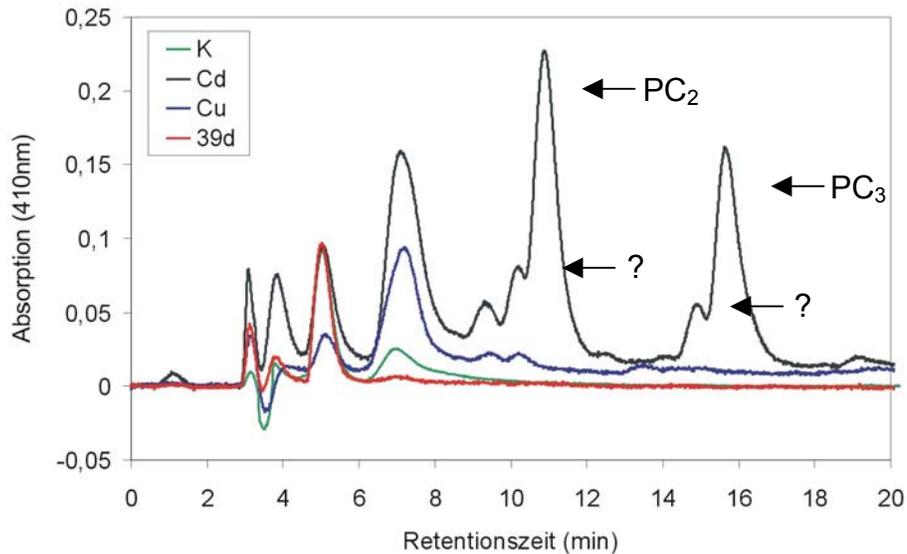
Um Synthese-Produkte der Phytochelatin-Synthase zu identifizieren und deren Abundanz während der natürlichen Blattseneszenz sowie unter Kupfer- und Cadmiumstress zu vergleichen, wurden Phytochelatine aus entsprechend angezogenem Blattmaterial (39d, Cu- und Cd-Stress 120 h, MS Medium, Kontrolle nur MS-Medium) nach der Methode von Grill et al. (1991) isoliert. Die Auftrennung wurde mittels HPLC und Nachsäulenderivatisierung mit DTNB durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 410 nm.

Abbildung 25 zeigt das HPLC-Elutionsprofil Ellman-positiver Verbindungen in den verschiedenen angezogenen Primärblättern von Gerste.

Die beiden HPLC-Peaks mit einer Retentionszeit von 10,5 min und 15,8 min, wurden mittels Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) als PC<sub>2</sub> [( $\gamma$ -GluCys)<sub>2</sub>-Gly] und PC<sub>3</sub> [( $\gamma$ -GluCys)<sub>3</sub>-Gly] identifiziert (Daten nicht gezeigt) und konnten nur bei Proben aus cadmiumexponierten Gerstenblättern nach einer verhältnismäßig langen Expositionsdauer von 120 h nachgewiesen werden. Kürzere Expositionzeiten mit Cadmium führten zu keiner

nachweisbaren Synthese von Phytochelatinen. So wurden nach 48 h Exposition mit Cadmium keine PCs nachgewiesen und nach 96 h Exposition konnten nur sehr geringe Mengen von PCs detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Als Reaktion einer übermäßig langen Cadmiumbehandlung akkumulieren nach 120 h in Blättern neben den Phytochelatinen PC<sub>2</sub> und PC<sub>3</sub> offenbar mindestens zwei Isoformen, deren Identität allerdings aufgrund der zu kleinen Peptidmenge noch nicht durch die ESI-MS bestätigt werden konnte.



**Abb. 25** HPLC-Chromatogramm Ellman-positiver Verbindungen in Primärblättern der Gerste nach Anzucht unter verschiedenen Bedingungen. K-Kontrolle, 15 Tage; Cd-15 Tage bei einer 120h Exposition mit 1 mM CdCl<sub>2</sub>; Cu- 15 Tage bei einer 120 h Exposition mit 1 mM CuCl<sub>2</sub>; 39 d- 39 Tage nach Aussaat. PC<sub>2</sub>: (γ-GluCys)<sub>2</sub>-Gly; PC<sub>3</sub>: (γ-GluCys)<sub>3</sub>-Gly. Die Schultern der jeweiligen PC-Peaks lassen das Auftreten von Isoformen dieser PC schliessen.

#### 4.4 Faktoren der Kupferhomöostase: *CCH* und *BCB*

##### 4.4.1 Isolation von cDNAs codierend für mögliche Faktoren der Kupferhomöostase: *CCH*, und *BCB*

Neben den MTs und den Phytochelatinen kennt man mittlerweile noch weitere Faktoren, die offenbar an Prozessen der Kupferhomöostase beteiligt sind. Um ein vollständiges Bild der Regulation der dabei eine Rolle spielender Faktoren zu bekommen, wurden zwei erst kürzlich identifizierte metallbindende Faktoren in die Untersuchungen mit einbezogen.

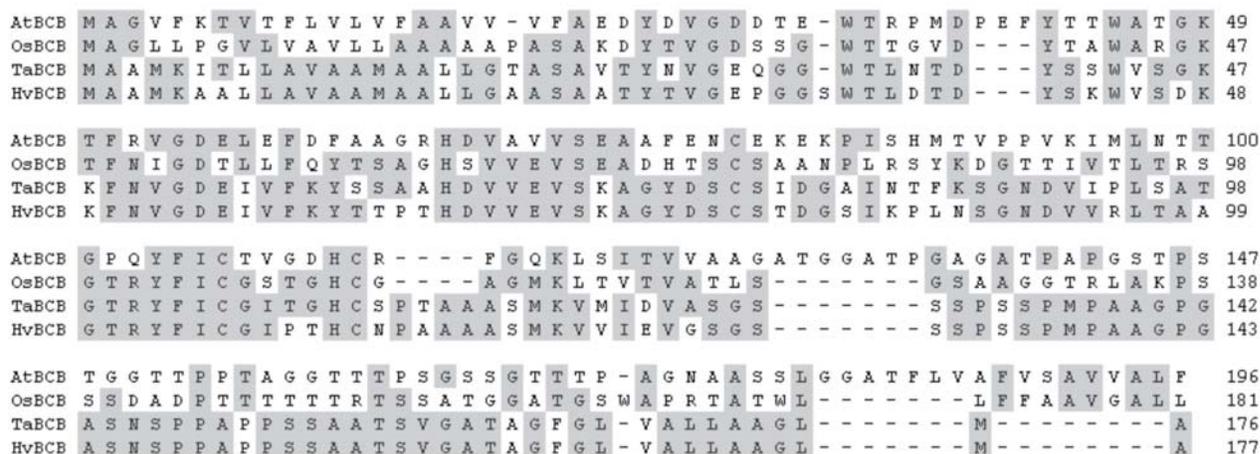
Wie in der Einleitung beschrieben, werden in Blättern von *Arabidopsis* Transkripte des Kupferchaperons *CCH* und des Blue-Copper-Binding-Protein (*AtBCB*) sowohl während des Kupferstresses als auch während der Blattseneszenz verstärkt exprimiert. Ausgehend von diesen bekannten kupferbindenden Faktoren in *Arabidopsis*, wurden deshalb in Datenbanken nach homologen Gersten ESTs gesucht, Primer abgeleitet und mittels RT-PCR gerstenhomologe cDNAs amplifiziert. Die Charakteristika der isolierten RT-PCR Produkte sind in Tabelle 3 aufgeführt.

##### CCH

Eine mit *HvCCH* benannte cDNA wurde aus 9 Tage alten Primärblättern isoliert. Die aus der codierenden Nukleotidsequenz (336 bp) abgeleitete Aminosäuresequenz von 112 Aminosäuren zeigt eine 76 %ige Homologie (85/112 von 132 aa) zu *OsCCH* (T50779) aus Reis und eine 68 %ige Homologie (76/112 von 121 aa) zu *CCH* (T47741) aus *Arabidopsis*.

Das Kupferchaperon *CCH* aus *Arabidopsis* ist das funktionelle Homolog des aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) bekannten Kupferchaperons *Atx1*, welches für die Kupferversorgung einer CPx-Typ ATPase (*Ccc2*) im sekretorischen Apparat zuständig ist (siehe Puig und Thiele 2002). Das in *Arabidopsis* identifizierte *Atx1*-Homolog *CCH* zeigt eine zusätzliche C-Terminale Elongation von 48 Aminosäuren (Himmelblau et al. 1998). Aus Reis wurde sowohl ein Kupferchaperon (*OsATX*) isoliert (Agrawal et al. 2002), welches die





**Abb. 27** Proteinalignment des Blue-Copper-binding-Proteins (BCB) aus Arabidopsis mit drei Vertretern der Poaceen. *AtBCB* (Q07488), *TaBCB* (AAD10251), *OsBCB* (CAD41461), *HvBCB* (CAE51320). Aminosäuren einer Konsensussequenz sind grau unterlegt.

**Tab. 1** Mittels RT-PCR isolierte cDNA-Fragmente von Faktoren, der zellulären Kupferhomöostase. Je 1 µg RNA wurde aus Primärblättern bzw. aus Wurzeln von Gerste eingesetzt, die unter den in der Tabelle aufgeführten Wachstumsbedingungen angezogen wurde.

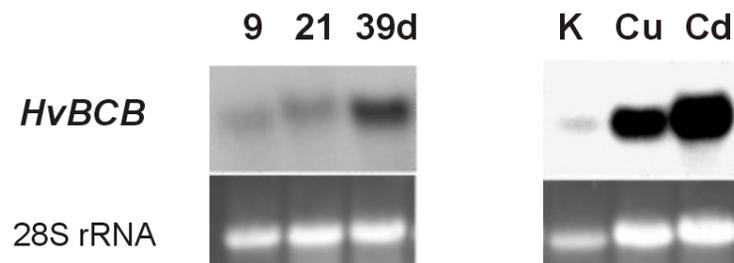
cDNA	Access. No.	Länge der cDNA (bp)	vollständig ORF	RNA isoliert aus	mögliche Protein Funktion	Eintrag Datenbank (NCBI) mit höchster Homologie Access. No. (Organismus) Homologie von x Aminosäuren (aa)
<i>HvBCB</i>	AJ585385 CAE51320	582 (ORF 531)	ja	unbehandelte Primärblätter, 39 d nach Aussaat	Blue-Binding-Copper-Protein	<i>BCB</i> , AAD10251 ( <i>Triticum aestivum</i> ) 76/102 von 176 aa
<i>HvCCH</i>	AJ585386 CAE51321	467 (ORF 336)	ja	unbehandelte Primärblätter, 9 d nach Aussaat	Kupfer Chaperon	<i>CCH</i> , T50779 ( <i>Oryza sativa</i> ) 61/68 von 132 aa

#### 4.4.2 Expressionsanalysen von *HvBCB* und *HvCCH* in Primärblättern nach Schwermetallexposition und während der natürlichen Blattseneszenz

Die erhaltenen RT-PCR Produkte für *HvCCH* und *HvBCB* wurden mittels PCR DIG-UTP markiert und in Northern Analysen als RNA-Sonden eingesetzt.

Wie auch in den beschriebenen Transkriptanalysen der Metallothioneine wurde die Expression der entsprechenden Gene bei 9, 21 und 39 Tage alten Pflanzen und bei kupfer- und cadmiumexponierten 12 Tage alte Keimlingen analysiert. Die mRNA von *HvCCH* war in allen Proben nicht detektierbar. Zusätzlich wurde eine zweite RNA-Sonde hergestellt und getestet. Dazu wurde der Klon HV\_CEA0009P19f von der Clemson University erworben, welcher auf einem zusätzlichen Plasmid ein Gersten cDNA-Insert (804 bp) trägt, welches einen vollständigen ORF für *HvCCH* beinhaltet. Das Insert wurde nach einer Restriktion aus dem Vektor mittels Random-Priming DIG-UTP markiert und als RNA-Sonde verwendet. Auch mit dieser Sonde gelang keine spezifischer Nachweis für die mRNA von *HvCCH* unter den getesteten Bedingungen.

Abbildung 28 zeigt das Ergebnis der Northern Analyse mit *HvBCB* während der natürlichen Blattseneszenz und unter Schwermetallstress. Während der Blattalterung kommt es zu einer Zunahme der mRNA des kupferbindenden Proteins *HvBCB*. In Blättern sowohl von kupfer- als auch cadmiumgestressten Pflanzen wird das Gen deutlich höher exprimiert. Dabei ist die Expression unter Cadmium noch stärker als unter Kupferstress.



**Abb. 28** Northern Analyse mit *HvBCB*. Nach 48h Exposition der Gerstenpflanzen mit 1 mM Cu bzw. Cd, sowie während der Blattseneszenz 39 d nach Aussaat nimmt der Transkriptgehalt von *HvBCB* deutlich zu.

## 4.5 Identifikation von cadmiuminduzierten Genen

### 4.5.1 Isolation von cDNAs nach 48 h Cadmiumexposition mittels Restriction Fragment Differential Display-PCR (RFDD-PCR)

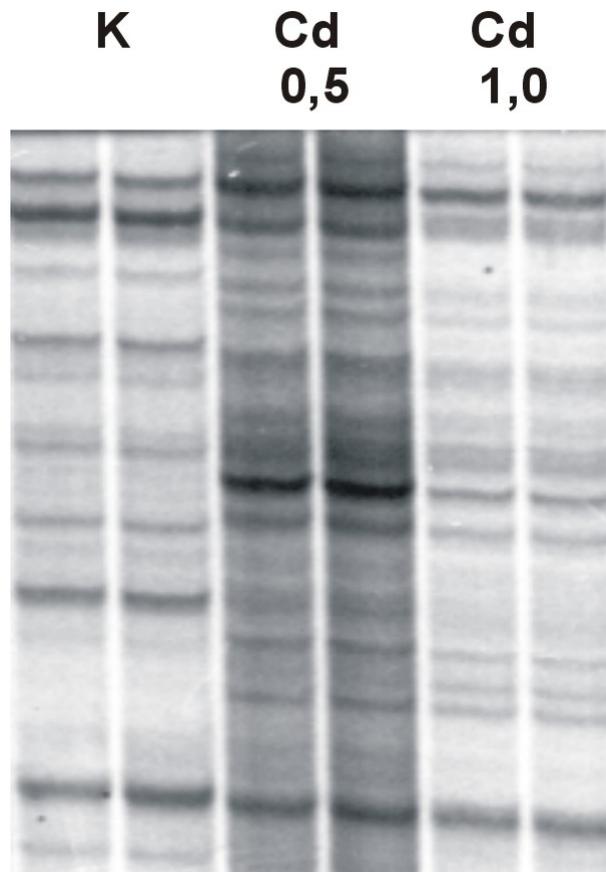
In den vorangegangenen Arbeiten wurden aus anderen Spezies bekannte Faktoren, die in die Metallhomöostase und Distribution involviert sind, mittels RT-PCR in Gerste identifiziert, isoliert und Expressionsmuster während der Blattseneszenz und während der Exposition mit Schwermetallen analysiert. Um jedoch die Möglichkeit zu haben, bisher noch nicht identifizierte Faktoren der Metalldetoxifikation zu isolieren, wurde ein Differential Display mit Kontroll- und cadmiumexponierten Pflanzen durchgeführt. Dabei wurden Pflanzen auf MS-Medium angezogen und für 48 h mit zwei verschiedenen Cadmiumkonzentrationen (0,5; 1,0 mM CdCl<sub>2</sub>) exponiert.

Abbildung 29 zeigt einen Ausschnitt des erhaltenen RFDD-PCR-Gels. Die Markierung der amplifizierten cDNA Banden erfolgte radioaktiv.

Aus dem RFDD-PCR-Gel wurden unter Verwendung zweier spezifischer Primerkombinationen (2 von 64 Möglichkeiten) insgesamt 24 differentiell exprimierte Banden isoliert. Von diesen Banden wurden 14 mittels PCR reamplifiziert und die cDNA-Fragmente durch T/A-Cloning in einen Vektor ligiert. Nach erfolgreicher Ligation wurde der Vektor (pGemT) in kompetente *E.coli* Zellen transformiert. Die cDNA-Fragmente der erhaltenen Transformanten wurden mittels PCR und Primern flankierend der „Multiple Cloning Site“ amplifiziert und sequenziert. Anschließend wurden die cDNA-Fragmente mittels PCR DIG-UTP markiert und in Northern Analysen als RNA-Sonde verwendet.

Die isolierten cDNA-Fragmente wurden, sofern es sich nicht um bekannte Gene aus Gerste handelte, mit *Cdi* (Cadmium-induziert) benannt. Einige Fragmente konnten trotz der Klonierung nicht erfolgreich sequenziert werden, und wurden nicht weiter bearbeitet. Andere Fragmente zeigten in der Northern Analyse keine differentielle Expression (z.B. 8.11.2, 8.9.5). Bei einigen der so identifizierten Fragmente konnten in der Northern Analyse keine Banden detektiert werden. Hier liegt vermutlich der Transkriptgehalt unterhalb der Nachweisgrenze

der Northern Analyse. Sequenzvergleiche der isolierten und weiter charakterisierten RFDD-PCR-Fragmente sind in Tabelle 4 (Kapitel 4.5.2) dargestellt.



**Abb. 29** Ausschnitt eines RFDD-PCR Gels mit jeweils zwei Spuren für: links: amplifizierte cDNA aus Primärblättern von Kontroll-Pflanzen, Mitte: amplifizierte cDNA Primärblätter 48 h 0,5 mM cadmiumexponierte Pflanzen, rechts: amplifizierte cDNA Primärblätter 48 h 1,0 mM cadmiumexponierte Pflanzen. Für die Markierung der amplifizierten cDNA wurde radioaktiv markiertes dATP ( $[\gamma^{33}\text{P}]\text{-dATP}$ ) in der PCR angeboten.

#### 4.5.2 Sequenzvergleiche der mittels RFDD-PCR erhaltenen cDNA-Fragmente

##### Cdi1

Nach Translation zeigt das 163 bp lange Fragment von *Cdi1* eine 87 %ige Homologie (35/40 von 938 aa) zu einer ClpD-Protease Untereinheit (*OsClpD*, AAN78327) aus Reis. *OsClpD* wird unter Stress (Wassermangel, Temperatur) verstärkt in Reis exprimiert (Shen et al 2003).

##### Cdi2

Ein 648 bp großes Fragment wurde mit *Cdi2* benannt (AJ508231). Die Nukleotidsequenz von *Cdi2* zeigt eine 83 %ige Homologie (300/362 von 362 bp) zu einem EST aus Mais (BM895473). Weitere Homologien konnten auch nach Translation in alle möglichen sechs Leseraster nicht gefunden werden.

##### Bsi1

Mehrere cDNA-Fragmente (Klone 8.3.5; 8.4.5.; 8.5.5; 8.9.9.), die eine Konsensussequenz von 155 bp aufweisen, konnten unabhängig voneinander aus verschiedenen differentiell exprimierten Banden isoliert werden. Die Konsensussequenz zeigt eine 97 %ige Homologie (150/155 von 267 bp) zu *Bsi1* (CAA88619, *Hordeum vulgare*), einem Bowman-Birk-Typ Proteinase Inhibitor (BB-PI). *Bsi1* ist ein kleines Protein von 89 Aminosäuren mit einem hohen Cysteingehalt von 11 %. In Gerste ist *Bsi1* pathogeninduziert (Stevens et al. 1996), das entsprechende Homolog in Mais (*Wip1*) wund- (Rohrmeier und Lehle 1993) und in Weizen (*Wali5*, JQ2361) aluminiuminduziert (Snowden und Gardner 1993).

##### Cdi4

Das 108 bp lange cDNA Fragment von *Cdi4* zeigt eine 94 %ige Homologie (34 /36 von 326 aa) zu einem möglichen TGF- $\beta$ -Rezeptor-interagierenden-Protein aus Reis (BAC92643) auf. Die Nukleotidsequenzen aus Reis sind bisher nur als Eintrag in der Datenbank vorhanden und nicht publiziert (Stand Februar 2004).

Cdi5

*Cdi5* mit einer Länge von 425 bp zeigt eine 99 %ige Homologie (420/425 von 1614 bp) zu einer mutmaßlichen Heparanase (Endo- $\beta$ -Glucuronidase) aus Gerste (AJ495772, CAD42650), welche von den Autoren als mehltauinduziertes Gen identifiziert wurden (Eckey et al. 2002).

Cdi6

*Cdi6* zeigt eine 100 %ige Homologie (65/65 von 132 bp) zu einem EST aus Gerste (CB860018), welcher seinerseits eine 92 %ige Homologie (154/166 von 249 aa) zu einer 20S Proteasom Untereinheit aus Reis (*Q9LSU0*) aufweist. Ein 20S Proteasom stellt einen hochmolekularer proteolytischen Komplex dar, welcher in den Ubiquitin-markierten Abbau von abnormalen Proteinen involviert ist.

Cdi7

*Cdi7* (112 bp) zeigt eine 96 %ige (25/26 von 282 aa) Homologie zu einem möglichen Seneszenzgen (BAB33421) aus Erbse (*Pisum sativum*). Untersuchungen zu diesem Gen aus Erbse sind nicht publiziert (Stand Februar 2004).

**Tab. 4** Mittels RFDD-PCR isolierte cDNA-Fragmente aus 0,5 bzw. 1,0 mM cadmiumexponierten Primärblättern nach 48 h Exposition.

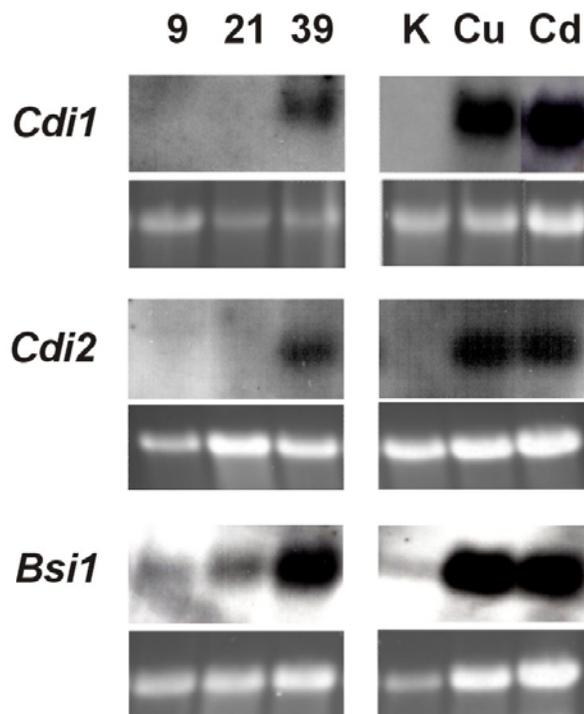
cDNA (Klon)	Access. No.	Länge der cDNA (bp)	vollständiger ORF	RNA isoliert aus	mögliche Protein Funktion	Eintrag Datenbank (NCBI) mit höchster Homologie Access. No. (Organismus) Homologie von x Aminosäuren (aa) / Basenpaaren (bp)
<i>Cdi1</i> (10.6.1)	nicht beantragt	163	nein	48 h cadmium-exponierte Primärblätter, 12 d nach Aussaat	Clp D Protease Untereinheit, Precursor	<i>OsClpD</i> , AAN78327 ( <i>Oryza sativa</i> ), 35/40 von 938 aa

Tab. 4 (Fortsetzung)

cDNA (Klon)	Access. No.	Länge der cDNA (bp)	voll- stän- diger ORF	RNA isoliert aus	mögliche Protein Funktion	Eintrag Datenbank (NCBI) mit höchster Homologie Access. No. (Organismus) Homologie von x Aminosäuren (aa) / Basenpaaren (bp)
<i>Cdi2</i> (8.1.1)	AJ508231	648	nein	48 h cadmium- exponierte Primär- blätter, 12 d nach Aussaart	unbekannt	EST BM895473, ( <i>Zea mays</i> ), 300/362 von 362 bp
<i>Bsi1</i> (8.3.5, 8.4.5, 8.5.5 8.9.9)	Z48729	155	nein	48 h cadmium- exponierte Primär- blätter, 12 d nach Aussaart	Bowman-Birk Proteinase Inhibitor	<i>Bsi1</i> , Z48729 ( <i>Hordeum vulgare</i> ) 150/155 von 267 bp
<i>Cdi4</i> (8.10.5)	nicht beantragt	108	nein	48 h cadmium- exponierte Primär- blätter, 12d nach Aussaart	TGF $\beta$ -Rezeptor interagierendes Protein	putatives TGF- $\beta$ -Rezeptor interag. Protein, BAC92643 ( <i>Oryza sativa</i> ) 34 /36 von 326 aa
<i>Cdi5</i> (8.3.6.)	nicht beantragt	425	nein	48 h cadmium- exponierte Primär- blätter, 12 d nach Aussaart	Heparanase (Endo- $\beta$ - Glucuronidase)	putative Heparanase AJ495772, ( <i>Hordeum vulgare</i> ), 420/425 von 1614 bp
<i>Cdi6</i> (8.10.1)	nicht beantragt	132	nein	48 h cadmium- exponierte Primär- blätter, 12 d nach Aussaart	20S Proteasom Untereinheit	EST, 1824549 ( <i>Hordeum vulgare</i> ) 65/65 von 610 bp, <i>PSA3</i> , Q9LSUO ( <i>Oryza sativa</i> ), 20/22 von 249 aa
<i>Cdi7</i> (10.9.1)	nicht beantragt	112	nein	48 h cadmium- exponierte Primär- blätter, 12 d nach Aussaart	mögliches Seneszenzgen	mögl. Seneszenzgen, BAB33421 ( <i>Pisum sativum</i> ) 25/26 von 282 aa

#### 4.5.3 Expressionsanalysen von isolierten cDNA-Fragmenten mittels RFDD-PCR in Primärblättern nach Schwermetallexposition und während der natürlichen Blattseneszenz

In Northern Analysen ließ sich nur die mRNA von *Cdi1*, *Cdi2* und *Bsi1* nachweisen. *Cdi1*, *Cdi2* sowie *Bsi1* zeigen sowohl während der Blattalterung als auch unter Kupfer- und Cadmiumstress ein gleiches Expressionsmuster (Abb. 30). Unter diesen Bedingungen nimmt der Transkriptgehalt deutlich zu. *Cdi3* zeigt unter Schwermetallstress keine Veränderungen im Transkriptgehalt. 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 ausgeschlossen werden kann (Ergebnisse nicht gezeigt). Hier liegen die Transkriptmengen vermutlich unterhalb der Nachweisgrenze von Northern Analysen. Die Genexpression von *Cdi7* wurde bisher nicht untersucht.



**Abb. 30** Northern Analysen der mittels RFDD-PCR identifizierten cadmiuminduzierten Gene *Bsi1*, *Cdi1* und *Cdi2*. Alle Gene werden sowohl unter Kupfer und Cadmiumstress als auch während der späten Phase der Blattseneszenz exprimiert.

## 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*<sup>1</sup> 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*<sup>2</sup>, *Oryza*<sup>3</sup>, *Zea*<sup>4</sup>). 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 Schwermetallstress 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

---

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

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

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

<sup>4</sup> *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  $\mu\text{M}$  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 ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -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).

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

Die Untersuchung von  $\alpha$ -Tocopherol und seiner Vorstufe dem  $\gamma$ -Tocopherol in kupfer- und cadmiumgestressten Gerstenblättern sowie den entsprechenden Kontrollen ergab, dass es unter Kupferstress zu keinen signifikanten Veränderungen sowohl im  $\alpha$ - als auch im  $\gamma$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -Tocopherol, GSH und Phytochelatinen unter Cadmiumstress denkbar.

Das zumindest  $\alpha$ -Tocopherol und Glutathion einer gemeinsamen Regulation unterliegen könnten, zeigen Untersuchungen in Ratten. Hier kommt es interessanterweise unter Cadmiumstress zu gemeinsamen Erhöhung von  $\alpha$ -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  $\gamma$ -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 PC<sub>2</sub> [( $\gamma$ -Glu-Cys)<sub>2</sub>-Gly] und PC<sub>3</sub> [( $\gamma$ -Glu-Cys)<sub>3</sub>-Gly] nachgewiesen werden (siehe Abb. 25). Die chromatographischen Analysen deuten zudem auf mindestens jeweils eine Isoform von PC<sub>2</sub> und PC<sub>3</sub> hin (siehe Abb. 25). Diese möglichen Isoformen konnten - anders als die in höheren Mengen vorkommenden PC<sub>2</sub> und PC<sub>3</sub> - 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 PC<sub>2</sub> und PC<sub>3</sub>. 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 Aminosäuren<sup>5</sup> 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

---

<sup>5</sup> 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 Reis<sup>6</sup> (*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 acht<sup>2</sup> 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).

<sup>6</sup> Zu Protein-Identifikationsnummern und zitierten Arbeiten siehe Tab. 6 im Diskussionsteil.

<sup>2</sup> 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 CuCl<sub>2</sub> in Primärblättern in hohem Maße nachweisen, während bei einer Exposition mit 2,5 mM CuCl<sub>2</sub>-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---CNCGSGCSCGSDCKCGKMYPDLTEQGSATAQVAAVVVLGMAPEN-KAGQFEVAAGQSGEGCSCGDNCKC-NPENC
T.a. Wal11 MS---CNCGSGCSCGSDCKCGKMYPDLTEQGSAAAQVAAVVVLGVAPEN-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--CGCGSSCNCGDSCKCNKRSSGLSYSEMETKETKETVVLGFGPAKIHFDGAEMSVASKEEGCKCGDKTC-DPENC
    
```

**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 Katalase<sup>7</sup>, als auch die Induktion von ROS<sup>8</sup> zu einer starken Genexpression von *LSC54* führt (Navabpour et al. 2003).

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

<sup>8</sup> 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-UAENDRCKGSDC-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---CKCGTSCITINCTDGH
T.a. (EST) MADKCGMDCADKTQCVKKGDSYGIVMVDTEKSH---FEVQEAENDGK---CKCGASCTEINCTDGH
O.s. MT3  MSDKCGMDCADKSQCCKGTSYGVVLVDAEKTTSKMLRRSATKKTGG---CKCTTGCSGAGCNDGK
A.t. MT3  MSSNCGSDCADKTQCVKKGTSYTFDIVETQESYKEAMIMDVGAEENNAKCKCKGSSCSIVNCTDGPN
    
```

**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<sub>c</sub>*-protein“ bezeichnet) von Hanley-Bowdin und Lane isoliert und als zinkhaltiges Protein beschrieben (Lane et al. 1987) wurde. Genexpressionsanalysen zeigten, dass Transkripte der *E<sub>c</sub>* 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<sub>c</sub>*) 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<sub>c</sub>* 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<sub>c</sub>* 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<sub>c</sub>* 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	MADTGKGSVAG---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		Kenzzeichen	Genexpression in Blättern
	MT Typ	Gen	MT Typ	Gen	MT Typ	Gen		
MT (4/6)	-	-	3a	<i>HvMT-3a</i> <sup>1</sup>	-	Os MT (AAB53811), Os MT (AAB65698)	-	<sup>1</sup> 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> <sup>1</sup> , <i>ids-1</i> , <i>HvMT-1d</i> , EST (BQ766316)	1	<i>OsMT-1</i> <sup>2</sup> , Os MT (AAB70546)	-	<sup>1,2</sup> Expression während der Seneszenz; Expression bei <sup>1,2</sup> Cu, <sup>1,2</sup> Cd, <sup>1,2</sup> Zn
MT (6/11/6)	1	<i>MT 1a</i> <sup>1</sup> , <i>1c</i> <i>MT 1b</i> *	-	-	-	-	Cys im Spacer -	<sup>1</sup> Expression während der Seneszenz; Expression bei <sup>1</sup> Cd, <sup>1</sup> Zn, <sup>1</sup> Cu
MT (6/6/5)	4	<i>MT 4a</i> <sup>1</sup> , <i>4b</i> <sup>2</sup>	4a	<i>HvMT-4a</i>	-	Os MT (AAG13588)	3 Cys- Domänen	<sup>1,2</sup> 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> <sup>1</sup> , <i>2b</i> <sup>2</sup>	2b	<i>HvMT-2b</i> <sup>3</sup>	2	<i>OsMT-2</i> <sup>4</sup>	N-Terminal Cys-Cys	<sup>1,2,3</sup> konstitutiv, <sup>1</sup> Expression bei Cu, Cd, Zn <sup>3</sup> Repression bei Cd <sup>1,2</sup> Zunahme bei Seneszenz
MT (8/9)	-	-	2a	<i>HvMT-2a</i> <sup>1</sup>	2	<i>MTE</i> <sup>2</sup> , <i>ricMT</i> <sup>3</sup> , Os MT <sup>4</sup> (AAB70545)	N+C- Terminal Cys-Cys	<sup>1</sup> konstitutiv, erhöht bei Zn, Fe, Al, Repression bei Ni und hohen Cu-Mengen <sup>2,4</sup> nicht untersucht <sup>3</sup> 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 ( $\beta$ -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 Markierung<sup>9</sup> 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

---

<sup>9</sup> 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](http://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- $\beta$ -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- $\beta$  Rezeptor Kinase (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) bekannt und ebenso essentiell in die Zellentwicklung involviert (Massague 1998). Das in tierischen Systemen *Cdi4* homologe Genprodukt TRIP-1 (TGF- $\beta$  receptor-interacting protein) ist zum einen ein Substrat für eine Ser/Thr Rezeptor

Kinase (TGF- $\beta$  Typ II Rezeptor Kinase), die eine große Rolle in der TGF- $\beta$  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 dektiert 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- $\beta$ -Glucuronidase) aus Gerste (CAD42650), welche von den Autoren als mehltauinduziertes Gen identifiziert wurde (Eckey et al. 2002).

Endo- $\beta$ -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  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten unterschieden werden. In Archebakterien sind die  $\alpha$ - Ketten der 20S Kern-Untereinheiten in die Struktur des Proteasoms integriert, während die  $\beta$ -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 die 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- $\beta$ -Rezeptor interagierendes Protein), *Cdi5* (Endo- $\beta$ -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 Ozon<sup>10</sup> 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.

---

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

## 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 Schwermetallexposition erhalten bleibt.

Als wichtige Komponenten der Metalldetoxifikation wurden in diesem Zusammenhang die Phytochelatine und Metallothioneine untersucht. Es ist bekannt, dass Phytochelatine eine Rolle bei der Metalldetoxifikation 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 (PC<sub>2</sub> und PC<sub>3</sub>) 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 (PC<sub>2</sub> and PC<sub>3</sub>) 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.

## 7. Literaturverzeichnis

**Adam Z, Adamska I, Nakabayashi K, Ostersetzer O, Haussuhl K, Manuell A, Zheng B, Vallon O, Rodermel SR, Shinozaki K, Clarke AK. 2001.** Chloroplast and mitochondrial proteases in *Arabidopsis thaliana*: a proposed nomenclature. *Plant Physiol* 125: 1912-1918.

**Agrawal GK, Rakwal R, Jwa NS, Agrawal VP. 2002.** Characterization of a novel rice gene *OsATX* and modulation of its expression by components of the stress signalling pathways. *Physiol Plant* 116: 87-95.

**Asano K, Kinzy TG, Merrick WC and Hershey JW. 1997.** Conservation and diversity of eukaryotic translation initiation factor eIF3. *J Biol Chem* 272: 1101-1109.

**Auf der Maur A, Belser T, Elgar G, Georgiev O, Schaffner W. 1999.** Characterization of the transcription factor MTF-1 from the Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) reveals evolutionary conservation of heavy metal stress response. *Biol Chem* 380: 175-185.

**Barcelo J, Poschenrieder Ch. 1999.** Structural and ultrastructural changes in heavy metal exposed plants. In: Heavy metal stress in plants. Prasad MNV und Hagemeyer J (eds.) Springer-Verlag Heidelberg, D: 83-205.

**Bazzaz FA, Rolfe GL, Carlson RW. 1992.** Effect of cadmium on photosynthesis and transportation of excised leaves of corn and sunflower. *Physiol Plant* 32: 373-377.

**Belles-Boix E, Inze D. 2002.** The role of active oxygen species in plant signal transduction. In: Plant signal transduction. Scheel D, Wasternach C (eds.) Oxford University Press Inc, New York, USA: 46-73.

**Bergmüller E, Porfirova S, Dormann P. 2003.** Characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in gamma-tocopherol methyltransferase. *Plant Mol Biol* 2003 52 (6):1181-1190.

**Binz PA, Kägi JHR. 1999.** Metallothionein: molecular evolution and classification. In: Metallothionein IV, C. Klaasen (ed.) Birkhäuser Verlag Basel, CH: 7-13.

**Bleecker AB, Patterson SE. 1997.** Last excit: senescence, abscission and meristem arrest in *Arabidopsis*. Plant Cell 9: 1169-1179.

**Blinda A, Koch B, Ramanjulu S, Dietz KJ. 1997.** *De novo* synthesis and accumulation of apoplastic proteins in leaves of heavy metal-exposed barley seedlings. Plant Cell Environ 20: 969-981.

**Blokhina O, Virolainen E, von Fagerstedt K. 2003.** Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Ann Bot 91: 179-194.

**Bordin G, Cordeiro Raposo F, Rodriguez AR. 1998.** Effect of temperature variation on metallothionein sub-isoform separation by reverse phase high performance liquid chromatography. J Liq Chrom Rel Technol 21 (13): 2039-2060.

**Brune A, Dietz KJ. 1995.** A comparative analysis of element composition of roots and leaves of barley seedlings grown in the presence of toxic cadmium, molybdenum, nickel and zinc concentrations. J Plant Nutr 18 (4): 853-868.

**Buchanan-Wollaston V, Ainsworth C. 1997.** Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. Plant Mol Biol 33: 821-843.

**Carbonnel-Campaa L, Lauga B, Combes D. 2000.** Isolation of a type 2 metallothionein-like gene preferentially expressed in the tapetum in *Zea mays*. Gene 254: 199-208

**Cazalé AC, Clemens S. 2001.** *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase. FEBS Lett 507: 215-219.

**Chen J, Zhou J, Goldsbrough PB. 1997.** Characterization of the phytochelatin synthase from tomato. *Physiol Plant* 101: 165-172.

**Chen RH, Miettinen PJ, Maruoka EM, Choy L, Derynck R. 1995.** A WD-domain protein that is associated with and phosphorylated by the type II TGF-beta receptor. *Nature* 377: 548-552.

**Chen T, Li W, Schulz PJ, Furst A, Chien PK. 1995.** Induction of peroxisome proliferation and increase of catalase activity in yeast, *Candida albicans*, by cadmium. *Biol Trace Elem Res* 50: 125-133.

**Chevalier C, Bourgeois E, Pradet A, Raymond P. 1995.** Molecular cloning and characterization of six cDNAs expressed during glucose starvation in excised maize (*Zea mays* L.) root tips. *Plant Mol Biol* 28 (3): 473-485.

**Chirgwin JM, Pryzbyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. 1979.** Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem* 18: 5294-5299.

**Choi D, Kim HM, Yun HK, Park JA, Kim WT, Bok SH. 1996.** Molecular cloning of a metallothionein-like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and Tobacco Mosaic Virus infection. *Plant Physiol* 112: 353-359.

**Clemens S, Antosiewicz DM, Ward JM, Schachtman DP, Schroeder J. 1998.** The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12043-12048.

**Clemens S, Kim EJ, Neumann D, Schroeder J. 1999.** Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J* 18 (12): 3325-3333.

**Clemens S, Palmgren MG, Kraemer U. 2002.** A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* 7: 309-315.

**Clemens S, Schroeder JI, Degenkolg T. 2001.** *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. *Eur J Biochem* 268(13): 3640-3643.

**Clemens S, Simm C. 2003.** *Schizosaccharomyces pombe* as a model for metal homeostasis in plant cells: the phytochelatin-dependent pathway is the main Cd detoxification mechanism. *New Phytol* 159: 323-330.

**Clendennen SK, May GD. 1997.** Differential gene expression in ripening banana fruit. *Plant Physiol* 115: 463-469.

**Clouse SD, Sasse JM. 1998.** Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 427-451.

**Cobbett CS, Goldsbrough PB. 2000.** Mechanisms of metal resistance: Phytochelatin and metallothioneins. In: *Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment*. Raskin I, Ensley BD (eds.) Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, New York, USA: 247-269.

**Cobbett CS, Goldsbrough PB. 2002.** Phytochelatin and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53: 159-182.

**Collakova E, DellaPenna D. 2003a.** Homogentisate phytyltransferase (HPT) is a key enzyme limiting tocopherol biosynthesis in unstressed *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* 131: 632-642.

**Collakova E, DellaPenna D. 2003b.** The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress. *Plant Physiol* 133 (2): 930-940.

**Coupe SA, Taylor JE, Roberts JA. 1995.** Characterization of an mRNA encoding a metallothionein-like protein that accumulates during ethylene-promoted abscission of *Sambucus nigra* L. leaflets. *Planta* 197: 442-447.

**Coupe SA, Taylor JE, Roberts JA. 1997.** Temporal and spatial expression of mRNAs encoding pathogenesis-related proteins during ethylene-promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra*. *Plant Cell Environ* 20: 1517–1524.

**Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. 1996.** Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65: 801-847.

**Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Briat JF, Walker EL. 2001.** Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* 409: 346-349.

**Debouck D. 1995.** Differential display or differential dismay. *Curr Opin Biol* 6: 597-599.

**DellaPenna D. 1999.** Nutritional genomics: manipulating plant micronutrients to improve human health. *Science* 285: 375-379.

**Desimone M, Weiss-Wichert W, Wagner E, Altenfeld U, Johanningmeier U. 1997.** Immuno-chemical studies on the Clp-protease in chloroplasts: evidence for the formation of a ClpC/P complex. *Bot Acta* 110: 234-239.

**Dietz KJ, Baier M, Krämer U. 1999.** Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: *Heavy metal stress in plants*. Prasad MNV, Hagemeyer J (eds.) Springer-Verlag Heidelberg, D: 73-97.

**Dittmer H J. 1937.** A quantitative study of the roots and root hairs of a winter rye plant. *Am J Bot* 24: 417-420.

**Drossopoulos JB, Bouranis DL, Bairaktari BD. 1994.** Patterns of mineral nutrient fluctuations in soybean leaves in relation to their position. *J Plant Nutr* 17: 1017-1035.

**Drossopoulos JB, Kouchaji GG, Bouranis DL. 1996.** Seasonal dynamics of mineral nutrients by walnut tree reproductive organs. *J Plant Nutr* 19: 421-434.

**Eckey C, Korell M, Kogel KH. 2002.** Identification and characterization of powdery mildew induced genes in barley. Eintrag in Datenbank (NCBI), nicht publiziert, Stand Dezember 2003.

**Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML. 1996.** A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5624-5628.

**El Gazhie I, Menge S, Miersch J, Chafik A, Benhra A, Elamrani MK, Krauss GJ.** Quantifikation of metallothionein-like proteins in the mussel *Mytilus galloprovincinalis* using RP-HPLC fluorescence detection. *Environ Sci Technol* (2004, im Druck).

**Ellmann GL. 1959.** Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-77.

**Ezaki B, Sivaguru M, Ezaki Y, Matsumoto H, Gardner RC 1999.** Acquisition of aluminum tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by expression of the *BCB* or *NtGDII* gene derived from plants. *FEMS Microbiol Lett* 171: 81-87.

**Ezaki B, Gardner, RC, Ezaki Y, Matsumoto H. 2000.** Expression of aluminium-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminium stress and/or oxidative stress. *Plant Physiol* 122: 657-665.

**Ezaki B, Katsuhara M, Kawamura M, Matsumoto H. 2001.** Different mechanisms of four aluminium (Al)-resistant transgenes for Al toxicity in *Arabidopsis*. *Plant Phys* 127: 918-927.

**Falk J, Andersen G, Kernebeck B, Krupinska K. 2003.** Constitutive overexpression of barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in tobacco results in elevation of the vitamin E content in seeds but not in leaves. *FEBS Letters* 540: 35-40.

**Faller P, Hasler DW, Zerbe O, Klauser S, Winge DR, Vašák M. 1999.** Evidence for a dynamic structure of human neuronal growth inhibitory factor and for major rearrangements of its metalthiolate clusters. *Biochemistry* 38: 10158-10167.

**Field, LS, Luk E, Culotta VC. 2002.** Copper chaperones: personal escorts for metal ions. *J of Bioenergetics and Biomembranes* 34 (5): 373-379.

**Foley RC, Liang ZM, Singh KB. 1997.** Analysis of type 1 metallothionein cDNAs in *Vicia faba*. *Plant Mol Biol* 33: 583-591.

**Fox TC, Guerinot ML. 1998.** Molecular biology of cation transporters in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 49: 669-696.

**Foyer CH, Theodoulou FL, Delrot S. 2001.** The functions of inter- and intracellular glutathione transportsystems in plants. *Trends in Plant Sci* 6 (10): 486-492.

**Freitas JD, Wintz H, Kim JH, Poynton H, Fox T, Vulpe C. 2003.** Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. *BioMet* 16: 185-197.

**Gallego SM, Benavides MP, Tomara ML. 1996.** Effect of heavy metal ions excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci* 121: 151-159.

**Ganesh AK, Rakwal R, Jwa NS, Agrawal VP. 2002.** Characterization of a novel rice gene *OsATX* and modulation of its expression by components of the stress signalling pathways. *Physiol Plant* 116: 87-95.

**Garcia I, Rodgers M, Lenne C, Rolland A, Sailland A, Matringe M. 1997.** Subcellular localization and purification of a *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from cultured carrot cells and characterization of the corresponding cDNA. *Biochem J* 325: 761-769.

**Gaymard F, Pilot G, Lacombe B, Bouchez D, Bruneau D, Boucherez J, Michaux-Ferriere N, Thibaud JB, Sentenac H. 1998.** Identifikation and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup>-release into the xylem sap. *Cell* 94: 647-655.

**Genschik P, Philipps G, Gigot C, Fleck J. 1992.** Cloning and sequence analysis of a cDNA clone from *Arabidopsis thaliana* homologous to a proteasome  $\alpha$  subunit from *Drosophila*. *FEBS Lett* 309: 311-315.

**Genty B, Briantais JM, Baker NR. 1989.** The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching in chlorophyll fluorescence. *Biochem Biophys Acta* 990: 87-92.

**Giritch A, Ganai M, Stephan UW, Bäumlein H. 1998.** Structure, expression and chromosomal localisation of the metallothionein-like gene family of tomato. *Plant Mol Biol* 37: 701-714.

**Gottesman S. 1996.** Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* 30: 465-506.

**Grill E, Winnacker EL, Zenk MH. 1985.** Phytochelatins, the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230: 674-676.

**Grill E, Loeffler S, Winnacker EL, Zenk MH. 1989.** Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathion by a specific glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6838-6842.

**Grill E, Winnacker EL, Zenk MH. 1991.** Phytochelatins. *Meth Enzymol* 205: 333-341.

**Guo WJ, Bundithya W, Goldsbrough PB. 2003.** Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytol* 159: 369-381.

**Ha SB, Smith AP, Howden R, Diertrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS. 1999.** Phytochelatin Synthase Genes from *Arabidopsis* and the Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* 11: 1153-1163

**Habu Y, Fukada-Tanaka S, Hisatomi Y, Lida S. 1997.** Amplified restriction fragment length polymorphism - based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence. *Biochem Biophys Res Com* 234: 516-521.

**Halliwell B, Gutteridge JM. 1984.** Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1-14.

**Hanley-Bowdin L, Lane BG. 1983.** A novel protein programmed by the mRNA conserved in dry wheat embryos. The principal site of cysteine incorporation during early germination. *Eur J Biochem* 135: 9-15.

**Hartner RD. 1983.** Effect of soil pH on adsorption of lead, copper, zinc and nickel. *Soil Sci Soc Am J* 47: 47-51.

**Heise J. 1999.** Untersuchungen von Laubblättern und Grannen während der natürlichen Blattseneszenz in Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Diplom-Arbeit an der MLU Halle.

**Hernandez GM, Murphy A, Taiz L. 1998.** Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 118: 387-397.

**Himmelblau E, Mira H, Lin SJ, Culotta VC, Penarrubia L, Amasino RM. 1998.** Identification of a functional homolog of the yeast copper gene *ATX1* from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 117: 1227-1234.

**Himmelblau E, Amasino RM. 2000.** Delivering copper within plant cells. *Curr Opin in Plant Biol* 3: 205-210.

**Hocking PJ. 1994.** Dry-matter production, mineral nutrient concentrations, and nutrient distribution and redistribution in irrigated spring wheat. *J Plant Nutr* 17: 1289-1308.

**Holtorf S, Apel K, Bohlmann H. 1995.** Specific and different expression patterns of two members of the leaf thionin family of barley in transgenic tobacco. *Plant Science* 111: 27-37.

**van Hoof NALM, Hassinen VH, Hakvort HWJ, Ballintijn KF, Schat H, Verkleij JAC, Ernst WHO, Karenlampi SO, Tervahauta AI. 2001.** Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of 2b-type metallothionein gene. *Plant Phys* 126: 1519-1526.

**Hopkins FG. 1921.** On an autoxidisable constituent of the cell. *Biochem J* 15:286–305.

**Howden R, Goldsbrough PB, Andersen CR, Cobbett CS. 1995.** Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol* 107: 1059-1066.

**Hsieh HM, Liu WK, Huang PC. 1995.** A novel stress-inducible metallothionein-like gene from rice. *Plant Mol Biol* 28: 381-389.

**Hsieh HM, Liu WK, Chang A, Huang PC. 1996.** RNA expression patterns of a type 2 metallothionein-like gene from rice. *Plant Mol Biol* 32: 525-529.

**Humbeck K, Krupinska K. 1996.** Does the Clp protease play a role during senescence-associated protein degradation in barley leaves? *J Photochem Photobiol* 36: 321-326.

**Humbeck K, Quast S, Krupinska K. 1996.** Functional and molecular changes in the photosynthetic apparatus during senescence of flag leaves from field-grown barley plants. *Plant Cell and Environ* 19: 337-344.

**Humbeck K, Krupinska K. 1999.** Successive degradation of the light-harvesting system of the photosystem apparatus during senescence of barley flag leaves. In: The chloroplast: From Molecular biology to biotechnology. Argyroudi-Akoyunoglou JH, Sanger H (eds.) Kluwer Academic Publishers: 297-392.

**Humbeck K, Krupinska K. 2003.** The abundance of minor chlorophyll *a/b*-binding proteins CP29 and LHCI of barley (*Hordeum vulgare* L.) during leaf senescence is controlled by light. J Exp Bot 54 (381): 375-383.

**Krupinska K, Humbeck K. 2004.** Photosynthesis and chloroplast breakdown. In: Plant cell death processes. Noodén LD (ed.). Elsevier Acad. Press. San Diego, Ca, USA: 169-187.

**Ito N, Tomizawa K, Tanaka K, Matsui M, Kendrick RE, Sato T, Nakagawa H. 1997.** Characterization of 26S proteasome  $\alpha$ - and  $\beta$ -type and ATPase subunits from spinach and their expression during early stages of seedling development. Plant Mol Biol 34: 307-316.

**Jacob C, Maret W, Vallee BL. 1998.** Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. Proc Natl Acad Sci USA 95: 3489-3494.

**Jensen LT, Culotta VC. 2000.** Role of *Saccharomyces cerevisiae* *ISA1* and *ISA2* in iron homeostasis. Mol Cell Biol 20 (11): 3918-3927.

**Jiang J, Clouse SD. 2001.** Expression of a plant gene with sequence similarity to animal TGF- $\beta$  receptor interacting protein is regulated by brassinosteroids and required for normal plant development. Plant J 26 (1): 35-45.

**Jiang LJ, Maret W, Vallee BL. 1998.** The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase. Proc Natl Acad Sci USA 95: 3483-3488.

**Kamachi K, Yamaya T, Hayakawa T, Mae T, Ojima K. 1992.** Changes in cytosolic glutamine synthase polypeptide and its mRNA in a leaf blade of rice plants during natural senescence. *Plant Phys* 98: 1323-1329.

**Kamal-Eldin A, Appelqvist LA. 1996.** The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31: 671-701.

**Kampfenkel K, Kushinr S, Babychuk E, Inze D, Van Montagu M. 1995.** Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *J Biol Chem* 270: 28479-28486.

**Kawai S, Itoh K, Tagaki SI, Iwashita T, Nomoto K. 1988.** Studies on phytosiderophores: biosynthesis of mugineic acid and 2'-deoxymugineic acid in *Hordeum vulgare* L. var. Minorimugi. *Tetrahedron Lett* 29: 1053-1056.

**Kawai S, Kamei S, Matsuda Y, Ando R, Kondo S, Ishizawa A, Alam S. 2001.** Concentrations of iron and phytosiderophores in xylem sap of iron-deficient barley plants. *Soil Science and Plant Nutrition* 47 (2): 265-272.

**Kawashima I, Kennedy TD, Chino M, Lane BG. 1992.** Wheat  $E_c$  metallothionein genes like mammalian  $Zn^{2+}$  metallothionein genes, wheat  $Zn^{2+}$  metallothionein genes are conspicuously expressed during embryogenesis. *Eur J Biochem* 209: 971-976.

**Kleber-Janke T, Krupinska K. 1997.** Isolation of cDNA clones for genes showing enhanced expression in barley leaves during dark-induced senescence as well as under field conditions. *Planta* 203: 332-340.

**Klemsdal SS, Hughes W, Lönneborg A, Aalen RB, Olsen OA. 1991.** Primary structure of a novel barley gene differentially expressed in immature aleurone layers. *Mol Gen Genet* 228: 9-16.

**Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB. 1999.** The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with abroad substrate range. *Plant Mol Biol* 40: 37-44.

**Krause K, Falk J, Humbeck K, Krupinska K. 1998.** Responses of the transcriptional apparatus of barley chloroplasts to a prolonged dark period and to subsequent reillumination. *Physiol Plant* 104: 143-152.

**Kupper H, Kupper F, Spiller M. 1996.** Environmental relevance of heavy-metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *J Exp Bot* 47: 259-266.

**Lane BG, Kajioka R, Kennedy TD. 1987.** The wheat germ Ec protein is a zink-containing metallothionein. *Biochem Cell Biol* 65: 1001-1005.

**Ledger SE, Gardner RC. 1994.** Cloning and characterization of five cDNAs for genes differentially expressed during fruit development of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *delicosa*). *Plant Mol Biol* 25: 877-886.

**Levy-Adam F, Miao HQ, Heinrikson RL, Vlodaysky I, Ilan N. 2003.** Heterodimer formation is essential for heparanase enzymatic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 308 (4): 885-891.

**Li Q, Hu N, Daggett MA, Chu WA, Bittel D, Johanson JA, Andrews GK. 1998.** Participation of upstream stimulator factor (USF) in cadmium-induction of the mouse metallothionein-I gene. *Nucleic Acids Res* 26: 5182-5189.

**Liang P, Pardee AB. 1992.** Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-972.

**Lohman K, Gan S, John M, Amasino RM. 1994.** Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 92: 322-328.

**Ma M, Lau PS, Jia YT, Tsang WK, Lam SKS, Tam NFY, Wong YS. 2003.** The isolation and characterization of type 1 metallothionein (MT) cDNA from a heavy-metal-tolerant plant, *Festuca rubra* cv. Merlin. *Plant Science* 164: 51-60.

**Malik D, Sheoran IS, Singh R. 1992.** Carbon metabolism in leaves of cadmium treated wheat seedlings. *Plant Physiol Biochem* 30: 223-229.

**Maret W, Vallee BL. 1998.** Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3478-3482.

**Margoshes M, Vallee BL. 1957.** A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc* 79: 4813-4814.

**Marschner H, Römheld V. 1994.** Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant Soil* 165: 261-274.

**Marschner H. 1995.** The soil-root interface (rhizosphere) in relation to mineral nutrition. In: *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2<sup>nd</sup> edn. Marschner H (ed.) Academic Press, London, UK: 537-595.

**Massague J. 1998.** TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67: 753-791.

**Matsumoto H. 2000.** Cell biology of aluminium toxicity and tolerance in higher plants. *Int Rev Cytol* 200: 1-46.

**Matsumura H, Shizuko N, Terauchi R. 1999.** Transcript profiling in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings using serial analysis of gene expression (SAGE). *Plant J* 20 (6): 719-726.

**Matz M, Usman, N, Shagin D, Bogdanova E, Lukyanov S. 1997.** Ordered Differential display: a simple method for systematic comparison of gene expression profiles. *Nucl Acids Res* 25: 2541-2542.

**Mauk CS, Noodén LD. 1992.** Regulation of mineral redistribution in pod-bearing soybean explants. *J Exp Bot* 43: 1429-1440.

**McCarthy I, Romero-Puertas MC, Palma JM, Corpas FJ, Gomez M, Del Rio LA. 2001.** Cadmium induces senescence symptoms in leaf peroxisomes of pea plants. *Plant Cell Environ* 24: 1065-1073.

**McMahon PJ, Anderson JW. 1998.** Preferential allocation of sulfur into  $\gamma$ -glutamylcysteinyl peptides in wheat plants grown at low sulphur nutrition in the presence of cadmium. *Physiol Plant* 104: 440-448.

**Melkonyan VZ und Nalbandyan RM.1989.** Copperthionein from the roots of cucumber seedlings. *Biochemia* 54: 306-312.

**Miersch I, Heise J, Zelmer I, Humbeck K. 2000.** Differential degradation of the photosynthetic apparatus during leaf senescence in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Biol* 2: 618-623.

**Mira H, Martinez-Gracia F, Penarrubia L. 2001a.** Evidence for the plant-specific intercellular transport of the *Arabidopsis* copper chaperone CCH. *Plant J* 25 (5): 521-528.

**Mira H, Vilar M, Perez-Paya E, Penarrubia L. 2001b.** Functional properties of the exclusive C-domain from the *Arabidopsis* copper chaperone (CCH). *Biochem J* 357: 545-549.

**Miyairi S, Shibata S, Naganuma A. 1998.** Determination of metallothionein by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using an isocratic solvent system. *Analytical Biochem* 258: 168-175.

**Money T, Reader S, Qu LJ, Dunford RD, Moore G. 1996.** AFLP-based mRNA fingerprinting. *Nucl Acids Res* 24: 2616-2617.

**Murphy A, Taiz L. 1995.** Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. *Plant Physiol* 109: 945-954.

**Murphy A, Zhou J, Goldsbrough PB, Taiz L. 1997.** Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Phys* 113 (4): 1293-1301.

**Navabpour S, Morris K, Allen R, Harrison E, Mackerness SAH, Buchanan-Wollaston V. 2003.** Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *J Exp Bot* 54 (391): 2285-2292.

**Nielsen E, Akita M, Davila-Aponte J, Keegstra K. 1997.** Stable association of chloroplastic precursors with protein translocation complexes that contain proteins from both envelope membranes and a stromal Hsp100 molecular chaperone. *EMBO J* 16: 935-946.

**Noodén LD, Leopold AC. 1988.** Whole plant senescence. In: *Senescence in aging plants*. Noodén LD, Leopold AC (eds.), Academic press, San Diego, CA, USA: 330-386.

**Noodén LD, Guamet JJ, John I. 1997.** Senescence mechanisms. *Physiol Plant* 101: 746-753

**Norvell WA. 1991.** Reactions of metal chelates in soils and nutrient solution. In: *Micronutrients in Agriculture*. 2<sup>nd</sup> edn., Mortvedt JJ et al. (eds.), Soil Sci Soc Am, Madison, WI, USA: 187-227.

**Oh MH, Ray WK, Huber SC, Asara JM, Gage DA, Clouse SD. 2000.** Recombinant brassinosteroid insensitive 1 receptor-like kinase autophosphorylates on serine and threonine residues and phosphorylates a conserved peptide motif in vitro. *Plant Physiol* 124: 751-766.

**Okumura N, Nishizawa NK, Umehara Y, Mori S. 1991.** An iron deficiency-specific cDNA from barley roots having two homologous cysteine-rich MT domains. *Plant Mol Biol* 17: 531-533.

**Okumura N, Nishizawa NK, Umehara Y, Ohata T, Nakainshi H, Yamaguchi T, Chino M, Mori S. 1994.** A dioxygenase gene (*Ids2*) expressed under iron deficiency conditions in the roots of *Hordeum vulgare* L. *Plant Mol Biol* 25: 705-719.

**Ortiz DF, Kreppel L, Speiser DM, Scheel G, McDonald G, Ow DW. 1992.** Heavy-metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane protein. *EMBO J* 11: 3491-3499.

**Porankiewicz J, Wang J, Clarke AK. 1999.** New insights into the ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond. *Mol Microbiol* 32: 449-458.

**Prasad MNV, Strzalka K. 1999.** Impact of heavy metals. In: Heavy metal stress in plants. Prasad MNV, Hagemeyer J (eds.) Springer-Verlag Heidelberg, D: 117-138.

**Puig S, Thiele DJ. 2002.** Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin in Chem Biol* 6: 171-180.

**Punter FA, Glerum DM 2003.** Mutagenesis reveals a specific role for Cox17p in copper transport to cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 278 (33): 30875-30880.

**Quaife CJ, Findley SD, Erickson JC, Froelick GJ, Kelly EJ, Zambrowicz BP, Palmiter RD. 1994.** Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithel. *Biochem* 33: 7250-7259.

**Quirino BF, Noh YS, Himelblau E, Amasino RM. 2000.** Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant science* 5 (7): 278-282.

**Rausser WE. 1999.** Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys* 31: 19-48.

**Reid SJ, Gross GS. 1997.** Up-regulation of two cDNA clones encoding metallothionein-like proteins in apple fruit during cool storage. *Physiol Plant* 100: 183-189.

**Richards KD, Schott EJ, Sharma, YK, Davis KR, Garnder RC. 1998.** Aluminium induces oxidative stress gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 116: 409-418.

**Riek R, Prêcheur B, Wang Y, MacKay EA, Wider G, Güntert P, Liu A, Kägi JHR, Wüthrich K. 1999.** NMR structure of the sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) metallothionein MTA. *J Mol Biol* 291: 417-428.

**Robinson NJ, Tommey AM, Kuske C, Jackson PJ. 1993.** Plant metallothioneins. *Biochem J* 295: 1-10.

**Robinson NJ, Wilson JR, Turner JS. 1996.** Expression of the type 2 metallothionein-like gene MT2 from *Arabidopsis thaliana* in Zn<sup>2+</sup>-metallothionein-deficient *Synechococcus* PCC 7942: putative role for MT2 in Zn<sup>2+</sup> metabolism. *Plant Mol Biol* 30: 1169-1179.

**Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML. 1999.** A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 397 (6721): 694-697.

**Rohrmeier T, Lehle L. 1993.** WIP1, a wound-inducible gene from maize with homology to Bowman-Birk proteinase inhibitors. *Plant Mol Biol* 22 (5): 783-792.

**Sancenon V, Puig S, Mira H, Thiele DJ, Peñarrubia L. 2003.** Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 51: 577-587.

**Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Romero-Puertas MC, Del Rio LA. 2001.** Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J Exp Bot* 52 (364): 2115-2126.

**Sasaki K, Taura F, Shoyama Y, Morimoto S. 2000.** Molecular characterization of a novel  $\beta$ -glucuronidase from *Scutellaria baicalensis* Georgi. JBC 275 (35): 27466-27472.

**Sassa H, Oguchi S, Inoue T, Hirano H. 2000.** Primary structural features of the 20S proteasome subunits of rice (*Oryza sativa*). Gene 250 (1-2): 61-66.

**Schmidtke I, Stephan UW. 1995.** Transport of metal micronutrients in the phloem of castor bean (*Ricinus communis*) seedlings. Physiol Plant 95: 147-153.

**Schreiber U, Schliwa U, Bilger W. 1989.** Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosyn Res 10: 51-62.

**Sharma YK, Davis KR. 1994.** Ozone-induced expression of stress-related genes in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol 105: 1089-1096.

**Shen GA, Pang YZ, Lin CF, Wei C, Qian XY, Jiang LZ, Du XL, Li KG, Attia K, Yang JS. 2003.** Cloning and characterization of a novel Hsp100/Clp gene (osClpD) from *Oryza sativa*. DNA Seq 14 (4): 285-293.

**Shojima S, Nishizawa NK, Mori S. 1989.** Establishment of a cell-free system for the biosynthesis of nicotianamine. Plant Cell Physiol 30: 673-677.

**Simpson RJ, Dalling MJ. 1981.** Nitrogen distribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum* L.): whole plants aspects. III. Enzymology and transport of amino acids from senescing flag leaves. Planta 151: 447-456.

**Singh R, Rana SV. 2002.** Influence of antioxidants on metallothionein-mediated protection in cadmium-fed rats. Biol Trace Elem Res 88 (1): 71-77.

**Smart CM. 1994.** Tansley Rev 64: Gene expression during leaf senescence. *New Phytol* 126: 419-448.

**Snowden KC, Gardner RC. 1993.** Five genes induced by aluminium in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol* 103: 855-861.

**Somashekaraiah BV, Padmaja K, Prasad ARK. 1992.** Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Phys Plant* 85: 85-89.

**Stephan UW, Scholz G. 1993.** Nicotianamine: mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem? *Physiol Plant* 88: 522-529.

**Stevens C, Titarenko E, Hargeaves JA, Gurr SJ. 1996.** Defence-regulated gene activation during an incompatible interaction between *Stagonospora (Septoria) nodorum* and barley (*Hordeum vulgare* L.) coleoptile cells: *Plant Mol Biol* 31: 741-749.

**Suhy DA, Simon KD, Linzer DI, O'Halloran TV. 1999.** Metallothionein is a part of a zinc-scavenging mechanism for cell survival under conditions of extreme zinc deprivation. *J Biol Chem* 274: 9183-9192.

**Terras FRG, Schoofs HME, Thevissen K, Osborn RW, Vanderleyden J, Cammune BPA, Broekaert WF. 1993.** Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. *Plant Physiol* 103: 1311-1319.

**Vasak M, Hasler DW. 2000.** Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr Opin Chem Biol* 4: 177-183.

**Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA. 1999.** *AtPCSI*, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and *in vitro* reconstruction. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7110-7115.

**Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA. 2000.** Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase. *J Biol Chem* 275 (40): 31451-31459.

**Virtanen V, Bordin G. 1998.** Charakterization of mammalian metallothionein isoforms by capillary zone electrophoresis with diode array detection using TRIS-borate buffer. *J Liq Chrom Rel Technol* 21 (20): 3087-3098.

**Weaver LM, Froehlich JE, Amasino RM. 1999.** Chloroplast-targeted ERD1 protein declines but its mRNA increases during senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 119: 1209-1216.

**Wei JZ, Chatterton NJ, Wang RR, Larson SR. 2002.** Characterization of mRNAs that accumulate during illumination of excised leaves of big bluegrass (*Poa secunda*). *J Plant Physiol* 159: 661-670.

**Woeste KE, Kieber JJ. 2000.** A strong loss-of-function mutation in *RANI* results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. *Plant Cell* (12): 443-455.

**Yamaguchi H, Nishizawa NK, Nakanishi H, Mori S. 2002.** IDI7, a new iron-regulated ABC transporter from barley roots, localizes to the tonoplast. *J Exp Bot* 53 (369): 727-735.

**Yu LH, Umeda M, Liu JY, Zhao NM, Uchimiya H. 1998.** A novel MT gene of rice plants is strongly expressed in the node portion of the stem. *Gene* 206 (1): 29-35.

**Zangger K, Öz G, Otvos JD, Armitage IM. 1999.** Three-dimensional solution structure of mouse [Cd7]-metallothionein-1 by homonuclear NMR spectroscopy. *Protein Sci* 8: 2630-2638.

**Zenk MH. 1996.** Heavy metal detoxifikation in higher plants - a review. *Gene* 179: 21-30.

**Zheng B, Halperin T, Hruskova-Heidingsfeldova O, Adam Z, Clarke AK. 2002.** Characterization of Chloroplast Clp proteins in *Arabidopsis*: Localization, tissue specificity and stress responses. *Physiol Plant* 114 (1): 92-101.

**Zhou J, Goldsbrough PB. 1994.** Functional homologs of animal and fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6: 875-884.

**Zhou J, Goldsbrough PB. 1995.** Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Mol Gen Genet* 248: 318-328.

**Zhou J, Tang X, Martin GB. 1997.** The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis element of pathogen-related genes. *EMBO J* 16: 3207-3218.

## CURRICULUM VITAE



### JAN HEISE, Dipl.-Biol.

August-Bebel-Str. 69, D-06108 Halle

## AUSBILDUNG

2000-2004: Promotion, Inst.f. Pflanzenphysiologie / Inst. f. Biochemie, MLU Halle-Wittenberg bei Prof. K. Humbeck / Dr. J. Miersch

1999-2000: Research Associate, Plant and Microbial Biology, University of California, Berkeley, (USA) bei Prof. T. Melis

1988-1999: Diplomarbeit, Inst. f.Pflanzenphysiologie, MLU Halle-Wittenberg bei Prof. K. Humbeck

1993-1998: Studium, Diplom-Biologie, MLU Halle-Wittenberg

1991-1992: Zivildienst, Fachklinik, Malente-Gremsmühlen

1988-1991: Gymnasium, Flensburg

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertation erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe.

Ferner erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den 20.02.04