

**Physiologisch-biochemische Charakterisierung
schwermetallinduzierter Reaktionen in
Fontinalis antipyretica Hedw.**

Dissertation

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

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Fachbereich Biochemie/Biotechnologie)

von Steffi Rau
geb. am 22. November 1971 in Eilenburg

Gutachter:

1. Dr. rer. nat. habil. J. Miersch
2. Dr. rer. nat. habil. D. Neumann
3. Prof. Dr. rer. nat. habil. K. Jung

Verteidigung: 09.10.2002

urn:nbn:de:gbv:3-000004774

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004774>]

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Schwermetalle: Ein Wirkungsspektrum	1
1.2 Mechanismen der Schwermetalltoleranz	4
1.2.1 Intrazelluläre Transportprozesse.....	4
1.2.2 Schwermetallchelatoren.....	6
1.2.2.1 Metallothioneine.....	6
1.2.2.2 Phytochelatine.....	8
1.2.2.3 Freie Aminosäuren.....	9
1.2.2.4 Organische Säuren.....	10
1.2.2.5 Phenole.....	12
1.2.3 Die Rolle der Hitzeschockproteine und Cyclophiline.....	13
1.3 <i>Fontinalis antipyretica</i>: Im Dienste der Schwermetallstressforschung	14
1.4 Zielstellung	15
2. Material und Methoden	16
2.1 Pflanzenmaterial und Kultivierungsbedingungen	16
2.1.1 <i>Fontinalis antipyretica</i>	16
2.1.2 Standort und Probennahme.....	17
2.1.3 Kultivierung.....	17
2.1.4 Schwermetallzugabe.....	18
2.1.5 Hitzestress.....	18
2.2 Messung der Chlorophyllfluoreszenz	19
2.3 Bestimmung des intrazellulären Schwermetallgehaltes	20
2.3.1 Probenvorbereitung.....	20
2.3.2 Aufschluss des Pflanzenmaterials.....	21
2.3.3 Schwermetallanalytik mittels Flammen-AAS.....	21
2.4 Analytische Elektronenmikroskopie	21
2.5 Proteinchemische Methoden	22
2.5.1 Proteinextraktion.....	22
2.5.2 Hitzefällung.....	23
2.5.3 Proteinbestimmung.....	23
2.5.4 Reduktive Carboxymethylierung.....	23
2.5.5 Elektrophoretische Methoden.....	24
2.5.5.1 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	24
2.5.5.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	24
2.5.5.2.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung.....	24

2.5.5.2.2 Zweite Dimension: SDS-PAGE.....	25
2.5.5.2.3 Bildverarbeitung.....	26
2.5.5.3 Transfer auf NC-Membranen.....	26
2.5.5.4 Transfer auf PVDF-Membranen.....	27
2.5.6 Proteinfärbungen.....	27
2.5.6.1 Färbung mit Coomassie.....	27
2.5.6.2 Silberfärbung.....	27
2.5.6.3 Färbung mit Ponceau-Rot.....	28
2.5.7 Immunologische Methoden.....	28
2.5.7.1 Immunologische Detektion.....	28
2.5.7.2 Densidometrische Auswertung der Immuno-Assays.....	29
2.5.8 Säulenchromatographische Methoden.....	29
2.5.8.1 Probenvorbereitung.....	29
2.5.8.2 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC).....	30
2.5.8.3 Kovalente Affinitätschromatographie.....	30
2.5.9 Massenspektrometrie.....	31
2.5.9.1 MALDI-TOF-MS.....	31
2.5.9.2 LC-MS.....	31
2.5.10 Micro-Sequenzanalyse von Proteinen/Peptiden.....	32
2.5.10.1 Alkylierung reduzierter Sulfhydrylgruppen.....	32
2.5.10.2 In-Gel-Proteinverdau und Peptideluotion.....	32
2.5.10.3 RP-HPLC-Trennung tryptisch verdauter Proteine.....	33
2.5.10.4 Protein/Peptid-Sequenzierung.....	34
2.6 Qualitative und quantitative Bestimmung freier Aminosäuren.....	34
2.6.1 Extraktion.....	34
2.6.2 Aminosäurederivatisierung.....	34
2.6.3 Qualitative und quantitative Aminosäureanalyse mittels GC-C-IRMS.....	35
2.6.4 Qualitative und quantitative Aminosäureanalyse mittels Aminosäure-Analyzer.....	35
2.7 Analytik organischer Säuren.....	35
2.7.1 Extraktion.....	35
2.7.2 HPLC-Analyse.....	36
2.7.3 Derivatisierung.....	36
2.7.4 Qualitative Analyse mittels GC-MS.....	36
2.8 Analytik phenolischer Verbindungen.....	37
2.8.1 Extraktion löslicher, phenolischer Inhaltsstoffe.....	37
2.8.2 Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes.....	37
2.8.3 RP-HPLC-Analyse.....	37
2.8.4 LC-MS/MS-Analyse.....	38
2.8.5 Nachweis von Flavonol-Kupfer-Wechselwirkungen.....	38

2.9 Nukleinsäureanalytik	39
2.9.1 Isolierung von Nukleinsäuren.....	39
2.9.1.1 Isolierung von genomischer DNA.....	39
2.9.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
2.9.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	40
2.9.1.4 Isolierung von RNA.....	40
2.9.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen.....	40
2.9.3 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	41
2.9.3.1 Standard-Agarosegelelektrophorese.....	41
2.9.3.2 Denaturierende Agarosegelelektrophorese.....	41
2.9.4 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	42
2.9.5 Ligation von DNA-Fragmenten.....	42
2.9.6 Transformation.....	43
2.9.6.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	43
2.9.6.2 Transformation/Vektor pBK-CMV.....	43
2.9.6.3 Transformation/Vektor pGEM-T.....	44
2.9.7 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	44
2.9.8 Kolonie-PCR.....	45
2.9.9 DNA-Sequenzierung.....	46
2.9.10 Nachweis spezifischer RNA.....	47
2.9.10.1 Nichtradioaktive Sondenmarkierung.....	47
2.9.10.2 Transfer auf Nylonmembranen.....	47
2.9.10.3 RNA-DNA-Hybridisierung (Northern-Hybridisierung).....	47
2.10 Statistische Auswertung	48
3. Ergebnisse	49
3.1 Vitalität unter Schwermetalleinfluss in <i>Fontinalis antipyretica</i>	49
3.2 Intrazelluläre Schwermetallaufnahme durch <i>Fontinalis antipyretica</i>	52
3.2.1 Intrazelluläre Aufnahme von Kupfer.....	52
3.2.2 Intrazelluläre Aufnahme von Cadmium.....	53
3.2.3 Intrazelluläre Aufnahme von Blei.....	54
3.2.4 Intrazelluläre Aufnahme von Zink.....	54
3.3 Untersuchungen zur zellulären Lokalisation und zum Bindungsstatus von Kupfer in <i>Fontinalis antipyretica</i>	55
3.3.1 Intrazelluläre Elementverteilung.....	55
3.3.2 Der Bindungsstatus von Kupfer in Zytoplasma und Vakuole.....	58
3.4 Charakterisierung schwermetall- und hitzeschockinduzierter Proteine aus <i>Fontinalis antipyretica</i>	59

3.4.1 Eindimensionale Proteinmuster unter Schwermetalleinfluss, Hitzeschock und nach Hitzefällung (SDS-PAGE).....	59
3.4.2 Zweidimensionale Proteinmuster unter Schwermetalleinfluss.....	62
3.4.2.1 Proteinmuster der Kontrolle.....	63
3.4.2.2 Proteinmuster unter Kupferbelastung.....	65
3.4.2.3 Proteinmuster unter Cadmiumbelastung.....	66
3.4.2.4 Proteinmuster unter Bleibelastung.....	68
3.4.2.5 Proteinmuster unter Zinkbelastung.....	69
3.4.3 Antigen-Antikörper-Reaktionen.....	71
3.4.3.1 Immunreaktion des anti-Peptid-Antikörpers Metallothionein p2.....	71
3.4.3.2 Immunreaktion des anti-HSP 70-Antikörpers.....	73
3.4.3.3 Immunreaktion des anti-HSP 17-Antikörpers.....	75
3.4.3.4 Immunreaktion des anti-Peptid-Antikörpers Cyclophilin 18.....	75
3.4.4 Affinitätschromatographie.....	75
3.4.4.1 Isolierung metallbindender Proteine mittels immobilisierter Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC).....	75
3.4.4.2 Isolierung thiolhaltiger Proteine mittels kovalenter Affinitätschromatographie.....	77
3.4.5 Identifizierung ausgewählter Proteine mittels Massenspektrometrie und Micro-Sequenzierung.....	78
3.4.5.1 MALDI-TOF-MS und Micro-Sequenzanalyse von hitzeinduzierten sowie hitzestabilen Proteinen.....	78
3.4.5.2 Micro-Sequenzanalyse der Metallothionein p2-Antikörperpositiven Proteine.....	79
3.4.5.3 LC-MS-, MALDI-TOF-MS- und Micro-Sequenzanalyse affinitätschromatographisch gereinigter Proteine.....	79
3.5 Der Einfluss von Kupfer auf die Zusammensetzung und den Gehalt freier Aminosäuren in <i>Fontinalis antipyretica</i>	81
3.6 Der Einfluss von Kupfer auf organische Säuren in <i>Fontinalis antipyretica</i>	84
3.7 Der Einfluss von Kupfer auf phenolische Verbindungen in <i>Fontinalis antipyretica</i>	87
3.7.1 Gesamtphenolgehalt.....	87
3.7.2 RP-HPLC- und LC-MS/MS-Analyse phenolischer Verbindungen.....	88
3.7.3 Phenolische Absorptionsspektren unter Kupfereinfluss.....	89
3.8 Transkriptionsanalyse und Identifizierung Metallothionein-ähnlicher Gene aus <i>Fontinalis antipyretica</i>	89
3.8.1 Expression Metallothionein-ähnlicher Gene unter Schwermetallstress.....	89
3.8.2 Identifizierung einer Metallothionein-ähnlichen Gensequenz.....	90

4. Diskussion	92
4.1 Der Einfluss von Kupfer, Cadmium, Blei und Zink auf die Vitalität von <i>Fontinalis antipyretica</i>	92
4.2 Intrazelluläre Aufnahme von Kupfer, Cadmium, Blei und Zink von <i>Fontinalis antipyretica</i>	96
4.3 Zelluläre Lokalisation und der Bindungsstatus von Kupfer in <i>Fontinalis antipyretica</i>	99
4.4 Untersuchungen zur Schwermetallstressantwort auf Proteinebene in <i>Fontinalis antipyretica</i>	102
4.4.1 Charakterisierung der ein- und zweidimensionalen Proteinmuster	102
4.4.2 Metallothioneine, Hitzeschockproteine und Cyclophiline	105
4.4.3 Schwermetallbindende Proteine	108
4.5 Kupfereffekte auf den Primär- und Sekundärstoffwechsel in <i>Fontinalis antipyretica</i>	110
4.5.1 Freie Aminosäuren	110
4.5.2 Organische Säuren	113
4.5.3 Phenolische Verbindungen	114
4.6 Metallothionein: Das genetische Potential von <i>Fontinalis antipyretica</i>	116
5. Zusammenfassung	118
6. Literaturverzeichnis	121
7. Anhang	139

Abkürzungsverzeichnis

1D	eindimensionale Gelelektrophorese
2D	zweidimensionale Gelelektrophorese
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	ATP-binding cassette transporter
ACN	Acetonitril
AS	Aminosäure
AtMRP	<i>Arabidopsis thaliana</i> -multi-drug-resistant protein
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAX2	calcium exchanger 2
CCH	copper chaperon
cDNA	komplementäre DNA
Chaps	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
COPT1	copper transporter1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	2'-desoxy-Uridin-5'-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
EST	expressed sequence tag, cDNA-Fragment
et al.	et alii (und andere)
ETR1	ethylene receptor1
FM	Frischmasse
GC-MS	Kopplung Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GSH	Glutathion (reduziert), γ -Glu-Cys-Gly
IRT	iron regulated transporter
Kap.	Kapitel

LB	Luria Bertani (Komplexmedium)
LC-MS	Kopplung Liquid Chromatography-Massenspektrometrie
LCT1	low-affinity-cation-transporter1
LHC	light harvesting complex
m/z	Masse/Ladung
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisations-Massenspektrometrie
Me(II)	Metall(II)-Ion
MES	N-Morpholinoethansulfonsäure
Mops	3-Morpholinopropansulfonsäure
MRP	multi-drug-resistant protein
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
N-Terminus	Amino-Terminus (Protein)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAM	Puls-Amplituden-Modulation
PAR	photosynthetic apparent radiation
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PDB	Protein Daten Bank
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PPN	polymerisch gebundene Alkylketten
PS	Photosystem
pUC18	Plasmid Vektor
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RAN1	responsive to antagonist1
REV1	DNA repair protein1
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography
R _t	Retentionszeit
RuBP-Carboxylase	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Natriumzitat-Salzlösung
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
TM	Trockenmasse

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV/Vis	ultraviolettes/sichtbares Licht
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
ZAT	zinc transporter <i>Arabidopsis thaliana</i>
ZIP	zinc/iron regulated transporter protein
ZNT	zinc transporter
ZRT	zinc regulated transporter

Ein- und Dreibuchstaben-Code der Aminosäuren:

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

1. Einleitung

1.1 Schwermetalle: Ein Wirkungsspektrum

Schwermetalle der Erdkruste werden durch abiotische und biotische Vorgänge wasserlöslich und können somit lebende Zellen beeinflussen. Dabei ist die physiologische Wirkung dieser Elemente abhängig von der Konzentration, der zeitlichen Einwirkung und Bindungsform. Einerseits zählen Schwermetalle* wie Zn(II) und Cu zur Gruppe der essentiellen Mikronährstoffe (< 0,5 mg/l), andererseits können toxische Konzentrationen zu letalen Veränderungen im Stoffwechsel führen. Die Pflanze befindet sich in einer Zwangslage, denn während der Evolution von Ionenaufnahmemechanismen wurde kein System entwickelt, das sich auf die für Pflanzen benötigten Schwermetalle beschränkt und alle nicht verwertbaren Elemente, wie z.B. Pb(II) und Cd(II), ausschließt (Brunold et al., 1996). Unspezifische Transportsysteme stellen demnach die Basis für die Aufnahme toxischer Schwermetallionen dar (Nies und Silver, 1995).

Die metabolische Funktion des Zn(II) in Enzymreaktionen liegt in dessen Bildung tetrahedrischer Komplexe mit N-, O- und S-Liganden. In katalytisch wirkenden Enzymen, wie z.B. der karbonischen Anhydrase, ist Zn(II) mit drei Aminosäuren (Histidin, Glutamin oder Asparagin) und einem Wassermolekül koordiniert. Als weitere Zn(II)-Enzyme sind die alkalische Phosphatase, die Phospholipase und die RNA-Polymerase zu nennen. Dagegen bildet Zn(II) in der Cu/Zn-Superoxiddismutase (Cu/Zn-SOD) die strukturelle Komponente, Cu die katalytische. Weiterhin sind Zn(II)-Metalloproteine in der Regulation der Genexpression involviert. Tetrahedrische Komplexe mit Cysteinresten der Polypeptidkette bilden sogenannte Zink-Finger-Motive, die DNA-bindende Domäne von Rezeptorproteinen. Als strukturelle Komponente der Ribosomen ist Zn(II) essentiell für den Ablauf der Proteinsynthese. Durch die Bindung an Phospholipiden und Sulfhydrylgruppen bzw. die Bildung tetrahedraler Komplexe mit Cysteinresten der Polypeptidkette membraner Komponenten schützt Zn(II) Membranlipide und Proteine vor oxidativen Schäden und beeinflusst dadurch wesentlich die Membranstabilität. Zinkmangel, bei höheren Pflanzen ab 0,2 µmol/g TM, tritt häufig parallel mit Eisenmangel auf und zeigt sich an verkürzten Internodien, Chlorosen und an Wuchsstörungen der Blätter (Marschner, 1995).

* Im Folgenden wird für redoxinierte Metalle die ionische Bezeichnung und für Kupfer und Aluminium, deren jeweiliger Oxidationsstatus nicht geklärt ist, die Elementform verwendet.

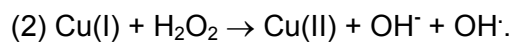
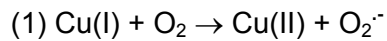
Die physiologische Bedeutung des zumeist enzymatisch gebundenen Cu liegt in seinem Redoxpotential. Zweiwertige Cu-Ionen werden leicht zu instabilen, einwertigen Ionen reduziert. Aufgrund der hohen Affinität gegenüber Sulfhydrylgruppen cysteinreicher Proteine sowie zu Karboxyl- und Phenolgruppen liegt Cu zumeist komplexiert vor und die Konzentration an freien Cu-Ionen im Zytoplasma und in Organellen ist sehr gering. Für Nutzpflanzen wird ein Mindestgehalt an Cu von 0,02 µmol/g TM angegeben (Marschner, 1995).

Nach Sandmann und Böger (1983) existieren drei verschiedene Gruppen Cu-Proteine: die sogenannten "blue-proteins", die an dem Transfer eines Elektrons beteiligt sind, die Peroxidasen oder "non-blue-proteins" sowie die Multi-Cu-Proteine, die als Oxidasen vier Cu-Atome pro Molekül besitzen. Mehr als 50 % des Cu in den Chloroplasten ist an Plastocyanin, einem "blue-protein" der Thylakoidmembran, gebunden. Polyphenol-oxidasen, die Multi-Cu-Proteine, sind in Zellwänden, aber auch in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten lokalisiert und katalysieren die Oxidation der Phenole zu Lignin.

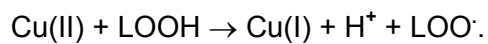
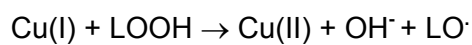
Eine Cu-Unterversorgung verursacht daher eine verringerte Lignifizierung der Zellwände und des Xylems (Lavid et al., 2001a; Marschner, 1995). Verringerte Aktivitäten des PS I und II, verbunden mit geringen Gehalten an löslichen Kohlehydraten, der gestörten Synthese von Quinonen und einer veränderten Lipidzusammensetzung der Thylakoidmembranen beschreibt Marschner (1995) als Folge eines Cu-Mangels. Insgesamt beeinflusst Cu-Mangel die Samenreifung (sterile Pollen) und Fruchtbildung signifikanter als das vegetative Wachstum (Blattwelken und nekrotische Apikalmeristeme).

Die Toxizität eines Schwermetalls ist in jedem Fall elementspezifisch und abhängig von der Pflanze selbst, denn jeder Organismus hat eine genetisch festgelegte Reaktionsbreite gegenüber Umweltfaktoren. Sobald eine kritische Konzentration erreicht, bzw. überschritten wird, kann dies zu komplexen Änderungen im Stoffwechsel führen (Brunold et al., 1996). Ausschlaggebend sind weiterhin die Verfügbarkeit sowie die Dauer und Art der Applikation. Die toxische Grenze für Zn(II) ist im Allgemeinen hoch und wird für Nutzpflanzen mit 100-300 µg Zn(II)/g TM angegeben. Blattchlorosen treten indirekt infolge Zn(II)-induzierten Magnesium-, Mangan- oder Eisenmangels auf (Marschner, 1995). Die Beeinflussung der PS auf verschiedenen Ebenen ist von van Assche und Clijsters (1986) sowie von Küpper et al. (1996) beschrieben. So tritt z.B. infolge der Zn(II)-Mg(II)-Konkurrenz eine Hemmung der RuBP-Carboxylase-Aktivität auf. Auch die Substitution des Mn(II) im wasserspaltenden Enzym verursacht Störungen im Elektronentransport des PS II. Weiterhin kann eine Zn(II)-Belastung zum Anstieg des GSH-Gehaltes sowie zur verminderten Aminosäurebiosynthese führen (Bruns et al., 2001; Sutter et al., 2001).

Obwohl Cu als Mikronährstoff von essentieller Bedeutung ist, besitzen Pflanzen eine geringe Toleranz gegenüber diesem Element. Marschner (1995) gibt als toxischen Grenzwert 20-30 µg Cu/g TM für Nutzpflanzen an. Schwermetalle wie Ag(II), Hg(I) und Cu sind in der Lage durch Autooxidation (1) oder durch die Reduktion von H₂O₂ (2) (Fenton-Reaktion) freie Sauerstoffradikale zu bilden, deren Reaktionen mit Nichtradikalen zur Synthese von weiteren Radikalen führt:



Des Weiteren verursachen diese Schwermetallionen Lipidperoxidationen in Membranen, wobei die Umsetzung des stabilen Lipidhydroperoxid (LOOH) in die reaktiven, freien Alkoxy- (LO[·]) und Peroxy (LOO[·])-Radikale erfolgt (Brunold et al., 1996):



Die Verringerung der Gesamtlipiden in Plasmamembranen und der Abbau ungesättigter Fettsäuren führt zur verminderten Membranfluidität. Zusätzlich wird der Ionenhaushalt durch den verstärkten Efflux von K-Ionen gestört (Quartacci et al., 2001) und Seneszenz induziert (Chen und Kao, 1999; 1998). Cu-induzierte Membranschäden wirken sich erheblich auf die Photosyntheseleistung aus. Clijsters und van Assche (1985) beschrieben eine Hemmung des Elektronentransportes am PS II durch Schädigung der Thylakoidmembranen. Aber auch die Substitution des Zentralatoms Mg im Chlorophyll resultiert in einer gestörten Elektronenübertragung im LHC-Komplex (Küpper et al., 1996). Die Toxizität der Schwermetalle basiert allerdings auch auf deren hohen Affinitäten gegenüber Thiol-Gruppen, die in Proteinen eine wichtige Rolle zur Stabilisierung der Tertiär- und Quartärstruktur spielen. Konformationsänderungen und Funktionsverlust sind die Folge der Blockierung funktioneller SH-Gruppen.

So verursacht z.B. die Cd(II)- oder Pb(II)-Bindung an SH-Gruppen der δ-Aminolävulinsäure- (ALA-) Dehydratase die Hemmung der Chlorophyllbiosynthese und somit eine Desorganisation der Chloroplastenfeinstruktur (Brunold et al., 1996). Prinzipiell treten Cd(II)-Toxizitäten häufiger auf als Pb(II)-induzierte Schäden. Allerdings ist in Bryophyten die Inhibierung des N-Stoffwechsels durch Pb(II) (Sutter et al., 2001) und in Algen eine verringerte Photosyntheseaktivität (Nygard und Ekelund, 1999) nachgewiesen. Trotz der allgemeinen Sensitivität der Pflanzen gegenüber Schwermetallen hat sich auf belasteten Böden im Laufe der Evolution eine spezifische Schwermetallvegetation eingestellt (Ernst, 1974). Sogenannte Hyperakkumulatoren speichern beträchtliche Schwermetallgehalte ohne Anzeichen toxischer Symptome. Baker et al. (2000) setzten dabei die Grenzwerte auf 0,1 mg Cd(II)/g TM, für Pb(II), Co(II), Cu und Ni(II) auf

1,0 mg/g TM bzw. für Mn(II) und Zn(II) auf 10,0 mg/g TM fest. Etwa 400 Taxa in 45 Pflanzenfamilien hyperakkumulieren Schwermetall. Welche Mechanismen ermöglichen diese enorme Toleranz?

1.2 Mechanismen der Schwermetalltoleranz

Macnair et al. (2000) definieren Schwermetalltoleranz als das Ergebnis der Wechselwirkungen zwischen Genotyp und Umweltfaktoren von Pflanzen auf schwermetallbelasteten Böden. Zunehmend wird diese Bezeichnung aber auch für experimentell induzierte Mechanismen verwendet (Hall, 2002). Die Toleranz gegenüber einem Schwermetall basiert auf spezifische Mechanismen, während Co-Toleranz durch das Zusammenwirken unspezifischer oder durch unabhängige, spezifische Mechanismen gegenüber verschiedenen Schwermetallen hervorgerufen wird (Schat et al., 2000).

Zu den extrazellulären Toleranzmechanismen, die zur verringerten Aufnahme der Schwermetallionen in den Symplasten führen, wird die Bindung von Metallionen an die Zellwand, die Ausscheidung komplexierender Exudate bzw. die verminderte Aufnahme von Metallionen durch Mykorrhiza gezählt.

Die wichtigsten Mechanismen der intrazellulären Toleranz beinhalten den Transport, die Kompartimentierung, die Chelatierung und die Sequestration freier Schwermetallionen zur Vermeidung toxischer Konzentrationen im Zytoplasma und in den Organellen sowie Protein-Reparaturmechanismen (Hall, 2002; Clemens, 2001) und werden im Folgenden erläutert.

1.2.1 Intrazelluläre Transportprozesse

Das Wissen über intrazelluläre Transportprozesse in Pflanzen ist bislang lückenhaft, stellt aber die Schlüsselrolle im Verständnis zur Regulation der Schwermetallhomöostase dar. Untersuchungen zur Funktion der Proteine erfolgen zumeist in heterologen Systemen (*Saccharomyces cerevisiae*). Insgesamt sind vier pflanzliche Transportsysteme im Schwermetalltransport involviert (Clemens, 2001; Williams et al., 2000):

- ZIP-Familie (ZRT/IRT-Proteine)
- Nramp-Familie (natural resistance-associated macrophage protein)
- P-Typ-ATPasen
- CDF-Familie (cation diffusion facilitator) (Abb. 1).

Transporter der ZIP-Familie sind an der Aufnahme von Fe(II) und Zn(II) beteiligt. Das durch Eisenmangel aktivierte IRT-Protein (*Arabidopsis thaliana*) transportiert Fe(II), Mn(II), Zn(II) und möglicherweise Cd(II) (Korshunova et al., 1999). Die ZIP-Proteine 1, 3 und 4 (*Arabidopsis thaliana*) vermitteln den Zn(II)-Transport in Wurzelmembranen bzw. in der Chloroplastenmembran (Guerinot und Eide, 1999). ZIP2 (*Arabidopsis thaliana*) besitzt eine hohe Affinität gegenüber Cu und Cd(II).

Die AtNramp1,3,4-Proteine regulieren die Fe(II)- (Curie et al., 2000) und im Fall des AtNramp3 auch die Cd(II)-Aufnahme (Thomine et al., 2000). Das LCT1-Protein aus *Triticum aestivum* scheint an der Aufnahme von Ca(II) und Cd(II) beteiligt zu sein (Clemens et al., 1998). Da für nicht essentielle Metalle wie Pb(II) und Cd(II) keine separaten Transportsysteme bestehen, werden diese infolge geringer Substratspezifität einiger Transporter (Cd(II) z.B. mittels IRT1, ZNT1 und AtNramp3) in die Zelle geschleust (Clemens, 2001).

Die intrazelluläre Aufnahme von Cu kann durch das COPT1-Protein (P-Typ-ATPase, *Arabidopsis thaliana*) erfolgen (Kampfenkel et al., 1995). Das Cu-Chaperon CCH ist als erster zytoplasmatischer Cu-Transporter in Pflanzen beschrieben (Mira et al., 2001a). RAN1 operiert als Cu-ATPase, wahrscheinlich an der Membran von Golgi-Vesickeln (Woste und Kieber, 2000). Denkbar wäre der Cu-Transport vom CCH im Zytoplasma auf das RAN1 an der Golgi-Membran und die nachfolgende Übergabe an den ethylenbindenden Rezeptor ETR1 (Himmelblau und Amasino, 2000).

Toxische Verbindungen werden hauptsächlich in der Vakuole gelagert. Über die Tonoplastentransportsysteme ist nur wenig bekannt. In *Arabidopsis thaliana* wiesen Lu et al. (1997) MRP-verwandte Proteine, die AtMRP's, nach, die den Transport von Cd(II)-PC-Komplexen in die Vakuole vermitteln könnten (Rea et al., 1998). Eine Cd(II)-PC-Transport-Aktivität in überexprimierten Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* wurde noch nicht ermittelt.

Zwei Proteine der CDF-Familie, die zur Akkumulation von Zn(II) bzw. Cd(II) beitragen, wurden aus *Arabidopsis thaliana* identifiziert: Das ZAT-Protein, homolog zu tierischen Zn(II)-Transportern (Bloß et al., 2002; van der Zaal et al., 1999) sowie das CAX2, dass als Cd(II)/H(I)-Antiporter auch eine geringe Affinität zu Ca(II) aufweist (Hirschi et al., 2000). Dennoch bleibt die zelluläre Lokalisation des ZAT und die Funktion des CAX2 zu beweisen.

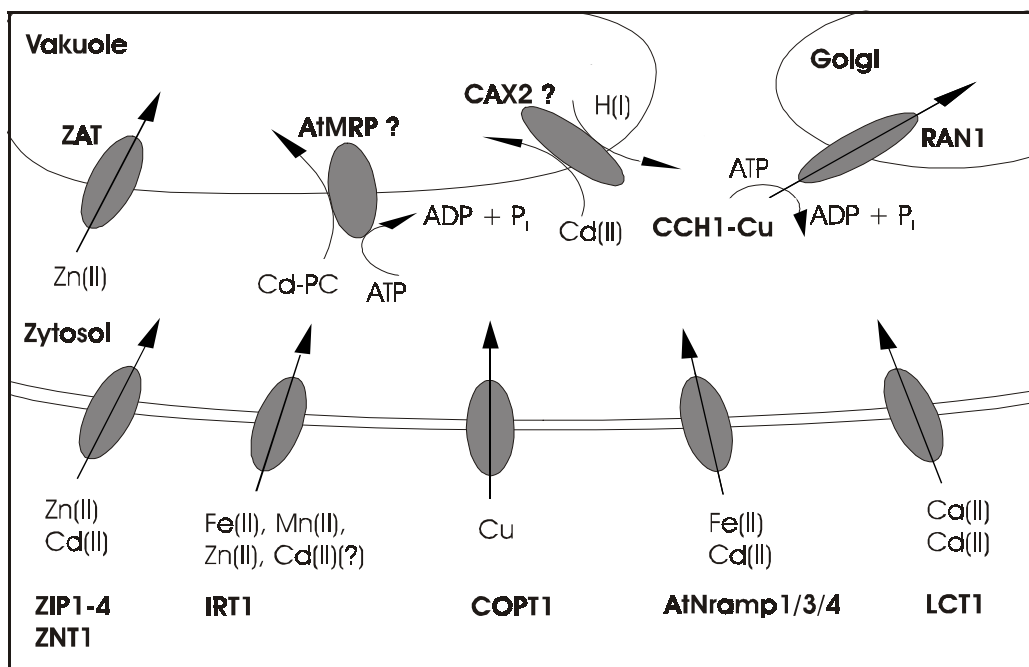


Abb. 1: Bisher identifizierte pflanzliche Metalltransporter, die in heterologen Systemen an der Aufnahme, dem Transport und der Sequestration von Metallionen beteiligt sind (Clemens, 2001).

1.2.2 Schwermetallchelatoren

1.2.2.1 Metallothioneine

Metallothioneine (MT's) bilden eine Gruppe von Proteinen, die ein Molekulargewicht von 6 kDa-8 kDa aufweisen, 30 % Cystein aber kein Histidin und keine aromatischen Aminosäuren besitzen sowie schwach hydrophob und hitzestabil sind. Die Bindung der Metallionen erfolgt in der Regel in zwei Metall-Thiolat-Clustern (Abb. 2). Metallothioneine werden durch Multigenfamilien codiert und sind im Zytoplasma lokalisiert.

Diese Proteine sind ubiquitär verbreitet und wurden aus Mensch, Tier, Prokaryoten, eukaryotischen Mikroorganismen, Pilzen und Pflanzen isoliert. Die neueste Klassifizierung der sehr formenreichen Vertreter erfolgt anhand der Cysteinmotive, Sequenzhomologien sowie phylogenetischen Verwandtschaft (Binz und Kägi, 1999).

Bislang wurden 58 pflanzliche MT-Gene beschrieben. Die Isolierung der Proteine erwies sich aufgrund der schnellen Proteolyse der cysteinarmen Linkerregion sowie der schnellen Oxidation der Thiolliganden als sehr schwierig und aufwendig (Rauser, 1999).

Murphy et al. (1997) charakterisierten zwei native MT's aus *Arabidopsis thaliana* und Lane et al. (1987) isolierten das Ec-Weizen-MT.

Untersuchungen tierischer MT's zeigen, dass die tertiäre Struktur und die Bildung der charakteristischen Metall-Thiolat-Cluster durch die sequentielle Chelatierung der Metallionen entscheidend geprägt wird. Dabei führt die Bindung von Metallionen an den N- und C-terminalen Cysteinen zu intramolekularen Faltungen, die die Formation der Metall-Cluster ermöglichen. *In vivo*-Studien wiesen eine direkte Korrelation zwischen der Länge der Linkerregion und der Effizienz der Sequestration von Cd(II)-Ionen nach (Stillman, 1992).

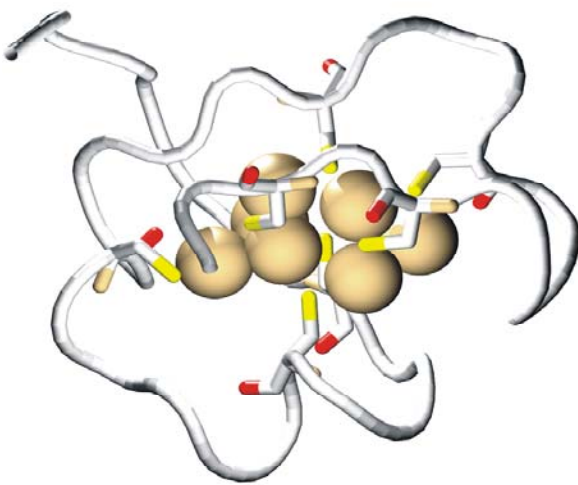


Abb. 2: NMR-Struktur des Cu(I)-Metallothionein aus *Saccharomyces cerevisiae* (Peterson et al., 1996). Dargestellt sind zwei Metall-Thiolat-Cluster mit 4 bzw. 3 Molekülen Cu(I); die Cysteinreste sind gelb gekennzeichnet.

Die komplexen Regulationsmechanismen der Metallothioneine sind noch unklar. Expressionsstudien MT-ähnlicher Gene weisen auf einen differenten Einfluss von Schwermetallen, Hitze- und Kältestress, Wundstress, Seneszenz und Fruchtreife, Zuckern, Salzen, Salicylsäure, Abscisinsäure, Ethylen und Zytokinin hin (Prasad, 1999; Rauser, 1999; siehe auch Tab. 1). Funktionelle Informationen aus heterologen Systemen lassen auf eine Rolle der MT's in der pflanzlichen Metallhomöostase schließen (Clemens, 2001). Weiterhin könnten MT's als zytosolische Chaperone für essentielle Elemente wirken und an der Ionenspeicherung während der Seneszenz beteiligt sein oder als Zn(II)-Donatoren für Transkriptionsfaktoren und Zn(II)-abhängige DNA- und RNA-

Polymerasen operieren. Eine mögliche Rolle in der Schwermetalldetoxifikation und in der Metallsekretion in Trichomen wird ebenfalls diskutiert. (Robinson et al., 1996; Garcia-Hernandez et al., 1998; Rauser, 2000).

Tab. 1: Regulation der MT-Gene in Pflanzen. Auszug aus Rauser (1999). Klassifizierung nach Robinson et al. (1993).

Pflanze	Gen	Repression	Expression	Referenz
<i>Oryza sativa</i>	OsMT1	ABA	Hitzestress, Seneszenz, Cu, Zuckermangel	Hsieh et al. (1995)
	OsMT2	Cu, Cd(II)	Hitzestress, Zuckermangel	Hsieh et al. (1996)
<i>Triticum aestivum</i>	wali1		Al (Wurzel), konst. (Blätter)	Snowden et al. (1993)
<i>Brassica napus</i>	MT2		Seneszenz	Buchanan-Wollaston (1994)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MT1a		Cu > Zn(II), Cd(II)	Zhou et al. (1994)
	MT1b		inaktiv	
	MT2a		Cu > Zn(II), Cd(II)	
	MT2b		Cu	
	MT3		Cu	
<i>Hordeum vulgare</i>	ids1		Fe(II)-Mangel	Okumura et al. (1991)
<i>Mimulus guttatus</i>		Cu, Zn(II), Cd(II)		de Miranda et al. (1990)
<i>Vicia faba</i>	MT2	Kältestress, Salz, Salicylsäure,		Foley et al. (1994)
<i>Nicotiana tabacum</i>	MT2		Cu, Virus, Verwundung	Choi et al. (1996)

1.2.2.2 Phytochelatine

Potentielle Schwermetallliganden in Pflanzen, Pilzen und einigen Mikroorganismen sind die Phytochelatine (PC). In diese Gruppe sind cysteinreiche Peptide folgender Struktur einzuordnen: $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$; $n = 2-11$. Schwermetallionen werden an den Thiolat-Gruppen der Cysteine komplexiert. Die Affinität gegenüber Metallionen erhöht sich dabei mit dem Grad der Polymerisierung (Rauser, 2000). Variationen der dritten Aminosäure

sind ebenfalls beschrieben. So tritt z.B. bei Vertretern der Fabaceae und Poaceae eine Substitution des Glyzins durch β -Alanin (Homo-Phytochelatin) bzw. Serin oder ein Verlust der C-terminalen Aminosäure (Iso-Phytochelatin) auf (Grill et al., 1987; Klapheck et al., 1992). Die Biosynthese der PC's erfolgt enzymatisch aus reduziertem Gluthation (γ -Glu-Cys-Gly; GSH), wobei die PC-Synthase als Transpeptidase wirkt und γ -Glu-Cys-Einheiten auf GSH bzw. PC-Moleküle überträgt. Dieses Enzym liegt konstitutiv im Zytoplasma vor und wird durch Metalle, insbesondere Cd(II) (Cobbett, 2000a; Zenk, 1996; Grill et al., 1989), aber auch durch blockierte Thiolgruppen des Glutathions (Zn(II)- oder Cd(II)-(GS)₂-Komplexe; Vatamanuik et al., 2000) innerhalb weniger Minuten aktiviert. In einem Modell von Cobbett (2000b) operiert die C-terminale Domäne der PC-Synthase als ein Metallsensor, während die N-terminale Domäne katalytische Funktion besitzt. Pflanzliche LMW-Komplexe (low-molecular weight-complex) aus Cd(II)-Ionen und PC's sowie HMW-Komplexe (high-molecular weight-complex), die zusätzlich säurelabiles Sulfid enthalten, wurden in *Lycopersicon* nachgewiesen (Reese et al., 1992; Lichtenberger und Neumann, 1997). Ortiz et al. (1995) postulierten die zytosolische Formierung von LMW-Komplexen aus Cd(II)-Ionen und PC's und einem anschließenden Transport durch den Tonoplasten mittels ABC-Transporter. Die Sequestration in der Vakuole findet in HMW-Komplexen statt, formiert aus LMW, säurelabilem Sulfid und zusätzlichen Cd(II)-Ionen, die über den H(I)-Antiporter transportiert werden. Diese Speicherungsform ist somit pH-Wert stabiler und besitzt eine erhöhte Bindungskapazität gegenüber Metallionen im Vergleich zu LMW-Komplexen.

Die Rolle der PC's in der Schwermetalldetoxifikation wird kontrovers diskutiert. Zum Einen ist ein direkter Zusammenhang zwischen der PC-Akkumulation und der Cd(II)-Toleranz nachgewiesen (Zhu et al., 1999; Clemens et al., 1999; Howden et al., 1995), zum Anderen zeigten Studien, dass eine alleinige Synthese von PC's zu keiner spezifischen Metalltoleranz führt (Ebbs et al., 2002; de Knecht et al., 1994; Grill et al., 1988). In zahlreichen Moosarten ist die Bildung von PC's als Reaktion auf Schwermetalle nicht nachzuweisen. In diesem Fall deutet der erhöhte GSH-Gehalt auf einen alternativen Detoxifikationsweg (Bruns et al., 2001). Nach Cobbett (2000a) sind Phytochelatine eher für die Homöostase essentieller Metallionen verantwortlich als für die Detoxifikation toxischer Metallionenkonzentrationen.

1.2.2.3 Freie Aminosäuren

Die Reaktivität der Schwermetallionen im Zytoplasma setzt deren kontinuierliche Chelation zur Vermeidung von physiologischen Schäden voraus. Neben den genannten

Liganden besitzen Pflanzen noch weitere Metallpuffersysteme. Die Carboxyl- und Aminogruppen freier Aminosäuren stellen aufgrund der Reaktivität von Übergangsmetallen gegenüber Sauerstoff und Stickstoff potentielle Liganden für Schwermetalle dar (Clemens, 2001).

Die Rolle der freien Aminosäuren in der Schwermetallhomöostase liegt im Transport von Metallionen innerhalb des Xylem und Phloem sowie im zytoplasmatischen Transport von z.B. Ni(II)-Ionen zum Tonoplasten (Clemens, 2001; Krämer et al., 2000). Histidin stellt im Xylemsaft von *Yucca* (Mullins et al., 1986) und *Alyssum lesbiacum* (Krämer et al., 1996) den Hauptliganden für Cu bzw. Ni(II) dar. Im Phloemsaft ist die Komplexbildung von Cu und Zn(II) an Asparagin, Glutamin und Tyrosin in *Yucca* nachgewiesen (Mullins et al., 1986). Aber auch die Bindung von Ni(II) an Glutamin ist möglich (Krämer et al., 1996). Über Bindungskonstanten der potentiellen Liganden ist nur wenig bekannt (Clemens, 2001). Aussagen zu Bindungsaffinitäten gibt es hinsichtlich einer Konkurrenzsituation bei Schwermetallgemischen. So führen erhöhte Zn(II)-Konzentrationen im Xylem zur verstärkten Bindung der Cu-Ionen an Histidin statt an Asparagin, dass wiederum vorrangig die Zn(II)-Ionen komplexiert (Mullins et al., 1986). Nach Rauser (1999) variiert die Bindung in Abhängigkeit der stofflichen Zusammensetzung des Xylem- und Phloemsaftes und der Konzentration der Schwermetallionen. Weiterhin ist die Stabilität des Komplexes abhängig vom pH-Wert des jeweiligen Kompartimentes. So ist die Histidin-Ni(II)-Bindung bei pH-Werten von 7,5 besonders stabil, während der Imidazol-Stickstoff bei einem pH-Wert um 5,5 protoniert vorliegt. Folglich werden Ni(II)-Ionen im Zytoplasma stabil durch Histidin gebunden, während in der Vakuole Zitrat als Ligand operiert (Krämer et al., 2000).

1.2.2.4 Organische Säuren

Die Bedeutung der organischen Säuren in der Schwermetalldetoxifikation basiert auf der Chelatierung von Metallionen durch ihre Carboxylgruppen.

Die Exudation von organischen Säuren wie z.B. Maleinsäure, Oxalsäure oder Zitronensäure aus dem Apikalmeristem der Pflanzenwurzeln dient nicht nur zur Mobilisierung von schwerlöslichen Fe(III)-Verbindungen, sondern kann auch zur Chelatierung löslicher Metallionen und damit zur verminderten Aufnahme in den Symplasten zahlreicher Pflanzen beitragen. Dieser Mechanismus spielt insbesondere in der Al-Detoxifikation eine Rolle. Organische Säuren sind ebenfalls an der vakuolären Sequestration von Schwermetallionen beteiligt. Die gebildeten Komplexe zeichnen sich durch eine hohe Stabilität im pH-Wert Bereich < 5 aus (Ma, 2000).

Untersuchungen zu Toleranzmechanismen an den Ni(II)- bzw. Zn(II)-Hyperakkumulatoren *Thlaspi goesingense* und *Thlaspi caerulescens* wiesen die vakuoläre Komplexierung von Ni(II) an Zitrat (Krämer et al., 2000) bzw. Zitrat und Oxalat nach (Salt et al., 1999). In Ni(II)-Hyperakkumulatoren führt die Ni(II)-Belastung zur signifikanten Erhöhung der Zitratkonzentration (Lee et al., 1977). Zitrat dominiert auch als Cu- und Cd(II)-Hauptligand bei pH-Werten zwischen 4,0-7,0 vor Malat und Oxalat (Mullins et al., 1986). Eine Zn(II)-Belastung führt in einigen Pflanzen zu einem signifikanten Anstieg der Zitratkonzentration in der Vakuole (Godbold et al., 1984). Die Funktion als zytoplasmatischer Metallionentransporter wird diskutiert (Wang et al., 1991).

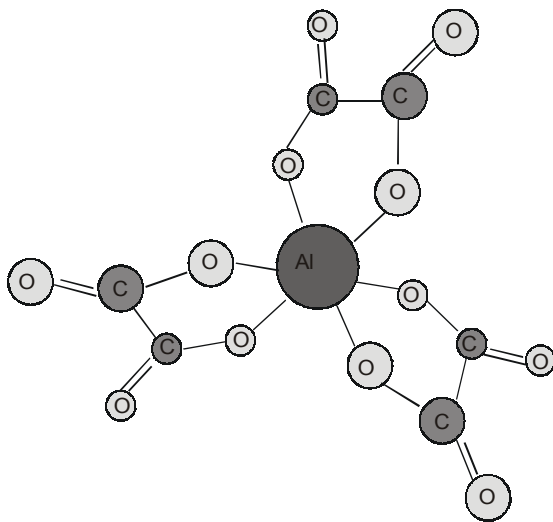


Abb. 3: Strukturmodell des Al-Oxalat-Komplexes. Al ist mit den Carboxylgruppen aus drei Molekülen Oxalsäure koordiniert (Ma, 2000).

Nachgewiesen ist die vakuoläre Bindung von Al an Zitrat (1:1) und Oxalat (1:3; Abb. 3) in *Hydrangea* bzw. *Fagopyrum* (Ma et al., 1997, 1998). Weiterhin besitzt Oxalat eine große Bedeutung als effektiver Zn(II)-Chelator oxalatreicher Spezies (Wang et al., 1991). Insgesamt beeinflussen die organischen Säuren die Homöostase und Sequestration der Schwermetallionen. Eine Korrelation zwischen der Konzentration einer organischen Säure und einer Metallbelastung, im Sinne eines spezifischen Toleranzmechanismus, ist bislang aber nicht eindeutig bewiesen (Clemens, 2001; Rauser, 2000).

1.2.2.5 Phenole

Phenolische Substanzen, die zur großen Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe gezählt werden, tragen an einem aromatischen Ringsystem mindestens eine Hydroxylgruppe oder deren funktionelle Derivate. Sie sind im Pflanzenreich weit verbreitet und in der Regel im Zellsaft gelöst und liegen als Glykoside vor. Pflanzliche Phenole werden anhand ihrer Grundstruktur in einfache Phenole (z.B. Cumarsäure), Phenolkarbonsäuren (z.B. Gallussäure), Phenylpropane (z.B. Zimtsäure, Cumarine, Lignin) und in Flavonoide (z.B. Flavonole, Flavone) unterteilt. Sie wirken als Fraßhemmer, allelopathische Substanzen und Lockstoffe. Ihre Funktion als anti-Oxidantien im Schutz vor freien Radikalen basiert auf der reduzierenden Wirkung als Wasserstoff- oder Elektronendonator und/oder der Wirkung als Metallchelator. In diesem Sinne ist ihre Aktivität abhängig vom Reduktionspotential und der Fähigkeit zur Chelatierung von Metallionen (Brown et al., 1998; Rice-Evans et al., 1997). Für die Chelatierung ist das Vorliegen einer Katecholstruktur, d.h. die ortho 3',4'-Dihydroxy-Substitution (Abb. 4/A), essentiell (Brown et al., 1998). Seltener erfolgt die Bindung der Ionen durch die Ketongruppe des C-Ringes bzw. der 5-Hydroxylgruppe (Slabbert, 1992; Abb. 4/B).

Die komplexe Regulation der Biosynthese erfolgt in Abhängigkeit zahlreicher biotischer und abiotischer Faktoren (Dixon und Paiva, 1995). Studien zur Induktion anti-oxidativer, phenolischer Verbindungen wiesen eine Akkumulation löslicher Phenole z.B. in *Lycopersicon* infolge Kälte- und Hitzestress nach (Rivero et al., 2001). Als Schwermetallstressantwort ist eine verstärkte Synthese von Umbelliferon beschrieben

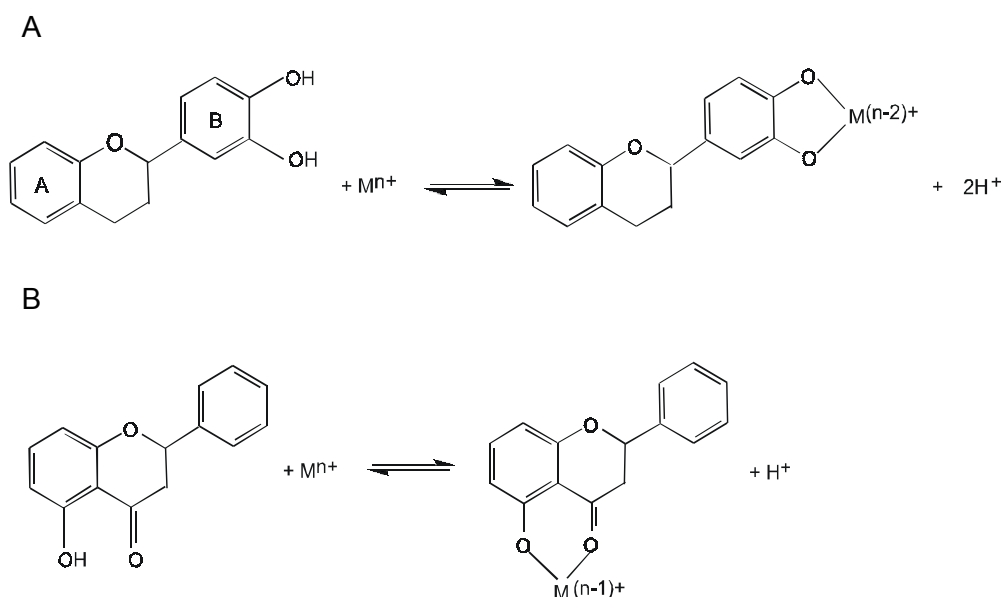


Abb. 4: Die Bildung von Metall-Flavonoid-Komplexen nach Slabbert (1992).

(Repcak et al., 2001) bzw. die Erhöhung des Polymerisierungsgrades von Polyphenolen der Zellwände nachgewiesen (Lavid et al., 2001a). Das Polyphenole in der Lage sind Schwermetallionen zu komplexieren, wurde in *in-vivo*-Untersuchungen bestätigt (Lavid et al., 2001b; Rice-Evans et al., 1996).

1.2.3 Die Rolle der Hitzeschockproteine und Cyclophiline

Hitzeschockproteine sind ubiquitär verbreitet und werden entsprechend ihres Molekulargewichtes klassifiziert. Spezifisch für Pflanzen sind die sHSP's (small heat shock proteins), die im Zytoplasma, im Endoplasmatischen Reticulum, in Mitochondrien und in Chloroplasten lokalisiert sind (Wehmeyer und Vierling, 2000). Die Regulation der Genexpression wird entwicklungspezifisch aber auch durch eine Reihe von Stressfaktoren, wie z.B. Hitze, Kälte, osmotischen und oxidativen Stress, Wasser-, UV- und Schwermetallstress, beeinflusst (Lewis et al., 1999; Wehmeyer und Vierling, 2000). Die Proteine operieren als molekulare Faltungshelfer. Ihre Bindung an Polypeptidketten verhindert die unspezifische Aggregation schwach bindender Seitenketten, steuert inter- und intramolekulare Faltungen. Unter physiologischen Stressbedingungen binden HSP's und sHSP's *in-vitro* partiell denaturierte Proteine, ein Schutz vor der Degradation und katalysieren ATP-abhängig die Rückfaltung in die native Struktur (Lee et al., 1997; Schröder et al., 1993).

Unter Schwermetallstress bilden Vertreter der sHSP-Familie in zytoplasmatischen Hitzeschockgranula mRNA-Protein-Komplexe, die die schnelle Reaktivierung der mRNA essentieller Proteine, wie z.B. kurzlebige Membranproteine, schon während des Stressgeschehens ermöglichen (Neumann et al., 1994; Nover, 1991). HSP 70-Proteine binden unter Cd(II)-Belastung Proteine der Plasmamembran. Dies deutet auf eine Rolle als Faltungshelfer für denaturierte Proteine unter Schwermetallstress hin (Neumann et al., 1994). Nach Prasad (1997) stellt die Synthese der HSP's unter Schwermetallstress einen multiplen Schutzmechanismus auf zellulärer und molekularer Ebene dar.

Eine weitere stressinduzierbare Proteingruppe, die eine essentielle Rolle bei der Faltung nativer Proteine spielen, sind die Cyclophiline. Diese Proteine besitzen eine PPIase-Aktivität (Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase-Aktivität) und katalysieren die cis-trans-Konformation der Prolinreste während der Proteinfaltung in Plastiden und im Zytosol (Saito, 1995). Cyclophiline sind daher in der *de-novo*-Proteinfaltung involviert (Stoller, 1995), aber auch am membranen Proteintransport beteiligt (Schmid, 1995).

Sowohl Kältestress als auch hormoneller- und osmotischer Stress induzieren die Synthese (Küllertz et al., 1999). Weiterhin führen Hitze- und Schwermetallstress zur Akkumulation von Cyclophilin-mRNA (Marivet et al., 1992; Luan et al., 1994). Die spezifische Funktion der Cyclophiline in einer Schwermetallstressantwort ist bislang noch nicht geklärt.

1.3 *Fontinalis antipyretica*: Im Dienste der Schwermetallstressforschung

Frühere Untersuchungen zeigten, dass aquatische Moose sich sehr gut als Bioindikatoren eignen. Diese Eigenschaft basiert auf der Tatsache, dass die Wasser- und Nährstoffaufnahme submerser Moose über die gesamte Blattoberfläche erfolgt (Frahm, 1998). Zahlreiche Untersuchungen zum passiven und aktiven Biomonitoring sowie Laborversuche lieferten Informationen zu Kinetiken der Schwermetallaufnahme (Lopez et al., 1994), zur pH-Wert-abhängigen Metallakkumulation und dem resultierenden Ionenefflux (Vazquez et al., 2000) und ermittelten eine hohe Schwermetallakkumulationsleistung von *Fontinalis antipyretica* an Standorten in Abhängigkeit der Metallionenkonzentration und der Wasserqualität (Bruns et al., 2000a; Cenci, 2000; Bruns und Krauß, 1999; Samecka-Cymerman und Kempers, 1999) bzw. unter Laborbedingungen (Sutter, 2000). Die kompetitive Hemmung der schnellen Zellwandadsorption der Schwermetallionen durch Mg(II)- und Ca(II)-Ionen wiesen Gagnon et al. (1998) nach.

Die intrazelluläre Kompartimentierung aufgenommener Cd(II)-Ionen erfolgt hauptsächlich in der Vakuole, gebunden an anorganischem Phosphat. Im Zytoplasma werden Cd(II)-Ionen dagegen an SH-Gruppen komplexiert (Bruns et al., 2001).

Physiologische Untersuchungen hinsichtlich der Toxizität von Schwermetallen auf den essentiellen Stickstoffmetabolismus zeigten eine metall- und konzentrationsabhängige Reduktion der Aminosäure- und Proteinbiosynthese (Sutter et al., 2001).

Die biochemischen Mechanismen der Metalltoleranz sind bislang noch unklar. Im Gegensatz zu höheren Pflanzen reagiert *Fontinalis antipyretica* sowie zahlreiche Bryophyten auf Schwermetallstress nicht mit der Synthese von Phytochelatinen. In Abhängigkeit der Inkubationszeit, der Konzentration und Schwermetallspezies wurden erhöhte GSH-Konzentrationen nachgewiesen (Bruns et al., 2001). Insgesamt wird die Rolle des GSH hinsichtlich der intrazellulären Schwermetalldetoxifikation im Zytoplasma

favorisiert (Bruns et al., 2001). Die Bedeutung weiterer intrazellulärer Metallchelatoren in der Regulierung der Schwermetallhomöostase bleibt zu klären.

1.4 Zielstellung

Weiterführend zu den bisherigen Studien über die Mechanismen der Regulierung toxischer Schwermetallionenkonzentrationen, soll die physiologisch-biochemische Charakterisierung der Schwermetallwirkung auf proteinchemischer, zellulärer, physiologischer und genomischer Ebene Ziel dieser Arbeit sein. Untersuchungen zum Einfluss von Cu(II), Cd(II), Pb(II) und Zn(II) auf die Vitalität des Quellmooses anhand von Chlorophyllfluoreszenzmessungen lieferten für weitere Experimente grundlegende Aussagen zur konzentrations- und zeitabhängigen Toxizität. Ausschlaggebend für die elementspezifische Wirkung der Schwermetalle ist auch deren intrazellulärer Gehalt. In diesem Zusammenhang wurden Untersuchungen zum intrazellulären Aufnahmeverhalten von Cu(II), Cd(II), Pb(II) und Zn(II) durchgeführt. Da die zelluläre Kompartimentierung von Metallionen einen wesentlichen Schutz vor toxischen Metallionenkonzentrationen im Zytoplasma darstellt, erfolgte die Bestimmung der zellulären Lokalisation und Komplexierung von Cu unter Nutzung der analytischen Elektronenmikroskopie.

Aussagen zur Regulation der Schwermetalltoleranz und -homöostase bedingen komplexe Informationen über die Wechselwirkungen der Schwermetallionen mit metallchelatierenden Verbindungen. Deshalb wurde der Einfluss der Schwermetalle auf freie Aminosäuren, organische Säuren sowie phenolische Verbindungen ermittelt. Eine wesentliche Funktion zur Regulierung der intrazellulären Schwermetallkonzentration besitzen schwermetallbindende Proteine. Der thematische Schwerpunkt lag daher auf der Isolierung und Identifizierung schwermetallinduzierbarer, cysteinreicher Proteine im niederen Molekulargewichtsbereich, wie z.B. der Metallothioneine. Dies beinhaltete die Anwendung immunologischer Methoden nach der ein- und zweidimensionalen Proteintrennung sowie der Metallchelat- und kovalenten Affinitätschromatographie. Weiterhin bestand das Anliegen dieser Arbeit in ersten Untersuchungen, das genetische Potential des Quellmooses hinsichtlich Metallothionein-ähnlicher Gene zu prüfen und deren Transkriptionsregulation zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial und Kultivierungsbedingungen

2.1.1 *Fontinalis antipyretica* Hedw.

Der Botaniker Johann Hedwig (1730-1799) beschrieb zum ersten Mal das flutende Quellmoos. Die Namensgebung (fons (lat.) = Quelle; anti (griech.) = gegen; pyr (griech.) = Feuer) erfolgte in Anlehnung an das Vorkommen in Quellen und Brunnen sowie die frühere Verwendung als Brandschutz beim Hausbau (Schubert und Wagner, 1988; Richardson, 1981). Die nach Shaw und Goffinet (2000) getroffene taxonomische Einordnung wird wie folgt beschrieben:

Abteilung: Bryophyta
 Klasse: Bryopsida
 Unterklasse: Bryidae
 Ordnung: Hypnales
 Familie: Fontinalaceae
 Gattung: *Fontinalis*
 Art: *antipyretica*.



Die mit weltweit 35 Arten beschriebene Gattung *Fontinalis* kommt in der Nordhemisphäre mit vier Arten vor (Frahm und Frey, 1987). *Fontinalis antipyretica* (Quellmoos) bildet in fließenden Gewässern dichte, dunkelgrüne Rasen bis zu 40 cm Länge. Als Hydrophyt besitzt es kein ausgebildetes inneres Leitsystem, die Wasser- und Stoffaufnahme erfolgt über die gesamte Blattoberfläche. Der Gametohpyt zeigt scharf gekielte Blätter, die dreireihig an den reich verzweigten Stämmchen sitzen. Die ganzrandigen Blättchen besitzen keine Mittelrippe und bestehen aus einer einzigen Schicht prosenchymatischer Zellen. Die Rhizoide an der Stämmchenbasis verankern das Moos an Steinen und Ästen. Die bevorzugte Wassertemperatur liegt unter 15 °C, so dass die Biomasse hauptsächlich in den Wintermonaten gebildet wird. Während dieser Zeit kann auch die Sporenbildung

beobachtet werden. Das zweihäusige, pleurokarpe Moos bildet auf einer kurzen Seta kleine, ovale, braun-rote Sporenkapseln mit doppeltem Peristom (Sporophyt). Die Vermehrung erfolgt jedoch vorwiegend vegetativ über abgetrennte Sprosssteile. Die Arten der Gattung *Fontinalis* variieren stark in ihrer Morphologie und sind daher taxonomisch schwer zu differenzieren. Aufgrund seiner breiten ökologischen Standortamplitude wird es zu den euryöken Moosen gezählt. Es sind Vorkommen aus klaren, oligotrophen bis mesotrophen, neutralen bis kalkreichen Fließgewässern beschrieben. Als bevorzugter Untergrund gilt ein steiniges Kiesbett (Nebel und Philippi, 2000). Von Aichele und Schwegler (1967) werden auch Seen bis zu 18 m Tiefe als Standorte beschrieben. Das überwiegend submerse Moos übersteht gelegentliches Trockenfallen des Standortes problemlos.

2.1.2 Standort und Probennahme

Als Standort für die Probennahme wurde ein Teil des Helbe-Oberlaufes an der Steinbrücke in der Nähe Dietenborn/Kyffhäuserkreis (Messtischblatt 4629/2 der Hainleite, Thüringisches Landesvermessungsamt Erfurt, 1996) gewählt. Die Helbe durchfließt im Norden Thüringens in südöstlicher Richtung das Landschaftsschutzgebiet Helbetal und mündet in die Unstrut. *Fontinalis antipyretica* zeigt an diesem Standort ganzjährig ein hohes Vorkommen. Als typischer Karstfluss wird das Untergrundgestein von Muschelkalk mit hohen Anteilen an Mergeln und Tonen gebildet. Die relative Ionenkonzentration setzt sich zu zwei Drittel aus Kalzium-, Sulfat-, Hydrogencarbonat- und Magnesiumionen zusammen. Der pH-Wert liegt mit 7,2 im neutralen Bereich, die Jahresmitteltemperatur bei 9,5 °C (Busse, 1997). Nach Angaben der Thüringer Landesanstalt für Umwelt ist die Helbe (1997-2001) im Bereich der Probensammelstelle als unbelastetes Fließgewässer einzustufen. Aufgrund der hohen HCO₃-Konzentration liegt die Wasserhärte bei 17° dH (siehe auch Anhang Tab. 1). Das Moosmaterial wurde in wassergefüllten Kunststoffwannen gegebenenfalls auf Eis transportiert und über Nacht bei 4 °C in Wasser gelagert.

2.1.3 Kultivierung

Einen Tag nach der Probennahme erfolgte die Aufarbeitung des Pflanzenmaterials. Dazu wurde das Moos mehrmals in bidestilliertem Wasser gewaschen und vitale Pflanzen ausgelesen. Verwendet wurden etwa 2 cm lange Teilstücke der grünen Triebspitzen. Die Kultivierung erfolgte in Erlenmeyerkolben mit verdünntem Knop-Medium bei einem

pH-Wert von 6,5-7,0 (Schopfer; 1986). Zur Vermeidung von Algenwachstum während der Kultivierung wurde, wie in Bruns et al. (1995) beschrieben, das Medium 1:10 verdünnt und der Stickstoff- und Phosphatanteil auf 33 % reduziert. Das Medium setzte sich aus $\text{CaNO}_3 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ (0,033 g/l), KCl (0,012 g/l), KH_2PO_4 (0,0083 g/l), KNO_3 (0,0083 g/l), $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ (0,025 g/l) sowie ca. 25 μl einer gesättigten FeCl_3 -Lösung zusammen.

Die Wahl der Weithals-Erlenmeyerkolben richtete sich nach der eingesetzten FM bzw. nach dem Volumen des Mediums. Je nach Versuchsansatz wurden 2 g FM mit 200 ml Medium in 300 ml-Kolben bzw. 3 g FM mit 300 ml Medium in 500 ml-Kolben inkubiert. Entsprechend den natürlichen Wachstumsbedingungen erfolgte die Kultivierung bei 10 °C. Belichtet wurde automatisch 12 h pro Tag mit ca. 40 kLux. Zur Gewährleistung einer homogenen Probenmischung und zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung des Pflanzenmaterials wurden die Versuchskolben bei ca. 120 rpm geschüttelt. Eine 24-stündige Konditionierung unter den oben genannten Bedingungen ging allen Experimenten voraus, mit Ausnahme der Proben K frisch, die direkt nach der Probennahme eingesetzt wurden.

2.1.4 Schwermetallzugabe

Die Schwermetalle Kupfer, Cadmium, Blei und Zink wurden in Form von gelösten Chloridsalzen direkt dem Knop-Medium nach der Konditionierung zugegeben. Folgende Me(II)-Konzentrationen wurden in Kurzzeit- (4 h) und Langzeitversuchen (1 d, 3 d, 5 d, 7 d) eingesetzt: 25 μM , 50 μM und 100 μM .

2.1.5 Hitzestress

Entsprechend den natürlichen Wachstumsbedingungen des Moores wurde die Temperatur für den Hitzestress auf 20 °C und 30 °C, die der Kontrollen (K) auf 10 °C festgelegt. Die Proben wurden unter diesen Temperaturen wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben kultiviert. Als Versuchszeiträume wurden vier Stunden, ein Tag und drei Tage gewählt.

2.2. Messung der Chlorophyllfluoreszenz

Die sensitive Indikation eines möglichen Vitalitätsverlustes des Moores infolge der Schwermetallexposition basierte auf der Messung der Chlorophyllfluoreszenzkinetik. Das Fluoreszenzsignal ist zu etwa 95 % auf das Chlorophyll a, das an das Photosystem II (PS II) gebunden ist, zurückzuführen (Krause und Weis, 1991; Buschmann, 1986). Angeregte Chlorophyll-a-Moleküle geben *in vivo* beim Übergang vom ersten Singulettzustand S_1 in den Grundzustand S_0 3-6 % der absorbierten Lichtenergie in Form von Fluoreszenz ab. Nach Kautsky et al. (1960) zeigen dunkel adaptierte Blätter, die mit aktinischem Licht bestrahlt werden, eine typische Fluoreszenz- oder Induktionskinetik (Kautsky-Effekt), die das Zusammenwirken der einzelnen PS II-Komponenten bei der Elektronenübertragung widerspiegelt und in prompter und verzögerter Fluoreszenz gegliedert wird. Eine direkte oder indirekte Schädigung des Photosyntheseapparates führt aufgrund gestörter Elektronentransportprozesse zu einer veränderten Fluoreszenzkinetik sowie zu einem Anstieg der Fluoreszenz (Lichtenthaler und Miesch, 1997; Buschmann, 1986). Die enge Beziehung zwischen Photosyntheseleistung und Vitalität ermöglicht somit die Indikation physiologischer Veränderungen mittels Chlorophyllfluoreszenz (Lichtenthaler et al., 1998).

Die impulsmodulierten Lichtmessungen am Mini-PAM-Fluorimeter (Heinz Walz GmbH, Effeltrich) basierten auf der Messung des Kautsky-Effektes und erlaubten den Nachweis selektiver Parameter der prompten Chlorophyllfluoreszenzkinetik (Abb. 5). Diese bildeten die Grundlage zur Kalkulation der effektiven Quantenausbeute der photochemischen Energieumwandlung des PS II, dem Genty-Parameter (Genty et al., 1989).

Für die Messungen wurden Blattspitzen schwermetallbelasteter Proben und unbelasteter Kontrollen verwendet. Pro Probe wurden fünf parallele Messungen durchgeführt. Die Dunkeladaptation erfolgte 30 min bei 4 °C. Die Anregung und Bestimmung der Fluoreszenz erfolgte stets auf der Blattoberseite bei Raumtemperatur. Für die Detektion der Grundfluoreszenz (F_0) wurden die Blattproben mit gepulstem Schwachlicht (650 nm; $0,15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR) bestrahlt. Als Grundfluoreszenz bezeichnet man eine konstante Fluoreszenz, die unabhängig von der photosynthetischen Aktivität gemessen werden kann und die die Fluoreszenzemission der Chlorophyll-a-Moleküle in den Antennensystemen des PS II darstellt, noch ehe Lichtenergie auf die Reaktionszentren übertragen wird (Buschmann, 1986).

Für die Aufnahme der schnellen Fluoreszenzkinetik wurde aktinisches Licht ($6.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR) mit einem Sättigungsimpuls ($18.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR) verwendet. Die dabei gemessene variable Fluoreszenz (F_v) spiegelt den Anstieg der

Fluoreszenz bis zum Maximalwert (F_M) in Abhängigkeit der photosynthetischen Aktivität wider. Der Genty-Parameter liegt unabhängig der Spezies zwischen 0 (minimale Vitalität) und 1 (maximale Vitalität), bei gesunden Pflanzen zwischen 0,80 und 0,84 (www.ab.ipw.agrl.ethz.ch).

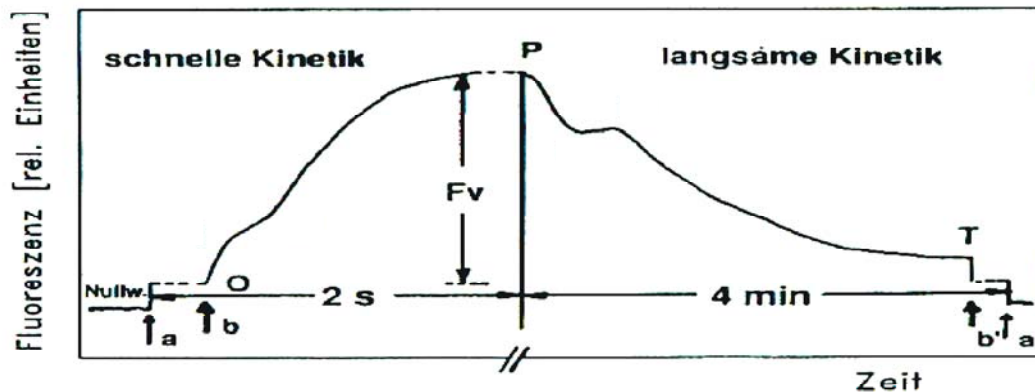


Abb. 5: Induktionskinetik der prompten Chlorophyllfluoreszenz eines Blattes nach Dunkeladaption (Buschmann, 1986). Messung mit einem PAM-Fluorimeter (Heinz Walz GmbH). $O = F_0 =$ Grundfluoreszenz, $P = F_M =$ maximale Fluoreszenz, $F_V =$ variable Fluoreszenz, $T =$ stationäre Fluoreszenz bei konstant ablaufender Photosynthese, $a/a' =$ An- bzw. Ausschalten des Messlichtes, $b/b' =$ An- bzw. Ausschalten des arktinischen Lichtes. Genty-Parameter: F_V/F_M .

2.3 Bestimmung des intrazellulären Schwermetallgehaltes

2.3.1 Probenvorbereitung

Das geerntete Moos wurde mehrmals mit bidest. H_2O gespült. Anschließend erfolgte der Austausch der an der Zellwand adsorbierten Schwermetallionen durch Ni(II)-Ionen (Brown und Wells, 1988). Das Material wurde dazu 3 x 30 min in je 200 ml 20 mM $NiCl_2$ gewaschen, bei 80 °C über Nacht getrocknet und in Polyethylenflaschen bis zum Aufschluss bei 4 °C aufbewahrt.

2.3.2 Aufschluss des Pflanzenmaterials

Die trockenen Moosproben wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und zu jeweils 50 mg in spezielle Teflongefäße (Lined Digestion Vessels, Fa. CEM, Kamp-Lintfort) eingewogen. Nach Zugabe von je 4 ml HNO₃ (65%ig, suprapur) und 2 ml H₂O₂ (Perhydrol, 30%ig) erfolgte der Mikrowellenaufschluss (Fa. CEM, MDS 2100) nach einer modifizierten Methode nach Bruns et al. (1995). In einem Dreistufenprogramm wurde dabei die Geräteleistung von 25 % über 70 % bis 90 % erhöht. Der Druck-Sollwert wurde für die jeweiligen Stufen wie folgt festgelegt: 1,30 bar, 6,95 bar und 8,33 bar. In der Stufe 1 lag eine Temperatur von 20 °C vor, die in Stufe 2 und 3 auf 180 °C anstieg. Die Sollparameter wurden in Stufe 1 und 2 jeweils 1 min und in Stufe 3 10 min gehalten. Die Gesamtdauer der einzelnen Stufen belief sich auf 10 min, 20 min bzw. 20 min. Das abgekühlte, aufgeschlossene Material wurde mit bidest. H₂O auf 50 ml aufgefüllt und in Polyethylenflaschen bei 4 °C gelagert.

2.3.3 Schwermetallanalytik mittels Flammen-AAS

Die Analyse der intrazellulären Schwermetallgehalte in den Moosproben wurde mit einem Flammen-Atomabsorptionsspektrometer (ATI UNICAM 929, Fa. Solar) durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte im Konzentrationsbereich von 5-100 µg/l Me(II)-Ion. Die Nachweisgrenzen für die Schwermetalle Kupfer, Blei, Zink und Cadmium in wässriger Phase lagen bei 0,16 µmol/l; 0,24 µmol/l; 0,08 µmol/l bzw. 0,09 µmol/l.

2.4 Analytische Elektronenmikroskopie

Die energiedispersive Röntgenmikroanalyse sowie die Elektronen-Energie-Verlust-Spektroskopie an Blättern von *Fontinalis antipyretica* wurde am IPB Halle/Saale von Herrn Dr. D. Neumann durchgeführt.

Die EDX-Technik (energy dispersive X-ray analysis) lieferte Aussagen zur intrazellulären Elementzusammensetzung verschiedener Zellkompartimente. Bei diesem Verfahren wird die zu untersuchende Probe mit energiereichen Elektronen bestrahlt. Diese Primärelektronen stoßen Elektronen aus kernnahen Energieniveaus der Probenatome heraus. Die entstehende Lücke füllen Elektronen höherer Energieniveaus, wobei elementspezifische Röntgenstrahlung als Energiedifferenz emittiert wird.

Die Bestimmung von Bindungszuständen ausgewählter Elemente im subzellulären Raum ermöglichte die EEL-Spektroskopie (electron energy loss spectroscopy). Hierbei wird der elementspezifische Energieverlust inelastisch gestreuter Elektronen, der nach Wechselwirkung energiereicher Elektronen mit der Elektronenhülle des Probenatoms entsteht, gemessen. Die kantennahe Feinstruktur der Spektren gibt Aussagen über den Bindungszustand des entsprechenden Atoms.

Die EEL-Spektren wurden von 50 nm dicken Ultradünnschnitten mit einer SIT TV-Kamera aufgenommen und nach Subtraktion des Hintergrundes (Evision-System, SYS) mit Standardspektren bzw. quantenchemischen Berechnungen (Dichte-Funktions-Theorie, DFT, Dr. O. Lichtenberger, Max-Planck-Institut für Mikrostrukturphysik Halle/Saale) verglichen.

Die Präparation der Proben erfolgte nach Neumann et al. (1995). Das Blattmaterial wurde mit flüssigem Propan eingefroren (JDF 030, Balzers), in Aceton gefriersubstituiert (CS auto, Leica) und anschließend in Epoxidharz eingebettet. Die Analysen wurden am Transmissions-Elektronenmikroskop EM 912 OMEGA (Zeiss), ausgerüstet mit einem Energiefilter (OMEGA-Filter, Zeiss) und einem EDX-Analyser (Link, Oxford Instruments), durchgeführt.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Proteinextraktion

Zur Isolierung der Proteinfraction wurde vom Standort entnommenes oder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagertes Material verwendet. Die Proben wurden unter flüssigem Stickstoff homogen gemörsert und in Extraktionspuffer (25 mM Tris/HCl, pH-Wert 7,5; 3 mM EDTA; 10 mM DTT; 0,2 % (w/v) PMSF) im Verhältnis 1:2 (w/v) aufgenommen. Alle Arbeiten wurden auf Eis ausgeführt bzw. Mörser und frisch hergestellte Puffer vorgekühlt. Im Anschluss erfolgte die Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 10.000 g, 10 min und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (K24 D, Zentrifugenbau Engelsdorf). Das Volumen des Extraktes wurde bestimmt und $3 \times 50\text{ }\mu\text{l}$ für die Proteinbestimmung entnommen. Die Proteinfraction wurde mit $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Aceton im Verhältnis 1:5 für mindestens 1 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (5.000 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min, Hettich Universal 30 RF, Tuttlingen) wurde das Proteinpellet bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet und gelagert.

2.5.2 Hitzefällung

Zur Isolierung hitzestabiler Proteine wurden die Proben in Anlehnung an McCormick et al. (1991) in flüssigem Stickstoff gemörsert, in Zentrifugenröhrchen überführt und etwa 4 min auf Raumtemperatur erwärmt. Nach Zugabe von 10 ml Extraktionspuffer (25 mM Tris/HCl, pH-Wert 7,5; 3 mM EDTA; 10 mM DTT; 0,2 % (w/v) PMSF) wurden die Proben nach 3-5-maligem Mischen (Vortex-Mixer) für 15 min auf Eis inkubiert. Der zentrifugierte Überstand (100.000 g; 1 h; 4 °C; Ultrazentrifuge Beckmann L8-60M, München) wurde mit flüssigem Stickstoff versetzt und die Proteine bei 75 °C für 15 min im Schüttelbad gefällt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (100.000 g; 30 min; 4 °C; Ultrazentrifuge Beckmann L8-60M) konnten die Proteine, wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben, gefällt werden.

2.5.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen nach Lowry et al. (1951) wurden wie folgt durchgeführt: Das Proteinextrakt (50 µl) wurde mit 2 ml 5%iger TCA mindestens 1 h bei 4 °C gefällt und im Anschluss an die Zentrifugation (5.000 g, 10 min, 4 °C, Hettich Universal 30 RF) in 50 µl 1 N NaOH gelöst. Nach Zugabe von 0,5 ml einer Lösung aus 0,5 ml Lösung A (1 % (w/v) CuSO₄ und 2 % (w/v) Na/K-Tartrat, 1:1 (v/v) gemischt) und 25 ml der Lösung B (2 % (w/v) Na₂CO₃) wurde der Ansatz 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 1,0 ml bidest. H₂O und 50 µl Folin-Coicalteau-Reagenz versetzt. Die Bestimmung der Absorption erfolgte nach 30 min bei einer Wellenlänge von 578 nm (Fotometer, Hitachi 1100). Als Blindwert wurden 50 µl NaOH eingesetzt und wie oben beschrieben behandelt. Die Proteinkonzentrationen wurden anhand eines Vergleiches einer Eichgeraden von Rinderserumalbumin im Bereich von 10-100 µg RSA/100 µl 1 N NaOH ermittelt.

2.5.4 Reduktive Carboxymethylierung von Proteinen

Um Aggregationen cysteinreicher Proteine vorzubeugen, wurden die Sulfhydrylgruppen entsprechender Proteine modifiziert. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Carboxymethylierung reduzierter SH-Gruppen durch Iodacetamid unter Bildung von S-Carboxamidomethylcystein. Die so modifizierten Cysteinreste sind stabil und irreversibel reduziert. Es wurden 10 µg Protein in 5 µl Puffer (0,2 M Tris/HCl, pH-Wert 8,8; 8 % (w/v) SDS; 50 % (v/v) Glycerol und 2 µl 0,2 M DTT) gelöst und für 5 min gekocht. Zu

den abgekühlten Proben wurden 3 µl 1 M Iodacetamidlösung (pH-Wert 8,0) gegeben und für 15 min bei 50 °C inkubiert.

2.5.5 Elektrophoretische Methoden

2.5.5.1 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Probenvorbereitung wurde das Proteinpellet in denaturierendem Probenpuffer (0,06 M Tris/HCl, pH-Wert 6,8; 10 % (v/v) Glycerol; 2 % (w/v) SDS und 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol) mit einer Konzentration von 2 µg/µl aufgenommen, 2 min bei 95 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt und gegebenenfalls zentrifugiert (5.000 g; 10 min; 4 °C; Hettich Universal 30 RF). Durch Zugabe von Bromphenolblau wurde die Lauffront markiert. Die analytische Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes erfolgte in einem vertikalen Gelelektrophoresesystem (Biometra, Göttingen). Die Mini-Gradientengele (10-20 % Tris/Tricin) mit einer Laufstrecke von 6 cm und einer Dicke von 1 mm wurden nach dem Protokoll von Sambrook (1989) mittels Gradientenmischkammer hergestellt. Um eine gute Auflösung kleinerer Proteine (< 15 kDa) zu erreichen, wurde das Puffersystem nach der Methode von Schägger und Jagow (1987) angewandt. Je nach Verwendungszweck wurden 10-20 µg Protein pro Spur aufgetragen. Die Konzentrierung der Proben im Sammelgel erfolgte bei 40 V/10 mA, die Proteintrennung im Trenngel bei konstant 150 V/25 mA. Als Molekulargewichtsmarker diente der Wide Range Protein Standard (NOVEX, Frankfurt). Die Proteine markierten einen Molekulargewichtsbereich von 2,5-200 kDa (Insulin A-Kette (2,5 kDa), Insulin B-Kette (3,5 kDa), Aprotinin (6,0 kDa), Lysozym (14,4 kDa), Trypsin-Inhibitor (21,5 kDa), Karbonische Anhydrase (31,0 kDa), Lactat-Dehydrogenase (36,5 kDa), Glutamin-Dehydrogenase (55,4 kDa), Rinderserumalbumin (66,3 kDa), Phosphorylase b (97,4 kDa), β-Galactosidase (116,3 kDa) und Myosin (200,0 kDa)).

2.5.5.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

2.5.5.2.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die Trennung der komplexen Proteingemische entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt erfolgte modifiziert nach der Methode von O'Farrell (1975).

Zur Vorbereitung der isolierten Proteinproben (Kapitel 2.4.1) wurden die Proteinpellets in denaturierendem Lysispuffer (8 M Harnstoff; 0,5 % (v/v) Nonidet P40; 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol und 0,8 % (v/v) Servalyt (pH-Wert 3-10; 40%ig)) in einer Konzentration von 2 µg/µl aufgenommen (Görg, 1991). Des Weiteren wurde Bromphenolblau zugesetzt, um die Migration der Proben aus den Probentrögen während der IEF zu verfolgen. Der Einsatz von 100 µg Protein pro Trennung zeigte optimale Ergebnisse.

Aufgrund ihres hohen Auflösungsvermögens wurden immobilisierte pH-Gradienten-Streifen (IPG-Streifen; pH-Wert 4-7; 7 cm; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) für die IEF eingesetzt. Vor Gebrauch wurden die trockenen Immobilinstreifen 16-18 Stunden in einer entsprechenden Quellkammer bis auf 1 mm Dicke rehydratisiert. Die dazu verwendete Lösung enthielt 8 M Harnstoff sowie 0,5 % (v/v) Nonidet P40 und 20 mM DTT und wurde stets neu hergestellt.

Die horizontale Fokussierung wurde mit der Multiphor II (LKB Bromma) durchgeführt. Die Applikation der Proteinlösungen auf die rehydratisierten IPG-Streifen erfolgte anodisch über spezielle Auftragströge. In Anlehnung an Westermeier (1997) wurden in Vorversuchen unterschiedliche Fokussierungsvarianten getestet. Folgende Methode erwies sich als optimal: Für einen langsamen Probeneintritt wurde die Fokussierung bei 150 V; 0,6 mA und 4 W_{\max} für 1 h gestartet und schrittweise, bei Erreichen von 0,1 mA, bis auf 5.000 V erhöht und nach 40 kWh beendet. Ab einer Spannung von 1.000 V gewährleistete die Wasserkühlung und die Übersichtung der Immobilinstreifen mit Paraffin den Luftabschluss und die Wärmeableitung. Nach beendeter Fokussierung wurden die Gelstreifen zwischen zwei Lagen fusselfreiem Papier vom Paraffin befreit und bis zur Weiterverarbeitung in der zweiten Dimension bei -80 °C gelagert.

2.5.5.2.2 Zweite Dimension: SDS-PAGE

Die Trennung der Proteine entsprechend ihrer Molekulargewichte in der zweiten Dimension erfordert eine vorherige Äquilibrierung. Dabei wurde das denaturierende und reduzierende Milieu aufrechterhalten und die Proteine zur Mizellenbildung mit SDS vernetzt. Um eine mögliche Bildung von Disulfidbrücken zu verhindern, wurden die Proteine alkyliert. Die Äquilibrierung erfolgte modifiziert nach Görg (1991).

Die Immobilinstreifen wurden 15 min in Puffer 1 (1 ml 0,5 M Tris/HCl, pH-Wert 6,8; 8 M Harnstoff; 4 % (w/v) SDS; 30 % (v/v) Glycerin, 1 % (w/v) DTT ad 10 ml bidest. H₂O; Bromphenolblau) und anschließend 2 x für je 15 min in Puffer 2 (Puffer 1 unter Zugabe von 481 mg Iodacetamid) geschüttelt. Die äquilibrierten IPG-Streifen wurden in

Elektrodenpuffer luftblasenfrei auf das Sammelgel des SDS-Gels aufgelegt. Um ein gutes Trennergebnis im niederen Molekulargewichtsbereich zu erhalten, wurde das Puffersystem und die 15%igen SDS-Mini-Gele nach Schägger und Jagow (1987) gefertigt. Die Elektrophoresebedingungen sowie der verwendete Molekulargewichtsmarker entsprachen den in Kapitel 2.5.5.1 beschriebenen Angaben. Im Anschluss erfolgte entweder eine Silberfärbung des Gels (Kap. 2.5.6.2) nach Blum et al. (1987) oder der Proteintransfer (Kap. 2.5.5.3) für immunologische Nachweise.

2.5.5.2.3 Bildverarbeitung

Die silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgele wurden im feuchten Zustand mit einem Scanner digitalisiert und die Proteinspots mit Hilfe einer Testversion der Software MELANIE 3.05g (GeneBio, Geneva Bioinformatics S. A., Genf, Schweiz) analysiert und ausgewertet.

2.5.5.3 Transfer auf NC-Membranen

Grundlage für die Durchführung serologischer Tests ist der Proteintransfer von SDS-Gelen auf Nitrozellulosemembranen (NC-Membran PROTRAN; 0,1 µm; Schleicher und Schüll, Dassel). Als effektivste Methode erwies sich dabei das Semi-Dry-Fast-Blot-Verfahren (Biometra). Der Transferpuffer enthielt 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH-Wert 8,0; 20 % (v/v) Methanol und 0,02 % (v/v) 2-Mercaptoethanol. Nach der Elektrophorese wurden Gel, NC-Folie und Blotpapier 2 min in 4 °C kaltem Transferpuffer getränkt. Zuvor wurde die NC-Membran und das Papier auf Gelgröße geschnitten. Auf die Anode wurden drei Lagen Blotpapier und die NC-Membran übereinandergelegt, auf diese das Gel und abschließend wieder drei Lagen Blotpapier. Die Blotkammer wurde mit der Kathode verschlossen. Der Elektrotransfer erfolgte mit 5 mA pro cm^2 Gel für 25 min und bei 4 °C. Nach dem Transfer wurde der Blot in bidest. H_2O gewaschen und mit Ponceau-Rot (Kap. 2.5.6.3) zur Überprüfung des Transfers angefärbt und fixiert. Für spätere immunologische Tests wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in Blocklösung (Kap. 2.5.7.1) inkubiert, am folgenden Tag luftgetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Das Fixieren der transferierten Proteine auf der Blotmembran mit Glutaraldehyd, das häufig bei Proteinen im niederen Molekulargewichtsbereich angewendet wird, zeigte keinen Einfluss auf nachfolgende immunologische Nachweise und wurde folglich weggelassen.

2.5.5.4 Transfer auf PVDF-Membranen

Für eine nachfolgende Micro-Sequenzierung erfolgte der Elektrotransfer der Proteine auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF-Membran WESTRAN; 0,2 µm; Schleicher und Schüll). Der verwendete Puffer enthielt 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH-Wert 8,0; 0,02 % (v/v) 2-Mercaptoethanol und 20 % (v/v) Methanol (gradient grade). Die Membran wurde 2 min in Methanol (gradient grade), 2 min in H_2O (gradient grade) und 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde wie in Kapitel 2.5.5.3 beschrieben verfahren. Nach Beendigung des Transfers wurde die PVDF-Membran in H_2O (gradient grade) gewaschen und mit Coomassie (Kap. 2.5.6.1) kurz angefärbt, luftgetrocknet und in Folie bei 4 °C gelagert.

2.5.6 Proteinfärbungen

2.5.6.1 Färbung mit Coomassie

In Vorbereitung auf die Micro-Sequenzanalyse wurden Proteine in SDS-Gelen und auf PVDF-Membranen mit der Coomassie-Methode gefärbt. Die Gele wurden für 30 min in der Farblösung aus 50 % (v/v) Methanol (gradient grade), 10 % (v/v) Essigsäure und 1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250 inkubiert und anschließend bis zur Sichtbarkeit der Proteinbanden entfärbt (45 % (v/v) Methanol (gradient grade), 10 % (v/v) Essigsäure und 45 % H_2O (gradient grade)).

2.5.6.2 Silberfärbung

Die Färbetechnik wurde je nach Verwendungszweck ausgewählt. Aufgrund der hohen Sensitivität (5-30 ng/Bande) wurden die SDS-Gele im Allgemeinen mit Silber nach Blum et al. (1987) angefärbt: Die Gele wurden mindestens 1 h in einer Lösung aus 50 % (v/v) Methanol und 12 % (v/v) Ethanol fixiert, danach in 50 %igem Ethanol gewaschen und 2 min in $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (40 mg/100 ml) inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift mit bidest. H_2O für jeweils 20 s. Anschließend wurden die Gele für 20 min in einer Lösung aus AgNO_3 (200 mg/100 ml) und 37%igem Formaldehyd (50 µl/100 ml) auf einem Schüttler imprägniert und einmal mit bidest. H_2O gespült. Entwickelt wurde mit einer Lösung aus Na_2CO_3 (6 mg/100 ml), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1 mg/100 ml) und 37%igem Formaldehyd (70 µl/100 ml). Nach dem abschließenden, zweimaligen Waschschrift mit bidest. H_2O wurde die Reaktion durch die Zugabe einer Lösung aus 50 % (v/v) Methanol und 12 % (v/v) Essigsäure

gestoppt. Die gefärbten Gele wurden über Nacht in Badelösung (10 % (v/v) Glycerin, 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol und 40 % bidest. H₂O) inkubiert und zwischen zwei Zellophanfolien getrocknet.

2.5.6.3 Färbung mit Ponceau-Rot

Die Proteinfärbung mit Ponceau-Rot beeinflusst nachfolgende immunologische Untersuchungen nicht und wurde daher für die Färbung von Nitrocellulosemembranen ausgewählt. Anhand dieser Färbung konnte die Effizienz der Blottechnik überprüft und eine Markierung der Markerproteine vorgenommen werden. Die Membran wurde 10 min in der Ponceau-Lösung (0,2 % (w/v) Ponceau S; 3 % (v/v) TCA; 97 % bidest. H₂O) geschüttelt und anschließend in bidest. H₂O bis zum Sichtbarwerden der Banden entfärbt.

2.5.7 Immunologische Methoden

2.5.7.1 Immunologische Detektion

Die primären Antikörper (AK) wurden hinsichtlich der Charakterisierung einer möglichen Stressantwort auf Schwermetalle und Hitzeschock ausgewählt.

Da Antikörper gegen pflanzliche Metallothioneine (MT, Klassifizierung nach Binz und Kägi; 1999) kommerziell nicht erhältlich waren und primäre tierische Antikörper in Vorversuchen zu unspezifischen Kreuzreaktionen führten, wurde ein gegen konservierte pflanzliche Metallothioneinsequenzen p2 (*Arabidopsis thaliana/Brassica juncea*) gerichteter Multipler-Antigen-Peptid-Antikörper (MAP-AK) synthetisiert. Folgende primäre Antikörper und deren Verdünnungen in 1 x PBS-Puffer wurden verwendet:

anti-Peptid MT p2¹ (1:50.000), anti-HSP 70² (1:5.000), anti-HSP 17³ (1:5.000) und anti-Cyclophilin 18⁴ (1:5.000).

1: anti-Peptid-AK gegen Metallothionein p2-Konsensussequenzen aus *Brassica juncea* und *Arabidopsis thaliana*; generiert in Kaninchen; Universität Halle, Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät, Arbeitsgruppe Dr. E. Weber.

2, 3: polyklonaler anti-HSP 70-AK/polyklonaler anti-HSP 17-AK aus *Lycopersicon peruvianum*; generiert in Kaninchen; IPB Halle, Arbeitsgruppe Dr. D. Neumann.

4: anti-Peptid-AK gegen Cyclophilin-Konsensussequenzen; generiert in Kaninchen; Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung Halle, Arbeitsgruppe Dr. G. Küllertz.

Nach erfolgreichem Elektrotransfer der Proteine auf die NC-Membran und der Anfärbung mit Ponceau-Rot wurden unspezifische Bindungsstellen über Nacht mit 1 % (w/v) Blockreagenz (Non-Fat-Dry-Milk, Bio Rad, München) in 1 x PBS und 0,1 % (v/v) Tween 20 bei 4 °C blockiert. Im Anschluss daran wurde die Membran im primären Antikörper über einen Zeitraum von 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Darauf folgten drei Waschschriffe a 5 min mit 1 x PBS-Puffer unter Zusatz von 0,1 % (v/v) Tween 20. Analog folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (biotynlierter anti-Kaninchen-Ziege-AK, 1:10.000; DAKO, Kopenhagen, Dänemark) für 1 h bei Raumtemperatur. Wiederum wurde, wie oben beschrieben, gewaschen und schließlich 15 min im dritten Antikörper (Streptavidin-HRP; 1:5.000; DAKO) geschüttelt. Nach einem letzten Waschschriff erfolgte die 5-minütige Behandlung mit dem ECL-Reagenz (SuperSignal West Dura; PIERCE, Rockford, USA). Danach wurden die Membranen sofort in Folie eingeschweißt und in einer Filmkassette fixiert. Der belichtete Röntgenfilm wurde automatisch entwickelt (Protec compact 35).

2.5.7.2 Densidometrische Auswertung der Immuno-Assays

Die densidometrische Quantifizierung der Antikörper-positiven Proteinbanden erfolgte mit der BASYS-Software von Biotec Fischer (Reiskirchen).

2.5.8 Säulenchromatographische Methoden

2.5.8.1 Probenvorbereitung

Der Aufschluss von Probenmaterial wurde in Anlehnung an Murphy et al. (1997) zur Reinigung cysteinreicher Proteine durchgeführt. Alle Arbeiten wurden unter strikt reduzierenden Bedingungen und auf Eis ausgeführt, Puffer stets frisch hergestellt und mit Helium entgast. Die Proben (50 g FM) wurden unter Zusatz von 2,5 g PVP sowie flüssigem Stickstoff homogen gemörsert, in Zentrifugenröhrchen überführt und mit Homogenisierungspuffer (20 mM Tris/HCl, pH-Wert 8,2; 0,25 M Saccharose; 5 mM DDT; 1 mM PMSF und 0,01 % (w/v) Leupeptin) aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde 15 min auf Eis inkubiert und anschließend durch ein Nylon-Flies (100 µm) filtriert. Das Filtrat wurde bei 20.000 g; 30 min und 4 °C zentrifugiert (K24 D) und der Überstand mit kaltem 96%igen Ethanol und Chloroform gefällt. Nach wiederholter Zentrifugation (5.000 g; 30 min; 4 °C; Hettich Universal 30 RF) und einer Ethanol-fällung bei -20 °C über 30 min schloss sich ein

letzter Zentrifugationsschritt (9.000 g; 4 °C, 20 min; Sorvall RC5B, Bad Homburg) an. Die Proteinpellets trockneten bei –20 °C und wurden in Resuspensionspuffer (0,2 % (w/v) Chaps/HCl; 100 mM DTT, 50 µM EDTA; pH-Wert 2,0) gelöst. Mögliche Metall-Protein-Komplexe dissoziierten während einer einstündigen Inkubation auf Eis. Nach anschließender Fällung mit –20 °C kaltem Aceton für mindestens 1 h bei –20 °C, wurde der zentrifugierte Überstand (5.000 g; 10 min; 4 °C; Hettich Universal 30 RF) bei –20 °C getrocknet. Die extrahierten Proteine wurden entsprechend der nachfolgenden Reinigungsstufe entweder in Startpuffer A (IMAC) oder B (kovalente Affinitätschromatographie) aufgenommen.

2.5.8.2 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Das Prinzip dieser Chromatographie beruht auf der pH-Wert-abhängigen Chelatierung an substratimmobilisierten Metallionen durch Proteine und Peptide. In diesem Fall wurde Chelating Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) gekoppelt mit Imminodiessigsäure als metallbindendes Substrat und Cu(II) als Metallion gewählt. Eine Leersäule (K9/30; Amersham Pharmacia Biotech) wurde mit 4 ml der nach Herstellerangaben vorbereiteten Sepharose gefüllt, mit 3 ml 0,2 M CuCl₂-Lösung gesättigt und mit 10 ml bidest. H₂O gewaschen. Alle verwendeten Lösungen wurden mit Helium entgast und die nachfolgenden Arbeiten bei 4 °C durchgeführt. Die Flussrate betrug 0,8 ml/min, kontinuierlich wurde die Absorption bei 254 nm gemessen (Econo System; BioRad) und mittels Integrator aufgezeichnet (D-2500; Merck-Hitachi).

Nach dem Äquilibrieren mit Startpuffer A (20 mM Na₂HPO₄, pH-Wert 7,2 und 10 mM PMSF) erfolgte der Probenauftrag unter Ausnutzung der Schwerkraft. Dem anschließenden Spülen mit Waschpuffer (20 mM Na₂HPO₄, pH-Wert 7,2; 1 M NaCl und 10 mM PMSF) zur Ablösung unspezifisch gebundener Proteine folgte die Elution mit Puffer A (pH-Wert 3,5). Das Eluat wurde in Vorbereitung auf die Thiopropyl-Sepharose-Säule oder der SDS-PAGE mit –20 °C kaltem Aceton im Verhältnis 1:5 (v/v) bei –20 °C über mindestens 1 h gefällt. Die Regenerierung des Säulenmaterials wurde durch Spülen mit einer 50 mM EDTA-Lösung und nachfolgender Äquilibrierung mit Startpuffer erreicht.

2.5.8.3 Kovalente Affinitätschromatographie

Die kovalente Bindung von Thiolgruppen der mobilen Phase an reaktive 2-Thiopyridyl-disulfide des Geles (Thiopropyl Sepharose 6B; Amersham Pharmacia Biotech) unter

Bildung von Disulfidkomplexen diente der Isolierung thiolhaltiger Proteine aus *Fontinalis antipyretica*.

Wie oben bereits erwähnt, wurden auch bei diesem Reinigungsschritt alle verwendeten Lösungen mit Helium entgast und die nachfolgenden Arbeiten bei 4 °C durchgeführt. Die technischen Parameter entsprachen denen in Kapitel 2.5.8.2. Das nach Herstellerangaben vorbereitete Sepharose-Gel (1 ml) wurde in eine Leersäule vom Typ K9/15 (Amersham Pharmacia Biotech) gefüllt und mit Startpuffer B (10 mM Tris/HCl, pH-Wert 7,4; 1 mM EDTA) äquilibriert. Nach dem Auftragen der reduzierten, metallfreien Probe per Eigenfluss wurde die Säule zur Elution unspezifisch gebundener Proteine mit 100 ml Waschpuffer (10 mM Tris/HCl, pH-Wert 7,4; 0,5 M NaCl und 1 mM EDTA) gespült. Die Elution wurde in Vorversuchen optimiert und erfolgte mit 15 mM 2-Mercaptoethanol in Puffer B. Das eluierte Protein wurde mit –20 °C kaltem Aceton im Verhältnis 1:5 (v/v) bei –20 °C über mindestens 1 h gefällt. Die Regenerierung des Säulenmaterials wurde nach Herstellerangaben mittels 2,2-Dithiopyridin (pH-Wert 8,0) ausgeführt.

2.5.9 Massenspektrometrie

2.5.9.1 MALDI-TOF-MS

Die MALDI-TOF-MS-Analysen zur Massen- bzw. Sequenzbestimmung der Proteine bzw. Peptide wurden von Frau Dr. A. Schierhorn (Max-Planck-Gesellschaft, Forschungsstelle Enzymologie der Proteinfaltung, Halle/Saale) mit einem Reflectron TOF Massenspektrometer ReflexII (Daltonik) sowie von Frau Dr. E. von Röpenack-Lahay an dem Institut für Pflanzenbiochemie Halle/Saale ausgeführt. Als Matrix wurde 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (Sinapinsäure) (> 5 kDa) oder Cyano-4-hydroxyzimtsäure (< 5 kDa) verwendet.

2.5.9.2 LC-MS

Über die Kopplung von RP-HPLC und Elektrosprayionisations-Massenspektrometer (VG Bio-Q Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit Elektrospray Interface (Fison Instruments)) wurden säulenchromatographisch getrennte Proteine (Kap. 2.5.8) entsalzt, konzentriert sowie die Massen ausgewählter Fraktionen analysiert.

Die Systemoptimierung erfolgte mittels Metallothioneinstandard (MT 1,2*; Sigma,

* Metallothionein-Klassifizierung nach Nordberg et al. (1972)

Deisenhofen). Die chromatographische Trennung erfolgte über eine Vorsäule (Nucleosil-C-3, 11 x 2 mm, Macherey Nagel, Düren) und anschließend über eine Nucleosil-C-3-Säule (500-5 PPN; 125 x 2 mm, Macherey Nagel).

Als mobile Phase wurde 0,1 % (v/v) TFA in H₂O (A) und 0,1 % (v/v) TFA in ACN (B), bei einer Flussrate von 200 µl/min, in einem Gradienten wie folgt eingesetzt: 0 % B (0-1 min), 60 % B (1-30 min), 0 % B (30-35 min). Das Probenvolumen betrug 30 µl. Die Signalverläufe wurden bei 254 nm detektiert.

2.5.10 Micro-Sequenzanalyse von Proteinen/Peptiden

2.5.10.1 Alkylierung reduzierter Sulfhydrylgruppen

In Vorbereitung auf die Micro-Sequenzierung wurde eine Reduktion mit nachfolgender Alkylierung von Cysteinresten ausgesuchter Proteinfractionen der LC-MS-Analyse (Kap. 2.5.9.2) durchgeführt. Die im Stickstoffstrom getrocknete Probe wurde in 50 µl Puffer (0,25 M Tris/HCl, pH-Wert 8,5; 4 mM EDTA und 6 M Guanidinhydrochlorid) aufgenommen. Hierzu wurden 0,2 mg DTT gegeben und im Dunkeln unter Stickstoff für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 µl Vinylpyridin (Raumtemperatur). Nach dem Mischen der Lösung wurde wie oben beschrieben inkubiert. Die Entsalzung des S-pyridylethylierten Proteins wurde mittels RP-HPLC über eine C-4-Säule (300-5; 50 x 3 mm, Macherey Nagel) durchgeführt.

Als mobile Phase wurde 0,1 % (v/v) TFA in H₂O (A) und 0,08 % (v/v) TFA in ACN (B), bei einer Flussrate von 1 ml/min, in einem Gradienten wie folgt eingesetzt: 0 % B (0-5 min), 70 % B (5-15 min), 70 % B (15-20 min), 0 % B (20-22 min). Das Probenvolumen betrug 50 µl. Die Signalverläufe wurden bei 214 nm und 254 nm detektiert, die Fraktionen manuell anhand der Absorptionsmaxima bei 214 nm gesammelt, im Stickstoffstrom getrocknet und bis zur Micro-Sequenzierung bei -20 °C gelagert.

2.5.10.2 In-Gel-Proteinverdau und Peptidelution

Zum Verdau der durch SDS-PAGE isolierten Proteine diente die Serin-Protease Trypsin (sequencing grade; Boehringer Mannheim, Mannheim). Die spezifische Spaltung der Peptidbindung erfolgt an der Carboxylgruppe von Lysin und Arginin bei einem pH-Wert von 7,5-9,0. Aus dem coomassiegefärbten SDS-Gel (Kap. 2.5.6.1) wurden die Proteinbanden mittels Skalpell scharf begrenzt ausgeschnitten, in Glasvials 3 x mit H₂O

(gradient grade) gewaschen und anschließend mechanisch zerkleinert. Dieser Gelschlamm wurde für 20 min bei 30 °C getrocknet. Nach Zugabe von 20 µl Puffer (50 mM NH₄CO₃, pH-Wert 8,0) und 1,0 µg Trypsin (in 2 µl 1 mM HCl) wurde der Verdau über Nacht im Wasserbad bei 25 °C inkubiert. Der Überstand wurde in Glasvials bei –80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.5.10.3 RP-HPLC-Trennung tryptisch verdauter Proteine

Die chromatographische Trennung der Peptidspaltprodukte des In-Gel-Proteinverdau (Kap. 2.5.10.2) erfolgte aus organisatorischen Gründen mit zwei verschiedenen Techniken. Die Peptidseparation wurde von Herrn Dr. K. P. Rücknagel, Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung Halle/Saale, an einem LC-10A HPLC-System (Shimadzu) durchgeführt. Als stationäre Phase wurde eine C-3-Säule (550-5 PPN; 125 x 0,3 mm; Macherey Nagel) eingesetzt. Die mobile Phase setzte sich aus 0,09 % (v/v) TFA in H₂O (A) und 0,08 % (v/v) TFA in ACN (B) zusammen. Bei einer Säulentemperatur von 40 °C und einer Flussrate von 4 µl/min wurden die Proben (Injektionsvolumen ca. 20 µl) mit folgendem Gradienten getrennt: 0 % B (0-2 min), 60 % B (2-62 min) und 60 % B (62-70 min). Die Messung der Absorption des Eluates erfolgte mittels Photo-Dioden-Array bei 200 nm bis 350 nm. Die Peptidfraktionen wurden manuell anhand der Maxima der Absorption bei 214 nm gesammelt und im Stickstoffstrom auf etwa 30 µl eingeeengt. Bis zur Micro-Sequenzierung erfolgte die Lagerung der Peptidlösungen bei –80 °C.

Weiterhin wurden Peptidfragmente an einer HP 11000-HPLC-Anlage (Hewlett-Packard, Böblingen) chromatographisch getrennt. Eingesetzt wurde eine Vydac-C-18-Säule (5 µm, 250 x 4,6 mm) als stationäre Phase. Die mobile Phase setzte sich aus 0,1 % (v/v) TFA in H₂O (A) und 0,01 % (v/v) TFA in 70 %igem Propanol (B) zusammen. Die Säulentemperatur betrug 40 °C. Bei einer Flussrate von 0,5 ml/min wurden die Proben (50 µl Injektionsvolumen) mittels folgendem Gradienten getrennt: 0 % B (0-2 min), 100 % B (2-70 min) und 100 % B (70-75 min). Die Absorption des Eluates wurde durch ein Photo-Dioden-Array im Bereich von 200 nm bis 350 nm aufgenommen und die Peptidfraktionen manuell anhand der Maxima der Absorption bei 214 nm gesammelt. Bis zur Protein/Peptid-Sequenzierung (Micro-Sequenzanalyse) erfolgte die Lagerung bei –80 °C.

2.5.10.4 Protein/Peptid-Sequenzierung

Die N-terminale Sequenzanalyse der tryptisch verdauten Peptidfragmente mittels Edmann-Abbau wurde in Zusammenarbeit von Herrn Dr. Th. Nürnberger, IPB Halle/Saale und der TOPLAB GmbH (Martiensried) durchgeführt.

Die von Herrn Dr. K. P. Rücknagel, Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung Halle/Saale ausgeführte Protein-/Peptid-Sequenzierung erfolgte mit den Aminosäuresequenzern ABI 476A Protein Sequencer und Procise cLC Protein Sequencing System (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) nach Herstellerangaben. Die Proteinsequenzen wurden durch Nutzung von Online-Angeboten verschiedener Institute ausgewertet. Die Homologievergleiche erfolgten mit Sequenzeinträgen aus Protein- bzw. DNA-Datenbanken (SWISS-Prot, PDB, TrEMBL u.a.). Verwendet wurden dafür die Programme BLASTP 2.2.2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Altschul et al., 1997) und FASTA33 (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33>; Pearson, 1990).

2.6 Qualitative und quantitative Bestimmung freier Aminosäuren

2.6.1 Extraktion

Die Extraktion der nicht proteinogenen Aminosäurefraktion (NP-Fraktion) wurde nach Hofmann et al. (1995) aus Frischmaterial, das in flüssigem Stickstoff gemörsert und sofort zu jeweils Portionen aus 5 g abgewogen wurde, durchgeführt. Über Nacht erfolgte die Extraktion in 25 ml bidest. H₂O bei 4 °C. Nach 10 min Zentrifugation bei 10.000 g (K24 D) und –2 °C wurde der Überstand durch Baumwollwatte filtriert und nochmals wie oben für 45 min zentrifugiert. Dieser Überstand wurde durch einen Glasfaserfilter filtriert. Nach der flüssig-flüssig-Extraktion mit jeweils 5 ml Chloroform wurde die wässrige Phase bei –25 °C lyophilisiert und bei –80 °C eingefroren.

2.6.2 Aminosäurederivatisierung

Für eine GC-C-IRMS-Analyse (Kap. 2.6.3) ist es aufgrund des Dipolcharakters der Aminosäuren notwendig, mittels geeigneter Derivatisierung die Flüchtigkeit der Proben zu erhöhen. In diesem Falle wurden die Aminosäuren nach Brand et al. (1994) verestert und nachfolgend acetyliert.

Das lyophilisierte Material wurde mit 1,12 mg Aminosäurestandard (Merck, Darmstadt) eingewogen und mehrmals mit Methylenchlorid im Rotavapor getrocknet. Anschließend wurden die Proben mit 10 ml einer im Eisbad frisch hergestellten Lösung aus Acetylchlorid und n-Propanol (1:4) versetzt und unter Rühren bei 110 °C 1 h im Heizblock verestert. Danach wurden die Proben abgekühlt und bei 45-50 °C im Heizblock bis zur Trockne eingengt. Die Trifluoracetylierung erfolgte mit 300 µl TFAA über Nacht bei Raumtemperatur. Die derivatisierten Proben lagerten bis zur Analyse bei 4 °C.

2.6.3 Qualitative und quantitative Aminosäureanalyse mittels GC-C-IRMS

Die qualitative und quantitative Analyse der derivatisierten Aminosäuren wurde am Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle, Sektion Chemische Ökotoxikologie mittels GC-C-IRMS (Gas-Chromatographie-Verbrennungs-Isotopen-Verhältnis-Massenspektrometrie) nach Hofmann et al. (eingereicht) durchgeführt.

2.6.4 Qualitative und quantitative Aminosäureanalyse mittels Aminosäure-Analyzer

Die Fraktion der freien Aminosäuren wurde für diesen Versuch wie oben beschrieben extrahiert und lyophilisiert. Die Analysen erfolgten am A100 Automatic Amino Acid Analyzer (Arbeitsgruppe Aminosäureanalytik Dr. Fuchs, Knauer GmbH, Berlin).

2.7 Analytik organischer Säuren

2.7.1 Extraktion

Die Fraktion der organischen Säuren aus Moosmaterial wurde über eine Stufenextraktion nach Kleber et al. (1997) isoliert. Aus einem 70%igen Ethanolextrakt wurden mittels aufeinanderfolgende Kationen- (Dowex-50; SERVA) und Anionenaustauscher (Dowex-1; SERVA, Heidelberg) organische Säuren separiert, die im Anschluss 72 h im Wasserbad bei 40 °C eingengt wurden. Die in 400 µl bidest. H₂O aufgenommenen Proben lagerten bis zur weiteren Analytik bei 4 °C.

2.7.2 HPLC-Analyse

Die Charakterisierung organischer Säuren mittels HPLC-Analyse (Hewlett Packard 1046A) wurde modifiziert nach Merck (Applikation 960751) durchgeführt. Als Standards wurden folgende Verbindungen (Merck) in einer Konzentration von 200 µg/ml in bidest. H₂O eingesetzt: Oxalsäure, Äpfelsäure, Zitronensäure und Weinsäure. Zur chromatographischen Trennung wurde als stationäre Phase eine Polyspher-ARAC-Säule (5 µm, 100 x 6,5 mm; Merck) und als mobile Phase 0,01 N H₂SO₄ verwendet. Das Probenvolumen betrug 20 µl. Die Separation erfolgte bei einer Säulentemperatur von 45 °C. Die Fraktionen wurden manuell anhand der Maxima der Absorption bei 206 nm gesammelt und anschließend derivatisiert.

2.7.3 Derivatisierung

Die für eine GC-MS-Analyse erforderliche Derivatisierung zur Erhöhung der Probenflüchtigkeit erfolgte nach Fiehn et al. (2000). Prinzip dieser Methode ist der Austausch des aciden Wasserstoffs gegen Trimethylsilylgruppen aus N-Methyl-N-Trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA). Die HPLC-Fractionen wurden mit BaOH neutralisiert sowie bei 5.000 g (Hettich Universal 30 RF) und 20 °C zentrifugiert. Die Derivatisierung des lyophilisierten Überstandes sowie der Standardverbindungen erfolgte mit 80 µl MSTFA für 30 min bei 37 °C und nachfolgend für 2 h bei Raumtemperatur. Die Proben wurden bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.7.4 Qualitative Analyse mittels GC-MS

Die silanisierten organischen Säuren wurden in der Arbeitsgruppe Umweltchemie und Lebensmittelchemie im Institut für Analytik und Umweltchemie der Universität Halle-Wittenberg gaschromatographisch (HP 6890 Series GC System; GC-Autosampler Controller 5973 msd; 7694 Headspace Autosampler) analysiert.

2.8 Analytik phenolischer Verbindungen

2.8.1 Extraktion löslicher, phenolischer Inhaltsstoffe

Die Extraktion phenolischer Inhaltsstoffe aus Moosmaterial erfolgte modifiziert nach Strack et al. (1979). Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert. Jeweils 1,5 g FM in Zentrifugenröhrchen abgewogen und mit 300 µl 80%igem Methanol (gradient grade) homogenisiert. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der zentrifugierte Überstand (5.000 g, 15 min, Hettich Universal 30 RF) steril filtriert und bei 40 °C im Wasserbad eingengt. Für die folgenden Analysen wurden die extrahierten Proben in 150 µl 80%igem (v/v) Methanol (gradient grade) im Ultraschallbad gelöst und gegebenenfalls zentrifugiert.

2.8.2 Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes

Der Gesamtphenolgehalt wurde nach Jennings (1981) spektroskopisch ermittelt. Der Messansatz setzte sich aus 30 µl Probe, 270 µl bidest. H₂O und 500 µl Phenol-Reagenz (Folin-Coicalteau-Reagenz) zusammen. Nach 15-minütigem Schütteln bei Raumtemperatur wurde der Ansatz mit 150 µl einer Lösung aus 0,1 % (w/v) NaOH und 2 % (w/v) NaCO₃ versetzt und 30 min inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte als Sechsfachbestimmung bei 760 nm (UV/VIS 1202; Shimadzu). Die Probenkonzentration wurde anhand einer Rutin-Eichreihe im Bereich von 0,06-1,0 mM berechnet.

2.8.3 RP-HPLC-Analyse

Die Analyse der in Kapitel 2.8.1 beschriebenen Extrakte erfolgte mittels RP-HPLC (Kontron Instruments, Neufahrn). Die qualitative und quantitative Auswertung der Chromatogramme wurde mit dem Programm Kroma 3000 (Bio Tec, Basel, Schweiz) ausgeführt. Die Konzentrationen der einzelnen Verbindungen wurden anhand einer Rutin-Eichreihe im Bereich von 0,06-1,0 mM ermittelt. Vor der Injektion wurden die Proben im Verhältnis 1:15 mit 80%igem (v/v) Methanol (gradient grade) verdünnt. Als Standardsubstanzen wurden jeweils 0,25 mM folgender Verbindungen (Merck) eingesetzt: Gallussäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, Vanillinsäure, 4-Hydroxybenzaldehyd, Umbelliferon, Quercetin und Zimtsäure. Die chromatographische Trennung erfolgte auf

einer Nucleosil-C-18-Säule (5 μm , 250 x 4 mm; Macherey Nagel). Die mobile Phase (pH-Wert 2,6) setzte sich aus 40 mM CH_2O_2 (A) und 0,01 % (v/v) TFA in ACN (B) zusammen, das Injektionsvolumen betrug 20 μl . Bei einer Flussrate von 0,8 ml/min wurde folgender Gradient eingesetzt: 5 % B (0-5 min), 60 % B (5-40 min). Die Identifizierung der getrennten Fraktionen wurde anhand der Retentionszeiten der eingesetzten Standards sowie der bereits vorhandenen HPLC-Software-Datenbank vorgenommen. Die Fraktionen wurden manuell anhand der maximalen Absorption bei 254 nm gesammelt und bei 4 °C gelagert.

2.8.4 LC-MS/MS-Analyse

Die Charakterisierung der HPLC-Fractionen wurde mittels LC-MS/MS (positive und negative Elektrosprayionisierung) von Herrn Dr. J. Schmidt, Arbeitsgruppe Pflanzen- und Pilzinhaltsstoffe, Institut für Pflanzenbiochemie Halle/Saale, durchgeführt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte an einem Massenspektrometer Finnigan MA TSQ 7000. Entsprechende Proben wurden vorher im Wasserbad bei 40 °C eingeeengt und in 10 μl 80%igem (v/v) Methanol (gradient grade) gelöst.

2.8.5 Nachweis von Flavonol-Kupfer-Wechselwirkungen

Die Zuordnung der isolierten phenolischen Verbindungen in die Gruppe der Flavonole wurde spektroskopisch nach Brown et al. (1998) überprüft. Diese Methode erlaubt den Nachweis der Cu-Chelatierung über Hydroxylgruppen am B-Ring der Flavonole sowie Oxidationseffekte an den Hydroxylgruppen des B- und C-Ringes anhand von charakteristischen Absorptionsverschiebungen.

Als Standardsubstanz wurde das Flavonol Quercetin verwendet. Die 1 mM Stammlösung in 80%igem (v/v) Methanol (gradient grade) wurde als Messansatz zu 25 μM in 1 ml 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH-Wert 7,4 verdünnt. Das UV/Vis-Spektrum des Flavonols wurde im Bereich von 200-600 nm (Cary 3E, Varian, Mulgrave, Australien) aufgenommen. Die Spektren der reversiblen Cu-Chelatierung wurden nach Zugabe von 25 μM CuSO_4 und nachfolgend 50 μM EDTA wie oben beschrieben gemessen.

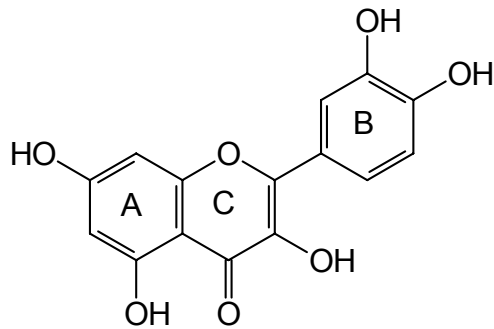


Abb. 6: Strukturformel von Quercetin.

HPLC-Fractionen der phenolischen Extrakte wurden bei 40 °C im Wasserbad eingengt, in 30 µl 80%igem (v/v) Methanol (gradient grade) gelöst und in 1 ml 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH-Wert 7,4 überführt. Das Absorptionsspektrum wurde wie oben beschrieben nach Zugabe von 25 µM CuSO₄ sowie nach Zugabe von 10-50 µM EDTA aufgenommen.

2.9 Nukleinsäureanalytik

2.9.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.9.1.1 Isolierung von genomischer DNA

Zur Extraktion wurden 100 mg Blattmaterial unter Zugabe von flüssigem Stickstoff fein gemörsert, anschließend mit einem vorgekühlten Spatel in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und in 0,9 ml CTAB-Puffer (100 mM Tris/HCl, pH-Wert 8,0; 2 % N-Cetyl-N,N,N-Trimethylammoniumbromid (CTAB); 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA und 0,2 % (v/v) 2-Mercaptoethanol) suspendiert. Der Ansatz wurde für 30 min bei 60 °C unter gelegentlichem Schütteln (ca. alle 5 min) inkubiert und danach mit 1 Volumenteil Chloroformlösung (24 Volumenteile Chloroform und 1 Volumenteil Isoamylalkohol) versetzt und 2 min von Hand geschüttelt. Nach 10 minütiger Zentrifugation (18.000 g; 20 °C, Eppendorf Tischzentrifuge) wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Tube überführt, mit 0,8 Volumenteilen Isopropanol gemischt und wie oben zentrifugiert. Nach Überschichtung des Pellets mit 500 µl kaltem 80%igem (v/v) Ethanol erfolgte nochmals eine Zentrifugation (siehe oben). Der Überstand wurde dekantiert und Ethanolreste mit einer Pipette abgezogen, so dass das trockene Pellet in bidest. H₂O aufgenommen werden konnte.

2.9.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Gewinnung von qualitativ hochwertiger Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte die Isolierung mittels QIAprep Spin Plasmid Kits (Quiagen, Hilden). Das Verfahren beruht auf dem Prinzip einer alkalischen Lyse und nachfolgender Bindung der Plasmid-DNA an eine Säulenmatrix (Anionentauscher). Ausgehend von einer Übernachtskultur (5 ml LB-Medium; 50 µg/ml Ampicillin) wurde die Plasmid-DNA nach den Herstellerangaben isoliert. Die DNA wurde mit 50 µl bidest. H₂O eluiert und bei 4 °C gelagert.

2.9.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Quiagen) laut den Herstellerangaben durchgeführt.

2.9.1.4 Isolierung von RNA

Die Isolierung pflanzlicher RNA erfolgte mit dem RNeasy Plant Mini Kit nach den Herstellerangaben (Quiagen). Als Ausgangsmaterial dienten jeweils 100 mg Frischmaterial. Die Proben wurden unter flüssigem Stickstoff fein gemörsert und in 450 µl Extraktionspuffer aufgenommen (8 M Guanidiniumchlorid; 20 mM MES/NaOH, pH-Wert 7,0; 20 mM EDTA). Nach kurzer Zentrifugation (20.000 g; 2 min; Hettich Universal 30 RF) wurde der Überstand auf die QIAshredder-Säule gegeben und 2 min bei 20.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit 225 µl Ethanol versetzt und in der Mini-Spin-Säule bei 20.000 g für 15 s zentrifugiert. Anschließend erfolgten die Waschschriffe mit 700 µl RW1-Puffer sowie 2 x mit 500 µl RPE-Puffer. Zur Elution der gebundenen RNA diente 50 µl steriles DEPC-Wasser. Zentrifugiert wurde bei 20.000 g für 1 min. Die Proben lagerten bei –80 °C.

2.9.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm gegen bidest. Wasser (Diode Array Spectrophotometer 8452A; Hewlett Packard). Die OD₂₆₀ von 1,0 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml und bei RNA einer Konzentration von 40 µg/ml. Präparative Proteinkontaminationen wurden anhand des Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ überprüft. Unter optimalen Bedingungen liegt

dieser Quotient bei 1,8-1,9. Die DNA-Konzentrationen der Plasmid-Präparationen wurden durch einen Vergleich der Bandenintensitäten im Agarosegel bestimmt. Als Standard wurde pUC18 mit einer definierten Konzentration von 0,5 µg/µl eingesetzt.

2.9.3 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

2.9.3.1 Standard-Agarosegelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern. Es wurden 1%ige (w/v) Agarosegele (1 % (w/v) in 1 x TAE-Puffer aus 40 mM Tris/HCl, pH-Wert 8,0; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA) eingesetzt. Vor dem Gießen des Geles wurde zur Anfärbung der DNA 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Als Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0,2 Vol. Stop-Mix (0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF und 30 % (w/v) Glycerin) versetzt. Als Größenmarker wurde der pGEM-Marker von Promega (Mannheim) sowie der Marker PCR 100 bp Low (Sigma) verwendet. Die Trennung erfolgte bei 80 V für 30 min. Im Anschluss wurde die DNA unter UV-Licht am Transilluminator sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

2.9.3.2 Denaturierende Agarosegelelektrophorese

Als Probenvorbereitung wurde das entsprechende Volumen für 15 µg RNA mit sterilem DEPC-Wasser auf 50 µl aufgefüllt und mittels 4 M NaCl auf die Endkonzentration von 0,1 M NaCl (Gesamtvolumen) eingestellt. Nach Zugabe des 2-fachen Volumens eiskalten Ethanols erfolgte die Inkubation bei -80 °C für 20 min bzw. über Nacht. Anschließend wurden die Proben bei 15.000 g und 4 °C für 20 min (Hettich Universal 30 RF) zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 100 µl 70%igem, -20 °C kaltem Ethanol gewaschen und wie oben zentrifugiert. Das trockene RNA-Pellet wurde in 18 µl denaturierenden Probenpuffer (4,5 µl steriles DEPC-Wasser; 2,0 µl Laufpuffer (Kap. 2.9.3.1); 10,0 µl Formamid; 3,5 µl Formaldehyd; 2,5 µl Glycerin und 0,04 % (v/v) Bromphenolblau) aufgenommen. Die gelösten Proben denaturierten 10 min bei 65 °C und wurden für 2 min im Eisbad abgekühlt.

Zur elektrophoretischen Auftrennung von RNA wurden denaturierende Agarose-Horizontalgele verwendet. Die Agarose (1 %) wurde im Laufpuffer (40 mM Mops; 10 mM NaOAc; 1 mM EDTA; pH-Wert 7,0) geschmolzen und nach Abkühlen auf ca. 50 °C mit

Formaldehyd (Endkonzentration 2 % (w/v)) gemischt. Nach dem Erkalten des Gels wurde der Laufpuffer aufgefüllt und die vorbereiteten Proben aufgetragen (10 µg pro Spur). Zum Eindringen der Proben wurden 100 mA für 5 min angelegt. Die eigentliche elektrophoretische Trennung wurde bei 45 mA/60 V durchgeführt. Als Größenstandard wurde der DIG (Digoxigenin)-markierte DNA-Längenstandard III (0,12-21,2 kb; Boehringer Mannheim) eingesetzt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 30 min unter fließendem Wasser gewaschen und für wiederum 30 min in 0,1 M Tris, pH-Wert 9,0 mit 1 mg Ethidiumbromid unter Schütteln gefärbt. Über Nacht erfolgte das Entfärben in frischem 0,1 M Tris, pH-Wert 9,0 bei 4 °C.

2.9.4 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion des MT p2-18-Inserts aus dem Vektor pBK-CMV erfolgte mit den Endonukleasen EcoRI und XhoI. Die DNA-Lösung (5 µg DNA) wurde mit 10 µl 2 x Y⁺/Tango-Puffer und je 1 µl (5 U) EcoRI und XhoI (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) gemischt und mit sterilem, bidest. H₂O auf 20 µl Gesamtansatz gebracht. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,02 M EDTA (pH-Wert 8,0) gestoppt und die Fragmente, wie in Kapitel 2.9.3.1 beschrieben, elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert.

2.9.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde das pGEM-T Vector System (Promega) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die Amplifizierung der DNA-Fragmente erfolgte direkt vor der Ligation. Es wurden mit 3 µl des jeweiligen PCR-Ansatzes das maximal bei der Ligation einsetzbare Volumen verwendet. Ligiert wurde bei Raumtemperatur für 1 Stunde oder bei 4 °C über Nacht. Gleich im Anschluss daran wurde die Transformation durchgeführt.

2.9.6 Transformation

2.9.6.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen wurde zunächst eine Vorkultur aus 3 ml LB-Medium (Sambrook et al., 1989) unter Zusatz von 50 µg/ml Kanamycin mit kompetenten *E. coli* XL1-Blue- bzw. DH5α-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln angezogen. Die Hauptkultur aus 200 ml LB-Medium (50 µg/ml Kanamycin) wurde mit 2 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 angezogen. Die Kultur wurde für 15 min auf Eis abgekühlt und danach abzentrifugiert (5.000 g; 4 °C; 15 min; Hettich Universal 30 RF). Im Anschluss wurde das Pellet 2 x mit je 200 ml eiskaltem, bidest. Wasser und einmal mit 30 ml 10%igem (v/v) Glycerin gewaschen, in 0,5-0,7 ml 10%igem (v/v) Glycerin aufgenommen und in 40 µl Aliquots bei –80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.9.6.2 Transformation/Vektor pBK-CMV

Für die Herstellung einer DIG-markierten Sonde wurde vorbereitend pBK-CMV-Plasmid [MT p2-18] (Schäfer et al., 1998) in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen kloniert. Der Vektor pBK-CMV (4,5 kb) vermittelte eine Kanamycin-Resistenz. Das Insert (0,6 kb) wurde in die EcoRI und XhoI-Site kloniert (Dr. H. Schäfer, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Th. Rausch; Botanisches Institut der Universität Heidelberg).

Die Transformation nach Dower et al. (1988) wurde am Gene Pulser (BioRad) durchgeführt. Pro Ansatz wurden 40 µl kompetente Zellen und 2 µl Ligationsansatz (80 ng Plasmid-DNA in 10 µl bidest. H₂O) eingesetzt. Die Zellen tauten auf Eis auf, wurden mit der Plasmid-DNA versetzt und nach 1 min Inkubation auf Eis in die sterile, vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 0,2 cm Elektrodenabstand (Peglab, Erlangen) überführt. Die eigentliche Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 2,5 kV und 200 Ω, wodurch eine Feldstärke von 12,5 kV/cm und Zeitkonstanten um 4,0 ms erreicht wurden. Sofort nach dem Impuls wurde 1 ml LB-Medium zugegeben. Die Zellen wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert und im Anschluss auf selektiven LB-Nährboden (50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert.

2.9.6.3 Transformation/Vektor pGEM-T

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurden 5 µl des zuvor abzentrifugierten Ligationsansatzes zu den –80 °C kalten, kompetenten *E. coli* DH5α-Zellen gegeben und 20 min auf Eis inkubiert (nach 10 min einmal sanft gemischt). Die Bakterien wurden exakt 45 s einem Hitzeschock bei 41 °C ausgesetzt und sofort für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 950 µl LB-Medium (20 °C) wurde für 30 min bei 37 °C geschüttelt und je 100 µl auf LB/Ampicillin/X-Gal-Platten ausplattiert und bei 37 °C für 16-20 h inkubiert.

2.9.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer Metallothioneingensequenzen aus genomischer DNA von *Fontinalis antipyretica* wurden aus Metallothionein-ähnlicher mRNA-Sequenz Oligonucleotidprimer abgeleitet und eingesetzt (eine nähere Charakterisierung der Primer ist in Kap. 2.9.8 dargestellt): Primer pMT1: *Triticum aestivum* (wali1; wheat aluminum induced; L11879; Snowden und Gardner, 1993). Die Reaktion wurde in einem Volumen von 50 µl im RoboCycler-Gradient 40 (Stratagene Cloning Systems, Heidelberg) durchgeführt.

Reaktionsansatz:

36,0 µl	steriles H ₂ O
5,0 µl	10 x PCR Reaktionspuffer (100 mM Tris/HCl, pH-Wert 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl ₂)
2,0 µl	dNTP-Mix (je 2,5 mM)
2,0 µl	Primer pMT1-1 oder MT2-1 (5 mM)
2,0 µl	Primer pMT1-2 oder MT2-2 (5 mM)
2,0 µl	genomische DNA (1:100)
<u>1,0 µl</u>	Taq DNA-Polymerase
<u>50,0 µl.</u>	

Touch down-PCR (TD-PCR)-Bedingungen:

Der Ansatz wurde zur Denaturierung der DNA 3 min bei 94 °C inkubiert. Anschließend folgten 10 Zyklen:

Denaturierung	94 °C	1 min
“Annealing“	60 °C	30 s

Synthese 72 °C 30 s $\Delta T = -1,0 \text{ °C}$ (nach jedem Zyklus wird die Temperatur um 1 °C gesenkt)

sowie 25 Zyklen:

Denaturierung	94 °C	1 min
“Annealing“	50 °C	30 s
Synthese	72 °C	30 s
Nachsynthese	72 °C	5 min.

2.9.8 Kolonie-PCR

Das Vorhandensein des DNA-Fragmentes wurde mit Hilfe der Kolonie-PCR unter Verwendung von Vektor-Primern überprüft. Dazu wurden zufällig ausgewählte Kolonien mit sterilen Pipettenspitzen in je 50 μl steriles H_2O überführt, für 5 min bei 95 °C inkubiert und in der Verdünnung 1:100 in folgendem PCR-Ansatz verwendet:

Reaktionsansatz:

8,4 μl	steriles H_2O
2,0 μl	10 x PCR Reaktionspuffer (100 mM Tris/HCl, pH-Wert 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl_2)
1,8 μl	dNTP-Mix (je 2,5 mM)
2,4 μl	T7-Vektor-Primer (5 mM)
2,4 μl	SP6-Vektor-Primer (5 mM)
2,0 μl	Kolonie-Lösung (1:100)
<u>1,0 μl</u>	Taq DNA-Polymerase (Johannigmeier)
<u>20,0 μl</u>	

PCR-Bedingungen:

Die Reaktion wurde in einem Thermocycler T1 (Biometra) durchgeführt. Nach der Denaturierung der DNA für 30 s bei 94 °C folgten 35 Zyklen:

Denaturierung	94 °C	30 s
“Annealing“	55 °C	30 s
Synthese	72 °C	1 min
Nachsynthese	72 °C	5 min.

Zur Kontrolle der Amplifizierung des gewünschten Fragmentes wurden je 10 µl Reaktionsansatz mittels Standard-Agarosegelelektrophorese (Kap. 2.9.3.1) aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht ausgewertet.

Tab. 2: Verwendete Primer (Metabion, Martiensried) für TD-PCR, Kolonie-PCR und Sequenzierungsreaktion.

Primer	Orientierung	Sequenz 5'→3'	Beschreibung
NewT7	forward (22-mer)	GTAATACGACTCACTATAGGGC	hybridisiert die Basen 69-47 upstream der Insertionsstelle im Vektor pGEM-T
SP6	reverse (22-mer)	AGCTATTTAGGTGACACTATAG	hybridisiert die Basen 74-96 downstream der Insertionsstelle im Vektor pGEM-T
pMT1-1	forward (21-mer)	TCAAGCTGCGGCTGCGGCTCA	Basenposition in <i>Triticum aestivum</i> (wali1)/L11879: 89-103
pMT1-2	reverse (21-mer)	GCAGTTGCAAGGGTTGCACTT	Basenposition in <i>Triticum aestivum</i> (wali1)/L11879: 288-269

2.9.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach dem von Sanger et al. (1977) entwickelten Kettenabbruchverfahren mit dem BigDye Terminator 3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben und einem automatischen Sequenziergerät vom Typ ABI Prism370 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Zur Auswertung der Sequenzdaten wurden die Computerprogramme Chromas (Version 2.2; <http://www.technelysium.com.au/chromas>) sowie Sequencer 4.01 (<http://www.genecodes.com>) verwendet. Homologievergleiche mit Datenbanksequenzen wurden mit Hilfe der Programme BLASTX (Altschul et al., 1997) und BLASTN (Altschul et al., 1990) des National Centre for Biotechnological Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt.

2.9.10 Nachweis spezifischer RNA

2.9.10.1 Nichtradioaktive Sondenmarkierung

Die Markierung des DNA-Fragmentes MT p2-18 erfolgte nichtradioaktiv mittels Digoxigenin (DIG) gekoppeltem dUTP über Random Primer. Hierzu wurde 1 µg Fragment in 30 µl sterilem Wasser für 10 min in kochendem Wasser denaturiert und im Eisbad auf –20 °C für 2 min abgekühlt. Nach Zugabe von 4 µl Dig-High-Prime-Lösung (Dig High Prime; Boehringer Mannheim) wurde der Ansatz für 30 s mit 10.000 g (Hettich Universal 30 RF) zentrifugiert und für 20 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10-minütiges Erhitzen bei 65 °C und 1-minütiger Inkubation bei –20 °C beendet. Anhand eines Dot-Blots mit Dig-markierter Kontroll-DNA (DIG Luminescent Detection Kit; Boehringer Mannheim) wurde die Effizienz der Sonde getestet.

2.9.10.2 Transfer auf Nylonmembranen

Das Gel wurde für 5 min in sterilem Wasser und ebenso wie das Blotpapier für 5 min in Transferpuffer (1,5 M NaCl; 150 mM Natriumcitrat) vorsichtig äquilibriert. Der Transfer auf die positiv geladene Nylonmembran (Boehringer Mannheim) erfolgte mit Hilfe einer Vakuumblot-Apparatur (Stratagene) für 45 min bei 75 mbar. Nach dem Transfer wurde die RNA durch doppelseitige UV-Bestrahlung (120 mJ) kovalent an die Membran gebunden (Stratalinker; Stratagene).

2.9.10.3 RNA-DNA-Hybridisierung (Northern-Hybridisierung)

Die Prehybridisierungslösung, ein SDS-Puffer bestehend aus 50 % (v/v) Formamid; 30 x SSC (0,45 M Natriumcitrat, pH-Wert 7,0 und 4,5 M NaCl); 1 M Natriumphosphat, pH-Wert 7,0; 10 % (w/v) Blocklösung (DIG-Luminescent Detection Kit; Boehringer Mannheim) sowie 10 % (w/v) N-Lauroylsarcosin, wurde vor Gebrauch 10 min auf 65 °C erhitzt und 2 min bei –20 °C abgekühlt. Die Nylonmembran wurde in einer sterilen Plastiktüte mit 40 ml Prehybridisierungslösung für 1,5 h bei 50 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Diese Lösung wurde verworfen. Anschließend erfolgte die Zugabe der zuvor 10 min bei 95 °C erhitzten DIG-RNA-Sonde in 25 ml SDS-Puffer (Hybridisierungslösung); die Membran wurde über Nacht bei 50 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Danach erfolgte das Waschen der Membran für jeweils 2 x 15 min bei Raumtemperatur in je

150 ml Waschlösung I (2 x SSC und 0,1 % (w/v) SDS) und in je 150 ml Waschlösung II (0,1 x SSC und 0,1 % (w/v) SDS) bei 50 °C im Schüttelwasserbad und anschließend die Äquilibrierung für 3 min in Waschpuffer (0,1 M Maleinsäure, pH-Wert 7,5; 0,15 M NaCl; 0,3 % (w/v) Tween). Weiterhin wurde die Membran bei Raumtemperatur in 100 ml Blocklösung (1 % (w/v) Blockreagenz in 0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl, pH-Wert 7,5; Boehringer Mannheim) für 45 min inkubiert. Die Lösung wurde abgossen und danach 40 ml des anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugats (Fab-Fragmente; Boehringer Mannheim) in einer Verdünnung von 1:10.000 zugesetzt und für weitere 30 min bei 24 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach dem 2-maligen Waschen mit je 150 ml Waschpuffer für je 15 min wurde die Membran in Detektionspuffer (0,1M Tris/HCl, pH-Wert 9,5; 0,1 M NaCl) für 2 min äquilibriert. Für die Detektion wurde die Membran 25 min mit 1 ml Chemilumineszenz-Substrat (CSPD; 1: 100 in Detektionspuffer; Boehringer Mannheim) bei 37 °C inkubiert. Die Membran wurde zwischen zwei Lagen Folie gelegt und mit einem Röntgenfilm exponiert. Für weitere Versuche lagerte die Membran in einer Plastiktüte bei 4 °C.

2.10. Statistische Auswertung

Die Bestimmungen der Standardabweichungen erfolgten mit dem Tabellenkalkulationsprogramm MS Excel 2000. Berechnungen der statistischen Signifikanzniveaus wurden mit dem Programm SIGMASTAT 2,01 durchgeführt. Zur Überprüfung der Mittelwertgleichheit verschiedener Messreihen wurde der t-Test angewendet. Der Grenzwert der Wahrscheinlichkeit P wurde auf $P < 0,05$ festgelegt (Timischl, 2000).

3. Ergebnisse

3.1 Vitalität unter Schwermetalleinfluss in *Fontinalis antipyretica*

Zur Vitalitätsbestimmung wurde die schnelle Kinetik der prompten Chlorophyllfluoreszenz mit einem Mini-PAM Chlorophyll-Fluorimeter analysiert (Kap. 2.2). Die effektive Quantenausbeute des PS II (Genty-Parameter) diente dabei als Maß für die Vitalität. Die Moosproben (Januar, April 1999) wurden wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben kultiviert und über einen Zeitraum von einem Tag bis sieben Tage mit Cu(II), Cd(II), Pb(II) und Zn(II) in den Konzentrationen 25 μM , 50 μM und 100 μM inkubiert (Kap. 2.1.4). In den Graphiken (Abb. 7-10) sind die Genty-Parameter als Verhältnis von variabler und maximaler Fluoreszenz in Abhängigkeit der eingesetzten Schwermetalle dargestellt. Änderungen wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Messreihen in Prozent [%] zur Kontrolle [100 %] angegeben (Anhang Tab. 2).

Im Ergebnis der Vitalitätsuntersuchungen zeigten die Kontrollproben mit täglich gemessenen Genty-Parametern von 0,72-0,75 keine signifikanten Schwankungen über den gesamten Versuchszeitraum. Die sensitivste Reaktion erfolgte auf die Cu(II)-Applikation, bei der eine enge Korrelation zwischen der Cu(II)-Konzentration und der signifikanten Abnahme der Vitalität auftrat (Abb. 7). So sank die Vitalität der Proben unter 25 μM Cu(II)-Belastung ab dem dritten Tag signifikant ab und erreichte zum Versuchsende den Wert 0,54 (72 %). Die Erhöhung der applizierten Cu(II)-Konzentration auf 50 μM bzw. 100 μM zeigte eine signifikante Abnahme des Genty-Parameters bereits nach dem ersten Tag. Die Werte am siebenten Tag lagen bei 0,55 bzw. 0,39 (73 % sowie 52 %). Insgesamt erreichten die Proben der 25 μM Cu(II)- und 50 μM Cu(II)-Versuchsreihe nach sieben Tagen vergleichbare Vitalitäten, während eine 100 μM Cu(II)-Belastung zu einer extrem verminderten Vitalität führte.

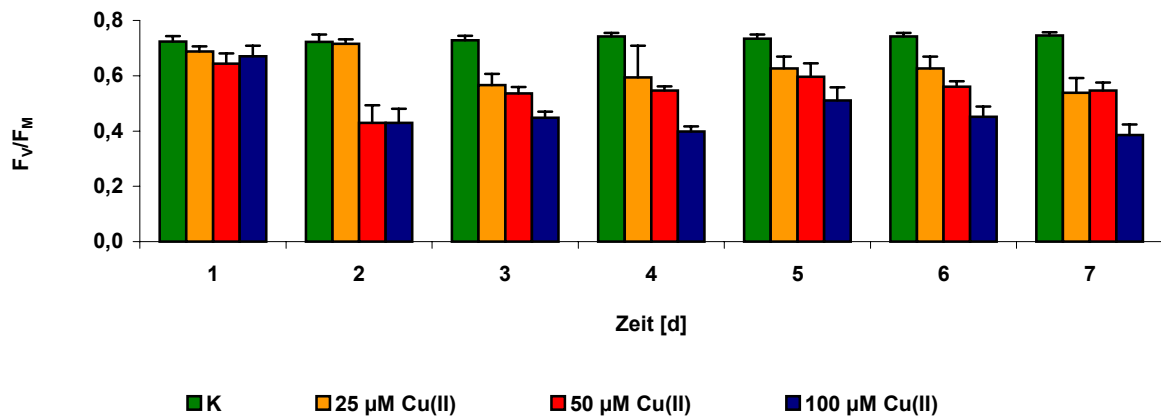


Abb. 7: Vitalität von *Fontinalis antipyretica* während der Kultivierung in Knop-Medium unter Cu(II)-Belastung. Genty-Parameter als F_v/F_m ; $n = 5$.

Ähnlich wie bei Cu(II) kam es auch unter Cd(II)-Belastung mit steigender Konzentration zu einer zeitlich früheren Abnahme der Vitalität (Abb. 8). Nach Applikation von 25 µM sanken die Werte signifikant erst ab dem vierten Versuchstag, bei 50 µM und 100 µM aber bereits ab dem dritten bzw. ersten Tag. Die drei Belastungsvarianten wiesen zu Versuchsende Genty-Parameter von 0,54 (72 %), 0,52 (69 %) und 0,56 (61 %) auf.

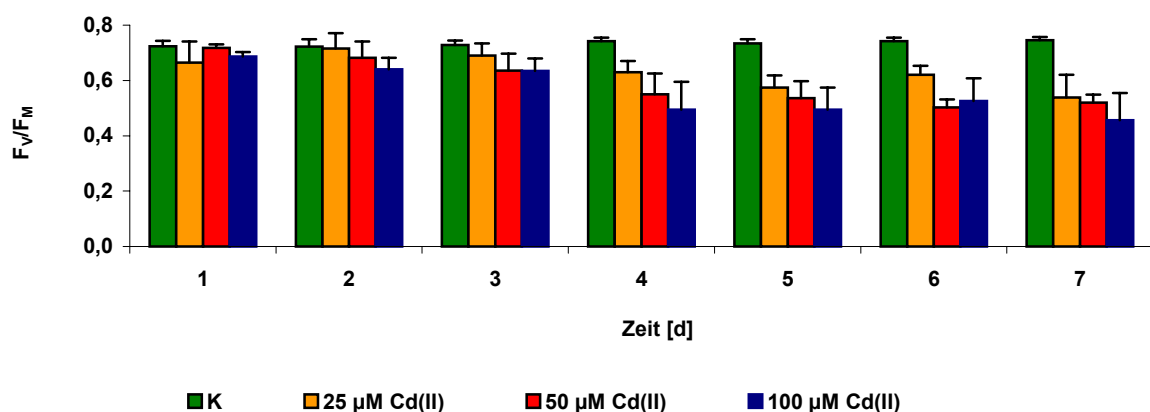


Abb. 8: Vitalität von *Fontinalis antipyretica* während der Kultivierung in Knop-Medium unter Cd(II)-Belastung. Genty-Parameter als F_v/F_m ; $n = 5$.

Damit zeigten die Konzentrationen 25 μM und 50 μM von Cu(II) und Cd(II) eine vergleichbare Toxizität nach sieben Tagen. Die Höchstkonzentration 100 μM führte bei Cd(II) zu einem geringeren Vitalitätsverlust als bei Cu(II).

Im Gegensatz zu den Schwermetallen Cu(II) und Cd(II) wirkten sich Pb(II) und Zn(II) nicht nachweisbar auf die Vitalität des Moores aus. Alle Konzentrationsvarianten zeigten über den gesamten Versuchszeitraum gegenüber den Kontrollen nicht signifikant veränderte Werte (Abb. 9 und 10).

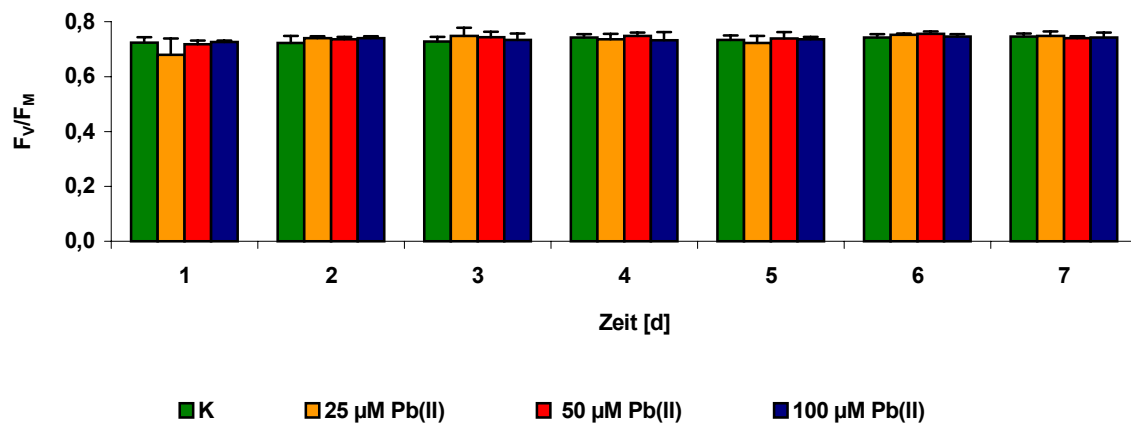


Abb. 9: Vitalität von *Fontinalis antipyretica* während der Kultivierung in Knop-Medium unter Pb(II)-Belastung. Genty-Parameter als F_v/F_m ; $n = 5$.

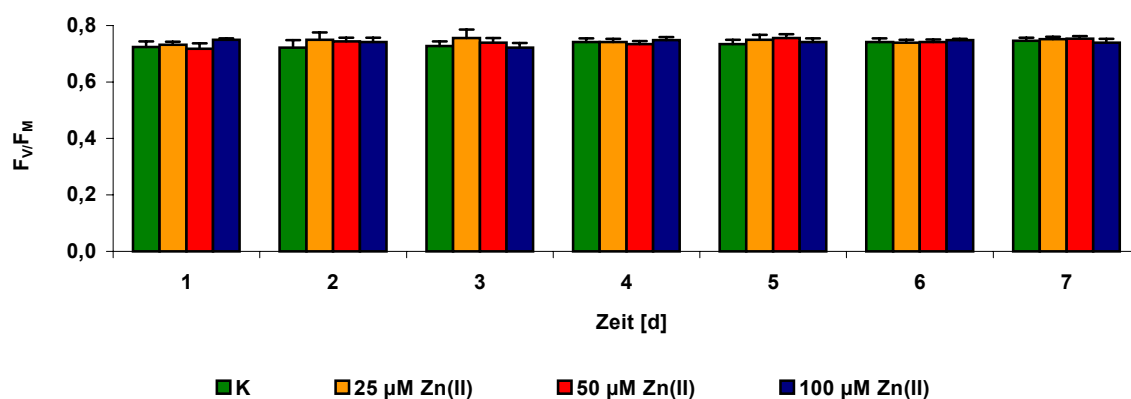


Abb. 10: Vitalität von *Fontinalis antipyretica* während der Kultivierung in Knop-Medium unter Zn(II)-Belastung. Genty-Parameter als F_v/F_m ; $n = 5$.

3.2 Intrazelluläre Schwermetallaufnahme durch *Fontinalis antipyretica*

Ziel dieses Versuches war die Darstellung des intrazellulären Aufnahmeverhaltens von *Fontinalis antipyretica* gegenüber Cu(II), Cd(II), Pb(II) und Zn(II) in Abhängigkeit von Zeit und Konzentration. Zudem ermöglichten die ermittelten Daten eine detailliertere Diskussion der Ergebnisse nachfolgender Versuche im Hinblick auf den Einfluss des intrazellulären Gehaltes an Schwermetall.

Das Moosmaterial (November 1999) wurde mit CuCl₂, CdCl₂, PbCl₂ und ZnCl₂ in den Konzentrationen 25 µM, 50 µM und 100 µM über einen Zeitraum von einem Tag bis sieben Tage exponiert (Kap. 2.1.4). Die eingesetzten Konzentrationen entsprachen einer absoluten Stoffmenge an Cu(II), Cd(II), Pb(II) und Zn(II) von 5 µmol, 10 µmol und 20 µmol pro 2 g FM in 200 ml Knop-Medium. Die Analyse der intrazellulären Schwermetallgehalte (Anhang Tab. 3) erfolgte mittels AAS (Kap. 2.3.3).

3.2.1 Intrazelluläre Aufnahme von Kupfer

Die Proben aller drei Konzentrationen zeigten eine schnelle intrazelluläre Aufnahme am ersten Tag und eine langsame, aber stetige Steigerung der Cu(II)-Gehalte bis zum Versuchsende am siebenten Tag (Abb. 11).

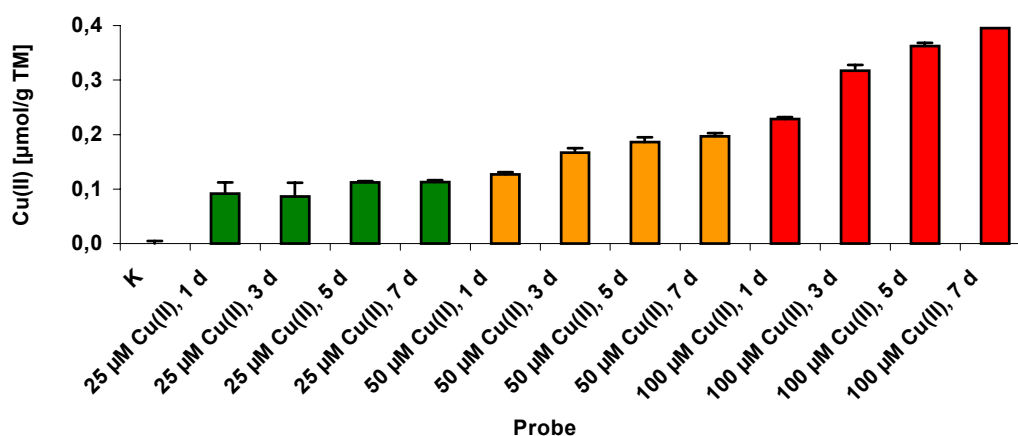


Abb. 11: Intrazelluläre Schwermetallaufnahme von *Fontinalis antipyretica* nach Belastung mit 25 µM, 50 µM und 100 µM CuCl₂. Analyse der Schwermetallgehalte mittels AAS; n = 3.

Bei einer Applikation von 25 μM Cu(II) waren zu diesem Zeitpunkt von den Zellen 0,11 μmol Cu(II)/g TM (2,3 % des verfügbaren Cu(II)) aufgenommen. Die Belastung mit 50 μM sowie 100 μM Cu(II) führte zu einem signifikanten Anstieg des intrazellulären Schwermetalls im gesamten Versuchszeitraum. Nach sieben Tagen waren 0,20 μmol Cu(II)/g TM bzw. 0,40 μmol Cu(II)/g TM aufgenommen, dies entspricht 3,9 % bzw. 7,9 % des verfügbaren Cu(II). Der Cu(II)-Gehalt der Kontrollproben war mittels AAS nicht nachweisbar, lag somit unterhalb der Nachweisgrenze von 0,16 $\mu\text{mol/l}$.

3.2.2 Intrazelluläre Aufnahme von Cadmium

Wie in der Abbildung 12 dargestellt, wurde eine konzentrations- und zeitabhängige, intrazelluläre Zunahme an Cd(II) bei allen drei Belastungsvarianten ermittelt. Maximalgehalte an Cd(II) wurden stets nach sieben Tagen nachgewiesen. Allerdings zeigten die Proben unter 25 μM Cd(II)-Belastung nach drei Versuchstagen einen nur schwachen Anstieg bis auf 0,06 $\mu\text{mol/g}$ TM, das entspricht 1,3 % des verfügbaren Cd(II). Eine signifikante Erhöhung des intrazellulären Cd(II)-Gehaltes über den Versuchszeitraum wies das Moos nach Inkubation mit 50 μM und 100 μM Cd(II) auf. Die ermittelten Höchstwerte lagen bei 0,10 $\mu\text{mol/g}$ TM (1,0 %) und 0,14 $\mu\text{mol/g}$ TM (0,7 %). In Kontrollmaterial wurde mittels AAS 0,01 $\mu\text{mol/g}$ TM Cd(II) nachgewiesen.

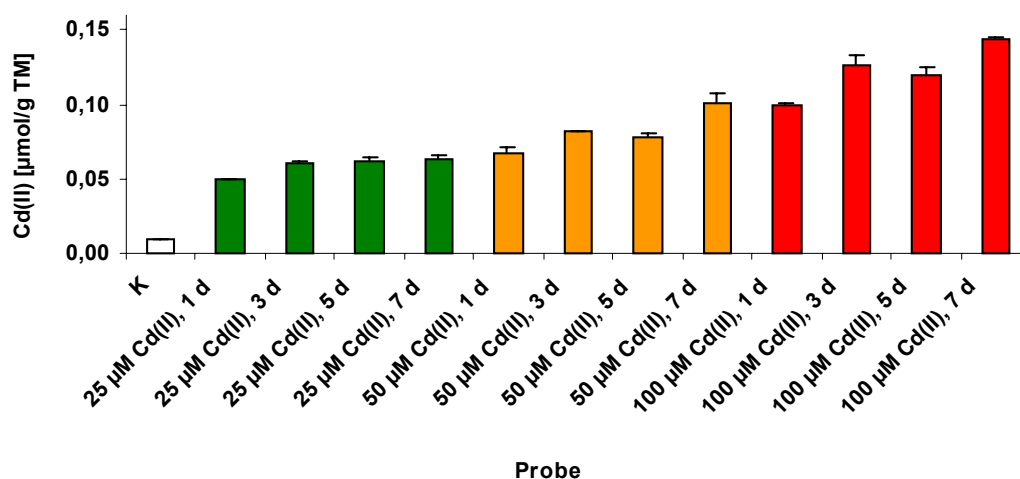


Abb. 12: Intrazelluläre Schwermetallaufnahme von *Fontinalis antipyretica* nach Belastung mit 25 μM , 50 μM und 100 μM CdCl₂. Analyse der Schwermetallgehalte mittels AAS; n = 3.

3.2.3 Intrazelluläre Aufnahme von Blei

Sowohl unter 25 μM und 50 μM als auch unter 100 μM Belastung war die Pb(II)-Aufnahme im Wesentlichen nach drei Tagen abgeschlossen. Im weiteren Versuchszeitraum stiegen die Werte nur leicht bis zum siebenten Tag auf 0,12 $\mu\text{mol/g}$ TM (2,3 %), 0,20 $\mu\text{mol/g}$ TM (2,0 %) bzw. 0,33 $\mu\text{mol/g}$ TM (1,6 %) an (Abb. 13). In Kontrollproben wurden Pb(II)-Gehalte von 0,01 $\mu\text{mol/g}$ TM nachgewiesen.

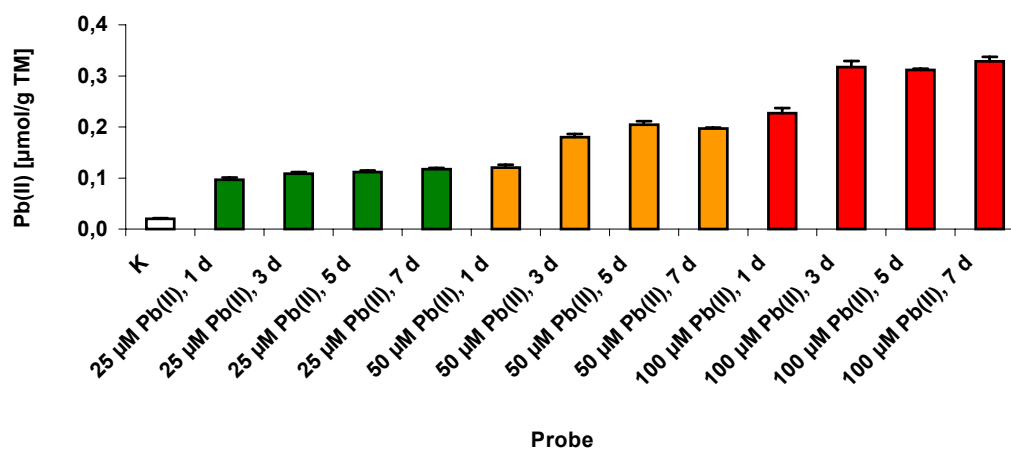


Abb. 13: Intrazelluläre Schwermetallaufnahme von *Fontinalis antipyretica* nach Belastung mit 25 μM , 50 μM und 100 μM PbCl_2 . Analyse der Schwermetallgehalte mittels AAS; $n = 3$.

3.2.4 Intrazelluläre Aufnahme von Zink

Die Moosproben unter 25 μM und 50 μM Zn(II)-Belastung wiesen im Versuchszeitraum einen stetig steigenden Gehalt an Zn(II) auf (Abb. 14). Maximalwerte von 0,07 $\mu\text{mol/g}$ TM (1,4 %) und 0,10 $\mu\text{mol/g}$ TM (1,0 %) wurden ermittelt. Auf die Applikation von 100 μM Zn(II) reagierten die Proben mit einem signifikanten Anstieg des Zn(II)-Gehaltes bis zum siebenten Tag. Der Höchstwert lag hier bei 0,19 $\mu\text{mol/g}$ TM, dies entsprach einer Aufnahme von 1,0 % des verfügbaren Zn(II). Das Kontrollmaterial enthielt 0,02 $\mu\text{mol/g}$ TM Zn(II).

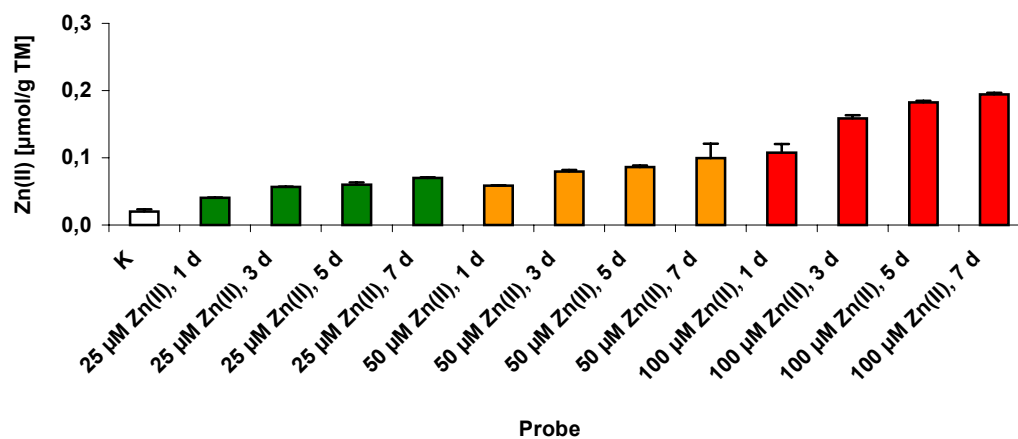


Abb. 14: Intrazelluläre Schwermetallaufnahme von *Fontinalis antipyretica* nach Belastung mit 25 µM, 50 µM und 100 µM ZnCl₂. Analyse der Schwermetallgehalte mittels AAS; n = 3.

3.3 Untersuchungen zur zellulären Lokalisation und zum Bindungsstatus von Kupfer in *Fontinalis antipyretica*

3.3.1 Intrazelluläre Elementverteilung

Die Elementzusammensetzungen elektronendichter Niederschläge der Zellwände, des Zytoplasmas, der Plastiden und Vakuolen wurden von Kontrollproben und Cu(II)-belastetem Material (50 µM, 5 d) anhand von EDX-Spektren untersucht. Die Kultivierung der Moosproben (Januar 1999) sowie die Schwermetallzugabe erfolgten wie in Kapitel 2.1.3 und 2.1.4 beschrieben. Der in den Spektren stets auftretende Ti-Peak wird durch das Proben-Trägernetzchen aus Titan verursacht und ist nicht Bestandteil der Probe.

Die Elementanalyse der Niederschläge innerhalb der Zellwand wies in Kontrollproben Si, Sn, P, Ca, Cu sowie Spuren von Fe nach. In Cu(II)-belasteten-Proben wurden zusätzlich Cl und Zn gemessen (Abb. 15).

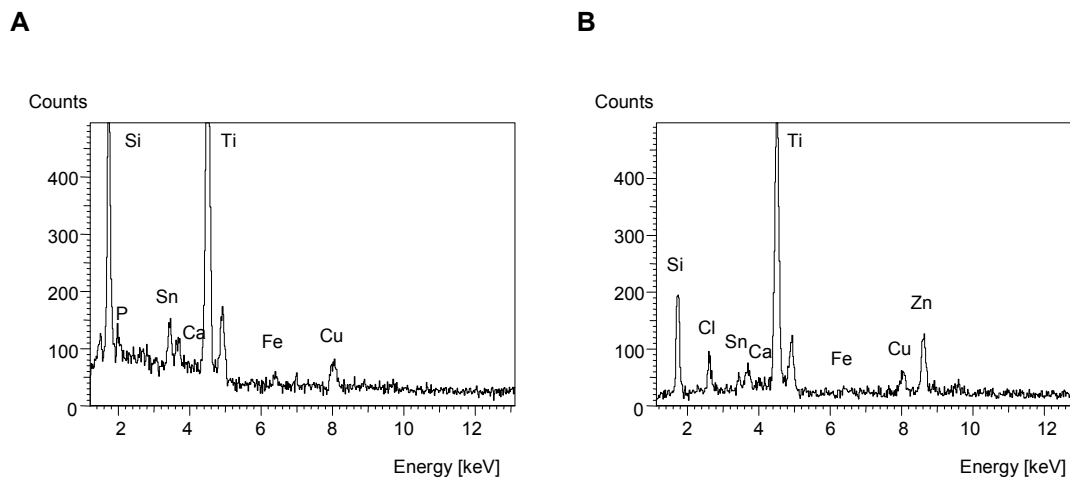


Abb. 15: EDX-Spektren der Niederschläge aus der Zellwand von *Fontinalis antipyretica*. **A:** K 5 d; **B:** 50 µM Cu(II), 5 d.

Die Niederschläge im Zytoplasma der Kontrollproben setzten sich aus folgenden Elementen zusammen: Si, P, S, Cl, Ca und Sn sowie Spuren von Fe, Cu und Zn. Die Cu(II)-belasteten Proben wiesen eine ähnliche Elementverteilung auf. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Cu(II)-Applikation nicht zu einer Anreicherung an Cu aber zu einer verringerten Konzentration an S im Zytoplasma führt (Abb. 16). Auch die Messungen in den Niederschlägen der Plastiden (Abb. 17) zeigten eine ähnliche Verteilung der Elemente Si, P und S in Kontrollen und belasteten Proben.

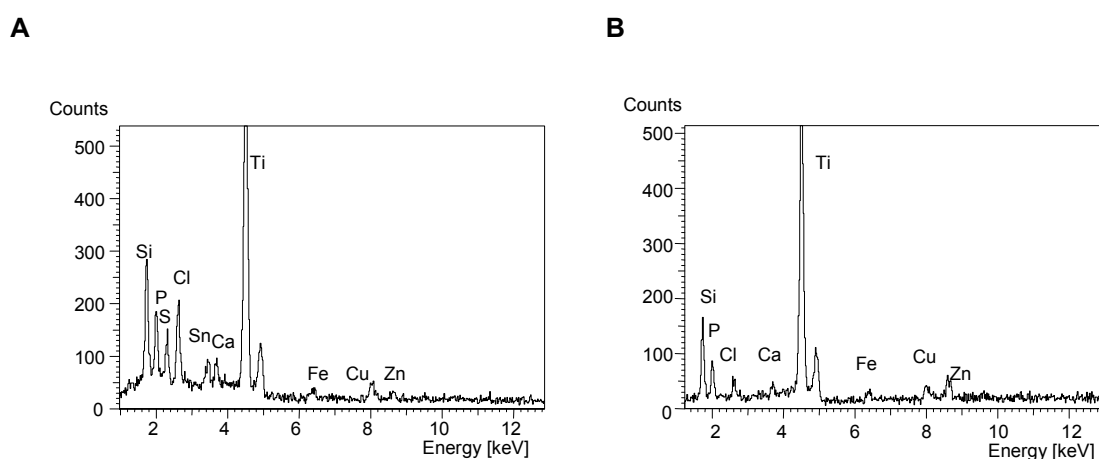


Abb. 16: EDX-Spektren der Niederschläge aus dem Zytoplasma von *Fontinalis antipyretica*. **A:** K 5 d; **B:** 50 µM Cu(II), 5 d.

Auffällig hierbei war die hohe Konzentration von Cu im Kontrollmaterial, die zusätzlich nach der Cu(II)-Applikation stark anstieg. Das Element Cl war nur in belasteten Proben in außergewöhnlich hoher Konzentration nachzuweisen.

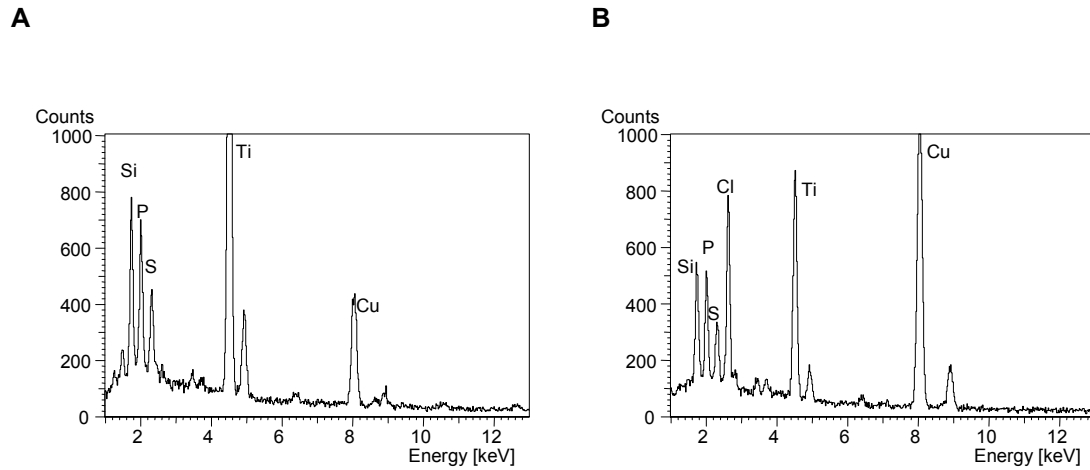


Abb. 17: EDX-Spektren der Niederschläge aus den Plastiden von *Fontinalis antipyretica*.
A: K 5 d; B: 50 µM Cu(II), 5 d.

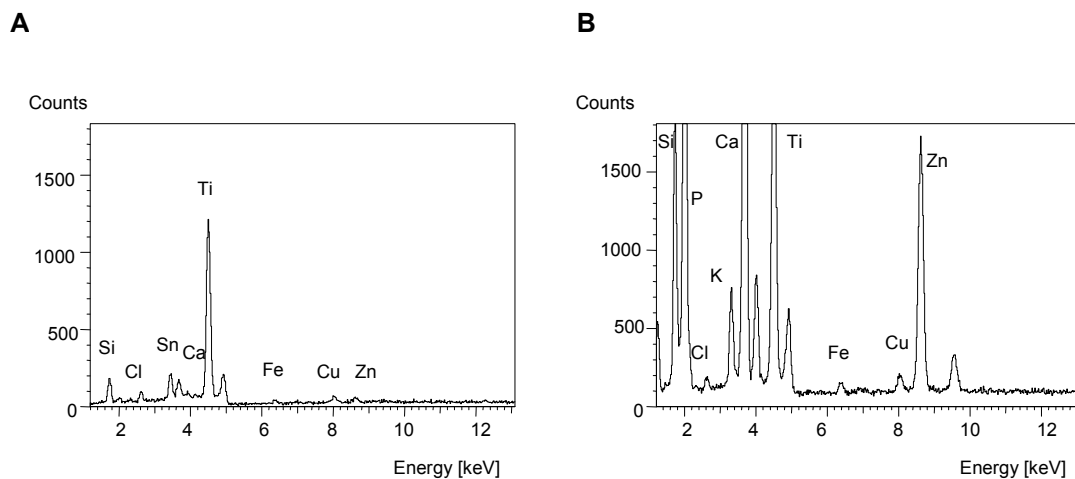


Abb. 18: EDX-Spektren der Niederschläge aus der Vakuole von *Fontinalis antipyretica*.
A: K 5 d; B: 50 µM Cu(II), 5 d.

In den Vakuolen von Kontrollmaterial wurden die Elemente Si, Sn, Ca und Spuren von Fe, Cu, Cl und Zn gemessen. Ein auffällig verändertes Spektrum zeigten die Vakuolen Cu(II)-

belasteter Proben. Sie enthielten hohe Konzentrationen an Si, P, K, Ca und Zn aber auch Fe und Cu (Abb. 18).

3.3.2 Der Bindungsstatus von Kupfer in Zytoplasma und Vakuole

Zur Bestimmung des Bindungszustandes von Kupfer innerhalb des Zytoplasmas und der Vakuolen belasteter Proben wurden EEL-Spektren aufgenommen. Anhand von EDX-Messungen wurde im Zytoplasma das Element S (Abb. 16) nachgewiesen. Dessen Bedeutung als möglicher Cu(II)-Bindungspartner wurde durch Vergleich mit dem EEL-Spektrum eines Cu-GSH-Standards überprüft. Die Übereinstimmung der Feinstruktur der Schwefel-L_{2,3}-Kante im Energiebereich von 170-180 eV aus Cu-GSH mit dem Spektrum des Zytoplasmas wies auf eine mögliche Bindung des Cu an SH-Gruppen hin (Abb. 19/A).

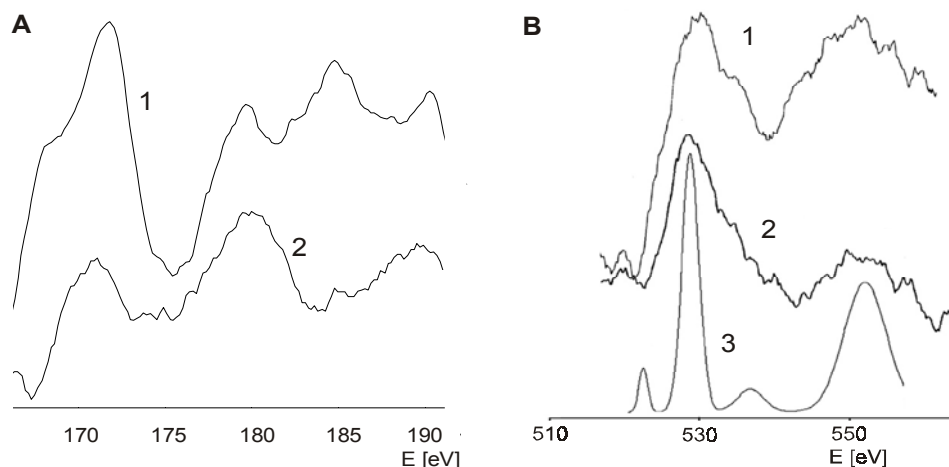


Abb. 19: EEL-Spektren von elektronendichten Niederschlägen aus *Fontinalis antipyretica* nach Exposition mit 50 μM Cu(II), 5d, im Vergleich mit Standardverbindungen und quantenchemischer Kalkulation (Dichte-Funktional-Theorie, DFT). **A:** Zytoplasma: *Fontinalis antipyretica* (1); Cu-GSH-Standard (2); **B:** Vakuole: *Fontinalis antipyretica* (1); Kalziumphosphat (2); DFT-Kalziumphosphat (3).

In den vakuolären Niederschlägen konnte neben Schwermetallen auch ein hoher Gehalt des Elementes P ermittelt werden (Abb. 18). Zur Bestimmung des Bindungszustandes von P wurde, aufgrund seiner geringen Anregungswahrscheinlichkeit das

Energieverlustspektrum der Sauerstoff-K-Ionisationskante aufgenommen. Die Feinstruktur zeigte einen typischen Verlauf, der sowohl mit dem Standardspektrum von Kalziumphosphat als auch mit dessen quantenchemischer Kalkulation (DFT) im Energiebereich von 530 eV-550 eV übereinstimmte (Abb. 19/B). Die Ergebnisse wiesen somit auf eine vakuoläre Cu-Bindung an anorganisches Phosphat hin. Polyphosphat als Cu-Bindungspartner konnte aufgrund differenter Spektren ausgeschlossen werden.

3.4 Charakterisierung schwermetall- und hitzeschockinduzierter Proteine aus *Fontinalis antipyretica*

Der Schwerpunkt der Untersuchung einer möglichen Schwermetall- und Hitzeschockstressantwort von *Fontinalis antipyretica* auf Proteinebene lag auf der Detektion induzierbarer, niedermolekularer Proteine bis ca. 20 kDa.

Das in den folgenden Versuchen verwendete Moosmaterial wurde wie in Kap. 2.1.3 beschrieben kultiviert und mit Schwermetallen exponiert (Kap. 2.1.4) bzw. einem Hitzestress ausgesetzt (Kap. 2.1.5). Analysiert wurden Proteinproben nach Cu(II)-, Cd(II)-, Pb(II)- und Zn(II)-Applikation unterschiedlicher Konzentration (25-100 µM) bzw. nach Hitzestress über einen Zeitraum von vier Stunden, einem Tag und drei Tagen.

3.4.1 Eindimensionale Proteinmuster unter Schwermetalleinfluss, Hitzeschock und nach Hitzefällung (SDS-PAGE)

Die Proteinpellets (Kap. 2.5.1) wurden in Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE (Kap.2.5.5.1) aufgetrennt. In Abbildung 20 sind Proteinmuster typischer eindimensionaler SDS-Gele nach Cu(II)-, Cd(II)-, Pb(II)- oder Zn(II)-Belastung mit 50 µM dargestellt. Der Vergleich der Bandenmuster schwermetall-exponierter Proben zeigte eine, vermutlich kultivierungsbedingt, induzierte Proteinbande im Bereich von ca. 50 kDa (Bande A) und ca. 45 kDa (Bande B) in Kontroll- als auch in schwermetallbelasteten Proben der Kulturversuche über vier Stunden, einen Tag und drei Tage, nicht aber in unkontrollierten Kontrollproben (K frisch). Dem gegenüber trat eine ca. 14 kDa-Bande in K frisch verstärkt auf (nicht bezeichnet). Eine ca. 70 kDa-Bande (Bande C) wurde in allen kultivierten Kontrollen sowie in den Proben der Schwermetallvarianten festgestellt.

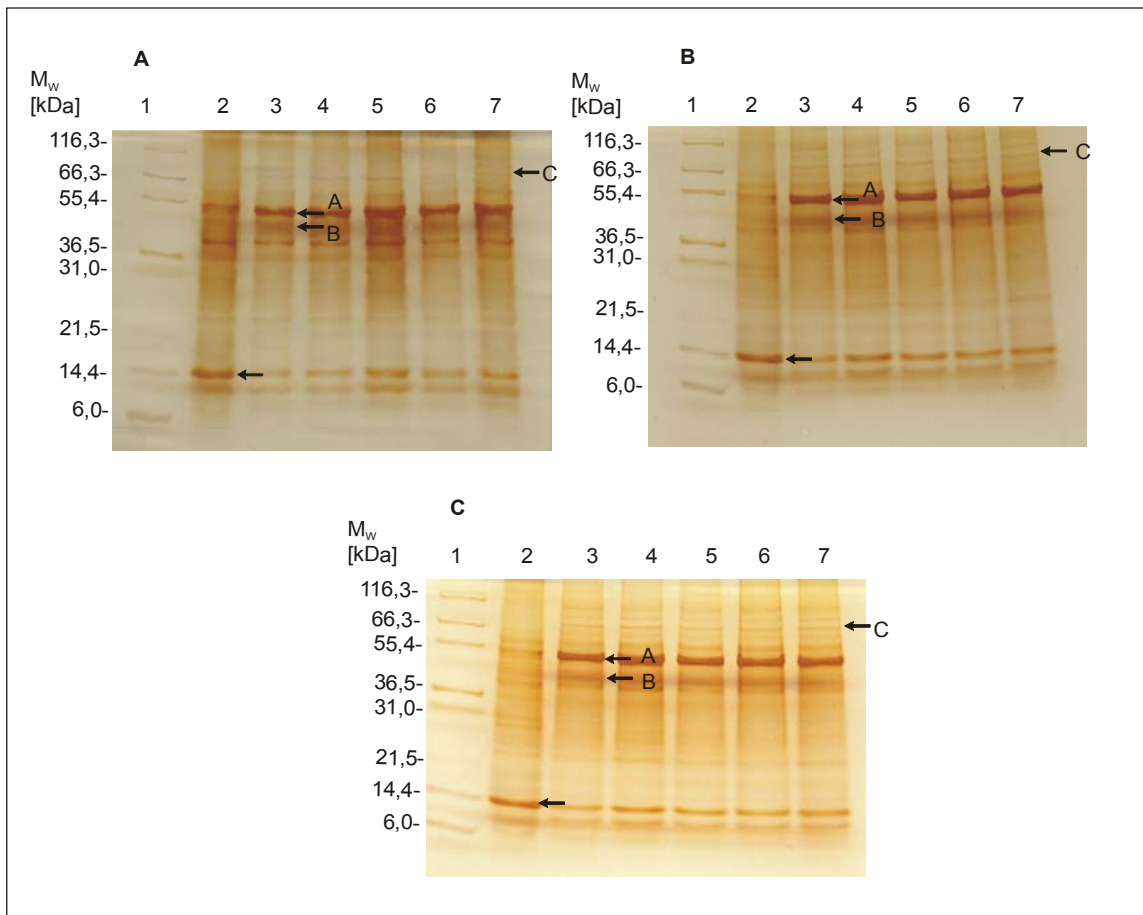


Abb. 20: Eindimensionale Trennung pufferlöslicher Proteine aus *Fontinalis antipyretica* nach Schwermetallapplikation (50 μ M) durch SDS-PAGE. Folgende Bedingungen wurden gewählt: 10-20%iges Tris/Tricin-Gradientengel, 10 μ g Protein pro Spur, Silberfärbung.

Spur 1: jeweils Molekulargewichtsmarker (Wide Range Protein Standard, NOVEX).

A: 4 h; Spur 2: K frisch; Spur 3: K; Spur 4: Cu(II); Spur 5: Cd(II); Spur 6: Pb(II); Spur 7: Zn(II).

B: 1 d; Spur 2: K frisch; Spur 3: K; Spur 4: Cu(II); Spur 5: Cd(II); Spur 6: Pb(II); Spur 7: Zn(II).

C: 3 d; Spur 2: K frisch; Spur 3: K; Spur 4: Cu(II); Spur 5: Cd(II); Spur 6: Pb(II); Spur 7: Zn(II).

Zur speziellen Detektion von hitzeschockinduzierten Metallothioneinen (Murphy et al., 1995) wurde das Moos einem Hitzestress (Kap. 2.1.5) ausgesetzt. In der Abbildung 21 sind SDS-Gele hitzeschockexponierter Proben dargestellt. Eine verstärkte Expression von Proteinen im niederen Molekulargewichtsbereich konnte nur in K 30 °C, 1 d (Bande D, ca. 10 kDa) nachgewiesen werden. Die Proteinbanden A und B im Bereich von ca. 50 kDa und ca. 45 kDa traten temperaturunabhängig in allen Proben dieses Versuches auf.

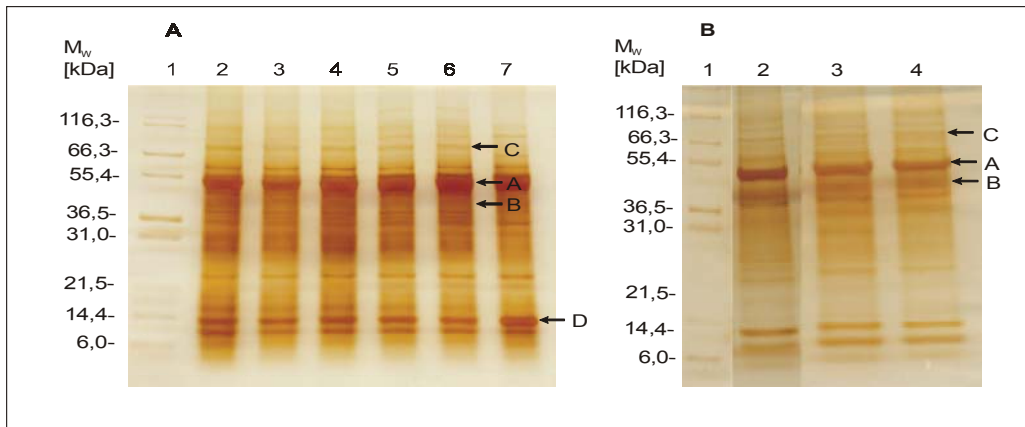


Abb. 21: Eindimensionale Trennung pufferlöslicher Proteine aus *Fontinalis antipyretica* nach Hitzeschock durch SDS-PAGE. Folgende Bedingungen wurden gewählt: 10-20%iges Tris/Tricin-Gradientengel, 15 µg Protein pro Spur, Silberfärbung.

Spur 1: jeweils Molekulargewichtsmarker (Wide Range Protein Standard, NOVEX).

A: 4 h und 1 d; Spur 2: K 10 °C 4 h; Spur 3: K 20 °C 4 h; Spur 4: K 30 °C, 4 h; Spur 5: K 10 °C, 1 d; Spur 6: K 20 °C, 1 d; Spur 7: K 30 °C, 1 d.

B: 3 d; Spur 2: K 10 °C; Spur 3: K 20 °C; Spur 4: K 30 °C.

Weiterhin war die Expression der Proteinbande bei ca. 70 kDa (Bande C) in allen Zeit- und Temperaturvarianten ersichtlich (Abb. 21). Auch ein langfristiger Hitzestress von 30 °C führte zu keiner sichtbaren Veränderung des Proteinmusters.

Die von McCormick et al. (1991) beschriebene Isolierung von Metallothioneinen mittels Hitzefällung wurde an Kontrollen, Cu(II)- und Cd(II)-belasteten Proben (1 d) durchgeführt. Auf diese Weise konnte eine Konzentrierung der hitzestabilen Proteine erreicht werden. Die Abbildung 22 zeigt die typischen Proteinmuster der gelelektrophoretischen Trennung. Infolge der Cu(II)-Exposition kam es in einem Fall zu einer verstärkten Expression eines hitzestabilen Proteins (Bande G; ca. 20 kDa). Dagegen wies die Kontrollprobe eine verstärkte Intensität der Bande bei ca. 30 kDa und 25 kDa sowie der Bande E (ca. 14 kDa) und F (ca. 7 kDa) auf. Eine Proteinbande bei ca. 70 kDa trat nur in der Kontrollprobe auf. Zur näheren Charakterisierung wurde von den Banden E, F und G eine Micro-Sequenzanalyse durchgeführt (Kap. 2.5.10).

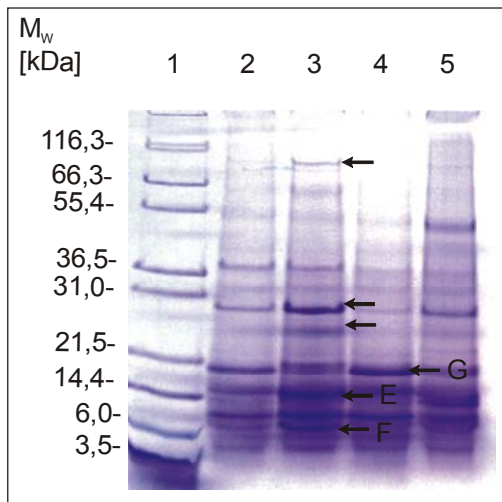


Abb. 22: Eindimensionale Trennung hitzegefällter Proteine aus *Fontinalis antipyretica* durch SDS-PAGE. Folgende Bedingungen wurden gewählt: 10-20%iges Tris/Tricin-Gradientengel, 15 µg Protein pro Spur, Silberfärbung.

Spur 1: Molekulargewichtsmarker (Wide Range Protein Standard, NOVEX).

Spur 2: K frisch; Spur 3: K 1 d; Spur 4: 50 µM Cu(II), 1 d; Spur 5: 50 µM Cd(II), 1 d.

3.4.2 Zweidimensionale Proteinmuster unter Schwermetalleinfluss

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (Kap. 2.5.5.2) ist durch die Kombination von isoelektrischer Fokussierung und SDS-Gelelektrophorese in der Lage, komplexe Proteingemische hochauflösend aufzutrennen und somit das Proteom unter definierten Bedingungen darzustellen. Werden Proteinmuster unterschiedlicher Zustände im subtraktiven Ansatz miteinander verglichen, so können veränderte Muster der Proteinexpression auf beeinflussende Reaktionen hinweisen.

Ziel dieser Untersuchungen war die Detektion schwermetallinduzierbarer Proteine im niederen Molekulargewichtsbereich (bis 20 kDa). Dabei bildete die Reaktion von *Fontinalis antipyretica* (unterschiedliche Probenahmen) hinsichtlich der Expression von Metallothioneinen nach dreitägigem Cu(II)-, Cd(II)-, Pb(II)- oder Zn(II)-Stress den Schwerpunkt.

Das Molekulargewicht pflanzlicher Metallothioneine liegt im Bereich von 4,5 kDa-8,0 kDa (Binz und Kägi, 1999), typische pI-Werte werden mit 4,1 bis 8,6 angegeben (Yang et al., 2000). Entsprechend der Aufgabenstellung diente ein subtraktiver Ansatz, also ein Vergleich von Kontrolle und schwermetallbelasteten Proben, um Differenzen im Proteinmuster aufzuzeigen. Zudem sollten die 2D-Blots aller Proben auf eine positive

Kreuzreaktion mit dem anti-Peptid-AK Metallothionein p2 geprüft werden (Kap. 2.5.7). Grundlage einer späteren 2D-Gel-Analyse war die Erarbeitung eines für das Moos optimalen Protokolls der Probenvorbereitung und Proteintrennung in der ersten und zweiten Dimension. In Vorversuchen wurden für die isoelektrische Fokussierung IPG-Streifen von 11 cm Länge im pH-Wert-Bereich 3-10 sowie 15%ige SDS-Gele (Schägger und Jagow, 1987) der Größe 14 cm x 18 cm getestet. Entsprechend dem charakteristischen Proteinmuster von *Fontinalis antipyretica* wurde eine verbesserte Auflösung mit IPG-Streifen von 7 cm Länge im pH-Wert-Bereich 4-7 und 15%igen SDS-Mini-Gelen erzielt.

Die Bildauswertung erfolgte mit der Software MELANIE 3.05g (GeneBio, Geneva Bioinformatics S. A.). Es wurden die Gele der Proben einer Charge, das heißt Proben gleicher Probennahme, Extraktion und desselben IEF-Laufs analysiert. Als Detektionsparameter für induzierte Spots wurde ein im Vergleich zum äquivalenten Kontrollspot mindestens 5fach erhöhtes Volumen festgelegt.

Im Folgenden sind silbergefärbte 2D-Gele sowie abstrakte Gele (konstruiert aus Kontroll- und Vergleichsgel nach dem Kontroll-Matching) dargestellt. Dabei sind alle identifizierten Spots rot dargestellt. Die im Vergleich zur Kontrolle induzierten Spots (grün) und die im niederen Molekulargewichtsbereich verstärkt exprimierten Proteine (rot) sind mit ihren Spotnummern aufgeführt.

3.4.2.1 Proteinmuster der Kontrolle

Im 2D-Gel der Kontrolle wurden in einem pH-Wert-Bereich von 3,5 bis 7,0 und einem Molekulargewichtsbereich von 6 kDa bis 100 kDa 100 Proteinspots detektiert. Die Abbildung 23 zeigt das 2D-Gel sowie das abstrakte Gel mit der Bezeichnung einzelner Spots, die für weitere Vergleiche mit anderen Proben relevant waren.

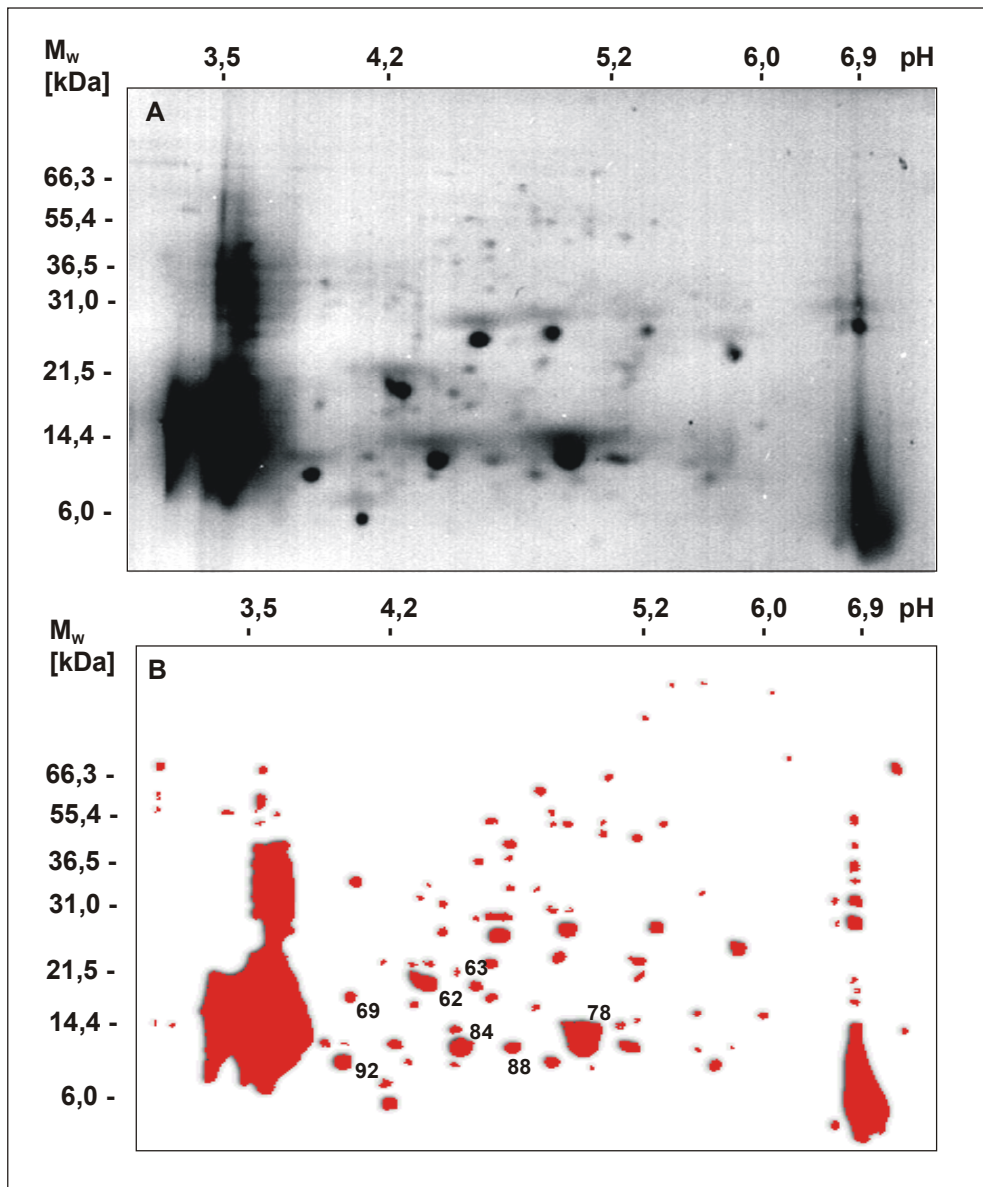


Abb. 23: Darstellung des zweidimensional getrennten Proteinmusters der Probe K 3 d aus *Fontinalis antipyretica*. Bedingungen: IEF: IPG-Streifen, pH-Wert 4-7/7 cm, 100 μ g Protein; SDS-Page: 15%iges Tris/Tricin-Minigel. **A:** Silberfärbung. **B:** abstraktes Gel, Bezeichnung relevanter Spots, die für den quantitativen Vergleich unterschiedlicher Proben herangezogen wurden. Molekulargewichtsmarker: Wide Range Protein Standard (NOVEX). IEF-Marker: SERVA Liquid Mix (SERVA).

3.4.2.2 Proteinmuster unter Kupferbelastung

Infolge der dreitägigen Belastung mit 50 μM Cu(II) wurde ein maximal verändertes Proteinmuster detektiert (Abb. 24). Die Probe zeigte 3 induzierte Proteinspots (pI: 3,9-7,2) im Molekulargewichtsbereich bis 8 kDa (Tab. 3).

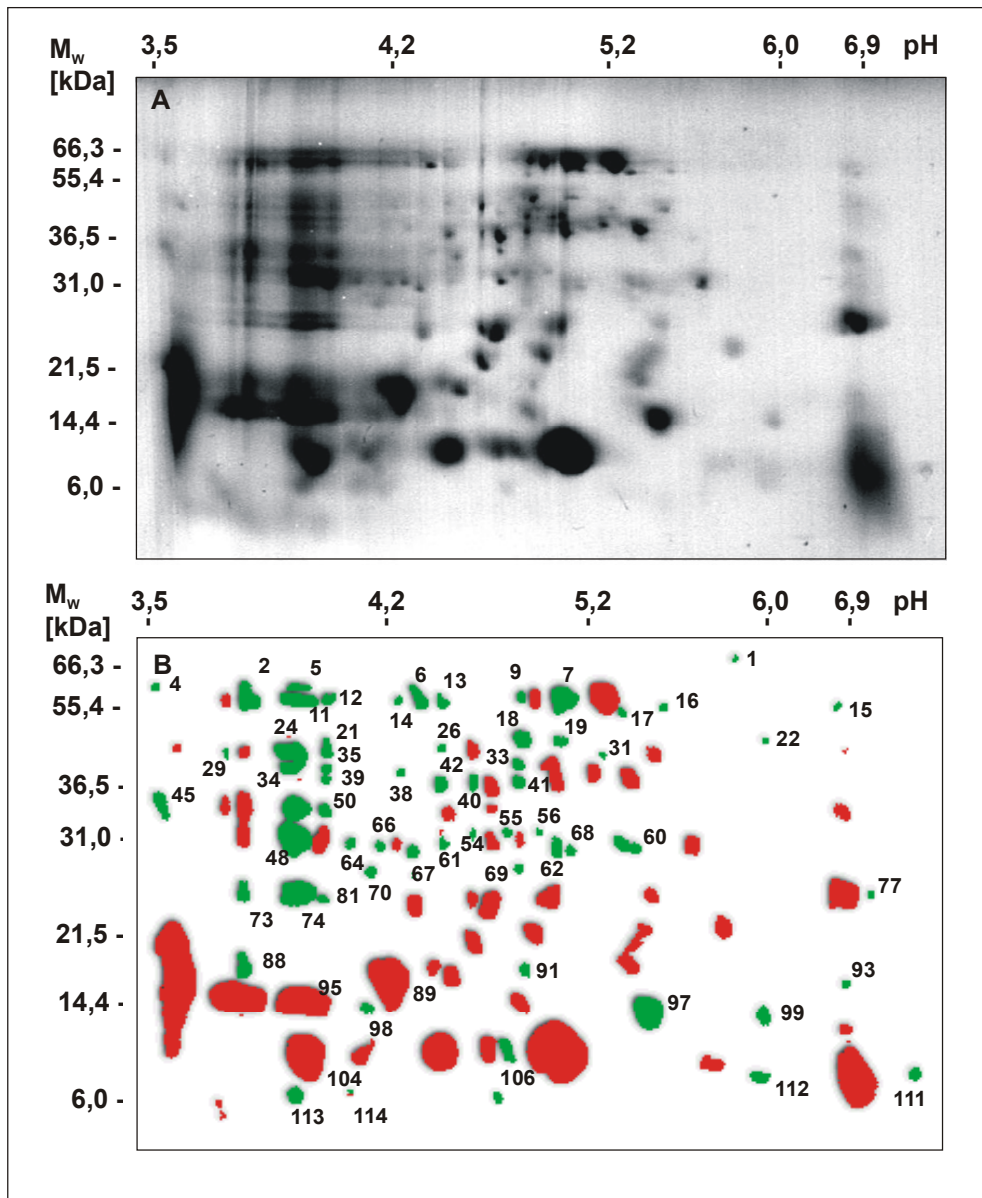


Abb. 24: Darstellung des zweidimensional getrennten Proteinmusters der Probe 50 μM Cu(II), 3 d aus *Fontinalis antipyretica*. Bedingungen: IEF: IPG-Streifen, pH-Wert 4-7/7 cm, 100 μg Protein; SDS-Page: 15%iges Tris/Tricin-Minigel. **A:** Silberfärbung. **B:** abstraktes Gel (nach Kontroll-Match), grüne Spots/Spotnummer: induziert; rote Spots/Spotnummer: verstärkt exprimiert. Molekulargewichtsmarker: Wide Range Protein Standard (NOVEX). IEF-Marker: SERVA Liquid Mix (SERVA).

Im Bereich bis 20 kDa konnten insgesamt 3 verstärkt exprimierte und 10 induzierte Spots mit pI-Werten von 3,8 bis 7,2 nachgewiesen werden. Die Gesamtspotzahl im pH-Wert-Bereich 3,5 bis 7,0 und dem Molekulargewichtsbereich bis 100 kDa betrug 118.

Tab. 3: Unter Cu(II)-Einfluss verstärkt exprimierte bzw. induzierte Proteine* im Molekulargewichtsbereich bis 20 kDa. Detektion äquivalenter Spots über 2D-Gel-Matching von Cu(II)-belasteter Probe und Kontrolle. Software: MELANIE 3.05g (GeneBio, Geneva Bioinformatics S. A.).

Protein/Spotnummer	M _w	pI	Protein/Spotnummer	M _w	pI
88*	18	3,8	99*	13	6,0
89	17	4,2	104	10	4,0
91*	17	5,0	106*	10	4,9
93*	17	6,9	111*	8	7,2
95	15	3,9	112*	8	6,0
97*	14	5,4	113*	7	3,9
98*	14	4,1			

3.4.2.3 Proteinmuster unter Cadmiumbelastung

Nach dreitägiger Cd(II)-Belastung (50 µM) wies das zweidimensional getrennte Proteinmuster keine Änderung im Molekulargewichtsbereich bis 8 kDa auf (Abb. 25). Insgesamt wurden im pH-Wert-Bereich von 3,5 bis 7,0 und einem Molekulargewichtsbereich bis 100 kDa 86 Proteinspots detektiert. Davon wurden 5 Spots (< 20 kDa) verstärkt exprimiert und 5 induziert (Tab. 4).

Tab. 4: Unter Cd(II)-Einfluss verstärkt exprimierte bzw. induzierte Proteine* im Molekulargewichtsbereich bis 20 kDa. Detektion äquivalenter Spots über 2D-Gel-Matching von Cd(II)-belasteter Probe und Kontrolle. Software: MELANIE 3.05g (GeneBio, Geneva Bioinformatics S. A.).

Protein/Spotnummer	M _w	pI	Protein/Spotnummer	M _w	pI
71*	20	5,6	81*	16	5,5
72	19	4,2	82*	15	4,2
73	19	4,3	83	14	4,4
78*	17	6,2	84	14	4,5
80*	16	6,0	85	14	5,0

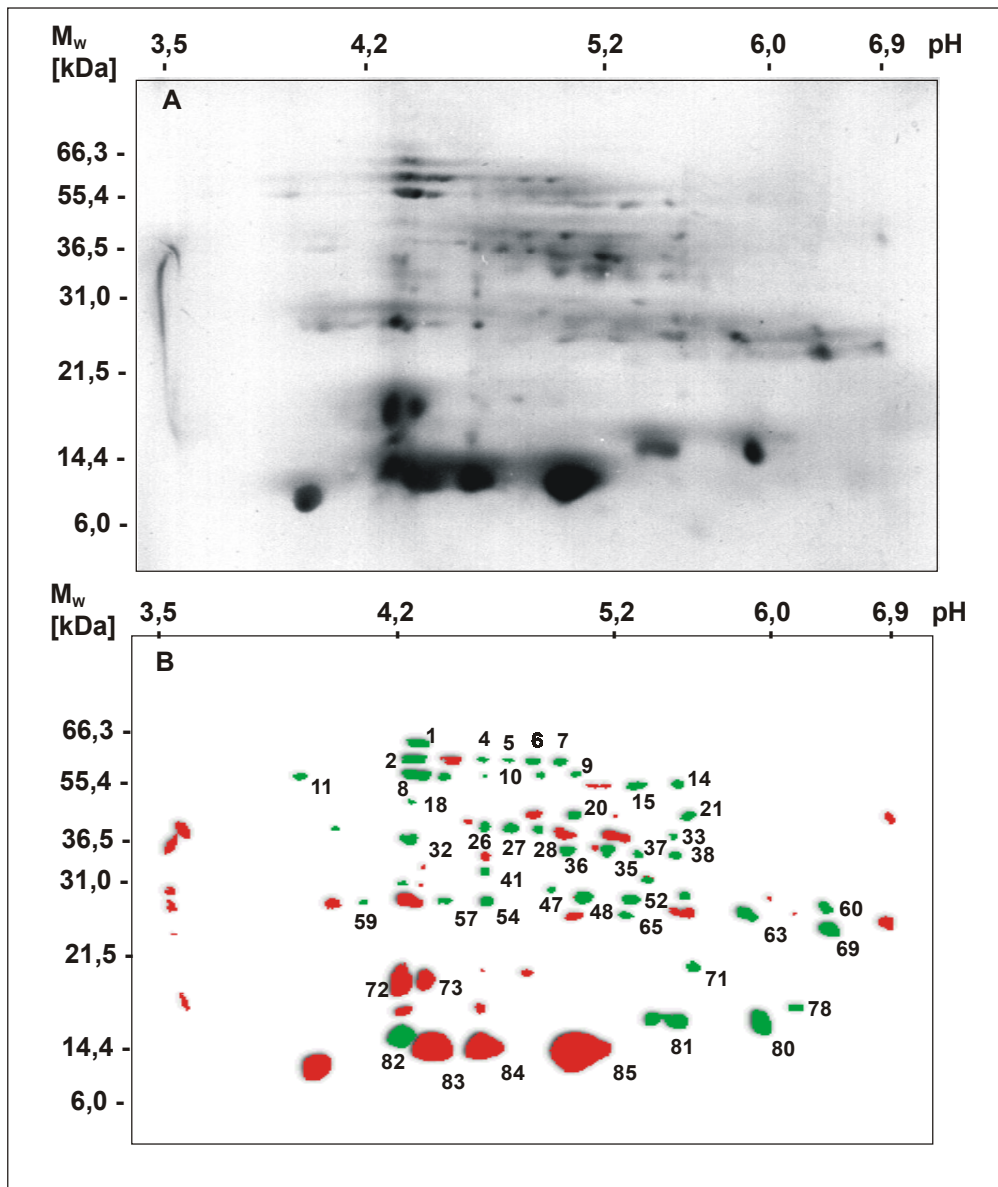


Abb. 25: Darstellung des zweidimensional getrennten Proteinmusters der Probe 50 μM Cd(II), 3 d aus *Fontinalis antipyretica*. Bedingungen: IEF: IPG-Streifen, pH-Wert 4-7/7 cm, 100 μg Protein; SDS-Page: 15%iges Tris/Tricin-Minigel. **A:** Silberfärbung. **B:** abstraktes Gel (nach Kontroll-Match), grüne Spots/Spotnummer: induziert; rote Spots/Spotnummer: verstärkt exprimiert. Molekulargewichtsmarker: Wide Range Protein Standard (NOVEX). IEF-Marker: SERVA Liquid Mix (SERVA).

3.4.2.4 Proteinmuster unter Bleibelastung

Die Probe 50 μM Pb(II), 3 d wies im vorgegebenen pH-Wert- und Molekulargewichtsbereich insgesamt 72 Spots auf, davon 2 verstärkt exprimierte und 2 induzierte Proteine (< 20 kDa) mit pI-Werten von 4,4 und 4,6 (Tab. 5). Im Bereich bis 8 kDa trat kein verändertes Proteinmuster auf (Abb. 26).

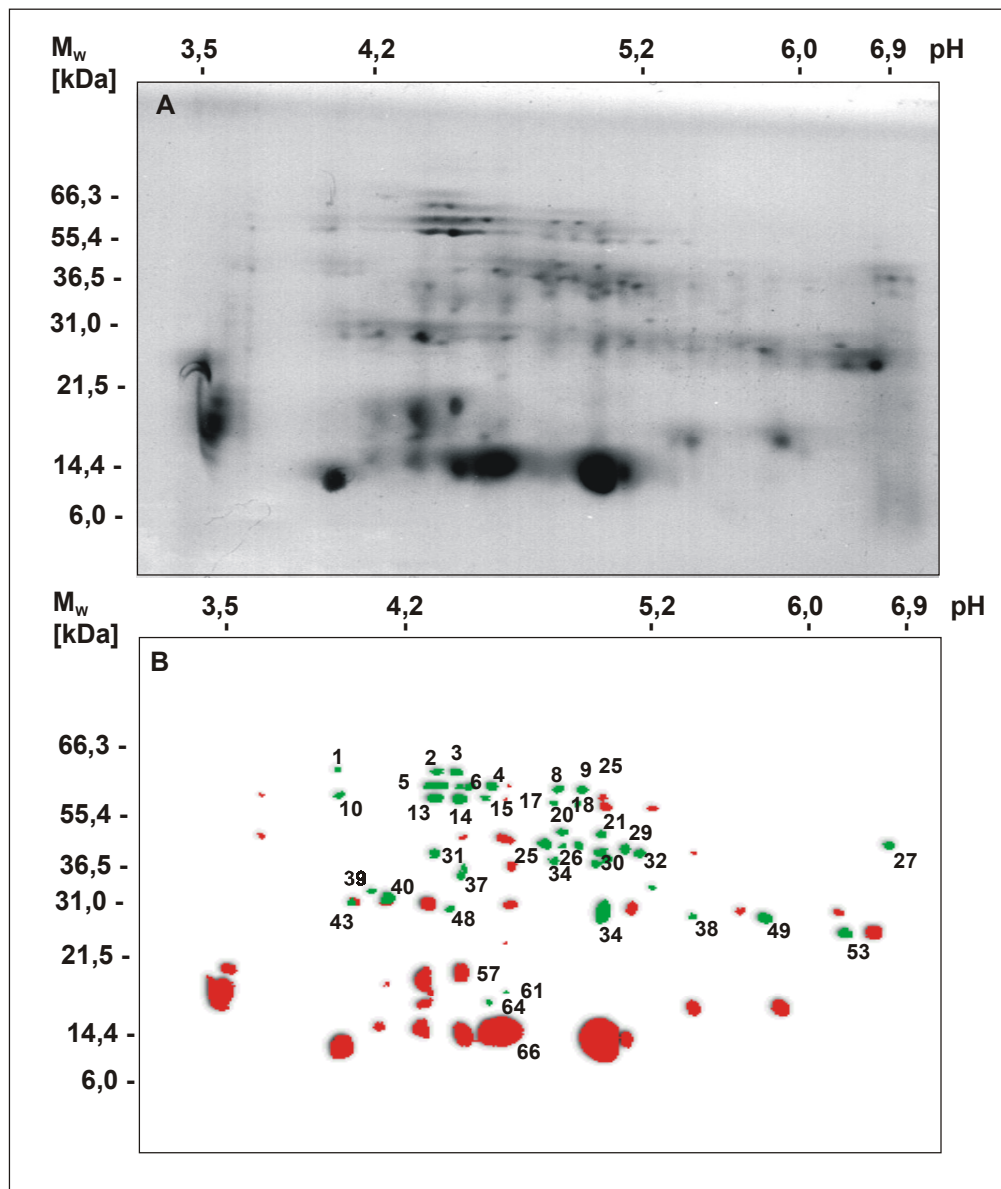


Abb. 26: Darstellung des zweidimensional getrennten Proteinmusters der Probe 50 μM Pb(II), 3 d aus *Fontinalis antipyretica*. Bedingungen: IEF: IPG-Streifen, pH-Wert 4-7/7 cm, 100 μg Protein; SDS-Page: 15%iges Tris/Tricin-Minigel. **A:** Silberfärbung. **B:** abstraktes Gel (nach Kontroll-Match), grüne Spots/Spotnummer: induziert; rote Spots/Spotnummer: verstärkt exprimiert. Molekulargewichtsmarker: Wide Range Protein Standard (NOVEX). IEF-Marker: SERVA Liquid Mix (SERVA).

Tab. 5: Unter Pb(II)-Einfluss verstärkt exprimierte bzw. induzierte Proteine* im Molekulargewichtsbereich bis 20 kDa. Detektion äquivalenter Spots über 2D-Gel-Matching von Pb(II)-belasteter Probe und Kontrolle. Software: MELANIE 3.05g (GeneBio, Geneva Bioinformatics S. A.).

Protein/Spotnummer	M _w	pI	Protein/Spotnummer	M _w	pI
57	20	4,4	64*	16	4,5
61*	18	4,6	66	15	4,6

3.4.2.5 Proteinmuster unter Zinkbelastung

Auch in diesem Versuch zeigte das zweidimensional getrennte Proteinmuster als Reaktion auf die dreitägige Zn(II)-Applikation (50 µM) keine Änderung im Molekulargewichtsbereich bis 8 kDa (Abb. 27). Insgesamt konnten im pH-Wert-Bereich von 3,5 bis 7,0 und einem Molekulargewichtsbereich bis 100 kDa 103 Proteinspots detektiert werden. Davon wurden 5 Spots (< 20 kDa) verstärkt exprimiert und 7 induziert (Tab. 6).

Tab. 6: Unter Zn(II)-Einfluss verstärkt exprimierte bzw. induzierte Proteine* im Molekulargewichtsbereich bis 20 kDa. Detektion äquivalenter Spots über 2D-Gel-Matching von Zn(II)-belasteter Probe und Kontrolle. Software: MELANIE 3.05g (GeneBio, Geneva Bioinformatics S. A.).

Protein/Spotnummer	M _w	pI	Protein/Spotnummer	M _w	pI
89	20	4,3	96*	15	4,2
90	18	4,2	97*	15	4,0
91*	18	4,0	99	12	4,5
92*	15	5,6	101	13	5,2
93*	15	5,5	102*	12	4,2
95*	15	4,4	104	10	3,9

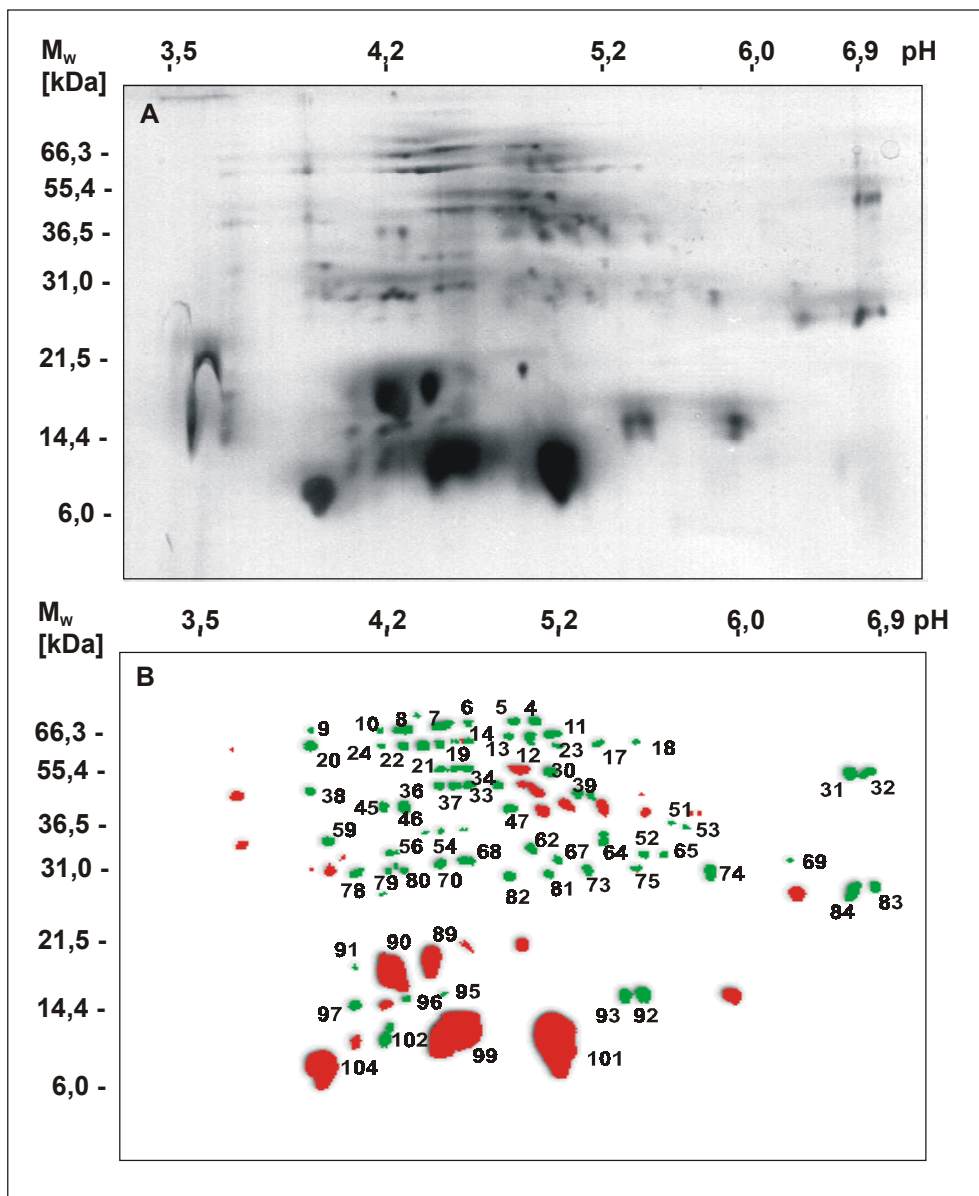


Abb. 27: Darstellung des zweidimensional getrennten Proteinmusters der Probe 50 μM Zn(II), 3 d aus *Fontinalis antipyretica*. Bedingungen: IEF: IPG-Streifen, pH-Wert 4-7/7 cm, 100 μg Protein; SDS-Page: 15%iges Tris/Tricin-Minigel. **A:** Silberfärbung. **B:** abstraktes Gel (nach Kontroll-Match), grüne Spots/Spotnummer: induziert; rote Spots/Spotnummer: verstärkt exprimiert. Molekulargewichtsmarker: Wide Range Protein Standard (NOVEX). IEF-Marker: SERVA Liquid Mix (SERVA).

3.4.3 Antigen-Antikörper-Reaktionen

Ziel dieses Versuches war die immunologische Detektion schwermetall- und hitzeschock-induzierbarer Metallothioneine, Hitzeschockproteine und Cyclophiline in *Fontinalis antipyretica* (verschiedene Probennahmen). Die verwendeten Antikörper sowie deren eingesetzte Verdünnungen sind im Kapitel 2.5.7.1 beschrieben.

Getestet wurde die Reaktion auf folgende Schwermetalle: Cu(II), Cd(II), Pb(II) und Zn(II), jeweils in der Konzentration 50 μ M (Kap. 2.1.4) sowie auf die Temperaturen 20 °C und 30 °C (Kap. 2.1.5). Die jeweiligen Kontrollen bildeten unbelastete Proben, die bei einer Temperatur von 10 °C kultiviert wurden. Für zeitlich differenzierte Aussagen wurden Kurzzeitversuche über vier Stunden und Langzeitversuche über einen Tag und drei Tage durchgeführt. Für quantitative Vergleiche wurden die detektierten Signalintensitäten densitometrisch analysiert und in Prozent [%] zur Kontrolle [100 %] angegeben (Anhang Tab. 4 und 5).

3.4.3.1 Immunreaktion des anti-Peptid-Antikörpers Metallothionein p2

Im Ergebnis der immunologischen Detektion von MT p2-homologen Antigenen in schwermetallexponiertem Material zeigten sowohl Kontrollen als auch Cu(II)-, Cd(II)-, Pb(II)- und Zn(II)-Proben aller Zeitvarianten mit dem anti-Peptid-AK eine positive Kreuzreaktion einer Doppelbande bei ca. 8 kDa (Abb. 28). Zur weiteren Charakterisierung wurde von den entsprechenden Banden des Coomassie-Geles eine Proteinsequenzanalyse durchgeführt (Kap. 3.4.5.2).

Unspezifische Kreuzreaktionen traten nicht auf. Als Positivkontrolle wurde eine MAP-Probe (Kap. 2.5.7.1) eingesetzt, die synthesebedingt mit drei Proteinbanden (ca. 3 kDa, 6 kDa und 14 kDa) positiv kreuzreagierte (Abb. 28/D).

Die Signale des Kurzzeitversuches (Abb. 28/A) deuteten aufgrund der positiven Doppelbande auf zwei konstitutive Proteine, deren Exprimierung nach vierstündiger Zn(II)-, Pb(II)- und Cu(II)-Belastung verringert wurde (59 %, 65 % und 73 %). Im Gegensatz dazu wies die Signalintensität der Cd(II)-Probe (111 %) auf eine verstärkte Synthese der detektierten Proteine hin.

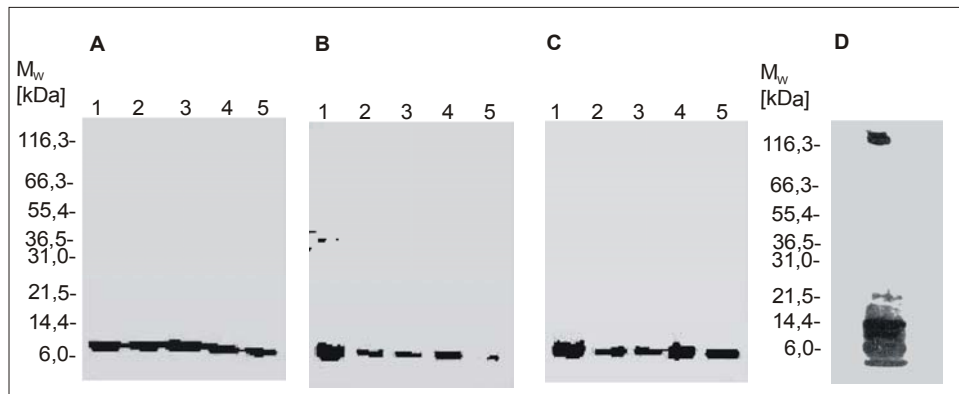


Abb. 28: Immunreaktion des anti-Peptid-Antikörpers Metallothionein p2 mit Proteinen schwermetallbelasteter Proben ($50 \mu\text{M}$) aus *Fontinalis antipyretica*. Eindimensionale Proteintrennung durch SDS-PAGE. Folgende Bedingungen wurden gewählt: 10-20%iges Tris/Tricin-Gradientengel, $10 \mu\text{g}$ Protein pro Spur/MAP $0,5 \mu\text{g}$. Western Blot auf NC-Membran (Kap. 2.5.5.3). Anti-Peptid-AK-Verdünnung in PBS 1:50.000. Detektion mittels Peroxidase gekoppeltem tertiärem AK und ECL-Reagenz (SuperSignal West Dura; PIERCE).

A: 4 h: Spur 1: K; Spur 2: Cu(II); Spur 3: Cd(II); Spur 4: Pb(II); Spur 5: Zn(II).

B: 1 d: Spur 1: K; Spur 2: Cu(II); Spur 3: Cd(II); Spur 4: Pb(II); Spur 5: Zn(II).

C: 3 d: Spur 1: K; Spur 2: Cu(II); Spur 3: Cd(II); Spur 4: Pb(II); Spur 5: Zn(II).

D: Positivkontrolle (MAP).

Eine 24-stündige Applikation der Schwermetalle führte in allen Belastungsvarianten zu einer verminderten Kreuzreaktion (Abb. 28/B). Auch hier zeigte die Zn(II)-Probe im Vergleich zur Kontrolle mit 17 % die schwächste Reaktion, gefolgt von der Cd(II)-Probe mit 30 % und der Cu(II)-Probe mit 47 %. Wiederum trat infolge einer Pb(II)-Belastung die geringste Signalreduktion mit 84 % auf. Dieser Trend wurde durch die Ergebnisse des Langzeitversuches (3 d) bestätigt (Abb. 28/C). Es kam zu einem weiteren Absinken der Signalintensitäten der Cd(II)-, Cu(II)- und Pb(II)-Probe auf 18 %, 24 % und 45 %. Die Zn(II)-Probe wies eine Signalstärke von 23 % auf.

Insgesamt konnte eine schwermetallspezifisch und zeitabhängig verringerte Expressierung der mittels anti-Peptid-AK Metallothionein p2 detektierten Doppelbande bei ca. 8 kDa festgestellt werden. Die Immunoblots der Proben des Hitzeschockversuches sowie der 2D-getrennten Proben des Schwermetallversuches (Kap. 3.4.1 und 3.4.2) wiesen ebenso wie die Proteinfraction der Hitzefällung (Kap. 3.4.1) unter den gegebenen Bedingungen keine positiven Immunreaktionen auf (nicht dargestellt).

3.4.3.2 Immunreaktion des anti-HSP 70-Antikörpers

Eine mögliche Induktion von Hitzeschockproteinen der HSP 70-Familie infolge einer Schwermetallapplikation oder eines Hitzeschocks wurde unter Verwendung eines anti-HSP 70-AK (Kap. 2.5.7.1) überprüft. Als Positivkontrolle wurde eine HSP 70-positive Proteinprobe aus Tabak (*Nicotiana tabacum* L.; 40 °C, 4 h; Frau Dr. O. Lubaretz, Arbeitsgruppe Schwermetallstress; IPB Halle/Saale) verwendet.

An schwermetallexponierten Proben im Kurzzeitversuch konnte anhand der positiven Kreuzreaktion eines Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa die Induktion einer schnellen Stressantwort infolge der 50 µM Cd(II)- oder Cu(II)-Belastung nachgewiesen werden (Abb. 29/A). Die Kreuzreaktion entsprach einer Signalintensität von 4900 % und 2600 % im Vergleich zur Kontrolle, die ebenso wie Pb(II)- und Zn(II)-Proben keine positiven Signale zeigten.

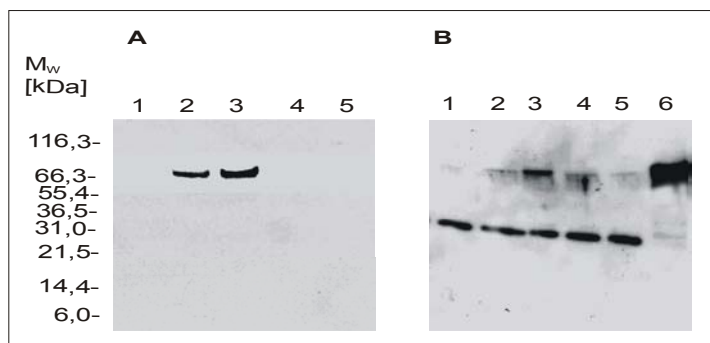


Abb. 29: Immunreaktion des anti-HSP 70-Antikörpers mit Proteinen schwermetallbelasteter Proben (50 µM) aus *Fontinalis antipyretica*. Eindimensionale Proteintrennung durch SDS-PAGE. Folgende Bedingungen wurden gewählt: 10-20%iges Tris/Tricin-Gradientengel, 10 µg Protein pro Spur/MAP 0,5 µg. Western Blot auf NC-Membran (Kap. 2.5.5.3). Anti-Peptid-AK-Verdünnung in PBS 1:5.000. Detektion mittels Peroxidase gekoppeltem tertiärem AK und ECL-Reagenz (SuperSignal West Dura; PIERCE).

A: 4 h: Spur 1: K; Spur 2: Cu(II); Spur 3: Cd(II); Spur 4: Pb(II); Spur 5: Zn(II).

B: 1 d: Spur 1: K; Spur 2: Cu(II); Spur 3: Cd(II); Spur 4: Pb(II); Spur 5: Zn(II); Spur 6: Positivkontrolle Kürbis, 40 °C.

Im Ergebnis des eintägigen Langzeitversuches reagierte die Cd(II)-Probe mit maximaler Signalintensität (700 %) im oben genannten Molekulargewichtsbereich (Abb. 29/B). Schwache Kreuzreaktionen traten bei Cu(II), Pb(II) und Zn(II) auf, die Kontrollprobe zeigte kein Signal. Infolge der Schwermetallbelastung über drei Tage traten keine weiteren

Änderungen auf (nicht gezeigt). Zusätzlich kam es bei allen getesteten Proben der Langzeitversuche zu einer unspezifischen Kreuzreaktion eines Proteins bei ca. 25 kDa. Dies könnte auf eine unspezifische Reaktion der karbonischen Anhydrase zurückzuführen sein (nicht dargestellt; persönliche Mitteilung Herr Dr. J. Miersch).

Es kann somit festgestellt werden, dass das detektierte Protein nicht konstitutiv exprimiert, jedoch unter vierstündiger Cu(II)- und Cd(II)-Belastung induziert wird. Eine Langzeitbelastung führte insbesondere bei Cu(II), bei Cd(II) zeitverzögert, zu verminderten Signalintensitäten der Kreuzreaktion. Pb(II)- und Zn(II)-belastete Proben reagierten mit dem Antikörper nur schwach.

Im Falle von Hitzeschockbehandelten Proben wurde eine zeit- und temperaturabhängige Induktion des mittels anti-HSP 70-AK positiv detektierten Proteins nachgewiesen (Abb. 30). Unspezifische Kreuzreaktionen traten nicht auf. Die Proteine der jeweiligen Kontrollen (10 °C) reagierten mit dem Antikörper nicht. Beide Temperaturvarianten, K 20 °C und K 30 °C, zeigten sowohl im Kurzzeitversuch als auch in beiden Langzeitversuchen eine positive Kreuzreaktion. Die maximal induzierte Signalintensität wurde jeweils nach eintägigem Hitzeschock (2000 % und 3200 %) erreicht. Dabei führte ein Hitzeschock über 30 °C in allen Zeitvarianten zu der stärksten Signalinduktion.

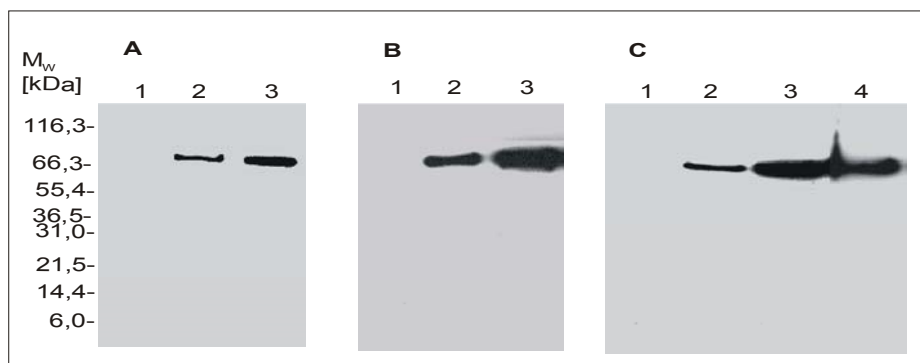


Abb. 30: Immunreaktion des anti-HSP 70-Antikörpers mit Proteinen Hitzeschockbehandelter Proben von *Fontinalis antipyretica*. Eindimensionale Proteintrennung durch SDS-PAGE. Folgende Bedingungen wurden gewählt: 10-20%iges Tris/Tricin-Gradientengel, 10 µg Protein pro Spur/ MAP 0,5 µg. Western Blot auf NC-Membran (Kap. 2.5.5.3). Anti-Peptid-AK-Verdünnung in PBS 1:50.000. Detektion mittels Peroxidase gekoppeltem tertiärem AK und ECL-Reagenz (SuperSignal West Dura; PIERCE).

A: 4 h: Spur 1: K 10 °C; Spur 2: K 20 °C; Spur 3: K 30 °C.

B: 1 d: Spur 1: K 10 °C; Spur 2: K 20 °C; Spur 3: K 30 °C.

C: 3 d: Spur 1: K 10 °C; Spur 2: K 20 °C; Spur 3: K 30 °C; Spur 4: Positivkontrolle Kürbis, 40 °C.

Da der eingesetzte AK sehr spezifisch mit cytosolischem HSP 70-Protein kreuzreagiert (Neumann et al., 1987), wurde auf eine weitere Charakterisierung der detektierten Bande verzichtet.

3.4.3.3 Immunreaktion des anti-HSP 17-Antikörpers

Die Induktion von Hitzeschockproteinen der HSP 17-Familie infolge einer Schwermetallapplikation oder eines Hitzeschocks wurde unter Verwendung des anti-HSP 17-AK (Kap. 2.5.7.1) überprüft. Als Positivkontrolle wurde eine HSP 17-positive Proteinprobe aus Tabak (*Nicotiana tabacum* L.; 40 °C, 4 h; Frau Dr. O. Lubaretz, Arbeitsgruppe Schwermetallstress; IPB Halle/Saale) verwendet.

Sowohl im Kurzzeit- als auch im Langzeitversuch wurde in allen untersuchten Proben (mit Ausnahme der Positivkontrolle) keine positive Kreuzreaktion im Molekulargewichtsbereich von ca. 17 kDa nachgewiesen (nicht dargestellt).

3.4.3.4 Immunreaktion des anti-Peptid-Antikörpers Cyclophilin 18

Die Prüfung einer möglichen Cyclophilin-Induktion infolge der Schwermetallbelastung erfolgte mit Hilfe eines anti-Peptid-AK gegen Cyclophilin-Konsensussequenzen (Kap. 2.5.7.1). Als Positivkontrolle wurde humanes Cyclophilin 18 verwendet.

Die Proben des Kurzzeit- als auch des Langzeitversuches zeigten im Gegensatz zur Positivkontrolle keine positive Kreuzreaktion mit dem AK im Molekulargewichtsbereich von ca. 18 kDa. Unspezifische Kreuzreaktionen traten jedoch bei ca. 30 kDa-55 kDa auf (nicht dargestellt).

3.4.4 Affinitätschromatographie

3.4.4.1 Isolierung schwermetallbindender Proteine mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die IMAC stellte die erste Reinigungsstufe zur Anreicherung schwermetallbindender und cysteinhaltiger Proteine im niederen Molekulargewichtsbereich dar. Aufgrund der hohen Affinität der Cu(II)-Ionen gegenüber den Aminosäuren Cystein, Histidin und Tryptophan, wurde Cu(II) als immobilisiertes Metallion (Kap. 2.5.8.2) eingesetzt.

In Anlehnung an Murphy et al. (1997) erfolgte die Induktion der oben erwähnten Proteine mit 50 μM Cu(II) im Langzeitversuch über drei Tage unter den in Kapitel 2.1.4 beschriebenen Bedingungen. Untersucht wurden sowohl Cu(II)-belastete Proben als auch Kontrollen derselben Probennahme.

Der Proteingehalt der Eluate (Anhang Tab. 6) der Proben K 3 d und 50 μM Cu(II), 3 d betrug durchschnittlich 0,14 % bzw. 0,15 % des applizierten Gesamtproteins und lag somit im von Murphy et al. (1997) angegebenen Bereich. Die aufgereinigte Fraktion der Kontrollprobe wies in der eindimensionalen SDS-PAGE zwei Hauptbanden im Molekulargewichtsbereich von ca. 40 kDa und 32 kDa auf. Dagegen konnten in der Cu(II)-belasteten Probe zwei Hauptbanden bei ca. 14 kDa und 12 kDa (Banden H und I) detektiert werden (Abb. 31). Zur Charakterisierung der Banden H und I wurde eine Micro-Sequenzanalyse durchgeführt (Kap. 3.4.5.3). Um eine Reoxidation der Cysteine zu vermeiden, wurden die denaturierten und reduzierten Proteine während der Probenvorbereitung zur SDS-PAGE mit Iodacetamid derivatisiert.

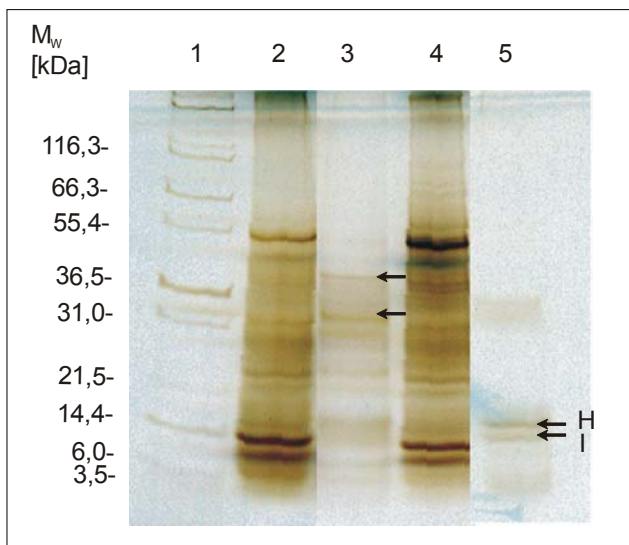


Abb. 31: Eindimensionale Trennung affinitätschromatographisch angereicherter Proteine (IMAC) aus *Fontinalis antipyretica* durch SDS-PAGE. Folgende Bedingungen wurden gewählt: 10-20%iges Tris/Tricin-Gradientengel, 10 μg Protein Spur 2 und 4, 5 μg Protein Spur 3 und 5; Silberfärbung. Spur 1: Molekulargewichtsmarker (Wide Range Protein Standard, NOVEX). Rohextrakt: Spur 2: K 3 d; Spur 4: 50 μM Cu(II), 3 d. Eluat: Spur 3: K 3 d; Spur 5: 50 μM Cu(II), 3 d.

3.4.4.2 Isolierung thiolhaltiger Proteine mittels kovalenter Affinitätschromatographie

Die zweite Reinigungsstufe bildete die kovalente Affinitätschromatographie (Kap. 2.5.8.3), wobei thiolhaltige Proteine kovalent an reaktive 2-Thiopyridyldisulfidgruppen unter Bildung von Disulfidkomplexen gebunden werden. Vorversuche zeigten, dass die nachfolgende Aufreinigung der IMAC-Eluate mit Hilfe der Thiopropyl Sepharose unter den gegebenen Bedingungen nicht effizient war, so dass im weiteren Verfahren das Proteinrohextrakt eingesetzt wurde.

Im Eluat der Proben K 3 d und 50 μM Cu(II), 3 d konnte durchschnittlich 0,02 % bzw. 0,01 % des applizierten Proteins nachgewiesen werden (Anhang Tab. 7). Im Ergebnis der gelelektrophoretischen Trennungen (Abb. 32) zeigten die Eluate der Kontrolle und der Cu(II)-belasteten Probe jeweils unterschiedliche Bandenmuster. In der Probe K 3 d traten insgesamt fünf Hauptbanden mit einem Molekulargewicht von ca. 34 kDa, 24 kDa, 16 kDa, 12 kDa (Bande J) und 8 kDa auf. Während in der Probe 50 μM Cu(II), 3 d vier Hauptbanden im Bereich von ca. 28 kDa und 24 kDa sowie 14 kDa (Bande K) und 10 kDa detektiert wurden.

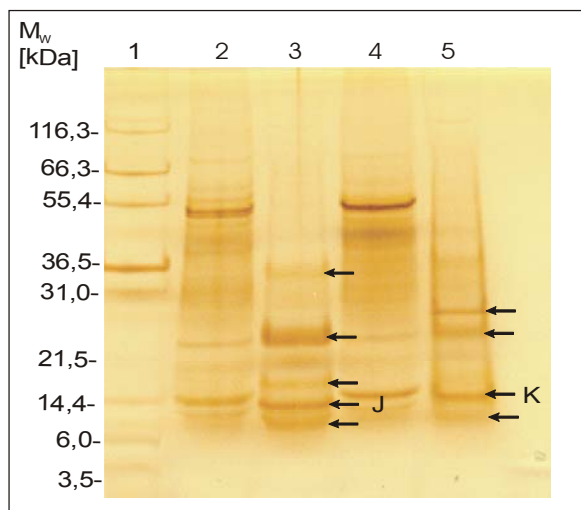


Abb. 32: Eindimensionale Trennung affinitätschromatographisch angereicherter, thiolhaltiger Proteine aus *Fontinalis antipyretica* durch SDS-PAGE. Folgende Bedingungen wurden gewählt: 10-20%iges Tris/Tricin-Gradientengel, 10 μg Protein pro Spur; Silberfärbung. Spur 1: Molekulargewichtsmarker (Wide Range Protein Standard, NOVEX). Rohextrakt: Spur 2: K 3 d; Spur 4: 50 μM Cu(II), 3 d. Eluat: Spur 3: K 3 d; Spur 5: 50 μM Cu(II), 3 d.

Zur näheren Charakterisierung bzw. Identifizierung wurden Micro-Sequenzanalysen der coomassiegefärbten Proteinbanden J und K durchgeführt (Kap. 3.4.5.3). Um eine Reoxidation der Cysteine zu vermeiden, wurden die denaturierten und reduzierten Proteine während der Probenvorbereitung zur SDS-PAGE mit Iodacetamid derivatisiert (Kap. 2.5.4).

3.4.5 Identifizierung ausgewählter Proteine mittels Massenspektrometrie und Micro-Sequenzierung

Datenbankrecherchen zur Identifizierung der Peptid- und Fragmentmassen erfolgten mit dem MASCOT-Programm (<http://www.matrixscience.com>). Für Aminosäuresequenzvergleiche wurden die Programme BLASTP und TBLASTN (Altschul et al., 1997) der NCBI-Datenbank eingesetzt.

3.4.5.1 MALDI-TOF-MS und Micro-Sequenzanalyse von hitzeinduzierten sowie hitzestabilen Proteinen

Zur Identifizierung der hitzeinduzierten Proteinbande D in der Probe K 30 °C, 1 d (Abb. 21/A, Seite 61) und den hitzestabilen Banden E und F in der Probe K 1 d sowie der Bande G in 50 µM Cu(II), 1 d (Abb. 22, Seite 62) wurden Aminosäuresequenzen ermittelt sowie MALDI-TOF-MS-Analysen isolierter Peptidfragmente durchgeführt.

In ersten Experimenten zeigte sich, dass die geblotteten Proteine einer N-terminalen Sequenzierung nicht zugänglich waren, was auf eine Blockierung des N-Terminus hinwies. Zur Bestimmung interner Aminosäuresequenzen wurden die entsprechenden Banden aus einem SDS-Gradientengel (10-20 % Tris/Tricin) eluiert und durch Trypsin verdaut (Kap. 2.5.10.2). Die anschließende Trennung der Peptidfragmente über eine HPLC (Kap. 2.5.10.3) ergab für die nachfolgende Sequenzierung eine zu geringe Ausbeute an Fragmenten (TOPLAB GmbH). Die Fragmentierungsmuster der MALDI-TOF-Analyse ausgewählter Peptide zeigten nach MASCOT- und NCBI-Recherche keine signifikanten Homologien zu eingetragenen Fragmentmassen bzw. Sequenzen (Dr. E. Röpenack-Lahaye; IPB Halle/Saale), so dass eine nähere Charakterisierung der oben genannten Banden nicht erfolgen konnte.

3.4.5.2 Micro-Sequenzanalyse der Metallothionein p2-Antikörper-positiven Proteine

Zur weiteren Charakterisierung der mittels MT p2-AK positiv detektierten Doppelbande (ca. 8 kDa; Abb. 28, Seite 72) wurden die Aminosäuresequenzen der entsprechenden Proteine ermittelt. Auch in diesem Fall waren diese der Edmann-Sequenzierung aufgrund einer N-terminalen Blockierung nicht zugänglich. Es folgte jeweils ein tryptischer Verdau mit anschließender HPLC-Trennung (Kap. 2.5.10.2, 2.5.10.3) der entstandenen Fragmente. Die Peptidsequenzierung ergab folgende Sequenz:

Protein (ca. 8 kDa): A Q V ? N P I D D T.

Die vierte Aminosäure war nicht eindeutig zu bestimmen. Es könnte sich dabei um die Aminosäure Lysin, Asparagin oder Phenylalanin handeln (Dr. K. P. Rücknagel, Max-Planck-Gesellschaft, Forschungsstelle Enzymologie der Proteinfaltung, Halle/Saale, persönliche Mitteilung). Die Datenbankrecherche zeigte unter Berücksichtigung aller möglichen Aminosäurevariationen keine signifikanten Homologien zu eingetragenen Peptidsequenzen, so dass eine Zuordnung des MT p2-AK-positiven Proteins zu bereits beschriebenen Proteingruppen nicht erfolgen konnte.

3.4.5.3 LC-MS-, MALDI-TOF-MS- und Micro-Sequenzanalyse affinitätschromatographisch gereinigter Proteine

Zur Charakterisierung der IMAC-gereinigten Proteine (Abb. 31, Seite 76) erfolgten Molekulargewichtsbestimmungen über LC-MS- und MALDI-TOF-MS-Analysen (Kap. 2.5.9) sowie Proteinsequenzanalysen von tryptischen Verdau relevanter Fraktionen (Kap. 2.5.10.4). Die ESI-MS-Analyse des Peaks $R_t = 13,3$ min aus der Probe K 3 d detektierte ein Molekulargewicht von 4,62 kDa. Dem Peak $R_t = 25,04$ min wurde das Molekulargewicht 11,54 kDa zugeordnet. Der Peak $R_t = 28,40$ min wies ein Molekulargewicht von 29,96 kDa auf (Anhang Abb. 1). Diese Fraktionen wurden für die weitere Bestimmung interner Peptidsequenzen tryptisch verdaut. Die Analyse der Peptidmassen interner Fragmente über MALDI-TOF-MS führte in keinem Fall zu positiven Datenbankrecherchen.

Die Micro-Sequenzierung der HPLC-getrennten Peptide ermittelte folgende Teilsequenzen, wobei die Aminosäure Cystein indirekt, durch Ausbleiben anderer Aminosäuresignale detektiert wurde:

Probe K 3 d (Protein: 4,62 kDa): **A E Q C G N Q A G N R K C P N G L C C S.**

In dem Fragment wurden indirekt vier Cysteine (20 %) nachgewiesen. Nach NCBI-Recherche konnte dieser Sequenz jeweils eine 80%ige Homologie zu einem Endochitinase-Precursor aus *Pisum sativum* (Accession: P36907; Vad et al., 1993) und *Humulus lupulus* (Accession: AAD34596; Henning und Moore, 1999) zugeordnet werden. Eine 75%ige Identität bestand zu einem Endochitinase-Precursor aus *Populus balsamifera* ssp. *trichocarpa* (Accession: P29031; Davis et al., 1991).

Probe K 3 d (Protein: 11,54 kDa): **A T G K A S T T T V T M P S A C T G F D.**

Das Proteinfragment wies einen auffällig hohen Anteil an Threonin (30 %) auf. Die Datenbanksuche ergab u.a. eine 47%ige Homologie zur Serin/Threonin-Protein-Kinase YNR047W aus *Saccharomyces cerevisiae* (Accession: P53739) sowie eine 44%ige Homologie zu der Aminophospholipase 2 aus *Arabidopsis thaliana* (Accession: P98205; Sato et al., 1997).

Probe K 3 d (Protein: 29,96 kDa): **D G E C S V A A P C P D K N N C C S Q F.**

Das Fragment zeichnete sich durch einen Cystein-Anteil von 20 % aus und besaß u.a. eine 66%ige Homologie zu einem nicht näher bezeichneten Protein aus *Drosophila melanogaster* MstProx (Accession: XP081934) sowie eine 57%ige Homologie zu dem REV1-Protein (SwissProt: AAA34967; Larimer et al., 1989) aus *Saccharomyces cerevisiae*.

Im Ergebnis der LC-MS-Analyse von IMAC-gereinigten Proteinen aus der Probe 50 µM Cu(II), 3 d wurden keine induzierten Proteinsignale festgestellt (nicht gezeigt), so dass eine Micro-Sequenzanalyse der Fraktionen nicht durchgeführt wurde.

Eine Identifizierung der Proteine der Banden H und I (Abb. 31, Seite 76) der Probe 50 µM Cu(II), 3 d über eine Micro-Sequenzierung war nach dem proteolytischen Verdau aufgrund von Sequenzüberlagerungen nicht möglich.

Des Weiteren sollten die mittels kovalenter Affinitätschromatographie isolierten Proteine aus den Proben K 3 d und 50 µM Cu(II), 3 d (Abb. 32, Seite 77) ebenfalls mit Hilfe von LC-MS- bzw. MALDI-TOF-MS-Analysen sowie der Micro-Sequenzanalyse identifiziert werden. Die LC-MS-Analyse der Probe K 3 d ermittelte für die Proteine der Peaks $R_t = 26,25$ min und $R_t = 27,56$ min ein Molekulargewicht von 31,99 kDa bzw. 12,71 kDa. Dem Peak $R_t = 28,25$ min wurde ein Molekulargewicht von 30,05 kDa zugeordnet (Anhang Abb. 2). Die Fragmentierung der Proteine zeigte keine Homologien zu eingetragenen Massenfragmenten. Eine anschließende Micro-Sequenzierung war aufgrund der geringen Konzentration nicht möglich.

Die LC-MS- (Anhang Abb. 3) bzw. die MALDI-TOF-Analyse der Probe 50 μM Cu(II), 3 d wies im Bereich von $R_t = 14,4$ min bis 22,9 min zahlreiche, schwache Proteinsignale im Molekulargewichtsbereich von 1,02 kDa bis 6,74 kDa nach. Nur im Fall des Peaks $R_t = 25,02$ min (10,88 kDa) wurde ein deutliches Proteinsignal detektiert. Die MS/MS-Analyse dieses Peaks ergab keine homologen Ionenmassen. In dieser Fraktion wurden in Vorbereitung auf die Sequenzanalyse, zum Schutz vor einer Reoxidation der Cysteine, die reduzierten Sulfhydrylgruppen durch Vinylpyridin alkyliert und die Probe anschließend über eine HPLC entsalzt (Kap. 2.5.10.1). Zur Bestimmung interner Sequenzen wurde die so vorbereitete Probe tryptisch verdaut und die entstandenen Peptidfragmente über eine HPLC getrennt. Im Ergebnis der Micro-Sequenzierung konnte in einem Fragment folgende Aminosäuresequenz nachgewiesen werden:

D A A W F Y P S P K.

Die Sequenzrecherche ergab jeweils eine 90%ige Homologie zu zwei aus genomischer Sequenz abgeleiteten Proteinen aus *Deinococcus radiodurans* (Accession: F75458 und F75458; White et al., 1999).

Weiterhin wurden die coomassiegefärbten Proteinbanden J der Probe K 3 d sowie die Bande K der Probe 50 μM Cu(II), 3 d (Abb. 32, Seite 77) eluiert. Eine nachfolgende Trypsinspaltung war notwendig, da beide Proteine einen blockierten N-Terminus aufwiesen. Es wurden sowohl underivatisierte als auch Iodacetamid carboxymethylierte Proteine (Kap. 2.5.4) verwendet. Unabhängig der Probenvorbereitung kam es infolge eines unvollständigen Proteaseverdaus zu keiner weiteren Sequenzierung.

3.5 Der Einfluss von Kupfer auf die Zusammensetzung und den Gehalt freier Aminosäuren in *Fontinalis antipyretica*

Zur qualitativen und quantitativen Untersuchung freier Aminosäuren unter Cu(II)-Einfluss wurden Kurzzeitversuche von vier Stunden und Langzeitversuche von drei Tagen durchgeführt. Das Moosmaterial (Dezember 2000) wurde wie in Kapitel 2.1.3 kultiviert und mit 50 μM Cu(II) exponiert (Kap. 2.1.4). Grundlage für die Berechnungen bildeten die Mittelwerte der mittels GC-C-IRMS analysierten Aminosäuregehalte (Kap. 2.6.3) aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei Parallelen (Anhang Tab. 10). Die Probe K 3 d lieferte nur zwei Parallelen, da in der dritten Charge keine Stickstoffwerte messbar waren. Aus demselben Grund kam es zu fehlenden Stickstoff- und Flächendaten bei den Proben

50 μM Cu(II), 4 h und 3 d. Die Aminosäuren Serin und Valin sowie Leucin und Isoleucin eluierten als jeweils ein Peak. Änderungen wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Messreihen in Prozent [%] zur Kontrolle [100 %] angegeben.

Als interner Standard (Std) wurde Cyclohexancarboxylsäure verwendet (Sigma). Die Aminosäuren Tyr, Phe und Ile zeigten mit 84 %, 76 % und 70 % die höchste Wiederfindung. Ihnen folgten Val (69 %), Leu (69 %), Pro und Ser (je 63 %), Asp (60 %), Cys (58 %), Thr (56 %), Glu (53 %), Ala (47 %), Gly (45 %), Lys (42 %), Met (32 %) und letztlich Arg (29 %).

Als Reaktion auf die vierstündige Cu(II)-Belastung zeigte die Aminosäure Cystein einen signifikanten Anstieg des Gehaltes auf 0,35 $\mu\text{mol/g}$ FM (203 %). Eine nicht signifikante Erhöhung der Aminosäuregehalte wurde bei Phenylalanin (auf 0,57 $\mu\text{mol/g}$ FM) und Glutamin (auf 0,34 $\mu\text{mol/g}$ FM) nachgewiesen. Damit erhöhte sich der Phenylalaningehalt auf 163 % und der Glutamingehalt auf 162 %. Der Gehalt an Asparagin blieb im Vergleich zur Kontrolle relativ konstant.

Signifikant verringerte Gehalte wurden dagegen an Tyrosin, Lysin, Alanin, Arginin, Serin und Valin nachgewiesen. Der Tyrosingehalt sank auf 0,34 $\mu\text{mol/g}$ FM (43 %), der Lysingehalt auf 0,12 $\mu\text{mol/g}$ FM (38 %), der Alaningehalt auf 0,09 $\mu\text{mol/g}$ FM (28 %), Arginin auf 0,02 $\mu\text{mol/g}$ FM (13 %), der Gehalt an Serin und Valin sank auf 0,096 $\mu\text{mol/g}$ FM (27 %) (Abb. 33).

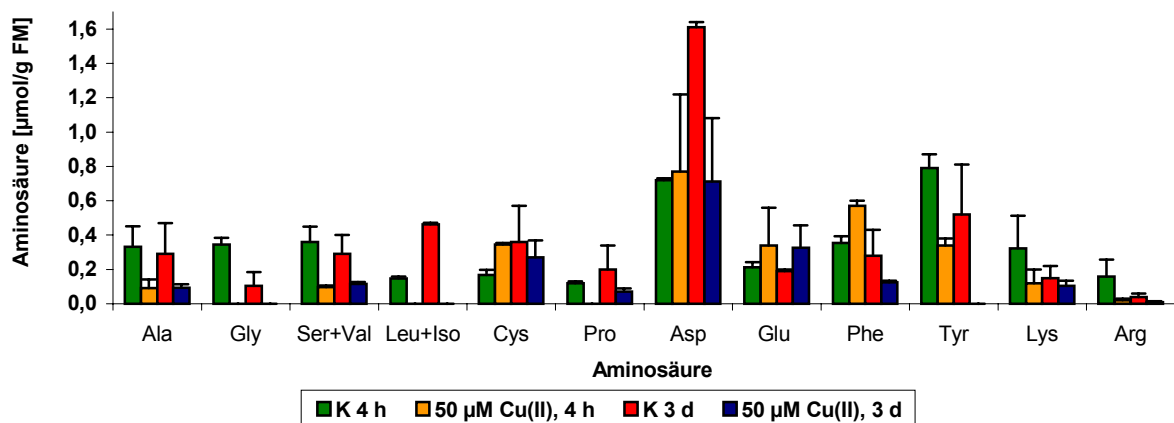


Abb. 33: Gehalte freier Aminosäuren aus *Fontinalis antipyretica* unter Cu(II)-Einfluss. Analyse mittels GC-C-IRMS; 2 x n = 3; (K 3 d: 2 x n = 2).

Im Langzeitversuch über drei Tage reagierte *Fontinalis antipyretica* auf die 50 µM Cu(II)-Applikation weiterhin mit einem erhöhten Glutamingehalt von 0,33 µmol/g FM (174 %). Ein signifikantes Absinken der Aminosäuregehalte wurde im Fall von Serin und Valin (40 %) und bei Arginin (25%) deutlich. Im Gegensatz zum Kurzzeitversuch konnte Prolin nach dreitägiger Cu(II)-Belastung in den Proben nachgewiesen werden. Auch hier kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikanten Verringerung des Aminosäuregehaltes auf 0,07 µmol/g FM (35 %). Eine nicht signifikante Abnahme der Aminosäuregehalte zeigte Cystein mit 0,27 µmol/g FM (75 %), Lysin mit 0,10 µmol/g FM (67 %), Asparagin mit einem Gehalt von 0,71 µmol/g FM (44 %), Phenylalanin mit 0,12 µmol/g FM (43 %) und Alanin mit 0,09 µmol/g FM (31 %) (Abb. 33).

Ein Vergleich der Aminosäuregehalte zwischen den Proben 50 µM Cu(II), 4 h und 3 d verdeutlicht Folgendes: Die Gehalte der Aminosäuren, die infolge der vierstündigen Cu(II)-Belastung gegenüber der Kontrolle nachweislich induziert wurden, sanken nicht signifikant im Langzeitversuch: Phenylalanin auf 43 % und Asparagin auf 44 %. Die höchste Abnahme zeigte Cystein, dessen Gehalt im Kurzzeitversuch 203 % betrug und im Langzeitversuch auf 75 % sank.

Betrachtet man die Gesamtgehalte der freien Aminosäuren (Anhang Tab. 9), die mittels GC-C-IRMS in allen Proben bestimmbar waren, so zeigten die Cu(II)-exponierten Proben im Kurzzeitversuch im Vergleich zur Kontrolle einen auf 123 % erhöhten Gesamtgehalt (nicht signifikant), während die Cu(II)-Belastung des Langzeitversuches zu einer deutlichen Abnahme des Gesamtgehaltes auf 68 % führte.

Infolge der vollständigen Hydrolyse der Aminosäuren im sauren Milieu der Derivatisierung konnten die Amide und Säuren des Glutamins und Asparagins nicht separat detektiert werden. Methionin, Tryptophan und Histidin derivatisierten unter den gegebenen Bedingungen unvollständig und wurden daher nicht analysiert (Hofmann et al., eingereicht). In den Cu(II)-Proben lagen die Konzentrationen der Aminosäuren Glycin, Leucin und Isoleucin in beiden Versuchsvarianten sowie Prolin im Kurzzeit- und Tyrosin im Langzeitversuch unterhalb der Nachweisgrenze.

Aufgrund der Nichtbestimmbarkeit einiger Aminosäurewerte mittels GC-C-IRMS erfolgte eine weitere Analyse von Proben gleichen Materials und gleicher Extraktionsmethode mit dem Aminosäure-Analyzer (Kap. 2.6.4). Bedingt durch die unterschiedliche Methodik beider Analysen konnten nur Tendenzen im Verhalten der Aminosäuren unter Cu(II)-Einfluss gewertet werden (Abb. 34). Dargestellt sind diejenigen Aminosäuren, die nur mittels Aminosäure-Analyzer bestimmbar waren (Anhang Tab. 8). Die Aminosäuregehalte der Kontrollwerte beider Zeitvarianten erwiesen sich als nahezu identisch, so dass im weiteren Verlauf nur eine Kontrolle aufgeführt wird.

Unter 50 μM Cu(II)-Kurzzeitbelastung sanken in den Moosproben die Gehalte von Threonin, Histidin, Glycin, Prolin und Leucin auf 46 %, 36%, 29 %, 26 % und 8 %. Im Langzeitversuch verringerten sich die Gehalte der genannten Aminosäuren weiter. Der Threoningehalt belasteter Proben betrug damit nur noch 32 %, die Gehalte von Glycin und Prolin noch 24 % und 20 % und die Aminosäure Histidin zeigte 17 % des Aminosäuregehaltes der Kontrolle. Allein der Wert für Leucin stieg auf 15 %.

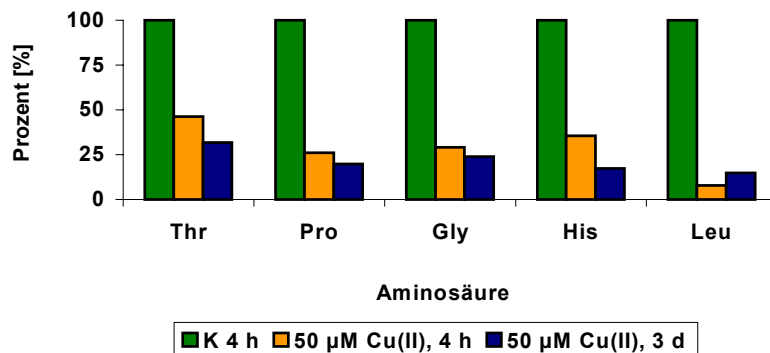


Abb. 34: Prozentuale Änderung der Gehalte freier Aminosäuren aus *Fontinalis antipyretica* unter Cu(II)-Einfluss. Analyse mittels Aminosäure-Analyzer (Knauer GmbH).

3.6 Der Einfluss von Kupfer auf organische Säuren in *Fontinalis antipyretica*

Organische Säuren sind aufgrund ihrer Struktur in der Lage, Schwermetallkomplexe zu bilden, so dass sie die intrazelluläre Verfügbarkeit auch von nicht essentiellen Metallen regulieren können (Rauser, 1999; Maywald und Weigel, 1997). Zur Untersuchung einer möglichen Cu(II)-Wirkung auf den organischen Säurehaushalt von *Fontinalis antipyretica* wurde Probenmaterial (Dezember 2000) im Kurzzeitversuch (4 h) und im Langzeitversuch (3 d) jeweils mit 50 μM Cu(II) belastet (Kap. 2.1.4). Da bisher nur wenig über die qualitative Zusammensetzung der Inhaltsstoffe der Fontinalaceen bekannt ist, wurde das Vorkommen von Oxalsäure, Zitronensäure und Äpfelsäure im Rohextrakt der Probe 50 μM Cu(II), 3 d mittels ESI-MS geprüft und bestätigt (Frau Dr. A. Schierhorn, Max-Planck-Gesellschaft, Forschungsstelle Enzymologie der Proteinfaltung, Halle/Saale; nicht gezeigt). Aufgrund der ungenügenden Ionisierbarkeit der Säuren, sollte im weiteren Verlauf eine HPLC-Trennung und eine nachfolgende GC-MS-Analyse der derivatisierten

Fractionen (Kap. 2.7.4) erfolgen. Es wurden Proben aus zwei Versuchsreihen mit jeweils 3 Parallelen untersucht.

Die HPLC-Analyse des Standardmix (Anhang Abb. 4) ermittelte folgende Retentionszeiten: Oxalsäure $R_t = 2,80$ min, Zitronensäure $R_t = 3,75$ min und Äpfelsäure: L-Äpfelsäure $R_t = 4,70$ min, D-Äpfelsäure $R_t = 7,55$ min. Auf die Darstellung der Weinsäure wurde verzichtet, da diese gleiche Retentionszeiten wie die Zitronensäure aufwies und gaschromatographisch in den Proben nicht nachweisbar war.

Für einen späteren Vergleich mit Probenfraktionen wurden die HPLC-getrennten organischen Säuren des Standardmix mit MSTFA derivatisiert (Kap. 2.7.3) und mittels GC-MS analysiert. Infolge einer unvollständigen Derivatisierung war die Aufnahme des Massenspektrums von Oxalsäure nicht möglich.

Im Ergebnis der chromatographischen Trennungen der Kontroll- und Cu(II)-belasteten Proben aus *Fontinalis antipyretica* wurden Verbindungen detektiert, die Retentionszeiten der Standard-Zitronensäure und der L-Äpfelsäure aufwiesen (Anhang Abb. 5 und 6).

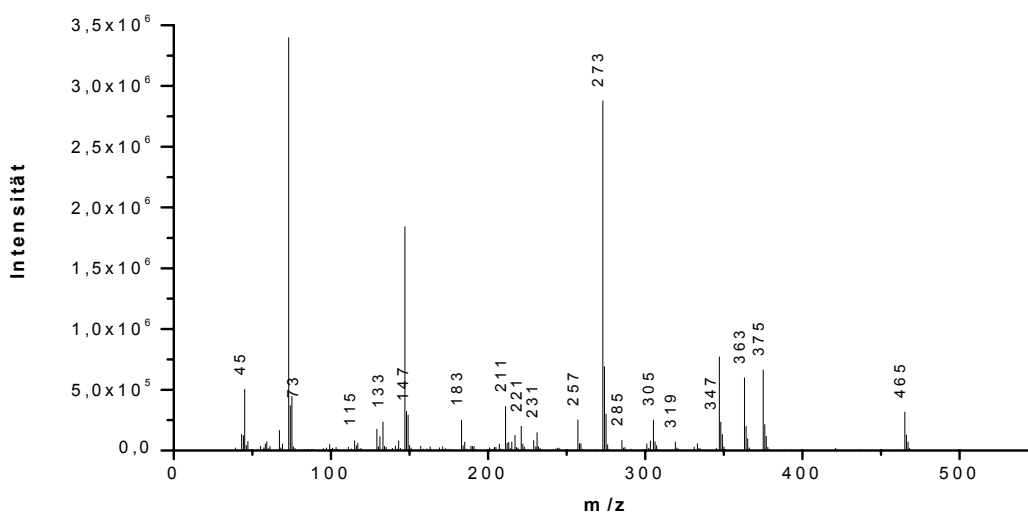


Abb. 35: GC-MS-Spektrum des MSTFA-Derivates der Zitronensäure (Merck); GC System HP 6890.

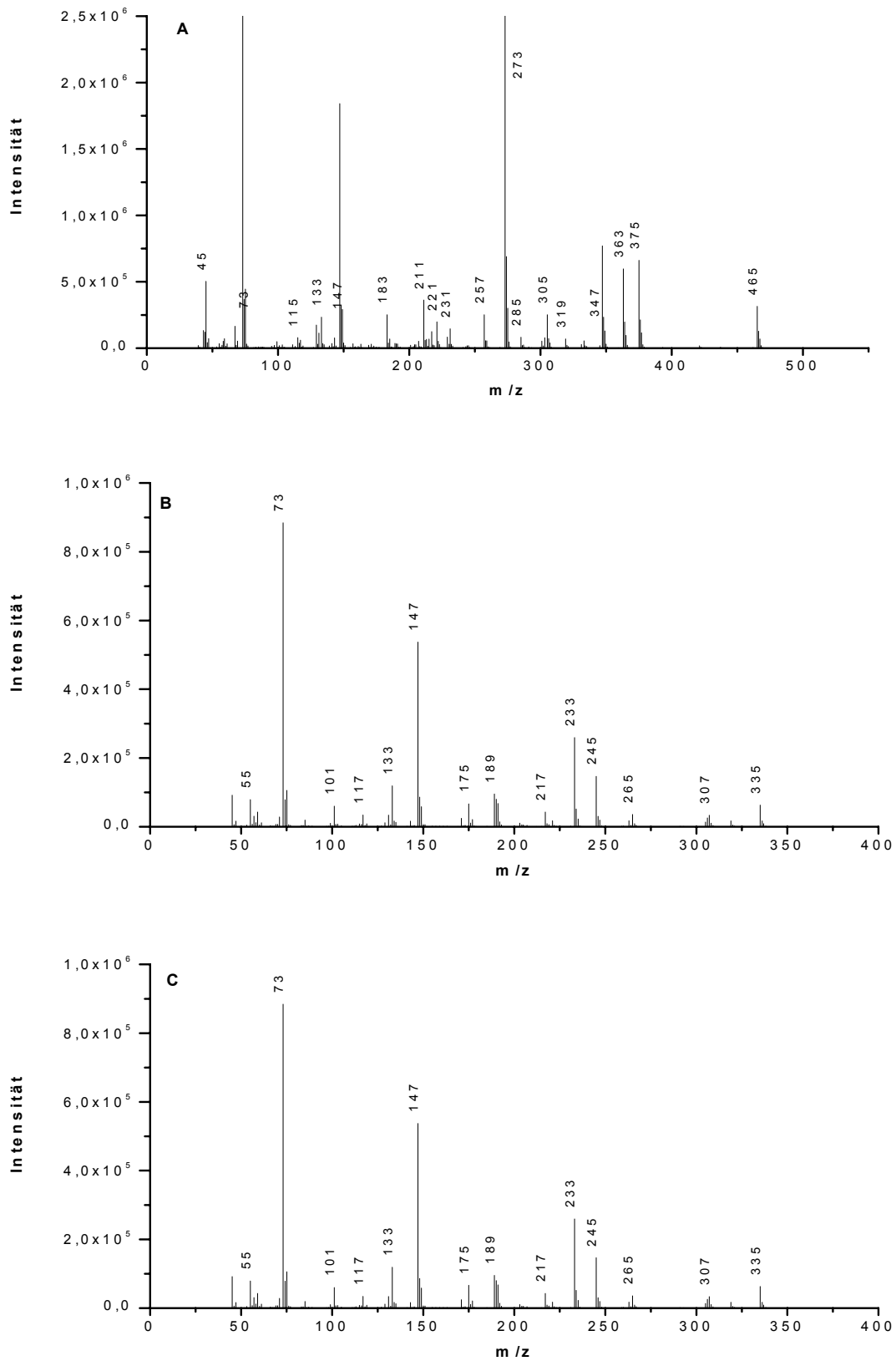


Abb. 36: GC-MS-Spektren der MSTFA-Derivate der Fraktion 1 aus *Fontinalis antipyretica* (A); der Äpfelsäure (Merck) (B) sowie der Fraktion 2 aus *Fontinalis antipyretica* (C); GC System HP 6890.

Die GC-MS-Analyse ermittelte identische m/z-Signale der Ionenfragmente von MSTFA-Derivaten der Zitronensäure und der Fraktion 1 (Abb.35 und 36/A) sowie der Äpfelsäure und der Fraktion 2 (Abb. 36/B,C). Derivate der Oxal- und Weinsäure wurden mit GC-MS nicht nachgewiesen. Insgesamt deuten die HPLC-Peakflächen der *Fontinalis*-Proben auf eine Cu(II)-induzierte Synthese der Zitronensäure und in geringerem Maße auch der Äpfelsäure im Langzeitversuch (Anhang Abb. 6). Da die GC-MS-Analysen Spuren von nicht näher identifizierten Verbindungen in den einzelnen HPLC-Fraktionen nachwiesen, waren Aussagen zum Einfluss von Cu(II) auf die detektierten organischen Säuren nicht quantifizierbar.

3.7 Der Einfluss von Kupfer auf phenolische Verbindungen in *Fontinalis antipyretica*

Ziel dieses Experimentes waren quantitative und qualitative Untersuchungen zum zeitlichen Einfluss der Cu(II)-Applikation von 50 µM auf phenolische Verbindungen in *Fontinalis antipyretica*. Die Kultivierung der Moosproben (Dezember 2000) sowie die Schwermetallzugabe erfolgte wie in Kapitel 2.1.3 und 2.1.4 dargestellt. Die phenolischen Verbindungen wurden nach Strack et al. (1979) extrahiert (Kap. 2.8.1).

3.7.1 Gesamtphenolgehalt

Der Gesamtphenolgehalt der Kontroll- und Cu(II)-belasteten Proben aus Kurzzeit- (4 h) und Langzeitversuchen (3 d) wurde in Anlehnung an Jennings (1981) spektroskopisch ermittelt (Kap. 2.8.2).

Die in Abbildung 37 dargestellten Gesamtgehalte wurden aus zwei Versuchsreihen mit jeweils drei Parallelen anhand einer Rutin-Eichreihe im Konzentrationsbereich von 2,00 mM-0,125 mM berechnet (Anhang Tab. 12). Sowohl im Ergebnis des Kurzzeitversuches als auch des Langzeitversuches zeigte der Gesamtgehalt an löslichen, phenolischen Verbindungen in Kontroll- und Cu(II)-belasteten Proben keine signifikanten Veränderungen. Die getesteten Proben wiesen Gehalte von ca. 0,3 mg/g FM auf.

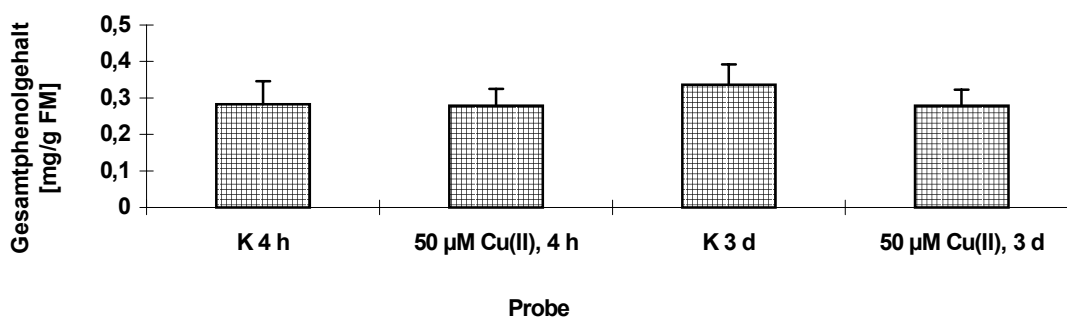


Abb. 37: Gesamtphenolgehalt nach Jennings (1981) in *Fontinalis antipyretica*; $2 \times n = 3$.

3.7.2 RP-HPLC- und LC-MS/MS-Analyse phenolischer Verbindungen

In diesem Experiment wurde das unbelastete Moos sowie Material nach kurzzeitiger (4 h) und langzeitiger (3 d) Cu(II)-Applikation (50 µM) hinsichtlich der löslichen, phenolischen Verbindungen chromatographisch analysiert. Typische RP-HPLC-Profile der Kontroll- und Cu(II)-belasteten Proben sind im Anhang (Abb. 7-10) aufgeführt.

Die qualitative Charakterisierung der Probenpeaks erfolgte über einen Vergleich der Retentionszeiten mit Standardsubstanzen aus der HPLC-Software-Datenbank. Die Konzentrationen der Fraktionen wurden anhand einer Rutin-Eichreihe (1,0 mM-0,06 mM) berechnet.

Aus den Extrakten der Kontrollen und des Cu(II)-belasteten Materials des Kurzzeitversuches wurden, unter Nutzung der Standard-Datenbank, die Verbindungen Gallussäure, 4-Hydroxybenzaldehyd, Quercetin, α -Methylzimsäure und 4-Nitrozimsäureethylester den Probenpeaks 1, 4, 7, 8 und 9 zugeordnet. Verbindungen, die die Retentionszeiten der Vanillinsäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure und Myrecetin-3-glucorhamnosid aufwiesen, traten zusätzlich in Proben des Langzeitversuches als Peak 3, 2 bzw. 5 auf. Der Peak 6 wurde nur in Kontrollproben nachgewiesen und war anhand der Retentionszeit dem Umbelliferon zuzuordnen. Die ESI-Massenspektren der phenolischen Fraktionen (Peak 1-9) wie auch die Fragmentierung ausgesuchter Ionen zeigten allerdings im Vergleich zu den verwendeten Phenolstandards keine vergleichbaren Massen- bzw. Fragmentierungsmuster, so dass die isolierten Fraktionen in diesem Rahmen nicht näher identifiziert werden konnten.

Die errechneten Konzentrationen der phenolischen Verbindungen sind im Anhang (Tab. 11) aufgeführt. Das Moos reagierte auf die Cu(II)-Belastung mit der Verringerung

der Konzentration der einzelnen Fraktionen, mit Ausnahme der Fraktionen 2, 4, 7 und 9, die im Langzeitversuch erhöhte Konzentrationen aufwiesen.

3.7.3 Phenolische Absorptionsspektren unter Kupfereinfluss

Zur näheren Charakterisierung der isolierten phenolischen Verbindungen wurde deren Zugehörigkeit zur Flavonolgruppe überprüft. Die Wechselwirkungen zwischen Flavonol und Cu(II) wurden spektroskopisch nach Brown et al. (1998) zuerst an einer Standardverbindung untersucht. Aufgrund seiner charakteristischen Flavonolstruktur wurde Quercetin eingesetzt. Die Daten der aufgenommenen Spektren von Quercetin und den Proben (Peak 1-9) sind im Anhang (Tab. 13 und 14) dargestellt.

Das Absorptionsspektrum von Quercetin zeigte die für die Flavonole typischen zwei Absorptionsmaxima bei 261 nm (A-Ring) und 371 nm (B-Ring). Infolge der Cu(II)-Chelatierung an den 3'- und 4'-Hydroxylgruppen des B-Rings zeigte die Bande 1 (371 nm) eine Absorptionsdrift um 71,8 nm in den langwelligeren Bereich, verbunden mit einer Absorptionsabnahme. Nach Zugabe von EDTA erfolgte, wie von Brown et al. (1998) beschrieben, keine Regenerierung zum Originalspektrum aufgrund von Oxidationseffekten an den Hydroxylgruppen des B- und C-Ringes (Anhang Abb. 11).

Im Ergebnis der spektroskopischen Untersuchungen der phenolischen RP-HPLC-Fraktionen 1 bis 9 wiesen die Proben in keinem Fall die für die Flavonole charakteristischen Absorptionsbanden bei ca. 270 nm und 370 nm auf, so dass eine Zuordnung der isolierten Substanzen in diese Phenolgruppe auszuschließen ist.

3.8 Transkriptionsanalyse und Identifizierung Metallothionein-ähnlicher Gene aus *Fontinalis antipyretica*

3.8.1 Expression Metallothionein-ähnlicher Gene unter Schwermetallstress

Zur Untersuchung der Expression von Metallothioneinen als Reaktion auf Schwermetalle wie Cu(II), Cd(II), Pb(II) oder Zn(II) und auf Hitzeschock wurde die Transkription der entsprechenden mRNA mit Hilfe von Northern Hybridisierungen verfolgt. Verwendet wurden Gesamt-RNA-Proben (Kap. 2.9.1.4) aus Moosmaterial (Oktober 2000), das über einen Zeitraum von zwei Stunden bis drei Tagen entweder mit 50 µM Cu(II), Cd(II), Pb(II)

oder Zn(II) belastet oder einem Hitzestress von 20 °C oder 30 °C (Kap. 2.1.4 und 2.1.5) unterzogen wurde. Als Sonde dienten DIG-markierte DNA-Fragmente (Kap. 2.9.10.1) aus *Brassica juncea* (MT p2) und *Podospora anserina* (PaMT f1; Prof. Dr. K. Humbeck, Institut für Pflanzen- und Zellphysiologie der Universität Halle-Wittenberg). Die Positivkontrolle bildeten RNA-Proben aus Cu(II)-belasteten Pflanzen von *Arabidopsis halleri* (IPB Halle/Saale, Arbeitsgruppe Schwermetallstress, Dr. St. Clemens).

Im Ergebnis der DNA-RNA-Hybridisierung mit der MT p2-Sonde konnte eine schwach positive Reaktion mit ca. 0,60 kb großen Transkripten der Proben 50 µM Zn(II), 2 h und K 20 °C, 2 h nachgewiesen werden (nicht dargestellt). Eine Erhöhung der Stringenz während der Hybridisierung führte zu keinen signifikanteren Signalintensitäten. Die Hybridisierung mit der Metallothioneinsonde aus *Podospora anserina* (PaMT f1) zeigte keine positiven Signale bei allen verwendeten Proben unter den beschriebenen Bedingungen (Frau Dr. I. Miersch, persönliche Mitteilung).

3.8.2 Identifizierung einer Metallothionein-ähnlichen Gensequenz

Zur Amplifikation homologer Metallothionein p1- und p2-Fragmente aus genomischer DNA von *Fontinalis antipyretica* wurde von der entsprechenden mRNA-Sequenz aus *Triticum aestivum* (L11879; Snowden und Gardner, 1993) die pMT1-Oligonucleotidprimer abgeleitet und in PCR's eingesetzt (Kap. 2.9.7). Mit Hilfe dieser Primer konnte ein DNA-Fragment mit einer Größe von etwa 220 bp amplifiziert werden (Abb. 38).

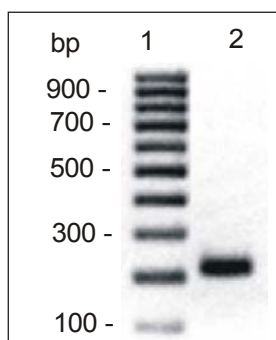


Abb. 38: Gelelektrophoretische Trennung (1%ige Agarose) des Amplifikates der TD-PCR mit pMT1-Primern. Als Template wurde genomische DNA aus *Fontinalis antipyretica* verwendet, Gel nach Ethidiumbromidfärbung, invertierte Darstellung.

Spur 1: Molekulargewichtsmarker (PCR 100 bp Low; Sigma); Spur 2: amplifiziertes DNA-Fragment.

Dieses Fragment wurde in den Vektor pGEM-T ligiert, das Plasmid in *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert und die Sequenz des Plasmid-Insert ermittelt (Kap. 2.9.9):

GACTGCAAGT GCGGATCTGA AGGATGTCTT GCAACTGTGG ATCAAGCTGC
GGCTGCGGCT CAAGCTGCGG CTCAAGCTGC GGCTGCGGCT CAAGTGCAAC
CCTTGCAACT GC (5'→3').

Nach dem Vergleich der Sequenz mit Datenbankeintragen (BLASTN) zeigte sich u.a. eine 95%ige Homologie (Plasmid-Basenposition 21-68) zur Metallothionein-mRNA (Basenposition 56-103) von *Zea mays* (Accession: X82186; Chevalier et al., 1995), die für ein Metallothionein p1-ähnliches Protein (Accession: P30571) kodiert.

21 **AGGATGTCTTGCAACTGTGGATCAAGCTGCGGCTGCGGCTCAAGCTGC** 68
M S C S C G S S C G C G S S C
56 **AGGATGTCTTGCAAGCTGCGGATCAAGCTGCGGCTGCGGCTCAAGCTGC** 103

Eine 93%ige Homologie (Plasmid-Basenposition 20-68) wurde zur *ids-1* (iron deficiency specific) mRNA-Sequenz (Basenposition 28-76) aus *Hordeum vulgare* (Accession: X58540) nachgewiesen.

20 **AAGGATGTCTTGCAACTGTGGATCAAGCTGCGGCTGCGGCTCAAGCTGC** 68
M S C S C G S S C G C G S N C
28 **AAGGATGTCTTGCAAGTTGTGGATCAAGCTGCGGCTGCGGCTCAAAGCTGC** 76

Die *ids-1*-Proteinsequenz (Accession: P26571) besitzt zwei Metallothionein-homologe, cysteinreiche Domänen (Okumura et al., 1991). Das Programm BLASTN recherchiert Sequenzhomologien in der Basenfolge eingetragener DNA- sowie cDNA (EST)-Sequenzen.

4. Diskussion

4.1 Der Einfluss von Kupfer, Cadmium, Blei und Zink auf die Vitalität von *Fontinalis antipyretica*

Vitalität beschreibt allgemein die Lebensfähigkeit, die durch die Bestimmung sensibler, physiologischer Parameter charakterisiert werden kann. Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz, das sogenannte "Stethoskop der Pflanzenphysiologen", hat sich als eine Methode zur physiologischen Stressindikation etabliert, da die photochemische Aktivität des PS II als ein empfindliches System auf jede Veränderung abiotischer Umweltfaktoren reagiert (Graham und McDonald, 2001; Lichtenthaler und Miehe, 1997). Grundsätzlich ist es möglich, mit Hilfe der Chlorophyllinduktionskinetik Aussagen zur stressinduzierten Störung der Photosyntheseaktivität und zur Änderung in der Zusammensetzung photosynthetischer Pigmente zu treffen, Seneszenz und photooxidative Prozesse (Chlorophyllabbau) zu detektieren (Buschmann und Lichtenthaler, 1999; Lichtenthaler et al., 1998; Lichtenthaler und Miehe, 1997), aber auch unterschiedliche Schwermetalleffekte auf den Photosyntheseapparat zu untersuchen (Monnet et al., 2001; Ciscato et al., 1999).

Im Gegensatz zu vorangegangenen Untersuchungen, die anhand der Bestimmungen des Chlorophyllgehaltes, des Chlorophyll a/b-Verhältnisses und der Chlorophyllabbaurate keinen signifikanten Einfluss von Cd(II) auf die Vitalität von *Fontinalis antipyretica* feststellten (Bruns, 1997), zeigten die Messungen der effektiven Quantenausbeute der photochemischen Energieumwandlung im PS II (Genty-Parameter) schwermetallspezifisch konzentrations- und zeitabhängige Schädigungen des PS II und damit eine verringerte Vitalität unter vergleichbaren Versuchsbedingungen.

Die Kontrollproben wiesen keine signifikanten Schwankungen der Vitalität während des gesamten Versuches auf, so dass von optimalen Kultivierungsbedingungen ausgegangen werden kann. Die ermittelten Werte des Genty-Parameters entsprachen den Angaben in der Literatur ($F_V/F_M = 0,84$; Maxwell und Johnson, 2000). Für weitere Untersuchungen wurden äquimolare Konzentrationen der Schwermetalle in einem Bereich eingesetzt, der oberhalb des Mikronährstoffbedarfes ($> 0,5 \text{ mg/l}$) und unterhalb einer letalen Dosis lag.

Der Einfluss der Schwermetallionen auf die Vitalität hängt zwangsläufig von deren intrazellulären Aufnahme und physiologischer Wirkung ab. So trat parallel zur effektivsten intrazellulären Aufnahme infolge der Cu(II)-Belastung auch der stärkste Vitalitätsverlust auf (Abb. 7, Seite 50). Die Applikation von $100 \mu\text{M}$ Cu(II) führte zur intrazellulären

Aufnahme von 0,40 $\mu\text{mol Cu(II)/g TM}$ sowie zu einem extremen Vitalitätsverlust bis zu 52 % gegenüber der Kontrolle. Insgesamt wurde im Bereich von 25 μM -100 μM ein konzentrationsabhängiges, signifikantes Absinken der Vitalität bis zum Versuchsende (7 d) nachgewiesen. Dabei erfolgte der Vitalitätsverlust schnell, ab 50 μM bereits signifikant nach 24 h. Auffällig war auch die sichtbare Braunfärbung der Blättchen, die wiederum von der Cu(II)-Konzentration des Mediums und der Inkubationsdauer abhängig war und auf einen Chlorophyllabbau hinwies. Bestätigt wird dies durch Untersuchungen von Bech-Otschir (1995) zur Cu(II)-bedingten Verringerung des Chlorophyllgehaltes an *Fontinalis antipyretica*. Die physiologisch toxische Wirkung der Höchstkonzentration von 100 $\mu\text{M Cu(II)}$ wird ebenso an einem reduzierten Gesamt-GSH-Spiegel deutlich (Bech-Otschir, 1995).

Sommer und Winkler (1982) stellten fest, dass eine verminderte photosynthetische Nettoleistung als Reaktion auf Cu(II)-Belastungen in dem Quellmoos auftritt. Ursache dieser massiven physiologischen Schädigung könnte in der Fähigkeit des Kupfers, freie Sauerstoffradikale zu bilden, liegen. Dabei können infolge der Autooxidation reaktive Superoxidanionen oder, durch die Reduktion von Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale (Fenton-Reaktion) entstehen. Ein wichtiges Beispiel für die toxische Wirkung freier Cu(II)-Ionen auf den Photosyntheseapparat ist der Start der Lipidperoxidation durch Bildung freier Radikale aus dem stabilen Lipidhydroperoxid. Die Peroxidation der Membranlipide führt zum Verlust der Fluidität aufgrund veränderter Phospholipidzusammensetzungen sowie zu einem gestörten Ionen-Efflux u.a. bei der Plasma- und den Chloroplastenmembranen (Quartacci et al., 2001). Clijsers und van Assche (1985) beschrieben eine Hemmung des Elektronentransportes am PS II durch Schädigung der Thylakoidmembranen. Cu(II)-induzierte Effekte an Q_B , an der Q_A -Eisen-Domäne und am D1-Protein untersuchten Yruela et al. (1993). Schröder et al. (1994) wiesen an *Spinacia oleracea* nach, dass der primär hemmende Cu(II)-Effekt auf die Photosynthese an der Akzeptorseite des PS II, speziell an einer Untereinheit des Reaktionszentrums des PS II, dem D1-Protein, auftritt. Pätsikkä et al. (1998) präzisierten diese Ergebnisse und ermittelten den Effekt von Cu(II) auf die Photoinhibition des PS II an hydroponischen Kulturen von *Phaseolus vulgaris*. Es zeigte sich, dass das Gleichgewicht zwischen der Synthese und dem Abbau des D1-Proteins durch die photoinhibitorische Wirkung der Cu(II)-Ionen in Richtung D1-Abbau verschoben wurde. Es kam zu einer konzentrationsabhängigen Verringerung der aktiven PS II-Reaktionszentren, gemessen an der effektiven Quantenausbeute des PS II. Es ist wahrscheinlich, dass ähnliche, komplexe Wirkungen irreparable Schäden am PS II von *Fontinalis antipyretica* hervorrufen und damit zu einer signifikanten Vitalitätsabnahme unter Cu(II)-Belastung führen.

Weiterhin zeigten die Untersuchungen, dass auch eine Cd(II)-Belastung im Bereich von 25 μM -100 μM kontinuierlich zu einem konzentrationsabhängigen Vitalitätsverlust führt (Abb. 8, Seite 50). Zu Versuchsende wurden Vitalitäten von 72 % bis 60 % gegenüber den Kontrollen gemessen. Interessant ist, dass Cd(II) die geringste intrazelluläre Aufnahme aller getesteten Schwermetalle (maximal 0,14 $\mu\text{mol/g}$ TM), aber die zweit toxischste Wirkung aufwies. Frühere Versuche bestätigen physiologische Schäden unter Cd(II)-Belastung im Quellmoos. So ermittelten Bech-Otschir (1995) und Sutter (2000) einen verminderten Chlorophyllgehalt bzw. eine reduzierte Chlorophyllfluoreszenz als Reaktion auf Cd(II). Ein weiterer Hinweis auf toxische Cd(II)-Effekte ist der Nachweis eines konzentrations- und zeitabhängig erhöhten Glutathionpools, verursacht durch den Anstieg des reduzierten Glutathions als Schwermetallstressantwort (Bruns et al., 2001, 2000b).

Die Schädigung des Photosyntheseapparates und die damit verbundene Verringerung des Genty-Parameters durch Cd(II) wird auch von Vassilev und Manolow (1999) durch *in-vivo* Untersuchungen an *Hordeum vulgare* bestätigt und wie folgt erklärt: Die Inaktivierung der SH-Gruppen der Enzyme des Calvin-Zyklus (Krupa et al., 1993) verursacht die Anhäufung reduzierter, geschlossener Reaktionszentren im PS II und führt folglich zur Verringerung der effektiven Quantenausbeute. Damit wird der Elektronenakzeptor Q_A vor weiteren Reduktionsreaktionen geschützt und die Nachlieferung von Elektronen vermindert. Geiken et al. (1998) und Masojidek et al. (2000) stellten die Abhängigkeit der Cd(II)-Toleranz zur Stimulation des D1-Protein-Turnover an Untersuchungen von *Pisum sativum* und *Vicia faba* fest. An beiden Objekten bewirkten Cd(II)-Belastungen über 24 h die Hemmung der D1-Synthese (Franco et al., 1999). Vassilev et al. (1995) beschrieben die Cd(II)-induzierte ultrastrukturelle Umordnung der Chloroplastenstruktur und der damit verbundenen Verringerung der Fluoreszenzkinetik. Eine drastische Abnahme des Chlorophyllgehaltes und der Anzahl der Antennenkomplexe im PS II führten in *Phaseolus vulgaris*-Blättern unter Cd(II)-Einfluss zu veränderten Photosyntheseleistungen (Tziveleka et al., 1999).

Im Gegensatz zu den Cu(II)- und Cd(II)-induzierten Effekten, zeigte *Fontinalis antipyretica* keine veränderte Vitalität unter einer Zn(II)- oder Pb(II)-Belastung bis zu 100 μM (Abb. 9 und 10, Seite 51), obwohl eine intrazelluläre Schwermetallaufnahme stattfand. So wurde bei der verwendeten Höchstkonzentration von 100 μM Zn(II) über den gesamten Versuchszeitraum von sieben Tagen eine signifikante Erhöhung des intrazellulären Zn(II)-Gehaltes bis auf 0,19 $\mu\text{mol/g}$ TM nachgewiesen (Abb. 14, Seite 55). Die Ergebnisse bestätigen somit die von Sutter (2000) getroffenen Aussagen zur geringen toxischen Wirkung der Schwermetalle Pb(II) und Zn(II) hinsichtlich einer PS II-Schädigung. Auch ein

physiologischer Effekt wurde erst ab 500 μM Pb(II) bzw. Zn(II) in Form eines GSH-Anstieges ermittelt (Bruns et al., 2001).

Versuche von Monnet et al. (2001) zeigten in *Lolium perenne* eine Zn(II)-bedingte Verringerung der effektiven Quantenausbeute des PS II nur bei sehr hohen Zn(II)-Konzentrationen ab 20 mM. In diesem Zusammenhang ist auch zu beachten, dass Zink als Spurenelement Bestandteil von mehr als 70 Enzymen (Cu/Zn-SOD, Karboanhydrase) sowie Cofaktor weiterer Enzyme und somit essentiell ist. Graham und McDonald (2001) beschrieben sogar eine durch Zn(II) erhöhte PS-Aktivität bei hitzestressen *Triticum aestivum*-Pflanzen und postulierten eine Zn(II)-bedingte Thermotoleranz. Im Gegensatz dazu wies El-Sheekh (1993) an *Chlorella fusca* eine Verringerung des Elektronentransportes im PS II infolge einer 20 mM-60 mM Zn(II)-Applikation nach. Toxische Zn(II)-Konzentrationen führten bei *Phaseolus vulgaris* zur Substitution des Mn-Atoms im wasserspaltenden Enzym der Photosynthese (van Assche und Clijsters, 1986). Der damit verbundene gestörte Energietransfers in den LHC-Komplexen kann zum völligen Erliegen der Photosynthese führen (Küpper et al., 1996).

Obwohl Pb(II), im Gegensatz zu Zn(II), kein essentieller Nährstoff ist, wurde bis 100 μM kein Effekt auf das PS II über den gesamten Versuchszeitraum gemessen. Die Ursache dafür ist nicht in einer geringen intrazellulären Aufnahme zu suchen, denn es wurden bis zu 0,33 μmol Pb(II)/g TM angereichert (Abb. 13, Seite 54). So deuten diese Ergebnisse auf eine geringe zelluläre Sensitivität, speziell des PS II, gegenüber den getesteten Pb(II)-Konzentrationen hin.

In der Literatur existieren über die photosynthetische Wirkung von Pb(II) zum Teil widersprüchliche Angaben. Sarvari et al. (1999) beobachteten an hydroponischen Kulturen von *Cucumis sativus* eine nur schwach Pb(II)-induzierte Abnahme des Chlorophyllgehaltes sowie der Aktivität des PS II. Bei *Fucus vesiculosus* tritt nach Pb(II)-Belastung eine verringerte Photosyntheseaktivität auf (Nygard und Ekelund, 1999). Dagegen wiesen Danilov und Ekelund (2001) an *Chlamydomonas reinhardtii* bei einer 24-stündigen Pb(II)-Belastung erhöhte Photosyntheseraten nach und die Toxizität im Hinblick auf die photosynthetische Aktivität wird wie folgt festgelegt: Cu(II) > Cd(II). Die Schwermetalle Zn(II) und Pb(II) zeigten positive Effekte. Für *Elodea canadensis* und andere submerse Pflanzen wird die Tendenz der Schwermetallionen das Mg-Zentralatom der Chlorophyllmoleküle zu verdrängen und damit den Elektronentransport zum PS II zu unterbrechen von Küpper et al. (1996) so beschrieben:

Hg(II) > Cu(II) > Cd(II) > Zn(II) > Ni(II) > Pb(II).

Auch die Vitalitätsuntersuchungen an *Fontinalis antipyretica* belegen spezifische toxische Wirkungen der Schwermetalle auf die Aktivität des PS II und damit auf die Vitalität. Der Grad der Toxizität wird dabei sowohl vom intrazellulären Gehalt als auch von der

physiologischen Wirkung der einzelnen Schwermetalle bestimmt. Im Konzentrationsbereich von 25 µM-100 µM ergeben sich daher folgende Prioritäten:

Cu(II) >> Cd(II) >> Pb(II)/Zn(II).

4.2 Intrazelluläre Aufnahme von Kupfer, Cadmium, Blei und Zink durch *Fontinalis antipyretica*

Aufgrund der speziellen Morphologie des Quellmooses (Kap. 2.1.1) erfolgt die Aufnahme von Nährstoffen unmittelbar über die gesamte Blattoberfläche. Somit können die der Nährlösung zugegebenen Schwermetalle an der Zellwand extrazellulär adsorbiert, in die Zellwand eingebaut und/oder intrazellulär aufgenommen werden. Wobei der letztere Prozess von physiologisch größter Bedeutung ist (Hall, 2002).

Nach Brown und Avalos (1991) sowie Brown und Beckett (1985) können Schwermetalle in austauschbarer Form mit unterschiedlicher Affinität an anionische Komponenten der Zellwand gebunden werden. Nach Shaw und Goffinet (2000) und Marschner (1995) wird die Bindung an Karboxylgruppen der Polygalacturonsäure innerhalb der Cuticula favorisiert.

Sutter (2000) zeigte für Cd(II), Zn(II) und Pb(II) bei *Fontinalis antipyretica* eine bis zum Erreichen des Gleichgewichtes zwischen Medium und Oberfläche zeit- und konzentrationsabhängige Zellwandadsorption. Im Hinblick auf die hohe Kationenaustauschkapazität der Mooszellwände (Shaw und Goffinet, 2000; Vazquez et al., 1999) und der submersen Lebensweise von *Fontinalis antipyretica* wird gleichzeitig die Funktion der Zellwand als Ionendepot diskutiert.

Eine Schwermetallspeicherung innerhalb der Zellwand wurde von Zn bei *Agrostis tenuis* und *Minuartia verna* beschrieben. Auch Cu wird weitgehend in den Zellwänden von *Agrostis*-Arten eingelagert (Schlee, 1992). Die epidermalen Zellwände in *Silene vulgaris* speichern z.B. Cu und Zn, gebunden an Protein bzw. als Silicat (Bringezu et al., 1999). *Cardaminopsis halleri* wies hohe Konzentrationen u.a. von Cu und Zn in epidermalen und parenchymatischen Zellwänden auf (Neumann und zur Nieden, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Aufnahme von Cu(II), Cd(II), Pb(II) und Zn(II) in *Fontinalis antipyretica* untersucht. Bei allen getesteten Schwermetallen erfolgte dieser Prozess zeit- und konzentrationsabhängig (Abb. 11-14, Seite 52-55). Dabei verhielten sich die intrazellulären Gehalte, unter Berücksichtigung der Kontrollwerte, wie folgt: Cu(II) > Pb(II) > Zn(II) > Cd(II). Es ist ersichtlich, dass bei allen drei verwendeten Konzentrationen die höchsten Gehalte bei Cu(II) und Pb(II), nur geringe intrazelluläre

Gehalte dagegen bei Cd(II) und Zn(II), gemessen wurden. So lagen nach Applikation von 100 μM des jeweiligen Schwermetalls zu Versuchsende am siebenten Tag 0,40 $\mu\text{mol Cu(II)/g TM}$; 0,33 $\mu\text{mol Pb(II)/g TM}$; 0,19 $\mu\text{mol Zn(II)/g TM}$ und 0,14 $\mu\text{mol Cd(II)/g TM}$ vor (Anhang Tab. 3). Die Ergebnisse deuten somit auf einen effektiveren Cu(II)-Transport in das Zellinnere, im Vergleich zu Cd(II), Pb(II) und Zn(II). Insgesamt hatte eine Zunahme der Schwermetallkonzentration im Medium auch eine Erhöhung der intrazellulären Gehalte zufolge. Der Konzentrationsanstieg von 25 μM auf 100 μM im Medium führte dabei zu einer Zunahme der intrazellulären Gehalte um den Faktor 3,6 (Cu(II)); 2,3 (Cd(II)); 2,7 (Pb(II)) bzw. 2,9 (Zn(II)). Im Vergleich dazu konnte im selben Konzentrationsbereich eine 4fache, 5fache bzw. 3,5fache Erhöhung der extrazellulär gebundenen Fraktion von Cd(II), Pb(II) und Zn(II) gezeigt werden (Sutter, 2000). Es ist somit anzunehmen, dass differente Mobilitäten aufgrund eines elementspezifischen Transportmechanismus in das Zytoplasma existieren. Insgesamt bestätigen die Ergebnisse das von Sutter (2000) und Bruns et al. (2001) beobachtete Cd(II)-, Pb(II)- und Zn(II)-Aufnahmeverhalten unter ähnlichen Versuchsbedingungen in *Fontinalis antipyretica*.

Vazquez et al. (1999) wiesen am Quellmoos bei 60-minütiger Schwermetallapplikation (0 ppm-200 ppm) eine direkte Abhängigkeit zwischen dem Metallgehalt der intrazellulären Fraktion und der Konzentration des Außenmediums nach. Die intrazelluläre Aufnahme erfolgte mit folgender Priorität: Cd(II) > Zn(II) > Cu(II) > Pb(II). Allerdings spiegeln diese Ergebnisse nicht das Aufnahmeverhalten über einen längeren Zeitraum wider und können in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. In der Literatur werden weiterhin Studien zu Kinetiken der Metallaufnahme an *Fontinalis antipyretica* angegeben, die aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen aber keine signifikanten Vergleiche zu den Ergebnissen dieser Arbeit zulassen. So zeigten Lopez et al. (1994) in Freilandversuchen über 28 Tage die Aufnahme von Schwermetallen in dieser Reihenfolge: Cd(II) > Pb(II) > Cu(II) > Zn(II). Da aber nur der Schwermetallgesamtgehalt analysiert wurde, ist eine klare Aussage zum intrazellulären Gehalt nicht möglich. Samecka-Cymerman und Kempers (1999) bestätigten allgemein die bereits erwähnte Korrelation zwischen Schwermetallkonzentration des Mediums und dem Elementgehalt des Quellmooses in Feldstudien.

Die vorliegenden Untersuchungen an *Fontinalis antipyretica* zeigten weiterhin, dass nicht nur die intrazelluläre Anreicherung sondern auch die Kinetik der Aufnahme charakteristische Unterschiede zwischen den einzelnen Schwermetallen aufwies. Generell erfolgte die intrazelluläre Aufnahme von Cd(II), Zn(II) und Cu(II), im Gegensatz zur extrazellulären Adsorption, langsam aber kontinuierlich. Nur bei geringen Konzentrationen von 25 μM stagnierte die Aufnahme nach drei bzw. fünf Tagen und war

im Fall von Pb(II) unabhängig der applizierten Konzentration im Wesentlichen nach drei Tagen abgeschlossen.

Auch Cenci (2000) wies eine Sättigung der Pb(II)-Aufnahme im Quellmoos bei Freilandversuchen nach vier Tagen nach, definierte Akkumulation aber als Summe von extrazellulärer Adsorption und intrazellulärer Aufnahme. Weiterhin widerlegen diese Befunde die von Gagnon et al. (1998) erstellte Hypothese von einem bevorzugten zellulären Cd(II)-Transport aufgrund Ca(II)- und Mg(II)-ähnlicher Eigenschaften. Auch ein gegenüber Pb(II) bevorzugter intrazellulärer Transport von Cd(II) und Zn(II) konnte nicht bestätigt werden (Brown und Sidhu, 1992). Zu diesem Thema sind in der Literatur kontrovers geführte Diskussionen vorhanden:

Im Rahmen einer Studie zur Schwermetallaufnahme im Kurzzeitversuch bei *Fontinalis antipyretica* diskutierten Vazquez et al. (1999) einen affinitätsabhängigen, transmembranen Carriertransport als energieabhängiges Transportsystem (Beckett und Brown, 1984). Lopez et al. (1994) schlossen anhand ihrer Schwermetallaufnahmekinetiken an *Fontinalis antipyretica* auf einen aktiven intrazellulären Transportmechanismus der adsorbierten Ionen. Pickering und Puia (1969) beschrieben die stoffwechselabhängige Metallabsorption im Quellmoos durch zwei Mechanismen: Diffusion und aktiven Transport.

Bereits bekannte Metallmembrantransporter sind Vertreter aus der Zn(II)-regulierten ZIP-Metall-Transport-Familie wie z.B. ZNT1 und ZTP1 aus *Thlaspi caerulescens* (Pence et al., 2000; Lasat et al., 2000; Assuncao et al., 2001) oder ZIP1-4 aus *Arabidopsis thaliana* (Mäser et al., 2001; Grotz et al., 1998). Interessant dabei sind die unterschiedlichen Co-Affinitäten zu Schwermetallen wie Cd(II), Cu(II) und Pb(II), die bei entsprechendem Ionenangebot einen transmembranen Transport zur Folge haben. Als primäres Metalltransportsystem operieren die CP_{1B}-ATPasen aus *Arabidopsis thaliana* (Axelsen und Palmgren, 2001; Williams et al., 2000). Weiterhin ist in *Arabidopsis* die multispezifische Metallaufnahme über Nramp-Transporter (natural resistance-associated macrophage protein) nachgewiesen (Thomine et al., 2000).

Insgesamt deutet die mit der Zeit verringerte Aufnahmegeschwindigkeit auf einen Diffusionsmechanismus hin (2. Fick'sches Diffusionsgesetz), ebenso die Korrelation zwischen Außenkonzentration des Mediums und intrazellulärem Schwermetallgehalt. Andererseits könnten die charakteristischen Unterschiede der intrazellulären Gehalte der einzelnen Schwermetalle das Ergebnis eines passiven (affinitätsabhängigen, durch Carrier vermittelten) oder aktiven Transportes darstellen. Die Energieabhängigkeit bleibt zu untersuchen. Ebenso sollte der Nachweis homologer, bereits identifizierter membraner Transportkomponenten auf genetischer Ebene weitere Erkenntnisse zum Schwermetallaufnahmemechanismus in *Fontinalis antipyretica* liefern.

4.3 Zelluläre Lokalisation und der Bindungsstatus von Kupfer in *Fontinalis antipyretica*

Oberste Priorität in der Schwermetalltoleranz besitzen diejenigen Mechanismen, die den Organellen und dem Zytoplasma freie Metallionen in toxischen Konzentrationen entziehen. Die Regulation der Exkretion, Komplexierung, Sequestration und Kompartimentierung von Schwermetallionen ist für deren physiologische Wirksamkeit ausschlaggebend (Hall, 2002; Clemens, 2001; Salt et al., 1998). Ein stark vereinfachtes Modell einer möglichen Schwermetallresistenz von Ernst et al. (1992) in höheren Pflanzen beschreibt die Aufnahme der Metallionen über die Zellwand, Zellmembran und den zytoplasmatischen Transport durch schwermetallbindende Liganden über den Tonoplasten in die Vakuole, dem Auffangbecken für Metabolite und Toxine.

Die vorliegenden Untersuchungen lieferten Aussagen zur ultrastrukturellen Verteilung des intrazellulär aufgenommenen Cu sowie zu Cu-Bindungspartnern, widerspiegeln also die Schwermetallkomplexierung und -kompartimentierung in *Fontinalis antipyretica*.

Die Zellwände der Kontrollen zeigten in den elektronendichten Niederschlägen Elemente wie Si, Sn, P, Ca und Cu. In Cu(II)-belasteten Proben wurde eine ähnliche Zusammensetzung gemessen, jedoch traten zusätzlich Cl und Zn auf (Abb. 15, Seite 56). Ähnliche Elementzusammensetzungen der elektronendichten Niederschläge der epidermalen Zellwand sind von *Silene vulgaris* (Bringezu et al., 1999), *Minuartia verna* (Neumann et al., 1997) und *Cardaminopsis halleri* (Neumann und zur Nieden, 2000) beschrieben. In *Fontinalis antipyretica* konnte infolge der Cu(II)-Applikation keine erhöhte Cu-Konzentration in der Zellwand mittels EDX-Spektroskopie beobachtet werden. Versuche zum Cd(II)-Aufnahmeverhalten in *Fontinalis antipyretica* wiesen dagegen auf eine Depotfunktion der Zellwand hin (Bruns et al., 2001). Die Barriere- und Speicherfunktion der Zellwand spielt bei Schwermetalltoleranzmechanismen eine große Rolle (Bringezu et al., 1999; Brunold et al., 1996; Ernst et al., 1992). In Studien zu Kationenaustauschprozessen in *Sphagnum*-Arten wurde die Bindung von z.B. Ca(II) und Mg(II) an Pektinsäure (Polygalacturonsäure), die in einer Zellulosematrix eingebunden ist (Brown, 1982), nachgewiesen. In höheren Pflanzen wurden auch zellwandspezifische Zn-Silicatkomplexe bei *Minuartia verna* (Neumann et al., 1997) und *Silene vulgaris* (Bringezu et al., 1999) sowie Cu-Proteinkomplexe in *Armeria maritima* (Neumann et al., 1995) und *Silene vulgaris* (Bringezu et al., 1999) beschrieben.

In den elektronendichten Niederschlägen des Zytosols waren u.a. die Elemente Si, Cl, S und P nachweisbar (Abb. 16, Seite 56). Cu trat in der Kontrolle, aber auch in belasteten Proben, nur in Spuren auf. Die in den Aufnahmeversuchen ermittelte intrazelluläre Cu(II)-

Anreicherung führte folglich zu einer effektiven Kompartimentierung der Ionen. Es ist ersichtlich, dass die Vermeidung toxischer Metallionenkonzentrationen im Zytoplasma von essentieller Bedeutung ist. Im Rahmen von Schwermetalltoleranzuntersuchungen an *Silene vulgaris* (Bringezu et al., 1999) und *Minuartia verna* (Neumann et al., 1997) konnten ebenfalls nur Spuren bzw. keine Schwermetalle im Zytoplasma mittels EDX-Messungen nachgewiesen werden.

Das parallele Vorkommen von S und Cu im Zytoplasma von *Fontinalis antipyretica* führte zur Bestimmung des Cu-Bindungsstatus im Hinblick auf eine gemeinsame Bindung.

Die EELS-Analyse der Schwefel-L_{2,3}-Kante zeigte eine hohe Übereinstimmung des Energieverlustspektrums von Cu-GSH und dem Zytoplasma (Abb. 19/A, Seite 58). Folglich ist eine Komplexierung der Cu-Ionen an SH-Gruppen zytoplasmatischer Proteine, wie z.B. das Cu-Chaperon CCH1 (*Arabidopsis thaliana*, Cu-Bindung an der N-terminalen Domäne MXCXXC; Mira et al., 2001b), das BCB-Protein (*Arabidopsis*, blue-copper-binding protein; Cu-Bindung an der Cys/His-Domäne; Ezaki et al., 2001) oder an Metallothionein (*Arabidopsis*, Cu-Bindung an Cys-Motiven; Murphy et al., 1997) in *Fontinalis antipyretica* möglich. Die kovalente Bindung an S konnte aufgrund abweichender Spektren ausgeschlossen werden (nicht gezeigt). Frühere Untersuchungen wiesen auf die Chelatierung von Cd(II)-Ionen durch SH-Gruppen hin (Bruns et al., 2001). Da keine durch Schwermetall induzierbare Phytochelatinsynthese im Quellmoos nachzuweisen ist, könnte die Bindung über SH-Gruppen auch an den Phytochelatin-Precursor GSH erfolgen, um den Cu-Transport zur Vakuole zu gewährleisten. Untersuchungen in *Fontinalis antipyretica* zeigten eine konzentrationsabhängig induzierte GSH-Synthese durch Cd(II), Pb(II), Zn(II) und Cu(II) (Bruns et al., 2001).

Der Transport von Cd(GSH)₂-Komplexen in die Vakuole wurde in *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben (Li et al., 1997). Vögeli-Lange und Wagner (1996) postulierten die Bindung von Cd-Ionen an GSH im Zytoplasma von *Nicotiana* und den anschließenden Transport in die Vakuole.

Die EELS-Analysen des Zytoplasmas Cu(II)-belasteter *Fontinalis*-Proben sind somit ein weiteres Indiz für die von Bruns et al. (2001) beschriebene Rolle des GSH als zelluläre Strategie zur Vermeidung von Schwermetallstress in aquatischen und terrestrischen Moosen. Weiterhin wäre die Chelatierung der Cu-Ionen durch thiolreiche Metallothioneine denkbar, deren Funktion in der Schwermetallhomöostase in höheren Pflanzen von zahlreichen Autoren beschrieben wurde (Hall, 2002; Clemens, 2001; Rauser, 1999).

Die EDX-Messungen in den Plastiden von *Fontinalis antipyretica* wiesen neben Si, S und P ein deutlich erhöhtes Vorkommen an Cl und Cu, infolge der intrazellulären Cu(II)-Aufnahme, auf (Abb. 17, Seite 57). Interessant ist außerdem der hohe Cu-Anteil in den Niederschlägen der Kontroll-Plastiden. Bekannt ist, dass mehr als 50 % des Cu in den

Chloroplasten an Plastocyanin, einem "blue-protein" der Thylakoidmembran, gebunden ist (Marschner, 1995). In den von Bringezu et al. (1999) beschriebenen Experimenten zur Elementzusammensetzung in *Silene vulgaris* von Cu-belasteten Standorten zeigte das Zytoplasma ebenfalls nur Spuren von Cu, die Plastiden dagegen hohe Gehalte. Hingegen bei *Minuartia verna* vom gleichen Standort, weder im Zytoplasma noch in den Organellen, Cu in elektronendichten Niederschlägen nachzuweisen war (Neumann et al., 1997).

EDX-Spektren der vakuolären Niederschläge in *Fontinalis antipyretica* zeigten sehr klar eine Cu-Anreicherung als Folge der intrazellulären Aufnahme. Insgesamt erfolgte also die Kompartimentierung der aufgenommenen Cu-Ionen in der Vakuole. Gleichzeitig traten auch im Vergleich zu Kontrollproben erhöhte Gehalte von Si, Zn, P, Ca sowie K auf (Abb. 18, Seite 57).

Vögeli-Lange und Wagner (1990) bezeichneten die Vakuole auch als Hauptspeicherkompartiment für toxische Verbindungen. Die vakuoläre Sequestration ist einer der wichtigsten intrazellulären Mechanismen zur Vermeidung toxischer Ionenkonzentrationen (Hall, 2002; Rauser, 1999; Neumann et al., 1995). Clemens (2001) machte dies in einem allgemeinen Modell zur Regulation der pflanzlichen Homöostase deutlich.

In *Fontinalis antipyretica* war nicht nur der Nachweis einer Aufnahme des Cu in die Vakuole von Interesse, sondern auch dessen möglicher Bindungspartner. Generell ist die vakuoläre Komplexierung von Schwermetallen abhängig von der Zusammensetzung der gespeicherten Metaboliten, dem pH-Wert und der spezifischen Affinität der Metalle gegenüber den vorhandenen Liganden. Nach computersimulierten Berechnungen von Wang et al. (1991) stellt Zitrat einen wichtigen Schwermetallkomplexor in der pflanzlichen Vakuole dar. Im Ni(II)-Hyperakkumulator *Thlaspi goesingense* lokalisierten Krämer et al. (2000) den Hauptteil des intrazellulär aufgenommenen Ni in der Vakuole, gebunden an Zitrat.

In *Fontinalis antipyretica* ermittelten EELS-Analysen, im Gegensatz zum Zytosol, anorganisches Phosphat als einen Cu-Liganden (Abb. 19/B, Seite 58). Diese Form der vakuolären Schwermetallkomplexierung ist auch für Cd(II) beschrieben (Bruns et al., 2001; Sutter, 2000) und ist in höheren Pflanzen noch nicht nachgewiesen. In beiden Fällen wurde die Übereinstimmung des Standard-Phosphatspektrums mit den vakuolären Spektren und der entsprechenden quantenchemischen Kalkulation festgestellt. Die Bindung an Schwefelspezies erfolgte nicht (Sutter, 2000). Dies lässt die Annahme zu, dass innerhalb der Vakuole eine Beteiligung der von Vögeli-Lange und Wagner (1996) in *Nicotiana tabacum* nachgewiesenen Phytochelatinkomplexen oder der von Lichtenberger und Neumann (1997) in *Lycopersicon* beschriebenen CdS/Phytochelatinkomplexen in *Fontinalis antipyretica* nicht erfolgt. Das mittels AAS

ermittelte Vorkommen von Pb(II) und Cd(II) in Kontrollmaterial konnte aufgrund der hohen biologischen Varianz des Materials anhand der EDX-Spektren nicht bestätigt werden. Um zweifelsfrei das Cu-Bindungsverhalten im Zytoplasma und der Vakuole zu klären, ist zusätzlich die Prüfung einer möglichen Glutamin- bzw. Ziträt- oder Malatbindung mittels EELS-Analyse durchzuführen. Alle drei Verbindungen können als Metallchelatoren operieren und zeigten unter Cu(II)-Belastung erhöhte Konzentrationen bzw. Vorkommen (Abb. 33, Seite 82 bzw. Anhang Abb. 6).

4.4 Untersuchungen zur Schwermetallstressantwort auf Proteinebene in *Fontinalis antipyretica*

4.4.1 Charakterisierung der ein- und zweidimensionalen Proteinmuster

Proteine sind die Werkzeuge der Zelle. Ihre Regulation unterliegt einem komplexen Netzwerk, das unter anderem auch von exogenen Faktoren beeinflusst wird. Um diese Effekte darzustellen, werden Proteingemische unterschiedlicher Pflanzenproben unter definierten Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt und proteinchemisch analysiert. Es ist bekannt, dass toxische Schwermetallkonzentrationen intrazellulär zu gravierenden qualitativen und quantitativen Veränderungen in der Proteinzusammensetzung führen können. So kann ein Überschuss an Schwermetallionen zur Synthese von Stressproteinen wie z.B. Phytochelatine und Metallothioneine führen, deren Funktion u.a. in der Regulierung intrazellulärer Schwermetallionenkonzentrationen liegt (Cobbett, 2000b; Clemens, 2001; Rauser, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit lag der Schwerpunkt der proteinchemischen Untersuchungen auf der Detektion cysteinreicher und niedermolekularer Proteine in *Fontinalis antipyretica*. Metallothioneine zeichnen sich u.a. durch folgende Eigenschaften aus: Sie sind hitzestabil (McCormick et al., 1991) und können unter anderem durch Hitze induziert, durch Schwermetalle induziert oder reprimiert werden (Rauser, 1999). Wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, wurde das Material mit 50 µM Cu(II), Cd(II), Pb(II) bzw. Zn(II) belastet und die extrahierten Proteine eindimensional gelelektrophoretisch getrennt. Die SDS-Gele der verschiedenen Proben wiesen keine signifikanten Veränderungen des Proteinmusters im Molekulargewichtsbereich bis 20 kDa, im Vergleich zu Kontrollmaterial, auf (Abb. 20, Seite 60). Weiterhin wurde die Induktion zweier Proteine (ca. 45 kDa und 50 kDa) in allen kultivierten Proben festgestellt. Im Gegensatz dazu trat eine ca. 14 kDa-Bande in frischen Standortproben verstärkt auf. Dies könnte eine Reaktion auf mechanische

Beanspruchung, Verwundung oder Temperaturschwankungen im Rahmen der Probennahme und –aufbereitung auf Proteinebene darstellen. Das natürliche Vorkommen von *Fontinalis antipyretica* wird bei Wassertemperaturen von unter 15 °C beschrieben (Nebel und Philippi, 2000). Interessanterweise kam es nur nach einem Hitzeschock von 30 °C über einen Tag zu einer signifikanten Änderung des Proteinmusters, der Induktion einer ca. 30 kDa-Bande (Abb. 21, Seite 61). Auch ein dreitägiger Hitzeschock führte nicht zu einem signifikanten Proteinabbau. Dies könnte ein Hinweis auf aktive, molekulare Schutzmechanismen wie z.B. Hitzeschockproteine sein.

Das Protein der 70 kDa-Bande wird nicht temperaturabhängig exprimiert, da die Bande in allen Temperaturvarianten (10 °C-30 °C) verstärkt auftrat (Abb. 21, Seite 61). Allerdings konnte im selben Molekulargewichtsbereich eine temperaturabhängige, positive Immunreaktion mit dem anti-HSP 70-AK festgestellt werden (Abb. 30, Seite 74). In beiden Fällen werden somit unterschiedliche Proteine beschrieben.

Die Hitzefällung (McCormick, 1991) wird fast ausschließlich zur Isolierung von MT's aus tierischem Material angewandt, setzt aber aufgrund des geringen Reinigungsfaktors eine relevante Ausgangskonzentration des gesuchten Proteins voraus.

In *Fontinalis antipyretica*-Proben wurde im Ergebnis der Hitzefällung eine differente Zusammensetzung hitzestabiler Proteine in Kontrollen und Cu(II)- bzw. Cd(II)-belasteten Proben deutlich (Abb. 22, Seite 62). Die Konzentrierung der hitzestabilen Proteine erfolgte besonders im Molekulargewichtsbereich bis 14 kDa. Eine positive Immunreaktion mit dem anti-Peptid-AK Metallothionein p2 trat in dieser Proteinfraction jedoch nicht auf. Die Cu(II)-induzierte Bande G (ca. 20 kDa) sowie die Banden E und F (ca. 14 kDa und 7 kDa), die in der Kontrolle die stärkste Expression zeigten, wurden für eine weitere Charakterisierung mittels MALDI-TOF- und Micro-Sequenzanalyse ausgewählt. Dabei stellte sich ein generelles Problem der Analytik der *Fontinalis antipyretica*-Proteine dar: Die begrenzte Identifizierung von Proteinen aus nicht sequenzierten Genomen über Peptidmassenfragmente. Daher führten die MALDI-TOF-Analysen interner Peptidfragmente aufgrund geringer Homologien zu Datenbank-Sequenzen nicht zur Identifizierung der Proteine. Die Micro-Sequenzanalyse setzte, bedingt durch die N-terminale Modifizierung der oben genannten (im Übrigen aller analysierten) Proteine, einen tryptischen Verdau voraus. Dieser Schritt erwies sich als limitierende Größe, denn Schwierigkeiten bei der Spaltung sowie der Elution der Peptide aus hochvernetzten Gelen (10-20 % Tris/Tricin) führten in zahlreichen Proben zu einer schlechten Sequenzabdeckung und damit zu keiner Sequenzinformation, wie im Fall der Proteine E, F und G (Abb. 22, Seite 62). Generell wurde eine Carboxymethylierung der Proteinproben in Vorbereitung der Micro-Sequenzierung vor der eindimensionalen Trennung durchgeführt. Ziel war die Bildung von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken

cysteinreicher Proteine und damit Aggregationen und unvollständige enzymatische Verdaus zu verhindern. Insgesamt wirkte sich die Kombination von niedermolekularen Proteinen, die nur in stark vernetzten Gelen trennbar sind und die Notwendigkeit tryptischer In-Gel-Verdaus ungünstig auf den Erfolg der Micro-Sequenzierung aus.

Durch die Anwendung der zweidimensionalen Proteintrennung konnten Unterschiede im Proteinmuster der Kontroll- und schwermetallbelasteten Proben dargestellt werden. Bislang sind 2D-Studien an Bryophyten nicht bekannt. Eine mögliche Ursache könnte in dem komplexen Vorkommen sekundärer Stoffwechselmetabolite wie z.B. Phenole, Lipide und Terpene (Shaw und Goffinet, 2000; Hegnauer, 1986) liegen. Da besonders die Trennung der ersten Dimension sensitiv gegenüber Lipiden, Phenolen, Salzen u.a. reagiert, obliegt der Probenvorbereitung die größte Bedeutung. Gleichzeitig ist eine optimale Proteinkonzentration zu ermitteln, die Aggregationen während der IEF verhindert, dennoch aber Verluste, z.B. in der Äquilibrationsphase (Lottspeich und Zorbas, 1998), kompensiert. Die Einsatzmöglichkeiten dieser Methode sind vielfältig. Ist das Detektionsziel klar definiert, können z.B. entwicklungs- oder stressspezifische Proteine ermittelt werden. So identifizierten Pardo et al. (2000) durch 2D-Gelelektrophorese Enzyme, die an der Zellwandgenese in *Saccharomyces cerevisiae* beteiligt sind. Neu charakterisierte Proteine während der Samenkeimung beschrieben Gallardo et al. (2001) in *Arabidopsis thaliana*. Die Bedeutung der Hitzeschockproteine in der Schwermetalltoleranz in *Lycopersicon peruvianum* untersuchten Neumann et al. (1994). 2D-Studien lieferten dabei Informationen zum Cd(II)-induzierten Stressproteinmuster.

An *Fontinalis antipyretica* wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese zur Detektion niedermolekularer, schwermetallinduzierter Proteine (Metallothioneine) angewendet. Um funktionelle Aussagen aufgrund veränderter Proteinmuster treffen zu können, war eine Minimierung weiterer beeinflussender Parameter grundlegend (Kap. 3.4.2).

Trotz Einsatz einer maximal auftrennbaren Proteinmenge von 100 µg war die detektierte Anzahl an Spots relativ gering und lag je nach Probe zwischen 72 und 118. Bei direkten Vergleichen mit 2D-Proteinmustern höherer Pflanzen sind die gewebespezifische Expression als auch die Unterschiede in der Probenvorbereitung und in der Proteintrennung zu beachten.

Im Molekulargewichtsbereich bis 20 kDa erfolgte die verstärkte Expression der Proteine mit folgender Priorität: Cd(II)/Zn(II) > Cu(II) > Pb(II) und die der induzierten Proteine: Cu(II) > Zn(II) > Cd(II) > Pb(II). Im Gegensatz zu 1D-Gelen wiesen die 2D-Gele signifikante Unterschiede im Proteinmuster der einzelnen Schwermetallvarianten auf. Insbesondere sind die schwermetallinduzierten Spots 111, 112 und 113 der Cu(II)-Probe (Tab. 3, Seite 66) und der Spot 104 aus der Zn(II)-Probe (Tab. 6, Seite 69) zu beachten, da sie Molekulargewichte im Bereich von 7 kDa-10 kDa aufwiesen. Die ermittelten pl-

Werte von 7,2; 6,0; und jeweils 3,9 lagen nach Yang et al. (2000) im Bereich der Metallothioneine, die eine große Variabilität in den pI-Werten zeigen. Zur Charakterisierung der genannten Proteine wurden die 2D-Blots weiterer Cu(II), Cd(II), Pb(II) und Zn(II)-Proben mit dem anti-Peptid-AK MT p2 geprüft. Eine positive Immunreaktion trat in keinem Fall auf, so dass auf eine nachfolgende Micro-Sequenzierung im Rahmen dieser Arbeit verzichtet wurde.

Insgesamt stellte die zweidimensionale Gelelektrophorese eine hochauflösende Methode zur Detektion stressinduzierter Proteine in *Fontinalis antipyretica* dar. Als limitierender Faktor zur Identifizierung und Charakterisierung der Proteine erwies sich insbesondere die MALDI-TOF-Analyse und Micro-Sequenzierung.

4.4.2 Metallothioneine, Hitzeschockproteine und Cyclophiline

Der immunologische Nachweis spezieller Proteine setzt spezifische Kreuzreaktionen des Antikörpers voraus. Detektiert werden dabei Proteine mit Antigen-homologen Epitopen.

Die Exprimierung von Proteinen, die eine mögliche Rolle in der Schwermetallstressantwort spielen können, wurde mittels anti-Peptid-AK MT p2; anti-HSP 70-AK, anti-HSP 17-AK und anti-Cyclophilin 18-AK überprüft (Kap. 2.4.7.1).

Im Gegensatz zu tierischen anti-MT-AK'ern zeigte der anti-Peptid-AK MT p2, der in einer Verdünnung von 1:50.000 eingesetzt wurde, keinerlei unspezifische Immunreaktionen. Die nach eindimensionaler Proteintrennung detektierte Doppelbande im Molekulargewichtsbereich von ca. 8 kDa wies auf zwei konstitutive Proteine hin, deren Exprimierung in Abhängigkeit von Schwermetall und Inkubationsdauer verringert wurde (Abb. 28, Seite 72). Eine physiologische Funktion dieser Proteine hinsichtlich einer Schwermetallstressantwort ist daher auszuschließen.

Die komplexen Regulationsmechanismen der Metallothioneine sind noch unklar. Rauser (1999) gibt einen Überblick zu Wechselwirkungen von Schwermetallen, Zucker, Salzen, Temperatur, Zytokine, Salicylsäure und Abscisinsäure mit pflanzlichen Metallothioneinen. Auch entwicklungspezifische Regulationen bei Fruchtreife und Blatt-Seneszenz werden aufgeführt. Aus einer Vielzahl von Studien ist ersichtlich, dass die Transkription der MT-Gene durch Cu(II), Cd(II) und Zn(II) sowohl induziert als auch gehemmt werden kann. Zum Einfluss von Pb(II) wurden keine Angaben gemacht.

Immunologische Nachweise von MT-Proteinen in pflanzlichem Gewebe sind bislang nur aus *Cucumis sativus* (Melkonyan und Nalbandyan, 1989) und aus *Arabidopsis thaliana* mittels anti-GST-MT2a/1a (Murphy et al., 1997) bekannt. Dabei ist zu beachten, dass die entsprechenden *Arabidopsis*-Proteine aus hoch gereinigten Fraktionen, nicht aber aus

dem Rohextrakt detektiert werden konnten. Die Spezifität des anti-Peptid-AK in *Fontinalis antipyretica* ermöglichte jedoch den signifikanten Nachweis einer Protein-Doppelbande aus dem Rohextrakt. Die Micro-Sequenzanalyse der entsprechenden internen Peptidfragmente ermittelte die Sequenz eines noch nicht beschriebenen Proteins (Kap. 3.4.5.2). Dieses Ergebniss bleibt mit Sequenzanalysen weiterer Peptidfragmente zu verifizieren. Auch sollte die Ursache dafür geklärt werden, warum die Proben der 2D-Blots im Gegensatz zu den 1D-Blots keine Reaktion auf den Antikörper zeigten.

Die Detektion der Hitzeschockproteine erfolgte mit den anti-HSP 70-AK bzw. anti-HSP 17-AK, die hochspezifisch mit zytosolischen HSP's reagieren. Die induzierte Synthese von Hitzeschockproteinen ist als hochkonservierte Stressreaktion auf Hitzeschock aber auch auf Schwermetalle bekannt. (Nover et al., 1989). Die Proteine der HSP-70-Familie operieren u.a. als molekulare Faltungshelfer und verhindern somit die Aggregation denaturierter Proteine bzw. katalysieren deren korrekte Rückfaltung (Goloubinoff et al., 1999). Aufgrund der essentiellen Funktion der HSP's tritt die sogenannte Hitzeschockantwort parallel auch zu Trocken-, Kälte-, Schwermetall- und oxidativen Stress auf (Schöffl et al., 1998) und wird als das zentrale Ereignis einer Stressantwort betrachtet (Schlee, 1992). Generell wird die verstärkte Expression der HSP's unter Schwermetallstress in Verbindung mit dem Schutz zellulärer Proteine und Membranen vor toxischen Schwermetalleffekten gesehen (Hall, 2002; Lee et al., 1997).

Die positive Immunreaktion des ca. 70 kDa-Proteins in *Fontinalis antipyretica* erfolgte insgesamt unter Hitzestress deutlicher als unter Schwermetallstress. Konstitutiv wurde das Protein nicht exprimiert. Die Hitzeschockversuche an *Fontinalis antipyretica* zeigten bereits nach vier Stunden bei einer Temperatur von 20 °C eine signifikante Stressantwort. Das detektierte Proteinsignal erreichte nach einem Tag in beiden Temperaturvarianten Maximalwerte (Abb. 30, Seite 74). Dieses Ergebnis widerspiegelt die klassische Induzierbarkeit der über mehrere Tage stabilen HPS's und bestätigt gleichzeitig die physiologische Temperaturamplitude des Quellmooses.

Eine Stressantwort in Form einer signifikanten Induktion trat auch bei einer 50 µM Cd(II)- und Cu(II)-Applikation bereits nach vier Stunden auf. Langzeitbelastungen führten zu signifikant verringerten, positiven Immunreaktionen. Pb(II) und Zn(II) induzierten das Proteinsignal nur sehr schwach nach einem Tag und drei Tagen (Abb. 29, Seite 73). Diese schnelle Stressantwort könnte mit dem Schutz der Proteine vor schwermetallinduzierter Denaturierung und Aggregation und den daraus resultierenden physiologischen Schäden im Zusammenhang stehen.

Die Ergebnisse werden durch Untersuchungen von Wollgiehn und Neumann (1999) zur Rolle der HSP's in der Schwermetallstressantwort in *Silene vulgaris* und *Lycopersicon peruvianum* bestätigt. Die Autoren zeigten u.a. die Akkumulation von sHSP's nach

ebenfalls vier Stunden unter Cd(II)-Stress. Eine bedeutende Rolle wurde den HSP's in der Stressantwort zum Schutz vor toxischen Effekten an Membranen und zytoplasmatischen Strukturen zugeschrieben. Elektronenmikroskopische Studien an *Lycopersicon peruvianum* wiesen zudem eine Cd(II)-induzierte Bindung von HSP 70 an Plasmamembranen nach (Neumann et al., 1994).

Im Fall des HSP 17 konnte keine positive Immunreaktion des Antikörpers mit *Fontinalis antipyretica*-Proteinen als Hitzestress- oder Schwermetallstressantwort nachgewiesen werden (Kap. 3.4.3.3). Die Proteine der sogenannten kleinen HSP-Familie (sHSP) werden nach Wehmeyer und Vierling (2000) in hohem Maße infolge Temperaturstress induziert.

Die Synthese der HSP's bedingt die Transkription neuer mRNA. Die Stabilität der Hitzeschock-mRNA korreliert in pflanzlichen Zellen mit der Bildung zytoplasmatischer Hitzeschockgranula (Nover und Neumann, 1989). Diese Granula (HSG's) sind zusammen mit den Nucleoli die hauptsächlichsten Lokalisationsorte für HSP 70 und 17 (Schlee, 1992). Die Akkumulation der Hitzeschockgranula im Zytoplasma von *Lycopersicon peruvianum* unter Cd(II)-Einfluss beschreibt auch Neumann et al. (1994).

Im Gegensatz dazu konnte das Vorkommen der HSG's in *Fontinalis antipyretica* unter Cu(II)-Belastung auf ultrastruktureller Ebene nicht nachgewiesen werden (Herr Dr. D. Neumann, persönliche Mitteilung). Demnach könnte das detektierte HSP 70-Protein an der Plasmamembran bzw. am Nucleolus gebunden sein. Hinsichtlich der möglichen Cu(II)-induzierten Membranschäden wäre die elektronenmikroskopische Überprüfung der Lokalisation des HSP 70 interessant.

Weiterhin wurden Untersuchungen zur Expression der Cyclophiline unter Schwermetallstress durchgeführt (Kap. 3.4.3.4). Diese Proteine besitzen eine Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase-Aktivität (PPIase) und kommen als Helfer-Enzyme der molekularen Chaperone konstitutiv in pflanzlichem Gewebe vor (Marivet et al., 1994). Studien an *Zea mays* und *Vicia faba* zeigten eine Hg(II)-bedingte Akkumulation von Cyclophilin-mRNA nach bereits sechs Stunden (Marivet et al., 1992). Eine ähnliche Reaktion konnte bei verschiedenen Pflanzen auf z.B. Hitze- und Salzstress oder durch Salicylsäure (Marivet et al., 1994) erreicht werden.

In *Fontinalis antipyretica* wurde keine positive Immunreaktion des anti-Peptid-AK Cyclophilin 18 im Molekulargewichtsbereich von 18 kDa unter Cu(II)-, Cd(II)-, Pb(II)- bzw. Zn(II)-Belastung bzw. in Kontrollproben nachgewiesen. Eine Aussage zur Rolle der Cyclophiline in der Schwermetallstressantwort im Quellmoos konnte demnach nicht getroffen werden. Die Identifizierung dreier PPIasen in *Digitalis lanata* (Küllertz et al., 1999) spricht für die Spezifität des Antikörpers gegenüber pflanzlichen Cyclophilinen. Dem gegenüber reagierten in *Fontinalis antipyretica* zahlreiche Proteine im

Molekulargewichtsbereich von ca. 30 kDa-55 kDa unspezifisch auf den AK, so dass eine Erhöhung der Spezifität des Ak's der Verifizierung der Ergebnisse vorausgehen sollte.

4.4.3 Schwermetallbindende Proteine

Die physiologische Funktion pflanzlicher Metallothioneine ist bislang noch unklar. Ursache dafür ist das Fehlen von Informationen über die nativen Proteine, deren Modifikationen und molekularen Wechselwirkungen. Die Schwierigkeiten der Isolation nicht degradierter Proteine basieren auf der schnellen Proteolyse der Linkerregion zwischen den cysteinreichen Domänen (Clemens, 2001; Cobbett und Goldsbrough, 2000; Rauser, 1999). In nur zwei Fällen konnten die nativen Proteine gereinigt und charakterisiert werden: das E_c-Weizen-Protein (Lane et al., 1987) und MT p1/p2 aus *Arabidopsis thaliana* (Murphy et al., 1997).

Die Isolierung schwermetallbindender, cysteinreicher Proteine im niederen Molekulargewichtsbereich aus *Fontinalis antipyretica* erfolgte daher modifiziert nach Murphy et al. (1997). Angewendet wurde sowohl die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) als auch eine kovalente Affinitätschromatographie (Kap. 2.4.8.2 und 2.4.8.3). Dabei erwies sich die jeweilige Trennung der Rohextrakte effizienter als eine Zwei-Stufen-Reinigung. Die Fraktion der schwermetallbindenden Proteine (IMAC) betrug in Kontrollproben 0,14 % und in Cu(II)-belasteten Proben 0,15 % des applizierten Gesamtproteins (Anhang Tab. 6) und entsprach den jeweiligen Ausbeuten des Murphy-Protokolls (Kap. 3.4.4.1).

Die eindimensionale Trennung der IMAC-Eluat wies im Fall der Kontrolle zwei Hauptbanden mit ca. 40 kDa und 32 kDa auf. Eine Anreicherung Cu(II)-bindender Proteine im niedermolekularen Bereich wurde nicht erzielt. Infolge der Cu(II)-Applikation induzierte, Cu(II)-bindende Proteine wurden bei ca. 14 kDa bzw. 12 kDa (Bande H und I) detektiert (Abb. 31, Seite 76). Die Micro-Sequenzanalyse der internen Fragmente von H und I war aufgrund von Sequenzüberlagerungen nicht möglich (Kap. 3.4.5.3). Wie bereits in Kapitel 4.5.1 beschrieben, verursachte die Elution bzw. die tryptische Spaltung der Proteine im hochvernetzten Gel große Schwierigkeiten, so dass die Eluate mittels LC-MS bzw. MALDI-TOF-MS analysiert wurden. Um eine Oxidation der SH-Gruppen während der tryptischen Spaltung zu verhindern, wurden die Proteine der entsprechenden LC-Fractionen mit Guanidinhydrochlorid stark denaturiert und nach anschließender Reduktion erfolgte die Alkylierung der SH-Gruppen mittels 2-Vinylpyridin. Diese Methode wurde an Metallothionein-Standards (Kap. 2.4.9.2) überprüft und erwies sich im Gegensatz zur SH-Carboxymethylierung mittels Iodacetamid als wesentlich effizienter.

Aufgrund der schnellen Polymerisierung des nicht umgesetzten 2-Vinylpyridins war jedoch die sofortige Entsalzung über eine RP-HPLC notwendig.

Erfolgreich war die LC-MS-Analyse mit anschließender Micro-Sequenzierung der internen Fragmente aus drei Proteinen der Kontrollprobe (Kap. 3.4.5.3). Ein 4,62 kDa-Protein enthielt eine cysteinreiche Sequenz (20 %), die eine 80%ige Homologie zu einem Endochitinase-Precursor aus *Pisum sativum* und weitere Homologien zu Endochitinasen aufwies. Chitinasen sind basische, in der Vakuole oder der Zellwand lokalisierte Proteine, deren Synthese elicitor- oder pathogeninduziert erfolgt. Das Molekulargewicht dieser Enzyme wird mit ca. 25 kDa-35 kDa angegeben (Kombrink et al., 1988). Aufgrund der signifikanten Homologie könnte das detektierte 4,62-kDa-Protein aus *Fontinalis antipyretica* ein proteolytisches Fragment einer Chitinase darstellen. Als Chitinase-Induktoren sind u.a. auch Phytohormone wie Ethylen, Cytokinine und Auxine beschrieben (Roby et al., 1986). Eine verringerte Expression infolge von osmotischem Stress ist in *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen (Tateishi et al., 2001).

Des Weiteren wurde von einem 11,4 kDa-Protein eine threoninreiche Sequenz (30 %) ermittelt, die eine 47%ige Homologie zur Serin/Threonin-Protein-Kinase aus *Saccharomyces cerevisiae* sowie eine 44%ige Homologie zur Aminophospholipase2 aus *Arabidopsis thaliana* zeigte. Protein-Kinasen katalysieren die Phosphorylierungen von Proteinen und regulieren dadurch indirekt deren katalytische Aktivitäten. Die Aminophospholipase2 stellt nach Sato et al. (1997) ein integrales, metallbindendes Membranprotein aus der Familie der kationischen ATPasen-Transporter dar, dass am Phospholipidtransport beteiligt ist.

Das dritte Protein aus der Kontrollprobe wies ein Molekulargewicht von 29,96 kDa auf. Die Datenbankrecherche ermittelte u.a. eine 57%ige Homologie zu dem REV1-Protein aus *Saccharomyces cerevisiae*. Das REV1-Protein operiert als Desoxycytidyltransferase während der DNA-Replikation und wird als DNA-Reparaturprotein bezeichnet (Larimer et al., 1989). Pflanzliche *Saccharomyces cerevisiae*-homologe REV1-Gene sind bisher erst aus *Arabidopsis thaliana* beschrieben (Lawrence und Maher, 2001).

Da die LC-Analyse der IMAC-gereinigten, Cu(II)-belasteten Probe keine Veränderungen im Chromatogramm im Vergleich zur Kontrolle zeigte, wurde auf eine Micro-Sequenzierung der detektierten Proteine zugunsten der Analyse der Fraktionen der kovalenten Affinitätschromatographie verzichtet.

Diese Fraktionen enthielten in Kontrollproben 0,02 % und in Cu(II)-belasteten Proben 0,01 % des applizierten Gesamtproteins (Anhang Tab. 7), im Vergleich zu *Arabidopsis thaliana* eine 100fache Ausbeute. Im Ergebnis der eindimensionalen Proteintrennung wies die Kontrolle und die Cu(II)-belastete Probe jeweils ein spezifisches Proteinmuster mit fünf bzw. vier Hauptbanden im Molekulargewichtsbereich bis 34 kDa auf. Die Bande J

(12 kDa) der Kontrolle und die Cu(II)-induzierte Bande K (11 kDa) (Abb. 32, Seite 77) wurden aufgrund des Molekulargewichtes und der Qualität für eine Micro-Sequenzanalyse ausgewählt. Dabei führte der unvollständige enzymatische Verdau zu keiner Sequenzinformation (Kap. 3.4.5.3).

Die LC-MS-Analyse detektierte in der Kontrollprobe drei Proteine mit jeweils 12,71 kDa, 30,05 kDa bzw. 31,99 kDa. Im Gegensatz dazu wies die Cu(II)-belastete Probe nur ein signifikantes Proteinsignal auf (10,88 kDa) (Anhang Abb. 2 und 3). Die Recherche der mittels MS/MS analysierten Fragmentmassen führte nicht zu einer Identifizierung der Proteine. Die Micro-Sequenzierung eines internen Fragmentes des 10,88 kDa-Proteins ermittelte eine cysteinfreie Aminosäuresequenz (Kap. 3.4.5.3) mit einer 90%igen Homologie zu zwei aus genomischer Sequenz abgeleiteten *Deinococcus radiodurans*-Proteinen. Nähere Angaben zur Funktion der Proteine sind nicht bekannt. Dieses gram-positive Bakterium zeichnet sich u.a. durch eine hohe Toleranz gegenüber oxidativen Stress aus und weist eine extreme Resistenz gegenüber radioaktiver- und UV-Strahlung auf (White et al., 1999).

Insgesamt erwies sich die Analytik der isolierten Proteine als limitierender Faktor. Einerseits bedingte die N-terminale Blockierung der Proteine eine enzymatische Spaltung, andererseits begünstigt das basische Milieu die Oxidation und die Aggregation von SH-Gruppen und verhindert somit eine erfolgreiche Sequenzanalyse. Die zusätzliche quantitative Carboxymethylierung der SH-Gruppen bzw. die quantitative Alkylierung mit anschließender RP-HPLC-Entsalzung war vorbereitend durchzuführen. Die MALDI-TOF-Analysen führten in keinem Fall zur Identifizierung der Proteine über homologe Massen, ein generelles Problem in der Analytik nicht sequenzierter Genome. Erfolgreicher verlief die Kombination von LC-MS und anschließender Micro-Sequenzierung interner Peptidfragmente, die in vier Fällen Sequenzinformationen lieferte.

4.5 Kupfereffekte auf den Primär- und Sekundärstoffwechsel in *Fontinalis antipyretica*

4.5.1 Freie Aminosäuren

Aufgrund der Reaktivität von Metallen gegenüber Sauerstoff, Schwefel und Stickstoff stellen die Carboxyl- und Aminogruppen der freien Aminosäuren potentielle Liganden für Schwermetalle dar (Clemens, 2001), wie z.B. Histidin, Glutamin und Cystein (Krämer et al., 2000; Rauser, 2000; Dawson et al., 1989).

Die an *Fontinalis antipyretica* durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss von Cu(II) auf freie Aminosäuren widerspiegeln dessen toxische Wirkung auf die Aminosäurebiosynthese. Hierzu wurden die Gesamt- und Einzelgehalte der mittels GC-C-IRMS detektierbaren Aminosäuren von Kontroll- und Cu(II)-belasteten Proben zeitabhängig erfasst und ausgewertet. Eine kurzzeitige Cu(II)-Applikation von 50 µM über vier Stunden führte, im Vergleich zur Kontrolle, zu einem nicht signifikanten Anstieg des Gesamtgehaltes an freien Aminosäuren auf 123 %. Im Gegensatz dazu reagierte das Quellmoos auf eine dreitägige Cu(II)-Belastung mit einem starken Abfall des Gesamtgehaltes auf 67 % des Kontrollwertes (Anhang Tab. 9). Diesen kurzzeitigen Anstieg des Aminosäuregehaltes bestätigen Studien von Chen et al. (2000) zur Cu(II)-regulierten Prolin-Akkumulation bei *Oryza sativa*. Sie ermittelten weiterhin erhöhte Gehalte an Glutamin, Arginin und Prolin.

In *Fontinalis antipyretica* zeigte speziell Cystein eine signifikante Induktion (203 %) (Abb. 33, Seite 82). Cystein ist ein Precursor des Tripeptids GSH, das in der Lage ist, selbst Schwermetalle zu binden (Rabenstein, 1989). Es spielt eine bedeutende Rolle als Phytochelatin-Precursor in der Reaktion höherer Pflanzen auf Schwermetallstress (Cobbett, 2000b; Cobbett und Goldsbrough, 2000) sowie in der Cd(II)-Detoxifikation von Bryophyten (Bruns et al., 2001) und ist außerdem Bestandteil des antioxidativen Abwehrsystems (Noctor und Foyer, 1998; Brunold et al., 1996; Rennenberg und Brunold, 1994). Infolge einer kurzzeitigen Cu(II)-Belastung mit bis zu 50 µM zeigte *Fontinalis antipyretica* einen Anstieg des GSH-Gehaltes (Bruns et al., 2001). Die enzym- und substratregulierte GSH-Synthese setzt dabei natürlich auch eine verstärkte Synthese von Cystein voraus (Noctor et al., 1998). Die Bedeutung erhöhter Cystein Konzentrationen liegt in der Zunahme Cu(II)-bindender SH-Gruppen im Zytoplasma des Quellmooses, deren Bindungspotential mittels EELS-Analyse nachgewiesen wurde (Abb. 19/A, Seite 58).

Weiterhin wurden erhöhte Konzentrationen von Glutamin und Phenylalanin (Abb. 33, Seite 82), einem möglichen Ausgangsstoff für die Synthese sekundärer Inhaltsstoffe, gemessen. Der erhöhte Gehalt an Glutamin scheint auf eine verstärkte Stickstofffixierung zu deuten, da es ein primäres Produkt des Stickstoffmetabolismus darstellt. Allerdings stehen toxische Cu(II)-Konzentrationen im Zusammenhang mit der Induktion von Blattseneszenz (Luna et al., 1994), ausgelöst durch Lipidperoxidationen (Quartacci et al., 2001; Chen und Kao, 1999). Palatnik et al. (1999) beobachteten den Abbau der Glutaminsynthetase unter oxidativem Stress in *Triticum aestivum*.

Somit könnte die Zunahme des Glutamins in *Fontinalis antipyretica* als Transportform des Stickstoffs infolge Cu(II)-induzierter, kataboler Prozesse zu sehen sein. Der extreme Vitalitätsverlust unter der Cu(II)-Belastung bestätigt dies (Abb. 7, Seite 50). Auch eine

Anreicherung aufgrund des seneszenzinduzierten Chlorophyll-Protein-Abbaus wäre denkbar, da nekrotische Veränderungen an den Moosblättchen unter Langzeit-Cu(II)-Belastung auftraten. Signifikant verringerte Gehalte zeigten dagegen Tyrosin, Lysin, Alanin, Serin, Valin sowie Arginin und widerspiegeln damit eine verringerte Aminosäurebiosynthese sowie Vitalität in dieser Stresssituation. Auf eine Langzeitbelastung mit 50 µM Cu(II) reagierte *Fontinalis antipyretica* allgemein mit reduzierten Aminosäuregehalten, was auf eine verminderte Aminosäurebiosynthese zurückzuführen ist. Alleinige Ausnahme bildete wiederum die im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Glutaminkonzentration (174 %) (Abb. 33, Seite 82).

Untersuchungen zum Stickstoffmetabolismus, anhand von ¹⁵N-Tracer-Studien von Sutter et al. (2001), bestätigen eine verminderte Aminosäuresynthese unter Schwermetallbelastung im Quellmoos. Die Schädigung des Primärstoffwechsels, speziell durch Cu(II), wird auch durch den mittels Chlorophyllfluoreszenz gemessenen Vitalitätsverlust infolge einer verminderten photochemischen Energieumwandlung im PS II deutlich. Zahlreiche Studien über Wechselwirkungen von Schwermetallen und Aminosäuren führten zu vergleichbaren Ergebnissen:

Eine Cd(II)-induzierte Abnahme des Gesamtgehaltes an Aminosäuren durch eine konzentrationsabhängige Hemmung der Aminosäuresynthese zeigten Boussama et al. (1999) in *Zea mays*. Costa und Morel (1994) ermittelten verringerte Aminosäuregehalte unter Cd(II)-Einfluss bei *Lactuca sativa*.

Im Quellmoos wurden, trotz der im Vergleich zur Kontrolle geringeren Werte, bei einigen Aminosäuren wie z.B. Lysin, Arginin, Alanin, Serin und Valin eine nicht signifikante Konzentrationszunahme im Langzeitversuch festgestellt. Dies könnte wiederum mit Cu(II)-induzierten, katabolen Mechanismen in Verbindung stehen.

Weiterhin zeigten die Analysen mittels Aminosäure-Analyser der Firma Knauer GmbH die Cu(II)-induzierte, zeitabhängige Abnahme der Konzentrationen verschiedener Aminosäuren, z.B. Threonin, Prolin, Glycin und Histidin und bestätigten somit den toxischen Cu(II)-Einfluss auf die Aminosäurebiosynthese in *Fontinalis antipyretica*.

Zu einer Akkumulation des Stressmetaboliten Prolin kommt es nach Chen et al. (2000) dagegen in *Oryza sativa* unter Cu(II)-Einfluss (gleichbleibender Wasserhaushalt). Da eine generelle Reduzierung der von Mullins et al. (1986) beschriebenen Cu(II)-Hauptliganden Asparagin und Histidin bzw. Tyrosin nachgewiesen wurde, ist eine wesentliche Rolle in der Regulierung des Ionengleichgewichtes im Quellmoos nicht zu vermuten. Glutamin wurde dagegen als möglicher Cu(II)-Ligand induziert. Nach Dawson et al. (1989) bindet diese Aminosäure Ni(II) effektiv im neutralen pH-Wert-Bereich. Eine weitere EELS-Analyse könnte überprüfen, ob Glutamin einen zytoplasmatischen Cu(II)-Bindungspartner in *Fontinalis antipyretica* darstellt. Da diese Aminosäure aber u.a. in Konkurrenz zu

anderen potentiellen Liganden, wie z.B. SH-Gruppen schwermetallbindender Proteine, Peptide (Kap. 3.4.5.3) oder der Zitronensäure (Kap. 3.6) steht, ist deren Bedeutung eher als Seneszenzmetabolit zu sehen.

4.5.2 Organische Säuren

Organische Säuren zeichnen sich aufgrund ihrer Carboxylgruppe durch eine potentielle Metallbindefähigkeit aus und zählen neben den Phytochelatinen und Metallothioneinen zu den wichtigsten pflanzlichen Chelatoren (Clemens, 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte das Vorkommen von Oxal-, Zitronen- und Äpfelsäure in *Fontinalis antipyretica* mittels ESI-MS bzw. GC-MS-Analyse nachgewiesen werden (Abb. 36, Seite 86). Konkrete Angaben zu Säuren im Quellmoos sind in der Literatur noch nicht bekannt. Auch aufgrund der außerordentlichen Variabilität der Inhaltsstoffe verschiedener Gattungen, ist die Übertragung bereits bekannter phytochemischer Daten auf *Fontinalis antipyretica* kaum zulässig. Asakawa (1982), Walland und Kinzel (1966) bestätigten das allgemeine Vorkommen von Äpfel- und Zitronensäure in Bryophyten. Weiterhin wurden z.B. Bernstein-, Shikimi- und Fumarsäure beschrieben (Hegnauer, 1986).

Die Untersuchungen zum zeitabhängigen Cu(II)-Einfluss auf organische Säuren zeigten eine Reaktion nach dreitägiger, nicht aber nach vierstündiger Belastung mit 50 μM (Anhang Abb. 5 und 6). Die Ergebnisse weisen auf eine Cu(II)-induzierte Synthese der identifizierten Verbindungen Zitronensäure >> Äpfelsäure hin. Die mittels GC-MS in den Proben nachgewiesenen Anteile von Fremdverbindungen ließen keine Quantifizierung der Säurekonzentrationen zu.

Inwieweit die mögliche Metallchelatierung zur Regulierung der intrazellulären Schwermetallkonzentration in *Fontinalis antipyretica* beiträgt, bleibt zu untersuchen. Dabei könnte die Existenz einer möglichen Cu-Zitrat-Bindung bzw. Cu-Malat-Bindung mittels EELS-Analysen bestimmt werden.

Die Zitronensäure kann sowohl als zytosolischer Transporter zur Vakuole als auch als Ligand zur Sequestration von Schwermetallen operieren. Die Transportfunktion ist u.a. durch thermodynamische Computersimulationen von Wang et al. (1991; 1992) und bei verschiedenen Futterpflanzen von Wagner (1993) an Zn(II) und Cd(II) beschrieben.

Eine vakuoläre Chelatierung an Zitronensäure wurde bei Cd(II) (Wang et al., 1991) und Zn(II) in *Nicotiana tabacum* (Krotz et al., 1989) und Ni(II) in *Serbertia acuminata* (Sagner et al., 1998; Godbold et al., 1984) nachgewiesen. Rauser (1999) und

Wang et al. (1991) favorisieren generell Zitrat-Schwermetallkomplexe bei einem pH-Wert zwischen 4 und 7. Die zytosolische Inaktivierung freier Zn(II)- und Ni(II)-Ionen durch Malat- und Zitratkomplexe ist als Teil des Schwermetalltoleranzmechanismus bei *Hybanthus floribundus* und *Alyssum*-Arten beschrieben (Schlee, 1992; Lee et al., 1977). Mullins et al. (1986) wiesen Cu(II)-Zitratkomplexe im Xylemsaft von *Lycopersicon* und *Glycine max* nach. Erhöhte Zn(II)-Konzentrationen führten infolge der Affinitätskonkurrenz jedoch zur Bildung von Cu(II)-Histidinkomplexen. Oxalsäure scheint als Ligand nur in Pflanzen mit einem natürlich hohen Oxalatgehalt eine Rolle zu spielen (Rauser, 1999). Da MSTFA-Derivate dieser Verbindung in den Proben nicht nachgewiesen wurden, ist eine wesentliche Rolle der Oxalsäure zur Regulation der Schwermetallkonzentration in *Fontinalis antipyretica* auszuschließen.

Welche organische Säure in der intrazellulären und vakuolären Metallkomplexierung dominiert, hängt letztlich vom pH-Wert des Milieus, von der artspezifischen Zusammensetzung der organischen Säuren sowie vom intrazellulären Schwermetallangebot und dem Vorkommen zusätzlicher Liganden, wie z.B. schwermetallbindende Peptide und Proteine, ab. Prinzipiell wäre in diesem Zusammenhang die Beteiligung der Zitronen- und Äpfelsäure an der Komplexierung des intrazellulär aufgenommenen Cu(II) (0,17 $\mu\text{mol/g}$ TM; Abb. 11, Seite 52) in *Fontinalis antipyretica* denkbar. Wie bereits oben erwähnt, könnte mittels EELS eine mögliche Cu-Bindung untersucht werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten EELS-Untersuchungen zu möglichen Cu-Bindungspartnern wiesen bisher auf eine zytosolische Chelatierung an SH-Gruppen bzw. eine vakuoläre Bindung an anorganisches Phosphat hin (Abb. 19, Seite 58).

4.5.3 Phenolische Verbindungen

Phenole, insbesondere die Gruppe der Flavonoide, spielen als Anti-Oxidantien im Schutz vor freien Radikalen eine bedeutende Rolle. Dies beruht auf ihrer reduzierenden Wirkung als Wasserstoff- oder Elektronendonator und/oder der Wirkung als Metallchelator (Brown et al., 1998; Rice-Evans et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde der zeitabhängige Einfluss von Cu(II) auf den Gesamtphenolgehalt von *Fontinalis antipyretica* gezeigt sowie in ersten Untersuchungen die extrahierten phenolischen Verbindungen charakterisiert.

Sowohl im vierstündigen Kurzzeitversuch als auch im dreitägigen Langzeitversuch wurde keine signifikante Änderung im Gesamtgehalt, ca. 0,3 mg/g FM, durch 50 μM Cu(II)

nachgewiesen (Abb. 37, Seite 88). Höhere Pflanzen enthalten generell höhere Gehalte an Phenolen, so wurde in *Lycopersicon esculentum* 3,1 mg Phenol/g FM (Rivero et al., 2001) und in *Nymphaea*-Blättern sogar 113 mg Phenol/g FM (Lavid et al., 2001b) gemessen. Beide Autoren verwandten jedoch unterschiedliche Referenzstandards bzw. Extraktionsmethoden.

Es ist bekannt, dass toxische Cu(II)-Konzentrationen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und damit zur Peroxidation von Membranlipiden führen können (Dat et al., 2000; Sandmann und Boger, 1980). So ist interessant, dass trotz verringerter Vitalität bei einer 50 µM Cu(II)-Belastung (Abb. 7, Seite 50) kein Anstieg des Phenolgehaltes als anti-oxidative Stressreaktion in *Fontinalis antipyretica* ermittelt wurde. Offenbar bildet die gesteigerte GSH-Synthese (Bruns et al., 2001) eine effektivere Antwort auf Cu(II)-induzierten Stress.

Auch Lavid et al. (2001a,b) beobachteten in Studien zum Polyphenolgehalt in schwermetallakkumulierenden Drüsen in *Nymphaea* keine Änderung des Phenolspiegels. Die Schwermetallakkumulation führte dagegen zu einer erhöhten Polymerisierung der Phenole, vermittelt durch die Peroxidase. Folglich beruht die Schwermetallstressantwort in diesem Fall nicht auf einer gesteigerten Synthese sondern auf der Umordnung der Phenole zu polymerisierten Schwermetallkomplexoren, die die Bildung freier Radikale verhindern. Dieser Mechanismus wurde von Marschner (1995) beschrieben und bei *Arabidopsis thaliana* als Reaktion auf toxische Pb(II)-Konzentrationen von Lummerzheim et al. (1995) erwähnt.

Das allgemeine Vorkommen von Zimt- und Benzoessäurederivate in Bryophyten wurde von Shaw und Goffinet (2000) sowie Hegnauer (1986) beschrieben. Es war daher anzunehmen, Verbindungen wie z.B. 3,4-Dihydroxybenzoessäure, 4-Hydroxybenzaldehyd oder weitere einfache Phenolkarbonsäuren, z.B. Gallussäure, aus *Fontinalis antipyretica* isolieren zu können. Die anhand des Vergleiches von Retentionszeiten getroffene Zuordnung der Probenfraktionen zu Standardverbindungen konnte massenspektrometrisch nicht bestätigt werden (Kap. 3.7.2). Aufgrund der Komplexität der phenolischen Stoffklasse waren weiterführende MS-Analysen im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Über einen spektralen Vergleich wurde die Zugehörigkeit der isolierten Verbindungen zur Gruppe der Flavonole überprüft. Die Spektren wiesen jeweils eine Absorptionsschulter bei 280 nm auf und zeigten weder die flavonoltypischen Absorptionsmaxima bei 260 nm und 370 nm, noch die für die Cu(II)-Chelatierung charakteristische Absorptionsverschiebung (Anhang Abb. 11 und 12). Nach Dudley und Fleming (1985) sind Spektren mit nur ein oder zwei Banden unter 300 nm nicht charakteristisch für polycyclische, aromatische Verbindungen. Somit kann eine strukturelle Verwandtschaft der isolierten, phenolischen

Verbindungen aus *Fontinalis antipyretica* mit der Klasse der Flavonole ausgeschlossen werden.

Weiterführende Aussagen, hinsichtlich der Rolle der Phenole als Anti-Oxidantien bzw. Metallchelatoren im Rahmen einer Schwermetallstressantwort in *Fontinalis antipyretica*, bedingen die massenspektrometrische Identifizierung der isolierten Verbindungen. Weiterhin könnten elektronenmikroskopische Untersuchungen den Cu(II)-Einfluss auf die Zellwandstruktur bzw. die Aktivität der Polyphenoloxidasen klären.

4.6 Metallothionein: Das genetische Potential von *Fontinalis antipyretica*

Die Aktivität der Metallothioneingene wird durch Schwermetalle wie Cu(II) und Zn(II), Hormone (ABA), Hitze, Kälte, osmotischen Stress, Verwundung oder Seneszenz beeinflusst (Cobbett und Goldsbrough, 2000; Rauser, 1999; Garcia-Hernandez et al., 1998). Pflanzliche Metallothioneine werden von Multigenfamilien codiert. Bis 1998 wurden insgesamt 58 cDNA-Sequenzen Metallothionein-ähnlicher Gene aus Pflanzen veröffentlicht (Rauser, 2000). Es existieren keine Angaben zum Vorkommen von MT-ähnlichen Genen in Bryophyten. Unklar ist bislang die physiologische Bedeutung dieser Proteine bzw. deren Genregulation. Nach Garcia-Hernandez et al. (1998) besitzen die Isoformen spezielle Funktionen in den Geweben.

In *Fontinalis antipyretica* deuten erste Untersuchungen auf eine Zn(II)- und temperatur-regulierte Transkription MT-ähnlicher Sequenzen hin (Kap. 3.8.1). Die mit der MT p2-18-Sonde aus *Brassica juncea* detektierten Transkriptionssignale lagen im Größenbereich von ca. 600 bp. Zu beachten ist, dass die von Murphy und Taiz (1995) beschriebene Cu(II)-induzierte Expression von MT p2 in *Arabidopsis thaliana* unter den gegebenen Bedingungen nicht bestätigt werden konnte.

Schäfer et al. (1997) wiesen mit einer MT p2-Sonde aus *Arabidopsis thaliana* ein Transkript von 580 pb in *Brassica juncea* nach, dessen cDNA später als Sonde für die oben beschriebenen Versuche verwendet wurde. Die Autoren zeigten außerdem die Cu(II)-induzierte Verringerung der MT p2-mRNA, ein Cd(II)-Einfluss war nicht nachweisbar. Auch die Ergebnisse der immunologischen Detektion MT p2-positiver Proteine in *Fontinalis antipyretica* deuten auf eine Verminderung der Expression unter Schwermetallbelastung hin (Abb. 28, Seite 72). Die Probennahme erfolgte dabei zur Transkriptionsanalyse nach zwei Stunden, die der immunologischen Tests ab vier Stunden. Das als zweite Metallothioneinsonde eingesetzte PaMT f1-Fragment aus

Podospora anserina hybridisierte in keinem Fall mit *Fontinalis antipyretica*-mRNA. Die Ursachen dafür könnten in deren geringer Spezifität bzw. an nicht stringenten Bedingungen liegen. Insgesamt bleibt das mit der MT p2-18-Sonde detektierte Ergebnis nach einer weiteren Optimierung der Methode zu verifizieren.

Der von Rauser (1999) gegebene Überblick zur Regulation von pflanzlichen MT-Genen widerspiegelt die funktionelle Vielfalt der MT's. So wiesen Hsieh et al. (1995) und Choi et al. (1996) eine Cu(II)-induzierte MT-Gen-Aktivierung in *Oryza sativa* (OsMT p1) und *Nicotiana glutinosa* nach. Andererseits wird die Transkription in der Cu(II)-toleranten *Mimulus guttatus* durch Cu(II)-Einfluss reduziert (de Miranda et al., 1990), ebenso in *Vicia faba* (Foley und Singh, 1994) und *Glycine max* (Kawashima et al., 1991).

Des Weiteren wurde aus genomischer DNA von *Fontinalis antipyretica* eine Metallothionein-ähnliche Gensequenz mit einer Größe von ca. 220 bp aus zwei unabhängigen DNA-Proben amplifiziert (Abb. 38, Seite 90). Die BLASTN-Datenbankrecherche der Sequenz ergab hohe Homologien zu MT p1-ähnlichen mRNA's verschiedener monokotyle und dikotyle Spezies. Diese Sequenzen zeichneten sich insgesamt durch hochkonservierte, cysteinreiche Bereiche aus. Im Fall der Metallothionein-mRNA aus *Zea mays* (Accession: X82186) handelt es sich um eine Sequenz, deren Transkription durch D-Glukose-Mangel induziert wird (Chevalier et al., 1995). Dagegen wird die ids-mRNA in Wurzeln von *Hordeum vulgare* bei Eisenmangel verstärkt transkribiert (Okumura et al., 1991). Diese Beispiele verdeutlichen die spezifische Regulation der Transkripte, abhängig von Gewebetyp sowie exogenen und endogenen Faktoren.

Durch die Isolierung des DNA-Fragmentes ist die Grundlage für die Herstellung einer *Fontinalis*-spezifischen Sonde für weitere Untersuchungen zum Expressionsverhalten MT-homologer Gensequenzen gelegt. Weiterhin wäre die Identifizierung der mittels MT p2-Primer, abgeleitet aus *Brassica juncea* (Schaefer et al., 1998), amplifizierten DNA-Fragmente (ca. 200 bp und 230 bp) wünschenswert, deren Sequenz bisher nicht ermittelt werden konnte.

5. Zusammenfassung

Submerse Moose sind ausgezeichnete Bioindikatoren für die Anzeige von Wassergüteklassen und können als Schwermetallakkumulatoren operieren (Frahm, 1998). Erste Studien zum Schwermetalleinfluss in *Fontinalis antipyretica* wiesen signifikante Unterschiede gegenüber höheren Pflanzen auf (Bruns et al., 1997; 1999; 2000; 2001). Ziel dieser Arbeit war die physiologisch-biochemische Charakterisierung schwermetallinduzierter Reaktionen von *Fontinalis antipyretica* unter Berücksichtigung proteinchemischer, zellulärer, physiologischer und genomischer Aspekte.

Vitalitätsstudien zeigten konzentrationsabhängig (25-100 μM) differente Wirkungen der Schwermetalle Cu(II), Cd(II), Pb(II) und Zn(II) auf den physiologischen Zustand des PS II. Konditioniertes Kontrollmaterial wies vitale Parameter auf, die durch die Applikation von maximal 100 μM Cu(II) und 100 μM Cd(II) bis auf 52 % bzw. auf 61% verringert wurden. Pb(II)- und Zn(II)-Belastungen zeigten bis 100 μM keine nachweisbaren Effekte auf die Vitalität. Anhand von Chlorophyllfluoreszenzmessungen wurde eine Schädigung des Elektronentransportes im PS II wie folgt ermittelt: Cu(II) >> Cd(II) >> Pb(II)/Zn(II). Diese Methode eignete sich zur sensitiven Stressindikation und lieferte grundlegende Daten zum physiologischen Zustand des Untersuchungsmaterials für weitere Versuche.

Experimente zur intrazellulären Aufnahme von Cu(II), Cd(II), Pb(II) und Zn(II) wiesen eine spezifische Abhängigkeit gegenüber der Schwermetallkonzentration des Mediums und der Inkubationszeit nach. Im Konzentrationsbereich von 25 μM -100 μM lag folgende Priorität vor: Cu(II) > Pb(II) > Zn(II) > Cd(II). AAS-Messungen ermittelten maximale, intrazelluläre Gehalte von 0,40 μmol Cu(II)/g TM; 0,33 μmol Pb(II)/g TM; 0,19 μmol Zn(II)/g TM und 0,14 μmol Cd(II)/g TM. Insgesamt erfolgte die intrazelluläre Aufnahme ab 50 μM von Cu(II), Cd(II) bzw. Zn(II) kontinuierlich. Eine Stagnation trat bei der geringen Konzentrationen von 25 μM und im Fall von Pb(II) unabhängig der applizierten Konzentration nach drei Tagen auf. Die Ergebnisse deuten auf einen Diffusionsmechanismus hin. Zur Klärung der Transportprozesse sollte deren Energieabhängigkeit geprüft sowie die Identifizierung von Membrantransportkomponenten erfolgen.

EDX-Analysen elektronendichter Niederschläge lieferten Informationen zur Elementzusammensetzung der Zellwände, des Zytoplasmas, der Plastiden sowie der Vakuolen. Infolge der intrazellulären Cu(II)-Aufnahme wurde die Kompartimentierung des Cu aus dem Zytoplasma in die Plastiden und die Vakuole nachgewiesen. Weiterhin ermittelte die EEL-Spektroskopie SH-Gruppen als mögliche Cu-Bindungspartner im Zytoplasma. In den Vakuolen werden Cu-Ionen, im Gegensatz zu höheren Pflanzen, an anorganisches Phosphat gebunden. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese von Bruns et al. (2001), wonach die Bindung der Schwermetallionen zum Transport durch das Zytoplasma von *Fontinalis antipyretica* an GSH erfolgen könnte.

Auf Proteinebene wurden schwermetall-, hitze- und kultivierungsbedingte Effekte festgestellt. Zweidimensionale Proteintrennungen zeigten schwermetallabhängig komplexe Änderungen, insbesondere im Proteinmuster des Molekulargewichtsbereiches bis 20 kDa: Cu(II) > Zn(II) > Cd(II) > Pb(II). Metallothionein p2-homologe Antigene konnten nach ein-, nicht aber nach zweidimensionaler Proteintrennung im Molekulargewichtsbereich von ca. 8 kDa nachgewiesen werden. Die Micro-Sequenzanalyse eines internen Fragmentes ermittelte eine Sequenz, die bisher keinem bekannten Protein zuzuordnen war. Die Expression der detektierten Proteine erfolgte konstitutiv und wurde infolge einer dreitägigen Cu(II)-, Cd(II)-, Pb(II)- und Zn(II)-Belastung spezifisch reprimiert: Cd(II) > Zn(II) > Cu(II) > Pb(II). Der Nachweis von MT p2-AK positiven Proteinen in hitzestressstem Material war nicht möglich.

Die Induktion des HSP 70-homologen Antigens erfolgte nach einem kurzzeitigen Cu(II)- und Cd(II)-Stress sowie nach einem kurz- und langfristigen Hitzeschock. In beiden Fällen konnte die Reaktion zeit- bzw. temperaturabhängig charakterisiert werden. HSP 17- und Cyclophilin 18-homologe Antigene wurden nicht detektiert. Mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) und kovalenter Affinitätschromatographie wurden metallbindende und thiolhaltige Proteine isoliert. Die Micro-Sequenzanalyse interner Fragmente aus Proteinen der IMAC-Kontrollfraktion ermittelte zwei cysteinreiche Sequenzen (80%ige Homologie zu einem Endochitinase-Precursor aus *Pisum sativum* bzw. 66%ige Homologie zu dem MstProx-Protein aus *Drosophila melanogaster*), eine threoninreiche Sequenz (47%ige Homologie zur Serin/Threonin-Protein-Kinase YNR047W aus *Saccharomyces cerevisiae*) sowie eine cysteinhaltige Sequenz eines internen Fragmentes der Cu(II)-belasteten Probe (90%ige Homologie zu abgeleiteten Proteinen aus *Deinococcus radiodurans*). Metallothionein-homologe Sequenzen wurden nicht identifiziert. Für die Micro-Sequenzierung relevanter 2D-Proteinspots ist deren vorherige immunologische Detektion sinnvoll, so dass eine Optimierung der Methodik im Nachweis Metallothionein-homologer Proteine in der 2D notwendig ist.

Die Biosynthese freier Aminosäuren wurde infolge der 50 μM Cu(II)-Belastung zeitabhängig gehemmt, so dass eine wesentliche Rolle der Hauptliganden Asparagin und Histidin in der Regulierung der Verfügbarkeit von Cu(II)-Ionen auszuschließen ist. Verstärkte Synthesen traten ausschließlich bei Cystein (203 %), Phenylalanin (163 %) und Glutamin (162 %) nach einem vierstündigen Cu(II)-Stress, im Fall von Glutamin auch im Langzeitversuch nach drei Tagen (174 %), auf. In der Funktion als GSH-Precursor wurde die bedeutende Rolle des Cysteins in der schnellen Schwermetallstressreaktion bestätigt. Das Cu(II)-Bindungspotential des Glutamin ist mittels EELS-Analysen zu überprüfen.

Das Vorkommen von Oxalsäure, Zitronensäure und Äpfelsäure wurde mittels ESI-MS, im Fall von Zitronensäure und Äpfelsäure zusätzlich mittels GC-MS, nachgewiesen. Die Ergebnisse deuten auf eine induzierte Synthese der beiden letztgenannten Verbindungen nach dreitägiger Cu(II)-Belastung hin. EELS-Analysen könnten deren mögliche Funktion als Cu(II)-Bindungspartner klären.

Der Gesamtphenolgehalt von *Fontinalis antipyretica* wird nicht durch eine vierstündige bzw. dreitägige 50 μM Cu(II)-Belastung beeinflusst. Die RP-HPLC-Analyse löslicher, phenolischer Verbindungen ermittelte Cu(II)-induzierte Konzentrationsschwankungen der isolierten Verbindungen. Die anhand der Retentionszeiten getroffene Zuordnung zu Standardsubstanzen konnte massenspektrometrisch nicht bestätigt werden. Spektroskopische Untersuchungen zu Wechselwirkungen der phenolischen Verbindungen mit Cu(II) schlossen eine Zugehörigkeit zur Gruppe der Flavonole aus. Die Charakterisierung der Phenole hinsichtlich einer Funktion in der Schwermetallstressantwort in *Fontinalis antipyretica* setzt deren massenspektrometrische Identifizierung voraus.

Erste Untersuchungen zur Regulation Metallothionein-ähnlicher Gene mittels einer cDNA-Sonde aus *Brassica juncea* deuteten auf eine kurzzeitige Induktion der Transkripte infolge einer Zn(II)-Belastung sowie nach einem 20 °C-Hitzeschock hin. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der immunologischen Detektion Metallothionein-ähnlicher Proteine. Aus genomischer DNA von *Fontinalis antipyretica* wurde eine Metallothionein p1-homologe Sequenz (95%ige Homologie zur Metallothionein p1-mRNA von *Zea mays*) isoliert und bietet als Sonde ideale Voraussetzungen zur Klärung der Regulation Metallothionein-ähnlicher Gene unter Schwermetalleinfluss.

6. Literaturverzeichnis

- Aichele, D., W. Schwegler** (1967): Unsere Moos- und Farn-Pflanzen. Franck'sche Verlagshandlung Stuttgart. 122.
- Altschul, F., L. Stephen, T. Madden, A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman** (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* 25: 3389-3402.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman** (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Asakawa, Y.** (1982): Chemical constituents of hepaticae. In: Hegenauer, R. (1986): *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Band 7: 375.
- Assuncao, A. G. L., P. D. C. Martins, S. de Folter, R. Vooijs, H. Schat, M. G. M. Aarts** (2001): Elevated expression of metal transporter genes in three accession of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell and Environ.* 24: 217-226.
- Axelsen, K., M. G. Palmgren** (2001): Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 126: 696-706.
- Baker, A. J. M., S. P. McGrath, R. D. Reeves, J. A. Smith** (2000): Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry, N., G. Banuelos (eds): *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Lewis Publishers, Boca Raton: 85-107.
- Bech-Otschir, D.** (1995): Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Schwermetalle auf den Glutathion- und Gesamtthiolgehalt von *Fontinalis antipyretica*. Diplomarbeit. Fachbereich Biochemie/Biotechnologie, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
- Beckett, R. P., D. H. Brown** (1984): The control of cadmium uptake in the lichen genus *Peltigera*. *J. Exp. Bot.* 35: 1071-1082.
- Binz, P.-A., J. H. R. Kägi** (1999): Metallothionein: molecular evolution and classification. In: Klaasen, C. (ed.): *Metallothionein IV*. Birkhäuser Verlag, Basel: 7-13.
- Bloß, T., St. Clemens, D. H. Nies** (2002): Characterization of the ZAT1p zinc transporter from *Arabidopsis thaliana* in microbial model organisms and reconstituted proteoliposomes. *Planta* 214: 783-791.
- Blum, H., H. Beier, H. J. Gross** (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8 (2): 93-99.
- Boussama, N., O. Ouarti, A. Suzuki, M. H. Ghorbal** (1999): Cd-stress on nitrogen assimilation. *J. Plant Physiol.* 155: 310-317.

- Brand, W. A., A. R. Tegtmeyer, A. Hilker** (1994): Compound specific isotope analysis: extending toward $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. *Org. Geochem.* 21: 585-594.
- Bringezu, K., O. Lichtenberger, I. Leopold, D. Neumann** (1999): Heavy metal tolerance of *Silene vulgaris*. *J. Plant Physiol.* 154: 536-546.
- Brown, D. H., A. Avalos** (1991): Chemical control of cadmium uptake by *Peltigera*. *Symbiosis* 11: 299-311.
- Brown, D. H., J. M. Wells** (1988): Sequential elution technique for determining the cellular location of cations. In: Glime, J. M. (ed.): *Methods in bryology. Proc. Bryol. Meth. Workshop, Mainz. Hattori Bot. Lab., Nichinan.* 227-233.
- Brown, D. H., M. Sidhu** (1992): Heavy metal uptake, cellular location and inhibition of moss growth. *Crypt. Bot.* 3: 82-85.
- Brown, D. H., R. P. Beckett** (1985): Intracellular and extracellular uptake of cadmium by the moss *Rhytidiadelphus squarrosus*. *Ann. Bot.* 55: 179-188.
- Brown, D.H** (1982): Mineral nutrition. In: Smith, A. J. (ed): *Bryophyte ecology.* Academic Press, London: 383-443.
- Brown, J. E., H. Khodr, R. Hider, C. Rice-Evans** (1998): Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.* 330: 1173-1178.
- Brunold, Ch., A. Ruegsegger, R. Brändle** (1996): *Stress bei Pflanzen.* UTB Verlag. 191-219.
- Bruns, I.** (1997): Induktion thiolhaltiger Peptide im Wassermoos *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. unter Schwermetalleinfluss und deren Nutzung als Biomarker für Schwermetallbelastungen aquatischer Systeme. Dissertationsschrift, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
- Bruns, I., A. Siebert, R. Baumbach, J. Miersch, D. Günther, B. Markert, G.-J. Krauß** (1995): Analysis of heavy metals and sulphur-rich compounds in the water moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw.. *Fresenius J. Anal. Chem.* 353: 101-104.
- Bruns, I., G.-J. Krauß** (1999): Das aquatische Monitormoos *Fontinalis antipyretica*-Schwermetallakkumulation und Synthese spezifischer Stressmetabolite. In: Oehlmann, J., B. Markert (eds.): *Ökotoxikologie. Ökosystemare Ansätze und Methoden.* Ecomed. Landsberg: 301-315.
- Bruns, I., K. Friese, G. Krauß, G.-J. Krauß** (2000a): Assessment of metal pollution of aquatic systems with the watermoss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. - from fundamental investigation to physiological effect. In: Markert, B., K. Friese (eds): *Trace elements their distribution and effects in the environment.* Elsevier Sci.. 323-339.

- Bruns, I., K. Sutter, D. Neumann, G.-J. Krauß** (2000b): Glutathione accumulation - a specific response of mosses to heavy metal stress. In: Brunold, Ch. (ed): Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants. Paul Haupt, Bern, Schweiz. 389-391.
- Bruns, I., K. Sutter, S. Menge, D. Neumann, G.-J. Krauß** (2001): Cadmium lets increase the glutathione pool in bryophytes. *J. Plant Physiol.* 158: 79-89.
- Buchanan-Wollaston, V.** (1994): Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. *Plant Physiol.* 105: 839-846.
- Buschmann, C.** (1986): Fluoreszenz- und Wärmestrahlung bei Pflanzen. *Naturwissenschaften* 73: 691-699.
- Buschmann, C., H. Lichtenthaler** (1999): Contribution of chlorophyll fluorescence to the reflectance of leaves in stressed plants as determined with the VIRAF-spectrometer. *Z. Naturforsch.* 54c: 849-855.
- Busse, S.** (1997): Veränderungen der Diatomeenflora in Helbe und Urbach (Thüringen) aufgrund einer verringerten Salzbelastung. Diplomarbeit. Freie Universität Berlin. Fachbereich Biologie.
- Cenci, R. M.** (2000): The use of aquatic moss (*Fontinalis antipyretica*) as monitor of contamination in standing and running waters: limits and advantages. *J. Limnol.* 60: 53-61.
- Chen, C. T., L.-M. Chen, C. C. Lin, C. H. Kao** (2001): Regulation of proline accumulation in detached leaves exposed to excess copper. *Plant Science* 160: 283-290.
- Chen, L.-M., C.-H. Kao** (1998): Relationship between ammonium accumulation and senescence of detached rice leaves caused by excess copper. *Plant Soil* 200: 167-173.
- Chen, L.-M., C.-H. Kao** (1999): Effect of excess copper on rice leaves: evidence for involvement of lipid peroxidation. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40: 283-287.
- Chevalier, C., E. Bourgeois, A. Pradet, P. Raymond** (1995): Molecular cloning and characterization of six cDNA's expressed during glucose starvation in excised maize (*Zea mays* L.) root tips. *Plant Mol. Biol.* 28: 473-485.
- Choi, D., H. M. Kim, H. K. Yun, J.-A. Park, W. T. Kim, S. H. Bok** (1996): Molecular cloning of a metallthionein-like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* 112: 353-359.
- Ciscato, M., J. Vangronsveld, R. Valcke** (1999): Effects of heavy metals on the fast chlorophyll fluorescence induction kinetics of photosystem II: a comparative studie. *Z. Naturforsch.* 54c: 735-739.
- Clemens, St.** (2001): Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostase. *Planta* 212: 475-486.

- Clemens, St., D. M. Antosiewicz, J. M. Ward, D. P. Schachtmann, J. I. Schröder** (1998): The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 12043-12048.
- Clemens, St., E. J. Kim, D. Neumann, J. I. Schröder** (1999): Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthetases from plants and yeast. EMBO J. 18: 3325-3333.
- Clijsters, H. M. M., F. van Assche** (1985): Inhibition of photosynthesis by heavy metals. Photosynth. Res. 7: 31-40.
- Cobbett, C. S.** (2000a): Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. Curr. Opin. Plant Biol. 3: 211-216.
- Cobbett, C. S.** (2000b): Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. Plant Physiol. 123: 825-832.
- Cobbett, C. S., P. B. Goldsbrough** (2000): Mechanisms of heavy metal resistance: phytochelatin and metallothioneins. In: Raskin, I., B. D. Ensley (eds): Phytoremediation of toxic metals: using plants clean up the environment. Wiley & Sons. New York. 247-269.
- Costa, G., J.-L. Morel** (1994): Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce. Plant Physiol. Biochem. 32: 561-570.
- Curie, C., J. M. Alonso, M. Jean, J. R. Ecker, J. F. Briat** (2000): Involvement of Nramp1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. J. Biochem. 347: 749-755.
- Danilov, R., N. G. A. Ekelund** (2001): Effects of Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} and pentachlorophenol on photosynthesis and motility in *Chlamydomonas reinhardtii* in short-term exposure experiments. Bio. Med. Central Ltd. Eco. 1-9.
- Dat, J., S. Vandenabeele, E. Vranova; M. van Montagu, D. Inze, F. van Breusegem** (2000): Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cellular and Molecular Life Science 57: 779-795.
- Davis, J. M., H. R. Clarke, H. D. Bradshaw, M. P. Gordon** (1991): Populus chitinase genes: structure, organization and similarity of translated sequences to herbaceous plant chitinases. Plant Mol. Biol. 17 (4): 631-639.
- Dawson, R. M. C., D. C. Elliott, W. H. Elliott, K. M. Jones** (eds) (1989): Data of biochemical research. Ed. 3. Clarendon Press, Oxford, UK.
- De Knecht, J. A., M. van Dillen, P. Koevoets, H. Schat, J. Verkleij, W. H. O. Ernst** (1994): Phytochelatin in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. Plant Physiol. 104: 255-261.
- De Miranda, J. R., M. A. Thomas, D. A. Thurman, A. B. Tomsett** (1990): Metallothionein genes from the flowering plant *Mimulus guttatus*. FEBS Lett. 260: 277-280.

- Dixon, R. A., N. L. Paiva** (1995): Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 7: 1085-1097.
- Dower, W. J., J. F. Miller, C. W. Ragsdale** (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acid Res.* 16: 387-395.
- Dudley, H. W., I. Fleming** (1985): *Strukturaufklärung in der organischen Chemie*. Georg Thieme Verlag. 5. Auflage. 2-41.
- Ebbs, St., I. Lau, B. Ahner, L. Kochian** (2002): Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Planta* 214: 635-640.
- El-Sheekh, M. M.** (1993): Quenching of the variable fluorescence induced by zinc in the green alga *Chlorella fusca*. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 5: 1-5.
- Ernst, W. H. O.** (1974): *Schwermetallvegetation der Erde*. G. Fischer Verlag. Stuttgart. 58.
- Ernst, W. H. O., J. A. Verkleij, H. Schat** (1992): Metal tolerance in plants. *Acta Bot. Neerl.* 41: 229-248.
- Ezaki, B., M. Katsuhara, M. Kawamura, H. Matsumoto** (2001): Different mechanisms of four aluminium resistant transgenes for Al-toxicity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127: 918-927.
- Fiehn, O., J. Kopka, P. Dörmann, T. Altmann, R. N. Trethewey, L. Willmitzer** (2000): Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat. Biotechnol.* 18: 1157-1161.
- Foley, R. C., K. B. Singh** (1994): Isolation of a *Vicia faba* metallothionein-like gene, expression in foliar trichomes. *Plant Mol. Biol.* 26: 435-444.
- Frahm, J.-P.** (1998): *Moose als Bioindikatoren*. Biologische Arbeitsbücher. Quelle und Meyer Verlag Wiesbaden. 16-17.
- Frahm, J.-P., W. Frey** (1987): *Moosflora*. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart. 398.
- Franco, E., S. Alessandrelli, J. Masojidek, A. Margonelli, M. T. Giardi** (1999): Modulation of D1-protein turnover under cadmium and heat stresses monitored by [³⁵S]methionine incorporation. *Plant Science* 144: 53-61.
- Gagnon, C., G. Vaillancourt, L. Pazdernik** (1998): Influence of water hardness on accumulation and elimination of cadmium in two aquatic mosses under laboratory conditions. *Arch. Env. Cont. Tox.* 34: 12-20.
- Gallardo, K., C. Job, St. P. C. Groot, M. Puype, H. Demol, J. Vandekerckhove, D. Job** (2001): Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. *Plant Physiol.* 126: 835-848.
- Garcia-Hernandez, M., A. Murphy, L. Taiz** (1998): Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118: 387-397.

- Geiken, B., Masojidek, M. Rizzuto, M. L. Pompili, M. T. Giardi** (1998): Incorporation of [³⁵S]methionine in higher plants reveals that stimulation of the D1 reaction centre II protein turnover accompienes tolerance to heavy metal stress. *Plant Cell and Environm.* 21: 1265-1273.
- Genty, B., J. M. Briantais and N. R. Baker** (1989): The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87-90.
- Godbold, D. L., W. J. Horst, J. C. Collins, D. A. Thurman, H. Marschner** (1984): Accumulation of zinc and organic acids in roots of zinc tolerant and non-tolerant ecotypes of *Deschampsia caespitosa*. *Plant Physiol.* 116: 59-69.
- Goloubinoff, P., A. Mogk, A. P. Zvi, T. Tomoyasu, B. Bukau** (1999): Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by bichaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13732-13737.
- Görg, A.** (1991): Ready-made gels, immobilized pH-gradients and automated procedures for high resolution two-dimensional electrophoresis. *Sciences Tools* 35: 1-5.
- Graham, A. W., G. K. McDonald** (2001): Effects of zinc of photosynthesis and yield of wheat under heat stress. *Proceedings of the 10th Australian Agronomy Conference*, Hobart.
- Grill, E., E.-L. Winnacker, M. H. Zenk** (1987): Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 439-443.
- Grill, E., E.-L. Winnacker, M. H. Zenk** (1988): Occurence of heavy metal binding phytochelatins in plants growing in a mining refuse area. *Experientia* 44: 539.
- Grill, E., E.-L. Winnacker, M. H. Zenk** (1989): Phytochelatins, the heavy metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6838-6842.
- Grotz, N., T. Fox, E. L. Connoly, W. Park, D. Eide** (1998): Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7220-7224.
- Guerinot, M. L., D. Eide** (1999): Zeroing in zinc uptake in yeast and plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 244-249.
- Hall, J. L.** (2002): Cellular mechanisms for heavy metal detoxfication and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53: 1-11.
- Hegnauer, R.** (1986): *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Band VII. Birkhäuser Verlag. 374-396.
- Henning, J. A., D. L. Moore** (1999): Hop Chitinase gene. (subm. *Plant Mol. Biol.*).

- Himmelblau, E., R. Amasino** (2000): Delivering copper within cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 205-210.
- Hirschi, K. D., V. Korenkov, N. L. Wilganowski, G. J. Wagner** (2000): Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiol.* 124: 125-133.
- Hofmann, D., K. Jung, H.-J. Segschneider, M. Gehre, G. Schüürmann** (1995): $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ analysis of amino acids with GC-C-IRMS-methodical investigation and ecotoxicological applications. *Isotopes Environ. Health. Stud.* 31: 367-375.
- Hofmann, D., M. Gehre, K. Jung** (eingereicht): Sample preparation techniques for the determination of $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ variations in amino acids by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS). *Isotopes in Environmental and Health Studies*.
- Howden, R., C. R. Andersen, P. B. Goldsbrough, C. S. Cobbett** (1995): A cadmium-sensitive glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. In: Clemens, St. (2001): Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostase. *Planta* 212: 475-486.
- Hsieh, H.-M., W.-K. Liu, P. C. Huang** (1995): A novel stress-inducible metallothionein-like gene from rice. *Plant Mol. Biol.* 28: 381-389.
- Hsieh, H.-M., W.-K. Liu, W. K. Chang, P. C. Huang** (1996): RNA-expression patterns of a type 2 metallothionein-like gene from rice. *Plant Mol. Biol.* 32: 525-529.
- Jennings, A. C.** (1981): The determination of dihydroxy phenolic compounds in extracts of plant tissues. *Analyt. Biochem.* 118: 396-398.
- Kampfenkel, K., S. Kushnir, E. Baiychuk, D. Inze, M. van Montagu** (1995): Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *J. Biol. Chem.* 270: 28479-28486.
- Kautsky, H., W. Appel, H. Amann** (1960): Chlorophyllfluoreszenz und Kohlensäureassimilation. *Biochemische Zeitschrift.* 322: 277-292.
- Kawashima, I., Y. Inokuchi, M. Chino, M. Kimura, N. Shimizu** (1991): Isolation of a gene for a metallothionein-like protein from soyabean. *Plant Cell Physiol.* 32: 913-916.
- Klapheck, S., B. Chrost, J. Starke, H. Zimmermann** (1992): γ -Glutamylcysteinylserine-a new homologue of glutathione in plants of the family Poaceae. *Bot. Acta* 105: 174-179.
- Kleber, H.-P., D. Schlee, W. Schöpp** (1997): *Biochemisches Praktikum.* Gustav Fischer Verlag, 5. Aufl., 90-94.
- Kombrink, E., M. Schröder, K. Hahlbrock** (1988): Several „pathogenese-related“ proteins in potato are 1,3- β -glucanases and chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 782-786.

- Korshunova, Y. O., D. Eide, W. G. Clark, M. L. Guerinot, H. B. Pakrasi** (1999): The IRT1-protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol. Biol.* 40: 37-44.
- Krämer, U., I. J. Pickering, R. C. Prince, I. Raskin, D. E. Salt** (2000): Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiol.* 122: 1343-1353.
- Krämer, U., J. D. Cotter-Howells, J. M. Charnock, A. J. M. Baker, J. A. C. Smith** (1996): Free histidin as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379: 635-638.
- Krause, G. H., E. Weis** (1991): Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 42: 313-349.
- Krotz, R. M., B. P. Evangelou, G. J. Wagner** (1989): Relationships between cadmium, zinc, Cd-peptide and organic acid in tobacco suspension cells. *Plant Physiol.* 91: 780-787.
- Krupa, Z., G. Öquist, N. Huner** (1993): The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* - a fluorescence analysis. *Physiol. Plantarum* 88: 626.
- Küllertz, G., A. Liebau, K. P. Rücknagel, A. Schierhorn, B. Dittrich, G. Fischer, M. Luckner** (1999): Stress-induced expression of cyclophilins in proembryonic masses of *Digitalis lanata* does not protect against freezing/thawing stress. *Planta* 208: 599-605.
- Küpper, H., F. Küpper, M. Spiller** (1996): Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *J. Exp. Bot.* 47: 259-266.
- Lane, B., R. Kalioka, T. Kennedy** (1987): The wheat-germ E_C protein is an zinc-containing metallothionein. *Biochem. Cell Biol.* 65: 1001-1005.
- Larimer, F. W., J. R. Perry, A. A. Hardigree** (1989): The REV1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: isolation, sequence and functional analysis. *J. Bacteriol.* 171: 230-237.
- Lasat, M. M., N. S. Pence, D. F. Garvin, S. D. Ebbs, L. V. Kochian** (2000): Molecular physiology of zinc transport in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J. Exp. Bot.* 51: 71-79.
- Lavid, N., A. Schwartz, O. Yarden, E. Tel-Or** (2001a): The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). *Planta* 212: 323-331.
- Lavid, N., Z. Barkay, E. Tel-Or** (2001b): Accumulation of heavy metals in epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). *Planta* 212: 313-322.
- Lawrence, C. W., V. M. Maher** (2001): Eukaryotic mutagenesis and translesion replication dependent on DNA polymerase ξ and REV1 protein. *Bio. Soc. Trans.* 29: 187.
- Lee, G. J., A. M. Roseman, H. S. Saibil, E. Vierling** (1997): A small heat shock protein stably binds heat denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J.* 16: 659-671.

- Lee, J., K. D. Reeves, R. R. T. Brooks** (1977): Jaffre isolation and identification of a citrato-complex of nickel from nickel-accumulating plants. *Phytochemistry* 16: 1503-1505.
- Lewis, S., R. D. Handy, B. Cordi, Z. Billingham, M. H. Depledge** (1999): Stress proteins (HSPs): methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotox.* 8: 351-358.
- Li, Z.-S., Y.-P. Lu, R.-G. Zhen, M. Szczypka, D. J. Thiele, P. A. Rea** (1997): A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(gluththionato)cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 42-47.
- Lichtenberger, O., D. Neumann** (1997): Analytical electron microscopy as a powerful tool in plant cell biology: examples using electron energy loss spectroscopy and X-ray microanalysis. *Europ. J. Cell Biol.* 73: 378-386.
- Lichtenthaler, H. K., J. A. Miede** (1997): Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in Plant Science* 2: 316-320.
- Lichtenthaler, H. K., O. Wenzel, C. Buschmann, A. Gitelson** (1998): Plant stress detection by reflectance and fluorescence. *Ann. New York Academy of Sciences.* Vol. 58: 271-285.
- Lopez, J., M. D. Vazquez, A. Carballeira** (1994): Stress responses and metal kinetics following transplant of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica*. *Freshwater Biol.* 32: 185-198.
- Lottspeich, F. H. Zorbass** (1998): *Bioanalytik.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin. 235 pp.
- Lowry, D. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. L. Randell** (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lu, Y. P., Z. S. Li, P. A. Rea** (1997): AtMRP1 gene of *Arabidopsis* encodes a glutathione S-conjugate pump: isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8243-8248.
- Luan, S., W. S. Lane, S. L. Schreiber** (1994): PCyPB: a chloroplast-localized, heat shock-responsive cyclophilin from fava bean. *Plant Cell* 6: 885-892.
- Lummerzheim, M., M. Sandroni, C. Castresana, D. E. Oliveira, M. van Montagu, D. Roby, B. Timmermann** (1995): Comparative microscopic enzymatic characterization of the leaf necrosis induced by lead nitrate and by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* after foliar spray. *Plant Cell Environ.* 18: 499-509.
- Luna, C. M., C. A. Gonzalez, V. S. Trippi** (1994): Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. *Plant Cell Physiol.* 35: 11-15.
- Ma, J. F.** (2000): Role of organic acids in the detoxification of aluminum in higher plants. *Plant Cell Physiol.* 41: 383-390.

- Ma, J. F., S. Hiradate, K. Nomoto, T. Iwashita, H. Matsumoto** (1997): Internal detoxification mechanism of Al in *Hydrangea* (identification of Al form in the leaves). *Plant Physiol.* 113: 1033-1039.
- Ma, Z., S. C. Miyasaka** (1998): Oxalate exudation by Taro in response to Al. *Plant Physiol.* 118: 861-865.
- Macnair, M. R., G. H. Tilstone, S. E. Smith** (2000): The genetics of metal tolerance and accumulation in higher plants. In: Terry, N., G. Banuelos (eds): *Phytoremediation of contaminated soil and water*. CRC Press LLC. 235-250.
- Marivet, J., P. Frendo, G. Burkhard** (1992): DNA sequence analysis of a cyclophilin gene from maize: development expression and regulation by salicylic acid. *Mol. Gen. Genet.* 247: 222-228.
- Marivet, J., P. M. Margis** (1994): Bean cyclophilin gene expression during plant development and stress conditions. *Plant Molecular Biology* 26: 1181-1189.
- Marschner, H.** (1995): *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, 2. Ausgabe. 333-364.
- Mäser, P., S. Thomine, J. I. Schroeder, J. M. Ward, K. Hirschi, H. Sze, I. N. Talke, A. Amtmann, F. J. M. Maathuis, D. Sanders, J. F. Harper, J. Tchieu, M. Gribskov, M. W. Persan, D. E. Salt, S. A- Kim, M. L. Guerinot** (2001): Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 126: 1646-1667.
- Masojidek, J., J. Maly, S. Alessandrelli, M. Koblizek, M. Rizzuto, B. Geiken, J. Kopecky, J. Komenda, O. Prasil, M. T. Giardi** (2000): Effect of heavy metals on the structure and function of photosystem II: potential and prospects for use as bioindicator. In: Pilloton, R., F. Mazzei (eds.): *Proceedings of the 2nd Workshop on Chemical Sensors and Biosensors*. 249-256.
- Maxwell, K., G. N. Johnson** (2000): Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51: 659-668.
- Maywald, F., H. J. Weigel** (1997): Zur Biochemie und Molekularbiologie der Schwermetallaufnahme und -speicherung bei höheren Pflanzen. *Landbauforschung Völkenrode* 3: 103-126.
- McCormick, C.C., L.-Y. Lin** (1991): Quantification and identification of metallothioneins by gel electrophoresis and silver staining. In: Riordan, J. F., B. Vallee (1991): *Methods of Enzymology* Vol. 205. Academic Press. 72.
- Melkonyan, V. Z., R. M. Nalbandyan** (1989): Cu-thionein from the roots of cucumber seedlings. *Biochimica* 54: 306-312.
- Mira, H., F. Martinez-Garcia, L. Penarrubia** (2001a): Evidence for the plant-specific intercellular transport of the *Arabidopsis* copper chaperone CCH. *Plant J.* 25: 521-528.

- Mira, H., M. Vilar, E. Perez-Paya, L. Penarrubia** (2001b): Functional and conformational properties of the exclusive C-domain from the *Arabidopsis* copper chaperone (CCH). *Biochem. J.* 357: 545-549.
- Monnet, F., N. Vaillant, P. Vernay, A. Coudret, H. Sallanon, A. Hitmi** (2001): Relationship between PSII activity, CO₂ fixation and Zn, Mn and Mg contents of *Lolium perenne* under Zn stress. *J. Plant Physiol.* 158: 1137-1144.
- Mullins, G. L., L. E. Sommers, T. L. Housley** (1986): Metal speciation in xylem and phloem exudates. *Plant Soil* 96: 377-391.
- Murphy, A., J. Zhou, P. B. Goldsbrough, L. Taiz** (1997): Purification immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 113: 1293-1301.
- Murphy, A., L. Taiz** (1995): Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. *Plant Physiol.* 109: 945-954.
- Nebel, M. und G. Philippi** (2000): Die Moose Baden-Württembergs. Band II. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart. 213-215.
- Neumann, D., O. Lichtenberger, D. Günther, K. Tschiersch, L. Nover** (1994): Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta* 194: 360-367.
- Neumann, D., U. zur Nieden** (2000): Silicon and heavy metal tolerance of higher plants. *Phytochemistry* 56: 685-692.
- Neumann, D., U. zur Nieden, O. Lichtenberger, I. Leopold** (1995): How does *Armeria maritima* tolerate high heavy metal concentrations? *J. Plant Physiol.* 146: 704-717.
- Neumann, D., U. Zur Nieden, R. Manteuffel, G. Walter, K.-D. Scharf, L. Nover** (1987): Intracellular localization of heat shock proteins in tomato cell cultures. *Eur. J. Cell. Biol.* 43: 71-81.
- Neumann, D., U. zur Nieden, W. Schwieger, I. Leopold, O. Lichtenberger** (1997): Heavy metal tolerance of *Minuartia verna*. *J. Plant Physiol.* 151: 101-108.
- Nies, D. H., S. Silver** (1995): Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Ind. Microbiol.* 14: 186-199.
- Noctor, G., A.-C. M. Arisi, L. Jouanin, K. J. Kunert, H. Rennenberg, C. H. Foyer** (1998): Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J. Exp. Bot.* 49: 623-647.
- Noctor, G., C. H. Foyer** (1998): Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 49: 249-279.
- Nordberg, M., M. Piscator, O. Vesterberg** (1972): Separation of two forms of rabbit metallothionein by isoelectric focusing. *Biochem. J.* 126: 491.
- Nover, L.** (1991): Heat shock response. CRC Press Boca Raton, London.

- Nover, L., D. Neumann** (1989): Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and contain a specific set of mRNA's. *Mol. Cell Biol.* 9: 1298-1308.
- Nover, L., D. Neumann, K.-D. Scharf** (eds) (1989): Heat shock and other stress response systems of plants. Springer Verlag, Berlin. 13 pp.
- Nygaard, Ch., N. G. A. Ekelund** (1999): Effects of lead (PbCl₂) on photosynthesis and respiration of the bladder wrack, *Fucus vesiculosus*, in relation to different salinities. *Water, Air and Soil Poll.* 116: 549-565.
- O' Farrell, P. H.** (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.
- Okumura, N., N. K. Nishizawa, Y. Umehara, S. Mori** (1991): An iron deficiency-specific cDNA from barley roots having two homologous cystein-rich MT domains. *Plant Mol. Biol.* 17: 531-533.
- Ortiz, D. F., T. Ruscitti, K. F. McCue, D. W. Ow** (1995): Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J. Biol. Chem.* 270: 4721-4728.
- Palatnik, J. F., N. Carrillo, E. M. Valle** (1999): The role of photosynthetic electron transport in the oxidative degradation of chloroplastic glutamine synthetase. *Plant Physiol.* 121: 471-478.
- Pardo, M., M. Ward, S. Bains, M. Molina, W. Blackstock, C. Gil, C. Nombela** (2000): A proteomic approach for the study of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall biogenesis. *Electrophoresis* 21: 3396-3410.
- Pätsikkä, E., E.-M. Aro, E. Tyystjärvi** (1998): Increase in the quantum yield of photoinhibition contributes to copper toxicity *in vivo*. *Plant Physiol.* 117: 619-627.
- Pearson, W. R.** (1990): Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods in Enzymology* 183: 63-98.
- Pence, N. S., P. B. Larsen, S. D. Ebbs, D. L. D. Letham, M. M. Lasat, D. F. Garvin, D. Eide, L. V. Kochian** (2000): The molecular physiology of metal transporter in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4956-4960.
- Peterson, C. W., S. S. Narula, I. M. Armitage** (1996): 3D-solution structure of copper and silver-substituted yeast metallothioneins. *FEBS Lett.* 379: 85 pp.
- Pickering, D. C., I. L. Puia** (1969): Mechanism for the uptake of zinc by *Fontinalis antipyretica*. *Physiol. Plant* 22: 653-661.
- Prasad, M. N. V.** (1997): Trace metals. In: Prasad, M. N. V. (ed): *Plant ecophysiology*. Wiley, New York. 207-249.
- Prasad, M. N. V.** (1999): Metallothioneins and metal binding complexes in plants. In: Prasad, M. N. V., J. Hagemeyer (eds): *Heavy metal stress in plants*. Springer Verlag. 52-71.

- Quartacci, M. F., E. Cosi, F. Navari-Izzo** (2001): Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess. *J. Exp. Bot.* 52: 77-84.
- Rabenstein, D. L.** (1989): Metal complexes of glutathione and their biological significance. In: Dolphin, D., O. Avramovic, R. Poulsonb (eds): *Glutathione*. Wiley Int. Sci, New York. 147-186.
- Rausser, W. E.** (1999): Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochem. and Biophys.* 31: 19-48.
- Rausser, W. E.** (2000): The role of thiols in plants under metal stress. In: Brunhold, Ch., H. Rennenberg, L. J. de Kok, I. Stulen, J.-C. Davidian (eds): *Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants*. Paul Haupt, Bern, Schweiz: 169-183.
- Rea, P. A., Z. S. Li, Y. P. Lu, Y. M. Drozdowicz, E. Martinoia** (1998): From vacuolar GS-X pumps to multisppecific ABC transporters. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 49: 727-760.
- Reese, R. N., C. A. White, D. R. Winge** (1992): Cadmium sulfide crystallites in Cd-(γ -EC)_nG peptide complexes from tomato. *Plant Physiol.* 98: 225-229.
- Rennenberg, H., C. Brunold** (1994): Significance of glutathione metabolism in plants under stress. *Prog. Bot.* 55: 142-156.
- Repcak, M., J. Imrich, M. Franekova** (2001): Umbelliferone, a stress metabolite of *Chamomilla recutita* (L.). *J. Plant Physiol.* 158: 1085-1087.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller, G. Paganga** (1996): Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical. Biol. Med.* 20: 933-956.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller, G. Paganga** (1997): Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2 (4): 152-159.
- Richardson, D. H. S.** (1981): *The biology of mosses*. Blackwell Scientific Publications Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne. 184-185.
- Rivero, R. M., J. M. Ruiz, P. C. Garcia, L. R. Lopez-Lefebvre, E. Sanchez, L. Romero** (2001): Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science* 160: 315-321.
- Robinson, N. J., A. M. Tommey, C. Kuske, P. J. Jackson** (1993): Plant metallothioneins. *Biochem. J.* 295: 1-10.
- Robinson, N. J., J. R. Wilson, J. S. Turner** (1996): Expression of the type 2 metallothionein-like gene MT2 from *Arabidopsis thaliana* in Zn²⁺ metallothionein-deficient *Synechococcus* PCC 7942: putative role for MT2 in Zn²⁺ metabolism. *Plant Mol. Biol.* 30: 1169-1179.
- Roby, D., A. Toppan, M.-T. Esquerre-Tugaye** (1986): Cell surface in plant-microorganism interactions. *Plant Physiol.* 77: 700-704.

- Sagner, S., R. Kneer, G. Wanner, J. P. Gosson, B. Deus-Neumann, M. H. Zenk** (1998): Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in *Sebertia acuminata*. *Phytochemistry* 47: 339-347.
- Saito, T., S. Ishiguro, H. Ashida, M. Kawamukai, H. Matsuda, H. Ochiai, T. Nakagwa** (1995): Cloning and sequence analysis of genes for cyclophilin from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 36: 377-382.
- Salt, D. E., R. C. Prince, A. J. M. Baker, I. Raskin, I. J. Pickering** (1999): Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy. *Environ Sci Technol.* 33: 713-717.
- Salt, D. E., R. D. Smith, I. Raskin** (1998): Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 49: 643-668.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniates** (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2. Aufl..
- Samecka-Cymerman, A., A. J. Kempers** (1999): Background concentration of heavy metals in aquatic bryophytes used for biomonitoring in basaltic areas. *Env. Geol.* 39: 117-122.
- Sandalio, L. M., H. C. Dalurzo, M. Gomez, M. C. Romero-Puertas, L. A. del Rio** (2001): Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.* 52: 2115-2126.
- Sandmann, G., P. Böger** (1980): Copper deficiency and toxicity in *Scenedesmus*. *Zeitschrift Pflanzenphysiol.* 98: 53-59.
- Sandmann, G., P. Böger** (1983): Enzymological function of heavy metals and their role in electron transfer processes of plants. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*. Springer Verlag Berlin. *Physiological Plant Ecology III*. Vol 12: 246-300.
- Sanger, F., S. Nicklen, A. R. Coulson** (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Sarvari, E., F. Fodor, E. Cseh, A. Varga, G. Zaray, L. Zolla** (1999): Relationship between changes in ion content of leaves and chlorophyll-protein composition in cucumber under Cd and Pb stress. *Z. Naturforschung* 54c: 746.
- Sato, S., H. Kotani, Y. Nakamura, T. Kaneko, E. Asamizu, M. Fukami, N. Miyajima, S. Tabata** (1997): Structural analysis of *Arabidopsis thaliana* chromosome 5. Sequence features of the 1,6 mb region covered by twenty physically assigned P1 clones. *DNA Res.* 4: 215-230.
- Schaefer, H. J., A. Haag-Kerwer, Th. Rausch** (1998): Cadmium-responsive genes in the heavy metal accumulator *Brassica juncea* L.: cDNA cloning of OAS (thio)lyase, gamma-glutamylcysteine synthetase, glutathione synthetase and metallothionein 2 and their expression in roots of Cd-exposed plants. *Mol. Plant Biol.* 37: 87-97.

- Schäfer, H. J., S. Greiner, Th. Rausch, A. Haag-Kerwer** (1997): In seedlings of the heavy metal accumulator *Brassica juncea* Cu²⁺ differentially affects transcript amounts for γ -glutamylcysteine synthetase (γ -ECS) and metallothionein (MT2). FEBS Letters 404: 216-220.
- Schägger, H., G. von Jagow** (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Analytical Biochem. 166: 368-379.
- Schat, H., M. Llugany, R. Bernhard** (2000): Metal-specific patterns of tolerance, uptake and transport of heavy metals in hyperaccumulating and non-hyperaccumulating metallophytes. In: Terry, N., G. Banuelos (eds): Phytoremediation of contaminated soil and water. CRC Press LLC.
- Schlee, D.** (1992): Ökophysiologische Biochemie. Gustav Fischer. 130 pp.
- Schmid, F. X.** (1995): Prolyl isomerases join the fold. Curr. Biol. 5: 993-994.
- Schöffl, F., R. Prändl, A. Reindl** (1998): Regulation of the heat-shock response. Plant Physiol. 117: 1135-1141.
- Schopfer, P.** (1986): Experimentelle Pflanzenphysiologie. Band 1. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio. 47.
- Schröder, H., T. Langer, F. U. Hartl, B. Bukau** (1993): DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. EMBO J. 12: 4137-4144.
- Schröder, W. P., J. B. Arellano, T. Bittner, M. Baron, H.-J. Eckert, G. Renger** (1994): Flash-induced absorption spectroscopy studies of copper interaction with PS II in higher plants. J. Biol. Chem. 269: 32865-32870.
- Schubert, R. und G. Wagner** (1988): Pflanzennamen und botanische Fachwörter. Neumann Verlag Leipzig, Radebeul. 183.
- Shaw, A. J., B. Goffinet** (eds) (2000): Bryophyte biology. Cambridge University Press. 113 pp.
- Slabbert, N.** (1992): Complexation of condensed tannins with metal ions. In: Hemingway, R. W., P. E. Laks (eds): Plant Polyphenols. Plenum Press, New York. 259-280.
- Snowden, K. C., R. C. Gardner** (1993): Five genes induced by aluminium in wheat (*Triticum aestivum*) roots. Plant Physiol. 103: 855-861.
- Sommer, C., S. Winkler** (1982): Reaktionen im Gaswechsel von *Fontinalis antipyretica* nach experimentellen Belastungen mit Schwermetallverbindungen. Arch. Hydrobiol. 93: 503-524.
- Stillman, M. J.** (ed) (1992): Metallothioneins: synthesis, structure and properties of metallothioneins, phytochelatins and metal-thiolate-complexes. VCH, New York. 258 pp.

- Stoller, G., K. P. Rücknagel, K. H. Nierhaus, F. X. Schmid, G. Fischer, J.-U. Rahfeld** (1995): A ribosome associated peptidyl-prolyl cis-trans isomerase identified as the trigger factor. *EMBO J.* 14: 4939-4948.
- Strack, D., G. B. Feige, R. Kroll** (1979): Screening of aromatic secondary lichen substances by high performance liquid chromatography. *Z. Naturforsch.* 34c: 695-698.
- Sutter, K.** (2000): Untersuchungen zur Akkumulation und physiologisch-biochemischen Wirkung von Schwermetallen im Wassermoos *Fontinalis antipyretica*. Dissertation. Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Universität Halle-Wittenberg.
- Sutter, K., K. Jung, G.-J. Krauß** (2001): Effects of heavy metals on the nitrogen metabolism of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. A ¹⁵N-Tracer study. *Environm. Sci. Poll. Res.* (OnlineFirst). 1-5.
- Tateishi, Y., Y. Umemura, M. Esaka** (2001): A basic class I chitinase expression in winged bean is up-regulated by osmotic stress. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 1663-1668.
- Thomine, S., R. Wang, J. M. Ward, N. M. Crawford, J. I. Schroeder** (2000): Cadmium and iron transport by members of a plant transporter gene family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4991-4996.
- Thüringisches Landesvermessungsamt Erfurt** (Hrsg.) (1996): Nivelliernetze. Messtischblatt 4629/2.
- Timischl, W.** (2000): Biostatistik. Eine Einführung für Biologen und Mediziner. Springer Verlag. 2. Aufl. 101-106.
- Tziveleka, L., A. Kaldis, A. Hegedüs, J. Kissimon, A. Prombona, G. Horvath, J. Argyroudi-Akoyunoglou** (1999): The effect of Cd on chlorophyll and light-harvesting complex II, biosynthesis in greening plants. *Z. Naturforsch.* 54c: 740-745.
- Vad, K., E. de Neergaard, K. Madritz-Ordenana, J. D. Mikkelsen, D. B. Collinge** (1993): Accumulation of defence-related transcripts and cloning of a chitinase mRNA from pea leaves (*Pisum sativum* L.) inoculated with *Ascochyta pisi*. *Lib. Plant Sci.* 92: 69-79.
- Van Assche, F., H. Clijsters** (1986): Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentration of zinc: effect on electron transport and photophosphorylation. *Physiologia Plantarum* 66: 717-721.
- Van der Zaal, B. J., L. W. Neuteboom, J. E. Pinas, A. N. Chardonnans, H. Schat, J. A. Verkleij, P. J. Hooykaas** (1999): Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiol.* 119: 1047-1056.
- Vassilev, A, I. Yordanov, E. Chakalova, V. Kerin** (1995): Effect of cadmium stress on growth and photosynthesis of young (*H. vulgare* L.) plants. II. Structural and functional changes in photosynthetic apparatus. *Bul. J. Plant Physiol.* 21: 12-21.

- Vassilev, A., P. Manolov** (1999): Chlorophyll Fluorescence of barley (*H. vulgare* L.) seedlings grown in excess of Cd. *Bul. J. Plant Physiol.* 25: 67-76.
- Vatamanuik, O. K., S. Mari, Y. Lu, P. A. Rea** (2000): Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatase (PC) synthase. *J. Biol. Chem.* 275: 31451-31459.
- Vazquez, M. D., J. Lopez, A. Carballeira** (1999): Uptake of heavy metals to the extracellular and intracellular compartments in three species of aquatic bryophyte. *Ecotox. Environ. Safety* 44: 12-24.
- Vazquez, M. D., J. Lopez, S. Diaz, A. Carballeira** (2000): The effect of pH on the kinetics of intra- and extracellular uptake of Al in *Fontinalis antipyretica*: Changes in the cellular contents of K, Mg and Ca. *Arch. Environ. Cont. Tox.* 39: 74-85.
- Vögeli-Lange, R., G. J. Wagner** (1990): Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. Implication of a transport function for cadmium-binding peptides. *Plant Physiol.* 92: 1086-1093.
- Vögeli-Lange, R., G. J. Wagner** (1996): Relationship between cadmium, glutathione and cadmium-binding peptides (phytochelatins) in leaves of intact tobacco seedlings. *Plant Science* 114: 11-18.
- Wagner, G. J.** (1993): Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv. Agron.* 51: 173-212.
- Walland, A., H. Kinzel** (1966): Über die Zusammensetzung der Zellsäfte der Archeogoniaten. In: Hegenauer, R. (1986): *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Band 7: 375.
- Wang, J., B. P. Evangelou, M. T. Nielsen, G. J. Wagner** (1991): Computer-simulated evaluation of possible mechanisms for quenching heavy metal ion activity in plant vacuoles. *Plant Physiol.* 97: 1154-1160.
- Wang, J., B. P. Evangelou, M. T. Nielsen, G. J. Wagner** (1992): Computer-simulated evaluation of possible mechanisms for sequestering ion activity in plant vacuoles. II. Zinc. *Plant Physiol.* 99: 621-626.
- Wehmeyer, N., E. Vierling** (2000): The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiol.* 122: 1099-1108.
- Westermeyer, R.** (1997): *Electrophoresis in practice*. VCH Weinheim.
- White, O., J. A. Eisen, J. F. Heidelberg, E. K. Hickey, J. D- Peterson, R. J. Dodson, D- H. Haft, M. L. Gwinn, W. C. Nelson, D. L. Richardson, K. S. Moffat, W. Pamhile, M. Crosby, M. Shen, J. J. Vamathevan, P. Lam, L. McDonald, T. Utterback, C. Zalewski, K. S. Makarova, L. Aravind, M. J. Daly, K. W. Minton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, K. E. Nelson, S. Salzberg, H. O. Smith, J. C. Venter, C. M. Fraser** (1999): Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* 286: 1571-1577.

- Williams, L. E., J. K. Pittman, J. L. Hall** (2000): Emerging mechanism for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 104-126.
- Wollgiehn, R., D. Neumann** (1999): Metal stress response and tolerance of cultured cells from *Silene vulgaris* and *Lycopersicon peruvianum*: role of heat stress proteins. *J. Plant Physiol.* 154: 547-553.
- Woste, K. E., J. J. Kieber** (2000): A strong loss-of-function mutation in RAN1 results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. *Plant Cell* 12: 443-455.
- Yang, C.-Y., Y. Len, J.-F. Shaw** (2000): Cloning and characterization of a cDNA encoding a MT1 type metallothionein from broccoli florets. *Plant Physiol.* 122: 1457.
- Yruela, I., M. Alfonso, I. O. Ortiz de Zarate, G. Montoya, R. Picorel** (1993): Precise location of the Cu(II)-inhibitory binding site in higher plant and bacterial photosynthetic reaction centers as probed by light-induced absorption changes. *J. Biol. Chem.* 268: 1684-1689.
- Zenk, M. H.** (1996): Heavy metal detoxification in higher plant - a review. *Gene* 179: 21-30.
- Zhou, J., P. B. Goldsbrough** (1994): Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6: 875-884.
- Zhu, Y. L., H. Pilon-Smits, A. S. Tarun, S. U. Weber, L. Jouanin, N. Terry** (1999): Cadmium tolerance and accumulation in indian mustard is enhanced by overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol.* 121: 1169-1177.

7. Anhang

Tab. 1: Auszug aus dem Wassergütebericht der Helbe 2001, Standort Ebeleben. Thüringer Landesanstalt für Umwelt.

Parameter	Messwert	Parameter	Messwert
pH	7,24	HCO ₃	320 mg/ml
Leitfähigkeit	664 µS/cm	NO ₃	3,8 mg/ml
O ₂ sofort	10,1 mg/l	NH ₄	0,02 mg/ml
Karbonathärte	17° dH	BSB5	2,0 mg/ml
Ca	106 mg/l*		

* Messwert von 2000

Tab. 2: Genty-Parameter (F_V/F_M) in Kontrollen von *Fontinalis antipyretica* sowie unter Cu(II)-, Cd(II)-, Pb(II)- und Zn(II)-Belastung mit je 25 µM, 50 µM und 100 µM über einen Zeitraum von einem Tag bis sieben Tage; n = 5. Signifikanz: ungepaarter t-Test. * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,005.

Probe	F_V/F_M	Prozent [%]	Probe	F_V/F_M	Prozent [%]
K 1 d	0,72	100,00	50 µM Cu(II), 1 d	0,64	89,44***
K 2 d	0,72	100,00	50 µM Cu(II), 2 d	0,43	59,72***
K 3 d	0,73	100,00	50 µM Cu(II), 3 d	0,54	73,42***
K 4 d	0,74	100,00	50 µM Cu(II), 4 d	0,55	73,78***
K 5 d	0,73	100,00	50 µM Cu(II), 5 d	0,60	81,64***
K 6 d	0,74	100,00	50 µM Cu(II), 6 d	0,56	75,68***
K 7 d	0,75	100,00	50 µM Cu(II), 7 d	0,55	72,80***
25 µM Cu(II), 1 d	0,69	95,03*	100 µM Cu(II), 1 d	0,67	93,06*
25 µM Cu(II), 2 d	0,72	99,44	100 µM Cu(II), 2 d	0,43	59,72***
25 µM Cu(II), 3 d	0,57	77,75***	100 µM Cu(II), 3 d	0,45	61,37***
25 µM Cu(II), 4 d	0,59	80,27*	100 µM Cu(II), 4 d	0,40	53,78***
25 µM Cu(II), 5 d	0,63	85,75***	100 µM Cu(II), 5 d	0,51	69,86***
25 µM Cu(II), 6 d	0,63	84,59***	100 µM Cu(II), 6 d	0,45	61,08***
25 µM Cu(II), 7 d	0,54	71,73***	100 µM Cu(II), 7 d	0,39	51,47***

Probe	F_V/F_M	Prozent [%]	Probe	F_V/F_M	Prozent [%]
25 μM Cd(II), 1 d	0,66	92,22	50 μM Pb(II), 7 d	0,74	98,67
25 μM Cd(II), 2 d	0,72	99,44	100 μM Pb(II), 1 d	0,73	100,83
25 μM Cd(II), 3 d	0,69	94,52	100 μM Pb(II), 2 d	0,74	102,78
25 μM Cd(II), 4 d	0,63	85,14***	100 μM Pb(II), 3 d	0,73	100,55
25 μM Cd(II), 5 d	0,57	78,63***	100 μM Pb(II), 4 d	0,73	98,92
25 μM Cd(II), 6 d	0,62	80,78***	100 μM Pb(II), 5 d	0,74	100,82
25 μM Cd(II), 7 d	0,54	71,73***	100 μM Pb(II), 6 d	0,75	100,81
50 μM Cd(II), 1 d	0,72	99,72	100 μM Pb(II), 7 d	0,74	98,93
50 μM Cd(II), 2 d	0,68	94,72	25 μM Zn(II), 1 d	0,73	101,67
50 μM Cd(II), 3 d	0,64	87,12**	25 μM Zn(II), 2 d	0,75	104,17
50 μM Cd(II), 4 d	0,55	74,32**	25 μM Zn(II), 3 d	0,76	103,56*
50 μM Cd(II), 5 d	0,54	73,42***	25 μM Zn(II), 4 d	0,74	100,27
50 μM Cd(II), 6 d	0,50	67,84***	25 μM Zn(II), 5 d	0,75	102,74
50 μM Cd(II), 7 d	0,52	69,33***	25 μM Zn(II), 6 d	0,74	100,00
100 μM Cd(II), 1 d	0,69	95,28**	25 μM Zn(II), 7 d	0,75	100,27
100 μM Cd(II), 2 d	0,64	88,89**	50 μM Zn(II), 1 d	0,72	99,72
100 μM Cd(II), 3 d	0,63	86,85***	50 μM Zn(II), 2 d	0,74	103,33
100 μM Cd(II), 4 d	0,49	66,76**	50 μM Zn(II), 3 d	0,74	101,37
100 μM Cd(II), 5 d	0,49	67,67***	50 μM Zn(II), 4 d	0,73	99,19
100 μM Cd(II), 6 d	0,53	71,08***	50 μM Zn(II), 5 d	0,76	103,56*
100 μM Cd(II), 7 d	0,56	60,80***	50 μM Zn(II), 6 d	0,74	100,27
25 μM Pb(II), 1 d	0,68	94,44	50 μM Zn(II), 7 d	0,75	100,53
25 μM Pb(II), 2 d	0,74	102,78	100 μM Zn(II), 1 d	0,75	104,17*
25 μM Pb(II), 3 d	0,75	102,47	100 μM Zn(II), 2 d	0,74	103,06
25 μM Pb(II), 4 d	0,74	99,46	100 μM Zn(II), 3 d	0,72	98,90
25 μM Pb(II), 5 d	0,72	98,90	100 μM Zn(II), 4 d	0,75	101,08
25 μM Pb(II), 6 d	0,75	101,62	100 μM Zn(II), 5 d	0,74	101,64
25 μM Pb(II), 7 d	0,75	99,73	100 μM Zn(II), 6 d	0,75	101,08
50 μM Pb(II), 1 d	0,72	99,72	100 μM Zn(II), 7 d	0,74	98,67
50 μM Pb(II), 2 d	0,74	102,22			
50 μM Pb(II), 3 d	0,74	101,92			
50 μM Pb(II), 4 d	0,75	101,08			
50 μM Pb(II), 5 d	0,74	101,10			
50 μM Pb(II), 6 d	0,76	102,16			

Tab. 3: Intrazelluläre Schwermetallaufnahme von *Fontinalis antipyretica* nach Belastung mit CuCl₂, CdCl₂, PbCl₂ und ZnCl₂ in den Konzentrationen 25 µM, 50 µM und 100 µM über einen Tag bis sieben Tage. Me(II)-Gehalte in [µmol/g TM] bzw. Prozent [%] des verfügbaren Me(II). AAS-Analyse; n = 3. Signifikanz: ungepaarter t-Test. * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,005.

Probe	Me(II) [µmol/g TM]	Prozent [%]	Probe	Me(II) [µmol/g TM]	Prozent [%]
25 µM Cu(II), 1 d	0,09	1,83***	25 µM Pb(II), 1 d	0,10	1,92***
25 µM Cu(II), 3 d	0,09	1,72	25 µM Pb(II), 3 d	0,11	2,17**
25 µM Cu(II), 5 d	0,11	2,24	25 µM Pb(II), 5 d	0,11	2,23
25 µM Cu(II), 7 d	0,11	2,25	25 µM Pb(II), 7 d	0,12	2,34*
50 µM Cu(II), 1 d	0,13	2,54***	50 µM Pb(II), 1 d	0,12	1,20***
50 µM Cu(II), 3 d	0,17	3,34***	50 µM Pb(II), 3 d	0,18	1,79***
50 µM Cu(II), 5 d	0,19	3,71**	50 µM Pb(II), 5 d	0,20	2,04***
50 µM Cu(II), 7 d	0,20	3,93	50 µM Pb(II), 7 d	0,20	1,96
100 µM Cu(II), 1 d	0,23	4,57***	100 µM Pb(II), 1 d	0,23	1,13***
100 µM Cu(II), 3 d	0,32	6,34***	100 µM Pb(II), 3 d	0,32	1,58***
100 µM Cu(II), 5 d	0,36	7,25***	100 µM Pb(II), 5 d	0,31	1,55
100 µM Cu(II), 7 d	0,40	7,90***	100 µM Pb(II), 7 d	0,33	1,64
25 µM Cd(II), 1 d	0,05	0,98***	25 µM Zn(II), 1 d	0,04	0,80***
25 µM Cd(II), 3 d	0,06	1,20***	25 µM Zn(II), 3 d	0,06	1,13***
25 µM Cd(II), 5 d	0,06	1,24	25 µM Zn(II), 5 d	0,06	1,19
25 µM Cd(II), 7 d	0,06	1,25*	25 µM Zn(II), 7 d	0,07	1,40***
50 µM Cd(II), 1 d	0,07	0,67***	50 µM Zn(II), 1 d	0,06	0,58***
50 µM Cd(II), 3 d	0,08	0,81***	50 µM Zn(II), 3 d	0,08	0,79***
50 µM Cd(II), 5 d	0,08	0,78***	50 µM Zn(II), 5 d	0,09	0,86*
50 µM Cd(II), 7 d	0,10	1,01***	50 µM Zn(II), 7 d	0,10	0,99
100 µM Cd(II), 1 d	0,10	0,50***	100 µM Zn(II), 1 d	0,11	0,53***
100 µM Cd(II), 3 d	0,13	0,63***	100 µM Zn(II), 3 d	0,16	0,79***
100 µM Cd(II), 5 d	0,12	0,59*	100 µM Zn(II), 5 d	0,18	0,90***
100 µM Cd(II), 7 d	0,14	0,72***	100 µM Zn(II), 7 d	0,19	0,97***

Tab. 4: Immunreaktion des anti-Peptid-Antikörpers Metallothionein p2 (1:50.000) mit Proteinen aus *Fontinalis antipyretica*. Detektion mittels Peroxidase gekoppeltem tertiärem AK und ECL-Reagenz (SuperSignal West Dura; PIERCE). Densitometrische Auswertung mit der BASYS-Software von Biotec Fischer.

Probe	Signalintensität [%]	Probe	Signalintensität [%]
K 4 h	100,0	50 µM Pb(II), 1 d	84,1
50 µM Cu(II), 4 h	73,2	50 µM Zn(II), 1 d	16,7
50 µM Cd(II), 4 h	111,0	K 3 d	100,0
50 µM Pb(II), 4 h	65,3	50 µM Cu(II), 3 d	23,5
50 µM Zn(II), 4 h	59,9	50 µM Cd(II), 3 d	17,8
K 1 d	100,0	50 µM Pb(II), 3 d	44,5
50 µM Cu(II), 1 d	47,2	50 µM Zn(II), 3 d	22,8
50 µM Cd(II), 1 d	30,1		

Tab. 5: Immunreaktion des anti-HSP 70-Antikörpers (1:5.000) mit Proteinen aus *Fontinalis antipyretica*. Detektion mittels Peroxidase gekoppeltem tertiärem AK und ECL-Reagenz (SuperSignal West Dura; PIERCE). Densitometrische Auswertung mit der BASYS-Software von Biotec Fischer.

Probe	Signalintensität [%]	Probe	Signalintensität [%]
K 4 h	100,0	50 µM Cd(II), 3 d	154,4
50 µM Cu(II), 4 h	2571,0	50 µM Pb(II), 3 d	134,1
50 µM Cd(II), 4 h	4849,0	50 µM Zn(II), 3 d	138,5
50 µM Pb(II), 4 h	-	K 10 °C, 4 h	100,0
50 µM Zn(II), 4 h	-	K 20 °C, 4 h	721,0
K 1 d	100,0	K 30 °C, 4 h	997,0
50 µM Cu(II), 1 d	228,0	K 10 °C, 1 d	100,0
50 µM Cd(II), 1 d	702,2	K 20 °C, 1 d	2050,0
50 µM Pb(II), 1 d	431,1	K 30 °C, 1 d	3192,0
50 µM Zn(II), 1 d	320,2	K 10 °C, 3 d	100,0
K 3 d	100,0	K 20 °C, 3 d	1164,0
50 µM Cu(II), 3 d	113,7	K 30 °C, 3 d	2543,0

Tab. 6: Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC). Proteingehalt der Eluate.

Probe	Proteingehalt der Auftragslösung [mg]	Proteingehalt der Elutionsfraktion [μ g]	Proteingehalt der Elutionsfraktion [%]
K 3 d	43,11	72,41	0,17
K 3 d	47,61	61,88	0,13
K 3 d	82,31	90,53	0,11
50 μ M Cu(II), 3 d	53,61	64,32	0,12
50 μ M Cu(II), 3 d	88,21	85,17	0,20
50 μ M Cu(II), 3 d	14,21	18,46	0,13

Tab. 7: Kovalente Affinitätschromatographie. Proteingehalt der Eluate.

Probe	Proteingehalt der Auftragslösung [mg]	Proteingehalt der Elutionsfraktion [μ g]	Proteingehalt der Elutionsfraktion [%]
K 3 d	42,60	10,61	0,02
K 3 d	48,50	5,51	0,01
K 3 d	52,30	11,61	0,02
50 μ M Cu(II), 3 d	83,80	13,21	0,02
50 μ M Cu(II), 3 d	306,00	38,91	0,01
50 μ M Cu(II), 3 d	122,41	16,81	0,01

Tab. 8: Prozentuale Änderung ausgewählter, freier Aminosäuren unter Kupfereinfluss. Analyse mittels Aminosäure-Analyser.

AS	Prozent [%]	Prozent [%]	Prozent [%]	Prozent [%]
	K 4 h	50 μ M Cu(II), 4 h	K 3 d	50 μ M Cu(II), 3 d
Thr	100,00	46,25	100,00	31,71
Pro	100,00	26,05	100,00	19,76
Gly	100,00	29,10	100,00	23,92
His	100,00	35,58	100,00	17,39
Leu	100,00	7,93	100,00	14,84

Tab. 9: Gesamtkonzentration der in allen Proben mittels GC-C-IRMS-Analyse bestimmbarer, freier Aminosäuren unter Kupfereinfluss; 2 x n = 3; (K 3 d: 2 x n = 2). Signifikanz: ungepaarter t-Test. * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,005.

AS	Konz. [$\mu\text{mol/g FM}$]	Konz. [$\mu\text{mol/g FM}$]	Konz. [$\mu\text{mol/g FM}$]	Konz. [$\mu\text{mol/g FM}$]
	K 4 h	50 $\mu\text{M Cu(II)}$, 4 h	K 3 d	50 $\mu\text{M Cu(II)}$, 3 d
Ala	31,53	8,95**	25,69	8,14
Ser/Val	42,41	10,95*	30,94	12,52*
Cys	20,34	29,19	42,97	36,28
Asp	17,76	147,23*	214,40	94,77
Glu	31,30	56,29	27,47	43,42
Phe	58,38	52,45	45,57	38,78
Lys	47,10	19,22	22,31	14,03
Arg	20,17	6,52	6,84	1,59*
Σ	268,97	330,78	416,18	282,04
[%]	100,00	122,98	100,00	67,77

Tab. 10: Konzentration freier Aminosäuren unter Kupfereinfluss. Analyse mittels GC-C-IRMS; 2 x n = 3; (K 3 d: 2 x n = 2); n.b. = nicht bestimmbar. Signifikanz: ungepaarter t-Test. * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,005.

AS	Konz. [$\mu\text{mol/g FM}$]	Prozent [%]	Konz. [$\mu\text{mol/g FM}$]	Prozent [%]
	K 4 h	K 4 h	50 $\mu\text{M Cu(II)}$, 4 h	50 $\mu\text{M Cu(II)}$, 4 h
Ala	0,33	100,00	0,09***	27,58
Gly	0,34	100,00	n.b.	-
Ser+Val	0,36	100,00	0,10***	26,67
Leu+Ile	0,15	100,00	n.b.	-
Cys	0,17	100,00	0,35***	202,94
Pro	0,12	100,00	n.b.	-
Asp	0,72	100,00	0,77	106,94
Glu	0,21	100,00	0,34	161,90
Phe	0,35	100,00	0,57	162,86
Tyr	0,79	100,00	0,34***	43,04
Lys	0,32	100,00	0,12*	37,50

AS	Konz. [$\mu\text{mol/g FM}$]	Prozent [%]	Konz. [$\mu\text{mol/g FM}$]	Prozent [%]
	K 3 d	K 3 d	50 $\mu\text{M Cu(II)}$, 3 d	50 $\mu\text{M Cu(II)}$, 3 d
Arg	0,16	100,00	0,02*	12,50
Ala	0,29	100,00	0,09	31,03
Gly	0,10	100,00	n.b.	-
Ser+Val	0,29	100,00	0,12*	40,00
Leu+Ile	0,46	100,00	n.b.	-
Cys	0,36	100,00	0,27	75,00
Pro	0,20	100,00	0,07*	35,00
Asp	1,61	100,00	0,71	44,10
Glu	0,19	100,00	0,33	173,68
Phe	0,28	100,00	0,12	42,86
Tyr	0,52	100,00	n.b.	-
Lys	0,15	100,00	0,10	66,67
Arg	0,04	100,00	0,01***	25,00

Tab. 11: Konzentrationen der RP-HPLC-Fractionen phenolischer Verbindungen aus *Fontinalis antipyretica* in mM Rutin; n = 3. Signifikanz: ungepaarter t-Test. * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,005.

Peak	Konz. [mM]	Konz. [mM]	Prozent [%]	Konz. [mM]	Konz. [mM]	Prozent [%]
	K 4 h	50 $\mu\text{M Cu(II)}$, 4 h		K 3 d	50 $\mu\text{M Cu(II)}$, 3 d	
1	14,75	7,16	48,56***	49,70	36,90	74,20
2	-	-	-	-	12,20	-
3	-	-	-	3,60	3,40	93,20
4	15,91	5,75	36,16**	4,30	6,20	142,60
5	-	-	-	11,70	11,30	96,70
6	5,35	-	-	3,50	-	-
7	36,05	11,65	32,32*	8,70	10,20	118,38*
8	9,88	4,05	40,98***	-	-	-
9	34,40	34,59	100,56	7,40	13,50	181,50***

Tab. 12: Gesamtphenolgehalt nach Jennings (1981) in *Fontinalis antipyretica*; 2 x n = 3.

Probe	Gesamtphenolgehalt [mg/g FM]
K 4 h	0,28
50 μ M Cu(II), 4 h	0,28
K 3 d	0,34
50 μ M Cu(II), 3 d	0,28

Tab. 13: Spektrale Absorptionsverschiebung von Quercetin nach Cu(II)-Wechselwirkung im Bereich von 200-600 nm. **A:** 25 μ M Quercetin in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH-Wert 7,4; **B:** 25 μ M Quercetin + 50 μ M Cu(II); **C:** 25 μ M Quercetin + 50 μ M Cu(II) + 125 μ M EDTA; n = 3.

	A		B		C	
Standard	Peakposition [nm]	Absorption	Peakposition [nm]	Absorption	Peakposition [nm]	Absorption
Quercetin	371,43	0,11	443,21	0,07	375,61	0,06
	261,14	0,15	269,69	0,24	266,90	0,32

Tab. 14: Spektrale Absorptionsverschiebung phenolischer Extrakte aus *Fontinalis antipyretica* unter Kupfereinfluss im Bereich von 200-600 nm. **A:** RP-HPLC-Fraktionen 1-9 in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH-Wert 7,4; **B:** RP-HPLC-Fraktionen 1-9 + 25 μ M Cu(II); n = 3.

	A		B	
Fraktion	Peakposition [nm]	Absorption	Peakposition [nm]	Absorption
1	290,88	0,05	287,24	0,05
2	281,36	0,05	269,60	0,15
3	280,44	0,04	279,52	0,87
4	291,44	0,04	285,20	0,05
5	279,92	0,06	276,40	0,07
6	288,36	0,03	286,12	0,03
7	279,12	0,02	281,60	0,04
8	280,52	0,02	275,48	0,15
9	286,44	0,04	290,64	0,06

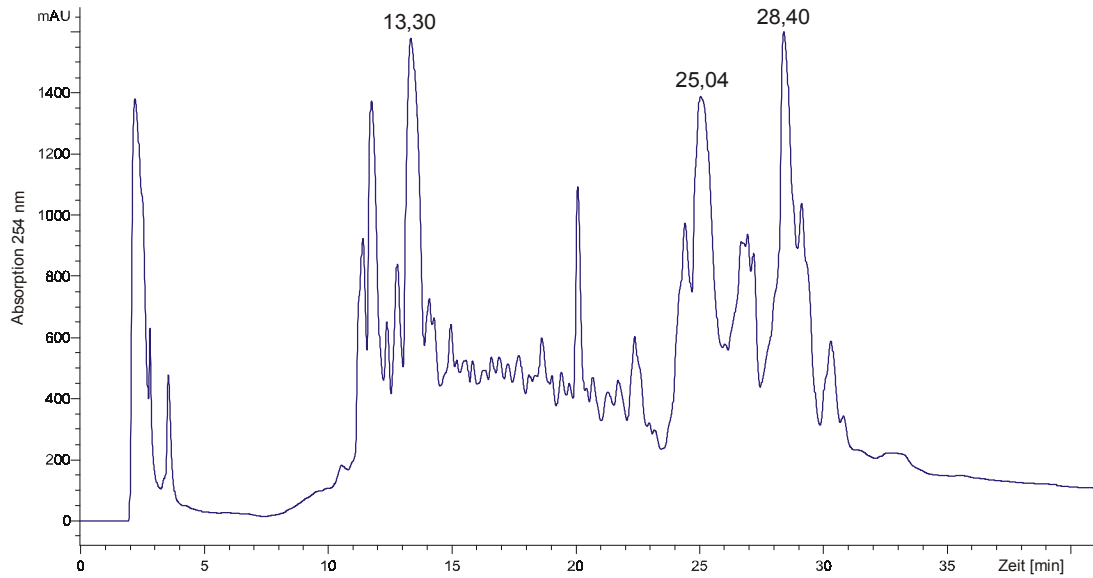


Abb. 1: LC-MS-Analyse von affinitätschromatographisch (IMAC) gereinigtem Protein der Probe K 3 d aus *Fontinalis antipyretica*. Detektierte Molekulargewichte:
 $R_t = 13,30$ min: 4,62 kDa; $R_t = 25,04$ min: 11,54 kDa; $R_t = 28,40$ min: 29,96 kDa.

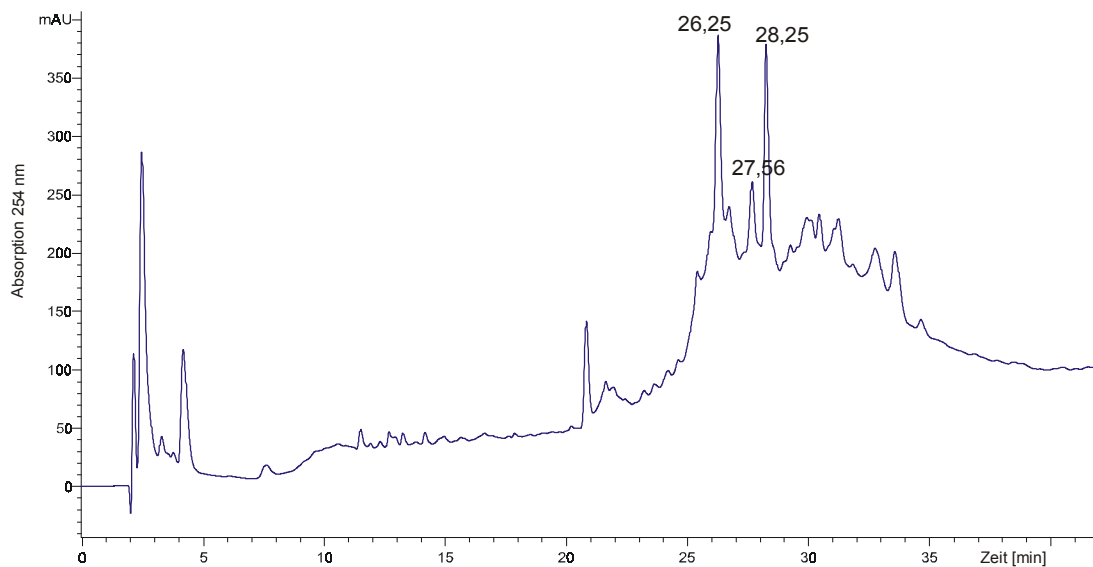


Abb. 2: LC-MS-Analyse von affinitätschromatographisch (kovalent) gereinigtem Protein der Probe K 3 d aus *Fontinalis antipyretica*. Detektierte Molekulargewichte:
 $R_t = 26,25$ min: 31,99 kDa; $R_t = 27,56$ min: 12,71 kDa; $R_t = 28,25$ min: 28,25 kDa.

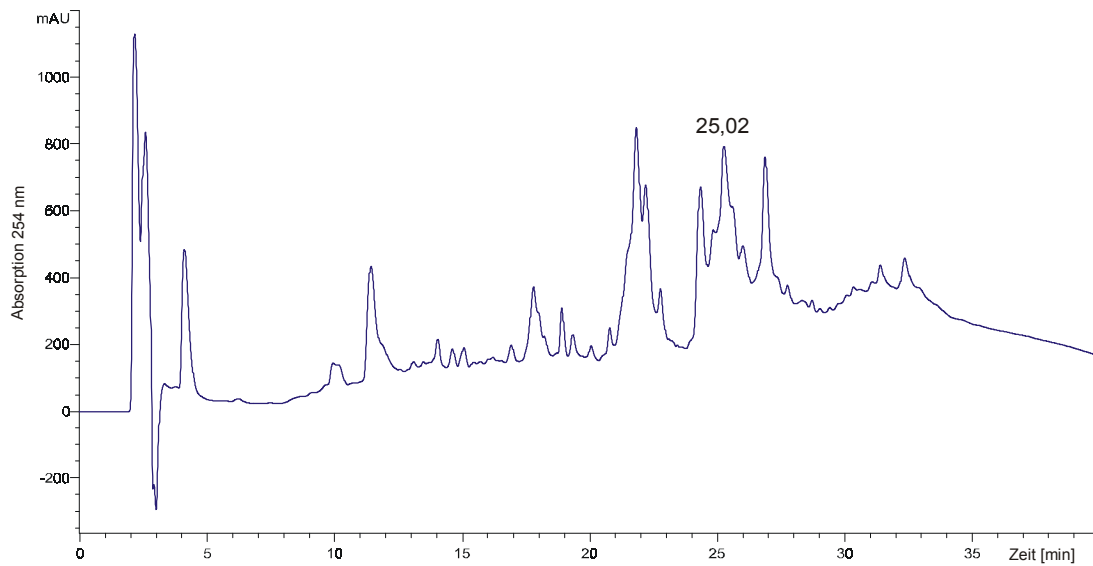


Abb. 3: LC-MS-Analyse von affinitätschromatographisch (kovalent) gereinigtem Protein der Probe 50 μ M Cu(II), 3 d aus *Fontinalis antipyretica*. Detektiertes Molekulargewicht: $R_t = 25,02$ min: 10,88 kDa.

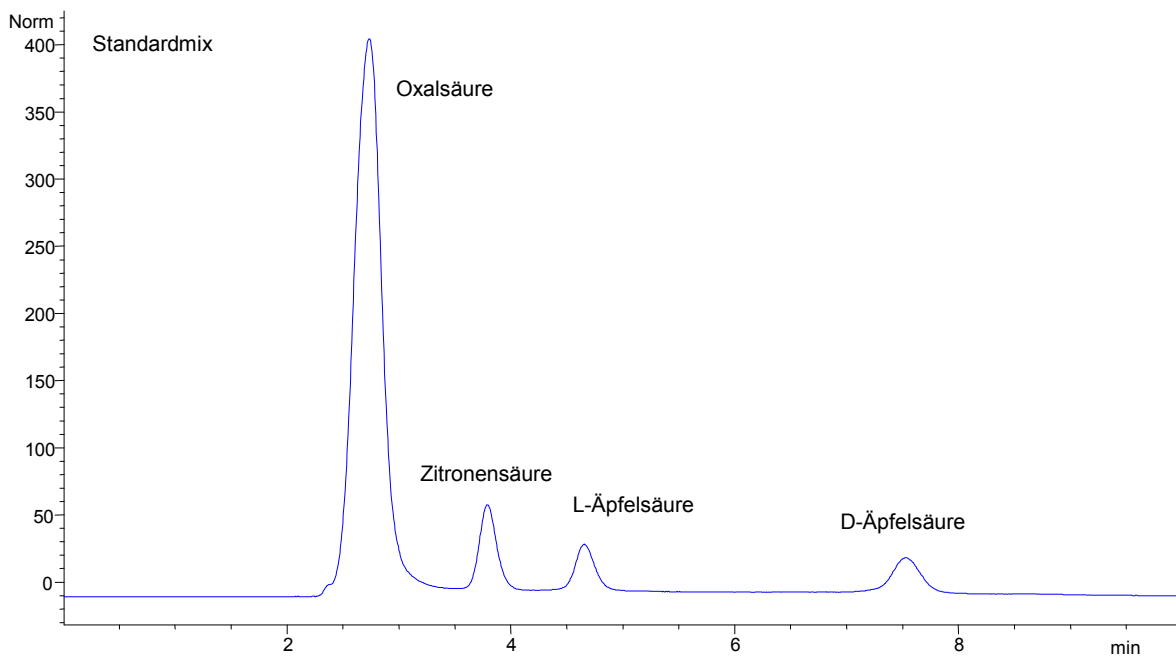


Abb. 4: HPLC-Chromatogramm des Standardmix aus jeweils 200 μ g/ml Oxalsäure, Zitronensäure und L-, D-Äpfelsäure.

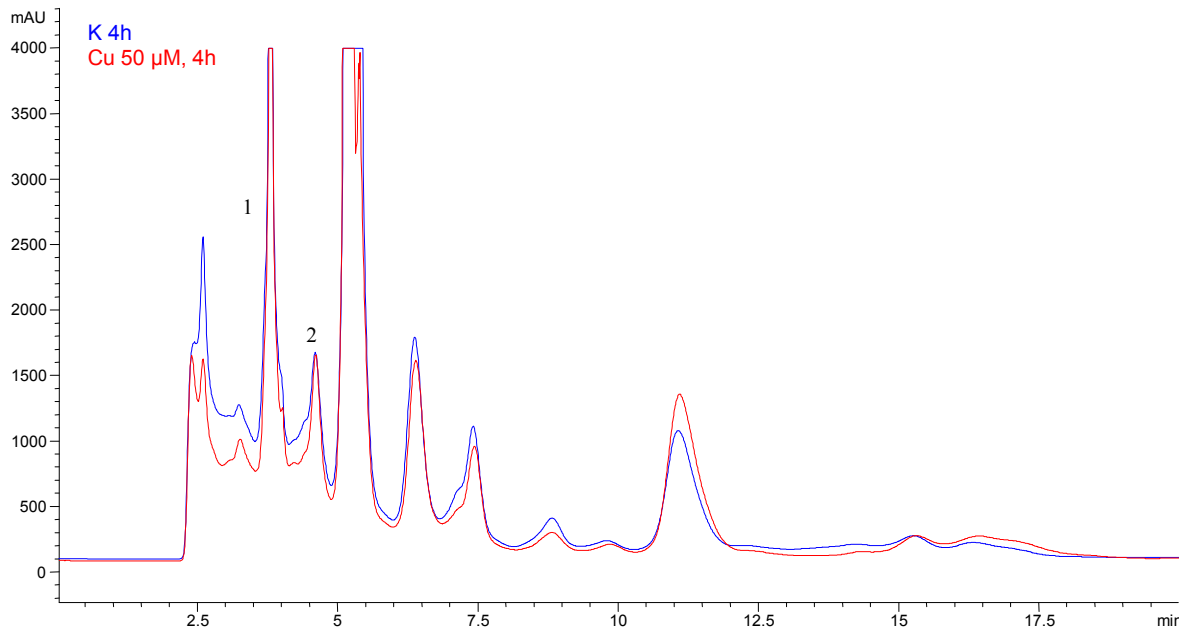


Abb. 5: HPLC-Chromatogramme organischer Säuren aus *Fontinalis antipyretica* (Kurzzeitversuch). Gaschromatographisch identifizierte Fraktion 1: Zitronensäure; Fraktion 2: Äpfelsäure.

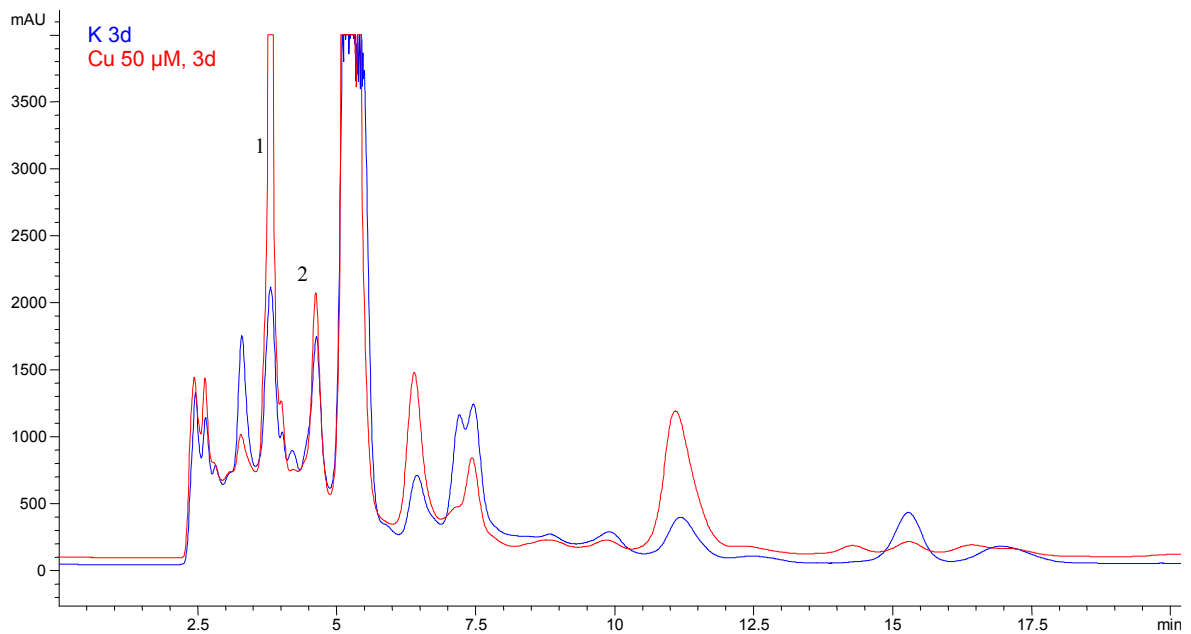


Abb. 6: HPLC-Chromatogramme organischer Säuren aus *Fontinalis antipyretica* (Langzeitversuch). Gaschromatographisch identifizierte Fraktion 1: Zitronensäure; Fraktion 2: Äpfelsäure.

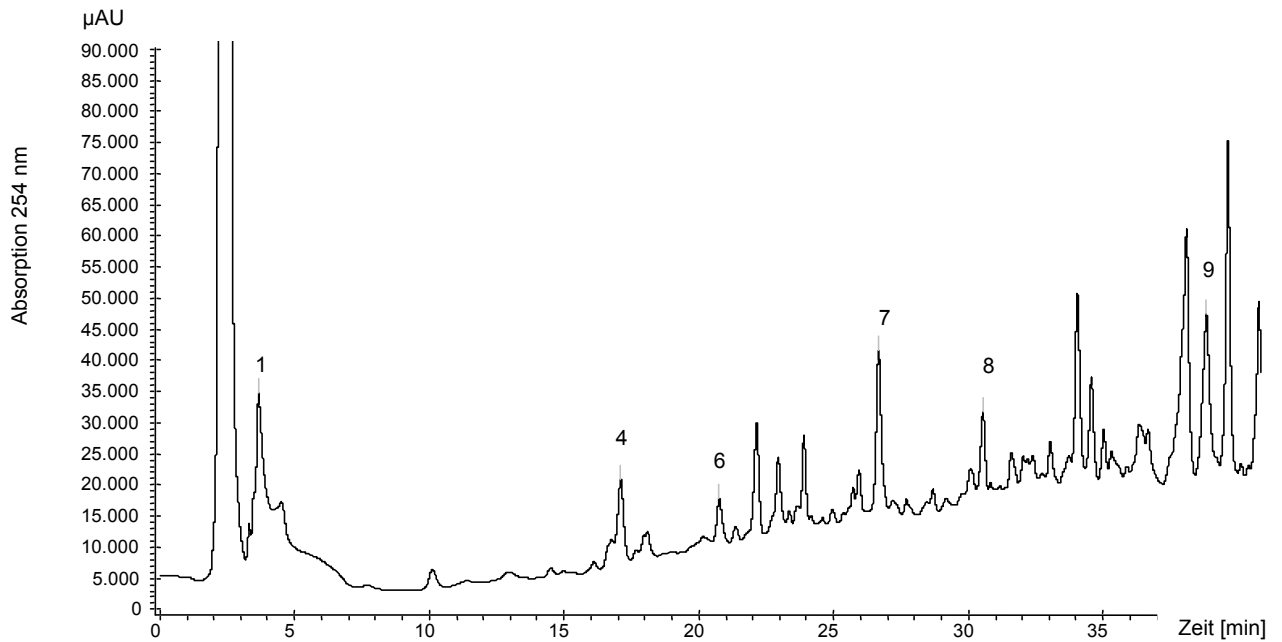


Abb. 7: RP-HPLC-Chromatogramm löslicher, phenolischer Verbindungen der Probe K 4 h aus *Fontinalis antipyretica*. 1: Gallussäure, 4: 4-Hydroxybenzaldehyd, 6: Umbelliferon, 7: Quercetin, 8: α -Methylzimtsäure, 9: 4-Nitrozimtsäureethylester. Die Bezeichnung der Peaks erfolgte entsprechend der HPLC-Standard-Datenbank anhand von Retentionszeitvergleichen.

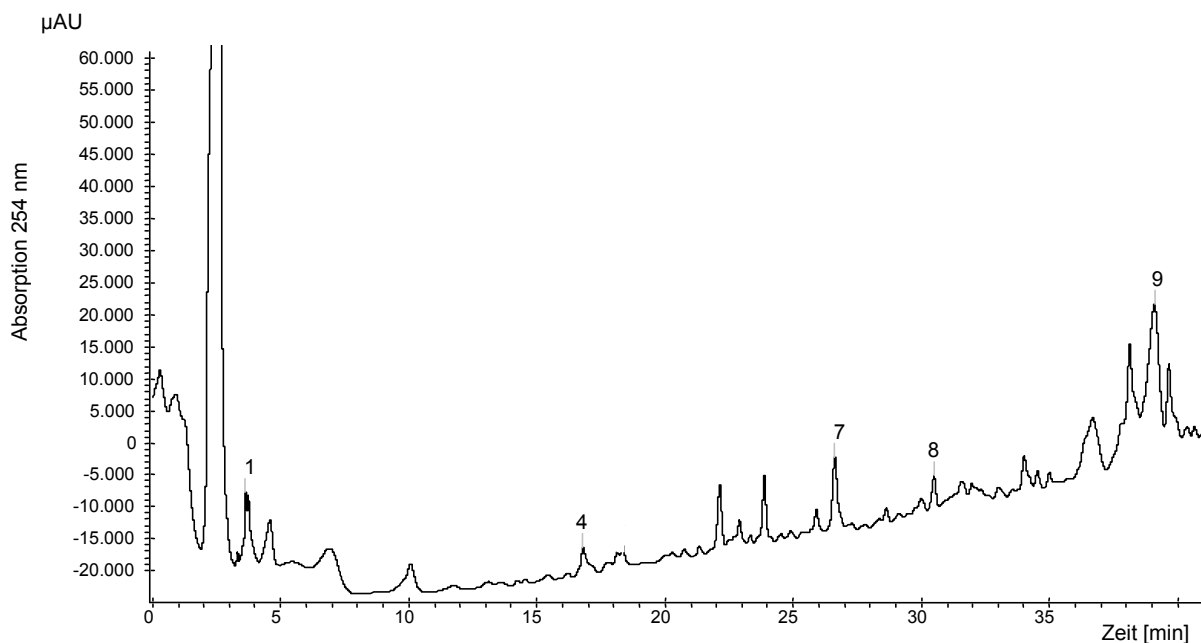


Abb. 8: RP-HPLC-Chromatogramm löslicher, phenolischer Verbindungen der Probe 50 μ M Cu(II), 4 h aus *Fontinalis antipyretica*. 1: Gallussäure, 4: 4-Hydroxybenzaldehyd, 7: Quercetin, 8: α -Methylzimtsäure, 9: 4-Nitrozimtsäureethylester. Die Bezeichnung der Peaks erfolgte entsprechend der HPLC-Standard-Datenbank anhand von Retentionszeitvergleichen.

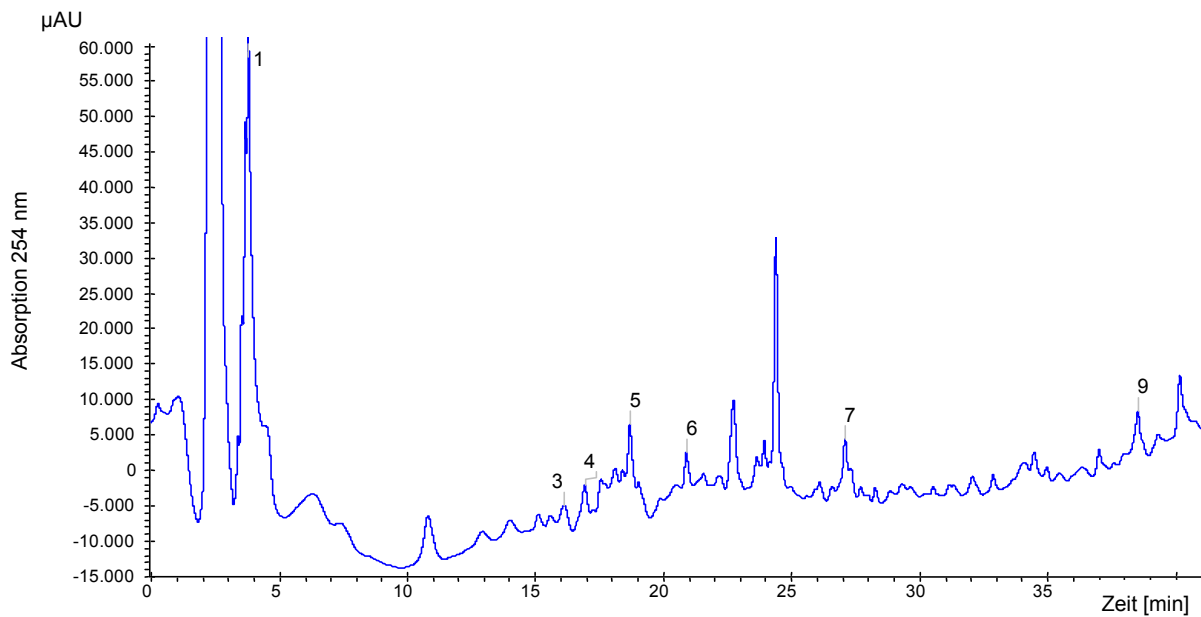


Abb. 9: RP-HPLC-Chromatogramm löslicher, phenolischer Verbindungen der Probe K 3 d aus *Fontinalis antipyretica*. 1: Gallussäure, 3: Vanillinsäure, 4: 4-Hydroxybenzaldehyd, 5: Myrecetin-3-glucorhamnosid, 6: Umbelliferon, 7: Quercetin, 9: 4-Nitrozimtsäureethylester. Die Bezeichnung der Peaks erfolgte entsprechend der HPLC-Standard-Datenbank anhand von Retentionszeitvergleichen.

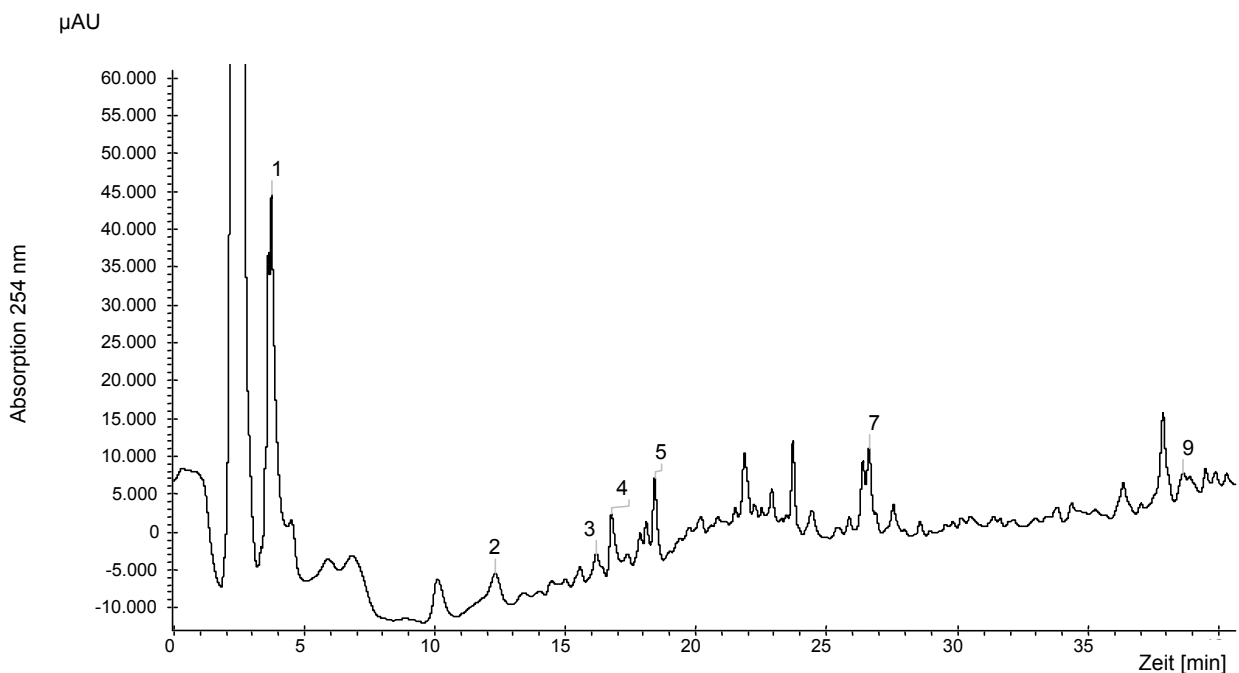


Abb. 10: RP-HPLC-Chromatogramm löslicher, phenolischer Verbindungen der Probe 50 µM Cu(II), 3 d aus *Fontinalis antipyretica*. 1: Gallussäure, 2: 3,4-Dihydroxybenzoesäure, 3: Vanillinsäure, 4: 4-Hydroxybenzaldehyd, 5: Myrecetin-3-glucorhamnosid, 7: Quercetin, 9: 4-Nitrozimtsäureethylester. Die Bezeichnung der Peaks erfolgte entsprechend der HPLC-Standard-Datenbank anhand von Retentionszeitvergleichen.

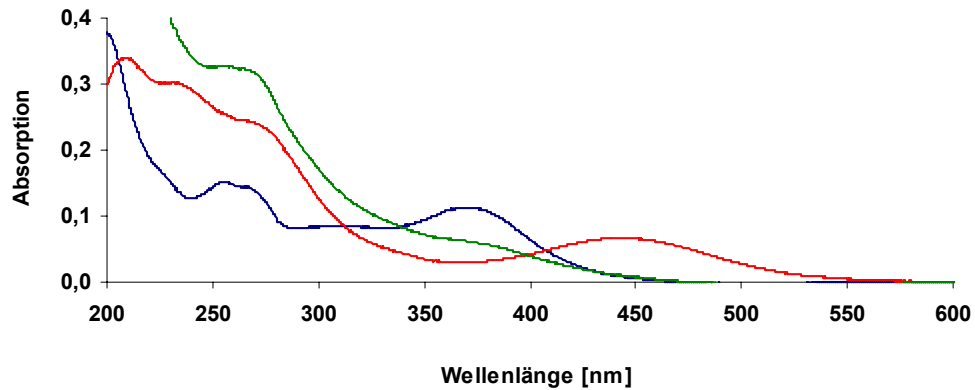


Abb. 11: Absorptionsspektren im Bereich 200-600 nm von 25 μM Quercetin in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH-Wert 7,4. Blau: Quercetin; rot: Quercetin + 50 μM Cu(II); grün: Quercetin + 50 μM Cu(II) + 125 μM EDTA.

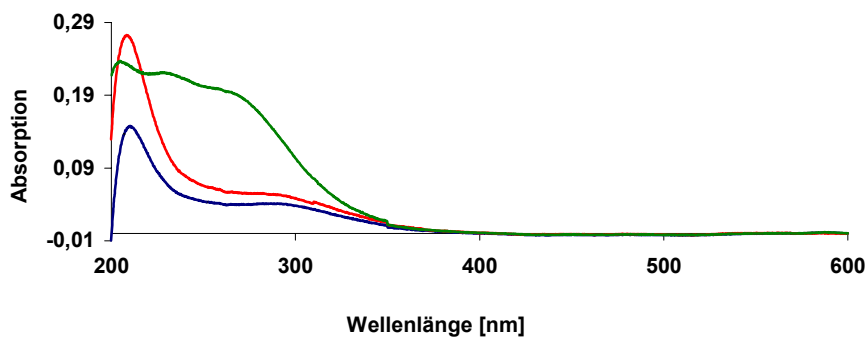


Abb. 12: Typische Absorptionsspektren einer phenolischen RP-HPLC-Fraktion (4) aus *Fontinalis antipyretica* im Bereich 200-600 nm in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH-Wert 7,4. Blau: Fraktion 4; rot: Fraktion 4 + 50 μM Cu(II); grün: Fraktion 4 + 25 μM Cu(II) + 50 μM EDTA.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt all jenen, die durch ihre Unterstützung die Anfertigung dieser Arbeit ermöglichten.

Herrn Prof. Dr. G.-J. Krauß danke ich für die Überlassung des Themas im Rahmen des Graduiertenkollegs "Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe" sowie für die Diskussionsbereitschaft und die finanzielle Unterstützung.

Mein Dank gilt Herrn Dr. habil. J. Miersch für die Betreuung, das stete Interesse am Gelingen der Arbeit und die fachlichen Ratschläge.

Herrn Dr. habil. D. Neumann möchte ich für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Analysen, für die kooperative Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft danken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. habil. K. Humbeck und Frau Dr. I. Miersch für die freundliche Unterstützung bei den Vitalitätsmessungen und den molekularbiologischen Arbeiten.

Frau Dr. A. Schierhorn, Herrn Dr. K. P. Rücknagel und Herrn Dr. Th. Nürnberger danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen sowie der Micro-Sequenzierungen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. habil. K. Jung und Frau E. Schmidt sowie Herrn Dr. M. Fuchs für die Durchführung der Aminosäure-Analysen.

Bei Frau Dr. A. Kraus und Herrn Dr. J. Schmidt möchte ich mich für die massenspektrometrische Analyse der organischen Säuren bzw. der phenolischen Verbindungen bedanken.

Danken möchte ich Herrn Dr. E. Weber für die Herstellung des anti-Peptid-Ak MT p2, der Arbeitsgruppe Dr. habil. G. Küllertz für die Bereitstellung des anti-Peptid-Ak Cyp 18, Herrn Dr. H. Schäfer für die Überlassung des MT p2-18-Inserts sowie Ch. Vess und O. Lubaretz

für die zur Verfügung gestellten *Arabidopsis*-mRNA-Proben bzw. für die *Nicotiana*-Proteine.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. J.-U. Rahfeld für die hilfreichen Diskussionen, Anregungen und die Unterstützung.

Mein Dank geht auch an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Ökologische und Pflanzen-Biochemie, insbesondere an Frau Dr. S. Menge, Herrn Dr. H. Tintemann, Frau R. Baumbach, Frau M. Dübler, Frau I. Thielemann und Frau E. Püschel, die mir mit fachlichen Ratschlägen aber auch mit aufmunternden Worten zur Seite standen.

Ein Dankeschön für die großen und kleinen Hilfen: Clarice de Figueiredo, Sylvia Krüger, Thomas Lehmann, Andreas Anton und Thomas Pribyl, Barbara Thiemer, Jan Heise und Olaf Barth.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Eilenburg, 19.06.2002

Steffi Rau

Lebenslauf

Name: Steffi Rau
geboren: am 22. November 1971 in Eilenburg
Familienstand: ledig

Schulbildung

1978 - 1988 Realschule Eilenburg/Sachsen
1988 - 1991 Gymnasium Coswig/Sachsen
1991 Abitur

Berufsausbildung

1988 - 1991 Landwirtschaftliche Produktionsgenossenschaft Radebeul/
Sachsen
1991 Abschluss Facharbeiter Gärtner Gemüse-/Zierpflanzen-
produktion

Hochschulbildung

1991 - 1997 Studium der Biologie an der Universität Leipzig,
Fachrichtung Pflanzenphysiologie/Botanik/Ökologie
1997 Abschluss Diplom Biologin
1997 – 2002 Promotionsstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg
1997 - 2001 Mitarbeit im DFG-Graduiertenkolleg "Adaptive physiologisch-
biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante
Wirkstoffe" zur Anfertigung einer Dissertation am
Fachbereich Biochemie/Biotechnologie, Institut für
Biochemie, in der Abteilung Ökologische und Pflanzen-
Biochemie (Betreuer: PD Dr. habil J. Miersch)
ab Juli 2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Max-Planck-
Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung
Halle/Saale

Eilenburg, 19.06.2002

Steffi Rau