

Untersuchungen zu einem Metallothionein aus dem aquatischen Hyphomyceten *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I -

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Diplom-Biologin Diana Meißner (geb. Steiner)

geb. am 26.08.1977 in Halle (Saale)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Gerd-Joachim Krauß
2. Prof. Dr. Werner Roos
3. Prof. Dr. Klaus Albert

Halle (Saale), 17.06.2010

I. INHALTSVERZEICHNIS

I. Inhaltsverzeichnis	1
II. Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einleitung	5
1.1. Aquatische Hyphomyceten	5
1.2. Schwermetalle	8
1.3. Schwermetallstress	9
1.4. Metallothioneine.....	12
1.5. Strukturbestimmung von Proteinen.....	15
2. Ziele der Arbeit.....	21
3. Material und Methoden	22
3.1. Kultivierung von <i>Heliscus lugdunensis</i>	23
3.2. Bakterien- und Hefestämme.....	25
3.2.1. Mikroorganismen und Plasmide.....	25
3.2.2. Anzucht und Stammhaltung von <i>Escherichia coli</i>	26
3.2.3. Anzucht und Stammhaltung von <i>Kluyveromyces lactis</i> GG799	26
3.3. Physiologische Untersuchungen	27
3.3.1. Probenahme und Wachstumsuntersuchungen.....	27
3.3.2. Vitalitätsbestimmung	27
3.3.3. Proteinbestimmung.....	28
3.4. Biochemische Untersuchungen	28
3.4.1. Synthetisches Metallothionein MT1_NECLU	28
3.4.2. Sulfatgehalte.....	29
3.4.3. Sulfidgehalte.....	30
3.4.4. Kleine Thiol-haltige Verbindungen	31
3.4.5. Phytochelatine und Metallothioneine.....	32
3.4.6. Massenspektrometrie.....	33
3.5. Molekularbiologische Untersuchungen.....	35
3.5.1. Gelelektrophorese.....	35
3.5.2. DNA-Isolierung.....	38
3.5.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen.....	38
3.5.4. Polymerasekettenreaktion	38
3.5.5. Restriktion	41
3.5.6. Ligation	41
3.5.7. Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> und Transformation	41
3.5.8. DNA-Sequenzierung	42
3.5.9. Isolierung von RNA	43
3.5.10. Northern-Hybridisierung.....	43
3.6. Proteinexpression	47
3.6.1. Proteinexpression in <i>Escherichia coli</i> BL21	47
3.6.2. Proteinexpression in <i>Kluyveromyces lactis</i> GG799	48
3.7. Strukturuntersuchungen	49

3.7.1.	Homologiemodellierung.....	49
3.7.2.	Fern-UV-Circulardichroismus	50
3.7.3.	Untersuchungen mittels 400 MHz-NMR-Spektroskopie.....	51
3.7.4.	Untersuchungen mittels <i>microcoil</i> 600 MHz-NMR-Spektroskopie.....	52
3.7.5.	Untersuchungen mittels <i>online</i> -Kapillar-HPLC-NMR	53
4.	Ergebnisse	56
4.1.	Physiologische Untersuchungen	56
4.1.1.	Wachstum auf Oberflächenkultur	56
4.1.2.	Wachstum in Flüssigkultur.....	57
4.1.3.	Vitalität.....	60
4.2.	Biochemische Untersuchungen	61
4.2.1.	Proteinexpression	61
4.2.2.	Sulfatbestimmung.....	63
4.2.3.	Sulfidbestimmung	65
4.2.4.	Kleine Thiol-haltige Verbindungen	66
4.2.5.	Phytochelatin 2 und Metallothioneine.....	71
4.2.6.	Massenspektrometrische Untersuchungen	74
4.3.	Molekularbiologische Untersuchungen.....	77
4.3.1.	Analyse des Gens <i>mt2_neclu</i> in <i>Heliscus lugdunensis</i>	77
4.3.2.	Analyse der regulatorischen Genregion	77
4.3.3.	Quantifizierung <i>mt2_neclu</i> -Genprodukts	78
4.4.	Strukturuntersuchungen des MT1_NECLU.....	81
4.4.1.	Modell des Metallothioneins MT1_NECLU.....	81
4.4.2.	Strukturanalyse mittels Fern-UV-Circulardichroismus	83
4.4.3.	Strukturbestimmung mittels 400 MHz-NMR-Spektroskopie	84
4.4.4.	Strukturbestimmung mittels <i>microcoil</i> 600 MHz-NMR-Spektroskopie.....	90
4.4.5.	Strukturanalyse des nativen Proteins MT2_NECLU mittels <i>online</i> -Kapillar-HPLC-NMR	95
5.	Diskussion	96
5.1.	Physiologisch-biochemische Untersuchungen.....	96
5.1.1.	Wachstum von <i>Heliscus lugdunensis</i> unter Schwermetallstress.....	96
5.1.2.	Schwefelhaushalt.....	98
5.1.3.	Induktion Thiol-haltiger Aminosäuren und Peptide.....	100
5.1.4.	Induktion Thiol-haltiger Proteine.....	104
5.2.	Molekularbiologische Untersuchungen.....	108
5.3.	Bestimmung der Struktur des synthetischen MT1_NECLU.....	110
5.3.1.	Strukturanalyse des MT1_NECLU mittels Homologiemodellierung.....	111
5.3.2.	Strukturbestimmung mittels Fern-UV-Circulardichroismus-Spektroskopie ..	115
5.3.3.	Strukturanalyse mittels NMR-Spektroskopie.....	117
5.4.	Strukturanalyse des nativen MT2_NECLU	123
6.	Zusammenfassung und Ausblick	124
7.	Literatur	126
8.	Anhang	140

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AQH	Aquatische(r) Hyphomycet(en)
bp	Basenpaar(e)
CD	Circulardichroismus-Spektroskopie
CE	<i>capillary electrophoresis</i> (Kapillarelektrophorese)
CHES	N-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure
ddUTP	Didesoxyuridin-5-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat, Na ⁺ -Salz
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
EtOH	Ethanol
FM	Frischmasse
FM/TM	Verhältnis Frischmasse zu Trockenmasse
GSH/GSSG	Glutathion reduziert/oxidiert
<i>H. lugdunensis</i>	<i>Heliscus lugdunensis</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
M _w	Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
MT	Metallothionein
MW	Mittelwert
n.b.	nicht bestimmt
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>

NEM	N-Ethylmaleimid
ns	nicht signifikant
OD	optische Dichte
PC	Phytochelatin
PCR	Polymerasekettenreaktion
R	Adenin oder Guanin als DNA-Base
RNase	Ribonuklease
RMS	<i>root mean square</i> - Maß für die Abstände zwischen analogen Atomen in zwei Molekülen im Raum
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>scanning electron microscopy</i>
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
STABW	Standardabweichung
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Trockenmasse
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität [$\mu\text{mol}/\text{min}$]
UV	ultraviolett
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
x	beliebige Aminosäure
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-Galactopyranosid

Aminosäuren wurden nach dem internationalen Ein- und Drei-Buchstabencode, Einheiten entsprechend dem SI-System abgekürzt. Die Nukleotidabkürzungen erfolgten nach IUPAC.

1. Einleitung

1.1. Aquatische Hyphomyceten

Das Untersuchungsobjekt dieser Arbeit war der aquatische Hyphomycet *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4, der aus einem stark mit Schwermetallen belasteten Gewässer im Mansfelder Land isoliert wurde (Krauss *et al.*, 2001). Aquatische Hyphomyceten (AQH) sind Pilze von sehr großer phylogenetischer Heterogenität (meist Ascomyceten). Der Pilz *Heliscus lugdunensis* wird nach 18S rDNA-Vergleich wie folgt eingeordnet (Hibbett *et al.*, 2007; Kirk, 2009):

<i>kingdom</i>	Reich:	Fungi
<i>subkingdom</i>	Unterreich:	Dikarya
<i>phylum</i>	Abteilung:	Ascomycota
<i>subphylum</i>	Unterabteilung:	Pezizomycotina
<i>class</i>	Klasse:	Sordariomycetes
<i>subclass</i>	Unterklasse:	Hypocreomycetidae
<i>order</i>	Ordnung:	Hypocreales
<i>family</i>	Familie:	Nectriaceae
<i>genus</i>	Gattung:	<i>Nectria</i> (Fr.) Fr. 1849
<i>species</i>	Art: teleomorph	<i>Nectria lugdunensis</i> J. Webster (1959)
	anamorph	<i>Heliscus lugdunensis</i> Sacc. & Therry (1880)

AQH sind fakultativ aquatisch lebende Pilze, die als Destruenten abgestorbenes, in Gewässer gefallenes Blattmaterial abbauen können (Webster, 1981; Webster & Weber, 2007). Ihre Identifizierung erfolgt meist über die typische Sporen- bzw. Konidienform, die von tetradial (z. B. *Tetracladium*- oder *Clavariopsis*-Species) bis hin zu nelkenförmigen, phialidischen Konidien (z. B. *Heliscus lugdunensis*; Abb. 1-1; Braha *et al.*, 2007) reichen kann. Die Konidienformen mit den typischen Fortsätzen spiegeln das Vorkommen im Wasser und die Funktion als Destruenten wider, da eine Anheftung an Blattmaterial mit Hilfe der Fortsätze gewährleistet wird (Bärlocher, 1992). Die ungeschlechtliche Fortpflanzung über Konidien (anamorph) ist die häufigste Form der Verbreitung der AQH. Oft sind auch die teleomorphen (geschlechtlichen) Formen dieser Pilze bekannt, die aber meist terrestrisch vorkommen. Früher wurden AQH als Indikatoren für sehr sauberes Wasser gewertet. Allerdings konnten

sie sowohl in mit Schwermetallen, als auch in mit Organika belasteten Gewässern gefunden werden (Krauss *et al.*, 2005; Schlosser *et al.*, 2008).

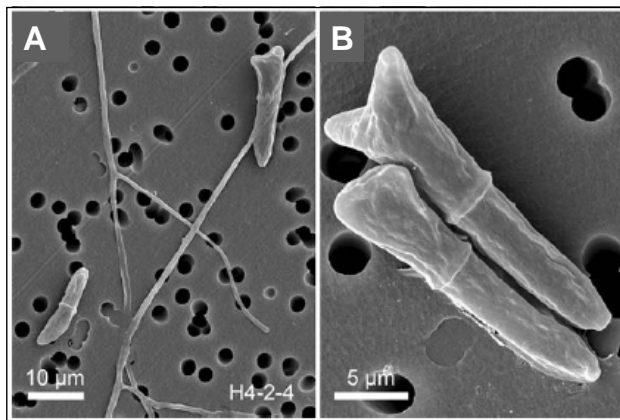


Abb. 1-1: SEM-Bilder von Konidien von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4; A+B: repräsentative Konidien.

Im Mansfelder Land, dem heutigen Landkreis Mansfeld-Südharz (Mitteldeutschland), wurde bis fast zum Ende des 20. Jahrhunderts etwa 800 Jahre lang Kupferschiefer bzw. Kupfererz abgebaut und die Verhüttungsrückstände (Theisenschlamm) nach der Verhüttung auf Armerzhalden gelagert. Der Standort H4-2-4 befindet sich am Fuße einer solchen Halde in Stadtborn/Hergisdorf bei Helbra, wo der Pilz aus der dortigen neuen Quelle isoliert wurde (Abb. 1-2 und 1-3; Krauss *et al.*, 2001).

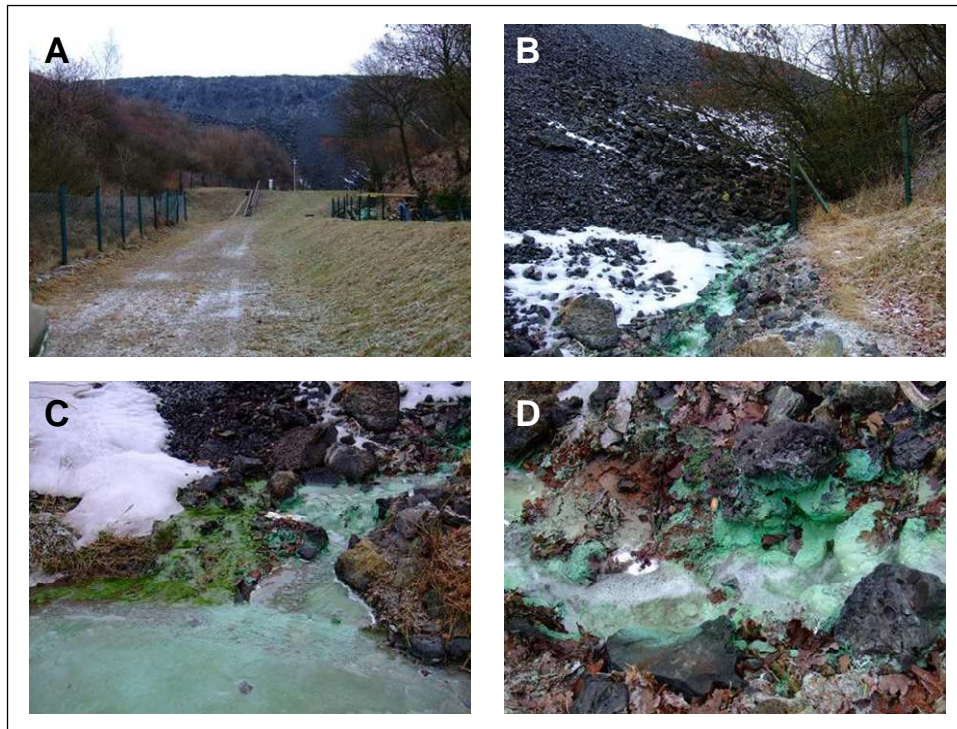


Abb. 1-2: Standort H4-2-4 in Stadtborn/Hergisdorf bei Eisleben (01/2009); A: Kupferschiefer-Armerzhalde; B: Quelle aus der Kupferschiefer-Armerzhalde; C: Zufluss in das Auffangbecken (Entsorgung des Schwermetall-haltigen Wassers); D: grüne Zink-Ablagerungen im Wasser und in der Nähe des Schwermetall-belasteten Wassers auf dem Armerz (Sekundärminerale).

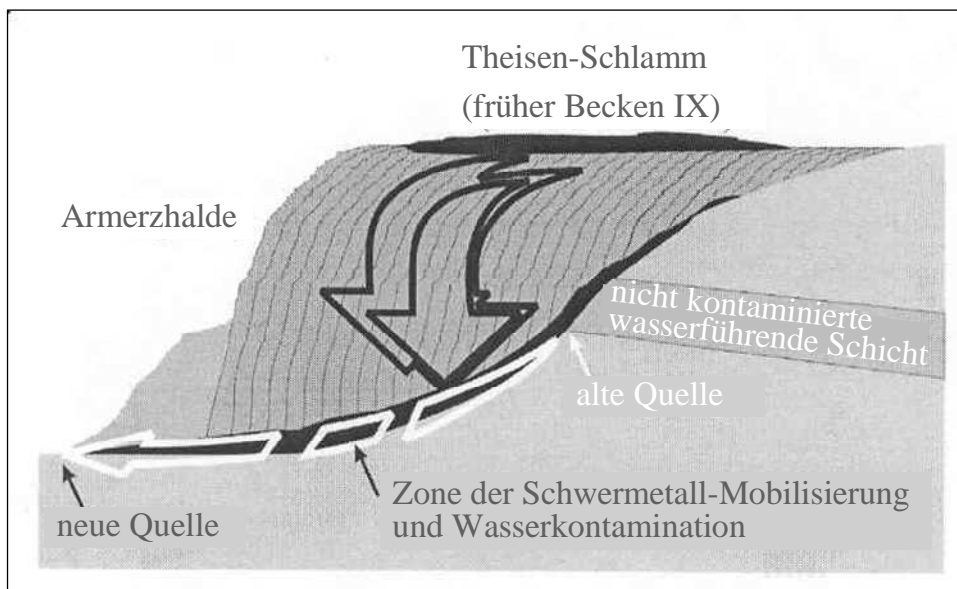


Abb. 1-3: Skizze der Situation am Standort H4-2-4 in Stadtborn/Hergisdorf bei Eisleben.

1.2. Schwermetalle

Der Begriff „Schwermetalle“ ist bisher nicht einheitlich definiert. Im Allgemeinen werden alle Metalle mit einer Dichte von $>5\text{-}6\text{ g/cm}^3$ als Schwermetall bezeichnet. Nach Duffus *et al.* (2002) ist es besser, von *hard metals (class A)*, *soft metals (class B)* und von *borderline metals* zu sprechen. Diese empirische, chemische Klassifizierung nach dem HSAB-Konzept (*hard and soft acids and bases*; Pearson, 1963) orientiert sich an der Eigenschaft der Metalle als Elektronenakzeptoren (Lewis-Säuren) sowie an der Größe ihrer Atomradien. In der Biologie müssen Metalle nach ihrer biologischen Relevanz (essenziell oder nicht-essenziell) eingeordnet werden.

Das Wasser am Standort H4-2-4 ist stark mit Schwermetallen und Anionen belastet, hauptsächlich mit Zink, Mangan, Kupfer und Cadmium, aber auch Blei und Eisen (Tab. 1-1 und 1-2; Krauss *et al.*, 2001). Zn und Mn sind essenziell für Organismen und gehören zu den *borderline metals*, während Pb (nicht-essenziell), Fe und Cu (beide essenziell) je nach Oxidationszustand zu den *hard*, *soft* oder *borderline metals* gezählt werden. Cd wird als nicht-essenziell für Organismen angesehen. Jedoch kommt Cd unter Zinkmangel-Bedingungen in aktiven Zentren von Carboanhydrasen aus *Thalassiosira weissflogii* und anderen marinen Diatomeen vor (Lane & Morel, 2000; Park *et al.*, 2007). Als *soft metal* komplexiert Cd überwiegend mit weichen Lewis-Basen, wie z. B. Thiolgruppen.

Tab. 1-1: Hydrochemische Daten am Standort H4-2-4

Standort	SO ₄ ²⁻		PO ₄ ³⁻		pH	Redoxpotential	Leitfähigkeit	Temperatur
	mg/L	µM	mg/L	µM				
H4	6750	70300	0,16	1,68	6,2	2,57	8,55	6,5

Tab. 1-2: Schwermetallgehalte am Standort H4-2-4

Standort	Cd		Cu		Fe		Mn		Pb		Zn	
	mg/L	µM	mg/L	µM	mg/L	µM	mg/L	µM	mg/L	µM	mg/L	µM
H4	2,80	24,91	13,25	208,5	0,05	0,89	19,10	347,7	1,90	9,30	2600	39773

1.3. Schwermetallstress

Allgemein sind Organismen in ihrer natürlichen Umwelt verschiedenen abiotischen (z. B. Temperatur, Wasserverfügbarkeit, Schwermetalle, Licht) und biotischen Stressbedingungen (z. B. Konkurrenz mit Organismen derselben Art oder einer anderen Art, Fraßfeinde, Parasiten) ausgesetzt (Abb. 1-4). Um diesen Stressoren begegnen zu können, haben alle Organismen Resistenzstrategien entwickelt.

Als Reaktion auf Schwermetallstress können Organismen mittels *avoidance*-Mechanismen verhindern, dass diese überhaupt in die Zelle gelangen. Beispiele hierfür sind die Adsorption an die Zellwand oder Veränderung dieser, verminderter Transport in die Zelle und die Ausscheidung organischer Säuren oder Schleime, die Schwermetalle extrazellulär chelatieren können. *Tolerance*-Mechanismen ermöglichen es dem Organismus, mit Schwermetallen intrazellulär umzugehen. Nach einer unspezifischen Aufnahme durch Transporter (z. B. MFS-, CDF-, ZIP- und RND-Transporter; Saier, 2009) in die Zelle werden sie durch die Bildung von Thiolen komplexiert, zur Vakuole transportiert und dort abgelagert (ABC-Transporter), so dass sie nicht mehr toxisch für Stoffwechselreaktionen im Cytoplasma einer Zelle sind (Bellion *et al.*, 2006; Clemens, 2006).

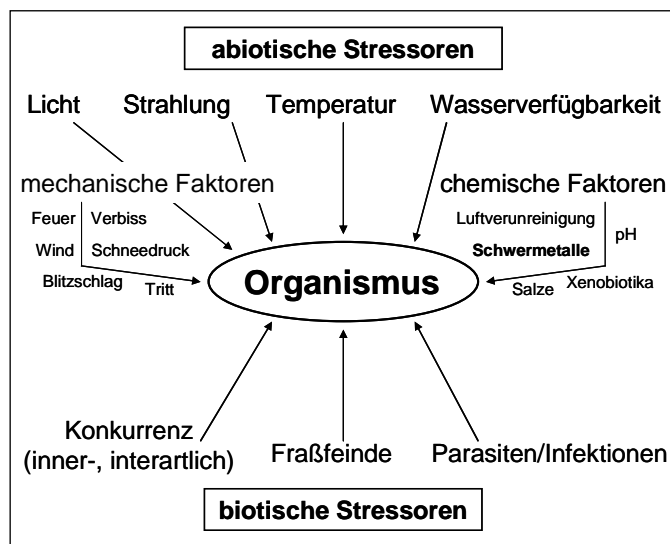


Abb. 1-4: Stressoren für Pilze.

Unter Cd(II)-Stress wird in Pilzen und Pflanzen, aber auch in Vertebraten die Bildung von niedermolekularen Thiolen, z. B. Cystein (Cys), γ -Glutamylcystein (γ -EC oder γ -Glu-Cys) und Glutathion (GSH) induziert, wobei das GSH sofort zur Entgiftung des Cd(II) als Bis-glutathionato-Komplex in die Vakuole transportiert oder zur Synthese von Phytochelatinen

(PCs) verwendet wird (Rauser, 2000; Courbot *et al.*, 2004). GSH ist ein enzymatisch (nicht-ribosomal) gebildetes Tripeptid aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin, wobei Glutamat über eine γ -Peptidbindung mit Cystein verknüpft wird (Abb. 1-5; Ernst *et al.*, 2008).

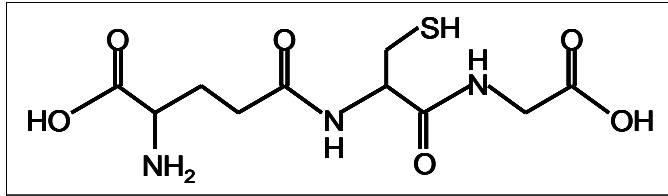


Abb. 1-5: Chemische Formel des Glutathions (γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin).

Die Bildung der γ -Peptidbindung erfolgt durch das Enzym γ -Glutamylcysteinyl-Synthetase und ist der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt der GSH-Biosynthese, wobei aus Cys und Glu γ -EC gebildet wird (Stephen & Jamieson, 1997; Pocsi *et al.*, 2004; Mendoza-Cózatl & Moreno-Sanchez, 2006; Rother *et al.*, 2006). Die Verknüpfung des γ -EC mit Gly erfolgt durch die GSH-Synthetase. Da für die GSH-Biosynthese Cystein benötigt wird, ist diese eng mit der Sulfatassimilation verbunden (Abb. 1-6; Al-Lahham, 1998).

Cystein wird mit Hilfe des Enzymkomplexes O-Acetylserin-(Thiol)-Lyase aus O-Acetylserin und Sulfid (S^{2-}) synthetisiert. Sulfid wird über die Sulfatassimilation in Pilzen, wie *Neurospora crassa* und *Aspergillus nidulans* (Marzluf, 1997), wie folgt bereitgestellt: Das durch Sulfat-Transporter in die Zellen transportierte Sulfat (SO_4^{2-}) wird durch die ATP-Sulfurylase zu Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) umgewandelt. APS wiederum wird mit Hilfe der Adenosin-5'-phosphosulfat-Kinase (APS-Kinase) zu Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) umgewandelt, welches durch die Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat-Reduktase (PAPS-Reduktase) zu Sulfit (SO_3^{2-}) reduziert wird. Aus SO_3^{2-} entsteht S^{2-} durch Reduktion mittels Sulfit-Reduktase.

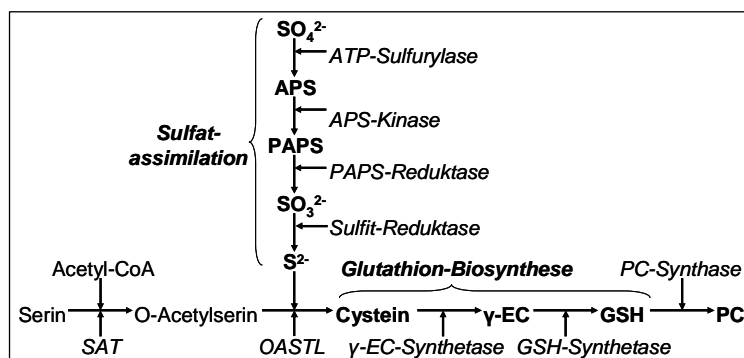


Abb. 1-6: Sulfatassimilation bei Pilzen (*N. crassa* und *A. nidulans*), sowie Glutathion- und Phytochelatin-Synthese in *S. pombe*.

Aus GSH können mittels Phytochelatin-Synthase (PCS) Phytochelatine gebildet werden (Abb. 1-6). In *Arabidopsis thaliana* und in der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* wurde eine konstitutive Expression der PCS-Gene und eine weitere Induktion unter Schwermetallstress beobachtet (Cobbett, 1999). Dagegen konnte in *H. lugdunensis* kein Gen für eine PCS gefunden werden (persönliche Mitteilung Bianca Braha und molekularbiologische Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit). In *Saccharomyces cerevisiae* wurde ebenfalls kein PCS-Gen identifiziert. Wünschmann *et al.* (2007) haben Hinweise vorgelegt, wonach eine Carboxypeptidase Y in dieser Hefe aus Glutathion durch Verknüpfen von γ -EC-Einheiten mit GSH Phytochelatine synthetisieren kann. Eine solche Rückreaktion ist erklärbar, wenn in der Zelle, wie unter Cd(II)-Stress beschrieben, sehr große Mengen γ -EC und GSH vorhanden sind (Wünschmann *et al.*, 2007). Bei *H. lugdunensis* konnte nur PC2, jedoch keine höher molekularen PCs (PC3-PC6) nachgewiesen werden (Jaeckel *et al.*, 2005), was auch ein Hinweis auf die Aktivität einer Carboxypeptidase ist. In *S. pombe* wurde die Bildung von PCs durch die Aktivität einer PCS nachgewiesen (Clemens *et al.*, 1999). In zahlreichen höheren Pflanzen (Ernst *et al.*, 2008) und Algen, z. B. in *Chlamydomonas reinhardtii* (Bräutigam *et al.*, 2009), konnten sowohl kanonische (PC2, PC3, etc.) als auch Iso-Phytochelatine nachgewiesen werden (Abb. 1-7).

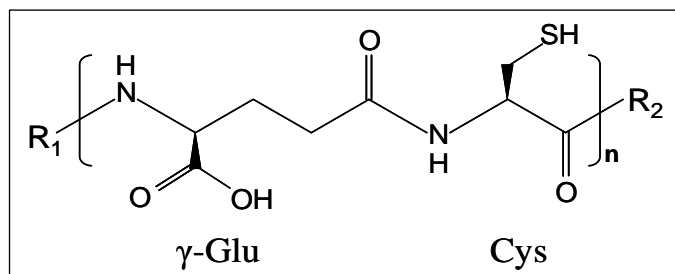


Abb. 1-7: Chemische Formel der Phytochelatine: $R_1=H$ & $R_2=Gly$ - kanonisches PC_n ; $R_1=Cys$ & $R_2=Gly$ - $CysPC_n$; $R_1=H$ & $R_2=OH$ - $desGlyPC_n$; $R_1=Cys$ & $R_2=OH$ - $CysPC_n desGly$; $R_1=H$ & $R_2=Ala/Ser/Glu/Gln$ - $PC_n Ala/Ser/Glu/Gln$.

1.4. Metallothioneine

Metallothioneine (MTs) sind kleine, gencodierte, Cystein-reiche (bis zu 33 %) Proteine mit Größen von ca. 2-17 kDa:

2,2-2,6 kDa	bei Pilzen (Familie 8),
3,8-4,6 kDa	bei Diptera (Familie 6),
4,4-8,5 kDa	bei Pflanzen (Familie 15)
5,0-7,5 kDa	bei Vertebraten und Invertebraten (Familien 1-5),
5,2-7,3 kDa	bei Pilzen (Familien 9-13),
5,4-5,8 kDa	bei Prokaryoten (Familie 14) sowie
11,1-16,7 kDa	bei Ciliata (Familie 7)

(nach: <http://www.expasy.ch/cgi-bin/lists?metallo.txt>; Binz & Kägi, 1999).

Metallothioneine, zuerst in den Nieren von Pferden entdeckt (Margoshes & Vallee, 1957), stellen eine große Gruppe von Proteinen dar, die für fast alle Organismengruppen beschrieben wurden. Ihre Bildung wird häufig durch Schwermetalle, die sie über die Sulfhydrylgruppen der Cys-Reste komplexieren können, induziert. Auch bei der Metallhomöostase essenzieller Metalle, beim Metall-Transport (*trafficking*) und unter anderen Stressbedingungen, wie Seneszenz, Trockenstress und biotischer Stress, werden Metallothioneinen Funktionen zugeordnet (Vašák, 2007).

Die Cys-Reste der MTs sind in *clustern* angeordnet und besitzen je nach Organismengruppe eine typische Konsensussequenz, die auch der Einteilung in Familien dient. In der Familie 8 (*fungi-I-MT*) sind die *small metallothioneins* (smMT) von verschiedenen Pilzen zusammengefasst. Die Konsensussequenz des MT1_NECLU aus *H. lugdunensis* Stamm H8-2-1 ist zu denen der anderen beschriebenen Pilze leicht verschieden (Abb. 1-8). MT1_NECLU besteht aus 24 Aminosäuren und hat eine Größe von ca. 2330 Da (Jaeckel *et al.*, 2005). In ihrer Dissertation konnte Jaeckel (2002) erste Hinweise auf das MT1_NECLU mit einem Methionin am N-Terminus der Aminosäuresequenz (Met-MT1_NECLU) neben dem MT1_NECLU finden.

MT1_NECLU:	S P C T C S T C N C A G A C N S C S C T S C S H
Konsensus:	C-x-C-x-x-C-x-C-x-x-x-C-x-x-C-x-C-x-x-C
Konsensus der MT-Familie 8 (<i>fungi</i>-I-MT; Binz & Kägi, 1999):	
	C-x-C-x-x-x-x-C-x-C-x-x-x-x-C-x-C-x-x-C

Abb. 1-8: Konsensussequenz des MT1_NECLU und der MT-Familie 8.

Man könnte die Familie 8 (*fungi*-I-MT) in zwei Untergruppen aufteilen, wobei MT1_NECLU und MT2_COLGL (aus dem Anthracnose-Pilz *Colletotrichum gloeosporioides*, Ascomycet) eine Untergruppe bilden, da sie eine sehr ähnliche Konsensussequenz haben (Abb. 1-9).

Die Metallothioneine MT2_COLGL und MT1_COLGL werden bei der Appressorium-Bildung durch den Wirt-Oberflächen-Wachs induziert und komplexieren über sieben Cysteinreste sechs Cu(I)-Ionen (Hwang & Kolattukudy, 1995). MT_AGABI wird von dem Basidiomycet *Agaricus bisporus* (Zuchtchampignon) unter Cu(I)-Stress gebildet und komplexiert sechs Cu(I)-Ionen (Münger & Lerch, 1985). Die Bildung des MT_NEUCR aus *Neurospora crassa* (Roter Schimmelpilz, Ascomycet) wird durch Cu induziert und komplexiert ebenfalls sechs Cu(I)-Ionen über die sieben Thiolreste der Cysteine (Cobine *et al.*, 2004). Diese drei Metallothioneine haben eine sehr ähnliche Konsensussequenz. Die fünf Metallothioneine der Familie 8 bestehen nur aus 24-27 Aminosäuren mit 27-33 % Cysteingehalt.

MT1_NECLU	-----SPCTCST---CN--CAGA-CNSCS---CTS-CSH	24	AS/8	Cys
MT2_COLGL	-----MAPCCKS---CGTSCAGS-CTSCS---CGS-CSH	27	AS/8	Cys
<hr/>				
MT_NEUCR	-----MGDCGCSGASSCN--CGSG-CS-CSN--CGS---K	26	AS/7	Cys
MT_AGABI	-----GDCGCSGASSCT--CASGQCT-CSG--CG---K	25	AS/7	Cys
MT1_COLGL	-----MSGCGCASTGTCH--CGKD-CT-CAG--CPH---K	26	AS/7	Cys
PiMT	MNTITSVPVNFNNCGSNS---CG--CGSS-CA-CKPGECKC-----	34	AS/7	Cys
	* . * * * *			
Konsensus Familie 8 (<i>fungi</i> -I-MT):				
	CxCx(2/5)Cx(1/3)Cx(3/4)Cx(1/2)Cx(1/2)C(xxCSH)			
Konsensus MT1_NECLU und MT2_COLGL:				
	CxCxxCx(1/3)CxxxCxxCxCxxCSH			
Konsensus MT_NEUCR, MT_AGABI und MT1_COLGL:				
	CxCxxxxxCxCx(3/4)CxCxxC			

Abb. 1-9: Alignment des MT1_NECLU und der MTs der Familie 8 und des PiMT aus *Paxillus involutus* und deren Konsensussequenzen; COLGL: *Colletotrichum gloeosporioides*; NEUCR: *Neurospora crassa*; AGABI: *Agaricus bisporus*; * = gleiche Aminosäuren; . = weniger ähnliche Aminosäuren.

Die MTs der Familien 9 bis 13 (bzw. *fungi-II-* bis *fungi-VI-MT*) wurden aus verschiedenen Hefen (Saccharomycetales) isoliert:

- MT1 und MT2 aus *Candida glabrata* (Familie 9 und 10; *fungi-II-* und *fungi-III-MT*)
- MT1 bis MT4 aus *Yarrowia lipolytica* (Familie 11; *fungi-IV-MT*)
- CUP1 und CRS5 aus *S. cerevisiae* (Familie 12 und 13; *fungi-V-* und *fungi-VI-MT*)

Die MTs dieser Familien haben Molekulargewichte zwischen 5,2 und 7,3 kDa und sind somit größer als die *fungi-I-MT* (Familie 8) (vergl. Abb. 1-9). Außerdem besitzen sie zwischen 9 und 18 Cys-Reste (*fungi-I-MT*: 7-8), die bis zu 11 Cu(I)-Ionen komplexieren können. Die Bildung aller MTs dieser Familie wird durch Cu-Stress induziert, bei *C. glabrata* auch durch Ag-Ionen.

Aus dem Basidiomyceten *Paxillus involutus* ist ebenfalls ein Metallothionein bekannt (PiMT), welches aus 34 Aminosäuren besteht und 7 Cysteine besitzt. Die Einordnung in die bestehenden Familien 8-13 ist nicht einfach, da es für die Familie 8 (Ascomyceten) der kleinen Metallothioneine zu groß, aber für die Familien 9-13 (Hefen) zu klein ist. Eine Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz besteht zu den Metallothioneinen der Familien 9-13, eine Ähnlichkeit in der Anzahl der Cysteine (7) besteht zur Familie 8. Das PiMT ist eine Mischform und müßte in eine eigene Familie eingeordnet werden.

MT1_YARLI	--MEFTTAMFGTSLIFTTS-TQS--KHNLVNCCSSST---- <td>55</td>	55
MT3_YARLI	--MEFTTAMLGASLISTTS-TQS--KHNLVNCCSSST---- <td>55</td>	55
MT2_YARLI	--MEFTSALFGASLVQSKHKTTK--KHNLVDSCCSKPT----EKPTN--SCTCS-----KCAC--DSCCK---	54
MT4_YARLI	--MEFLNANFGASLIQSKHKTTK--KHNLVNSCCSKPA----EKPTN--SCTCS-----KCAC--DSCCK---	54
MT1_CANGA	-MANDCKPNGCSCPNCAN---G--GCQCGDKCECKQS----CHGCG-EQCKCGSHGSSCHGSCGCG-DKCECK--	63
MT2_CANGA	-MPEQVNCQYDCHCSNACENTC--NCCAKPACTNSA----SN-----ECSCQ-----TCKC--QTCKC---	52
CRS5_Sc	MTVKICDCEGECCKDSCHCGSTCLPSCSGGEKCKCDHSTGSPQCKSCG-EKCKCET-----TCTCEKSKCNCEKC	69
MTCU_Sc	MFSELINFQNEGHECQCQCGSCK-NNEQCQKSCSCEPTG----CNSDD--KCPCGN-----KSEETKKSC-CSGK	61
PiMT	--MNTITS-VPVFNCCGS-----NSCGCS-----SCACK-----P-----GECKC---	34
:	: * * . * * * *	

Abb. 1-9: Alignment der Sequenzen der pilzlichen Metallothioneine der Familien 9-13 und des PiMT aus *Paxillus involutus*; YARLI: *Yarrowia lipolytica*; CANGA: *Candida glabrata*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; * = gleiche Aminosäuren; : = ähnliche Aminosäuren; . = weniger ähnliche Aminosäuren.

Vertebraten-MTs besitzen eine Zwei-Domänen-Struktur (Villarreal *et al.*, 2006). Am N-Terminus befindet sich die β -Domäne, in der neun Cysteinreste drei Schwermetallionen (Cd(II), Zn(II), Co(II), Cu(I), Hg(II), etc.) komplexieren können. Die α -Domäne am C-Terminus besteht aus einem Cystein-Cluster, welcher 11 Cysteinreste enthält und einen Komplex mit vier Schwermetall-Ionen bilden kann.

Pflanzliche MTs bestehen aus zwei bis drei Cystein-reichen Regionen, die durch *linker*-Regionen verbunden sind (Zhang & Shu, 2006; Freisinger, 2008). Sie werden in die Familie 15 eingeordnet und in sechs Untergruppen eingeteilt: p1, p2, p21, p3, p4 und pec. Sie

unterscheiden sich in der Anzahl der Cysteine pro Region und in der Anordnung dieser sowie in der Aminosäureanzahl der *linker*. Pflanzliche MTs haben molekulare Massen von 4,4 bis 8,5 kDa.

1.5. Strukturbestimmung von Proteinen

Proteine besitzen eine durch ihre Aminosäuresequenz bestimmte Sekundär- und Tertiärstruktur, bei Proteinkomplexen spricht man von Quartärstrukturen. Die Strukturaufklärung von Metallothioneinen, die oft keine Sekundärstruktur aufweisen, kann mit Hilfe verschiedener spektroskopischer Techniken und deren Kombinationen (z. B. Röntgenkristallographie, Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR), Elektronenspinresonanz (EPR), Circular dichroismus-Spektroskopie (CD) sowie UV/VIS- und Raman-Spektroskopie) durchgeführt werden (Ngu & Stillman, 2009b; Ngu & Stillman, 2009a; Peroza *et al.*, 2009).

Zur Strukturvorhersage eines Metallothioneins wird häufig die **Homologiemodellierung** (*homology modelling*) verwendet (Qu *et al.*, 2009). Dazu werden Röntgenkristall- oder NMR-Daten ähnlicher Metallothioneine bekannter Struktur mit hoher Homologie (idealerweise mind. 50-60 %) als Vorlage für die Vorhersage der Struktur des gesuchten MTs herangezogen. Mittels spezieller Algorithmen werden zunächst die Primärsequenzen des strukturell bekannten MTs und des zu bestimmenden MTs aligniert (sog. Sequenz-*alignment*). Die Modellierung der dreidimensionalen Struktur erfolgt dann mit Hilfe spezieller Software. Zur Bewertung der Homologiemodelle werden Ramachandran-Plots erstellt und energetische Kriterien betrachtet. Die Untersuchung der Stabilität der Modelle erfolgt anschließend durch Moleküldynamik-Simulationen. Daraus lassen sich am Ende Durchschnittsstrukturen des zu untersuchenden Metallothioneins und so Homologiemodelle generieren.

Zur detaillierten Metallothionein-Strukturanalyse werden die **hochauflösende Röntgenstrukturanalyse oder die NMR-Spektroskopie** eingesetzt. Für beide Methoden werden jedoch große Probenmengen benötigt und die Analysen sind äußerst zeit- und arbeitsintensiv (Erzeugung von Kristallen bei der Röntgenstrukturanalyse).

Einfachere und erheblich schnellere Untersuchungen zu Sekundärstrukturelementen eines Proteins, wie z. B. α -Helices, β -Faltblätter, *loops* oder ungeordnete Bereiche sind mittels **Circulardichroismus-Spektroskopie** möglich (Kelly *et al.*, 2005), wie Untersuchungen zur Ligandenbindung und Faltungsvorgängen zeigen (Stillman & Zelazowski, 1988; Ngu *et al.*, 2006; Osz, 2008). Bei der CD-Spektroskopie wird links- und rechts-circular polarisiertes Licht bestimmter Wellenlängen genutzt. In Abhängigkeit der Chiralitäten innerhalb des Proteins wird rechts- und links-circular polarisiertes Licht sowohl in seiner Phase als auch in seiner Amplitude verändert. Die bei diesem Vorgang entstehende Differenz zwischen beiden Phasen führt zur Rotation des Feldvektors um den Wellenvektor mit sich periodisch änderndem Betrag. Bei der so entstehenden Polarisation beschreibt die Spitze des Feldvektors eine Ellipse (elliptische Polarisation). Das resultierende Spektrum wird dann dekonvolutiert, um die relativen Anteile an Sekundärstrukturelementen zu bestimmen. Man unterscheidet Fern-UV- (190-260 nm, Amid-Region, Peptidbindung) und Nah-UV-Circulardichroismus (260-320 nm, aromatische Aminosäuren). Die Komplexierung mit Schwermetallen, wie z. B. Kupfer, führt zur Bildung einer chromophoren Gruppe und ruft eine Änderung der Elliptizität im Bereich von ca. 250-260 nm im CD-Spektrum hervor.

Die **Kernspinresonanz-Spektroskopie** (*nuclear magnetic resonance spectroscopy*, NMR) ist eine gängige Methode in der modernen biologischen Forschung bei der Strukturuntersuchung von Proteinen und Peptiden bis ca. 35 kDa. Im folgenden Abschnitt werden kurz die Grundlagen der NMR-Spektroskopie beschrieben (für eine ausführliche Beschreibung: Kessler *et al.* (1988), Lottspeich & Engels (2006)).

Wechselwirkungen zwischen dem magnetischen Moment eines Atomkerns mit Magnetfeldern lassen sich als kernmagnetische Resonanz dieser Atome beschreiben. Ursache für das magnetische Moment eines Atomkerns ist der quantenmechanische Spin desselben, der sich als Summe der Spins der Protonen und Neutronen ergibt. Der quantenmechanische Spin bezeichnet dabei die Rotation eines geladenen Teilchens (Eigendrehimpuls), die zu einem magnetischen Moment führt. Nur die Kerne, die einen Kernspin $S \neq 0$ besitzen, haben ein magnetisches Moment. Kerne mit einem Spin $S = \frac{1}{2}$ können sich entweder parallel oder antiparallel zu einem in z-Richtung angelegten Magnetfeld B_0 orientieren und nehmen so unterschiedliche Energieniveaus ein (Abb. 1-10).

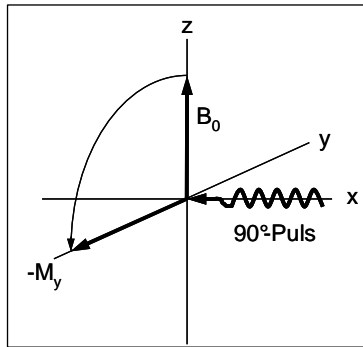


Abb. 1-10: Wirkung eines 90°-Pulses auf die z-Magnetisierung B_0 ; der aus x-Richtung kommende Puls dreht die z-Magnetisierung rechtshändig um 90° um die x-Achse, wobei die (-y)-Magnetisierung entsteht (Lottspeich & Engels, 2006).

Die Übergangsfrequenz zwischen den Energieniveaus entspricht der Resonanzfrequenz des Kerns (Larmor-Frequenz). Die Larmor-Frequenz ist abhängig vom gyromagnetischen Verhältnis, einer für jede Kernsorte charakteristischen Konstante, und von der Stärke des Magnetfeldes. Bis in die siebziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurde die *continuous-wave-NMR* (CW-NMR, "kontinuierliche" NMR) zum Abtasten des Spektrums verwendet. Hierbei wird bei konstantem Magnetfeld die Frequenz der eingestrahlten Radiostrahlung variiert. In den Kernen finden nur dann Energieübergänge statt, wenn die Frequenz der Strahlung dem Energieunterschied der beteiligten Energieniveaus entspricht, die Resonanzbedingung also erfüllt ist. Bei der heute allgemein verwendeten Puls-Fourier-Transformations-NMR-Spektroskopie (PFT-NMR) werden alle Kerne gleichzeitig für eine sehr kurze Zeitdauer im Bereich von einigen Mikrosekunden durch einen einzigen, "unscharfen", im Winkel von 90° zur z-Achse (x-Richtung) eingestrahlten Radiofrequenzimpuls angeregt. Die Zeitdauer und die Energie der Strahlung sind umgekehrt proportional zueinander, weshalb ein extrem kurzer Radiofrequenzpuls viele Frequenzen enthält und die Resonanzen aller Kernspins in einer Probe auf einmal anregt. Alle anschließend von den Kernspins emittierten Signale (Spannung) werden gleichzeitig mittels einer Empfängerspule detektiert. Durch Fourier-Transformation werden die Zeitdaten (FID, *free induction decay*, freier Induktions-Zerfall) in eine Frequenzdomäne (Spektrum in ppm, *parts per million*) übersetzt, das so entstandene eindimensionale NMR-Spektrum beinhaltet Informationen über alle Kerne einer Probe. Die Elektronen in einem Kern erzeugen ihrerseits ein schwaches Magnetfeld, welches den Kern vom angelegten Magnetfeld abschirmt. Je nach chemischer Umgebung besitzt der Kern eine andere Resonanz, die als chemische Verschiebung bezeichnet und in ppm angegeben wird.

Bei der zweidimensionalen NMR-Spektroskopie wird eine weitere spektrale Dimension hinzugefügt, d.h. zur Präparation (Puls) und Datenakquisition kommen zwei neue Bausteine

der NMR-Spektroskopie hinzu (Kessler *et al.*, 1988; Friebolin & Schilling, 1994): Die indirekte Evolutionszeit und die Mischsequenz (die aus Pulsen und Wartezeiten bestehen kann), bei der indirekten Evolutionszeit werden die Kerne der ersten Dimension magnetisiert. Durch die Mischsequenz wird der Magnetisierungszustand abgefragt und gleichzeitig durch skalare oder dipolare Kopplungen auf einen benachbarten Kern übertragen. Durch eine distinkte Verlängerung der Evolutionszeit kann die zeitliche Entwicklung der Magnetisierung detektiert und nach Fourier-Transformation als "Höhenliniendiagramm" dargestellt werden. Man kann bei zweidimensionalen Spektren Signale auf einer Diagonalen (Magnetisierung nach Mischzeit auf demselben Spin wie vorher) oder neben der Diagonalen beobachten (Kreuzsignale/-peaks). Kreuzpeaks verknüpfen die Signale von zwei benachbarten Kernen, die während der Mischsequenz Magnetisierung ausgetauscht haben, also miteinander wechselwirken.

Bei der zweidimensionalen Korrelationsspektroskopie (COSY, *correlation spectroscopy*) wird die Magnetisierung über skalare Wechselwirkungen übertragen. Die Distanz der Linien in einem Multipllett wird als Kopplungskonstante J bezeichnet und ist von der verwendeten Magnetfeldstärke unabhängig. Dies kann nur über Kerne, die über eine Bindung (1J), zwei Bindungen (2J , geminale Kopplung) oder nicht mehr als drei Bindungen (3J , vicinale Kopplung) voneinander entfernt sind, geschehen. Über die Kopplung der Amidprotonen mit den α H-Protonen eines Proteins lassen sich Aussagen über die Stärke des Torsionswinkels φ zwischen diesen beiden Protonen treffen und damit Rückschlüsse über die Molekülgeometrie ziehen (Abb. 1-11). Die Karplus-Beziehung beschreibt diese Abhängigkeit:

$$J(\varphi) = A \cos^2(\varphi - 60) - B \cos(\varphi - 60) + C$$

Die empirisch bestimmten Konstanten A , B und C sind dabei für jeden Typ von Torsionswinkel verschieden.

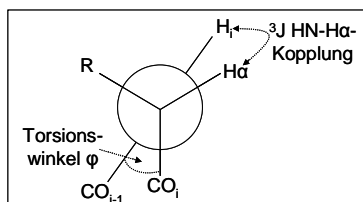


Abb. 1-11: Aufsicht auf die $C\alpha$ -N-Achse eines Proteins; dargestellt ist der Zusammenhang zwischen Kopplungskonstante J und Torsionswinkel φ (Lottspeich & Engels, 2006).

Bei der zweidimensionalen TOCSY-Spektroskopie (*total correlation spectroscopy*) kann mittels eines mehrstufigen sukzessiven Transfers die Magnetisierung über die skalaren Kopplungen des gesamten Spinsystems einer Aminosäure verteilt werden. Im Spektrum erhält man ein charakteristisches Signalmuster, welches das Spinsystem der Aminosäure widerspiegelt.

Um Informationen über die Protein-Geometrie, also dessen dreidimensionale räumliche Struktur zu erhalten, ist das NOESY-Spektrum (*nuclear overhauser and exchange spectroscopy*) von entscheidender Bedeutung. Der Nuclear-Overhauser-Effekt bezeichnet die dipolaren Wechselwirkungen der Kernspins untereinander, die durch den Raum wirken. Die Korrelation von zwei Kernen ist damit von ihrem Abstand zueinander abhängig (meist $< 5 \text{ \AA}$). Wenn der räumliche Abstand zwischen den Kernen eines Proteins klein genug ist, kann man für alle Kerne ein Signal detektieren.

Man kann bei der Strukturbestimmung von Proteinen mittels zweidimensionaler NMR-Spektroskopie homo- (einkernig, meist Protonen) und heteronukleare NMR-Experimente (zweikernig) unterscheiden. Neben Protonen werden auch Heterokerne wie ^{15}N , ^{13}C , Deuterium oder Metall-Isotope für die heteronukleare zweidimensionale NMR-Spektroskopie verwendet, um so die räumliche Struktur aller Atome eines Proteinmoleküls zu bestimmen.

In neuester Zeit werden immer mehr Anwendungen der Strukturaufklärung von Substanzen aus Substanzgemischen, z. B. aus pharmakologisch interessanten Pflanzen, veröffentlicht. Dazu ist es zum einen notwendig, das Substanzgemisch aufzutrennen und zum anderen, von einzelnen Substanzen eine schnelle Strukturaufklärung durchzuführen. Dazu wurden Kopplungen von Trennmethoden mit NMR-Spektrometern entwickelt (*hyphenated techniques*). Da die Sensitivität der NMR im Vergleich zu anderen analytischen Techniken relativ niedrig ist, wurden *microseparations*-Techniken entwickelt, bei denen mit wenig Ausgangsmaterial (Substanzgemische) eine qualitativ hochwertige Strukturaufklärung durchgeführt werden kann (Webb, 2005). Die Sensitivität der NMR-Spektroskopie steigt umgekehrt proportional mit der Quadratwurzel des Spulen-Durchmessers an. Um auch kleinste Probenmengen untersuchen zu können und die Sensitivität zu erhöhen, wurden spezielle NMR-Probenköpfe entwickelt, die Proben in einer Kapillare (Innendurchmesser bis $100 \mu\text{m}$) detektieren können (Albert, 2002). Es wurden Sattelspulen (*saddle coils*) und Solenoidspulen (*solenoidal coils*) mit aktiven Probenvolumina von $1,5$ bis $2,5 \mu\text{L}$ entwickelt, wobei die Sensitivität der Solenoidspulen um das zwei- bis dreifache höher als bei den Sattelspulen liegt (Abb. 1-12; Schlotterbeck *et al.*, 2002; Krucker *et al.*, 2004). Die Technik

wird *microprobe* oder auch *microcoil* NMR genannt. Im Vergleich dazu werden zur Strukturbestimmung von Proteinen oder Peptiden mittels herkömmlicher NMR-Spektrometer 500 bis 700 μL einer ca. 1 mM Proteinlösung benötigt, um qualitativ hochwertige Spektren zu detektieren.

Die Trennung mittels Kapillar-HPLC und die anschließende Kopplung über eine Transferkapillare an das NMR-Spektrometer (*online*-Kapillar-HPLC-NMR) ist die Methode der Wahl, um aus einer nativen Probe die Struktur eines Peptids/Proteins bestimmen zu können (Hentschel *et al.*, 2005).

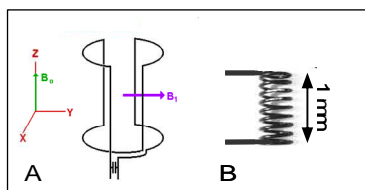


Abb. 1-12: Schematische Darstellungen der *microcoil* NMR-Probenköpfe: A-*saddle coil* - Sattelspule (<http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/chap-7/chap-7.htm>); B-*solenoidal coil* - Solenoidspule (Ciobanu *et al.*, 2003).

2. Ziele der Arbeit

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die physiologisch-biochemische Charakterisierung des Induktionsverhaltens eines kleinen Metallothioneins, welches in *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 bei gleichzeitiger Induktion von Phytochelatin 2 und Erhöhung des Glutathiongehaltes gebildet wird.

Es sollte die Induktion dieses Metallothioneins bei Veränderungen der Stammhaltung auf Oberflächenkulturen und der Kulturführung in Flüssigkultur unter Cd(II)-Stress optimiert und das Protein quantifiziert werden.

Begleitend sollten weitere unter Cd(II)-Stress induzierte Aminosäuren, wie Cystein, und niedermolekulare Thiole, wie Cys-Gly, γ -EC, GSH und das Phytochelatin 2, quantifiziert werden.

Da die Bildung von Thiolen eng mit der Sulfatassimilation verbunden ist, war die Untersuchung des extra- und intrazellulären Sulfatgehaltes sowie des intrazellulären Sulfid-Gehaltes von großer Bedeutung.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des Gens, welches für das Metallothionein codiert. Dabei war die Sequenzierung der regulatorischen Region *upstream* des Gens wichtig, um Aussagen über die Genregulation treffen zu können. Die Induktion des Metallothioneins sollte sowohl auf RNA-Ebene (Transkription) als auch auf Protein-Ebene (Translation) verfolgt werden.

Bisher ist nur von **einem** Cu-komplexierenden Metallothionein MT_NEUCR aus *Neurospora crassa* die Struktur bekannt (Cobine *et al.*, 2004). Unser Ziel war es, die Struktur des apo- und des Cd(II)-komplexierten Metallothioneins aus *H. lugdunensis* mittels verschiedener Methoden zu untersuchen.

Mittels Homologie-Modellierung sollte die theoretische Struktur des Metallothioneins ermittelt und mit Circular dichroismus-Spektroskopie (CD) sollte ein Einblick in die Sekundärstruktur erhalten werden. Als geeignete Methode zur Strukturbestimmung in Lösung wurde die Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR) ausgewählt.

Für die Strukturuntersuchungen wurde das synthetisch hergestellte Metallothionein (MT1_NECLU; Reinheit >98 %) verwendet. Um das native Metallothionein MT2_NECLU aus dem *H. lugdunensis*-Stamm H4-2-4 direkt aus einer Pilz-Probe untersuchen zu können, sollte eine Kopplungstechnik (*online* Kapillar-HPLC-NMR) eingesetzt werden.

3. Material und Methoden

Die verwendeten Geräte wurden, soweit möglich, im Material- und Methodenteil bezeichnet.

Folgende Geräte fanden ebenfalls Verwendung:

pH-Meter:	pH 538 (WTW, Weilheim)
Waagen:	BL150 und BP211D (SARTORIUS, Göttingen)
Labormischer:	Reamix 2789 und 2789/2 (KARL HECHT GmbH & Co KG, "Assistent", Sondheim/Rhön)
Magnetrührer:	Variomag Powertherm und Electronic Mono (H & P, jetzt THERMO, Langenselbold)
Thermoblock:	Thermoleader HB 110 (UNIEQUIP, Martinsried)
Zentrifugen:	Mikro 22R, EBA 12 und Universal 30RF (HETTICH, Tuttlingen)
PCR-Block:	ThermoHybaid (HYBAID Ltd., Ashford, Middlesex, UK)
Hybridisierungssofen:	BFD-53 (WTB BINDER, Tuttlingen)
Geldokumentation:	Gel Jet Imager (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen)
Gelkammern:	Modell 40-4214 Class II (PEQLAB, Erlangen) EasyCast Class II (OWL, Portsmouth, USA) Minigel-Twin (BIOMETRA, Göttingen)
Stromversorgung:	PHERO-STAB 0352 Power Supply (BIOTEC-FISCHER, Reiskirchen)

Chemikalien wurden von den Firmen FLUKA (jetzt SIGMA-ALDRICH, Steinheim), MERCK (Darmstadt), SIGMA-ALDRICH (Steinheim), ROTH (Karlsruhe) sowie SERVA (Heidelberg) bezogen. Von den Firmen OPERON (Planegg-Martinsried), FERMENTAS (St. Leon-Rot), ROCHE (Mannheim), ROTH (Karlsruhe) sowie PROMEGA (Mannheim) wurden Enzyme und Oligonukleotide bezogen.

Für die statistische Datenauswertung wurde das Programm InStat (Version 3.05; GraphPad) verwendet. Bei der Auswertung von drei oder mehr Datengruppen (Vergleich der unterschiedlichen Platten oder der unterschiedlichen Cadmium-Belastungen) wurde der One-way-ANOVA-Test mit anschließendem Tukey-Kramer-Test verwendet. Die Signifikanzen P wurden dabei immer im Vergleich zur Kontrolle wie folgt angegeben: $P > 0,05$ nicht signifikant (ns); $P < 0,05 = *$, $P < 0,01 = **$ und $P < 0,001 = ***$ signifikant.

Die Verwaltung von Literatur erfolgte mit Hilfe des Programms EndNote 6 für Windows® (THOMSON ISI RESEARCHSOFT).

Alle eingesetzten flüssigen und festen Medien, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden vor Verwendung 20 min bei 121 °C im Dampfautoklav sterilisiert. Die verwendeten Korkbohrer und Messer des UltraTurrax (IKA) wurden vor der Benutzung drei Stunden bei 180 °C in trockener Hitze sterilisiert. Nicht hitzestabile Lösungen wurden sterilfiltriert, nicht hitzestabile Geräte wurden mit Alkohol 70 % behandelt oder abgeflammt.

3.1. Kultivierung von *Heliscus lugdunensis*

Isolierte Konidien von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 wurden zum Auskeimen einzeln auf Oberflächenkultur gelegt, die Stammhaltung erfolgte dann bei 14 °C im Dunkeln (Tab. 3-1). Jeweils im Abstand von ca. vier Wochen wurde ein Stück des alten Mycels aus der Wachstumszone mit einem Korkbohrer (Ø 7-8 mm) ausgestochen und steril auf eine neue Malzagar-Platte überführt. Zur Überprüfung der Sterilität des Pilzmycels erfolgte eine mikroskopische Analyse mittels Stereomikroskop (Stemi 2000-C mit Beleuchtung KL200; ZEISS). Für die Experimente zur Vorkultivierung auf Cd(II)-haltigem Malzagar wurde dem Agar bei ca. 50 °C steriles CdCl₂ (75 mM) bis zu Endkonzentrationen von 50 und 100 µM Cd(II) zugegeben. Für Standortwasser-Platten (SOW-Platten) wurde vor Zugabe des Malzextraktes und des Agars das Standortwasser 1:1 mit H₂O bidest. verdünnt und zweimal autoklaviert.

Für die Experimente in Flüssigkultur wurde jeweils ein Mycelstück in 1 mL Malz-Pepton-Medium (Tab. 3-1) homogenisiert (UltraTurrax, 15 s, 16800 rpm), 75 mL Malz-Pepton-Medium in einem 200 mL Erlenmeyerkolben wurden mit 1 mL Homogenisat beimpft (Schema s. Abb. 3-1). Anschließend wurde bei 14 °C, 120 rpm Schütteln im Dunkeln inkubiert. Die Zugabe von 25, 50 und 100 µM CdCl₂ erfolgte zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase (Tag 2). Sowohl kurz vor dem Ende der logarithmischen Wachstumsphase (Tag 5) als auch in der stationären Wachstumsphase (Tag 7) wurde die Pilzbiomasse geerntet. Die mikroskopische Analyse auf Sterilität erfolgte mittels Inversmikroskop (Axiovert 200 mit AxioCam MRc; Software: AxioVision; ZEISS).

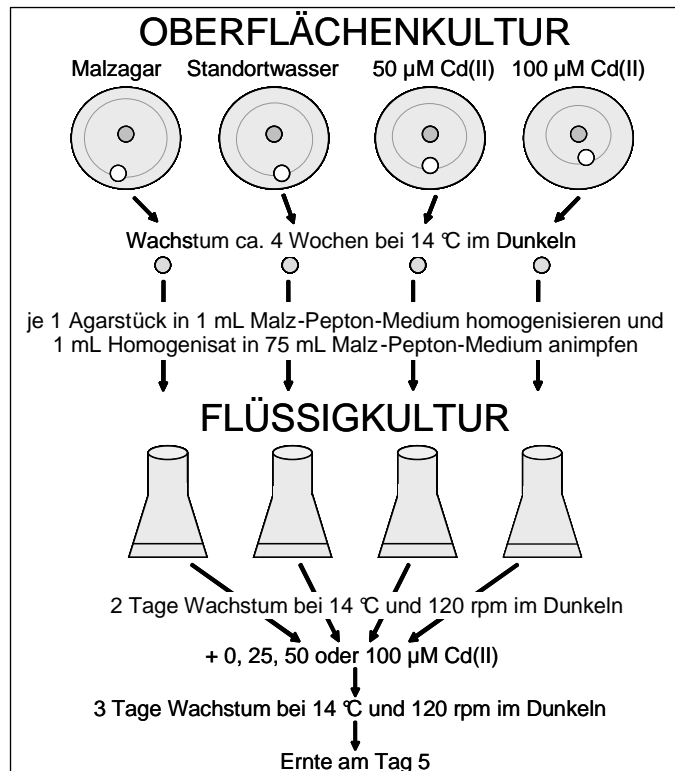


Abb. 3-1: Kulturführungsschema für *Heliscus lugdunensis* mit Vorinkubation auf verschiedenen Oberflächenkulturen und dessen anschließende Flüssigkultivierung.

Tab. 3-1: Fest- und Flüssigmedien zur Kultivierung von *Heliscus lugdunensis*

Malzagar (Oberflächenkultur)	Malz-Pepton-Medium (Flüssigkultur)
1 % Malzextrakt (ROTH)	0,5 % Malzextrakt (ROTH)
1,5 % Agar-Agar (ROTH)	0,1 % Bacto-Pepton™ (Becton Dickinson)
pH 5-5,2	

Die Elementanalyse des Malz-Pepton-Mediums erfolgte mittels ICP-AES (Tab. 3-2).

Tab. 3-2: Analyse des Gehaltes an Nichtmetallen und Metallen (einschließlich Halb-, Erdalkali-, Alkali- und Übergangsmetallen) in Flüssigkultur (Malz-Pepton-Medium)

Element	mg/L	µM	Element	mg/L	µM
S	16,870	526,201	Co	<0,030	<0,509
P	4,965	160,296	Cr	<0,040	<0,769
Ca	1,145	28,568	Cu	<0,040	<0,629
K	23,110	591,079	Fe	0,063	1,128
Mg	2,210	90,924	Mn	<0,020	<0,364
Na	39,200	1750,892	Ni	<0,050	<0,852
Al	0,042	1,557	Pb	<0,050	<0,241
As	<0,100	<1,335	Sr	<0,020	<0,228
Cd	<0,050	<0,445	Zn	<0,040	<0,612

3.2. Bakterien- und Hefestämme

3.2.1. Mikroorganismen und Plasmide

Die in Tab. 3-3 aufgeführten Mikroorganismen wurden während dieser Arbeit für die molekularbiologischen Untersuchungen und zur Proteinexpression verwendet.

Tab. 3-3: Verwendete Bakterienstämme

Bakterien	Merkmale	Referenz
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF'	$\Delta(mcrA)$ 183, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173, <i>endA1supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F'proAB, <i>lacI</i> ^q Z Δ M15, Tn10(Tet ^r)]	Bullock <i>et al.</i> , 1987 STRATAGENE
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)pLysS	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ (DE3), pLysS, Cm ^r	PROMEGA
<i>Kluyveromyces lactis</i> GG799	Wildyp, industrieller Stamm	NEW ENGLAND BIOLABS

Folgende Plasmide wurden in dieser Arbeit verwendet (Tab. 3-4):

Tab. 3-4: Verwendete Plasmide

Plasmide	Merkmale	Referenz
pGEM [®] -T Easy	Amp ^r , <i>lacPOZ</i> , f1 ori, MCS	PROMEGA
pGEM [®] T Easy-DM22	pGEM::75 bp-PCR-Fragment	diese Arbeit
pJET1	<i>bla</i> (Amp ^r), P _{lacUV5} , <i>lac</i> Repressor, ColE1, <i>rep</i> (pMB1), <i>eco47IR</i> mit MCS	FERMENTAS
pJET1-DM47	pJET1::268 bp-PCR-Fragment	diese Arbeit
pET-31b(+)	T7 Promoter, <i>lac</i> Operator, KSI <i>coding sequence</i> , His tag, <i>lacI coding sequence</i> , Tet ^r	NEW ENGLAND BIOLABS
pET-31b(+)-DM22	pET-31b(+>::75 bp-PCR-Fragment mit Schnittstellen	diese Arbeit
pKLAC1	P _{LAC4-PBI} Promoter, LAC4 Transkriptions-Terminator, α -MF, MCS, <i>amdS</i> , Hefe <i>ADH2</i> Promoter (P _{ADH2}), <i>E. coli</i> ori, Amp ^r	NEW ENGLAND BIOLABS
pKLAC1-DM60	pKLAC1::75 bp-PCR-Fragment mit Kex-site und Schnittstellen	diese Arbeit

3.2.2. Anzucht und Stammhaltung von *Escherichia coli*

E. coli XL1 und BL21 wurden in LB-Medium (nach Luria-Bertani, ROTH) über Nacht bei 37 °C kultiviert (200 rpm). Dazu wurde aus einer Glycerinkultur oder von Kolonien einer Agar-Platte Zellmaterial entnommen und 5 mL LB-Medium beimpft. Zur Selektion von Transformanten von *E. coli* XL1 wurden LB-Agar-Platten oder -Medium mit Ampicillin und Tetracyclin hergestellt (Tab. 3-5). Zur Selektion von Transformanten von *E. coli* BL21 oder zur Proteinexpression wurden dem LB-Medium oder LB-Agar Ampicillin/Tetracyclin und Kanamycin zugesetzt (Tab. 3-5). Zur Stammhaltung von *E. coli* wurden 250 µL einer Über-Nacht-Kultur entnommen und mit 100 % Glycerin (steril) bis zu einer Endkonzentration von 25 % versetzt, bei -80 °C war sie dann über längere Zeit lagerbar.

Tab. 3-5: Medienzusätze zum LB-Medium/LB-Agar (ROTH)

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	10 mg/mL	100 µg/mL
Tetracyclin	12,5 mg/mL	125 µg/mL
Kanamycin	50 mg/mL	40 µg/mL

3.2.3. Anzucht und Stammhaltung von *Kluyveromyces lactis* GG799

Aus einer Stammkultur von *K. lactis* oder von einer Agar-Platte (siehe 3.6.2.) wurde steril Zellmaterial entnommen und in YPGlu-Medium (Tab. 3-6) über Nacht bei 30 °C und 200 rpm angezogen. Die Stammhaltung erfolgte in YPGlu-Medium mit 20 % Glycerin bei -80 °C.

Tab. 3-6: Zusammensetzung des YPGlu-Mediums

YPGlu-Medium
10 g Hefeextrakt
20 g Bacto-Pepton™ (Becton-Dickinson)
ad 950 mL H ₂ O bidest.
→ 20 min bei 121 °C autoklavieren, abkühlen
+ 50 mL 40 %ige Glucose-Lösung (autoklaviert)

3.3. Physiologische Untersuchungen

3.3.1. Probenahme und Wachstumsuntersuchungen

Die Pilzbiomasse wurde mit Hilfe einer Absaugapparatur mittels Vakuum und eines Rundfilters geerntet (quantitativ; Ø 55 mm; ROTH), mit 50 mL H₂O bidest. gewaschen, 1 min trocken gesaugt und sofort für anschließende Analysen eingesetzt oder bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Für die Erstellung von Wachstumskurven wurden Rundfilter zunächst über Nacht bei 65 °C getrocknet und gewogen. Anschließend wurde die Frischmasse bestimmt und die Filter mit der Pilz-Biomasse 24 h bei 65 °C getrocknet. Nach Bestimmung der Trockenmasse erfolgte die Auftragung der Wachstumskurven halblogarithmisch.

3.3.2. Vitalitätsbestimmung

Zur Vitalitätsbestimmung wurde die Aktivität der Gesamt-Dehydrogenasen gemessen (Nathan, 2007). Als Vitalitätsmarker wurde Resazurin zugesetzt und dessen Umsatz zu Resorufin fluoreszenzspektrometrisch verfolgt (Abb. 3-2).

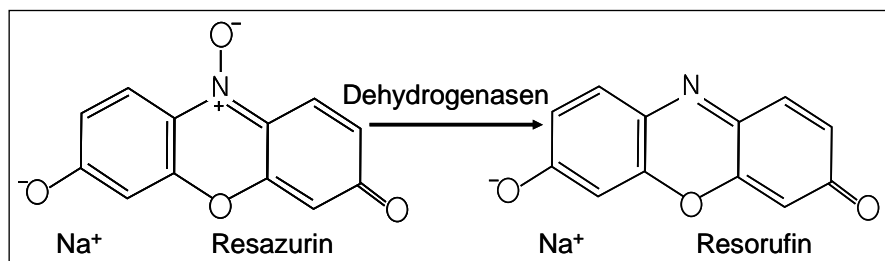


Abb. 3-2: Umsetzung des nicht-fluoreszierenden Resazurins zum fluoreszierenden Resorufin durch Dehydrogenasen; $\lambda_{\text{ex}} = 560 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$.

40 mg frische Pilz-Biomasse wurden in 20 mL 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,5 mittels UltraTurrax (IKA) resuspendiert (10 s, 16000 rpm). 190 μL dieser Pilz-Suspension wurden mit 10 μL 0,5 mg/mL Resazurin (in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5) versetzt und die Fluoreszenzänderung über 30 min ($\lambda_{\text{ex}} = 560 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$) protokolliert.

3.3.3. Proteinbestimmung

Als Bezugssystem für die Vitalitätsbestimmung wurde die Proteinmenge der eingesetzten Pilz-Biomasse gewählt, welche in 96-well-Platten nach Lowry *et al.* (1951) bestimmt wurde. Dazu wurden 95 µL der resuspendierten Biomasse mit 95 µL 20 %iger Trichloressigsäure (eiskalt) versetzt und zur Proteinfällung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die 96-well-Platte 30 min bei 4 °C und 2460 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 10 µL 1 N NaOH aufgenommen. Anschließend wurden 31 µL der TKC-Lösung (10 mL: 0,1 mL 2 % Na-K-Tartrat; 0,1 mL 1 % CuSO₄×5 H₂O; 9,8 mL 2 % Na₂CO₃) zugegeben, gut gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Zum Gemisch wurden 65,5 µL Folin-Ciocalteu-Reagenz, im Verhältnis 1:21 mit H₂O bidest. gemischt, hinzugegeben und 30 min bei RT inkubiert. Um die Menge des umgesetzten Folin-Ciocalteu-Reagenz zu bestimmen, erfolgte die Messung der Absorption bei $\lambda = 750$ nm. Mittels BSA (*bovine serum albumin*) wurde eine Kalibriergerade im Bereich von 0 bis 10 µg/µL erstellt.

3.4. Biochemische Untersuchungen

3.4.1. Synthetisches Metallothionein MT1_NECLU

Das synthetische Metallothionein (MT1_NECLU) wurde von der Firma BIOLUX bezogen. 20 mg des kleinen Proteins wurden in einer Reinheit von >98 % hergestellt. Die langfristige Lagerung dieses Proteins erfolgte unter Argon bei -80 °C, um eine Oxidation und damit die Bildung von Disulfidbrücken zu verhindern.

Proteinlösungen wurden mit Argon begast, damit überschichtet und bei -20 °C gelagert. Die Entnahme des Proteins erfolgte in einer GloveBox[®] (ROTH) unter Argonatmosphäre.

Das MT1_NECLU (P84865) hat einen theoretischen isoelektrischen Punkt (pI) von 6,43 und eine molekulare Masse von 2330,59 Da (*average*; Compute pI/Mw, ExpASY; http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) und besitzt folgende Aminosäuresequenz (Abb. 3-3; Jaeckel *et al.*, 2005):

SPCTCSTCNCAGACNSCSCTSCSH

Abb. 3-3: Aminosäuresequenz des MT1_NECLU.

3.4.2. Sulfatgehalte

Für die Bestimmung des intrazellulären Sulfatgehaltes wurden 80-100 mg Pilz-Biomasse mit flüssigem Stickstoff gemörsert, in ein Reaktionsgefäß eingewogen und mit der 3,5-fachen Menge an H₂O bidest. versetzt. Der Ansatz wurde gemischt, 10 min bei 90 °C im Heizblock inkubiert und anschließend bei 18890 g zentrifugiert, bis keine Oberphase mehr vorhanden war. Der Überstand wurde dann filtriert (Ø 13 mm; 0,45 µm; ROTH) und direkt oder nach Verdünnung mit H₂O bidest. eingesetzt. Zur Bestimmung des extrazellulären Sulfatgehaltes wurde das Medium ebenfalls filtriert (Ø 13 mm; 0,45 µm; ROTH) und analysiert.

Die Bestimmung des Sulfatgehaltes erfolgte mittels Kapillarelektrophorese und indirekter UV-Absorption (Ross, 1995) an einem HP ^{3D}Kapillarelektrophoresesystem (HEWLETT-PACKARD) mit Dioden-Array-Detektor (Tab. 3-7).

Tab. 3-7: Kapillarelektrophoretische Trennparameter

Kapillare	SUPELCO FS 50 CE; effektive Länge: 24,5 cm; ID 50 µM
Temperatur der Kapillare	20 °C (Luftkühlsystem)
Injektion	200 mbar × s
Detektion - λ _{Signal} - λ _{Referenz}	350 nm
	235 nm
Spannung	18 kV, negative Spannung (positive Peaks)

Die Quantifizierung erfolgte über eine Kalibriergerade im Bereich von 0,0625 bis 1 mM Na₂SO₄. Vor jeder Analyse wurde die Kapillare für 3 min mit 0,1 N NaOH, für 3 min mit 10 mM H₃PO₄, für 2 min mit H₂O (für die CE) und für 3 min mit Trennpuffer (Zusammensetzung s. unten) äquilibriert. Die Analysenzeit betrug 6 min.

Trennpuffer 2,25 mM Pyromellinsäure
 6,50 mM NaOH
 0,75 mM Hexamethoniumhydroxid
 1,60 mM Triethanolamin
 pH 11,4 (mit 0,1 N NaOH)

3.4.3. Sulfidgehalte

Zu 50 mg gemörserter Pilz-Biomasse wurde 1 mL entgastes H₂O bidest. zugegeben und 5 min bei 4 °C gemischt. Von der homogenen Lösung wurden 300 µL den folgenden Schritten unterworfen:

- + 1240 µL 2,6 % Zn-Acetat-Lösung
- + 240 µL 6,0 % NaOH
- 3 min bei 4 °C mischen
- + 200 µL 0,2 % N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin (in 20 % H₂SO₄)
- + 20 µL 10 % FeNH₄(SO₄) (in 2 % H₂SO₄)
- 30 min Inkubation bei 4 °C im Dunkeln
- 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 18890 g
- filtrieren (Ø 13 mm; 0,45 µm; ROTH)

Die Bestimmung des Sulfidgehaltes erfolgte nach der Metylenblau-Methode (Trüper & Schlegel, 1964; King & Morris, 1967) durch Messung der Absorption bei 665 nm (Spectrophotometer U-1100, HITACHI). Aus einer frisch hergestellten Stammlösung (mit Argon überschichtet, auf Eis gestellt) wurde eine Kalibriergerade im Bereich von 0,2-100 µmol/L Natriumsulfid erstellt.

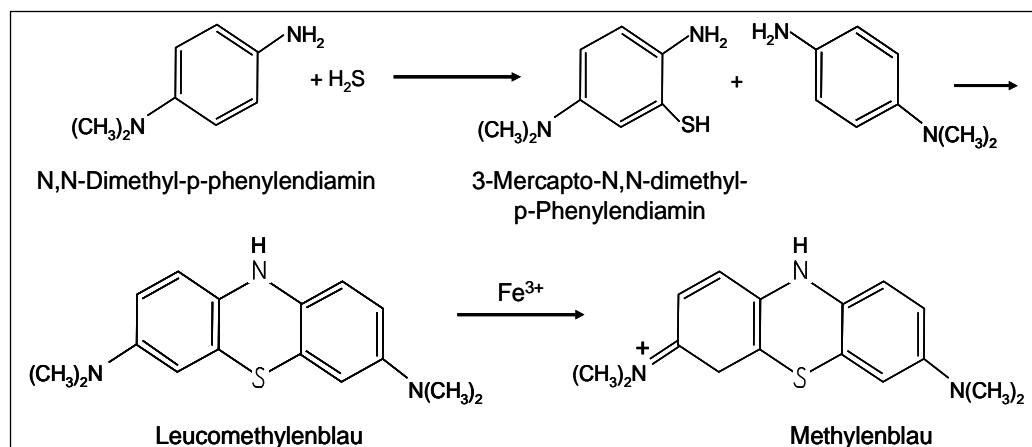


Abb. 3-4: Reaktionsschema der Metylenblau-Methode.

3.4.4. Kleine Thiol-haltige Verbindungen

Die quantitative Analyse niedermolekularer Thiole erfolgte nach Monobrombiman-Derivatisierung (Abb. 3-5) und anschließender Trennung mittels RP-HPLC an einer C18-Phase (Tab. 3-9).

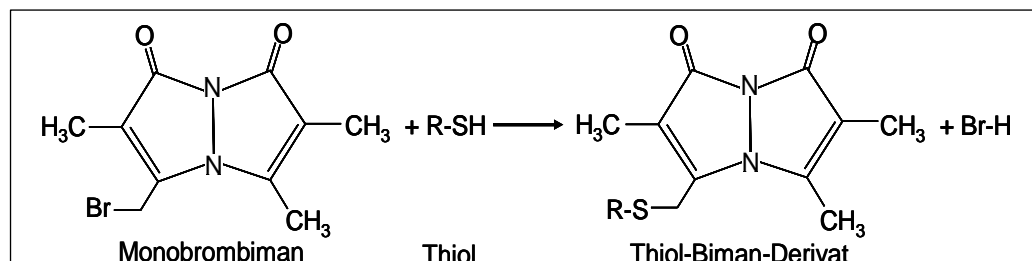


Abb. 3-5: Reaktionsschema von Monobrombiman mit Thiolgruppen.

50 mg Pilz-Biomasse wurden unter flüssigem Stickstoff gemörsert und in 1 mL 0,1 N HCl aufgenommen. Im Anschluss wurde 10 min bei 16090 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die nachfolgenden Derivatisierungen eingesetzt (Tab. 3-8).

Tab. 3-8: Derivatisierung mittels Monobrombiman

Puffer/Lösungen	Gesamt-GSH	GSSG
Pilz-Extrakt	120 µL	200 µL
200 mM CHES-Puffer pH 9,3	180 µL	300 µL
6 mM NEM (tägl. frisch)	-	50 µL → 10 min RT
Toluol-Extraktion	-	500 µL → 3x extrahieren
5 mM DTT (tägl. frisch)	30 µL → 1 h auf Eis inkubieren	30 µL zu 300 µL Toluol-Extrakt → 1 h auf Eis inkubieren
30 mM Monobrombiman in Methanol	10 µL → 15 min RT (dunkel)	10 µL → 15 min RT (dunkel)
5 % Essigsäure	250 µL	250 µL

Tab. 3-9: HPLC-Bedingungen und -Gradient bei der Bimanderivat-Analyse

Säule (stationäre Phase)	Lichrospher 60 RP Select B 5 µm; Größe: 4,6 × 250 mm (MERCK)	
Mobile Phase	A: 2 % Methanol in H ₂ O [v/v] + 2,5 mL/L Eisessig; pH 4,3 mit 10 N NaOH	
	B: 90 % Methanol in H ₂ O [v/v] + 2,5 mL/L Eisessig; pH 3,9 mit 0,1 N NaOH	
Fluss	0,9 mL/min	
Fluoreszenzdetektion	$\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ nm}$	
Injektionsvolumen	20-50 µL	
Zeit [min]	Gradient	
	A [%]	B [%]
0	100	0
15	97	3
30	0	100
30,1	0	100
35	0	100
35,1	97	3
45	97	3

Die erhaltenen Extrakte wurden bis zur HPLC Analyse dunkel und bei -20 °C aufbewahrt. Die Kalibrierung erfolgte im Bereich von 0 bis 10 µg/mL. Der GSH-Gehalt (reduziert) wurde über Subtraktion des oxidierten Anteils (GSSG) vom Gesamt-GSH ermittelt.

Vor der HPLC-Analyse wurden die Proben für 4 min bei 21910 g zentrifugiert. Je nach Thiolgehalt wurden die Proben unverdünnt oder mit 5 % Essigsäure verdünnt eingesetzt. Nach jeweils 10 Proben wurde ein Waschprogramm durchgeführt. Um die Reproduzierbarkeit der Trennungen zu überprüfen, wurde nach 20 Proben jeweils eine Standardprobe analysiert.

3.4.5. Phytochelatine und Metallothioneine

Die quantitative Analyse der höhermolekularen Thiole erfolgte mit RP-HPLC an einer C18-Phase mit DTNB-Nachsäulen-Derivatisierung (Ellman Reagenz; Tab. 3-10).

100 mg Pilz-Biomasse wurden dabei unter flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 200 µL 1 N NaOH mit 1 mg/mL NaBH₄ versetzt und kräftig gemischt. Die Suspension wurde dann 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 10 min bei 14000 g und 4 °C zentrifugiert. 100 µL Überstand wurden dann mit 28 µL 3,6 N HCl versetzt, gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter 5-minütiger Zentrifugation (21910 g, 4 °C) erfolgte die HPLC. Die Detektion von Cumarinen bei 410 nm wurde ausgeschlossen, nachdem ein pH-*shift* durchgeführt wurde (Berlich *et al.*, 2002). Über eine GSH- und eine

MT1_NECLU-Kalibriergerade wurden die PC2-Gehalte (in GSH-Äquivalenten) und die MT2_NECLU-Gehalte quantifiziert.

Für die Auswertung von HPLC-Chromatogrammen fand das Programm HSM Win 2000 (Version 4.1; MERCK und HITACHI INSTRUMENTS) Verwendung.

Tab. 3-10: HPLC-Bedingungen und -Gradient bei der Ellmanderivat-Analyse

Säule (stationäre Phase)	ProntoSIL AQ C18; 5 μ m; 120 Å; Größe: 4,6 \times 250 mm (BISCHOFF)	
Mobile Phase	A: 100 % H ₂ O; pH 3 mit TFA	
	B: 100 % Acetonitril	
Fluss	1 mL/min	
Detektion	$\lambda = 410$ nm	
Nachsäulen-Derivatisierung (1 mL-Probeschleife)	0,4 mL/min: 300 μ M DTNB in 50 mM KH ₂ PO ₄ (pH 8,0)	
Injektionsvolumen	50-400 μ L	
Zeit [min]	Gradient	
	A [%]	B [%]
0	100	0
12	97	3
30	0	100
30,1	0	100
35	0	100
35,1	97	3
45	97	3

3.4.6. Massenspektrometrie

Zur Identifizierung der in *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 gebildeten Metallothioneine und des PC2 wurden 400 μ L Pilzextrakt (aus einer Flüssigkultur mit 50 μ M Cd(II)) durch HPLC ohne Ellman-Nachsäulenderivatisierung getrennt (3.4.6.) und Fraktionen von je 0,5 mL aufgefangen. Diese wurden sofort auf Eis gestellt, mit 2 mM DTT versetzt, rechromatographiert (mit Ellman-Nachsäulenderivatisierung) und auf ihren Gehalt an Thiolen, wie PC2 und MT1_NECLU/MT2_NECLU, überprüft. Die Ellman-positiven Fraktionen wurden mittels Argonstrom eingengt oder lyophilisiert, mit 2 mM TCEP versetzt und mit Argon überschichtet. Die Lagerung bis zur massenspektrometrischen Analyse erfolgte bei -20 °C.

Die massenspektrometrischen Analysen von HPLC-Fraktionen des PC2 und der Metallothioneine sowie des synthetischen Metallothioneins MT1_NECLU erfolgten mittels

eines Q-TOF-Massenspektrometers (Q-TOF-2, WATERS GmbH). Das Spektrometer war mit einer nano-ESI Z-Spray Quelle mit PicoTip Emitter GlassTips (NEW OBJECTIVE) ausgestattet. Die Probeninjektion erfolgte mittels Spritzenpumpe bei einer Flussrate von 300 nL/min (HARVARD APPARATUS GmbH). Außerdem wurde ein Teil der Analysen mittels MALDI-TOF/TOF-MS mit einem ULTRAFLEX II-Massenspektrometer (BRUKER DALTONIK GmbH) durchgeführt. Als Matrix wurde α -Cyano-4-hydroxymethylsäure genutzt. Die Bezeichnung der Fragmente erfolgte nach Roepstorff & Fohlman (1984).

Die *de-novo*-Sequenzierung der Metallothioneine MT2_NECLU und Met-MT2_NECLU (HPLC-Fractionen) wurde mittels eines Q-TOF-Massenspektrometers (Q-TOF-2, WATERS GmbH), ausgerüstet mit einer nano-ESI Z-Spray Quelle mit PicoTip Emitter GlassTips (NEW OBJECTIVE) durchgeführt. Die Messungen erfolgten im Positiv-Ionen-Modus, mit einer Kapillarspannung von 0,9 kV und einer Konusspannung von 35 V (*low-mass* und *high-mass* Massenfilter wurden mit 15 AU definiert). Zudem wurden 2300 V für den MCP gewählt, die Temperatur der nano-ESI-Quelle betrug 80 °C, sie wurde mit einem Stickstoff-Strom von 100 psi gespült. Ein Massenbereich von m/z 300 bis 2700 wurde geprüft, die Peptide für die Fragmentierung manuell selektiert. Die Kollisionsenergie wurde zwischen 25 und 55 eV gewählt (in Abhängigkeit des Ladungszustandes und des m/z -Verhältnisses). Die Programmsteuerung erfolgte über die Software MassLynx 4.1 (WATERS/MICROMASS). Die Ergebnisse aus den Q-TOF-Tandem-MS Experimenten wurden mit der Software MassLynx 4.1 (WATERS/MICROMASS) ausgelesen, manuell geprüft und mit dem Modul Maximum Entropie 3 (MaxEnt 3) prozessiert. Die resultierenden Spektren wurden im dta-Format gespeichert, um eine automatisierte *de novo*-Sequenzierung zu ermöglichen (Software: PEAKS Studio 4.5, Bioinformatics Solutions; Ma *et al.*, 2003). Die tolerierbaren Abweichungen für Peptid- und Fragmentmassenfehler wurden mit 0,15-0,2 Da für Q-TOF-MS/MS gewählt.

3.5. Molekularbiologische Untersuchungen

3.5.1. Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese

Als Standard-Methode zur Sichtbarmachung und Größenbestimmung von DNA wurde die Agarose-Gelelektrophorese angewendet (Adkins & Burmeister, 1996). Die Auftrennung erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern mit Agarosekonzentrationen von 1-2 % [w/v] in 1× TAE-Puffer mit Ethidiumbromid (0,7 µg/mL Gel), als Laufpuffer diente ebenfalls 1× TAE (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure; pH 8,0). Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit der 0,2-fachen Menge an 6× Ladepuffer versetzt (0,25 % [w/v] Bromphenolblau, 0,25 % [w/v] Xylencyanol, 40 % [w/v] Glycerin), die Elektrophorese erfolgte bei 110 V für 30-45 min. Um die Größe von DNA-Fragmenten abzuschätzen, wurden Größenmarker (5 µL von 50 bp *ladder*, *ladder*-Mix oder 100 bp *ladder* [FERMENTAS]) auf das Gel aufgetragen.

Die DNA wurde am Gel-Imager unter UV-Licht ($\lambda=310$ nm) detektiert. Durch halb-logarithmische Auftragung der DNA-Fragmente gegen ihre Wanderungsstrecke im Gel konnten Kalibriergeraden erstellt und die Größe unbekannter Fragmente bestimmt werden.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE erfolgte in Minigel-Kammern. Zur Analyse von Metallothioneinen wurden meist Trenngele mit einer Acrylamid-Konzentration von 17,5 % verwendet (Laemmli, 1970). Die Sammelgele hatten eine Konzentration von 5 % Acrylamid. Als Laufpuffer diente Tris-Glycin-Laufpuffer (3,02 g/L Tris/Base, 14,4 g/L Glycin, 1 g/L SDS; pH 8,3). Die zu trennenden Proben wurden 1:1 mit 2× Probenpuffer (ad 10 mL H₂O bidest.: 2 mL 0,625 M Tris/HCl pH 6,8, 2 g SDS, 5 mL Glycerin 100 %, 0,5 mL 2-Mercaptoethanol, 0,1 mL Bromphenolblau 1 % in Ethanol) gemischt, 10 min bei 95 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Proben 1 min bei 18890 g zentrifugiert.

Proben und Marker wurden auf das Gel aufgetragen und 10-30 min bei 10 mA (ca. 80 V) im Sammelgel aufkonzentriert und anschließend 90-150 min bei 25 mA (ca. 100 V) getrennt (Tab. 3-11). Die Gele wurden entweder mittels Coomassie- oder Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987; Nesterenko *et al.*, 1994) unter leichtem Schütteln gefärbt.

Tab. 3-11: Zusammensetzung der Trenngel- und Sammelgel-Lösungen für die SDS-PAGE

Trenngel-Lösung (3 mL pro Gel)	
Acrylamid-Konzentration im Gel	17,5 %
Acrylamid-Stammlösung (30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid)	3,5 mL
1,88 M Tris/HCl pH 8,8	1,2 mL
0,5 % SDS	1,2 mL
H ₂ O bidest.	0,1 mL
TEMED	5 µL
10 % APS in H ₂ O (frisch)	30 µL
Sammelgel-Lösung (2 mL pro Gel)	
Acrylamid-Konzentration im Gel	5 %
Acrylamid-Stammlösung (30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid)	0,33 mL
0,625 M Tris/HCl pH 6,8	0,4 mL
0,5 % SDS	0,4 mL
H ₂ O bidest.	0,87 mL
TEMED	2 µL
10 % APS in H ₂ O (frisch)	10 µL

Coomassie-Färbung:

Färbung	2 g Coomassie Blue R-250; 0,5 g Coomassie Blue G-250; 425 mL Ethanol 96 %; 50 mL Methanol; 100 mL Essigsäure 96 % ad 1000 mL H ₂ O bidest.	ca. 60 min
Entfärbung	450 mL Ethanol 96 %; 100 mL Essigsäure 96 % ad 1000 mL H ₂ O bidest.	30-60 min
Lagerung	in H ₂ O bidest. auf Gelrahmen in Folie getrocknet	1 Woche ∞

Silberfärbung:

Fixierung	25 mL Methanol; 7,15 mL Ethanol 96 % ad 50 mL H ₂ O bidest.	mind. 60 min
Waschen	50 mL Ethanol 96 %	1× kurz waschen
Vorbehandlung	20 mg Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O in 50 mL H ₂ O bidest.	2 min
Waschen	50 mL H ₂ O bidest.	3× 20 s waschen
Imprägnierung	100 mg AgNO ₃ ; 25 µL Formaldehyd 37 % in 50 mL H ₂ O bidest.	20 min
Waschen	50 mL H ₂ O bidest.	1× kurz waschen
Entwicklung	3 g Na ₂ CO ₃ ; 0,5 mg Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O; 70 µL Formaldehyd 37 % in 50 mL H ₂ O bidest.	je nach Intensität der Färbung
Waschen	50 mL H ₂ O bidest.	2× 2 min waschen
Stoppen	25 mL Methanol; 6,8 mL Essigsäure 96 % ad 50 mL H ₂ O bidest.	10 min
Waschen	25 mL Methanol ad 50 mL H ₂ O bidest.	20-30 min
Lagerung	in H ₂ O bidest. auf Gelrahmen in Folie getrocknet	1 Woche ∞

Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Tricin-SDS-PAGE)

Die Tricin-SDS-Gelelektrophorese ist eine weitere Methode, um insbesondere kleine Proteine (z. B. MTs) zu trennen (Schägger & von Jagow, 1987; Schägger, 2006). Für die MT-Expressionsanalysen wurden Gradientengele von 15-25 % Acrylamid verwendet. Zuerst wurde die höherprozentige Trenngel-Lösung und nachfolgend die niederprozentige Trenngel-Lösung in die Gelkammer gepumpt (Tab. 3-12).

Tab. 3-12: Zusammensetzung der Trenngel- und Sammelgel-Lösungen für die Tricin-SDS-PAGE

Trenngel-Lösung (3 mL pro Gel)	
Acrylamid-Konzentration im Gel	15/25 %
x % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid	30/49 %
Acrylamid-Stammlösung	2,5 mL
1 M Tris/HCl pH 8,45	1,3 mL
10 % SDS	50 µL
H ₂ O bidest.	1,1 mL
Harnstoff	0,9 g
TEMED	2 µL
10 % APS in H ₂ O (frisch)	50 µL
Sammelgel-Lösung (2 mL pro Gel)	
Acrylamid-Konzentration im Gel	5 %
Acrylamid-Stammlösung (30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid)	0,33 mL
0,625 M Tris/HCl pH 6,8	0,4 mL
0,5 % SDS	0,4 mL
H ₂ O bidest.	0,87 mL
Harnstoff	0,4 g
TEMED	2 µL
10 % APS in H ₂ O (frisch)	10 µL

Die Proteinproben wurden 1:1 mit 2× Tricin-Probenpuffer (ad 10 mL H₂O bidest.: 1 mL 1 M Tris/HCl pH 6,8, 0,8 g SDS, 3 g Glycerin 100 %, 0,31 g DTT, 2 mg Coomassie Blue G-250) versetzt, 3 min bei 95 °C erhitzt, abgekühlt und kurz zentrifugiert. Die Trennung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei der SDS-PAGE mittels eines Kathodenpuffers (obere Pufferkammer; Kathodenpuffer: 12 g/L Tris/Base, 17,92 g/L Tricin, 1 g/L SDS, pH nicht einstellen) und eines Anodenpuffers (untere Pufferkammer; 5× Anodenpuffer: 121,1 g/L Tris/Base, ad 500 mL H₂O bidest. pH 8,9 mit konz. HCl, ad 1000 mL H₂O bidest.).

Alle hergestellten Puffer konnten bei 4 °C aufbewahrt werden. Als Marker wurde der Protein-Marker Broad Range verwendet (2-212 kDa; NEW ENGLAND BIOLABS) und zusätzlich Aprotinin mit einer Größe von 6,5 kDa.

3.5.2. DNA-Isolierung

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte mittels ChargeSwitch[®] Nucleic Acid Purification Technology (INVITROGEN) nach den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde in 30 μ L DEPC-H₂O aufgenommen und bis zur ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (PEQLAB). Zur Präparation wurde eine Übernachtskultur von *E. coli* (5 mL) eingesetzt und nach Protokoll des Herstellers aufgearbeitet. Die DNA wurde mit 30 μ L DEPC-H₂O eluiert.

Zur Isolierung von PCR-Produkten aus einem Agarosegel wurde das peqGOLD Gel Extraction Kit (Classic Line; PEQLAB) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

3.5.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentration einer Nukleinsäurelösung wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm photometrisch bestimmt. Dazu wurden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Nach (Sambrook *et al.*, 1989) lässt sich die Konzentration folgendermaßen berechnen:

Absorption = 1 entspricht: 50 μ g/mL doppelsträngige DNA
31 μ g/mL Oligonukleotide
40 μ g/mL RNA

Für RNA-Konzentrationsbestimmungen wurde das UV/VIS-Spektralphotometer NanoDrop ND1000 (PEQLAB) verwendet.

Die Reinheit von Nukleinsäurelösungen konnte durch photometrische Messungen ebenfalls ermittelt werden. Ist eine Nukleinsäurelösung proteinfrei, sollte das Verhältnis von OD_{260 nm} zu OD_{280 nm} bei einem Wert von ca. 1,8 liegen.

3.5.4. Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente erfolgte mittels PCR (*polymerase chain reaction*). Die genomische DNA aus *H. lugdunensis* diente als Matrize. Die Standard-Reaktion wurde in einem Volumen von 20 μ L im Thermoblock (HYBAID) durchgeführt.

Reaktionsansatz

- 2 μL genomische DNA (50-100 ng)
- 2 μL 10 \times GoTaq[®]-Puffer mit 20 mM MgCl₂
- 2 μL Oligonukleotid *forward* (2 pmol)
- 2 μL Oligonukleotid *reverse* (2 pmol)
- 1 μL dNTP-Lösung (10 mM)
- 0,5 μL GoTaq[®] DNA-Polymerase

ad 20 μL H₂O bidest.

erste Denaturierung	2 min	95 °C	
Denaturierung	30 s	95 °C	} 33 Zyklen
<i>annealing</i>	30 s	50-65 °C	
<i>extension</i>	30 s	72 °C	
<i>final extension</i>	10 min	72 °C	

5-20 μL des Reaktionsansatzes wurden mit der 0,2-fachen Menge 6 \times Ladepuffer versetzt und mittels Standard-Gelelektrophorese (3.5.1.) getrennt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Oligonukleotide für die PCR und Sequenzierungen verwendet (Tab. 3-13):

Tab. 3-13: Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'-Richtung	Verwendung	Firma
smt_U	GTGAGAGCAAGAGGGTGAAGAGCAAGAGTTGCACGCAC CCGCCAGTTGCAGGTAGAGCAGGTGCACGGAGACAT	75mer, Klonierung des MT	METABION
smt_D	TCTCCGTGCACCTGCTCTACCTGCAACTGCCGGGTGC GTGCAACTCTTGCTTGCACCTCTTGCTCTCACATG	75mer, Klonierung des MT	METABION
smMT_MT1forward	AAACATATGTCTCCGTGCACCTGCTCT	27mer, Klonierung des MT in den Vektor pET31b+, Ndel-Schnittstelle	METABION
smMT_MT1reverse2	AAACTCGAGTTAATGAGAAACAAGAAGTACAAGAACA	36mer, Klonierung des MT in den Vektor pET31b+, XhoI-Schnittstelle	METABION
MTHLfor1	ATGTCYCCSTGCACSTGCTCYACSTGC	27mer, Identifizierung des MT in H.I., ergibt 1 PCR-Produkt	METABION
MTHLrev1	STGRGAGCARGASGTGCARGAGCA	24mer, Identifizierung des MT in H.I., ergibt 1 PCR-Produkt	METABION
MTHLfor2	ATGTCNCCITGYACNTGY	18mer, Identifizierung des MT in H.I.	METABION
MTHLrev2	TGIGARCANGANGTRCA	17mer, Identifizierung des MT in H.I.	METABION
MTHLfor3	ATGAGYCCITGYACNTGY	18mer, Identifizierung des MT in H.I.	METABION
MTHLrev3	TGRCTRARCNTGTRCA	17mer, Identifizierung des MT in H.I.	METABION
MTHLfor1reversed	GCASGTRGAGCASCSTGCASGGRGACAT	27mer, Identifizierung der MT-Regulationsregion in H.I.	METABION
MTHLregul	TGCGTCTTTATTGCTGTG	18mer, Identifizierung der MT-Regulationsregion in H.I.	METABION
Klactisfor	AAACTCGAGAAAAAAGTCTCCGTGCACCTGCTCT	36mer, Klonierung des MT in den Vektor pKLAC1, XhoI-Schnittstelle	OPERON
Klactisrev	AAAGCGCCGCTTAGTGAGAGCAAGAGGTGCAAGA	35mer, Klonierung des MT in den Vektor pKLAC1, NotI-Schnittstelle	OPERON
SeqPrimer KL1	GCGGATAACAAGCTCAAC	18mer, Sequenzierungsprimer für pKLAC1, LAC4mt Promotor Sequencing Primer	OPERON
SeqPrimer KL2	GAAGAAGCCTTGATTGGA	18mer, Sequenzierungsprimer für pKLAC1, α -Mating Factor Sequencing Primer	OPERON
SeqPrimer KL3	TTATCGCACAAAGACAATC	18mer, Sequenzierungsprimer für pKLAC1, reverse	OPERON
T7-Primer	TAATACGACTCACTATAGGG	20mer, Sequenzierungsprimer für pJET1, forward	METABION
SP6-Primer	ATTTAGGTGACACTATAG	18mer, Sequenzierungsprimer für pJET1, reverse	METABION

3.5.5. Restriktion

Die Restriktion von PCR-Produkten und Plasmiden mit bestimmten Restriktions-Schnittstellen erfolgte mittels spezifischer Restriktionsenzyme (FERMENTAS). Es wurden folgende Restriktionsansätze durchgeführt und bei 37 °C für 2 h inkubiert:

Restriktionsansatz 1 µL 10× Puffer (je nach Enzym)
 3 µL Plasmid (150-300 ng)
 0,5 µL Restriktionsenzym 1
 0,5 µL Restriktionsenzym 2
 ad 10 µL H₂O bidest.

3.5.6. Ligation

Die Ligation von mit Restriktionsenzymen geschnittenen Plasmiden und PCR-Produkten erfolgte mittels T4-Ligase (FERMENTAS) über Nacht bei 4 °C oder für 5 h bei RT.

Ligationsansatz 1,5 µL 10× Ligationspuffer
 3 µL geschnittenes Plasmid (150-300 ng)
 9,5 µL geschnittenes PCR-Produkt (Insert; 150-250 ng)
 1 µL Ligase

3.5.7. Herstellung kompetenter *Escherichia coli* und Transformation

Herstellung CaCl₂-kompetenter *Escherichia coli*

1 mL einer Über-Nacht-Kultur von *E. coli* in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurde in 100 mL LB-Medium angeimpft (mit halber Konzentration an Antibiotikum) und bei 37 °C ca. 3-4 h bis zu einer OD_{600nm} = 0,3-0,5 schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden je 50 mL in eiskalte GREINER-Röhrchen (ROTH) überführt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Röhrchen wurden dann 10 min bei 4 °C und 3000 g zentrifugiert und der Überstand (Medium) entfernt. Das Zellpellet wurde mit 10 mL eiskalter 0,1 M CaCl₂-

Lösung resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes erfolgte die Zugabe von 2 mL eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung und eine Inkubation für mind. 3 h auf Eis. Die so behandelten Zellen werden dann zur Transformation verwendet oder bei -80 °C eingefroren. Dazu wurden je 2 mL Zellen mit 25 % Glycerin versetzt (steril; 667 µL) und jeweils 100 µL in Reaktionsgefäße aliquotiert.

Transformation kompetenter *Escherichia coli*

100 µL CaCl₂-kompetente *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit 15 µL Ligationsansatz gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C, der Ansatz wurde dann 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgten die Zugabe von 0,8 mL LB-Medium und eine Inkubation für 1 h bei 37 °C und Schütteln. 150 µL davon wurden dann auf LB-Agar mit den entsprechenden Antibiotika-Zusätzen ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden auf das Plasmid mit Insert geprüft (Restriktion/PCR/Sequenzierung). Die LB-Platten wurden bei 4 °C gelagert.

3.5.8. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mittels Kettenabbruchverfahren nach (Sanger *et al.*, 1977). Zur Sequenzierung am automatischen ABI-Sequencer 377 (Version 4.0, ABI) wurde der *Dye Terminator Reaction Mix* (ABI) angewendet. Es wurden 0,2-0,7 µg Plasmid-DNA im Sequenzierungsansatz (Thermoblock; HYBAID) eingesetzt:

Reaktionsansatz 2-7 µL Plasmid-DNA (100 ng/µL)
 1 µL Oligonukleotid (10 pmol)
 2 µL *Dye Terminator Reaction Mix*
 ad 10 µL H₂O bidest.

Denaturierung	30 s	95 °C	} 33 Zyklen
annealing	30 s	50-65 °C	
extension	2 min	60 °C	

Nach Beendigung der Reaktion erfolgte eine Ethanol-fällung bei RT zur Entfernung der nicht eingebauten Nukleotide (0,1 Vol. 3 M Na-Acetat pH 5,2; 3 Vol. Ethanol 96 %) und eine

Zentrifugation (20 min, 18890 g). Das Waschen des Pellets erfolgte mit 0,5 mL Ethanol 70 %, es wurde bei 37 °C getrocknet. Bis zur Sequenzierung wurde das Pellet bei -20 °C gelagert. Das Pellet wurde in 4 µL Gelpuffer (*Formamide Loading Dye*, ABI) gelöst und vor dem Auftragen auf das Sequenziergel für 2 min bei 90 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt.

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mittels Computerprogramm CHROMAS (Version 1.43; Brisbane, Australien). Sequenzhomologien zu den in den Datenbanken enthaltenen DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem vom NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI) bereitgestellten Programm BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL ermittelt (Altschul *et al.*, 1997; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome).

3.5.9. Isolierung von RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mittels SpectrumTM Plant Total RNA Kit (SIGMA-ALDRICH) nach den Angaben des Herstellers. Die RNA wurde in 30 µL DEPC-H₂O eluiert und bis zu ihrer Verwendung kurzfristig bei -20 °C, längerfristig bei -80 °C gelagert.

3.5.10. Northern-Hybridisierung

Das PCR-Produkt des MT-Gens (75 bp; *mt2_neclu*) wurde als Sonde zur Hybridisierung eingesetzt. Dazu wurde es mit Hilfe des 10× DIG DNA Labeling Mix (ROCHE) in folgender PCR-Reaktion mit Digoxigenin-11-dUTP markiert:

Markierungsansatz 8 μL 5 \times GoTaq[®] PCR-Puffer (ohne MgCl_2)
6,4 μL 20 mM MgCl_2
1,6 μL Oligonukleotid MTHL1for, 10 pmol (*forward* Primer)
1,6 μL Oligonukleotid MTHL1rev, 10 pmol (*reverse* Primer)
2 μL PCR-Produkt/Sonde (200 ng)
2 μL 10 \times DIG DNA Labeling Mix
0,25 μL GoTaq[®]-Polymerase
ad 40 μL H_2O bidest.

Es wurden die gleichen PCR-Bedingungen wie unter 3.5.4. verwendet, die *annealing*-Temperatur betrug 60 °C. Der gesamte PCR-Ansatz wurde dann mit der 0,2-fachen Menge 6 \times Ladepuffer versetzt und mittels Standard-Gelelektrophorese getrennt und aus dem Gel isoliert (s. 3.5.1.). Die DNA-RNA-Hybridisierung wurde genutzt, um die Metallothionein-Gene auf RNA-Ebene nachzuweisen und das induzierte *mt2_neclu*-Gens semi-quantitativ zu bestimmen.

Transfer der RNA auf Nylonmembranen

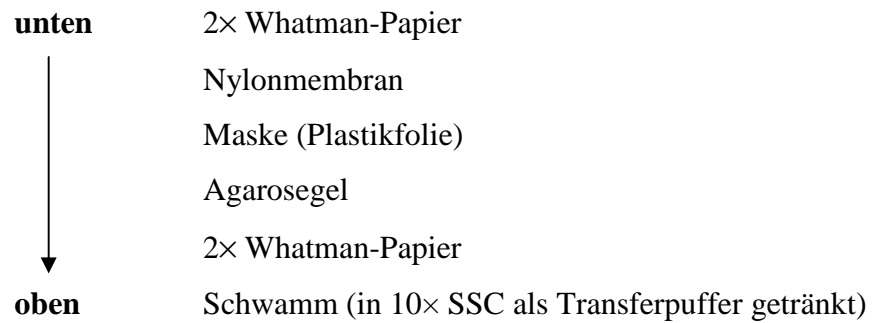
Die isolierte Gesamt-RNA aus *H. lugdunensis* wurde in einer denaturierenden Gelelektrophorese (Zusammensetzung s. unten) aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1 \times MOPS.

denaturierendes Agarosegel 1,125 g Agarose (1,5 %)
(75 mL) 60 mL H_2O bidest. steril
7,5 mL 10 \times MOPS (Zusammensetzung s. unten)
8 mL Formaldehyd (37 %)

Je 20 μg RNA in 50 μL DEPC- H_2O wurden zur Fällung mit 4 μL 4 M NaCl versetzt und mit 100 μL Ethanol 99,8 % gemischt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach Zentrifugation (20 min bei 21910 g, 4 °C) wurde das RNA-Pellet einmal mit 100 μL Ethanol 99,8 % gewaschen, erneut zentrifugiert und steril getrocknet. Die Auftragung auf das denaturierende Agarosegel erfolgte nach Aufnahme in 18 μL RNA-Probenpuffer, Zentrifugation, Denaturierung 10 min bei 65 °C und 2 min Abkühlung auf Eis. Als Marker diente der RNA-Marker III (50 ng; ROCHE). Die denaturierende Agarose-Gelelektrophorese erfolgte ca. 90 min. Danach wurde das Gel 15 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Die RNA wurde ca. 1 h mittels Ethidiumbromid (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 2 \times SSC, pH 7) sichtbar gemacht. Zum

Entfärben wurde das Gel für 30 min bei RT in 2× SSC und über Nacht bei 4 °C gewaschen. Das Gel wurde bis zum Transfer der RNA auf die positiv geladene Nylonmembran (ROCHE) in 10× SSC (Zusammensetzung s. unten) aufbewahrt werden.

Der Aufbau des Blots erfolgte auf das Druckblotgerät „PosiBlot 30-30 Pressure Blotter and Pressure Control Station“ (STRATAGENE):



Der Transfer erfolgte für 1-1,5 h mit 10× SSC bei 70-80 mbar, danach wurde die Position des Gels auf der Membran markiert und die RNA durch 2-minütige UV-Bestrahlung der Membran (120 mJoule; UV Stratalinker, STRATAGENE) 2× auf jeder Seite kovalent gebunden und konnte anschließend direkt zur Hybridisierung eingesetzt werden.

20× SSC	3 M NaCl
	0,3 M Na-Citrat × 2 H ₂ O
	pH 7,0 mit Zitronensäure

10× MOPS	0,4 M MOPS
	0,1 M Natriumacetat
	10 mM Na-EDTA
	pH 7,2 mit 1 N NaOH

1× RNA-Probenpuffer	1,6 µL 10× MOPS
	8 µL Formamid
	2,8 µL Formaldehyd 37 %
	4 µL Dye (50 % Glycerin+0,04 % [w/v] Bromphenolblau)
	ad 20 µL H ₂ O bidest. steril

Hybridisierung

Die Hybridisierung der Nylonmembran erfolgte mit High-SDS-Hybridisierungspuffer in Borosilikat-Hybridisierungsröhrchen (steril) im OV3-Hybridisierungsöfen (beides WHATMAN-BIOMETRA®). Zur Blockierung unbesetzter Bindestellen wurde die Nylonmembran für 1,5 h bei 50 °C mit 20 mL High-SDS-Hybridisierungspuffer ohne Sonde prähybridisiert. Zur Hybridisierung wurde der Prähybridisierungspuffer entfernt und durch 20 mL High-SDS-Hybridisierungspuffer mit 10 µL *mt_neclu*-Sonde (10 min bei 68 °C erhitzt und 2 min bei -20 °C abgekühlt) ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 50 °C. Am nächsten Tag wurden unspezifisch gebundene Sondenmoleküle 2× 15 min bei RT mit Waschpuffer 1 und 2× 15 min bei 50 °C mit Waschpuffer 2 unter Schwenken von der Membran gewaschen.

High-SDS-Hybridisierungspuffer

- 7 % [w/v] SDS
- 50 % [v/v] Formamid
- 25 % [v/v] 20× SSC
- 20 % [v/v] 10× Blockierungslösung
- 5 % [v/v] 1 M Na-Phosphatpuffer (pH 7)
- 1 % [v/v] 10 % N-Lauroylsarcosin-Lösung

Waschpuffer 1

- 2× SSC
- 0,1 % [w/v] SDS

Waschpuffer 2

- 0,5× SSC
- 0,1 % [w/v] SDS

Detektion

Nach der Hybridisierung erfolgte ein 3-minütiges Äquilibrieren in Waschpuffer 3. Anschließend wurde die Membran 45 min in 1× Blockierungslösung geschwenkt und danach für 30 min in 1× Blockierungslösung mit Anti-DIG-AP-Konjugat (ROCHE) bei RT inkubiert. Es folgten 2× 15 min Waschen in Waschpuffer 3 bei RT, um unspezifisch an der Membran haftendes Anti-DIG-AP-Konjugat zu entfernen. Nach Äquilibrierung der Membran für 2 min in 1× Detektionspuffer bei RT wurden im Nachweisverfahren 20 Tropfen CDP-Star™ *ready-to-use*-Lösung (ROCHE) als Substrat für die alkalische Phosphatase eingesetzt. Die Membran

lag zwischen zwei Acetatfolien und wurde 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte je nach Signalstärke 2,5-8 h durch Belichtung eines Röntgenfilms (Hyperfilm™ ECL™, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH EUROPE) in einer lichtundurchlässigen Filmkassette. Der Film wurde in einer Dunkelkammer entwickelt.

Maleinsäurepuffer	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH 7,5 mit festem NaOH
Waschpuffer 3	10 % [v/v] Maleinsäurepuffer 0,3 % Tween 20
10× Blockierungslösung	10 % [w/v] <i>blocking reagent</i> (ROCHE) in Maleinsäurepuffer, bei 4 °C lagern
1× Blockierungslösung	10× Blockierungslösung in Maleinsäurepuffer verdünnt
Anti-DIG-AP-Konjugat	Anti-Digoxigenin Alkalische-Phosphatase 1:10000 in 1× Blockierungslösung
1× Detektionspuffer	0,1 M Tris 0,1 M NaCl pH 9,5 mit 10 N HCl

3.6. Proteinexpression

3.6.1. Proteinexpression in *Escherichia coli* BL21

Die rekombinante Expression der Metallothioneine MT2_NECLU bzw. MT1_NECLU erfolgte mittels *E. coli* BL21. Dazu wurden CaCl₂-kompetente Zellen von *E. coli* BL21 mit den entsprechenden Plasmiden transformiert und auf Selektiv-LB-Agarplatten ausplattiert (3.5.8.). Nach der Überprüfung der erfolgreichen Transformation und Insertion des zu

exprimierenden Gens (PCR/Sequenzierung) wurden die entsprechenden Kolonien in 5 mL LB-Medium mit Ampicillin und Kanamycin (3.2.2.) über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Die Vorkultur wurde anschließend 1:10 in 30 mL neues LB-Medium überführt und bei 37 °C und 200 rpm für 2-3 h inkubiert. Bei einer OD_{600nm} von ca. 0,5 bis 0,6 wurde die Expression der Proteine mittels IPTG induziert (Endkonzentration 1 mM). Anschließend wurden die *E. coli* 5-6 h bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Die Ernte von 1 mL Bakterienkultur erfolgte mittels Zentrifugation für 5 min bei 21910 g und 4 °C. Das Zellpellet wurde nach Zugabe von 1 mL 20 mM Tris-HCl (pH 7,8) mit 2 mM DTT für 15 min bei 95 °C aufgeschlossen. Anschließend kühlte die Probe 5 min auf Eis ab und wurde 5 min bei 4 °C und 21910 g zentrifugiert.

30 mL oder 1 L Bakterienkultur wurde nach Induktion der Proteinexpression für 10 min bei 4 °C und 10000 g geerntet. Der Aufschluss der Zellen erfolgte nach Zugabe von 10 mL 20 mM Tris-HCl (pH 7,8) mit 2 mM DTT mittels Ultraschall (3× 1 min bei 100 % und 60/min; dazwischen je 2 min Abkühlen auf Eis). Anschließend erfolgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 10000 g. Die Überstände wurden für die Analyse mittels SDS-PAGE oder Tricine-SDS-PAGE eingesetzt (3.5.1.).

3.6.2. Proteinexpression in *Kluyveromyces lactis* GG799

Die zweite Expressionsstrategie der Metallothioneine erfolgte mittels der sogenannten „Milchhefe“ *Kluyveromyces lactis*, die im *K. lactis* Protein Expression Kit (NEW ENGLAND BIOLABS) nach den Angaben des Herstellers verwendet wurde.

Der Vektor pKLAC1 kann dabei zur intrazellulären Expression von Proteinen oder zur Sekretion der exprimierten Proteine verwendet werden. Das MT1_NECLU sollte in diesem Experiment durch die Hefe sekretiert und ins Medium abgegeben werden (Abb. 3-6). Die Sekretionsstrategie wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

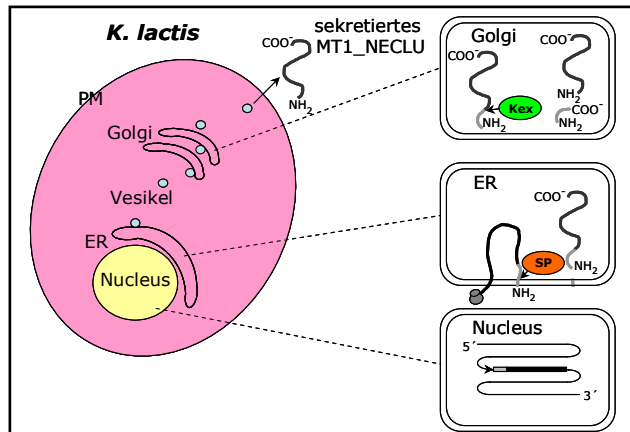


Abb. 3-6: Expression des MT1_NECLU in *K. lactis* (modifiziert nach NEW ENGLAND BIOLABS); PM: Plasmamembran; ER: endoplasmatisches Reticulum; SP: Signalpeptidase; Kex: Kex-Protease.

3.7. Strukturuntersuchungen

3.7.1. Homologiemodellierung

Zur Bestimmung der theoretischen Struktur des Metallothioneins MT1_NECLU wurde durch Frau Dr. Sabine Gebauer (Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abt. Molecular Modelling - Frau PD Dr. Iris Thondorf, MLU Halle) eine Homologiemodellierung durchgeführt. Dazu wurden mit Hilfe des BLAST-Programms des NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) MT1_NECLU-ähnliche Proteine bzw. Proteindomänen gesucht.

Anschließend erfolgte ein *alignment* der Proteinsequenzen mittels ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>; Larkin *et al.* (2007)). Die Modellierung der 3D-Struktur der Metallothioneine bzw. der Metallothionein-Domänen erfolgte mit MODELLER (Sali & Blundell, 1993; Sanchez & Sali, 2000) und Composer (Programm SYBYL, Versionen 6.7 und 6.8, TRIPOS Associates Inc.). Zur Bewertung der Modelle wurden Ramachandran-Plots erstellt (PROCHECK; Morris *et al.* (1992); Laskowski *et al.* (1993)) und energetische Kriterien betrachtet (ProSA; Sippl (1993)). Die Untersuchung der Stabilität der Modelle erfolgte durch Moleküldynamik-Simulationen (AMBER 7.0; Case *et al.* (2002); Case *et al.* (2005)). Dabei wurde zunächst der *backbone* fixiert (zwei aufeinanderfolgende Simulationen mit Kraftkonstanten k von 1 und 0,1 N/m), um eine Relaxierung der Seitenketten zu ermöglichen. Daran schloss sich eine weitere Simulation aller *constraints* an, die dann zur Generierung der Durchschnittsstrukturen von drei MT-Modellen und der

mittleren geometrischen Parameter diente (Tab. 5-4). Die wichtigsten Parameter der Berechnungen sind in Tab. 3-15 aufgeführt.

Tab. 3-15: Wichtige Parameter bei der Homologiemodellierung

Kraftfeld	AMBER 7.0
Parameter für Cd(II)	$\epsilon = 0,0304$ kcal/mol; $R_{\min/2} = 1,460$ Å (Babu & Lim, 2006)
Lösungsmittel	H ₂ O (implizit)
<i>backbone constraints</i>	$k = 1,0; 0,1; 0$ N/m
Dauer je MD	1 ns
Ladungen	AMBER (parm99)

3.7.2. Fern-UV-Circulardichroismus

Die Untersuchungen des MT1_NECLU mittels Fern-UV-Circulardichroismus erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Ralph Golbik (Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abt. Mikrobielle Biotechnologie, MLU Halle).

Für die CD-Messungen wurde die Konzentration des Proteins spektrometrisch bestimmt. Es wurde ein Spektrum im Bereich von 200 bis 260 nm aufgenommen und die Konzentration c über das Lambert-Beersche Gesetz $E_\lambda = \epsilon_\lambda \times c \times d$ berechnet (Kleber *et al.*, 1988). Dabei bezeichnet d die Schichtdicke der Küvette (in cm), ϵ_λ den Extinktionskoeffizienten der Peptidbindungen und E_λ die Extinktion der Peptidbindungen bei einer Wellenlänge von $\lambda = 202$ nm.

$$c = E_\lambda / \epsilon_\lambda \times d$$

$$c = E_\lambda / 6,38 \text{ [L/mmol} \times \text{cm]} \times 0,1 \text{ cm}$$

Die CD-Messungen erfolgten mittels eines Spektropolarimeters (J810, JASCO) bei 10 °C, in einem Stickstoffstrom. Die Konzentration des MT1_NECLU betrug 183 μ M in H₂O bidest. Zu der MT1_NECLU-Lösung wurde in Schritten die gleiche molare Menge an Cd(II) (183 μ M CdCl₂), die doppelte, vierfache sowie die zehnfache Menge zugegeben. Die Weglänge der Messküvette betrug 1 mm und die Brennweite $f = 226,8831503$. Es wurden jeweils 40 Spektren mit einer Geschwindigkeit von 100 nm/min akkumuliert. Die Spektren wurden mittels der Software Kaleidagraph™ aufgenommen und ausgewertet.

3.7.3. Untersuchungen mittels 400 MHz-NMR-Spektroskopie

Die Strukturuntersuchungen mittels 400 MHz-NMR-Spektroskopie erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Carmen Mrestani-Klaus (Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abt. Naturstoffbiochemie, MLU Halle).

Zur Untersuchung der Struktur des synthetischen apo-Metallothioneins MT1_NECLU wurden alle Schritte der Probenvorbereitung in einem unter Argon-Atmosphäre (Argon 5.0, AIR LIQUIDE) gehaltenen Sekuroka[®]-Glove Bag (70×70 cm, ROTH) durchgeführt, um Oxidationen des Proteins zu vermeiden. Das Protein wurde in Konzentrationen von 1-2 mM in H₂O bidest. (mit 0,03 % 2-Mercaptoethanol, 10 % D₂O, 10 min unter Argonatmosphäre mit Argon durchspült) eingesetzt. 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat (DSS; MERCK) wurde als interner Standard (1 mg/L) der Probe zugesetzt. Der pH-Wert der Proteinlösung betrug 6,9. Zur Untersuchung der Cd(II)-Komplexierung wurde die Probe mit 10 mM CdCl₂ (in H₂O bidest. mit 0,03 % 2-Mercaptoethanol und 10 % D₂O) versetzt. Der pH-Wert änderte sich kaum (pH 6,7).

Die so vorbereitete Probe wurde erneut ca. 10 min mit Argon durchspült und in ein mit Argon gefülltes J. Young-Valve-NMR-Röhrchen (Abb. 3-7; WILMAD) überführt. Dieses spezielle verschließbare NMR-Röhrchen wurde vor und nach Befüllung mit der Probe in je vier Zyklen mit Hilfe eines TIP-OFF Manifolds (zwei Ports; WILMAD) und einer Membranpumpe evakuiert, mit Argon belüftet und anschließend fest verschlossen. Die Lagerung der gelösten Metallothionein-Proben apo-MT1_NECLU und Cd-MT1_NECLU erfolgte im J.-Young-Valve-NMR-Röhrchen unter Argon-Atmosphäre bei 4 °C.

Die Strukturuntersuchungen des apo- und des Cd₂-MT1_NECLU wurden hauptsächlich bei 300 K an einem 400 MHz-NMR-Spektrometer (AVANCE 400, BRUKER Biospin GmbH) mit einem herkömmlichen Probenkopf (5 mm TBI ¹H, BRUKER Biospin GmbH) durchgeführt. Die ¹H-chemischen Verschiebungen wurden gegen den internen Standard DSS (MERCK) kalibriert. Die Wasserunterdrückung konnte durch Vorsättigung (*presaturation*) der Wasserresonanz erzielt werden. Es wurden von beiden Proben eindimensionale ¹H-Spektren sowie zweidimensionale COSY-, TOCSY- und NOESY-Spektren aufgenommen. Die wichtigsten Bedingungen bei der Aufnahme der NMR-Spektren sind in Tab. 3-15 aufgeführt. Die NMR-Spektren wurden mit Hilfe der Software TOPSPIN 1.3 (BRUKER Biospin GmbH) prozessiert und ausgewertet.

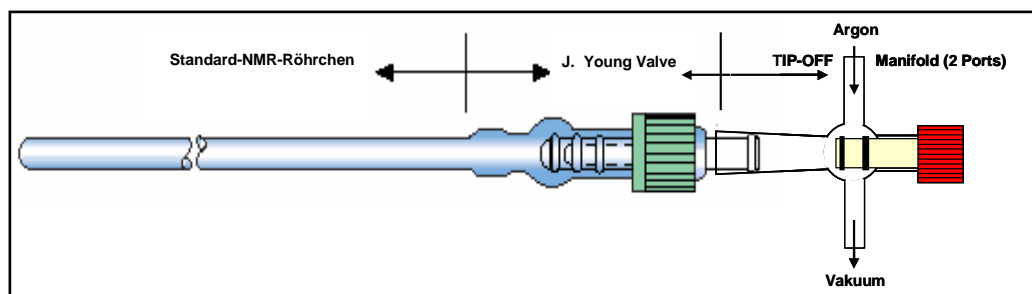


Abb. 3-7: Darstellung eines J. Young-Valve-NMR-Röhrchens mit TIP-OFF Manifold, welches zwei Anschlüsse besitzt (nach WILMAD-Katalog, 2006).

Tab. 3-15: Wichtige Parameter bei der 400 MHz-NMR-Spektroskopie

Parameter	eindimensional	zweidimensional
MHz	400,13	
Wasserunterdrückung	^1H -Presaturation	COSY/TOCSY: Presaturation NOESY: WATERGATE
scans/Analysen pro Spektrum	512	16/96
Pulsprogramm	zgpr	COSY: cosyphpr TOCSY: mlevprtp NOESY: noesygp19
Mischzeit	-	TOCSY: 60 ms NOESY: 300 ms
Temperatur	meist 300 K	
Lösungsmittel	90 % H_2O /10 % D_2O mit 0,03 % 2-Mercaptoethanol	
Kalibrierung	intern mit 1 mg/L 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat (DSS; MERCK)	

3.7.4. Untersuchungen mittels *microcoil* 600 MHz-NMR-Spektroskopie

Die Strukturuntersuchungen mittels *microcoil* 600 MHz-NMR-Spektroskopie erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Klaus Albert und Herrn Dipl.-Chem. Marc Bayer (Institut für Organische Chemie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen).

Das Protein MT1_NECLU wurde in einer Konzentration von 2-3 mM eingesetzt und in entgastem H_2O bidest. mit 0,03 % 2-Mercaptoethanol und 10 % D_2O bzw. in 100 % D_2O (Uvasol 99,8 %; MERCK) gelöst und mit Stickstoff überschichtet. Zur Untersuchung der Cd(II)-Komplexierung wurde die vier- bis zehnfache molare Menge an Cd(II) (CdCl_2 in 90 % H_2O /10 % D_2O bzw. in 100 % D_2O mit 0,03 % 2-Mercaptoethanol) zugegeben.

Die Proben wurden in die Kapillare des Probenkopfes (1 μL ; PROTASES) überführt und mittels *microcoil* 600 MHz-NMR-Spektrometer (AMX 600; 14,1 T; BRUKER Biospin

GmbH) bei 298 K vermessen. Bei allen NMR-Messungen erfolgte die Wasserunterdrückung durch Vorsättigung (*presaturation*) der Wasserresonanz. Zur Strukturbestimmung des apo- und des Cd₂-Metallothioneins wurden eindimensionale ¹H-Spektren sowie zweidimensionale COSY-, TOCSY- und NOESY-Spektren in 100 % D₂O und in 90 % H₂O/10 % D₂O aufgenommen. Wichtige Bedingungen bei der Aufnahme der *microcoil* NMR-Spektren sind in Tab. 3-16 aufgeführt. Das NMR-Spektrometer wurde über eine *O2 workstation* (SILICON GRAPHICS) gesteuert, mittels XWIN-NMR-Software 3.0 (Bruker Biospin GmbH) erfolgte die Datenaufnahme und die Prozessierung und Auswertung der Spektren mittels der Software TOPSPIN 1.3 (BRUKER Biospin GmbH).

Tab. 3-16: Wichtige Parameter bei der *microcoil* 600 MHz-NMR-Spektroskopie

Parameter	eindimensional	zweidimensional
MHz	600,13	
Wasserunterdrückung	¹ H-Presaturation	COSY90/TOCSY/NOESY: Presaturation
scans/Analysen pro Spektrum	2048/196	COSY90: 196 TOCSY/NOESY: 256
Pulsprogramm	zgpr	COSY90: cosypr TOCSY: mlevprtp NOESY: noesyprtp
Mischzeit	-	TOCSY: 67 ms NOESY: 900 ms
Temperatur	298 K	
Lösungsmittel	90 % H ₂ O/10 % D ₂ O oder 100 % D ₂ O mit 0,03 % 2-Mercaptoethanol	

3.7.5. Untersuchungen mittels *online*-Kapillar-HPLC-NMR

Die Strukturuntersuchungen des nativen MT₂_NECLU erfolgten ebenfalls in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Klaus Albert und Herrn Dipl.-Chem. Marc Bayer.

Die Untersuchungen wurden mittels einer dreiteiligen modularen Kapillar-HPLC-Pumpe (CapLC System; WATERS), die an einen externen UV-Detektor (Lambda 1010; BISCHOFF) angeschlossen war, durchgeführt. Die NMR-Strukturuntersuchungen erfolgten mittels *microcoil* 600 MHz-NMR-Spektrometer (3.7.5.; Abb. 3-8). Aufgeschlossene Proben von *H. lugdunensis* (Kontrolle und 50 µM Cd(II) nach 50 µM Cd(II)-Vorkultur; siehe 3.4.5.) wurden zweimal zentrifugiert, um keine Schwebeteilchen auf die Säule zu bringen. Die Probe

wurde anschließend mittels manueller Injektion über ein 6-Wege-Ventil (Vivi Cheminert; VICI AG) in die selbst gepackte Kapillarsäule aus *fused silica* (ohne Beschichtung) injiziert und bei 298 K getrennt (Tab. 3-17). Mittels der Software HyStar (BRUKER Biospin GmbH) wurden die Daten aufgenommen und die Chromatogramme ausgewertet.

Detektor und NMR-Spektrometer (3.5.7.; Tab. 3-17) wurden über eine Transferkapillare (Innendurchmesser: 50 μm ; Länge: 3 m) und ein Stop-Ventil verbunden.

Tab. 3-17: HPLC-Bedingungen und -Gradient bei der Kapillar-HPLC

Säule (stationäre Phase)	ProntoSIL AQ C18; 5 μm ; 120 \AA ; Größe: 15 cm \times 250 μm Innen \emptyset (BISCHOFF)	
Mobile Phase	A: 90 % H ₂ O/10 % D ₂ O; pH 3 mit TFA	
	B: 90 % Acetonitril/ 10 % Acetonitril-d ₃	
Fluss	2 $\mu\text{L}/\text{min}$	
Detektion	$\lambda=220$ nm	
Injektionsvolumen	0,5-2 μL	
Zeit [min]	Gradient	
	A [%]	B [%]
0	98	2
20	88	12
40	88	12
40,1	15	85
55	15	85
60	98	2
70	98	2

Die Transferzeit zwischen UV-Detektor und NMR-Spektrometer (Totzeitbestimmung) wurde mittels Methanol bestimmt. Für die eigentliche Kapillar-HPLC-NMR-Kopplung wurde nach Detektion im UV-Bereich (Peak-Maximum) die Zeit bis zur Detektion eines NMR-Signals gestoppt (Totzeit) und das Stop-Ventil geschlossen. Die Substanz verblieb somit im *microcoil*-Detektionsfenster (*stopped flow*). Zur Strukturbestimmung des nativen Metallothioneins wurden 1D ¹H-Spektren aufgenommen.

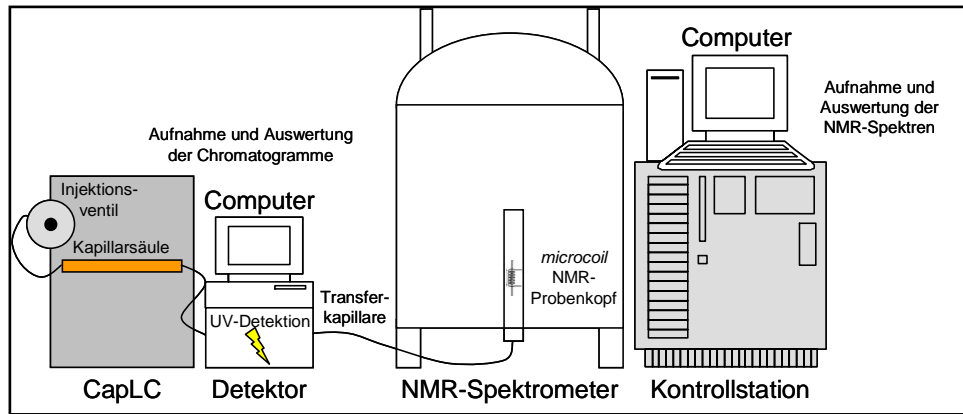


Abb. 3-8: Schematische Darstellung des Aufbaus der Kopplung der Kapillar-HPLC (CapLC) an das *microcoil* 600 MHz-NMR-Spektrometer (*online*-Kapillar-HPLC-NMR).

4. Ergebnisse

4.1. Physiologische Untersuchungen

4.1.1. Wachstum auf Oberflächenkultur

Nach vier Wochen konnte auf den Oberflächenkulturen ein deutlicher Unterschied im Wachstum beobachtet werden ($n = 3$). Ohne Schwermetalle (Abb. 4-1, Abb. 4-2A) war der Durchmesser der Wachstumszone am größten (7,5 cm), wobei das Wachstum auf Standortwasser-Platten nur wenig geringer war (7,0 cm; Abb. 4-2B). Wachstumsinhibierungen konnten festgestellt werden, wenn 50 (Abb. 4-2C) bzw. 100 μM Cd(II) (Abb. 4-2D) im Malzagar vorhanden waren (Wachstumszone nur 6,5 cm und 5 cm).

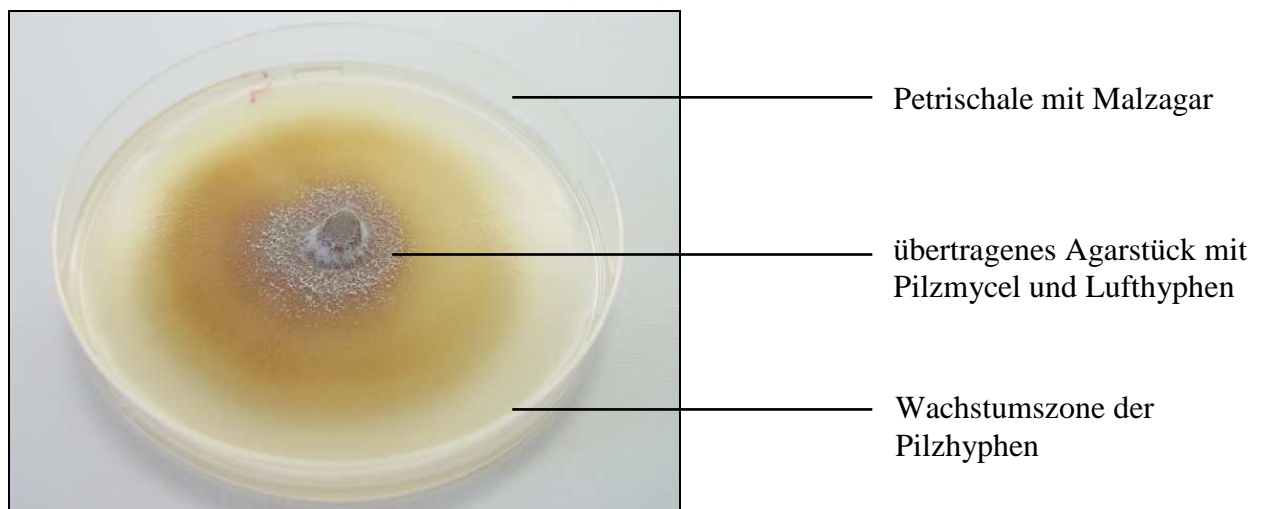


Abb. 4-1: Wachstum von *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 auf Oberflächenkultur nach ca. 4 Wochen.

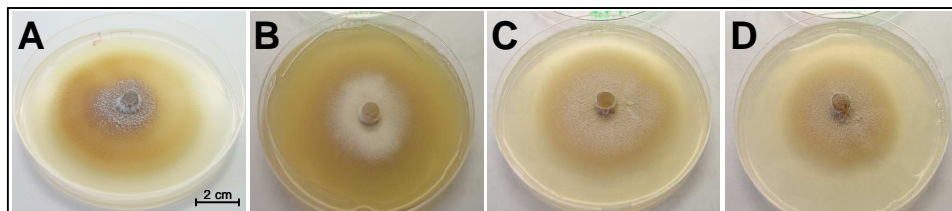


Abb. 4-2: Wachstum von *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 auf Oberflächenkultur ohne Schwermetalle (A), mit „Standortwasser“ präpariert (B), mit 50 μM Cd(II) (C) und mit 100 μM Cd(II) (D) nach vier Wochen.

Die Pilzhyphen bildeten in der Flüssigkultur ein dichtes Geflecht (Abb. 4-3A). Zur möglichen Untersuchung von Einzelzellen wurde ein mit Mycel bewachsenes Agarstück auf Malzagarbeschichtete Objektträger gelegt und drei Tage wachsen gelassen. Es bildete sich ebenfalls ein dichtes Hyphengeflecht sowie Leithyphen (Abb. 4-3B; Abb. 4-4).

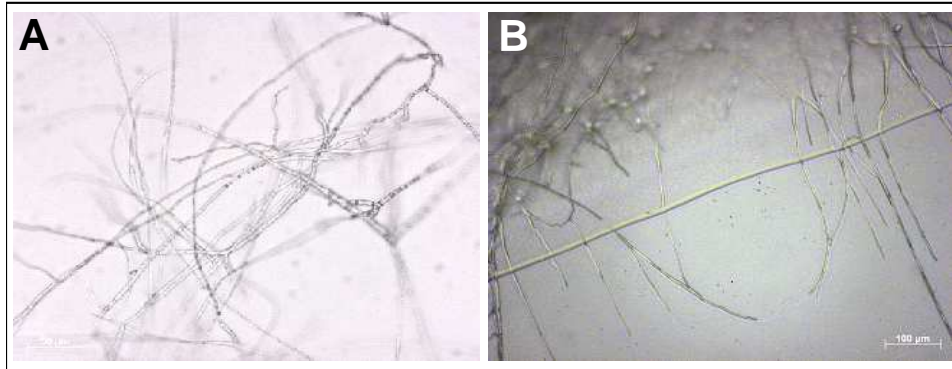


Abb. 4-3: Hyphen von *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 in Flüssigkultur gewachsen (A; Tag 5) und (B) auf Malzagar-beschichteten Objektträgern gewachsen (3 Tage).

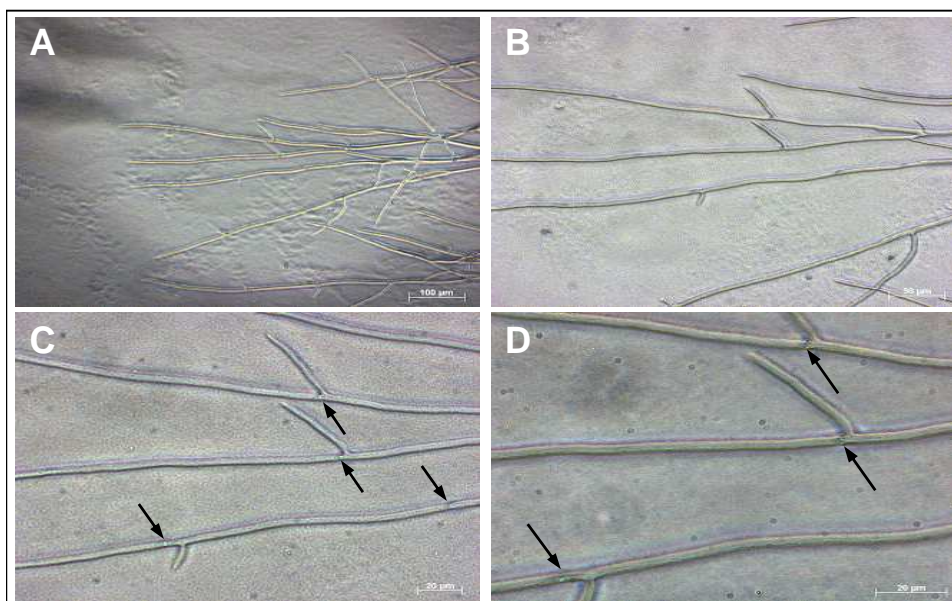


Abb. 4-4: Hyphen von *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4, die auf Malzagar-beschichteten Objektträgern gewachsen sind; A: 100-fache Vergrößerung; B: 200-fache Vergrößerung; C: 400-fache Vergrößerung und D: 630-fache Vergrößerung. Deutlich zu erkennen sind die Leithyphen, die nur eine geringe Verzweigung aufweisen (A, B). Die Hyphen von *H. lugdunensis* bestehen, wie bei allen Ascomyceten, aus Zellen, die nur durch Septen → getrennt sind (C, D).

4.1.2. Wachstum in Flüssigkultur

Aus Abb. 4-5 ist ersichtlich, dass die logarithmische Wachstumsphase bei *H. lugdunensis* in Flüssigkultur ohne Cd(II)-Zugabe zwei Tage nach dem Animpfen beginnt. Sie dauert etwa drei bis vier Tage, ab Tag 6 beginnt die stationäre Phase. In der stationären Phase wurde eine Trockenmasse von 2 bis 2,2 g/L erreicht. Unter 25 µM Cd(II) verzögert sich das Wachstum, so dass erst am Tag 7 die stationäre Phase erreicht wird. Im Gegensatz dazu sieht man bei der

Zugabe von 50 und 100 μM Cd(II) nur noch ein leichtes Wachstum von ca. 0,06 g/L auf 0,2 g/L, aber keine „echten“ Wachstumsphasen.

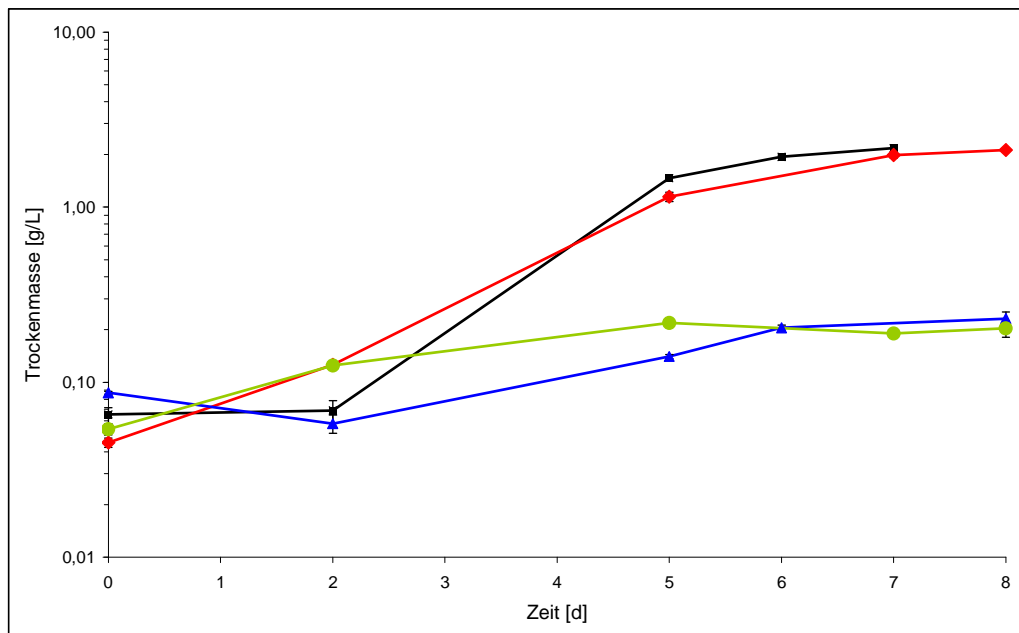


Abb. 4-5: Wachstum von *H. lugdunensis* in Flüssigkultur nach Oberflächenkultur auf Malzagar-Platten ohne Cd(II); n = 3; schwarz: Flüssigkultur unter Zugabe von 0 μM Cd(II) (Kontrolle); rot: Flüssigkultur unter Zugabe von 25 μM Cd(II); blau: Flüssigkultur unter Zugabe von 50 μM Cd(II); grün: Flüssigkultur unter Zugabe von 100 μM Cd(II).

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass eine Vorkultivierung auf Oberflächenkultur mit unterschiedlichen Cd(II)-Konzentrationen einen Einfluss auf das Wachstum von *H. lugdunensis* in Flüssigkultur hat. Aus Abb. 4-6A-C ist ersichtlich, dass nach Zugabe von 0 oder 25 μM Cd(II) zur Flüssigkultur sich die Wachstumskurven fast nicht unterscheiden, wenn man die Anzucht auf Oberflächenkultur ohne Cd(II) und mit „Standortwasser“ präparierten Malzagar-Platten vergleicht (Abb. 4-5 und 4-6A). Werden die auf Standortwasser-Platten vorkultivierten Pilze mit 50 μM Cd(II) gestresst, erhöht sich die Biomasse von ca. 0,06 g/L auf ca. 1,7 g/L in der Flüssigkultur. Nur eine geringe Biomasse-Zunahme ist dagegen bei der Zugabe von 100 μM Cd(II) zur Flüssigkultur zu verzeichnen (0,04-0,09 g/L). Im Gegensatz dazu kann beim Wachstum nach Anzucht auf Oberflächenkulturen mit 50 μM Cd(II) (Abb. 4-6B) bei allen Cd(II)-Konzentrationen in Flüssigkultur eine deutliche Biomasse-Zunahme beobachtet werden (bei 100 μM Cd(II) von ca. 0,05 auf 0,4 g/L). Das Wachstum bei Zugabe von 50 und 100 μM Cd(II) zur Flüssigkultur ist verzögert und erreicht auch bis Tag 8 nicht die stationäre Wachstumsphase. Wurde *H. lugdunensis* auf Oberflächenkultur mit 100 μM Cd(II) vorkultiviert (Abb. 4-6C), konnte kaum Biomasse-Verlust bis 50 μM Cd(II) in Flüssigkultur festgestellt werden. Nach 100 μM Cd(II)-Zugabe verzögerte sich das Wachstum und es konnte bis zum Tag 8 keine stationäre

Phase erreicht werden. Die Trockenmassen zu den verschiedenen Zeitpunkten sind im Anhang in den Tab. 8-1 bis 8-4 dargestellt.

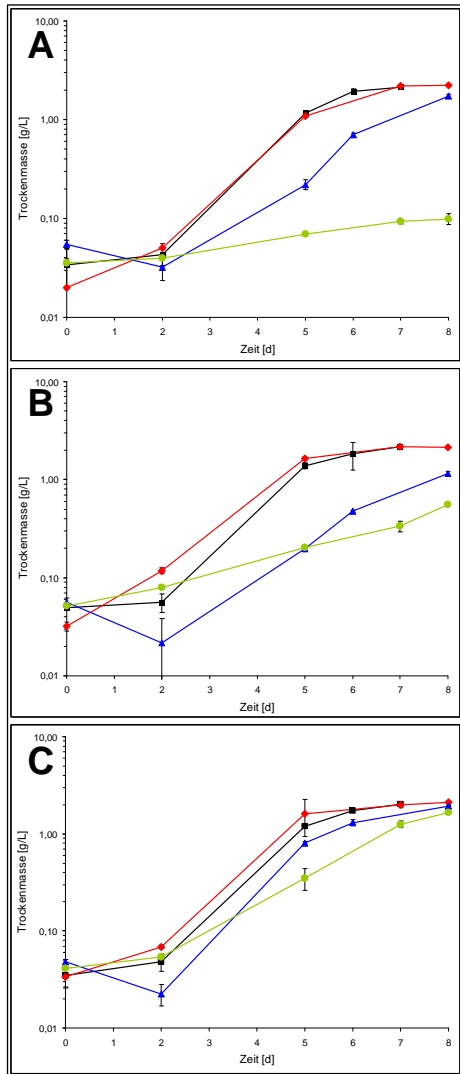


Abb. 4-6: Wachstum von *H. lugdunensis* in Flüssigkultur nach Oberflächenkultur auf Malzagar-Platten mit: (A) „Standortwasser“ präpariert, (B) 50 µM Cd(II) und (C) 100 µM Cd(II); n = 3; schwarz: Flüssigkultur unter Zugabe von 0 µM Cd(II) (Kontrolle); rot: Flüssigkultur unter Zugabe von 25 µM Cd(II); blau: Flüssigkultur unter Zugabe von 50 µM Cd(II); grün: Flüssigkultur unter Zugabe von 100 µM Cd(II).

4.1.3. Vitalität

Als Maß für die Abschätzung der Vitalität von *Heliscus lugdunensis* wurde die Bildung von Resorufin durch die Gesamtheit aller Dehydrogenasen gemessen.

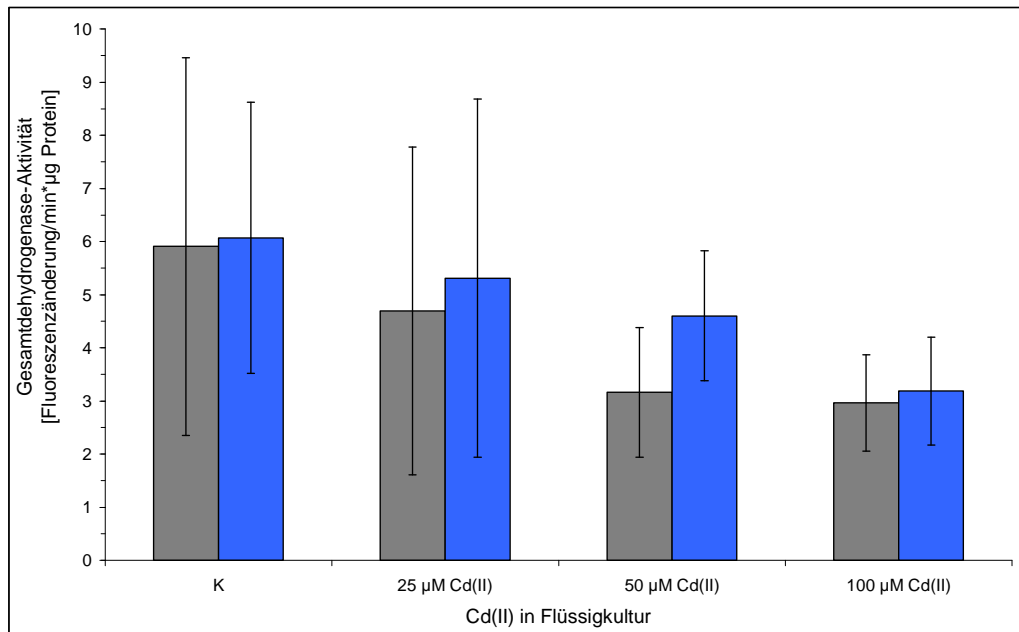


Abb. 4-7: Gesamtdehydrogenase-Aktivität von *H. lugdunensis*-Extrakten nach Wachstum in Flüssigkultur und Oberflächenkultur auf Malzagar-Platten ohne Cd(II) (grau) und mit 50 µM Cd(II) (blau); alle Unterschiede nicht signifikant; n = 9.

Wie in Abb. 4-7 zu erkennen ist, sank die Vitalität mit steigender Menge an Cd(II) in Flüssigkultur etwas ab (nicht signifikant), wobei die Vitalität des Pilzes nach Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II) langsamer abnahm (v. a. wenn der Pilz mit 25 und 50 µM Cd(II) gestresst wurde) als die Vitalität der auf Oberflächenkultur ohne Cd(II) vorkultivierten Pilzproben (Abb. 4-8). Dies ist deutlich an der stärkeren Abnahme der Steigung der Regressionsgeraden bei Pilzproben, die auf Oberflächenkultur ohne Cd(II) vorkultiviert wurden, zu sehen (-1,037x zu -0,9352x bei Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II)). Die höchste Abnahme der Vitalität des Pilzes konnte festgestellt werden, wenn der Pilz mit 50 µM Cd(II) in der Flüssigkultur gestresst wurde.

Dieser Befund korreliert mit den Ergebnissen der Wachstumsversuche, bei denen eine höhere Pilz-Biomasse nach Vorinkubation auf Cd(II)-haltigen Oberflächenkultur erreicht wurde.

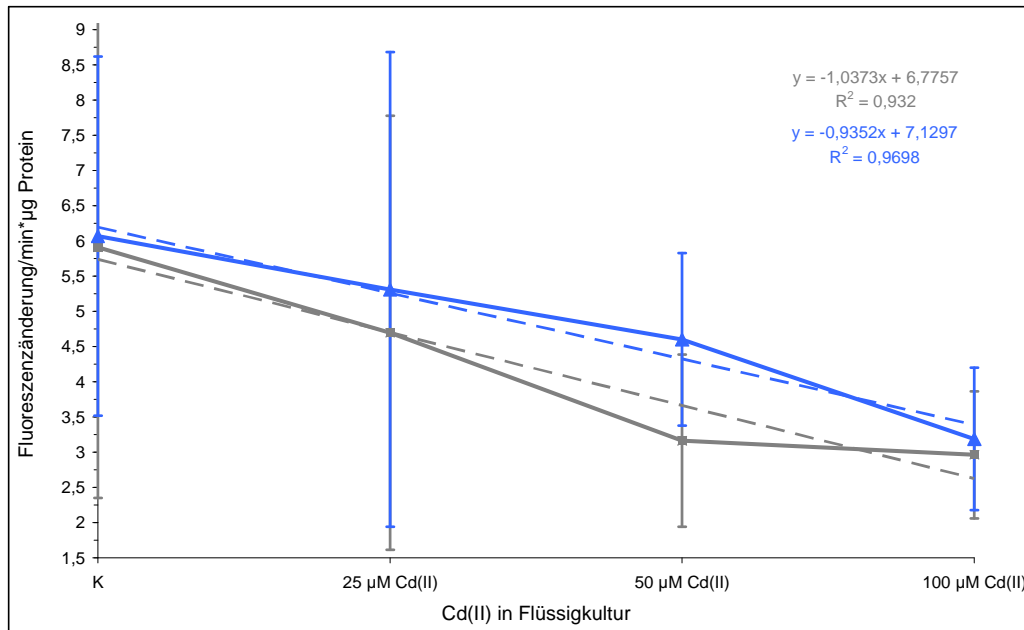


Abb. 4-8: Darstellung der Unterschiede in der Steigung der Regressionsgeraden von *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 bei der Bestimmung der Gesamtdeshydrogenase-Aktivität nach Wachstum in Flüssigkultur und Oberflächenkultur auf Malzagar-Platten ohne Cd(II) (schwarz) und mit 50 µM Cd(II) (blau); n = 9.

4.2. Biochemische Untersuchungen

4.2.1. Proteinexpression

In Abb. 4-9 ist ein 17,5 %iges Gel einer SDS-PAGE dargestellt, welches mittels Silberfärbung gefärbt wurde. Das Gen *mt1_neclu* wurde in den Vektor pET31b(+) kloniert (Vektor: pET-31b(+)-DM22) und in *E. coli* BL21 transformiert. Die Expression erfolgte wie in Abschnitt 3.6.1. beschrieben.

Zu den *E. coli* wurden 0 oder 10 µM CuSO₄ hinzugegeben und jeweils vor Induktion, sowie 1 h, 3 h und 5 h nach Induktion der Expression jeweils 1 mL Probe entnommen. Es ist zu erkennen, dass es keinen Unterschied im Proteinmuster zwischen den Kulturen mit und ohne CuSO₄ gibt. Es ist kein Protein im Bereich von 2,33 kDa detektierbar, welches der Größe des MT1_NECLU entsprechen würde. Auch nach einer 5-stündigen Induktion ist kein MT1_NECLU detektierbar.

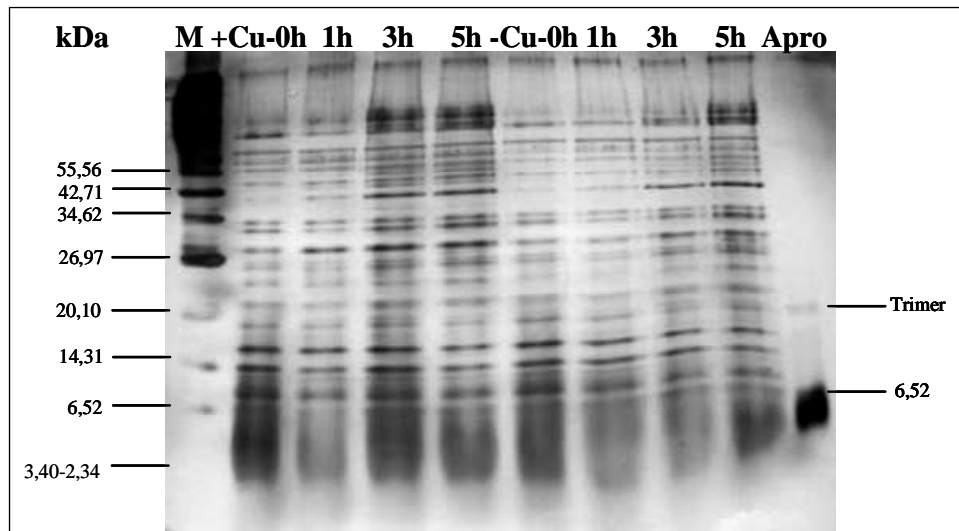


Abb. 4-9: Silberfärbung eines 17,5 %igen Gels einer SDS-PAGE; als Marker (M) wurden der Broad Range Protein Marker (2-212 kDa; NEW ENGLAND BIOLABS) sowie das Aprotinin (Apro; 6,5 kDa) verwendet; die Proben der *E. coli*-Kulturen wurden jeweils bei gleichen OD aufgetragen; +Cu: 10 μ M CuSO₄; -Cu: kein CuSO₄ zugeben; 0-5 h: Ernte der Bakterienkultur 0-5 h nach Induktion mit IPTG.

Dieses Proteingel steht stellvertretend für mehrere MT1_NECLU-Expressionsversuche und deren Proteingele, bei denen kein MT1_NECLU detektiert werden konnte. Veränderte Bedingungen, wie z. B. Zugabe von 100 μ M Cd(II), 100 μ M Cu(II) oder 10 μ M Cystein führten nicht zur Expression dieses kleinen Proteins. Ebenfalls wurde versucht, die Zeitpunkte der Ernte von *E. coli* zu variieren und dem Medium 2 mM DTT zuzufügen. Weiterhin wurden die Bakterien nach der Ernte und nach jedem weiteren Aufarbeitungsschritt mit Stickstoff überschichtet, um Oxidationen des MT1_NECLU zu vermeiden. Die Analyse der Expression des MT1_NECLU erfolgte auch mittels Tricine-SDS-PAGE, wobei ebenfalls keine Expression zu detektieren war.

Bei den Experimenten zur Expression in der Hefe *Kluyveromyces lactis* sollte das zu exprimierende MT1_NECLU in das Medium abgegeben werden (Abb. 4-10). Auch mit Hilfe dieses Expressionssystems konnte keine MT1_NECLU-Expression beobachtet werden. Unter verschiedenen Bedingungen (Zugabe von 10 μ M CuSO₄, 10 μ M CdCl₂ oder 2 mM DTT) und nach verschiedenen Ernte-Zeitpunkten wurde kein MT1_NECLU detektiert.

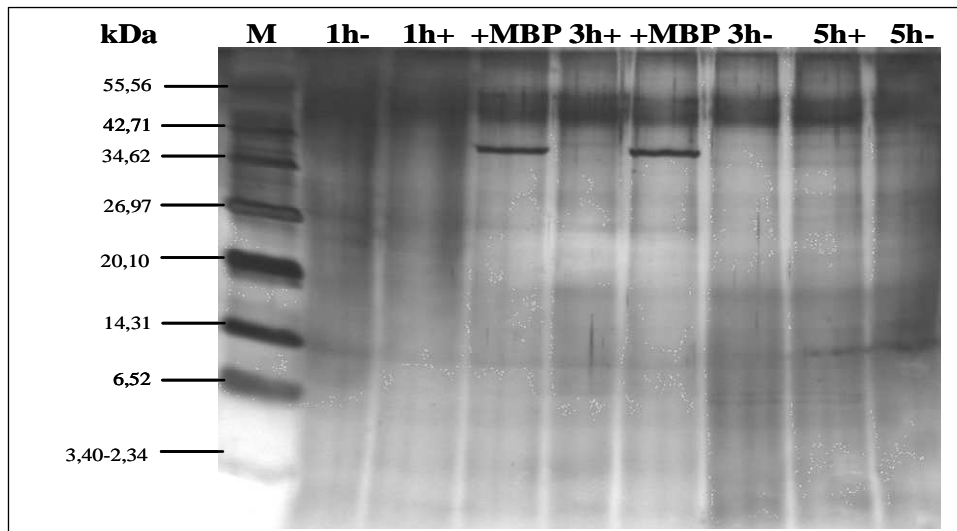


Abb. 4-10: Silberfärbung eines 17,5 %igen Gels einer SDS-PAGE; als Marker (M) wurde der Broad Range Protein Marker (2-212 kDa; NEW ENGLAND BIOLABS) verwendet; der Medienüberstand der *K. lactis*-Kulturen (Hefe) wurde nach 1 h, 3 h und 5 h Wachstum entnommen; -: Hefe ohne Gen *mt1_neclu* in Plasmid pKLAC1; +: Hefe mit Gen *mt1_neclu* in Plasmid pKLAC1; +MBP: pKLAC1-Vektor mit Gen für das *maltose binding protein*, ca. 40,6 kDa, als Kontroll-Protein.

4.2.2. Sulfatbestimmung

Der Sulfatgehalt des Malz-Pepton-Mediums (Flüssigkultur) wurde vor und nach Wachstum von *H. lugdunensis* (Tag 0 bzw. 5) und der intrazelluläre Gehalt an Sulfat an Tag 5 bestimmt. Die Flüssigkultur enthielt ca. 270 $\mu\text{mol/L}$ Sulfat (Tag 0; Abb. 4-11). Der Gehalt an Sulfat im Medium (extrazellulär) nahm von Tag 0 zu Tag 5 von ca. 270 $\mu\text{mol/L}$ auf ca. 130 bzw. 170 $\mu\text{mol/L}$ ab, wenn der Flüssigkultur 0, 25 oder 50 μM Cd(II) zugesetzt wurden. Eine Abnahme war nicht zu beobachten, wenn der Pilz mit 100 μM Cd(II) in der Flüssigkultur gestresst wurde. Im Vergleich zur Kontrolle war der Sulfatgehalt nur geringfügig niedriger (ca. 250 $\mu\text{mol/L}$). Die Aussagen trafen sowohl für die Kulturen, die auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), als auch für die, die mit 50 μM Cd(II) wuchsen, zu.

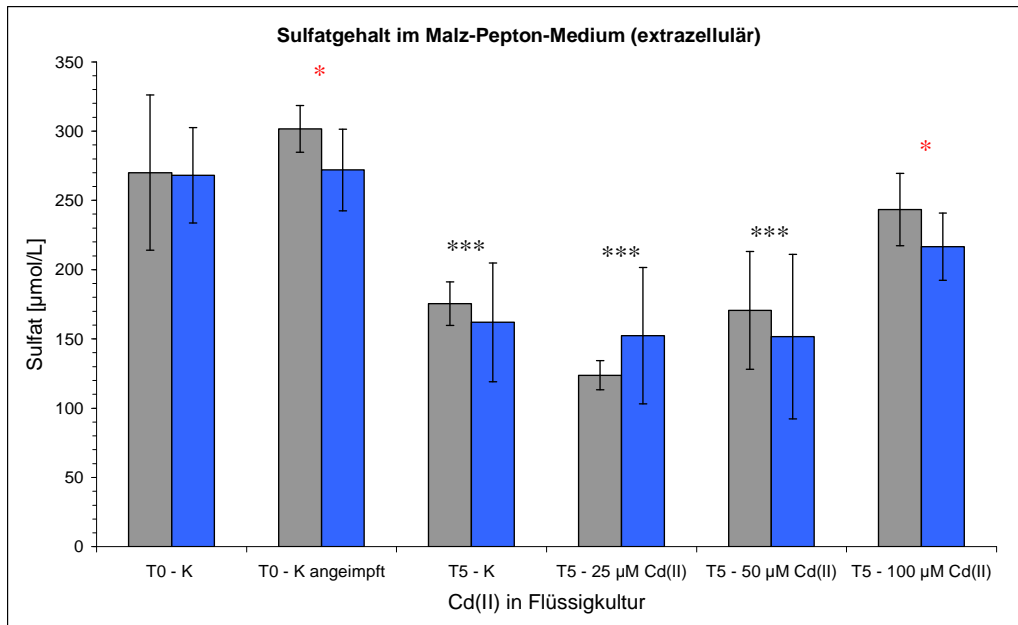


Abb. 4-11: Extrazellulärer Gehalt an Sulfat bei *H. lugdunensis* nach Wachstum in Flüssigkultur und Oberflächenkultur auf Malzagar-Platten ohne Cd(II) (grau) und mit 50 µM Cd(II) (blau), sowie vor (T0 – K) bzw. nach Beimpfung mit Pilz-Suspension (T0 – K angeimpft bis T5 – K bis 100 µM Cd(II)); T0: Tag 0; T5: Tag 5; rote *: Signifikanzen zwischen den Werten der verschiedenen Oberflächenkulturen; schwarze *: Signifikanzen zwischen der Kontrolle und den Werten der verschiedenen Cd(II)-Konzentrationen in der Flüssigkultur; n = 8-9.

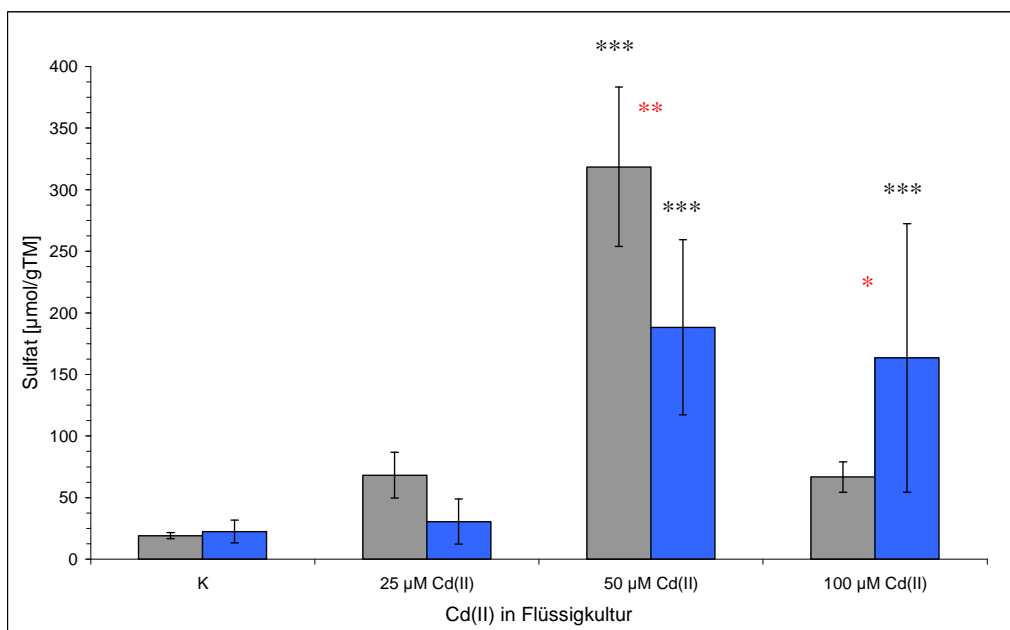


Abb. 4-12: Intrazellulärer Gehalt an Sulfat bei *H. lugdunensis* nach Wachstum in Flüssigkultur und Oberflächenkultur auf Malzagar-Platten ohne Cd(II) (grau) und mit 50 µM Cd(II) (blau); rote *: Signifikanzen zwischen den Werten der verschiedenen Oberflächenkulturen; schwarze *: Signifikanzen zwischen der Kontrolle und den Werten der verschiedenen Cd(II)-Konzentrationen in der Flüssigkultur; n = 9.

Der intrazelluläre Sulfatgehalt schwankte zwischen ca. 20 und 320 µmol/g TM (Abb. 4-12). Waren 0 oder 25 µM Cd(II) in der Flüssigkultur vorhanden, gab es nur geringe Unterschiede

im Gehalt an Sulfat für beide Oberflächenkulturen (ohne Cd(II) und mit 50 μM Cd(II)). Wurden dagegen 50 μM Cd(II) in das Malz-Pepton-Medium gegeben, erhöhte sich der Sulfatgehalt signifikant um das ca. 16-fache bei Oberflächenkultur ohne Cd(II) bzw. um das 9-fache bei Oberflächenkultur mit 50 μM Cd(II). Nach Oberflächenkultur ohne Cd(II) erhöhte sich der intrazelluläre Sulfatgehalt nur sehr gering, wenn *H. lugdunensis* mit 100 μM Cd(II) in der Flüssigkultur gestresst wurde. Wurde er auf Oberflächenkultur mit 50 μM Cd(II) vorkultiviert, konnte im Vergleich zur Kontrolle ein signifikanter Anstieg des intrazellulären Sulfatgehaltes um das 8-fache (ca. 160 $\mu\text{mol/g}$ TM) verzeichnet werden.

4.2.3. Sulfidbestimmung

Der Gehalt an Sulfid wurde nur intrazellulär bestimmt (Abb. 4-13). Bedingt durch die Kulturführung (5 Tage Schütteln bei 120 rpm) kommt es zum Sauerstoffeintrag in das Medium und zur Oxidation zu Sulfat und zum Entweichen als H_2S , so dass die Bestimmung im Medium nicht sinnvoll war.

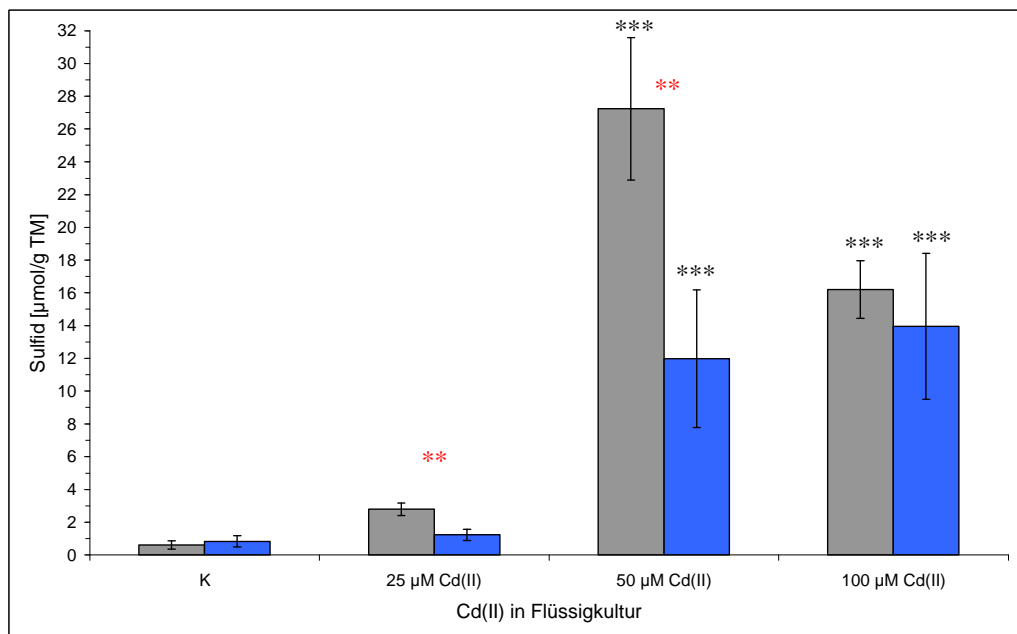


Abb. 4-13: Intrazellulärer Gehalt an Sulfid bei *H. lugdunensis* nach Wachstum in Flüssigkultur und Oberflächenkultur auf Malzagar-Platten ohne Cd(II) (grau) und mit 50 μM Cd(II)-Platten (blau); rote *: Signifikanzen zwischen den Werten der verschiedenen Oberflächenkulturen; schwarze *: Signifikanzen zwischen der Kontrolle und den Werten der verschiedenen Cd(II)-Konzentrationen in der Flüssigkultur; n = 9.

Allgemein ist in Abb. 4-13 ein deutlicher Anstieg des Sulfidgehaltes unter 50 μM Cd(II)-Stress in der Flüssigkultur zu erkennen. Analysiert man die Oberflächenkultur ohne Cd(II) mit der Oberflächenkultur mit 50 μM Cd(II), so war nur bei Cd(II)-Konzentrationen von 25 und 50 μM in der Flüssigkultur der Sulfidgehalt signifikant unterschiedlich. Im Vergleich zur Kontrolle waren bei beiden Anzuchten nur die Sulfid-Konzentrationen unter 50 und 100 μM Cd(II) im Flüssigmedium signifikant erhöht. Der höchste Sulfidgehalt wurde nach Oberflächenkultur ohne Cd(II) und 50 μM Cd(II) in der Flüssigkultur beobachtet. Wurden 100 μM Cd(II) zur Flüssigkultur gegeben, sank der Gehalt an Sulfid ab. Im Gegensatz dazu war der Sulfidgehalt nach Vorkultur auf 50 μM Cd(II)-Platten mit 50 μM Cd(II) in der Flüssigkultur signifikant geringer.

4.2.4. Kleine Thiol-haltige Verbindungen

Der intrazelluläre Cys-Gehalt (Abb. 4-14) bei *H. lugdunensis* erhöhte sich, je mehr Cd(II) in der Flüssigkultur und bei den unterschiedlichen Oberflächenkulturen vorhanden war (s. Abb. 3-1). Der Cysteingehalt stieg von ca. 0,12 $\mu\text{mol/g}$ TM in der Flüssigkultur ohne Cd(II) auf 4 $\mu\text{mol/g}$ TM nach Zugabe von 100 μM Cd(II) zur Flüssigkultur. Im Gegensatz dazu erhöhte sich der Cysteingehalt nach Oberflächenkultur mit „Standortwasser“ bzw. mit 100 μM Cd(II) nach Zugabe von 50 μM Cd(II) zur Flüssigkultur nur leicht. Bei Zugabe von 100 μM Cd(II) zur Flüssigkultur konnte jedoch ein starker Anstieg des Cysteingehaltes auf ca. 5-6 $\mu\text{mol/g}$ TM beobachtet werden. Nach Oberflächenkultur mit 50 μM Cd(II) konnte der höchste Gehalt an Cystein mit 5,07 $\mu\text{mol/g}$ TM gemessen werden, wenn 50 μM Cd(II) zur Flüssigkultur hinzugegeben wurden. Wurden aber 100 μM Cd(II) zur Flüssigkultur gegeben, erniedrigte sich der Cysteingehalt wieder auf ca. 2,5 $\mu\text{mol/g}$ TM.

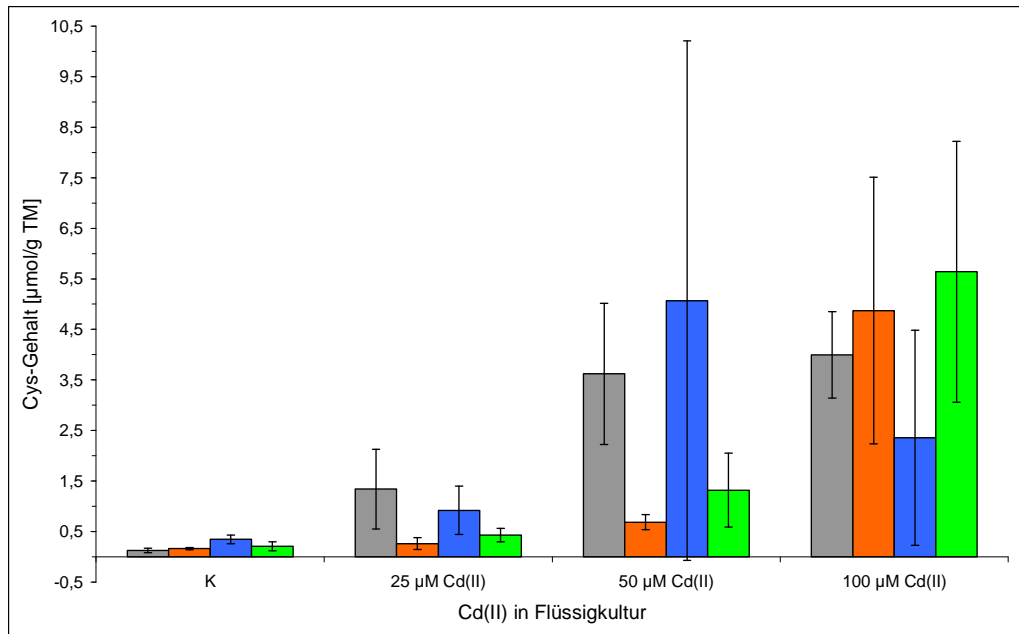


Abb. 4-14: Intrazellulärer Gehalt an Cystein bei *H. lugdunensis* nach Wachstum in Flüssigkultur und Oberflächkultur auf Malzagar-Platten ohne Cd(II) (grau), mit „Standortwasser“ präpariert (orange), mit 50 µM Cd(II) (blau) und mit 100 µM Cd(II) (grün); alle Unterschiede nicht signifikant; n = 6-9.

Cys-Gly wurde in Konzentrationen von 0,01-4,5 µmol/g TM bestimmt (Abb. 4-15). Dabei konnte nach fast allen Oberflächkultivierungen (Abb. 3-1) nur ein sehr geringer Cys-Gly-Gehalt gemessen werden, wenn kein oder 25 µM Cd(II) der Flüssigkultur zugegeben wurden. Ausnahme dabei ist die Probe, die auf Oberflächkultur ohne Cd(II) vorkultiviert und mit 25 µM Cd(II) in der Flüssigkultur gestresst wurde. Ihr Gehalt an Cys-Gly verzehnfachte sich im Vergleich zu den anderen Vorkultivierungsbedingungen, bei denen der Cys-Gly-Gehalt bei 25 µM Cd(II) in der Flüssigkultur nur zwei- bzw. dreimal so hoch war. Nach Zugabe von 50 µM Cd(II) zur Flüssigkultur konnte nach Oberflächkultur ohne bzw. mit 50 µM Cd(II) ein erhöhter Gehalt an Cys-Gly von 0,73 und 0,84 µmol/g TM festgestellt werden. Die höchsten Cys-Gly-Gehalte von bis zu 4,5 µmol/g TM wurden nach Zugabe von 100 µM Cd(II) zur Flüssigkultur gemessen. Dabei waren die Cys-Gly-Konzentrationen der auf Oberflächkulturen mit Standortwasser und mit 50 µM Cd(II) vorkultivierten Pilze signifikant geringer als bei denen ohne Cd(II) und mit 100 µM Cd(II) vorkultivierten Pilzproben.

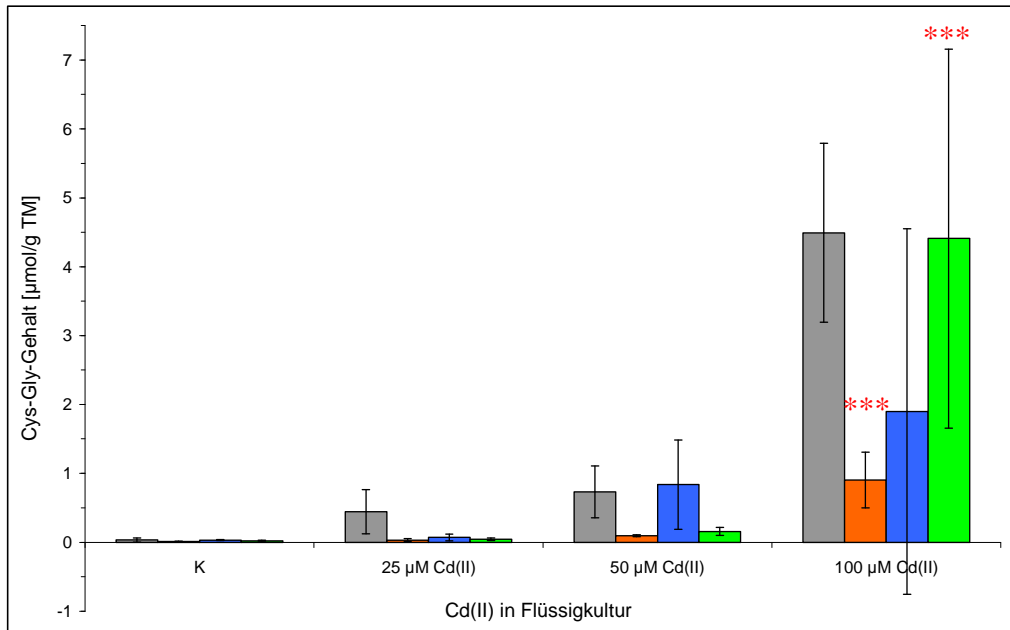


Abb. 4-15: Intrazellulärer Gehalt an Cys-Gly in *H. lugdunensis* nach Wachstum in Flüssigkultur und Oberflächenkultur auf Malzagar-Platten ohne Cd(II) (grau), mit „Standortwasser“ präpariert (orange), mit 50 µM Cd(II) (blau) und mit 100 µM Cd(II) (grün); rote *: Signifikanzen zwischen den Werten der verschiedenen Oberflächenkulturen; n = 6-9.

In Abb. 4-16 wurde der Gehalt an γ -EC in *H. lugdunensis* dargestellt. Unter Zugabe von Cd(II) zur Flüssigkultur steigt der Gehalt an γ -EC an, wobei der Gehalt bei Pilzen, die auf Oberflächenkultur mit 100 µM Cd(II) angezogen wurden, um das fast 600-fache anstieg. Bei Zugabe von 50 und 100 µM Cd(II) zur Flüssigkultur war die Erhöhung signifikant. Bei Oberflächenkultur mit „Standortwasser“ stieg der γ -EC-Gehalt um das 140-fache im Vergleich zur Kontrolle, um das 105-fache nach Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II) und um das 192-fache nach Oberflächenkultur mit 100 µM Cd(II). Auffällig bei den γ -EC-Gehalten war der signifikant geringere Gehalt nach Oberflächenkultivierung mit „Standortwasser“ und mit 50 µM Cd(II) in der Flüssigkultur. Nach Oberflächenkultivierung mit Standortwasser und 50 µM Cd(II) und nach 100 µM Cd(II)-Stress in der Flüssigkultur konnte bei *H. lugdunensis* ein signifikant geringerer Gehalt an γ -EC im Vergleich zu den anderen Vorkultivierungen (ohne und mit 100 µM Cd(II)) festgestellt werden.

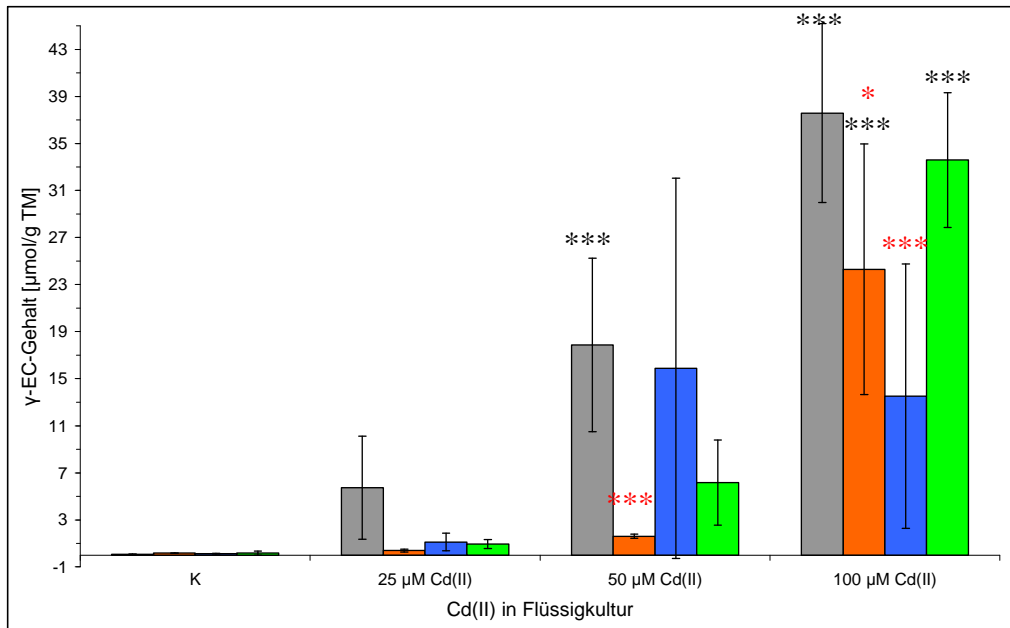


Abb. 4-16: Intrazellulärer Gehalt an γ -EC in *H. lugdunensis* nach Wachstum in Flüssigkultur und Oberflächenkultur auf Malzagar-Platten ohne Cd(II) (grau), mit „Standortwasser“ präpariert (orange), mit 50 μ M Cd(II) (blau) und mit 100 μ M Cd(II) (grün); rote *: Signifikanzen zwischen den Werten der verschiedenen Oberflächenkulturen; schwarze *: Signifikanzen zwischen der Kontrolle und den Werten bei verschiedenen Cd(II)-Konzentrationen in der Flüssigkultur; n = 6-9.

Auch beim Glutathion-Gehalt (GSH) kam es zu einer Cd(II)-Konzentrations-abhängigen Erhöhung um das 5 bis 6-fache (Abb. 4-17). Diese Erhöhung war bei allen Oberflächenkultur-Bedingungen ab 50 μ M Cd(II) in der Flüssigkultur signifikant. Die Probe, die auf Oberflächenkultur mit 50 μ M Cd(II) vorkultiviert und mit 100 μ M Cd(II) in der Flüssigkultur gestresst wurde, enthielt im Vergleich zu den anderen Oberflächenkultivierungen signifikant weniger GSH. Der GSH-Gehalt von Pilz-Proben, die auf Oberflächenkultur ohne Cd(II) angezogen wurden, stieg im Vergleich zu den anderen Oberflächenkulturen stärker an.

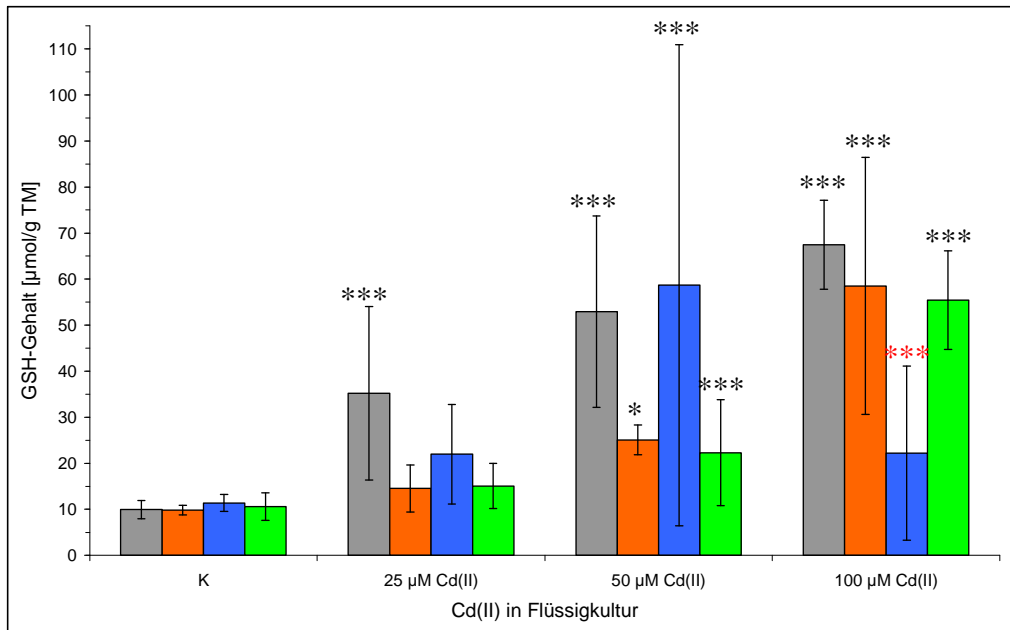


Abb. 4-17: Intrazellulärer Gehalt an GSH in *H. lugdunensis* nach Wachstum in Flüssigkultur und Oberflächenkultur auf Malzagar-Platten ohne Cd(II) (grau), mit „Standortwasser“ präpariert (orange), mit 50 µM Cd(II) (blau) und mit 100 µM Cd(II) (grün); rote *: Signifikanzen zwischen den Werten der verschiedenen Oberflächenkulturen; schwarze *: Signifikanzen zwischen der Kontrolle und den Werten bei verschiedenen Cd(II)-Konzentrationen in der Flüssigkultur; n = 6-9.

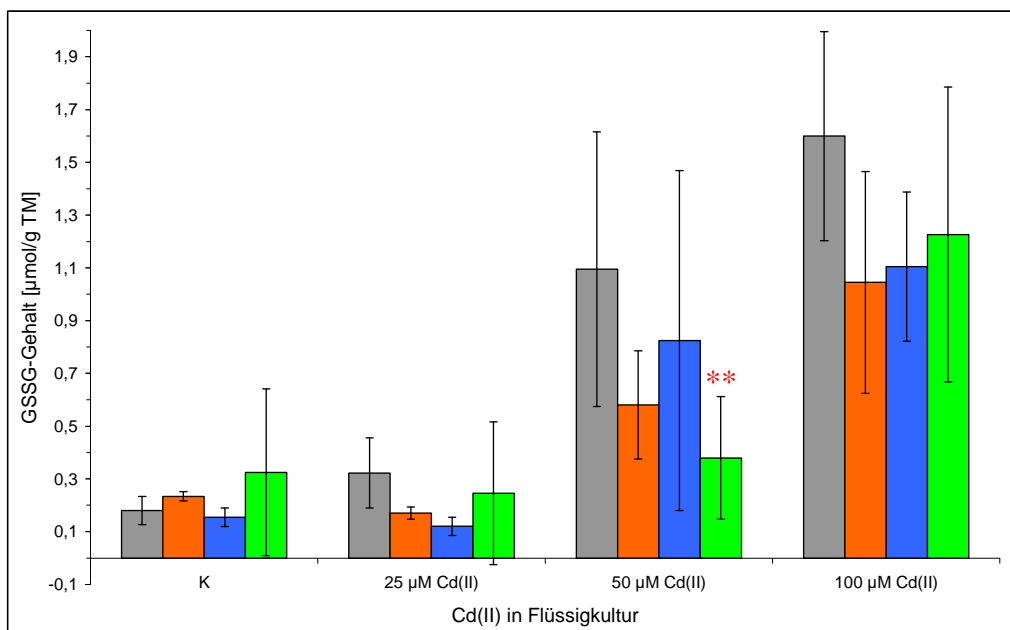


Abb. 4-18: Intrazellulärer Gehalt an GSSG (oxidiertes Glutathion) in *H. lugdunensis* nach Wachstum in Flüssigkultur und Oberflächenkultur auf Malzagar-Platten ohne Cd(II) (grau), mit „Standortwasser“ präpariert (orange), mit 50 µM Cd(II) (blau) und mit 100 µM Cd(II) (grün); rote *: Signifikanzen zwischen den Werten der verschiedenen Oberflächenkulturen; n = 6-9.

Mit Erhöhung der Cd(II)-Konzentration in der Flüssigkultur (50 und 100 µM Cd(II)) konnte eine Erhöhung des oxidierten Anteils des Glutathions (GSSG) festgestellt werden (Abb. 4-18). Nach Oberflächenkultivierung mit 100 µM Cd(II) und 50 µM Cd(II) in der Flüssigkultur konnte ein signifikant niedrigerer GSSG-Gehalt im Vergleich zu den anderen

Oberflächenkulturen detektiert werden. Ein geringerer Anstieg des GSSG-Gehaltes konnte bei Proben, die auf Oberflächenkulturen mit „Standortwasser“, 50 und 100 μM Cd(II) vorkultiviert wurden, festgestellt werden.

Eine Aussage über den Redox-Status einer Pilzprobe (Gesamtheit aller Pilz-Hyphen) konnte getroffen werden, indem der prozentuale Anteil des oxidierten Glutathions (GSSG) am Gesamt-GSH berechnet wurde (Tab. 4-1). Hier zeigte sich, dass der Anteil an GSSG nach Vorinkubation auf 50 μM Cd(II)-Platten jeweils am niedrigsten war, außer wenn 100 μM Cd(II) dem Flüssigmedium zugesetzt wurde. Bei dieser Probe ist der Anteil an GSSG mit ca. 5 % am höchsten. Alle anderen GSSG-Anteile beliefen sich auf ca. 1-3 %.

Tab. 4-1: Anteil des oxidierten Glutathions (GSSG) am Gesamt-Glutathion-Gehalt (GSH) in *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 nach Wachstum unter verschiedenen Bedingungen

Cd(II) in Flüssigkultur	Anteil des GSSG-Gehaltes am Gesamt-GSH-Gehalt [%]			
	K	25 μM Cd(II)	50 μM Cd(II)	100 μM Cd(II)
Oberflächenkultur ohne Cd(II)	1,82	0,92	2,07	2,37
Oberflächenkultur mit „Standortwasser“	2,38	1,17	2,31	1,79
Oberflächenkultur mit 50 μM Cd(II)	1,35	0,55	1,41	4,98
Oberflächenkultur mit 100 μM Cd(II)	3,07	1,63	1,70	2,21

4.2.5. Phytochelatin 2 und Metallothioneine

Der PC2-Gehalt (Abb. 4-19) stieg mit höher werdenden Konzentrationen an Cd(II) in der Flüssigkultur um das ca. 400-fache an (von ca. 1,2 nmol/g TM ohne Cd(II) in Flüssigkultur auf ca. 412 nmol/g TM mit 100 μM Cd(II) in der Flüssigkultur). Dabei ist auffällig, dass bei einer Oberflächenkultivierung mit 50 μM Cd(II) der höchste PC2-Gehalt festgestellt wurde, wenn 50 μM Cd(II) in der Flüssigkultur vorhanden waren. Wurde *H. lugdunensis* mit 100 μM Cd(II) in der Flüssigkultur gestresst, war der PC2-Gehalt bei Oberflächenkultivierung mit „Standortwasser“ am höchsten.

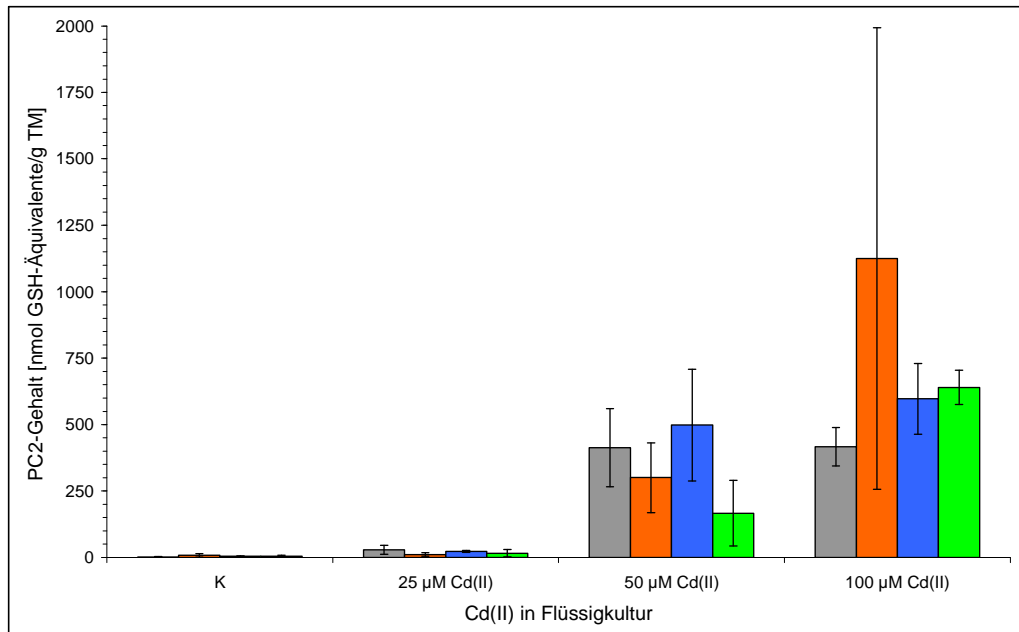


Abb. 4-19: Intrazellulärer Gehalt an Phytochelatin 2 bei *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 nach Wachstum in Flüssigkultur und Oberflächenkultur auf Malzagar-Platten ohne Cd(II) (grau), mit „Standortwasser“ präpariert (orange), mit 50 µM Cd(II) (blau) und mit 100 µM Cd(II) (grün); alle Unterschiede nicht signifikant; n = 3-7.

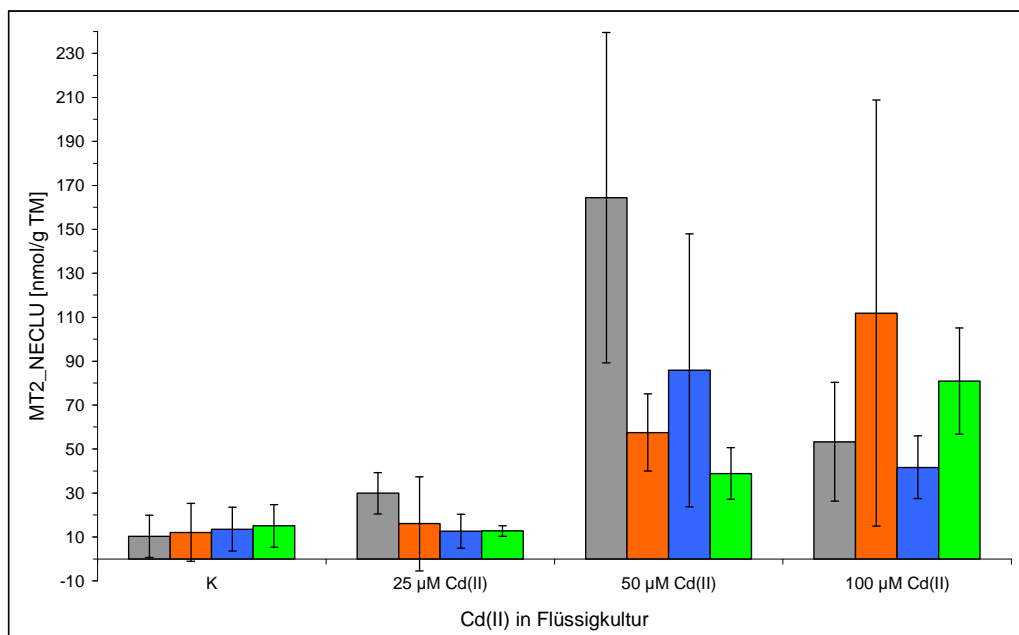


Abb. 4-20: Intrazellulärer Gehalt an MT2_NECLU bei *H. lugdunensis* nach Wachstum in Flüssigkultur und Oberflächenkultur auf Malzagar-Platten ohne Cd(II) (grau), mit „Standortwasser“ präpariert (orange), mit 50 µM Cd(II) (blau) und mit 100 µM Cd(II) (grün); alle Unterschiede nicht signifikant; n = 3-7.

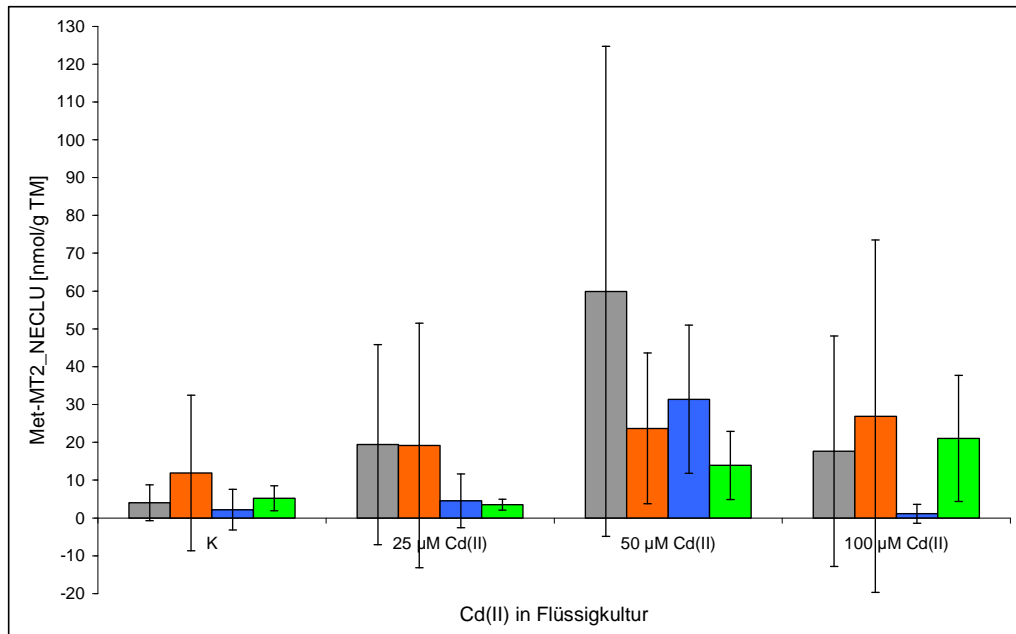


Abb. 4-21: Intrazellulärer Gehalt an Met-MT2_NECLU bei *H. lugdunensis* nach Wachstum in Flüssigkultur und Oberflächenkultur auf Malzagar-Platten ohne Cd(II) (grau), mit „Standortwasser“ präpariert (orange), mit 50 µM Cd(II) (blau) und mit 100 µM Cd(II) (grün); alle Unterschiede nicht signifikant; n = 3-7.

Die MT2- und Met-MT2-Gehalte (Abb. 4-20, Abb. 4-21) stiegen ebenfalls an, je mehr Cd(II) der Flüssigkultur zugegeben wurde. Dabei stieg der MT2-Gehalt nach Oberflächenkultivierung ohne Cd(II) von ca. 10 nmol/g TM auf 164 nmol/g TM mit 50 µM Cd(II) in der Flüssigkultur an. Die höchsten Konzentrationen an MT2_NECLU und Met-MT2_NECLU konnten erhalten werden, wenn der Pilz auf Oberflächenkultur ohne Cd(II) und mit 50 µM Cd(II) vorinkubiert und mit 50 µM Cd(II) in der Flüssigkultur gestresst wurde. Ebenfalls ein hoher MT2-Gehalt konnte nach Vorinkubation auf Standortwasser-Platten und 100 µM Cd(II) in der Flüssigkultur (EK) erreicht werden. Der Anteil des Met-MT2_NECLU am Gesamt-MT2-Gehalt ist in Tab. 4-2 dargestellt und betrug ca. 26-30 %.

Tab. 4-2: MT2_NECLU- und Met-MT2_NECLU-Gehalte in *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 unter 50 µM Cd(II)-Stress in der Flüssigkultur

Oberflächenkultur	MT2_NECLU [nmol/g TM]	Met-MT2_NECLU [nmol/g TM]	Gesamt-MT2 [nmol/g TM]	Met-MT2_NECLU [%]
ohne Cd(II)	164,4	59,95	224,35	26,7
mit „Standortwasser“	57,54	23,71	81,25	29,2
mit 50 µM Cd(II)	85,77	31,39	117,16	26,8
mit 100 µM Cd(II)	38,84	13,89	52,73	26,3

4.2.6. Massenspektrometrische Untersuchungen

Nachweis des PC2 und Analyse des synthetischen MT1_NECLU

Die massenspektrometrische Analyse des synthetischen Proteins MT1_NECLU ergab eine Masse für dieses Protein von m/z 2330 $[M+H]^+$. Diese Masse entspricht der theoretisch berechneten Masse von m/z 2329,72 $[M+H]^+$ (isotopisch) und bestätigt damit die Identität des MT1_NECLU.

Nach Fraktionierung des HPLC-Peaks mit der Retentionszeit 12,5 min (PC2) wurde dessen Identität ebenfalls überprüft. Es konnte eine Masse von m/z 540,14 $[M+H]^+$ bestimmt werden, was die Induktion von PC2 unter Cd(II)-Stress in *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 bestätigt.

Nachweis und *de novo*-Sequenzierung des Metallothioneins MT2_NECLU und dessen Vorstufe Met-MT2_NECLU

Der Hauptpeak mit einer Masse von m/z 2343,8 $[M+H]^+$ ergab ein Fragmentmassenspektrum, das auf eine gute Fragmentierung des Hauptpeaks (MT2_NECLU) schließen lässt (Abb. 4-22). Die erhaltenen Fragmente konnten den a-, b- oder y-Fragmenten des MT2_NECLU (s. Anhang Tab. 8-21) zugeordnet werden. Alle Fragmentmassen zeigen keine Abweichungen von den angegebenen Grenzwerten von $\pm 0,15$ bis $\pm 0,2$ Da (s. Anhang Abb. 8-6).

Der unbekanntere, kleinere Nebenpeak im Chromatogramm konnte als Protein mit einer Masse von m/z 2475,4 $[M+H]^+$ identifiziert und ebenfalls *de novo* sequenziert werden (Abb. 4-23).

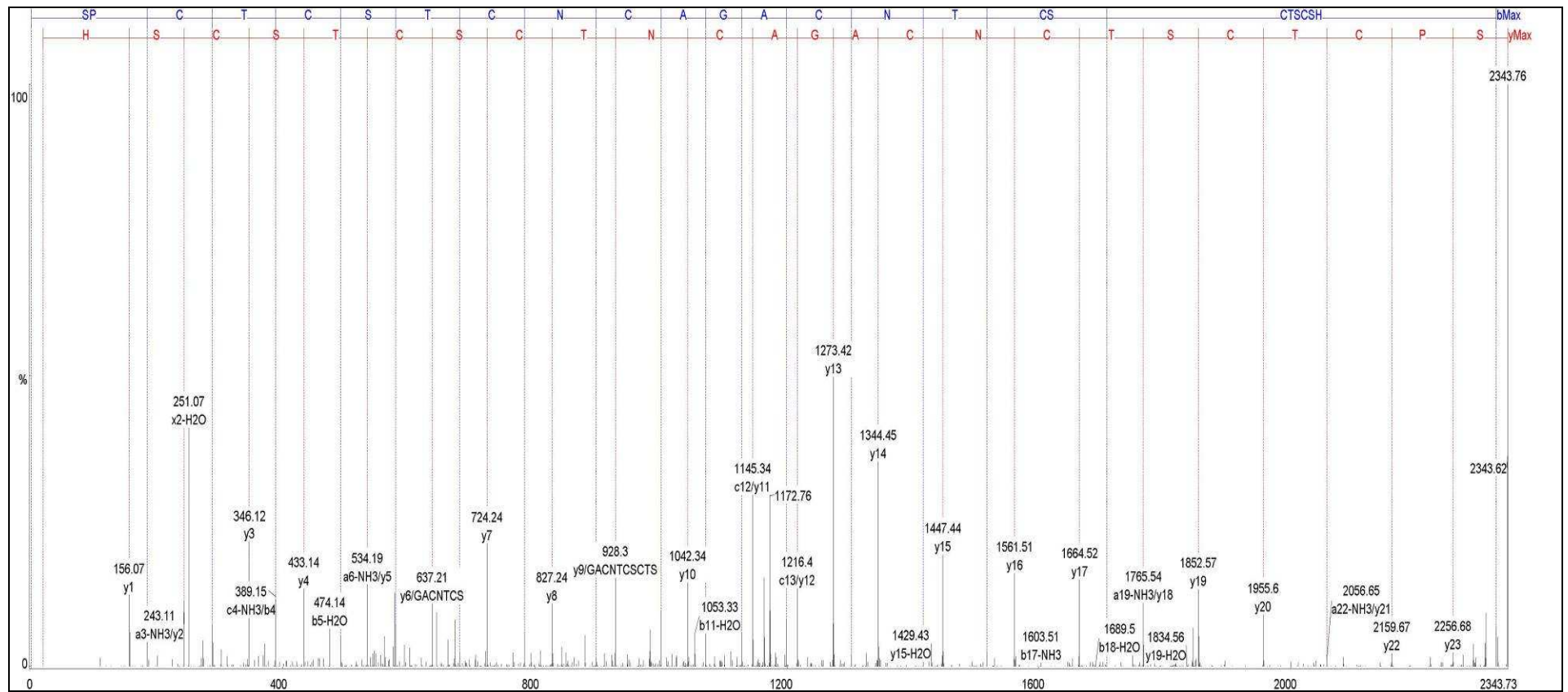


Abb. 4-22: Massenerfallsspektrum von m/z 2343,8 $[M+H]^+$ mit Zuordnung der Massenpeaks zu den a-, b- und y-Fragmenten und damit der *de novo*-Sequenzierung des MT2_NECLU.

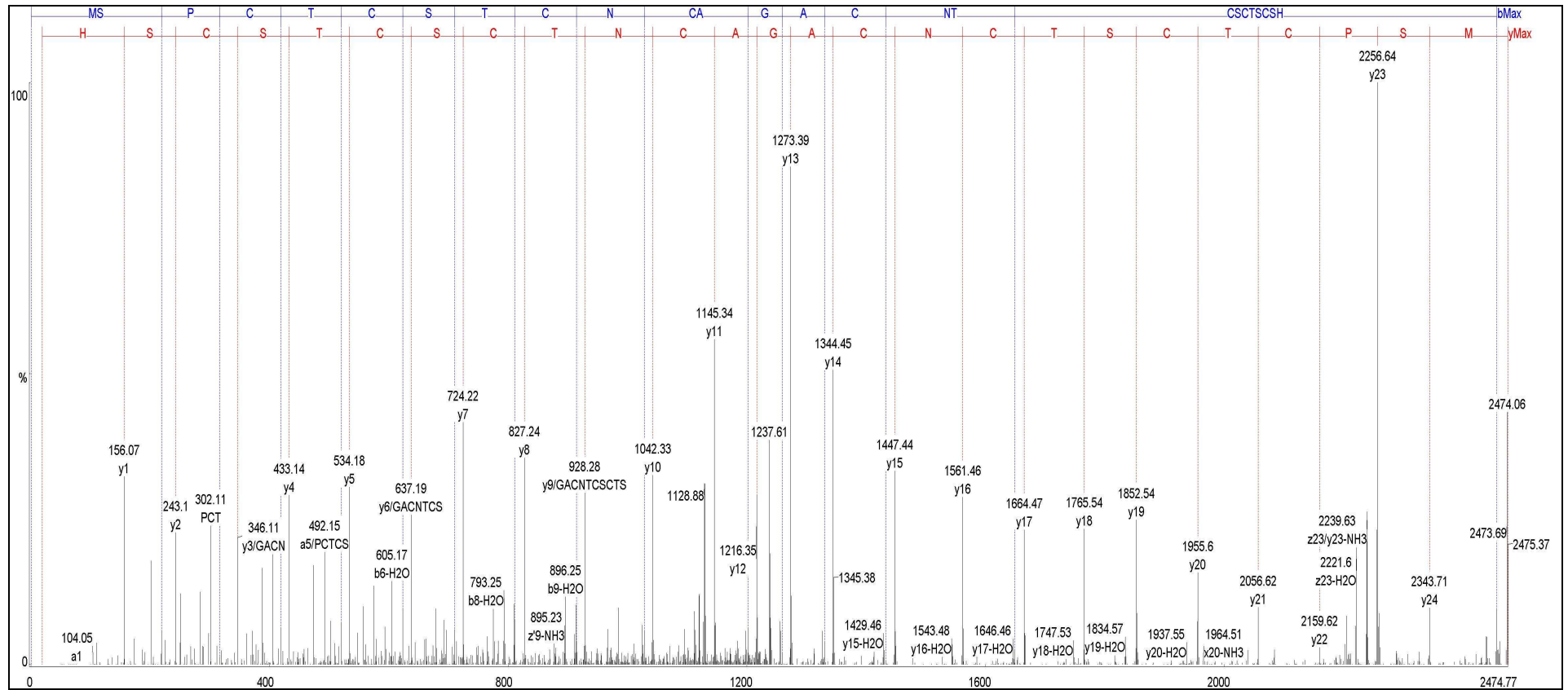


Abb. 4-23: Massenerfallsspektrum von m/z 2475,4 $[M+H]^+$ mit Zuordnung der Massenpeaks zu den a-, b- und y-Fragmenten und damit der *de novo*-Sequenzierung des Met-MT2_NECLU.

4.3. Molekularbiologische Untersuchungen

4.3.1. Analyse des Gens *mt2_neclu* in *Heliscus lugdunensis*

Die Sequenz des Gens *mt2_neclu* konnte mit Hilfe degenerierter Oligonukleotide identifiziert werden (Abb. 4-24):

Start	Stop
ATG TCTCCGTGCACCTGCTCTACGTGCAACTGCGCCGGCGCTTGCAAC ACT TGCTCTTGACCTCCTGCTCTCACTAA	
(M) S P C T C S T C N C A G A C N <u>T</u> C S C T S C S H	

Abb. 4-24: Sequenz des Gens *mt2_neclu* (75 bp). In schwarz ist die DNA-Sequenz des Gens, in fett die Proteinsequenz des Proteins MT2_NECLU, unterstrichen ist die Aminosäure dargestellt, die wichtig für die Bestimmung der MT2_NECLU-Sequenz ist und in *kursiv* ist die Base Adenin dargestellt, die wichtig für die Identifizierung der Aminosäure Threonin und damit des Metallothioneins MT2_NECLU ist.

Das Gen *mt2_neclu* in *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 besteht aus 78 bp mit dem Startcodon ATG und dem Stopcodon TAA.

Die optimale theoretische Schmelztemperatur der Primer MTHLfor1 und MTHLrev1 betrug 59-67 °C, die PCR wurde mit *annealing*-Temperaturen von 55-65 °C durchgeführt. Die beste Ausbeute an PCR-Produkt konnte dabei bei einer *annealing*-Temperatur von 60 °C erreicht werden.

4.3.2. Analyse der regulatorischen Genregion

Nach PCR mit den degenerierten („gewobbelten“) Oligonukleotiden MTHLregul (mit Konsensussequenz für eine *upstream activating sequence* (UAS)) und MTHLfor1reversed (Anfang der Gensequenz umgedreht) konnte für ein MT-Gen eine *upstream* vom Gen gelegene regulatorische Region mit einer Größe von 236 bp identifiziert werden (Abb. 4-25). Innerhalb dieser Region konnten vier putative UAS zugeordnet werden. Die zum MT-Gen gehörige DNA-Sequenz ist im Vergleich zu der des *mt2_neclu* (Abb. 4-26) verschieden, so dass es sich möglicherweise um ein zweites MT-Gen handelt. Weitere Analysen von *E. coli*-Klonen und Plasmiden ergaben keine Erkenntnisse, ob es sich um das Gen *mt2_neclu* oder mit geringerer Wahrscheinlichkeit um ein anderes MT-Gen handelt.

Primer MTHLreg	
TGCG <u>TC</u> TTTATT <u>GCTG</u> TGCGAAATCAGACTATTACGGCTCAAACGGGCGT	50
CTCTGGAAGTGGTCATGACCACATTTTCGGGCATAGCGTCAGCACTTCCGG	100
TGTGTAGATCGGGAGATGGAAGTGACATTT <u>CTCGCAG</u> ACCAGATTTCCCA	150
GCCCGACCACT <u>TC</u> TCC <u>GCTGTGATAAA</u> CCCCATGATGATTGAGGTCCTGG	200
AAAACCTTCGCGCCAT <u>TC</u> AAG <u>CTG</u> CGTTTTATCGGTGATGT <u>CCCC</u> TGCAC	250
CTGCTCCACCTGC	263
C S T C	S P C T
Primer MTHLfor1rev	

Abb. 4-25: Sequenz (263 bp) der regulatorischen Genregion eines MT-Gens. In schwarz ist die regulatorische DNA-Sequenz des Gens, in rot die Sequenz des Primer MTHLreg, in rot und fett die Proteinsequenz, in blau die Sequenz des Primers MTHLfor1rev, der am Beginn des Gens bindet, in grün die zu Abb. 4-24 unterschiedlichen Basen, in fett und kursiv eine mögliche TATAAA-Box und in fett und unterstrichen die möglichen *upstream activating sequences* (UAS) dargestellt.

4.3.3. Quantifizierung *mt2_neclu*-Genprodukts

Die *Northern-Blot*-Analyse ergab folgendes Autoradiogramm (Abb. 4-26). Auf dem RNA-Gel (Abb. 4-26B) sieht man deutlich die Gesamt-RNA, die aus unterschiedlich gestressten Proben von *H. lugdunensis* und in einer Menge von ca. 20 µg aufgetragen wurde. Die beiden dicken Banden können der 18S- und 28S-rRNA zugeschrieben werden. Nach Hybridisierung mit der DIG-markierten Sonde *mt2_neclu*, konnte pro Probe eine (zwei) distinkte Bande(n) mit einer Größe von ca. 489 bp (196 bp) detektiert werden (Abb. 4-26A). Dabei war auffällig, dass nach Oberflächenkultivierung ohne Cd(II) und ohne Cd(II) in der Flüssigkultur nur wenig MT2-mRNA detektiert werden konnte. Man kann sagen, dass eine sehr geringe konstitutive Expression stattfindet. Dagegen wurde bei 25, 50 und 100 µM Cd(II) in der Flüssigkultur eine deutliche Zunahme an MT2-mRNA festgestellt, wobei diese bei 50 und 100 µM Cd(II) am größten war. Nach Oberflächenkultur mit 100 µM Cd(II) und ohne Cd(II) in der Flüssigkultur konnte eine Erhöhung des MT2-mRNA-Gehaltes im Vergleich zur Kontrolle auf Malzagar vorkultivierter Pilze beobachtet werden. Eine Erhöhung der MT2-Transkriptmenge im Vergleich zur Kontrolle konnte auch für die Kulturen, die mit 25-100 µM Cd(II) gestresst und auf Oberflächenkultur mit 100 µM Cd(II) vorkultiviert wurden, festgestellt werden. Es ist weiterhin eine zweite Bande bei ca. 196 bp zu erkennen, die allerdings nur eine sehr geringe Intensität hat und nur bei 50 bzw. 100 µM Cd(II) in der Flüssigkultur auftritt. Dies könnte die mRNA eines zweiten Metallothionein-Gens darstellen. Eine andere Erklärung wäre ein Gen mit MT-ähnlichen Sequenzen, wie z. B. für Zinkfinger-

Proteine (ca. 1500 bp) oder andere Regulatorproteine, die allerdings meist größer als 196 bp sind.

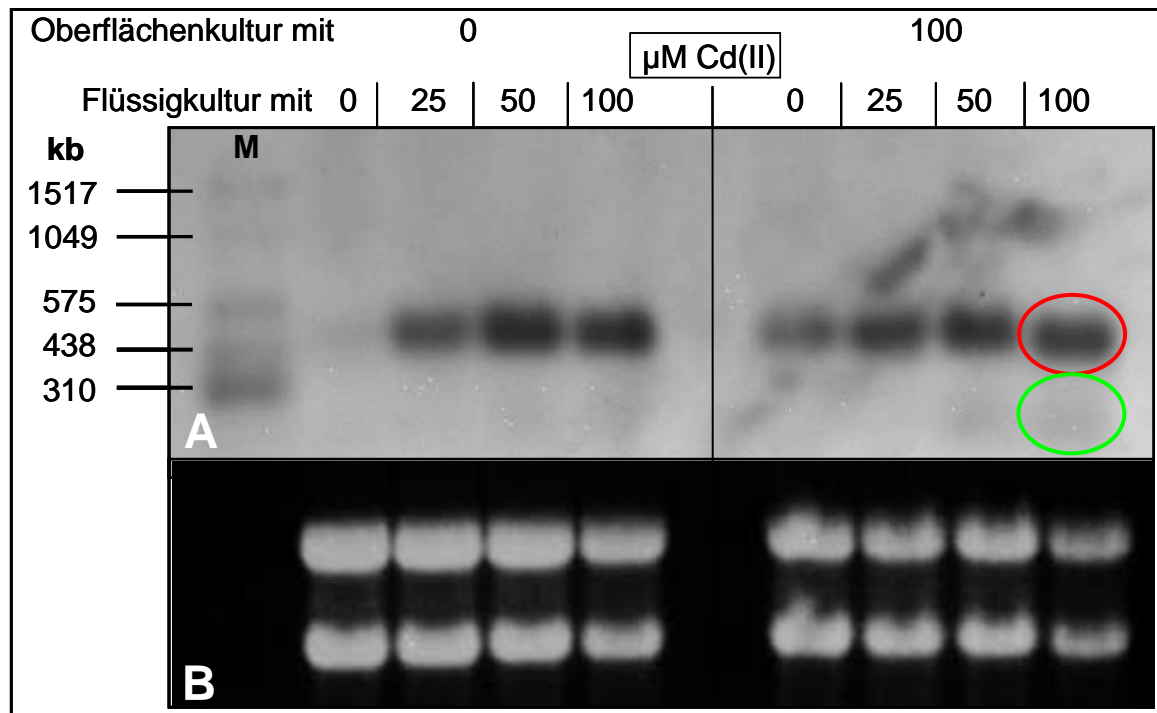


Abb. 4-26: Autoradiogramm des Northern-Blots mit der *mt2_neclu*-Sonde (A) und (B) RNA-Gelfoto der aus *H. lugdunensis* Stam H4-2-4 isolierten Gesamt-RNA (20 µg/Spur). M: RNA-Marker; K: Wachstum von *H. lugdunensis* nach Oberflächenkultur auf Malzagar-Platte ohne Cd(II) oder mit 100 µM Cd(II) und ohne Cd(II) in Flüssigkultur; 25: Wachstum von *H. lugdunensis* nach Oberflächenkultur auf Malzagar-Platte ohne Cd(II) oder mit 100 µM Cd(II) und mit 25 µM Cd(II) in Flüssigkultur; 50: Wachstum nach Wachstum von *H. lugdunensis* nach Oberflächenkultur auf Malzagar-Platte ohne Cd(II) oder mit 100 µM Cd(II) und mit 50 µM Cd(II) in Flüssigkultur; 100: Wachstum nach Wachstum von *H. lugdunensis* nach Oberflächenkultur auf Malzagar-Platte ohne Cd(II) oder mit 100 µM Cd(II) und mit 100 µM Cd(II) in Flüssigkultur; Größe der detektierten MT-mRNA: ca. 489 bp bzw. 196 bp.

In Tab. 4-3 sind die Ergebnisse der semiquantitativen RNA-Analyse zusammengefasst. Mittels Markerbanden 1-5 wurde eine Größenbestimmung der MT2-mRNA vorgenommen. Die durchschnittliche Größe dieser beträgt rund 489 bp. Weiterhin ist die RNA-Menge auf dem Gel in % angegeben, wobei die Kontrolle, die auf Oberflächenkultur ohne Cd(II) vorkultiviert wurde, als 100 % angenommen wurde. Die Intensität der detektierten Banden auf dem Northern Blot (Pixel) wurden dann in Bezug zu 100 % RNA der Kontrolle gesetzt. Anschließend erfolgte eine Berechnung der Bandenintensität in Prozent zu 100 % RNA der Kontrolle.

Die Auswertung zeigt, daß nicht in jeder Spur die gleiche Gesamt-RNA-Menge aufgetragen wurde, obwohl deren Konzentration vorher bestimmt wurde (103,6 % bis 48,3 %). Eine mögliche Ursache hierfür könnte ein rascher Abbau der RNA durch ubiquitär vorhandene

RNasen sein. Die Transkriptmengen an MT2-mRNA wurden durch die Intensität auf dem Blot und der Berechnung in Bezug auf 100 % RNA angegeben. Man kann erkennen, dass die Transkriptmenge mit steigender Konzentration an Cd(II) zunimmt. Dies ist sowohl bei Kulturen, die auf Oberflächenkultur ohne Cd(II) vorkultiviert wurden auch mit 100 µM Cd(II) vorkultivierten Proben der Fall. Wurden die Kulturen auf Oberflächenkulturen mit 100 µM Cd(II) vorinkubiert, konnte man eine Erhöhung der Transkriptmenge des *mt2_neclu* im Vergleich zur Kontrolle ohne Schwermetall-Vorkultur auf 144,5 % (124,1 % ohne RNA-Bezug) feststellen, wenn kein Cd(II) in der Flüssigkultur vorhanden war. Auch die MT2-mRNA-Menge nach 25, 50 und 100 µM Cd(II) in der Flüssigkultur ist im Vergleich zur Oberflächenkultur ohne Cd(II) erhöht.

Es ist allerdings fraglich, ob sich die MT2-mRNA-Menge bei der Auftragung der gleichen Menge an Gesamt-RNA erhöht hätte. Deshalb ist es nicht möglich, Absolutmengen an MT2-mRNA zu bestimmen, es ist aber ein Trend sichtbar.

Tab. 4-3: Auswertung des Northern Blots mit der Software GelScan (V6.0.0 Build: 142; BioSciTec GmbH)

Spur	Bande	Intensität auf Blot [Pixel]	Intensität auf Blot [%]	RNA auf Gel [%]	Intensität in Bezug auf 100 % RNA [Pixel]	Intensität in Bezug auf 100 % RNA [%]	RNA-Größe [bp]
M	1	-	-	-	-	-	1.517
	2	-	-	-	-	-	1.049
	3	-	-	-	-	-	575
	4	-	-	-	-	-	438
	5	-	-	-	-	-	310
Malzagar-Platte als Vorkultur							
K	1	156988	100	100	156988,0	100	475
25	1	205887	132,1	103,6	198732,6	126,6	500
50	1	233141	148,6	98,3	237172,9	151,1	500
100	1	229106	145,9	75,0	305474,7	194,6	488
100 µM Cd-Platte als Vorkultur							
K	1	193957	124,1	85,5	226850,3	144,5	487
25	1	218495	139,2	73,6	296868,2	189,1	494
50	1	222492	141,9	78,1	284880,9	181,5	500
100	1	213356	135,3	48,3	441730,8	281,4	469
durchschnittliche RNA-Größe							489

4.4. Strukturuntersuchungen des MT1_NECLU

4.4.1. Modell des Metallothioneins MT1_NECLU

Bei den für die Homologiemodellierung in Frage kommenden MT1_NECLU-ähnlichen Metallothionein-Domänen wurde insbesondere nach solchen mit bekannter NMR- oder Kristallstruktur gesucht. Folgende Strukturen wurden gefunden (Tab. 4-4):

Tab. 4-4: MT1_NECLU-ähnliche Metallothioneine bzw. deren Domänen

PDB-Code	Metallothionein aus Organismus	Art der Struktur
2MRT	β -Domäne des MTA_NOTCO aus <i>Notothenia coriiceps</i>	NMR-Struktur
1M0J	β -Domäne des MT2_RAT aus <i>Rattus norvegicus</i>	NMR-Struktur
4MT2	β -Domäne des MT2_RAT aus <i>Rattus norvegicus</i>	Kristall-Struktur
1T2Y	MT_NEUCR aus <i>Neurospora crassa</i>	NMR-Struktur

Die NMR- oder Kristallstrukturen sind in der *Protein Data Bank* (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) unter den angegebenen Codes zu finden.

Die *alignments* ergaben Identitäten bzw. Homologien von 60 % (1M0J), 52 % (2MRT/4MT2) und 50 % (1T2Y) zum MT1_NECLU (Abb. 4-27).

	* * *	* * * *	* * * *	
MT1_NECLU	-SP-CTCST---	CNCAGACNS--	CSCTSCSH	24
2MRT	MDPNCSCATD	GCSCAGSCK	CKQCKCTSCK-	30
1M0J	-DP-CECSKSG	TCNCGGSC	TCTNCSCKSCK-	28
MT1_NECLU	SPCTCS---	TCNAGACNS	CSCTSCSH	24
1T2Y	MGDCGCSG	ASSCNCG---	SGCSCSNCGSK	26
	* **	***	*** *	

Abb. 4-27: *Alignment* von Metallothionein-Sequenzen mit den höchsten Identitäten zum MT1_NECLU; 1M0J: β -Domäne MTA_NOTCO aus *Notothenia coriiceps*; 2MRT/4MT2: β -Domäne MT2_RAT aus *Rattus norvegicus*; 1T2Y: MT_NEUCR aus *N. crassa*; * identische Cys; * identische andere Aminosäuren.

Die beiden Metallothionein-Domänen mit den höchsten Homologien wurden dann für die Homologiemodellierung verwendet. Von der β -Domäne des MT2_RAT war sowohl eine NMR-Struktur (1M0J), als auch eine Röntgenkristallstruktur bekannt (4MT2). Drei Strukturmodelle wurden generiert und bewertet (Abb. 4-28). Das Homologiemodell des MT_NEUCR zeigte während der Moleküldynamiksimulationen starke Abweichungen zwischen den Abständen analoger Atome (*root mean square*, RMS) im Vergleich zur Startstruktur und wurde daher für die weiteren Untersuchungen nicht betrachtet.

Alle Modelle weisen eine *loop*-artige Struktur auf, bei der die Thiolgruppen in das Innere des Proteins gerichtet sind. Alle Modelle enthalten zwei Cd(II)-Ionen, welche tetraedrisch über die Thiolgruppen komplexiert werden. Innerhalb der Aminosäurekette konnten in den Moleküldynamiksimulationen zwei unterschiedlich bewegliche Bereiche lokalisiert werden. Aufgrund der Cd(II)-Komplexierung sind die Cystein-Reste (und ihre Aminosäure-Nachbarn) in ihrer Position weitestgehend fixiert, während der N- und C-Terminus durch das Fehlen von Sekundärstrukturelementen frei beweglich ist.

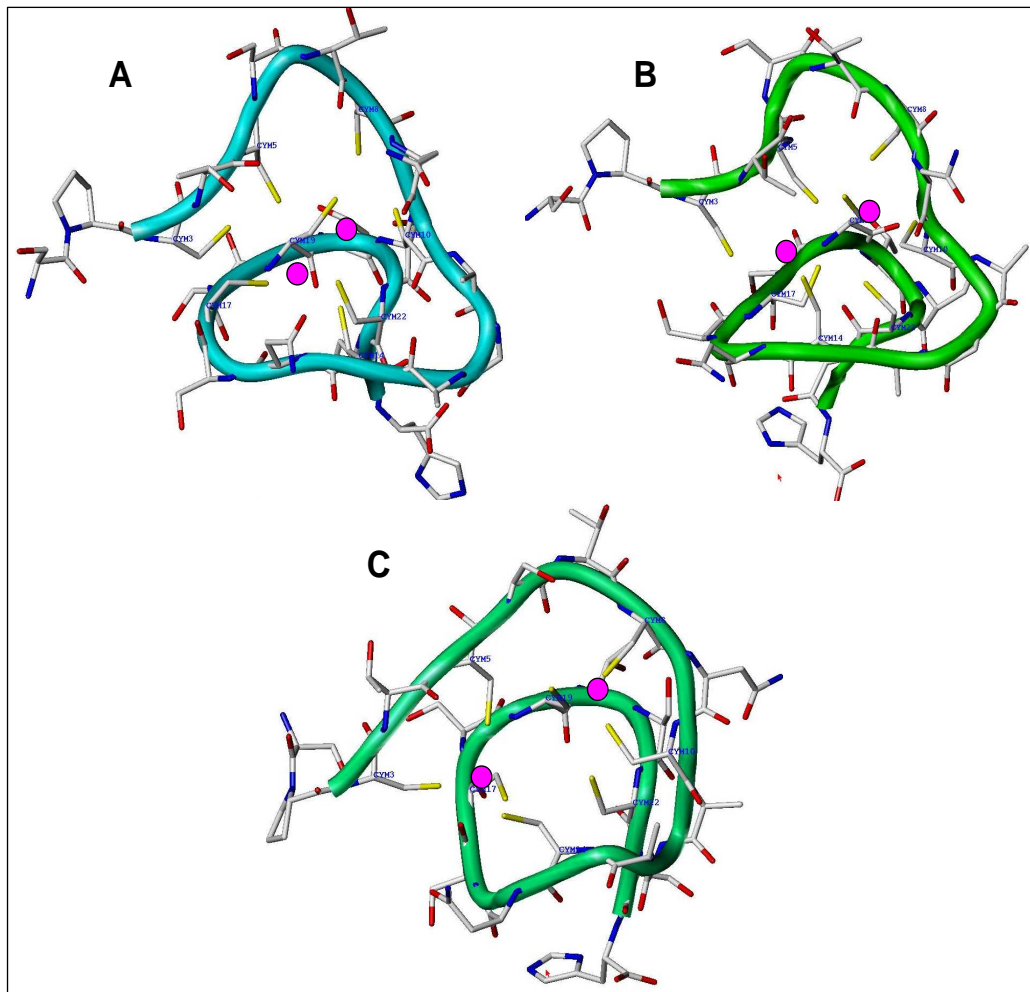


Abb. 4-28: Strukturmodelle des MT1_NECLU mit Hilfe der bekannten NMR-Struktur des (A) 1M0J (β -Domäne MTA_NOTCO, *Notothenia coriiceps*), des (B) 2MRT (β -Domäne MT2_RAT, *Rattus norvegicus*) und des (C) 4MT2 (β -Domäne MT2_RAT, *Rattus norvegicus*) ermittelt; die komplexierten Cd(II)-Ionen sind in pinkfarbenen Kugeln dargestellt; Thiolgruppen: gelb; Stickstoff: blau; Sauerstoff: rot; Kohlenstoff: grau; Protein-backbone: blau/türkis/grün.

4.4.2. Strukturanalyse mittels Fern-UV-Circulardichroismus

Nach Zugabe von Cd(II) in verschiedenen molaren Verhältnissen zum MT1_NECLU, wurden Circulardichroismus- (CD-) Messungen der Proben durchgeführt.

Die Analyse der aufgenommenen CD-Spektren ergab, dass die Aminosäurekette des kleinen Proteins MT1_NECLU ohne Cd(II) keine Merkmale einer Sekundärstruktur aufweist, es besitzt eine *random coil*-Struktur (Abb. 4-29). Das lokale Minimum im Spektrum befindet sich bei ca. 202 nm, während sich im Bereich von ca. 220 nm ein kleines Plateau bildet. Dieses nähert sich ab ca. 240 nm dem Nullwert. Bei Zugabe von Cd(II) konnte eine Änderung in der Anordnung der Aminosäure-Kette hin zu einer *loop*-ähnlichen Struktur festgestellt werden. Das Minimum und das kleine Plateau im Bereich von ca. 220 nm sind nicht so niedrig wie bei dem apo-MT1_NECLU. Hier nähert sich das Spektrum schon ab ca. 230 nm dem Nullwert an. Allerdings konnten auch in diesem Fall keine definierten Sekundärstruktur-Merkmale, wie z. B. α -Helix oder β -Faltblatt, gefunden werden. Nach Zugabe der zweifachen Stoffmenge an Cd(II) im Vergleich zur Stoffmenge des Apoproteins wurde eine Sättigung des MT1_NECLU mit Cd(II) erreicht, da sich die Spektren nach Zugabe der vier- und zehnfachen Cd(II)-Menge nicht wesentlich veränderten. Dieser Befund deutet darauf hin, dass das Protein zwei Cd(II)-Ionen komplexiert, was auch mit den Ergebnissen der massenspektrometrischen Untersuchungen übereinstimmt (Jaeckel *et al.*, 2005).

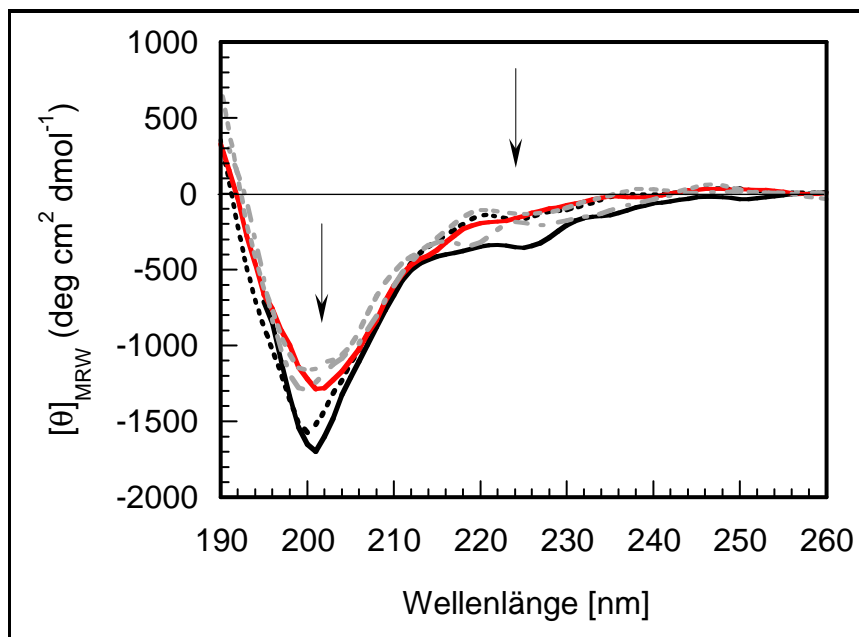


Abb. 4-29: Fern-UV-Circulardichroismus-Spektren des MT1_NECLU nach Zugabe unterschiedlicher Mengen an Cd(II); schwarz: apo-MT1, schwarz gepunktet: mit einfacher molarer Menge an Cd(II); rot: mit zweifacher molarer Menge an Cd(II); grau gestrichelt: mit vierfacher molarer Menge an Cd(II); graue Strich-Punkt-Linie: mit zehnfacher molarer Menge an Cd(II).

Nach Auftragung der spezifischen Elliptizität bei 202 nm (Minimum im Spektrum) gegen die Menge an zugegebenem Cd(II) konnte eine Sättigung nach Zugabe der zweifachen Menge an Cd(II) zum MT1_NECLU beobachtet werden (Abb. 4-30).

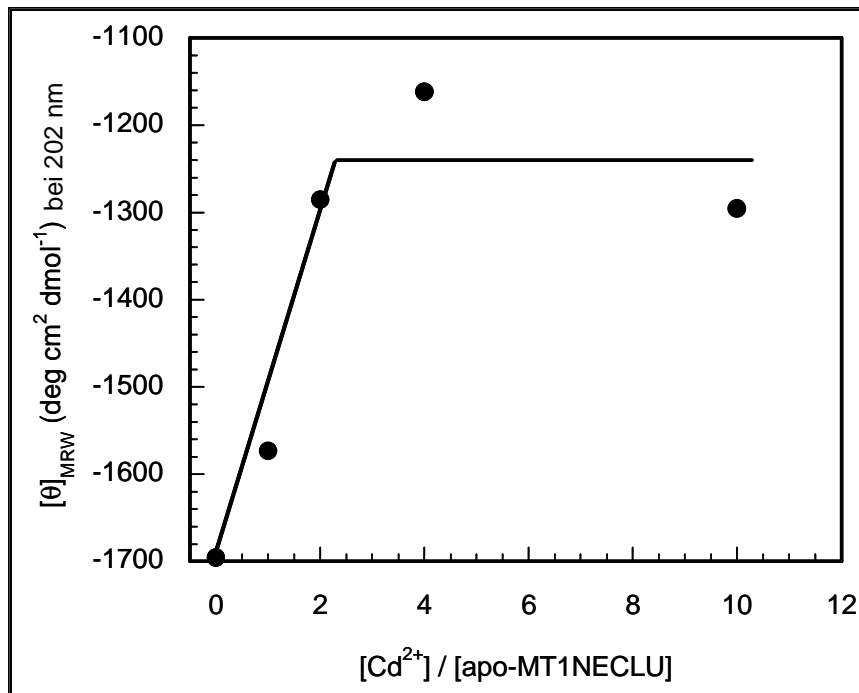


Abb. 4-30: Auftragung der Werte der spezifischen Elliptizität bei 202 nm gegen die zugegebene Menge an Cd(II) zum MT1_NECLU.

4.4.3. Strukturbestimmung mittels 400 MHz-NMR-Spektroskopie

Zur Bestimmung der Struktur des apo-MT1_NECLU ohne Cd(II) und des Cd₂-MT1_NECLU wurden beide Proteine mittels hochauflösender NMR-Spektroskopie durch die Verwendung von ein- und zweidimensionalen Messtechniken untersucht. In Abb. 4-31 sind die eindimensionalen ¹H-NMR-Spektren dargestellt.

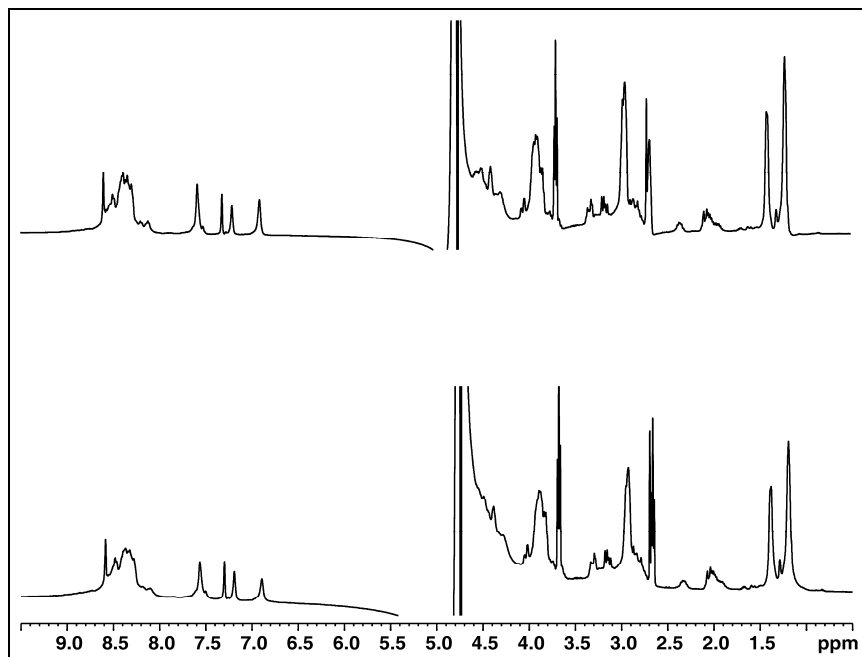


Abb. 4-31: Vergleich der 400 MHz 1D ^1H -NMR-Spektren von apo-MT1_NECLU (1 mM, oben) und Cd_2 -MT1_NECLU (1 mM + 2 mM CdCl_2 , unten) in 90 % H_2O bidest./10 % D_2O und 0,03 % 2-Mercaptoethanol bei 300 K.

Neben wenigen sehr scharfen und gut aufgelösten Signalen zeigen die Spektren eine geringe Signaldispersion und relativ hohe Linienbreiten für die Mehrzahl der Protonensignale. Im Bereich der Amid-Protonen liegt die Signaldispersion unter 0,5 ppm. In der αH -Protonenregion und im Aliphatenbereich erscheinen ebenfalls sehr breite, wenig aufgelöste Signale bzw. Signalberge, die zum Teil ineinander übergehen. Mit dem Ziel, eine bessere Auflösung zu erhalten, wurden auch 1D-Messungen bei 283 K durchgeführt, die jedoch nicht zum gewünschten Ergebnis führten (Spektren nicht gezeigt). Auch in diesem Fall lagen besonders die Amidprotonenresonanzen als kaum aufgelöste Signalberge vor.

Um dennoch die für die Raumstrukturaufklärung notwendigen Zuordnungen der NMR-chemischen Verschiebungen der Aminosäureprotonen der Proteinsequenz zu ermöglichen bzw. zu versuchen, wurde eine Reihe von zweidimensionalen NMR-Spektren, einschließlich COSY-, TOCSY- und NOESY-Spektren, gemessen. Tatsächlich konnten durch die Kombination der COSY- und TOCSY-Experimente individuelle Spinsysteme für einen Teil der Aminosäuren der beiden Proteine zugeordnet werden (Tab. 4-5 und 4-6).

Tab. 4-5: Zugeordnete ¹H-NMR-chemische Verschiebungen (in ppm) von apo-MT1_NECLU bei 400 MHz; a - keine genaue Zuordnung aufgrund von starken Signalüberlagerungen möglich

Aminosäurerest	NH	α H	β H	Andere
P2	-	4,54	2,35	γ H 2,02/2,05 δ H 3,68/3,77
T4	8,19/8,29/8,32	4,41	4,29	1,22
T7	8,19/8,29/8,32	4,41	4,29	1,22
N9	a	a	a	NH ₂ 6,91/7,21 7,58
A11	8,11/8,41	4,36	1,40/1,41	-
A13	8,11/8,41	4,36	1,40/1,41	-
N15	a	a	a	NH ₂ 6,91/7,21 7,58
T20	8,19/8,29/8,32	4,41	4,29	1,22
H24	8,49	4,69	3,17/3,33	2H 8,60 4H 7,31

Tab. 4-6: Zugeordnete ¹H-NMR-chemische Verschiebungen (in ppm) von Cd₂-MT1_NECLU bei 400 MHz; a - keine genaue Zuordnung aufgrund von starken Signalüberlagerungen möglich

Aminosäurerest	NH	α H	β H	Andere
P2	-	4,52	2,33	γ H 2,00/2,03 δ H 3,65/3,75
T4	8,17/8,27/8,30	4,38	4,27	1,20
T7	8,17/8,27/8,30	4,38	4,27	1,20
N9	a	a	a	NH ₂ 6,89/7,19 7,56
A11	8,09/8,40	4,33	1,39	-
A13	8,09/8,40	4,33	1,39	-
N15	a	a	a	NH ₂ 6,89/7,19 7,56
T20	8,17/8,27/8,30	4,38	4,27	1,20
H24	8,47	4,69	3,16/3,31	2H 8,58 4H 7,30

Es war möglich, das Spinsystem des einzigen Prolins in Position 2 sehr gut auf der Basis der entsprechenden Korrelationen in den COSY- und TOCSY-Spektren zuzuordnen. Alle drei Methylgruppen-enthaltenden Aminosäuren Threonin, ebenso wie die beiden Alanine konnten mittels der gleichen Prozedur ebenfalls einfach zugeordnet werden. Eine sequentielle Zuordnung war jedoch aufgrund fehlender Daten aus den NOESY-Spektren nicht möglich (zu wenige Korrelationspeaks). Die Kreuzsignale, die durch skalare Kopplung der Seitenketten-NH₂-Protonen von Asparagin in Position 9 und 15 entstehen, wurden aus den TOCSY-Spektren identifiziert. Eine genaue Zuordnung der Amidprotonenresonanzen sowie der α H- und Seitenkettenprotonen der beiden Asparaginreste war jedoch wegen starker Signalüberlagerungen in den zweidimensionalen Spektren nicht erfolgreich. Dies trifft ebenso

für sämtliche Protonen der Aminosäurereste S1, C3, C5, S6, C8, C10, G12, C14, S16, C17, S18, C19, S21, C22 und S23 zu. Damit konnten 15 von 24 Aminosäuren der beiden Proteine MT1_NECLU und Cd₂-MT1_NECLU nicht zugeordnet werden. Die Protonen dieser Aminosäuren liegen zwar in den Erwartungsbereichen der chemischen Verschiebungen für Serin, Cystein und Glycin, sind aber extrem stark überlagert und sehr breit. Dies lässt sich exemplarisch anhand von entsprechenden Ausschnitten aus den COSY-Spektren von apo-MT1_NECLU sehr deutlich veranschaulichen (Abb. 4-32).

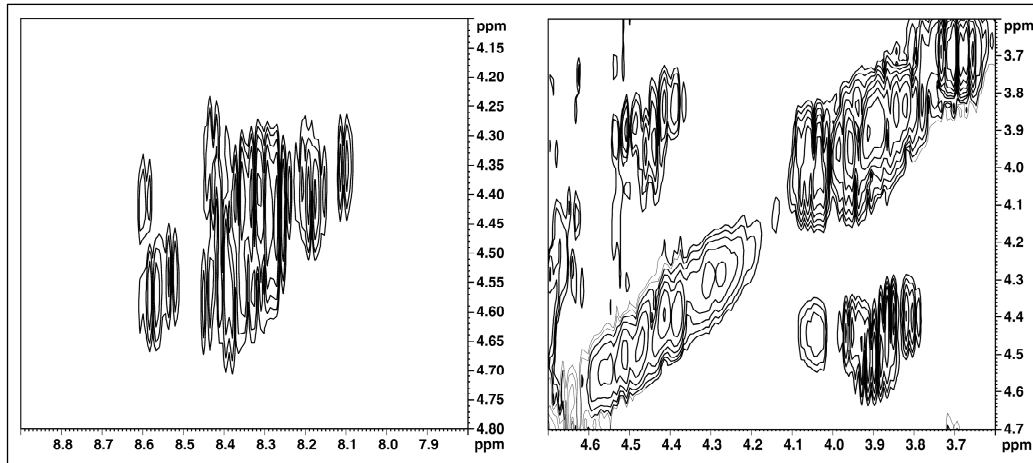


Abb. 4-32: Ausschnitte aus dem zweidimensionalen COSY-Spektrum von apo-MT1_NECLU bei 400 MHz, gemessen bei 300 K; links: Teil der *fingerprint*-Region, rechts: α H-Protonenbereich.

Dagegen konnten die Protonen der einzigen aromatischen Aminosäure in beiden Proteinen (His am C-Terminus) auf der Basis ihrer charakteristischen chemischen Verschiebungen und relativ scharfer Linienformen sehr gut zugeordnet werden.

Bei der genauen Analyse der TOCSY-Spektren sowohl von apo-MT1_NECLU als auch von Cd₂-MT1_NECLU ist auffällig, dass zwei Signalsätze unterschiedlicher Intensität erscheinen (Abb. 4-33), die auf die Existenz zweier Konformationen hindeuten, was für α -Pro-Peptidderivate im Allgemeinen auch zu erwarten ist (Fischer, 2000; Fischer & Aumüller, 2003).

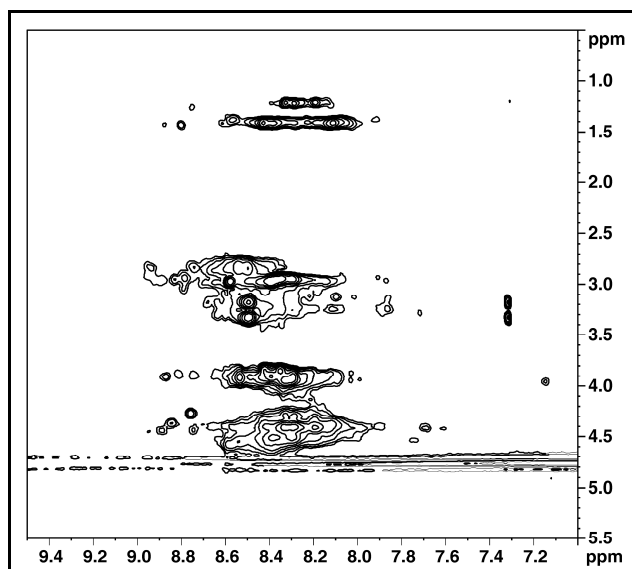


Abb. 4-33: Ausschnitt aus dem zweidimensionalen TOCSY-Spektrum von apo-MT1_NECLU (*fingerprint-Region*) bei 400 MHz, gemessen bei 300 K; Kreuzsignale starker und schwacher Intensität deuten auf das gleichzeitige Vorhandensein von mindestens zwei Konformationsisomeren hin.

Einer dieser Datensätze resultiert höchstwahrscheinlich von einem *cis*-Konformer mit einer *cis*-Peptidbindung zwischen Ser1 und Pro2. Ob es sich bei der Hauptpopulation um das *trans*-Konformer und bei der Nebenpopulation um das *cis*-Konformer handelt, konnte jedoch aufgrund der fehlenden charakteristischen Kreuzsignale in den NOESY-Spektren nicht eindeutig belegt werden. Wie oben bereits erwähnt, konnten in den zweidimensionalen NOESY-Spektren beider Proteine praktisch keine NOEs detektiert werden. Somit waren sequentielle Zuordnungen und Aussagen über räumliche Konnektivitäten von Protonen unmöglich.

Der Vergleich der ^1H -chemischen Verschiebungen des apo-MT1_NECLU mit denen des Cd_2 -MT1_NECLU für die Aminosäuren, die eindeutig zugeordnet werden konnten, ergibt Verschiebungsdifferenzen von maximal 0,03 ppm (Tab. 4-5 und 4-6). Diese geringen chemischen Verschiebungseffekte lassen darauf schließen, dass die Zugabe von Cd(II) mit äußerst geringen strukturellen Auswirkungen auf MT1_NECLU einhergeht. Dies lässt sich auch anhand des Vergleichs aller gemessenen zweidimensionalen NMR-Spektren verdeutlichen, die kaum einen Unterschied zeigen (Abb. 4-34 bis 4-36). Eine Veränderung der NMR-Spektren durch den pH-Wert bei Zugabe von CdCl_2 -Lösung zum apo-MT1_NECLU kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da sich dieser nur um 0,2 Einheiten verschob. Die Messung des pH-Wertes beim apo-MT1_NECLU ergab einen Wert von 6,9, während Cd_2 -MT1_NECLU einen pH-Wert von 6,7 aufwies.

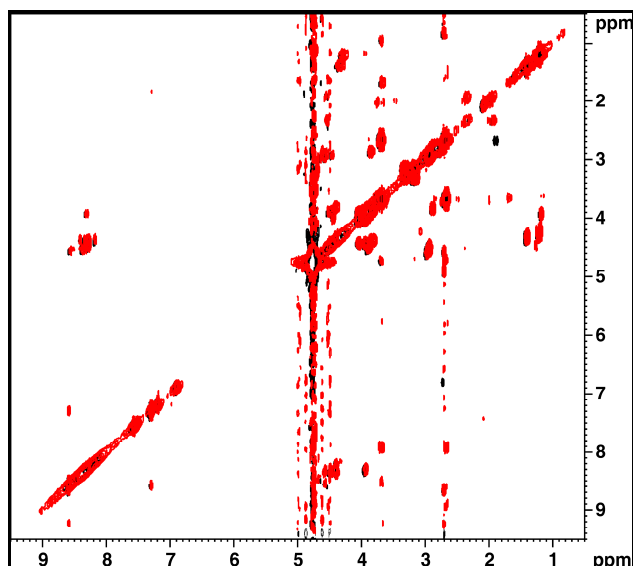


Abb. 4-34: Vergleich der zweidimensionalen H,H-COSY-Spektren von apo-MT1_NECLU (1 mM) und Cd₂-MT1_NECLU (1 mM + 2 mM CdCl₂) bei 400 MHz; in 90 % H₂O bidest./10 % D₂O mit 0,03 % 2-Mercaptoethanol, gemessen bei 300 K.

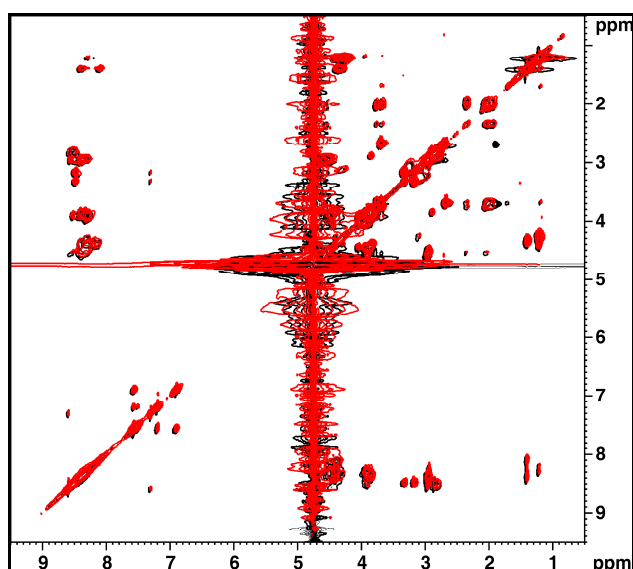


Abb. 4-35: Vergleich der zweidimensionalen H,H-TOCSY-Spektren von apo-MT1_NECLU (1 mM) und Cd₂-MT1_NECLU (1 mM + 2 mM CdCl₂) bei 400 MHz; in 90 % H₂O bidest./10 % D₂O mit 0,03 % 2-Mercaptoethanol, gemessen bei 300 K.

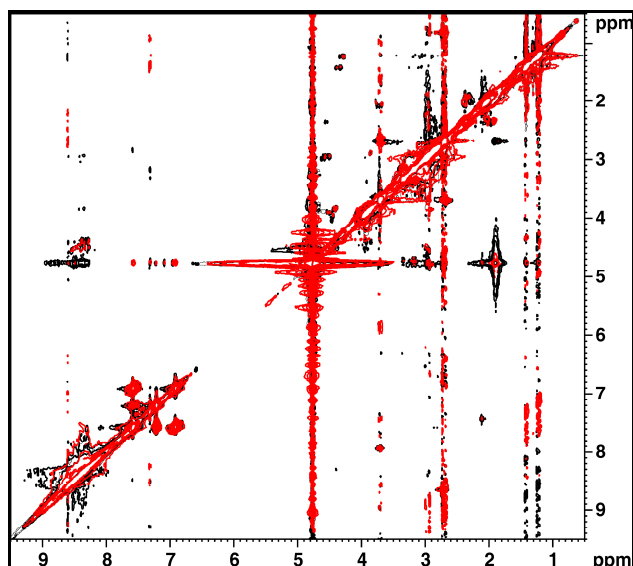


Abb. 4-36: Vergleich der zweidimensionalen ^1H , ^1H -NOESY-Spektren von apo-MT1_NECLU (1 mM) und Cd_2 -MT1_NECLU (1 mM + 2 mM CdCl_2) bei 400 MHz; in 90 % H_2O bidest./10 % D_2O mit 0,03 % 2-Mercaptoethanol, gemessen bei 300 K.

4.4.4. Strukturbestimmung mittels *microcoil* 600 MHz-NMR-Spektroskopie

Bei den Strukturuntersuchungen mittels *microcoil* 600 MHz-NMR-Spektroskopie konnten ebenfalls einige chemische Verschiebungen zugeordnet werden, sowohl in den ein-, als auch in den zweidimensionalen Protonenspektren. Dabei wurden jeweils Spektren mit und ohne Cd(II) sowie mit 100 % D_2O und 90 % $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O aufgenommen (Tab. 4-7 bis 4-10; Abb. 4-37 bis 4-38).

Die Spektren des MT1_NECLU in 100 % D_2O zeigen im Amidprotonen-Bereich fast keine chemischen Verschiebungen. Die Amidprotonen tauschen sehr schnell mit Deuterium aus und können so nicht mehr detektiert werden. Die Ringprotonen des Histidins und die Seitenkettenprotonen des Asparagins dagegen werden langsamer ausgetauscht und sind detektierbar. Die αH -Protonen und die restlichen aliphatischen Protonen der Aminosäuren werden ebenfalls nicht ausgetauscht und konnten detektiert und teilweise zugeordnet werden.

Die eindimensionalen Protonenspektren des MT1_NECLU in 90 % $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O (Abb. 4-38) sind den Spektren, die bei 400 MHz aufgenommen wurden, ähnlich. Auch hier sind die NMR-Signale vor allem im Amidprotonen-Bereich, aber auch im αH -Bereich, verhältnismäßig schlecht aufgelöst. Eine vollständige Zuordnung der chemischen

Verschiebungen unter den hier verwendeten Bedingungen war bisher nicht möglich (Tab. 4-7 bis 4-10).

Der Vergleich der Protonenspektren in 90 % H₂O/10 % D₂O (Abb. 4-38) und in 100 % D₂O (Abb. 4-37) ergab eine fast genauso gute Auflösung im aliphatischen Protonenbereich, während im Amidprotonenbereich fast alle NH-Protonen ausgetauscht wurden.

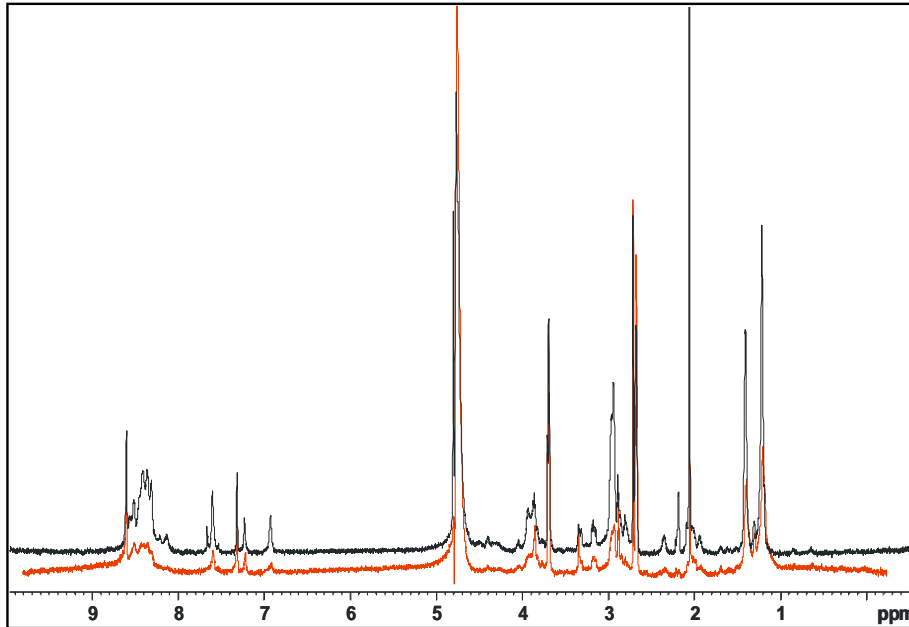


Abb. 4-37: Vergleich der eindimensionalen ¹H-NMR-Spektren von apo-MT1_NECLU (2,6 mM) und Cd₂-MT1_NECLU (2,6 mM + 10 mM CdCl₂) bei 600 MHz; in 90 % H₂O bidest./10 % D₂O, 0,03 % 2-Mercaptoethanol, gemessen bei 298 K.

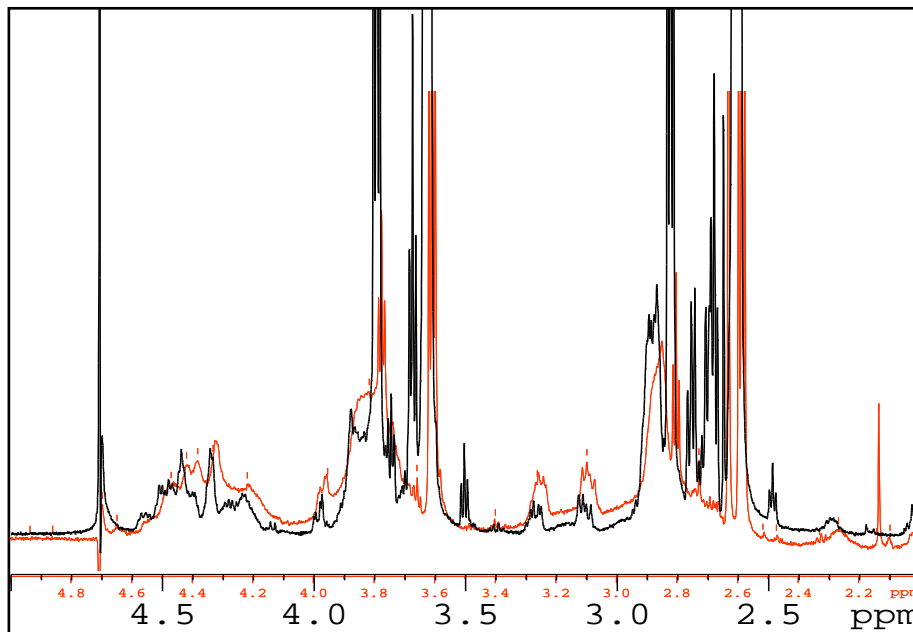


Abb. 4-38: Vergleich der eindimensionalen ¹H-NMR-Spektren von apo-MT1_NECLU (1,5 mM) und Cd₂-MT1_NECLU (3 mM + 30 mM CdCl₂) bei 600 MHz; in 100 % D₂O, 0,03 % 2-Mercaptoethanol, gemessen bei 298 K.

Tab. 4-7: Zugeordnete ^1H -NMR-chemische Verschiebungen (in ppm) von apo-MT1_NECLU in 90 % $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O bei 600 MHz; a - keine genaue Zuordnung aufgrund von starken Signalüberlagerungen möglich

Aminosäurerest	NH	αH	βH	Andere
P2	-	4,42	2,19	3,76 δH / 2,07 γH
T4	a	3,93/3,94/3,95	4,3/4,305/4,31	1,18/1,19/1,20 γH_2
T7	a	3,93/3,94/3,95	4,3/4,305/4,31	1,18/1,19/1,20 γH_2
N9	a	3,87/3,88	2,88/2,90	7,23/7,24 δNH_{21} / 6,92/6,93 δNH_{22}
A11	8,13/8,15	a	1,41/1,42	-
A13	8,13/8,15	a	1,41/1,42	-
N15	a	3,87/3,88	2,88/2,90	7,23/7,24 δNH_{21} / 6,92/6,93 δNH_{22}
T20	a	3,93/3,94/3,95	4,3/4,305/4,31	1,18/1,19/1,20 γH_2
H24	7,61	4,52	3,34 βH_2 / 3,2 βH_3	8,62 ϵH_1 /7,32 δH_2

Tab. 4-8: Zugeordnete ^1H -NMR-chemische Verschiebungen (in ppm) von apo-MT1_NECLU in 100 % D_2O bei 600 MHz; a - keine genaue Zuordnung aufgrund von starken Signalüberlagerungen möglich

Aminosäurerest	NH	αH	βH	Andere
P2	-	4,44	2,29	3,75 δH / 2,03 γH
T4	a	3,97/3,98/3,99	4,33/4,34/4,35	1,14/1,15/1,16 γH_2
T7	a	3,97/3,98/3,99	4,33/4,34/4,35	1,14/1,15/1,16 γH_2
N9	a	3,78/3,80	2,88/2,90	a
A11	a	a	1,34/1,35	-
A13	a	a	1,34/1,35	-
N15	a	3,78/3,80	2,88/2,90	a
T20	a	3,97/3,98/3,99	4,33/4,34/4,35	1,14/1,15/1,16 γH_2
H24	a	4,56	3,27 βH_2 / 3,11 βH_3	8,56 ϵH_1 / 7,27 δH_2

Tab. 4-9: Zugeordnete ^1H -NMR-chemische Verschiebungen (in ppm) von Cd_2 -MT1_NECLU in 90 % $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O bei 600 MHz; a - keine genaue Zuordnung aufgrund von starken Signalüberlagerungen möglich

Aminosäurerest	NH	αH	βH	Andere
P2	-	4,40	2,18	3,78 δH / 2,05 γH
T4	a	3,91/3,92/3,93	4,28/4,29/4,30	1,17/1,18/1,19 γH_2
T7	a	3,91/3,92/3,93	4,28/4,29/4,30	1,17/1,18/1,19 γH_2
N9	a	3,84/3,85	2,87/2,88	7,21/7,22 δNH_{21} / 6,91/6,92 δNH_{22}
A11	a	a	1,40/1,41	-
A13	a	a	1,40/1,41	-
N15	a	3,84/3,85	2,87/2,88	7,21/7,22 δNH_{21} / 6,91/6,92 δNH_{22}
T20	a	3,91/3,92/3,93	4,28/4,29/4,30	1,17/1,18/1,19 γH_2
H24	7,60	4,51	3,32 βH_2 / 3,19 βH_3	8,61 ϵH_1 / 7,31 δH_2

Tab. 4-10: Zugeordnete ^1H -NMR-chemische Verschiebungen (in ppm) von $\text{Cd}_2\text{-MT1_NECLU}$ in 100 % D_2O bei 600 MHz; a - keine genaue Zuordnung aufgrund von starken Signalüberlagerungen möglich

Aminosäurerest	NH	αH	βH	Andere
P2	-	4,42	2,27	3,72 δH / 2,01 γH
T4	a	3,81/3,82/3,83	4,32/4,33/4,34	1,12/1,13/1,14 γH_2
T7	a	3,81/3,82/3,83	4,32/4,33/4,34	1,12/1,13/1,14 γH_2
N9	a	3,78/3,79	2,78/2,79	7,14/7,15 δNH_{21} / 6,89/6,90 δNH_{22}
A11	a	a	1,32/1,33	-
A13	a	a	1,32/1,33	-
N15	a	3,78/3,79	2,78/2,79	7,14/7,15 δNH_{21} / 6,89/6,90 δNH_{22}
T20	a	3,81/3,82/3,83	4,32/4,33/4,34	1,12/1,13/1,14 γH_2
H24	[7,56]	a	3,26 βH_2 / 3,10 βH_3	8,54 ϵH_1 / 7,24 δH_2

Ferner wurden beim Vergleich der zweidimensionalen COSY-Spektren bei 400 und 600 MHz (Abb. 4-39) weniger Signale bei den 600 MHz-Spektren festgestellt. Die in 100 % D_2O aufgenommenen COSY-Spektren (Abb. 4-40) zeigten eine etwas bessere Auflösung im αH -Protonen-Bereich und im Bereich der anderen aliphatischen Protonen im Vergleich zu den in 90 % $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O aufgenommenen Spektren, was eine bessere Zuordnung der chemischen Verschiebungen möglich machte. Jedoch konnten keine Unterschiede beim Vergleich der Spektren des apo-MT1_NECLU und des $\text{Cd}_2\text{-MT1_NECLU}$ detektiert werden.

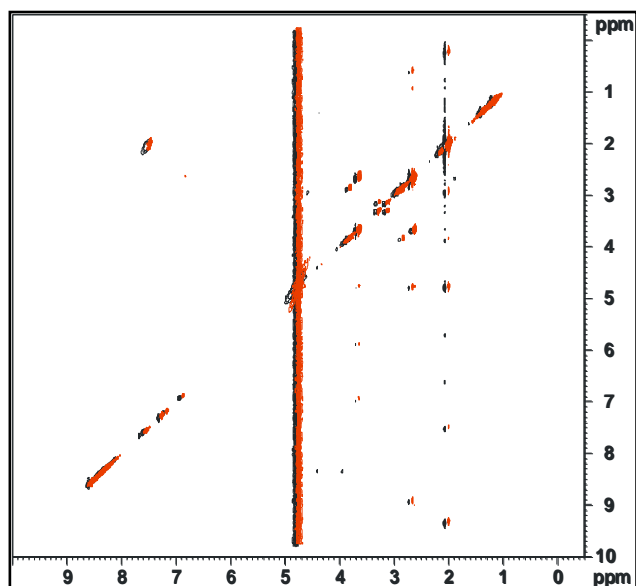


Abb. 4-39: Vergleich der 2D $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY-Spektren von apo-MT1_NECLU (2,6 mM) und $\text{Cd}_2\text{-MT1_NECLU}$ (2,6 mM + 10 mM CdCl_2 bei 600 MHz, 298 K, in 90 % H_2O bidest./10 % D_2O , 0,03 % 2-Mercaptoethanol.

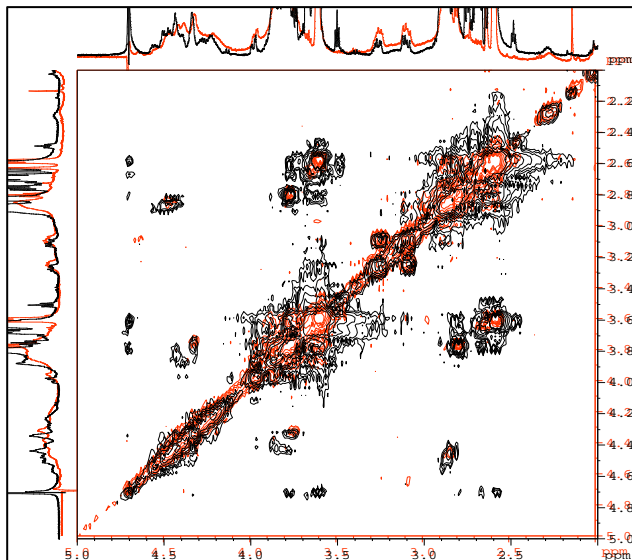


Abb. 4-40: Vergleich der 2D H,H-COSY-Spektren von apo-MT1_NECLU (1,5 mM) und **Cd₂-MT1_NECLU** (3 mM + 30 mM CdCl₂) bei 600 MHz, 298 K, 100 % D₂O, 0,03 % 2-Mercaptoethanol.

Der Vergleich der zweidimensionalen TOCSY-Spektren bei 400 und 600 MHz (Abb. 4-41) ergab ebenfalls weniger Signale bei den 600 MHz-Spektren. Dabei zeigten aber die in 90 % H₂O/10 % D₂O aufgenommenen TOCSY-Spektren eine etwas bessere Auflösung im α H-Protonen-Bereich und im Bereich der anderen Protonen (aliphatisch) im Vergleich zu den in 100 % D₂O aufgenommenen Spektren, was eine etwas bessere Zuordnung der chemischen Verschiebungen möglich machte. Allerdings war es auch so nicht möglich, die chemischen Verschiebungen der Cysteine und Serine und deren Reste zuzuordnen.

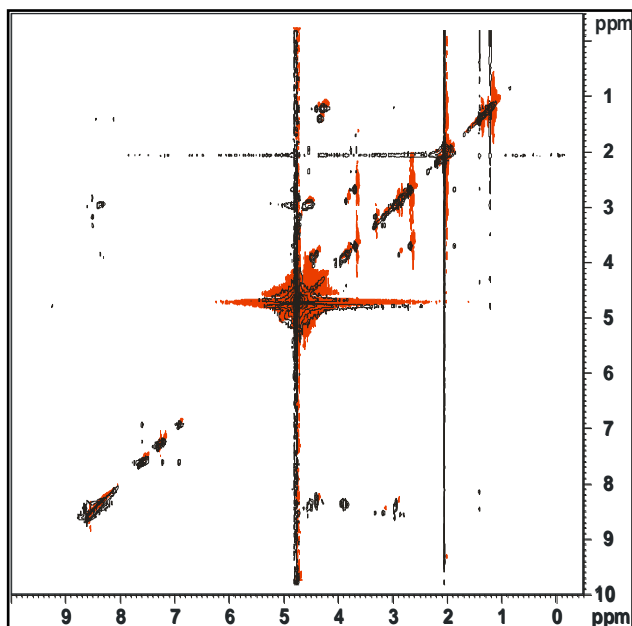


Abb. 4-41: Vergleich der 2D H,H-TOCSY-Spektren von apo-MT1_NECLU (2,6 mM) und **Cd₂-MT1_NECLU** (2,6 mM + 10 mM CdCl₂) bei 600 MHz, 298 K, in 90 % H₂O bidest./10 % D₂O, 0,03 % 2-Mercaptoethanol.

4.4.5. Strukturanalyse des nativen Proteins MT2_NECLU mittels *online*-Kapillar-HPLC-NMR

Die Kapillar-HPLC-Chromatogramme zeigten sehr geringe Peakintensitäten und –flächen (Abb. 4-42).

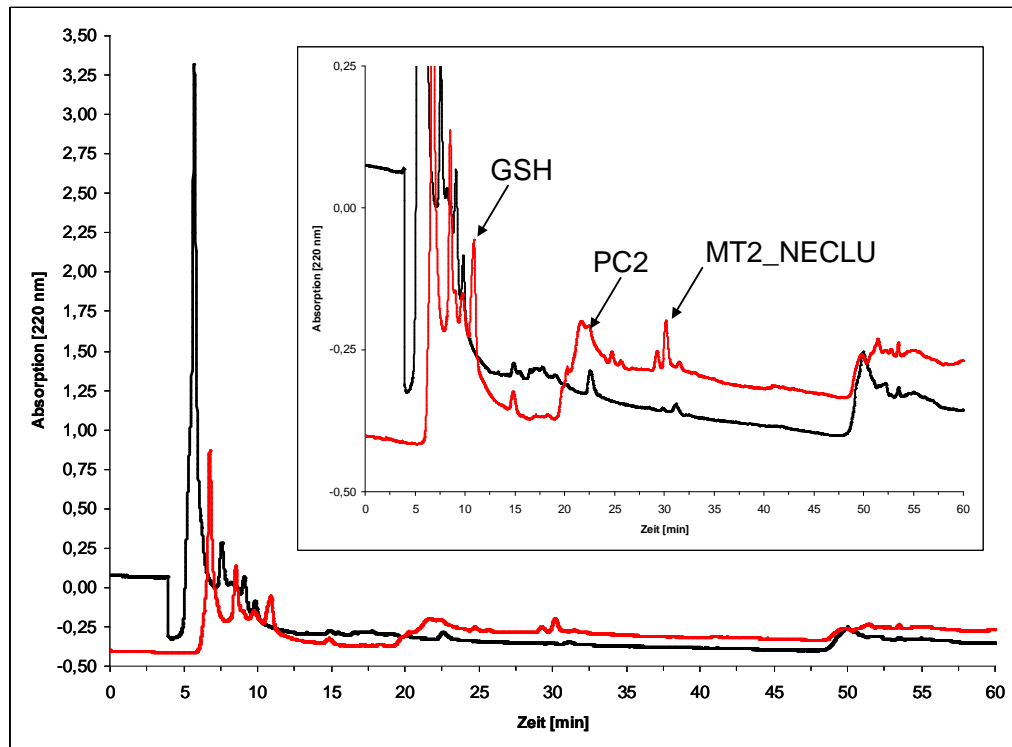


Abb. 4-42: Kapillar-HPLC-Chromatogramm einer Probe aus *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4, auf Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II) vorinkubiert; schwarz: Kontrolle ohne Cd(II); rot: Probe mit 50 µM Cd(II) in der Flüssigkultur gestresst.

Über die Trennung von Standards konnten die im Chromatogramm auftretenden Peaks identifiziert werden. Nach erfolgreicher Trennung des Pilz-Extraktes erfolgte die Bestimmung der Totzeit zwischen dem UV-Detektor und dem *microcoil* NMR-Probenkopf. Die Totzeit betrug etwa 7 min 28 s ($n = 6$).

Der MT2_NECLU-Peak wurde mittels *stopped flow*-Verfahren in den NMR-Probenkopf überführt und NMR-spektroskopisch vermessen. Auch nach 2048 *scans* konnten keine NMR-Spektren erhalten werden. Weitere Strukturuntersuchungen des nativen MT2_NECLU durch NMR-Spektroskopie waren somit nicht möglich, allerdings sollen in nachfolgenden Untersuchungen *offline*-Spektren nach Fraktionierung mittels analytischer HPLC aufgenommen werden.

5. Diskussion

5.1. Physiologisch-biochemische Untersuchungen

5.1.1. Wachstum von *Heliscus lugdunensis* unter Schwermetallstress

Das Wachstum und die Vitalität von *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 wurden zunächst unter verschiedenen Cd(II)-Konzentrationen in der Flüssigkultur und in der Oberflächenkultur untersucht, um Aussagen über den Lebenszustand des Pilzes treffen zu können.

Unter Cd(II)-Stress konnte eine Verringerung der Biomasse (Trockenmasse) bis Tag 5 der Flüssigkultur im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (s. 4.1.2.; s. Anhang Tab. 8-1 bis 8-4), wenn der Pilz mit 25, 50 und 100 μM Cd(II) gestresst wurde. Nach Oberflächenkultivierung auf Cd(II)-haltigen Agarplatten ergab sich ein etwas anderes Bild: Wurde der Flüssigkultur kein Cd(II) zugesetzt, konnte ein leichter Biomasse-Verlust verzeichnet werden. Wurden dagegen 25 und 50 μM Cd(II) zugesetzt, erhöhte sich die Biomasse nach Oberflächenkultur auf Cd(II)-haltigen Agarplatten im Vergleich zur Kontrolle ohne Cd(II). Die Zugabe von 100 μM Cd(II) zur Flüssigkultur resultierte in einer leichten Biomasse-Verringerung im Vergleich zur Kontrolle. In *Penicillium* wurde ebenfalls eine signifikante Erniedrigung der Wachstumsrate nach Cd(II)-Exposition nachgewiesen (Nazareth & Marbaniang, 2008). Gadd *et al.* (2001) konnten zeigen, dass bei den Pilzen *Trichoderma viridae* und *Rhizopus arrhizus* in Oberflächenkulturen und unter 100 μM Cd(II)-Stress die Wachstumsrate um ein Drittel sinkt. Leyh (2009) konnte für Oberflächenkulturen von *H. lugdunensis* eine Verminderung der Wachstumsrate um 29 % und für *Clavariopsis aquatica* um 7 % beobachten. Auch Hebner (2007) konnte zeigen, dass *H. lugdunensis* um Faktor 4,5 stärker im Wachstum (bei 100 μM Cd(II)) inhibiert wird, als *C. aquatica*. Man könnte daher auf eine höhere Cd(II)-Resistenz im Pilz *C. aquatica*, der aus einem mit Xenobiotika belasteten Standort isoliert wurde, schließen.

Die Vitalität des aquatischen Hyphomyceten sinkt mit steigender Cd(II)-Konzentration in der Flüssigkultur, allerdings sinkt die Vitalität weniger stark nach Oberflächenkultur mit 50 μM Cd(II) im Vergleich zur Kontrolle auf Oberflächenkultur ohne Cd(II) (s. Abb. 4-7 und 4-8).

Die Vitalität wurde dabei über die Gesamt-Dehydrogenase-Aktivitäten des Pilzes bestimmt, dies ist allerdings nur ein Parameter, um die Vitalität von Organismen zu bestimmen. Als ein

weiterer Parameter zur Vitalitätsbestimmung bei Pilzen und Hefen dient die Bestimmung des Ergosterol-Gehaltes, wobei das Sterol Ergosterol in den Zellmembranen der Pilze vorkommt (Hughes *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007). Dabei wurde festgestellt, dass durch Schwermetalle, in diesem Fall Cobalt, die Sterolsynthese beeinflusst wird. Ergosterol als Vitalitätsmarker ist allerdings umstritten, da eine Verringerung des Ergosterol-Gehaltes eine Biomasseverringerng anzeigt, aber nicht die Vitalfunktionen wie z. B. verschiedene Enzymaktivitäten, die den Zellmetabolismus widerspiegeln. Azevedo *et al.* (2007; 2009) konnten zeigen, dass durch Schwermetalle (Cu, Zn, Cd) der programmierte Zelltod (*programmed cell death*, PCD) in Pilzen ausgelöst wird. Außerdem konnten sie eine Erhöhung von Peroxidase-Aktivitäten nachweisen, die darauf schließen lassen, dass durch Cu(II) und Zn(II) reaktive Sauerstoff-Spezies entstehen. Sie zeigten weiterhin Änderungen der Zellkernmorphologie, der Chromatinkondensation und Änderungen von Kaspase-ähnlichen Aktivitäten. In *H. lugdunensis* wurden durch Braha *et al.* (2007) unter Cd(II)-Stress ebenfalls erhöhte Peroxidase-Aktivitäten festgestellt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Zellmetabolismus und die Zellentwicklung, also auch das Wachstum und die Vitalität, durch Schwermetalle maßgeblich beeinflusst wird.

Bei filamentösen Pilzen wie *H. lugdunensis* kann man nicht von einzelnen Zellen, sondern eher von Zellverbänden sprechen. Auf Oberflächenkultur kann man „normales“ Mycel sowie Such- oder Leithyphen, welche nach neuen Nährstoffquellen „suchen“, erkennen. Verzweigungen bildeten sich bei diesem Pilz meist kurz vor einem Septum (s. Abb. 4-4). Von besonderer Bedeutung bei den Ascomyceten ist die Spitzenzelle, da in ihr das Wachstum und die Wachstumsrichtung bestimmt werden (Araujo-Palomares *et al.*, 2007) und sie meist als erstes mit den Stoffen in ihrer Umgebung in Kontakt kommt. Das auffälligste Merkmal der Spitzenzelle ist der Spitzenkörper, auch Polarisom genannt, der nicht nur Vesikel für Wachstums-, Transport- und Syntheseprozesse zur Verfügung stellt (Dijksterhuis, 2003; Araujo-Palomares *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2007). Im Spitzenkörper befinden sich auch vermehrt Ribosomen zur Proteinsynthese und Mitochondrien zur Energiebereitstellung sowie viele kleine Vakuolen für die Beseitigung toxischer Stoffe und Mikrotubuli für Transportprozesse (Steinberg, 2007). Die nachfolgenden Zellen haben die Aufgabe, die Spitzenzelle mit allen benötigten Nährstoffen zu versorgen, produzierte oder toxische Stoffe in hintere Hyphenteile zu transportieren und eben auch bei Stress (z. B. durch Schwermetalle) durch programmierten Zelltod den jüngeren, fitteren Hyphenzellen Nährstoffe bereitzustellen (Azevedo *et al.*, 2009). In der Diplomarbeit von B. Leyh (2009) erfolgten erste erfolgreiche

Untersuchungen von Einzelzellen der aquatischen Hyphomyceten *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 und *Clavariopsis aquatica* WD(A)-00-01 mittels Lasermikrodissektion (*laser microdissection and laser pressure catapulting*, LMPC). Ziel der Einzelzell-Analytik ist ein besseres Verständnis für die Mechanismen des Zellmetabolismus. Für unsere Arbeitsgruppe bedeutet dies vor allem, die Ausbildung von Toleranz- und Resistenzmechanismen unter Schwermetallstress in den verschiedenen Zelltypen zu untersuchen, wie z. B. die Biosorption und -akkumulation von Schwermetallen, die Komplexierung dieser durch Thiole (Cystein, GSH, PCs und MTs) und die Beeinflussung des Schwefelhaushaltes.

5.1.2. Schwefelhaushalt

Wie schon durch Braha *et al.* (2007), Hebner (2007) und Nathan (2007) beschrieben, wird bei *H. lugdunensis* der Schwefelhaushalt unter Cd(II)-Stress beeinflusst, da nicht nur der intrazelluläre Sulfat- und Sulfidgehalt ansteigt, sondern auch schwefelhaltige Thiole, wie Cys, Cys-Gly, γ -EC und GSH sowie PC2 und Metallothioneine induziert werden.

Die Veränderung des Schwefelhaushaltes von *H. lugdunensis* nach Vorinkubation auf Oberflächenkultur mit 50 μ M Cd(II) sollte untersucht werden. Dabei konnte mit steigender Konzentration an Cd(II) in der Flüssigkultur eine Erniedrigung des Sulfatgehaltes im extrazellulären Malz-Pepton-Medium sowohl auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), als auch mit 50 μ M Cd(II) festgestellt werden. Nach Zugabe von 100 μ M Cd(II) zur Flüssigkultur wurde nur eine leichte Verringerung des Sulfatgehaltes im Medium beobachtet. Damit einhergehend stiegen die intrazellulären Gehalte an Sulfat und Sulfid deutlich an, wobei nach Oberflächenkultivierung mit 50 μ M Cd(II) der Gehalt nicht so stark anstieg.

Ein weniger starker Anstieg des intrazellulären Sulfatgehaltes bei einer Cd(II)-Konzentration von 100 μ M in der Flüssigkultur könnte mit einer verminderten Sulfataufnahme durch Hemmung des Transportes in die Zelle erklärt werden. Sulfat ist ein Makronährstoff für alle Organismen und die primäre Schwefelquelle für Pflanzen und auch für Pilze (Jarai & Marzluf, 1991; Hell, 2002). Die Sulfataufnahme erfolgt über Sulfat-Transporter (Permeasen), die im Plasmalemma mit 10-11 Transmembran-Helices verankert sind (*S. cerevisiae*, Cherest *et al.*, 1997; *N. crassa*, Ketter & Marzluf, 1988 und Ketter *et al.*, 1991). Aus *S. cerevisiae* sind hoch- und niedrigaffine Sulfat-Transporter bekannt, die das Sulfat (SO_4^{2-}) mit Hilfe eines Membranpotentials ($\text{SO}_4^{2-}/3 \text{ H}^+$ -Symport) in die Zelle transportieren (Smith *et al.*, 1995).

Nach 100 μM Cd(II)-Zugabe wurde eine stark verminderte Vitalität (-50 %, s. 3.1.3.) des aquatischen Pilzes *H. lugdunensis* beobachtet, die oft mit einem veränderten Membranpotential assoziiert wird. Das Membranpotential ist abhängig von einem Protonen-Gradienten, der über die Membran verteilt ist (Gadd & Mowll, 1983; Gadd & White, 1989; Blaudez *et al.*, 2000). Das Membranpotential wird durch K^+ - Ca^{2+} -Gradienten aufrechterhalten. Cd(II) besitzt ähnliche Eigenschaften wie Ca^{2+} und könnte diesen Gradienten stören und eine Sulfataufnahme verhindern, indem es den Ca^{2+} -Influx verhindert. Nach der Zugabe von 25 und 50 μM Cd(II) zur Flüssigkultur konnte nur eine leicht verminderte Vitalität und eine leicht verminderte Sulfataufnahme nachgewiesen werden. Diese Konzentrationen an Cd(II) sind nicht so toxisch für die Zelle, wie 100 μM Cd(II). *H. lugdunensis* ist unter den Bedingungen der Vorinkubation auf 50 μM Cd(II)-Platten vitaler, als ohne Vorinkubation auf Cd(II)-haltigen Oberflächenkultur, da schon Toleranz- bzw. *avoidance*-Mechanismen induziert werden konnten. Der Pilz muss daher weniger Sulfat für die vermehrte Bildung/die Induktion von GSH, PC2 und Metallothioneinen aufnehmen.

Nathan (2007) und Ganz (2006) konnten eine Erhöhung des intrazellulären Sulfid-Gehaltes unter Cd(II)-Stress feststellen. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine Erhöhung des intrazellulären Sulfid-Gehaltes nachgewiesen, der nicht so stark anstieg, wenn mit 100 μM Cd(II) gestresst wurde. Sulfid wird während der Sulfatassimilation aus Sulfat gebildet und wird zur Synthese von schwefelhaltigen Aminosäuren, wie Cystein und Methionin benötigt (Saito, 2000). Auch andere schwefelhaltige Proteine und Eisen-Schwefel-Cluster sind wichtig für das Wachstum und den Stoffwechsel von Organismen (Marzluf, 1997). Da Sulfid ein Zellgift ist, wird es intrazellulär sofort in Cystein eingebaut und/oder unter Cd(II)-Stress als Cd-S-Komplexe abgelagert oder ins Medium sezerniert (z. B. in *S. pombe*, Murasugi *et al.*, 2008 und in *Candida glabrata*, Mehra *et al.*, 1994). Die Thiol-Cd(II)-Komplexe (*low molecular weight*, LMW), die in die Vakuole transportiert werden, können auch mit Sulfid als *high molecular weight*-Komplexe (HMW) vorliegen (Dameron *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 1995). Rother (2002) und Miersch *et al.* (unveröffentlichte Daten) konnten sowohl im Medium von Stand-, als auch von Schüttelkulturen von *H. lugdunensis* CdS-Kristalle nachweisen. Diese sind unter Sauerstoffeintrag in das saure Medium (pH 5,0) nicht stabil und zerfallen in Cd(II)-Ionen und Sulfid, welches sofort als H_2S entweicht.

5.1.3. Induktion Thiol-haltiger Aminosäuren und Peptide

In *Heliscus lugdunensis* wurde in beiden Stämmen H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)-Stress eine Erhöhung des GSH-Pools und die Bildung des Phytochelatins 2 (PC2) nachgewiesen (Jaeckel *et al.*, 2005; Braha *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde die Cd(II)-Stressantwort des Stammes H4-2-4 nach Oberflächenkultur auf schwermetall- und Cd(II)-haltigen Malzagar-Platten untersucht.

Der Cys-Gehalt betrug ca. 5 $\mu\text{mol/g}$ TM, wenn *H. lugdunensis* auf Oberflächenkultur mit 50 μM Cd(II) vorinkubiert und mit 50 μM Cd(II) in der Flüssigkultur gestresst wurde (höchster Gehalt). Die Kontrolle dagegen enthielt 0,12-0,34 $\mu\text{mol/g}$ TM Cys, dies entspricht einem Zwanzigstel bis Fünfzigstel im Vergleich zur Cd(II)-gestressten Probe. Diese Werte stimmen in etwa mit denen von Braha *et al.* (2007) überein. Auch Hebner (2007) und Nathan (2007) konnten diese Cys-Gehalte bestätigen. Im Mycobiont *Cladonia cristatella* (Flechtenpilz) wurde unter 500 μM Cu(II) der höchste Gehalt an Cys mit ca. 0,1 $\mu\text{mol/g}$ TM festgestellt (Backor *et al.*, 2006). In *Trichoderma harzianum* und in drei *Fusarium*-Arten (Schimmelpilze, Ascomyceten) wurde durch Schwermetalle eine Beeinflussung des Cystein-Haushaltes beobachtet (Raspanti *et al.*, 2009). Dabei erhöhte sich der Cys-Gehalt bei den verschiedenen Pilzen unter Cd(II)-Stress um das 1,2- bis 6-fache auf ca. 40-80 nmol/g FM, was in etwa 200-800 nmol/g TM entsprechen würde. Im Vergleich zu *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 ist dies ca. fünfmal weniger. In den HPLC-Chromatogrammen der Trennung eines Extraktes aus der methylotrophen Hefe *Hansenula polymorpha* unter 300 μM Cd(II)-Stress könnte man einen erhöhten Cys-Gehalt erkennen, was aber durch die Autoren nicht weiter erläutert wird (Blazhenko *et al.*, 2006).

Unter Cd(II)-Stress, kaum aber unter Zn(II)-Stress, konnte im aquatischen Hyphomycet *Flagellospora curta*, der aus einem belasteten Fluss isoliert wurde, eine signifikante Erhöhung des Gehaltes an nicht proteingebundenen Thiolen (NP-SH) nachgewiesen werden (Guimaraes-Soares *et al.*, 2007). NP-SH können z. B. Cys, GSH oder Phytochelatine sein. Der Gehalt an NP-SH sank, wenn der Pilz mit Cu(II) gestresst wurde. Der ebenfalls durch Guimaraes-Soares *et al.* (2007) untersuchte aquatische Hyphomycet *Fontanospora fusiramosa*, der aus der Quelle des besagten Flusses isoliert wurde, zeigte unter allen eingesetzten Schwermetallen und deren Konzentrationen eine Erhöhung der NP-SH um 30-80 %. Kurzzeit-Experimente mit beiden Pilzen ergaben unterschiedliche Ergebnisse: Während bei *F. curta* die Produktion der NP-SH durch Erhöhung der Cd(II)-Konzentration, aber nicht mit der Zeit anstieg, wurde bei *F. fusiramosa* ein signifikanter Anstieg der NP-SH

nur bei der höchsten Cd(II)-Konzentration nach einer Inkubationszeit von 62 h festgestellt. Der Gehalt an NP-SH mit ca. 2 $\mu\text{mol/g}$ TM bzw. 0,6 $\mu\text{mol/g}$ TM unter Cd(II)-Stress bei *F. curta* bzw. *F. fusiramosa* ist viel niedriger, als der Cystein-Gehalt allein bei *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4. Man könnte daraus schlussfolgern, dass bei *F. curta* und *F. fusiramosa* hauptsächlich andere Mechanismen (*avoidance*-Mechanismen) als bei *H. lugdunensis* (Toleranzmechanismen) greifen, um mit Schwermetallstress umgehen zu können, z. B. Zellwandveränderungen oder Ausscheidung von Chelatoren. In Cd(II)-gestressten Extrakten des Ektomykorrhiza-Pilzes *Paxillus involutus* (Kahler Krempling, Basidiomycet) konnte keine Erhöhung des Cysteingehaltes festgestellt werden (Courbot *et al.*, 2004).

Bei *H. lugdunensis* wurde eine Erhöhung des Cys-Gly-Gehaltes unter Cd(II)-Stress bestimmt (Kontrolle: 0,03 $\mu\text{mol/g}$ TM; 100 μM Cd(II): 4,5 $\mu\text{mol/g}$ TM). Bisher ist noch wenig über das Abbauprodukt Cysteinylglycin in Pilzen bekannt. In der Hefe *S. cerevisiae* spaltet die γ -Glutamyltranspeptidase das L-Glutamat vom GSH ab und Cysteinylglycin entsteht als Abbauprodukt, was in der Abb. 5-1 verdeutlicht wird (Jaspers & Penninckx, 1984; Penninckx, 2002; Poci *et al.*, 2004).

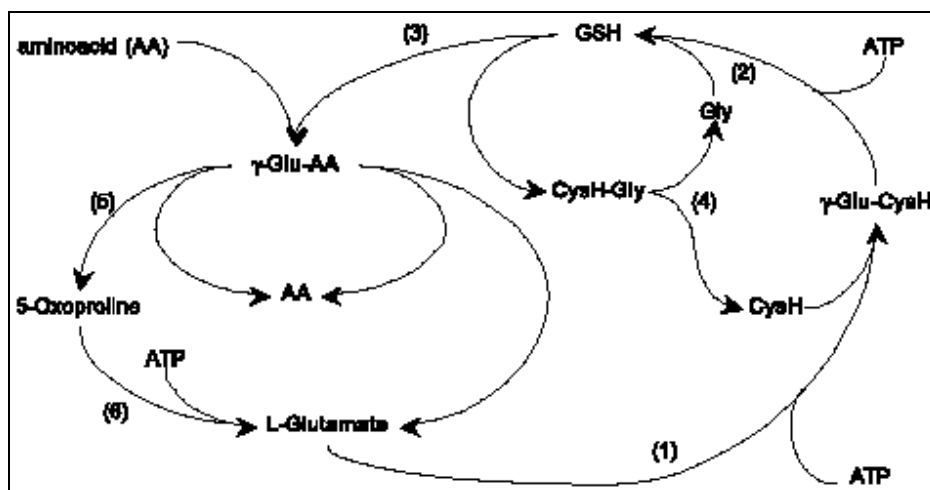


Abb. 5-1: Der γ -Glutamyl-Kreislauf in der Hefe *S. cerevisiae*: (1) γ -Glutamylcysteinsynthetase; (2) GSH-Synthetase; (3) γ -Glutamyltranspeptidase; (4) Cysteinylglycindi-peptidase; (5) γ -Glutamylcyclotransferase; (6) 5-Oxoprolinase.

Ein zum γ -Glutamyltranspeptidase-Gen *cis2* aus *S. cerevisiae* homologes Gen *ggt1* wurde in der methylotrophen Hefe *Hansenula polymorpha* identifiziert (Blazhenko *et al.*, 2006; Ubiyovk *et al.*, 2006). Die Autoren konnten nach einem *knockout* dieses Gen eine verminderte Cd(II)-Akkumulation feststellen. Dies deutet auf eine Beteiligung der γ -

Glutamyltranspeptidase im Metabolismus des Cd(II)-GSH-Komplexes und auf eine Beteiligung dieses Enzyms im Xenobiotika-Abbau bzw. -Umwandlung hin. Manavathu *et al.* (1996) konnten bei der dimorphen Hefe *Candida albicans* nur einen erhöhten Gehalt an γ -Glutamyltranspeptidase beobachten, wenn sie von der Hefe-Form in die Mycel-Form wechselte.

Wie schon bei Braha *et al.* (2007) beschrieben, konnte eine Erhöhung des Gehaltes an γ -EC im Stamm H4-2-4 von *H. lugdunensis* beobachtet werden. Allerdings erhöhte sich der γ -EC-Gehalt bei Braha *et al.* (2007) um das 6-fache, bei Nathan (2007) um das 38-fache und im Gegensatz dazu in dieser Arbeit um das ca. 200-fache. Eine Erklärung für diesen starken Anstieg könnte die lange Stammhaltung dieses Pilzes auf Oberflächenkultur ohne Schwermetallbelastung sein. Nach 8-10 Wochen Vorkultivierung auf Cd(II)-haltigen Oberflächenkulturen betrug die Steigerung des γ -EC-Gehaltes nur das ca. 10-100-fache im Vergleich zur Stammhaltung auf Oberflächenkultur ohne Cd(II). γ -EC ist die Vorstufe des GSH und kann ebenfalls über seine Thiolgruppe Cd(II)-Ionen komplexieren. Unter Cd(II)-Stress konnte in *Paxillus involutus* ebenfalls eine leichte Erhöhung des γ -EC-Gehaltes von 0,05 bis auf 0,3 $\mu\text{mol/g}$ FM detektiert werden (Courbot *et al.*, 2004).

Der Gehalt an GSH in *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 erhöhte sich unter Cd(II)-Stress, es konnten 6 bis 7-fach höhere GSH-Konzentrationen gemessen werden. Dabei war auffällig, dass nach Vorinkubation auf Oberflächenkulturen mit 50 μM Cd(II) der Gehalt an GSH wieder sank, wenn 100 μM Cd(II) in der Flüssigkultur verwendet wurden. Nach allen anderen Oberflächenkultivierungen stieg der Gehalt an GSH kontinuierlich in der Flüssigkultur bis 100 μM Cd(II) an. Für das GSH wurde durch Li *et al.* (1997) die Bildung von Bis-glutathionato-Cd(II)-Komplexen nachgewiesen. Außerdem hat das GSH eine Funktion als Vorstufe für Phytochelatine, die enzymatisch durch die PC-Synthase gebildet werden. Auch im Ektomykorrhiza-Pilz *Laccaria laccata* konnte eine Erhöhung des GSH-Gehaltes im Vergleich zur Kontrolle von ca. 0,8 auf 3,2 $\mu\text{mol GSH/g}$ FM bestimmt werden (Galli *et al.*, 1993). Guimaraes-Soares *et al.* (2006) beobachteten in den beiden aquatischen Pilzen *F. fusiformis* und *F. curta* einen Anstieg des Gehaltes an hitzestabilen thiolhaltigen Proteinen bzw. Peptiden, wobei es sich um GSH, Phytochelatine oder Metallothioneine handeln könnte. Eine ähnliche Cd(II)-Stressantwort wurde auch in der methylophilen Hefe *Hansenula polymorpha* beobachtet, bei der eine Erhöhung des GSH-Gehaltes unter verschiedenen Bedingungen beobachtet wurde, z. B. in synthetischem Medium, Vollmedium,

100 und 300 μM Cd(II) und nach verschiedenen Inkubationszeiten (Blazhenko *et al.*, 2006). Die vermehrte Produktion von GSH unter Cd(II)-Stress wurde im Ektomykorrhiza-Pilz *Paxillus involutus* ebenfalls detektiert (Courbot *et al.*, 2004). Dabei stieg der Gehalt an GSH bei 0; 0,05; 0,5; 5 und 50 μM Cd(II) kontinuierlich an. Auch unter Cu(II)-Stress veränderte sich der GSH-Gehalt im Mycobiont *Cladonia cristatella* (Mycobiont einer Flechte) (Backor *et al.*, 2006): Während die Konzentration des GSH unter 10 μM Cu(II) im Vergleich zur Kontrolle um ein Viertel anstieg, sank die Konzentration nach Zugabe von 100 und 500 μM Cu(II) auf ca. die Hälfte ab. Es kann vermutet werden, dass bei diesen hohen Konzentrationen an Cu(II) der Organismus zu stark gestresst und damit abgetötet wird, was auch an den Werten der Vitalitätsbestimmung und an den Ergosterol-Gehalten ersichtlich ist.

Der Gehalt an oxidiertem Glutathion (GSSG) im aquatischen Hyphomycet *H. lugdunensis* stieg mit zunehmender Konzentration an Cd(II) in der Flüssigkultur an (4-10-fach). Hierbei konnte beobachtet werden, dass nach Vorinkubation auf schwermetallhaltiger Oberflächenkultur der GSSG-Gehalt nach 25 μM Cd(II)-Zugabe zur Flüssigkultur sank, nach Zugabe von 50 und 100 μM Cd(II) jedoch wieder anstieg, aber nicht so hohe Werte wie nach Wachstum auf Oberflächenkulturen ohne Cd(II) erreichte. GSSG entsteht, wenn durch direkten oder indirekten oxidativen Stress das GSH oxidiert wird. Das Verhältnis von GSH zu GSSG wird benutzt, um den Redoxzustand einer Zelle/eines ganzen Organismus zu bestimmen. Sinkt dieses Verhältnis, dann herrscht in der Zelle ein hoher oxidativer Stress und es kommt zu einem Ungleichgewicht des Redoxzustandes, was zum Tod der Zelle führen kann. Braha *et al.* (2007) konnte eine Erhöhung der GSH:GSSH-Verhältnisse unter Cd(II)-Stress in *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 nachweisen. In der vorliegenden Arbeit konnte bis 25 μM Cd(II) eine Erhöhung, ab 50 μM Cd(II) in der Flüssigkultur eine Erniedrigung dieses Verhältnisses bestimmt werden. Eine Erklärung für den niedrigeren Gehalt an GSSG nach Oberflächenkultur auf Cd(II)-haltigen Agar-Platten wäre, dass in diesen schon Entgiftungsmechanismen, wie die Erhöhung der GSH-, PC2- und MT2-Gehalte, induziert wurden. Auch Zellwandveränderungen unter Cd(II)-Stress, wie der geringere Anteil an Glucuronsäure oder Glucose (Braha, 2004), oder Ausscheidung von Chelatoren könnten als Ursache für die niedrigeren GSSG-Gehalte in Frage kommen.

H. lugdunensis Stamm H4-2-4 bildet unter Cd(II)-Stress das Phytochelatin 2 (PC2). Da bisher keine Gensequenz einer PC-Synthase identifiziert werden konnte (eigene unveröffentlichte Daten), ist daraus zu schließen, dass die Synthese des PC2 über andere Mechanismen, z. B.

durch eine Carboxypeptidase, erfolgt. Carboxypeptidasen sind Hydrolasen. Eine Serin-Hydrolase-ähnliche Gensequenz konnte im *H. lugdunensis*-Genom lokalisiert werden (s. Anhang 8.8.). Als Hydrolasen werden Enzyme bezeichnet, die nicht nur Ester, Ether, Peptide, Glykoside, Säureanhydride, sondern auch C-C-Bindungen in reversibler Reaktion hydrolytisch unter Verbrauch von Wasser spalten können. Sie werden der dritten Gruppe der EC-Klassifikation der Enzyme zugeordnet, z. B. Peptidasen, Nukleasen, Phosphatasen, Glykosidasen, Esterasen (<http://de.wikipedia.org/wiki/Hydrolase>). Unter den Peptidasen sind auch die Carboxypeptidasen, welche zu den Exopeptidasen gezählt werden und Aminosäuren vom C-terminalen Ende abspalten, eingeordnet. Die Synthese von PCs (alter Name: Cadystine) aus GSH mittels einer Carboxypeptidase P wurde zuerst von Isobe *et al.* (1991) für die Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* nachgewiesen. Imai *et al.* (1996) wiederholten dies mit der Carboxypeptidase Y und konnten eine Bildung von PC2 bis PC6 nachweisen. In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* wiesen Wünschmann *et al.* (2007) zwei Carboxypeptidasen nach. Die Autoren konnten durch Deletionsmutanten die Bildung von PC2 eindeutig bestimmen. Bisher wurden keine Hinweise auf das Vorhandensein höherwertiger PCs in *H. lugdunensis* gefunden (diese Arbeit; persönliche Mitteilung Dr. Dirk Schaumlöffel [CNRS, Universität Pau, Frankreich] und Anja Bräutigam), was auch auf die PC-Synthese durch Carboxypeptidasen hindeutet.

5.1.4. Induktion Thiol-haltiger Proteine

Der *H. lugdunensis*-Stamm H4-2-4 bildet unter Cd(II)-Stress das Metallothionein MT2_NECLU mit einer Molmasse von 2342,7 Da, welches in molekularbiologischen Untersuchungen sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf DNA-Ebene (Gen *mt2_neclu*) nachgewiesen werden konnte. Dabei konnten unterschiedliche Gehalte an MT2_NECLU nach differenter Vorinkubation auf Cd(II)-haltigen Oberflächenkulturen festgestellt werden (MT2_NECLU: 164 nmol/g TM; Met-MT2_NECLU: 60 nmol/g TM). Die Identität des MT2_NECLU wurde eindeutig mittels *de novo*-Sequenzierung festgestellt (96 % Wahrscheinlichkeit; Tab. 5-1)

Tab. 5-1: Vergleich der mittels *de novo*-Sequenzierung erhaltenen Proteinsequenzen und ihre Wertung im Hinblick auf die Wahrscheinlichkeit, mit welcher das MT2_NECLU vorkommt (96 %)

Peptide mit <i>m/z</i> 1172,363647, einer Ladung von <i>z</i> = 2 und einer Masse von 2342,71265 Da	Wertung [%]	Rang
SPCTCSTCNCAGACNTCSCTSCSH	96,02	0
SPCTCSTCNCAGACGGTCSCTSCSH	2,16	1
SAETCSTCNCAGACNTCSCTSCSH	1,09	2
SPCTCSTCGGCAGACNTCSCTSCSH	0,29	3
SEATCSTCNCAGACNTCSCTSCSH	0,19	4
SCPTCSTCNCAGACNTCSCTSCSH	0,16	5
CPSTCSTCNCAGACNTCSCTSCSH	0,03	6
PSCTCSTCNCAGACNTCSCTSCSH	0,01	7
SPCTCSFGNCAGACNTCSCTSCSH	0,008	8
SEATCSTCNCAGACGGTCSCTSCSH	0,008	9
SPCTCSTCGGCAGACGGTCSCTSCSH	0,006	10
SPTCCSTCNCAGACNTCSCTSCSH	0,004	11
SCPTCSTCNCAGACGGTCSCTSCSH	0,004	12
SAETCSTCGGCAGACNTCSCTSCSH	0,003	13
SPGFCSTCNCAGACNTCSCTSCSH	0,003	14
CSPTCSTCNCAGACNTCSCTSCSH	0,002	15
SAETCSTCNCAGACGGTCSCTSCSH	0,002	16
ASETCTCNCAGACNTCSCTSCSH	0,001	17
AESTCTCNCAGACNTCSCTSCSH	0,001	18

In den HPLC-Chromatogrammen konnte ein Cd(II)-abhängig induzierter kleinerer Peak mit einer höheren Retentionszeit als das MT2_NECLU festgestellt werden. Dieser besaß eine Masse von 2474 Da und konnte als Met-MT2_NECLU identifiziert werden. Der Gehalt an Met-MT2_NECLU beträgt ca. 25-30 % des Gesamt-MT2-Gehaltes. Das Auftreten von Proteinen mit und ohne Methionin am N-Terminus wurde durch Frottin *et al.* (2006) untersucht. Die Transkriptionsinitiation erfolgt immer mit den Basentriplets ATG oder GTG, welche für die Aminosäure Methionin codieren. Das Methionin kann durch Methionin-Aminopeptidasen (MAP), von denen unter anderem zwei cytosolische in *S. cerevisiae* identifiziert und charakterisiert wurden (Walker & Bradshaw, 1999; Chen *et al.*, 2002), abgespalten werden. Ob eine Abspaltung des Methionins erfolgt, hängt von mehreren Faktoren, insbesondere von der Spezifität der MAP, deren Aktivität und von den folgenden bzw. benachbarten Aminosäuren, ab. Die MAP-Aktivität ist der limitierende Faktor bei der N-terminalen Methionin-Abspaltung (Frottin *et al.*, 2006), sowohl bei Proteinen im Überschuss, z. B. bei Überexpression in *E. coli*, als auch unter bestimmten Stressbedingungen (z. B. Cd(II)-Stress bei *H. lugdunensis*). Die Methionin-Aminopeptidasen besitzen zwei Zn(II)- bzw. Co(II)-Ionen als Cofaktoren, bei Cd(II)-Stress durch Cofaktor-Austausch wird das Enzym gehemmt. So können die N-terminalen Methionine nicht von allen Proteinmolekülen abgespalten werden. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Aminosäure-Folge, da sterische/geometrische Behinderungen der MAP und Wasserstoffbrückenbildung

durch lange Aminosäure-Seitenketten auftreten. Die Effektivität der Methionin-Abspaltung ist für die ersten 2-5 Aminosäuren sowohl in *E. coli*, als auch in *S. cerevisiae* getestet worden. Dabei sind die Aminosäuren Ser, Ala, Gly, Lys und Arg an zweiter Stelle nach dem Methionin verantwortlich für eine hohe Effektivität der Methionin-Abspaltung (ca. 90 %). Dagegen wirken Threonin, Valin und Prolin inhibitorisch auf die Abspaltung des Methionins am N-Terminus. Etwa die gleichen Ergebnisse wurden für die dritte und vierte Aminosäure nach dem Methionin erhalten. Ein Prolin an dritter Position lässt die Abspaltungseffizienz *in vivo* auf ca. 50 % zurückgehen. Im Kontext zum MT2_NECLU hieße das, dass die Aminosäure Serin an zweiter Position eine hohe Effizienz der Abspaltung des Methionins zuließe, aber dieser Effekt durch das Prolin an dritter Position abgeschwächt wird. Für das MT2_MECLU beträgt die Methionin-Abspaltungseffizienz ca. 70-75 %, da noch 25-30 % Met-MT2_NECLU *in vivo* vorhanden sind.

Der Gehalt an MT2_NECLU und Met-MT2_NECLU bei *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 steigt mit zunehmender Konzentration an Cd(II) bis 50 µM Cd(II) in der Flüssigkultur um das 3-16-fache im Vergleich zur Kontrolle an. Wurde *H. lugdunensis* als Oberflächenkultur ohne Cd(II) oder mit 50 µM Cd(II) angezogen, sank der MT2_NECLU-Gehalt bei Zugabe von 100 µM Cd(II) zur Flüssigkultur wieder ab (auf das 4-5-fache der Kontrolle). Wurde der Pilz auf Oberflächenkultur mit „Standortwasser“ oder mit 100 µM Cd(II) vorkultiviert, erhöhte sich der MT2_NECLU-Gehalt ebenfalls (6-10-fach). Im aquatischen Hyphomyceten *F. fusiramosa* (aus einem unbelasteten Standort isoliert) wurde eine Erhöhung des Protein-gebundenen Thiolgehaltes um 10-30 % festgestellt. Bei *F. curta* (aus einem stark mit Schwermetallen belasteten Standort isoliert; Guimaraes-Soares *et al.* (2007)) konnte aber keine Erhöhung beobachtet werden. Da *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 aus einem stark mit Schwermetallen belasteten Gewässer isoliert wurde, stehen die Ergebnisse im Gegensatz zu denen von *F. curta*. Der *Heliscus lugdunensis* Stamm H8-2-1 zeigte im Vergleich zum Stamm H4-2-4 eine noch höhere MT-Induktion unter Cd(II)-Stress (Braha, 2004), dessen Reaktion wiederum der des Pilzes *F. fusiramosa* ähneln würde (Anstieg des Gehaltes an Protein-gebundenen Thiolen).

N. crassa bildet unter Cu(I)-Stress, aber nicht unter Cd(II)-, Co(II)-, Ni(II)- oder Zn(II)-Stress, ein Metallothionein (Lerch, 1980). Dessen mRNA-Gehalt (CuMT_NEUCR-mRNA) steigt mit zunehmender Konzentration bis 1 mM Cu(I) an, um dann bis 10 mM Cu(I) wieder abzunehmen (Münger *et al.*, 1985; Münger *et al.*, 1987). Von der Menge an mRNA kann man allerdings nicht direkt auf die Proteinmenge schließen.

Während der Cd(II)-Stressantwort des Pilzes *Paxillus involutus* wird ein Gen induziert, welches zum Metallothionein-Gen aus *Agaricus bisporus* homolog ist (Jacob *et al.*, 2004). Courbot *et al.* (2004) konnten dann das Metallothionein PiMT1 unter Cd(II)-Stress auf Proteinebene nachweisen. In den zwei Ektomykorrhiza-Pilzen, *Laccaria laccata* (Rötlicher Lacktrichterling) und *Paxillus involutus*, wurde die Induktion von Metallothioneinen unter Cu(II)-Stress gezeigt (Howe *et al.*, 1997). Somit ist die Erhöhung der Metallothionein-mRNA-Menge unter Schwermetallstress (v.a. Cd, Cu) eine oft zu beobachtende Eigenschaft bei verschiedenen Pilz-Arten.

H. lugdunensis wurde nicht nur am stark mit Schwermetallen belasteten Standort H4 (*H. lugdunensis* Stamm H4-2-4) gefunden, sondern auch am weniger stark belasteten Standort H8 (*H. lugdunensis* Stamm H8-2-1; Krauss *et al.*, 2001). Im Stamm H8-2-1 wurde unter Cd(II)-Stress die Bildung des MT1_NECLU festgestellt (Jaeckel *et al.*, 2005). MT2_NECLU wurde aus dem Stamm H4-2-4 isoliert. Beide Metallothioneine unterscheiden sich in ihrer Sequenz nur durch einen Aminosäure-Austausch von Serin 16 (MT1) zu Threonin 16 (MT2). Dieser Befund deutet auf die Bildung von zwei Ökotypen hin. Braha (2004) konnte in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die beiden *Heliscus lugdunensis*-Stämme nur geringe Unterschiede in ihrer 18S rDNA-Sequenz zeigen. Durch die Etablierung molekularbiologischer Methoden entwickelte sich der Gen-Sequenzvergleich zum Mittel der Wahl für taxonomische Untersuchungen. Sequenzierung und *alignment* der an stark konservierten Regionen reichen DNA-Abschnitte, die für 18S ribosomale RNA kodieren (*nuclear small ribosomal subunit gene*, nSSU), bildeten dabei die Grundlage. Jedoch enthält die nSSU allein, gerade durch den hohen Anteil an stark konservierten Regionen, häufig zu wenig phylogenetisch verwendbare Informationen. Im Gegensatz zur 18S hat sich die 28S rDNA (*nuclear large ribosomal subunit gene*, nLSU) 1,6- bis 2,2-mal schneller entwickelt und enthält 3,3-mal mehr phylogenetische Informationen als diese (Kuzoff *et al.*, 1998). Die Regionen D1 bis D3 (Michot *et al.*, 1984; Michot *et al.*, 1990) enthalten die meisten phylogenetischen Informationen innerhalb der nLSU (Hillis & Dixon, 1991; Kuzoff *et al.*, 1998; Hopple & Vilgalys, 1999).

Es wurde ebenfalls vermutet (Braha, 2004), dass es sich bei den beiden Stämmen H4-2-4 und H8-2-1 von *H. lugdunensis* um zwei Ökotypen handeln könnte, da auch Unterschiede in der Cd(II)- und Zn(II)-Stressantwort (z. B. im Thiolgehalt) beobachtet wurden.

Die MT-Gehalte bei *H. lugdunensis* sind im Vergleich zu den Thiolpeptid-Gehalten um ca. ein hundertstel niedriger. Man könnte vermuten, dass vorrangig die Aminosäure Cys und die Thiolpeptide γ -EC und GSH für die erste und schnelle Komplexbildung von Cd(II) verantwortlich sind. Die Metallothioneine müssen erst ribosomal hergestellt werden, was zu einem geringeren Gehalt an MTs führt. Ein weiterer Grund für deren relativ geringen Gehalt könnte sein, dass nicht mehr genug freies Cd(II) in der Zelle vorhanden ist, um mehr MTs zu induzieren. Um diese Hypothese zu untermauern könnte man *knock-out*-Mutanten von *H. lugdunensis* erzeugen, die einen Defekt des *mt2_neclu*-Gens aufweisen. Wenn diese Mutanten genauso gut wachsen können, wie die Kontrolle, dann kann man davon ausgehen, dass hauptsächlich die Thiolpeptide, dabei vor allem das GSH und das PC2, an der Cd(II)-Entgiftung beteiligt sind.

5.2. Molekularbiologische Untersuchungen

Die putative Sequenz des Gens *mt1_neclu*, die von der massenspektrometrisch ermittelten Proteinsequenz in *H. lugdunensis* Stamm H8-2-1 abgeleitet wurde (Jaeckel *et al.*, 2005), konnte auch nach mehrmaliger Sequenzierung der Plasmide unterschiedlicher *E. coli*-Klone nicht im Stamm H4-2-4 identifiziert werden (Abb. 5-3). Schon bei der Planung der Experimente war klar, dass die Identifizierung beider Gene in einem Stamm schwierig wird. Nur durch einen Basenaustausch von Adenin zu Threonin die Aminosäuresequenz verändert sich die Proteinsequenz. Ist die Base **Threonin** statt **Adenin** vorhanden, ändert sich das Basentriplett von **ACT** zu **TCT** und damit die Proteinsequenz von ...**NTC**...(MT2_NECLU) zu ...**NSC**...(MT1_NECLU).

MT2_NECLU	(M)	S	P	C	T	C	S	T	C	N	C	A	G	A	C	N	T	C	S	C	T	S	C	S	H	
MT1_NECLU		S	P	C	T	C	S	T	C	N	C	A	G	A	C	N	S	C	S	C	T	S	C	S	H	
Gen <i>mt1_neclu</i>		A	T	G	T	C	C	G	T	G	C	A	C	C	T	G	C	T	A	C	T	G	C	A	A	C

Abb. 5-3: Proteinsequenz des MT2_NECLU und des MT1_NECLU (Jaeckel *et al.*, 2005) und die putative Gensequenz des *mt1_neclu* (75 bp). In **rot** und **blau** sind die unterschiedlichen Aminosäuren der MT dargestellt, in der putativen Gensequenz des *mt1_neclu* ist die zum Gen *mt2_neclu* unterschiedliche Base in **blau** dargestellt.

In *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 wurde das Gen, welches für das MT2_NECLU codiert, identifiziert. Weiterhin konnte mittels degenerierter Primer eine DNA-Sequenz *upstream*

dieses Gens, also ein Teil der regulatorischen Genregion, sequenziert werden. Diese enthält vier mögliche *upstream activating sequences* (UAS). Es konnte allerdings nur ein atypisches TATA-Box-Motiv gefunden werden (GATAAA).

Im filamentösen Pilz *Podospora anserina* konnten ebenfalls eine Gensequenz, welche für das MT1 codiert, sowie die *upstream* und *downstream* dieses Gens gelegenen regulatorischen Regionen sequenziert werden (Averbeck *et al.*, 2001). Nach Analyse dieser Sequenzen konnten mehrere regulatorische Elemente gefunden werden:

Element	Abstand zum PaMT1-Gen
TATA-Box	ca. 120 bp <i>upstream</i>
AP1-Bindestelle	ca. 488 bp <i>upstream</i>
homopolymere Sequenz aus 11 T	ca. 210 bp <i>upstream</i>
indirekter <i>repeat</i>	ca. 25 bp <i>upstream</i>
Region ähnlich einer Sequenz in <i>N. crassa</i>	ca. 275 bp <i>upstream</i>
2 <i>upstream activating sequences</i> (UAS)	195 bp und 293 bp <i>upstream</i>
imperfekter CA-Mikrosatellit	ca. 16 bp <i>downstream</i>

Die Autoren diskutieren die Abwesenheit von regulatorischen *upstream activating sequences* (UAS in Hefen; *metal responsive elements* [MRE] in Säugetieren), an denen AMT1- oder ACE1-ähnliche Transkriptionsfaktoren, die in anderen Pilzen und Hefen beschrieben wurden, binden können (Thiele, 1988; Thorvaldsen *et al.*, 1993; Culotta *et al.*, 1994). Nach Analyse der regulatorischen Region des PaMT1-Gens konnten aber zwei solcher regulatorischer Elemente mit der Konsensussequenz TCX₍₄₋₆₎GCTG identifiziert werden. Das PaMT1-Gen enthält, im Gegensatz zum Gen *mt2_neclu* und zum CRS5-Gen aus *S. cerevisiae*, eine Intron-Sequenz. Diese codiert nicht und enthält die für Introns typische interne Lariat-ausbildende Region (Ballance, 1986). Auch das Gen, welches für das MT aus *N. crassa* codiert, enthält eine Intron-Sequenz (Münger *et al.*, 1985) mit einer Länge von 94 bp. In der *upstream* regulatorischen Sequenz dieses Gens konnte eine TATA-Box identifiziert werden. Die weitere Analyse dieser Sequenz ergab das Vorhandensein einer UAS-ähnlichen Sequenz (TCX₍₉₎GCTG) an der Position -357, was die Autoren nicht erwähnen.

Die mittels MS erzielten Ergebnisse stimmen mit den DNA-Analysen und den RNA-Analysen, bei denen eine Induktion von MT2_NECLU in *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 unter Cd(II)-Stress beobachtet wurde, überein.

Die Ergebnisse der semi-quantitativen mRNA-Analyse (*Northern Blot*) in *H. lugdunensis* spiegeln die Ergebnisse der Thiol-Analyse (Ellman-Nachsäulenderivatisierung) auf Proteinebene (siehe 4.2.5.) wider, bei denen eine Erhöhung des MT2_NECLU-Gehaltes mit steigenden Cd(II)-Konzentrationen in Flüssigkultur beobachtet wurde. Bei 100 μM Cd(II)-Belastung sinkt der Gehalt an MT2_NECLU sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene. In *P. anserina* wurde ebenfalls eine Erhöhung der mRNA-Menge des Metallothioneins (PaMT1) unter Cu(I)-Stress festgestellt (Averbeck *et al.*, 2001). Bis zu einer Cu(I)-Konzentration von 100 μM steigt die Menge an PaMT1-mRNA an. In dieser Studie zeigte sich auch, dass die PaMT1-mRNA-Menge mit zunehmendem Alter des Pilzes zunahm. Gründe hierfür scheinen vermehrt auftretende „freie Radikale“ bzw. eine distinkte Änderung der Metallhomöostase (Kupfer-Homöostase) während der Alterung zu sein. Bellion *et al.* zeigten 2007, dass das PiMT1 aus *Paxillus involutus* (Kahler Krempling, Ektomykorrhizapilz) auf mRNA-Ebene nach Cu(II)- und Cd(II)-Stress induziert wird, nach Zn(II)-Stress konnte allerdings keine Induktion festgestellt werden. Münger *et al.* (1987) konnten eine Induktion der CuMT-mRNA-Menge unter Cu(II)-Stress und ebenfalls mit zunehmendem Alter des Pilzes *N. crassa* zeigen. Dieses Phänomen der Zunahme an MT-mRNA mit zunehmendem Alter wurde für *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 nicht untersucht.

5.3. Bestimmung der Struktur des synthetischen MT1_NECLU

Bei der Sequenzanalyse des synthetischen Metallothioneins MT1_NECLU, welches erstmalig in *H. lugdunensis* Stamm H8-2-1 identifiziert wurde (Jaeckel *et al.*, 2005), fallen besondere Merkmale des kleinen Proteins auf. Zum einen gibt es zahlreiche Aminosäurewiederholungen, zum anderen mehrere Sequenzwiederholungen (Tab. 5-2). Das aus vierundzwanzig Aminosäuren bestehende MT1_NECLU enthält nur acht der zwanzig proteinogenen Aminosäuren, wobei fünf Sequenz-Wiederholungen, die mindestens zweimal vorkommen, auftreten.

Generell erschweren Aminosäure- und Sequenz-Wiederholungen eine Proteinstrukturbestimmung mittels NMR-Spektroskopie. Auch das kleine Metallothionein MT_NEUCR aus *N. crassa* (Cobine *et al.*, 2004) enthält lediglich acht proteinogene Aminosäuren mit fünf Sequenzwiederholungen (Tab. 5-3). Beide Metallothioneine besitzen am C-Terminus eine basische Aminosäure. Bei MT1_NECLU handelt es sich dabei um

Histidin als schwach basische Aminosäure und bei MT_NEUCR um Lysin als stark basische Aminosäure. Der isoelektrische Punkt (pI-Wert) der anderen Aminosäuren liegt jeweils im leicht sauren Bereich. Das MT_NEUCR hat einen pI-Wert von 5,57, er liegt also niedriger als der des MT1_NECLU (pI = 6,43). Dies wird vermutlich durch die stark saure Aminosäure Asparaginsäure in Position 3 der MT_NEUCR-Aminosäuresequenz, die einen pI-Wert von 2,85 besitzt, hervorgerufen. Der geringe Anteil „sperriger“, hydrophober Aminosäuren von lediglich einem Prolin in Position 2 und der ungewöhnlich hohe Gehalt besonders polarer Aminosäuren wie Serin, Threonin und Asparagin sollte auf die Struktur von MT1_NECLU einen starken Einfluss haben.

Tab. 5-2: Anzahl der Aminosäure- und Teilsequenz-Wiederholungen des kleinen Proteins MT1_NECLU

Aminosäure	Anzahl	Aminosäuresequenz MT1_NECLU	
S - Serin	6	SPCTCSTCNCAGACNSCSCCTSCSH	
P - Prolin	1		
C - Cystein	8	Sequenz-Wiederholungen	Anzahl
T - Threonin	3	CS	3
N - Asparagin	2	SC	3
A - Alanin	2	CT	2
G - Glycin	1	TC	2
H - Histidin	1	CN	2

Tab. 5-3: Anzahl der Aminosäure- und Teilsequenz-Wiederholungen des kleinen Proteins MT_NEUCR

Aminosäure	Anzahl	Aminosäuresequenz MT_NEUCR	
M – Methionin	1	MGDCGCGSGASSCNCGSGCSCSNCGSK	
G - Glycin	6		
D - Asparaginsäure	1	Sequenz-Wiederholungen	Anzahl
C - Cystein	7	CS	3
S - Serin	7	SC	2
A - Alanin	1	CG	3
N - Asparagin	2	GC	2
K - Lysin	1	NC	2

5.3.1. Strukturanalyse des MT1_NECLU mittels Homologiemodellierung

Die theoretische Struktur des Metallothioneins MT1_NECLU wurde über Homologien zu anderen bekannten β -Domänen von Vertebraten-Metallothioneinen der Familie 1 (Binz & Kägi, 1999), zum einen aus der Wanderratte (1M0J/4MT2; 29 AS) und zum anderen aus

einem antarktischen Gelbbauchdorsch (2MRT; 28 AS) bestimmt (Furey *et al.*, 1986; Schultze *et al.*, 1988; Robbins *et al.*, 1991; Capasso *et al.*, 2003).

Diese MTs bestehen aus zwei Domänen, der β - und α -Domäne, und haben eine Größe von ca. 6 kDa (60/61 AS; Abb. 5-2). Die β -Domäne mit der Konsensussequenz [CxXXXXXXXXCxXXXCxXxCxXxC] kann über 9 Cysteine drei Cd(II)-Ionen komplexieren. Die α -Domäne mit 11 Cysteinen ist in der Lage, vier Cd(II)-Ionen zu komplexieren, sie besitzt die Konsensussequenz [CCxCCxxxCxXxxxCxX(4;6)Cx(3;1)CCx].

	β -Domäne	α -Domäne
Cd ₇ -MTA_NOTCO	MDP-CECSKSGTCNCGGSCTCTNCSCK	SCKKSCCPCCPSGCTKASGCVCKGKT--CDTSCCQ 60
Cd ₇ -MT2_RAT	MDPNCSCATDGSCSCAGSCKCKQCKCT	SCKKSCCPVGCACKSQCICKEASDKCS--CCA 61
	*** * * * * * * * * * * * * *	***** ** * * * * * * * *

Abb. 5-2: Alignment der Metallothionein-Sequenzen aus Wanderratte (MT2_RAT) und antarktischem Gelbbauchdorsch (MTA_NOTCO); die β -Domänen sind durch einen Trennstrich von den α -Domänen abgegrenzt; * = gleiche Aminosäuren, * = gleiche Cysteine; | = Trennung der beiden Domänen.

Bei den Vertebraten-MTs wurde eine Komplexierung von drei Cd(II)-Ionen über die β -Domäne festgestellt. Dagegen konnten bei dem MT1_NECLU aus *H. lugdunensis* mit acht Cysteinen bisher nur zwei Cd(II) nachgewiesen werden (diese Arbeit: CD-Spektroskopie; Jaeckel *et al.* (2005): MS). Trotz dieser Unterschiede konnten Homologiemodelle des MT1_NECLU berechnet werden (Abb. 4-29).

Die Winkel zwischen den Thiolgruppen und Cd(II)-Ionen sollten bei einer tetraedrischen Komplexierung theoretisch $109,5^\circ$ betragen, wobei die Abstände etwa $2,5 \text{ \AA}$ nicht überschreiten sollten (Abb. 5-3; Jiang *et al.* (1994)). In Tab. 5-4 sind die berechneten Werte für die drei Modelle aufgeführt. Die erhaltenen Werte für die Winkel und Abstände zwischen den Thiolgruppen und den Cd(II)-Ionen sind nur geringfügig kleiner als die berechneten Werte. Von besonderem Interesse war es, die Modelle mit experimentellen Daten aus NMR-Untersuchungen zu vergleichen, um die theoretischen Modelle des MT1_NECLU zu bestätigen bzw. zu präzisieren. Hierzu sollten vor allem interresiduale NOE-Daten aus den NOESY-NMR-Experimenten verwendet werden. Entsprechende Messungen ergaben jedoch keine interresidualen und nur sehr wenige intraresiduale NOE-Kontakte. Grund hierfür könnte eine hohe Flexibilität des Moleküls trotz der Cd(II)-Komplexierung bzw. eine lockere Cd(II)-Komplexierung sein.

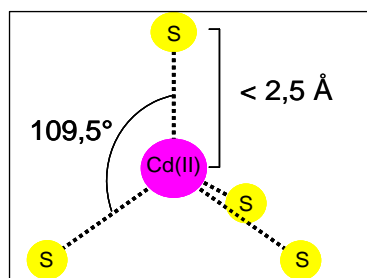


Abb. 5-3: Theoretische tetraedrische Komplexierung des Cd(II)-Ions durch vier Thiolgruppen.

Tab. 5-4: Abstände und Winkel zwischen den Thiolgruppen und den Cd(II)-Ionen in den drei Durchschnittsstrukturen des MT1_NECLU aus den Moleküldynamik-Simulationen

Modellvorlage	S-Cd(II)-Abstand [\AA]		S-Cd(II)-S-Winkel [$^\circ$]	
	Cd(II)-1	Cd(II)-2	Cd(II)-1	Cd(II)-2
MT2_RAT (NMR-Struktur)	2,28	2,31	107	109
MTA_NOTCO (NMR-Struktur)	2,30	2,36 (tri. pyr.)	109	-
MT2_RAT (Kristallstruktur)	2,30	2,35 (okt.)	107	-

Von besonderer Bedeutung bei der Analyse der MT-Sequenz ist das Vorhandensein eines Histidins am C-terminalen Ende der Aminosäurekette. In der Literatur ist bei anderen Metallothioneinen eine Beteiligung des Histidins an der Metallkomplexierung beschrieben (Blindauer, 2008). Bisher konnte für das MT1_NECLU mittels Circular dichroismus-Spektroskopie (s. 4.4.2.) und massenspektrometrischer Analysen nur eine Komplexierung von zwei Cd(II)-Ionen nachgewiesen werden (Jaeckel *et al.*, 2005). Es ist nicht ausgeschlossen, dass auch ein drittes Cd(II)-Ion an das C-terminale Histidin des MT1_NECLU komplexiert werden könnte (Beltramini *et al.*, 1987). Allerdings ist dies eher unwahrscheinlich, da alle Thiol-Reste zur Komplexierung der zwei Cd(II)-Ionen benötigt werden und keine „freie“ Thiolgruppe oder ein weiteres Histidin zur Komplexierung eines dritten Cd(II)-Ions zur Verfügung stehen. Andererseits ist aber denkbar, dass die C-terminalen Histidine zweier MT1_NECLU-Moleküle ein weiteres drittes Cd(II)-Ion komplexieren könnten, wie für das MT aus Huhn beschrieben wurde (Abb.5-4) (Villarreal *et al.*, 2006; Blindauer, 2008). Auch viele pflanzliche MTs, das pilzliche MT2 (CAP5) aus *Colletotrichum gloeosporioides* und MTI und MTII aus *Caenorhabditis elegans* besitzen am C-Terminus ein endständiges Histidin (Blindauer, 2008). Für das *C. elegans* Cd₆-MTII konnte die Raumstruktur mit Hilfe von UV- und NMR-Spektroskopie bestimmt werden (You *et al.*, 1999). Eine mögliche

Beteiligung des Histidins an der Komplexbildung der Cd(II)-Ionen konnte jedoch nicht beobachtet werden.

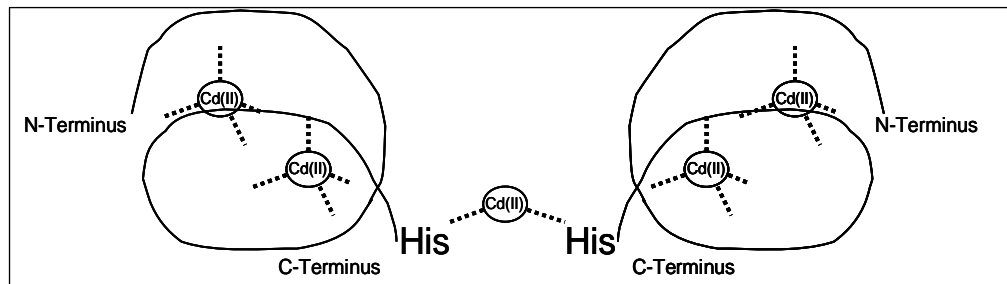


Abb. 5-4: Schema der möglichen Komplexbildung eines zusätzlichen Cd(II)-Ions durch zwei MT1_NECLU-Moleküle über die C-terminalen Histidine.

Bisher ist von kleinen pilzlichen MTs nur die Struktur des Cu₆-MT_NEUCR aus *N. crassa* bekannt (Cobine *et al.*, 2004). Ein Sequenzvergleich mit dem MT1_NECLU ergab eine Identität von 50 % (Abb. 5-5), was eine relativ hohe Homologie darstellt. Bei der Moleküldynamiksimulation wurden allerdings höhere RMS-Abweichungen im Vergleich zur Startstruktur erhalten. Außerdem wurde beim Cu₆-MT_NEUCR eine Komplexbildung von sechs Cu(I)-Ionen gefunden, wobei die Stöchiometrie, Komplexbildungswinkel und Bindungslänge der Thiol-Cu(I)-Komplexbildung wesentlich unterschiedlich zum MT1_NECLU sind (Pickering *et al.*, 1993). Beim MT_NEUCR entsteht ein „cuprous-thiolate multimetallic cluster“, welcher zwei Formen annehmen kann (Cobine *et al.*, 2004): Eine linear zweifach koordinierte digonale Form (*linear two-coordinate digonal*) wie beim Cu₄-MT_NEUCR oder eine verzerrte planare trigonal dreifach koordinierte Form (*planar trigonal three-coordinate*) wie beim Cu₆-MT_NEUCR. Das aus den NMR-Daten berechnete Modell dieses Cu₆-Metallothioneins (Abb. 5-6) zeigt eine neuartige Polypeptidstruktur, bei dem das Protein-Rückgrat (*backbone*) um die Metallionen herum gelagert ist. Dabei zeigt das MT_NEUCR vom N- zum C-Terminus zuerst eine linksgängige, im zweiten Teil des Moleküls eine rechtsgängige Form. Bisher ist diese Form nur für die α -Domäne des Cd₆-MT-1 aus der Blaukrabbe (*Callinectes sapidus*) bekannt (Narula *et al.*, 1995). Die von dem antarktischen Fisch und der Wanderratte abgeleiteten Homologiemodelle des MT1_NECLU zeigen im Vergleich dazu zuerst eine rechts-, dann eine linksgängige Form.

MT_NEUCR	MGDCGCSGASSCNCG---SGCSCSNCGSK	26
MT1_NECLU	SPCTCS---TCNCAGACNSCSCTSCSH	24
	* * * * * * * * * * * * * *	

Abb. 5-5: Alignment der MTs aus *N. crassa* und *H. lugdunensis*; * = gleiche Aminosäuren, * = gleiche Cys.

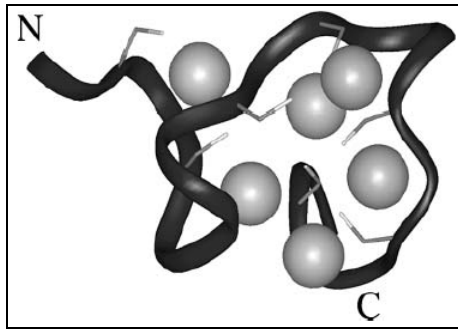


Abb. 5-6: Modell des MT_NEUCR aus *N. crassa*, wobei die 6 Cu(I)-Ionen nachträglich in die Molekülstruktur eingepasst wurden (Cobine *et al.*, 2004).

5.3.2. Strukturbestimmung mittels Fern-UV-Circulardichroismus-Spektroskopie

Über Fern-UV-Circulardichroismus können Hinweise zur strukturellen Integrität eines Proteins erhalten werden. Dabei wird, bedingt durch die Chiralität der Peptidbindung, circular polarisiertes Licht (rechts bzw. links) unterschiedlich beeinflusst und die Resultante durch den Detektor analysiert. Man kann somit *random coil*- und *loop*-Strukturen, α -Helices und β -Faltblätter durch die unterschiedlichen lokalen Minima und Maxima der spezifischen Elliptizität im CD-Spektrum identifizieren. Metallothioneine besitzen in ihrer Aminosäuresequenz keine oder nur sehr wenige aromatische Aminosäuren, die die Detektion im Nah-UV-Bereich bei ca. 280 nm ermöglichen würden. Deshalb werden CD-Untersuchungen von Metallothioneinen meist im Fern-UV-Bereich durchgeführt.

Für das apo-MT1_NECLU konnte eine *random coil*-Struktur ohne Sekundärstrukturmerkmale bestimmt werden. In Abb. 5-7 sind CD-Spektren von Poly-L-Lysin gezeigt (Yang *et al.*, 1986), wobei CD-Spektren eines *random coil*, einer α -Helix und eines β -Faltblattes abgebildet sind. Die Spektren des MT1_NECLU sehen denen des *random coil* des Poly-L-Lysins sehr ähnlich. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das MT1_NECLU eine *random coil*-Struktur besitzt. Als "*random coil*" bezeichnet man einen mehr oder weniger ungeordneten Strukturbereich eines Proteins, der anders als die definierten Sekundärstrukturelemente α -Helix oder β -Faltblatt, in seiner Konformation nicht klar definiert ist (Fasman, 1996; Kelly *et al.*, 2005).

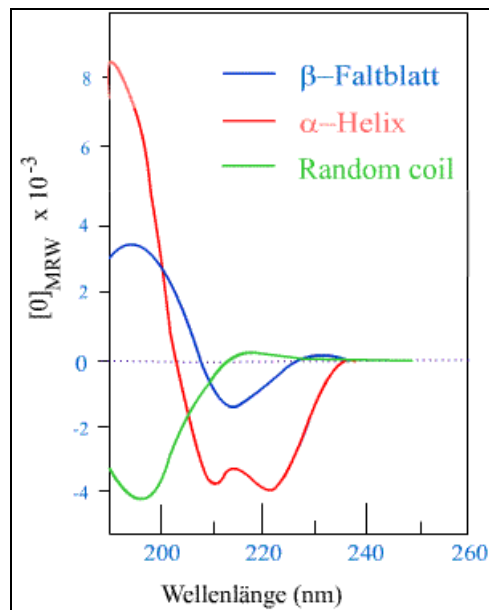


Abb. 5-7: CD-Spektren des Poly-L-Lysins (Yang *et al.*, 1986).

Die Komplexierung der zwei Cd(II)-Ionen läuft sehr schnell ab. Zu sehen ist dies an der abknickenden Gerade bei der Auftragung der spezifischen Elliptizität bei 202 nm gegen die zugegebene Menge an Cd(II) zum MT1_NECLU (Abb. 4-31). Es ist demzufolge eine „aktive-Zentren-Komplexierung“, da im Diagramm keine Hyperbel zu sehen ist. Als Maß für die Bildung von Gleichgewichten bei chemischen Reaktionen oder auch Komplexierungen wird der K_D -Wert oder auch Dissoziationskonstante verwendet. Die Komplexierung des Cd(II) erfolgt unter den verwendeten Bedingungen so schnell, dass eine Messung einer Kinetik kaum möglich ist, das heißt, der K_D -Wert ist sehr klein und das Gleichgewicht liegt in Richtung des Komplexes. Um den K_D -Wert des MT1_NECLU zu bestimmen, müsste man die Konzentration des Proteins stark verringern, um das Gleichgewicht in Richtung Ausgangsprodukte zu verschieben (nach LeChatelier: „Prinzip vom kleinsten Zwang“, 1884). Nach Verdünnung wäre dann aber die Mindest-Konzentration für die Messung von CD-Spektren unterschritten, so dass Spektren sehr schlecht messbar wären. Eine Alternative zu den 1 mm-Küvetten ist die Aufnahme von CD-Spektren in 1 cm-Küvetten, wobei allerdings mehr Proteinlösung verwendet werden müsste.

Nach Zugabe von Cd(II) änderte sich die Struktur hin zu einer *loop*-ähnlichen Struktur, was deutlich am veränderten Minimum zu erkennen ist (s. 4.4.2.). Auch für das kleine pilzliche Metallothionein aus *N. crassa* MT_NEUCR wurden CD-Spektren gemessen (Beltramini & Lerch, 1986). Diese wurden hauptsächlich im Bereich von ca. 200-400 nm aufgenommen. Sie zeigen, dass das apo-MT_NEUCR ein Minimum bei unter 200 nm aufweist. Dieses wird durch die $\pi/n \rightarrow \pi^*$ -Amid-Übergänge der Peptidreste hervorgerufen. Das Minimum des apo-

MT1_NECLU liegt dagegen bei etwa 202 nm. Das Spektrum nähert sich bei ca. 240 nm dem Nullpunkt an, während dies beim apo-MT_NEUCR erst bei 270 nm der Fall ist. Auch zeigt das Spektrum beim apo-MT_NEUCR im Unterschied zum apo-MT1_NECLU kein Plateau. Das Cu₆-MT_NEUCR zeigt im CD-Spektrum 3 Maxima (230, 270, 355 nm) und 2 Minima (245 und 295 nm). Im Gegensatz dazu wurden keine solchen Extrema beim Cd₂-MT1_NECLU gefunden. Das apo-MT1_NECLU unterscheidet sich nur in der Amplitude des Signals, des Plateaus und im Erreichen des Nullwerts vom Cd₂-MT1_NECLU. Daraus könnte geschlossen werden, dass das MT1_NECLU durch seine verschiedene Aminosäuresequenz im Vergleich zum MT_NEUCR weniger strukturiert, also fast keine Sekundärstruktur-Merkmale besitzt. Für viele pflanzliche (z. B. E_c-1 MT; Peroza & Freisinger, 2007) und Invertebraten-, Vertebraten- und pilzliche Metallothioneine (Cols *et al.*, 1997; Stillman *et al.*, 2000) wurden ebenfalls CD-Spektren aufgenommen. Beispielhaft seien hier das Cd₆-rfMT aus der marinen Alge *Fucus vesiculosus* (Merrifield *et al.*, 2006) und das Cd₇-rwMT aus dem Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Ngu *et al.*, 2006) genannt. Bei beiden wurden allerdings pH-Titrations durchgeführt, d.h. das Cd(II)-komplexierte MT wurde angesäuert und der Verlauf der Ansäuerung mittels CD-Spektroskopie verfolgt. Es konnte für beide MT (rfMT und rwMT) gezeigt werden, dass sie keine Sekundärstrukturmerkmale aufweisen. Das apo-MT besitzt jeweils nur ein Minimum, um dann bei etwa 275 und 250 nm den Nullwert zu erreichen. Die mit Cd(II) komplexierten MTs haben ein (255 nm; Cd₆-rfMT) bzw. zwei Maxima (243 und 270 nm; Cd₇-rwMT) und unterscheiden sich deutlich von den apo-MTs.

Die pH-Titration könnte ebenfalls für das MT1_NECLU angewendet werden, um zu untersuchen, wie sich der Cd₂-MT1_NECLU-Komplex bei unterschiedlichen pH-Werten verhält. Es wäre dann möglich, eine Aussage darüber zu erhalten, ob der Komplex beispielsweise in der Vakuole der Zelle (saurer pH-Wert) zerfällt oder nicht.

5.3.3. Strukturanalyse mittels NMR-Spektroskopie

Um Strukturinformationen über apo-MT1_NECLU und Cd₂-MT1_NECLU zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit, neben der CD-Spektroskopie, die NMR-Spektroskopie als experimentelle Schlüsselmethodik verwendet. So ist es bei der Strukturbestimmung von Proteinen mittels NMR möglich, mit Hilfe von zweidimensionalen NOESY-Spektren

Aussagen über die räumliche, dreidimensionale Struktur eines Proteins zu treffen. NOESY-Spektren werden bei Bedingungen aufgenommen, bei denen der Nuklear-Overhauser-Effekt ausgenutzt wird und die Magnetisierung über dipolare Kopplungen im Raum ausgetauscht werden kann. Die Aufnahme von eindimensionalen Protonenspektren und von zweidimensionalen COSY- und TOCSY-Spektren ist dabei notwendige Voraussetzung für die Zuordnung der chemischen Verschiebungen der Protonen in den einzelnen Aminosäuren. Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Strukturuntersuchung wurden die Bedingungen so gewählt, dass 1 mM des synthetischen MT1_NECLU in H₂O bidest., das 10 % D₂O und 0,03 % 2-Mercaptoethanol (als Reduktionsmittel) enthielt, gelöst. Da die in Wasser bestimmte dreidimensionale Struktur von Proteinen artifiziell ist, wurde versucht, ein dem Cytosol angenähertes Puffersystem für die NMR-Strukturbestimmung zu verwenden (Kaliumphosphatpuffer). Nach Zugabe von Cd(II) wurde allerdings eine Präzipitation im NMR-Röhrchen beobachtet, wobei es sich vermutlich um Cd(II)-Phosphat handelte. Eine Präzipitation ist für die NMR- und CD-Spektroskopie ungünstig, da in diesem Fall keine homogene Lösung vorliegt. Außerdem könnte dann durch das MT1_NECLU kein Cd(II) mehr komplexiert werden, da es am Phosphat gebunden ist. Deshalb wurde in den weiteren Untersuchungen mit ungepufferten wässrigen Lösungen gearbeitet.

Das ¹H-NMR-Spektrum sowohl von apo-MT1_NECLU als auch von Cd₂-MT1_NECLU zeigt eine geringe Auflösung für den gesamten Protonenbereich. Auffallend ist, dass alle Amidprotonenresonanzen innerhalb einer schmalen Region zwischen 8,11 und 8,49 ppm für apo-MT1_NECLU und zwischen 8,09 und 8,47 ppm für Cd₂-MT1_NECLU gefunden wurden, was auf die Abwesenheit einer Sekundärstruktur in diesen Proteinen hinweist. Eine relativ niedrige spektrale Dispersion, besonders im Amidprotonenbereich, wird typischerweise in unstrukturierten Polypeptiden gefunden (Takahashi *et al.*, 2009), während gefaltete Proteine Signaldispersionen von nahezu 5 ppm für die Amidprotonen zeigen. Dies wird zusätzlich bestätigt durch die Analyse der Seitenkettenresonanzen, die für alle Serine und Cysteine stark überlagern, was darauf hindeutet, dass keine Strukturmerkmale vorliegen, die eine Verschiebung dieser Resonanzen untereinander hervorrufen würde. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den erhaltenen CD-spektroskopischen Daten. Für 9 von 24 Aminosäuren des MT1_NECLU zeigen die 2D-COSY- und 2D-TOCSY-Spektren zusätzlich zu den breiten, wenig aufgelösten Signalen jedoch auch gut aufgelöste Resonanzen, die allerdings sequentiell nicht zugeordnet werden konnten aufgrund fehlender NOEs in den 2D-NOESY-Spektren.

Bei Proteinen ging man bisher davon aus, dass die dreidimensionale Struktur die Voraussetzung für die Funktion des Proteins ist. In den vergangenen zehn Jahren wurden jedoch immer mehr Proteine und Proteindomänen gefunden, die unter physiologischen Bedingungen ungefaltet vorliegen. Diese Proteine, die eine neue strukturelle Kategorie darstellen, bezeichnet man als „intrinsisch unstrukturiert“ bzw. „intrinsisch ungeordnet“ (Wright & Dyson, 1999; Dyson & Wright, 2005; Richter *et al.*, 2007). Intrinsisch unstrukturierte/ungeordnete Proteine besitzen eine nicht-starre Struktur unter physiologischen Bedingungen. Die Moleküle sind gestreckt, hoch flexibel und haben wenig Sekundär- und Tertiärstruktur. Sie verhalten sich nur selten wie echte „*random coil*“-Proteine, sondern neigen vielmehr zur Bildung lokaler Strukturelemente oder hydrophober Cluster. Intrinsisch ungeordnete Proteine spielen in Transkriptions- und Translationsprozessen, bei der Signaltransduktion und Zellzyklus-Kontrolle eine Rolle (Dyson & Wright, 2005). Ähnliche Funktionen wurden auch für andere MTs beschrieben.

Auf der Basis der gefundenen NMR-spektroskopischen Daten lässt sich schlussfolgern, dass das apo-MT1_NECLU eine vollständig unstrukturierte Konformation einnimmt. Die Zugabe von Cd(II) zeigte keinen Effekt auf die NMR-Spektren von MT1_NECLU. Die beobachteten Resonanzen in der Aminosäuresequenz von Cd₂-MT1_NECLU bleiben unverändert und weisen kaum chemische Verschiebungseffekte auf, die ein Hinweis für Konformationsveränderungen sind. Wegen der Ähnlichkeit der ein- und zweidimensionalen Protonen-NMR-Spektren von apo-MT1_NECLU im Vergleich zum Cd(II)-beladenen Protein kann man davon ausgehen, dass sich durch die Zugabe von Cd(II) die Konformation des apo-Proteins kaum oder gar nicht ändert. Das lässt sich besonders auch anhand der Kreuzsignale im 2D-TOCSY-Spektrum beider Proteine zeigen, die ein identisches Kopplungsmuster zeigen (s. Abbildung 4-37). Allerdings wurde bei den CD-Messungen eine Änderung der Elliptizität festgestellt, wonach man für das Cd₂-MT1_NECLU eine *loop*-ähnliche dreidimensionale Struktur postulieren könnte. Diese These wird auch durch die berechneten Modelle unterstützt, da die Aminosäuren des MT1_NECLU *loop*-ähnlich erst halb rechts-, dann halb links-gängig um die komplexierten Cd(II)-Ionen gewunden sind (s. Abb. 4-30). Auch bei den Strukturbestimmungen aller anderen bisher untersuchten Metallothioneine konnten keine Sekundärstruktur-Elemente beobachtet werden. Alle beschriebenen Metallothioneine besitzen *loop*- und *coil*-ähnliche Strukturmerkmale, außer das MTA_NOTCO aus dem antarktischen Dorsch, für das ein ₃₁₀-Helix-Motiv gefunden wurde (Schultze *et al.*, 1988; Capasso *et al.*, 2003).

Für das Kupfer-Metallothionein Cu₆-MT_NEUCR aus *Neurospora crassa* konnten 152 NOE-

restraints, also dipolare, räumliche Wechselwirkungen zwischen den Protonen der Aminosäuren identifiziert werden (Cobine *et al.*, 2004). Mit Hilfe dieser NOEs war die Erstellung eines Modells möglich. Im Gegensatz dazu konnten in der vorliegenden Arbeit kaum brauchbare NOE-Signale für das MT1_NECLU bzw. Cd₂-MT1_NECLU beobachtet werden, weshalb die MD-Simulationen ohne NOE-*restraints* durchgeführt wurden. Für das Fisch-Metallothionein MTA_NOTCO konnten 373 NOE-*restraints* detektiert werden, was die Berechnung einer dreidimensionalen Struktur ermöglichte (Capasso *et al.*, 2003).

In den drei verschiedenen Homologiemodellen des MT1_NECLU konnten theoretische Abstände der Cd(II)-Ionen zu den Schwefelionen bei der Komplexierung von Cd(II) an die Cysteinreste von ca. 2,3 Å berechnet werden (s. 4.3.1.). Demzufolge sollte der Abstand zwischen zwei Schwefelionen mind. 4,6 Å betragen, der Abstand der Kohlenstoffatome und Protonen wäre noch größer als 4,6 Å (Abb. 5-8). Über eine Bindungslänge von mehr als 5 Å gibt es keine dipolaren Wechselwirkungen, wie auch Malikayil *et al.* (1989) beschreiben. Dies ist möglicherweise eine Ursache dafür, dass keine interresidualen NOEs detektiert werden konnten. Allerdings wurden auch kaum intraresiduale NOEs, die Bindungslängen unter 5 Å entsprechen, beobachtet. In Chelatkomplexen konnten die Autoren Renz-Kreikebohm *et al.* (1991), Engelhardt & Renz-Kreikebohm (1989) und Engelhardt *et al.* (1991) eine Bindungslänge zwischen Cd(II) und dem S-Liganden von 2,5 bis 3 Å bestimmen. Diese Bindungslänge im Chelat-Komplex ist somit etwas größer, als sie für die Cd(II)-Thiol-Komplexierung im MT1_NECLU bestimmt wurde. Man könnte eine stärkere Komplexierung des Cd(II) an das MT1_NECLU annehmen. Stillman *et al.* (1994) fanden für Cu-Thiol-Komplexe Bindungslängen von ca. 2,15 bis 2,3 Å. Dies würde den Bindungslängen von Cd(II) im MT1_NECLU ähneln, allerdings kann man Cu- und Cd-Ionen-Komplexe nicht direkt vergleichen, da Cu einen kleineren Atomradius hat als Cd. Für die α -Domäne des Metallothioneins 2a aus Kaninchenleber konnten für Cd-S-Komplexe (terminal) Bindungslängen von 2,47-2,61 Å mittels NMR, MM/MD (*molecular mechanics/dynamics*) und DFT (*density functional theory*) bestimmt werden (Yalovega *et al.*, 2007). Nicht terminale, sogenannte Brücken-Schwefelatome (*bridging*) dagegen haben Bindungslängen von 2,58-2,59 Å. Die α -Domäne des MT-2a kann 4 Cd(II)-Ionen über 11 Cystein-Reste komplexieren, was zu diesen Brücken-Schwefelatomen führt. Diese Domäne selbst ist größer als das MT1_NECLU, es wären daher auch die größeren Bindungslängen erklärbar

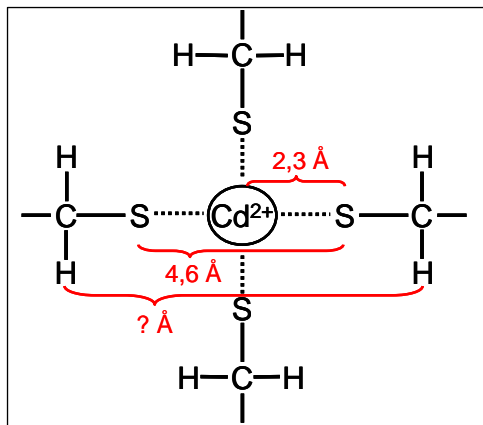


Abb. 5-8: Schema der Komplexbildung zwischen einem $\text{Cd}(\text{II})$ -Ion und vier Schwefelionen sowie deren theoretisch berechnete Bindungslängen (in \AA).

Es ist möglich, dass das native MT1_NECLU, welches im Cytosol der Zelle vorkommt, eine andere Struktur als in H_2O besitzt. Viele intrinsisch ungeordnete Proteine gehen einen Übergang zu einem geordneten Zustand ein oder falten in stabile Sekundär- oder Tertiärstrukturen bei der Bindung an ihre Zielmoleküle, wie beispielsweise stabilisierende Proteine, Chaperone oder Metall-Überträger, was bedeutet, dass sie gekoppelte Faltungs-Bindungs-Prozesse durchlaufen (Dyson & Wright, 2005).

Während mit Hilfe der NMR-Spektroskopie Lösungsstrukturen von Proteinen bestimmt werden, ist die Röntgenkristallographie eine andere Möglichkeit, um Strukturinformationen über Protein-Kristalle zu erhalten. Für das Metallothionein 2 aus Ratte (MT2_RAT) wurde die dreidimensionale Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse (Robbins *et al.*, 1991) und NMR-Spektroskopie bestimmt (Schultze *et al.*, 1988). Braun *et al.* (1992) verglichen beide Strukturen miteinander und konnten eine gleiche allgemeine Polypeptidfaltung mit gleichem molekularem Bau feststellen. Die β -Domäne, die für die Homologiemodellierung des MT2_RAT Verwendung fand, besitzt eine rechtsgängige Struktur. Die größten Unterschiede der Kristallstruktur im Vergleich zur Lösungsstruktur sind die Kristall-Packungs-Effekte, die vor allem in der *loop*-Region 9-15 und in der C-terminalen Region 24-30 zum Tragen kommen. Die β -Domäne zeigt dabei eine weniger gut durch NMR-Daten definierte Struktur, man kann dies auch als eine höhere dynamische Unordnung bezeichnen. Die Cystein-Motive C-x-C in der β -Domäne des MT2_RAT zeigen eine *half-turn*-Sekundärstruktur. Da für das kleine Metallothionein MT1_NECLU aus *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 mittels CD- und NMR-Spektroskopie keine Sekundärstrukturmerkmale bestimmt werden konnten, ist es möglich, dass keine Kristalle dieses MTs erzeugt werden können, die zu einer Röntgenkristallstruktur führen. Generell haben Metallothioneine ein flexibleres Polypeptid-Rückgrat, als andere Proteine mit einer distinkten Sekundärstruktur. Diese erstaunliche

Eigenschaft ist auch der Grund dafür, dass Metallothioneine verschieden große Schwermetall-Ionen komplexieren können, ohne dass sie ihre Konformation wesentlich verändern müssen (Ngu & Stillman, 2009a). Eine Kristallstruktur-Analyse von MT1_NECLU kann wahrscheinlich keine Informationen über ungeordnete Zustände liefern, sondern nur Hinweise auf deren Existenz durch die Abwesenheit von Elektronendichte in lokalen Regionen des Proteins geben.

Die Konzentration einer Substanz ist bei NMR-Strukturuntersuchungen ein entscheidender Faktor. Bei den Messungen mittels 600 MHz-NMR-Spektrometer wurden 2,6 mM MT1_NECLU verwendet, was ca. die 2,5-fache Konzentration im Vergleich zu den Messungen mittels 400 MHz-NMR-Spektroskopie war. Bei der *microcoil* NMR-Spektroskopie beträgt die Menge an gelöstem MT1_NECLU, das für die Messungen verwendet wird, ca. 1,5 μL = 9 μg . Bei 650 μL eingesetztem MT1_NECLU wurden ca. 1,5 mg Substanz verwendet. Die für NMR-Messungen bei 600 MHz verwendete Menge an MT1_NECLU betrug also ca. 1/150 im Vergleich zur 400 MHz-NMR-Spektroskopie. Trotzdem konnten fast genauso gut aufgelöste Spektren aufgenommen werden. Bei einer höheren Konzentration an MT1_NECLU könnten wahrscheinlich bessere Spektren mit intensiveren Signalen erhalten werden, die aber trotzdem keine vollständige Zuordnung der chemischen Verschiebungen der Protonen zulassen würden.

Der Vergleich der Spektren bei 400 MHz und 600 MHz ist schwierig, da erstens die Messungen bei 600 MHz mit einem *microcoil*-Spektrometer durchgeführt wurden, während die Messungen der Spektren bei 400 MHz in einem herkömmlichen Probenkopf erfolgten. Zweitens wurde bei den Messungen mittels *microcoil* 600 MHz-NMR-Spektrometer kein interner Standard zugesetzt, der als Referenz zur Eichung der Messungen bei 400 MHz benutzt wurde. Hinzu kommt die Messung der NMR-Spektren bei unterschiedlichen Frequenzen (400 und 600 MHz) und magnetischen Flussdichten (Magnetfeld; 9,4 und 14,1 Tesla). Je höher die magnetische Flussdichte, desto höher die Empfindlichkeit und die Auflösung (Lehmann, 2007).

5.4. Strukturanalyse des nativen MT2_NECLU

Die *online*-Kopplung der Kapillar-HPLC an das *microcoil* 600 MHz-NMR-Spektrometer lieferte keine NMR-Daten. Auch nach der Erhöhung der Anzahl der *scans*/Analysen pro Spektrum konnten keine chemischen Verschiebungen detektiert werden. Grund hierfür ist wahrscheinlich eine zu geringe Konzentration des nativen MT2_NECLU in der Probe. Für Peptide mit Massen von ca. 1300 Da wurde ein Detektionslimit von ca. 300 pmol für *microcoil*-Messungen festgestellt (Hentschel *et al.*, 2005). Nach der Quantifizierung des MT2_NECLU wurde in der Probe eine Konzentration von ca. 15 pmol/ μ L berechnet. Diese geringe Konzentration (1/20) ist mittels UV-Detektion bei 220 nm noch detektierbar, aber für *microcoil* NMR-Messungen zu gering.

Eine Alternative, um kleine Substanzmengen mittels NMR untersuchen zu können, wäre die Verwendung einer HPLC-SPE-NMR-Kopplung, bei der die gewünschte Substanz, hier z. B. das Metallothionein, mehrmals hintereinander mittels HPLC getrennt und mittels SPE-Säule (*solid phase extraction column*) aufkonzentriert wird. Anschließend ist ein Wechsel des Lösungsmittels, welches für die NMR-Messung optimal ist, möglich. Der Analyt wird in einem kleinen Volumen und damit in einer hohen Konzentration von der SPE-Säule eluiert und für die NMR-Messungen verwendet (Seger & Sturm, 2007). Diese Methode ist heute eine gängige Methode, um Sekundärstoffe oder Stoffgemische in (potenziellen) Arzneipflanzen, wie z. B. Polyphenole (z. B. aus *Hypericum perforatum* – Echtes Johanniskraut; Tatsis *et al.*, 2007), Coumarine (Lambert *et al.*, 2005), Iridoide und Terpenoide (z. B. aus *Harpagophytum procumbens* – Afrikanische Teufelskralle; Clarkson *et al.*, 2006), Saponine (Nyberg *et al.*, 2003) und Alkaloide (z. B. aus *Corydalis solida* – Gefingertes Lerchensporn; Sturm *et al.*, 2007) zu identifizieren.

In zukünftigen Untersuchungen sollten MT2_NECLU-Fractionen mittels analytischer HPLC fraktioniert und lyophilisiert werden, um das Lyophilisat in einem sehr kleinen Volumen an Lösungsmittel (wie gehabt) mit 0,03 % 2-Mercaptoethanol aufzunehmen. Dadurch wäre eine Konzentrierung des MT2_NECLU möglich und NMR-Spektren messbar. Eine andere Struktur des nativen MT2_NECLU im Vergleich zum synthetischen MT1_NECLU ist nicht zu erwarten, da der Serin-Threonin-Austausch (Threonin besitzt nur eine Methylgruppe mehr als Serin) nicht relevant für die Struktur ist.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Der Stamm H4-2-4 des aquatischen Hyphomyceten *Heliscus lugdunensis*, der aus einem stark mit Schwermetallen belasteten Standort isoliert wurde, bildet unter Cd(II)-Stress das Metallothionein MT2_NECLU. Im Stamm H8-2-1 aus einem moderat belasteten Standort (Jaeckel *et al.*, 2005) wurde dagegen unter Cd(II)-Stress das MT1_NECLU induziert, das sich nur durch **einen** Aminosäure-Austausch vom MT2_NECLU unterscheidet. Dieses Ergebnis weist zusammen mit morphologischen Unterschieden, Wachstumsunterschieden, unterschiedlichen Thiol-Induktionen und leicht abweichenden 18S rDNA-Sequenzen (Braha, 2004) auf die Bildung von zwei Ökotypen dieses Pilzes hin. Weitere Hinweise zur Ökotyp-Bildung dieser beiden Stämme von *H. lugdunensis* könnten zukünftige 28S rDNA-Sequenzierungen aufdecken.

Alle Untersuchungen wurden mit dem gesamten Pilzmycel durchgeführt. Um auch Unterschiede bei der Cd(II)-Stressantwort in verschiedenen Zelltypen dieses Pilzes untersuchen zu können, ist die Laser-Mikrodissektion von Einzelzellen (Spitzenzellen und nachfolgenden Zellen) die Methode der Wahl. Erste Untersuchungen (Leyh, 2009) zeigen die gute Anwendbarkeit dieses Systems auf das Pilzmycel. Die Detektion geringster Mengen an verschiedenen Thiolen, wie Cys, Cys-Gly, γ -Glu-Cys und GSH, die aus den Einzelzellen extrahiert werden, ist mittels kapillarelektrophoretischer Trennung und Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion möglich.

Mittels molekularbiologischer Untersuchungen konnte das Gen, welches für das MT2_NECLU codiert, identifiziert werden. Die Sequenzierung der regulatorischen Genregion zeigte, dass das Gen vermutlich durch *upstream activating sequences* reguliert wird, die schon aus Hefen bekannt sind. Um die genaue Regulation dieses Gens untersuchen zu können, wäre es notwendig, eine größere Region vor diesem Gen sowie *downstream*-Sequenzen zu analysieren.

Die Induktion dieses Gens unter Cd(II)-Stress konnte auch auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Da eine zweite, induzierte Bande detektiert wurde, müsste mittels weiteren Sequenzierungen des Genoms abgeklärt werden, worum es sich dabei handelt.

Die Quantifizierung der Thiole, wie Cys, Cys-Gly, γ -Glu-Cys, GSH und PC2, ergab eine Erhöhung der Gehalte unter Cd(II)-Stress. Dabei konnten Cd(II)-abhängige Unterschiede festgestellt werden.

Im physiologischen Experiment wurde die Induktion des MT2_NECLU unter Cd(II)-Stress in *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 beobachtet und mittels Massenspektrometrie nachgewiesen. Weiterhin konnte das Vorhandensein einer Vorstufe des MT2_NECLU, das Met-MT2_NECLU, mittels RP18-HPLC mit anschließender Ellman-Nachsäulenderivatisierung nachgewiesen werden. Durch Cd(II)-Stress erhöhte Mengen an MT2_NECLU und die Aminosäurefolge tragen dazu bei, dass das Methionin nicht bei allen Molekülen abgespalten werden kann. Es müsste ebenfalls untersucht werden, ob diese Vorstufe auch für das MT1_NECLU im Stamm H8-2-1 von *H. lugdunensis* mittels Massenspektrometrie eindeutig nachgewiesen werden kann.

Die Strukturuntersuchungen des synthetischen MT1_NECLU zeigen, dass das apo-MT1_NECLU keine Sekundärstruktur-Elemente aufweist. Nach der Komplexierung mit zwei Cd(II)-Ionen ändert sich die Struktur nicht wesentlich, man könnte eine *loop*-ähnliche Struktur vermuten. Um möglicherweise noch mehr Strukturinformationen zu erhalten, wäre die Bestimmung der Kristallstruktur des MT1_NECLU mittels Röntgenkristallographie eine geeignete Methode. Weiterhin gibt es die Möglichkeit, das kleine Protein mittels schwerer Isotope (^{13}C und/oder ^{15}N) zu markieren, um noch mehr Informationen über dessen Struktur zu bekommen. Auch der sequentielle Austausch einzelner Aminosäuren, wie Cystein, über Peptid-Bibliotheken könnte zu einem noch besseren Verständnis der Struktur des MT1_NECLU führen.

Die Untersuchung des nativen MT2_NECLU konnte bisher nicht mittels *online*-Kopplung der Kapillar-HPLC an das NMR-Spektrometer erfolgen. In weiteren Untersuchungen sollten angereicherte MT2_NECLU-Fractionen mittels *microcoil*-NMR analysiert werden, um die Struktur des Proteins zu bestimmen.

7. Literatur

- ADKINS, S. & BURMEISTER, M. (1996). Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: Applications for preparative gels and educational demonstrations. *Anal. Biochem.* 240 (1): 17-23.
- ALBERT, K. (2002). On-line LC-NMR and related techniques. Wiley, Chichester.
- AL-LAHHAM, A. (1998). Involvement of the glutathione synthetase gene *gsh 2* in phytochelatin biosynthesis of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., ZHANG, J., LIPMAN, D. J., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, Z. & MILLER, W. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25 (17): 3389-3402.
- ARAUJO-PALOMARES, C. L., CASTRO-LONGORIA, E. & RIQUELME, M. (2007). Ontogeny of the Spitzenkorper in germlings of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 44 (6): 492-503.
- AVERBECK, N. B., BORGHOUTS, C., HAMANN, A., SPECKE, V. & OSIEWACZ, H. D. (2001). Molecular control of copper homeostasis in filamentous fungi: Increased expression of a metallothionein gene during aging of *Podospora anserina*. *Mol. Gen. Genet.* 264 (5): 604-612.
- AZEVEDO, M.-M., ALMEIDA, B., LUDOVICO, P. & CASSIO, F. (2009). Metal stress induces programmed cell death in aquatic fungi. *Aquat. Toxicol.* 92 (4): 264-270.
- AZEVEDO, M.-M., CARVALHO, A., PASCOAL, C., RODRIGUES, F. & CASSIO, F. (2007). Responses of antioxidant defenses to Cu and Zn stress in two aquatic fungi. *Sci. Total Environ.* 377 (2-3): 233-243.
- BABU, C. S. & LIM, C. (2006). Empirical force fields for biologically active divalent metal cations in water. *J Phys Chem A* 110 (2): 691-699.
- BACKOR, M., PAWLIK-SKOWRONSKA, B., TOMKO, J., BUDOVA, J. & SANITA DI TOPPI, L. (2006). Response to copper stress in aposymbiotically grown lichen mycobiont *Cladonia cristatella*: uptake, viability, ergosterol and production of non-protein thiols. *Mycol. Res.* 110: 994-999.
- BALLANCE, D. J. (1986). Sequences important for gene expression in filamentous fungi. *Yeast* 2 (4): 229-236.
- BÄRLOCHER, F. (1992). The ecology of aquatic hyphomycetes. Springer Verlag, Heidelberg.
- BELLION, M., COURBOT, M., JACOB, C., BLAUDEZ, D. & CHALOT, M. (2006). Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 254 (2): 173-181.

- BELLION, M., COURBOT, M., JACOB, C., GUINET, F., BLAUDEZ, D. & CHALOT, M. (2007). Metal induction of a *Paxillus involutus* metallothionein and its heterologous expression in *Hebeloma cylindrosporum*. *New Phytol.* 174 (1): 151-158.
- BELTRAMINI, M. & LERCH, K. (1986). Primary structure and spectroscopic studies of *Neurospora* copper metallothionein. *Environ. Health Perspect.* 65: 21-27.
- BELTRAMINI, M., MÜNGER, K., GERMANN, U. A. & LERCH, K. (1987). Luminescence emission from the Cu(I)-thiolate complex in metallothioneins. *Experientia Suppl.* 52: 237-241.
- BERLICH, M., MENGE, S., BRUNS, I., SCHMIDT, J., SCHNEIDER, B. & KRAUSS, G.-J. (2002). Coumarins give misleading absorbance with Ellman's reagent suggestive of thiol conjugates. *The Analyst* 127 (3): 333-336.
- BINZ, P.-A. & KÄGI, J. H. R. (1999). Metallothionein: Molecular evolution and classification. In: *Metallothionein IV* (Klaasen, C., Hrsg.). Birkhäuser, Basel, S. 7-13.
- BLAUDEZ, D., BOTTON, B. & CHALOT, M. (2000). Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiol.* 146 (5): 1109-1117.
- BLAZHENKO, O. V., ZIMMERMANN, M., KANG, H. A., BARTOSZ, G., PENNINGCKX, M. J., UBIYVOVK, V. M. & SIBIRNY, A. A. (2006). Accumulation of cadmium ions in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Biometals* 19 (6): 593-599.
- BLINDAUER, C. A. (2008). Metallothioneins with unusual residues: Histidines as modulators of zinc affinity and reactivity. *J. Inorg. Biochem.* 102 (3): 507-521.
- BLUM, H., BEIER, H. & GROSS, H.-J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8 (2): 93-99.
- BRAHA, B. (2004). Physiologisch-biochemische Charakterisierung schwermetallinduzierter Reaktionen des aquatischen Hyphomyceten *Heliscus lugdunensis* (Teleomorph: *Nectria lugdunensis*). Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- BRAHA, B., TINTEMANN, H., KRAUSS, G., EHRMAN, J., BARLOCHER, F. & KRAUSS, G. J. (2007). Stress response in two strains of the aquatic hyphomycete *Heliscus lugdunensis* after exposure to cadmium and copper ions. *BioMetals* 20 (1): 93-105.
- BRAUN, W., VASAK, M., ROBBINS, A. H., STOUT, C. D., WAGNER, G., KÄGI, J. H. & WÜTHRICH, K. (1992). Comparison of the NMR solution structure and the x-ray crystal structure of rat metallothionein-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (21): 10124-10128.
- BRÄUTIGAM, A., SCHAUMLÖFFEL, D., KRAUSS, G. J. & WESENBERG, D. (2009). Analytical approach for characterization of cadmium-induced thiol peptides-a case study using *Chlamydomonas reinhardtii*. *Anal Bioanal Chem* 395 (6): 1737-1747.

- CAPASSO, C., CARGINALE, V., CRESCENZI, O., DI MARO, D., PARISI, E., SPADACCINI, R. & TEMUSSI, P. A. (2003). Solution structure of MT_{nc}, a novel metallothionein from the antarctic fish *Notothenia coriiceps*. *Structure* 11 (4): 435-443.
- CASE, D. A., CHEATHAM, T. E., 3RD, DARDEN, T., GOHLKE, H., LUO, R., MERZ, K. M., JR., ONUFRIEV, A., SIMMERLING, C., WANG, B. & WOODS, R. J. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem* 26 (16): 1668-1688.
- CASE, D. A., PEARLMAN, D. A., CALDWELL, J. W., III, T. E. C., WANG, J., ROSS, W. S., SIMMERLING, C. L., DARDEN, T. A., MERZ, K. M., STANTON, R. V., CHENG, A. L., VINCENT, J. J., M. CROWLEY, TSUI, V., GOHLKE, H., RADMER, R. J., DUAN, Y., PITERA, J., MASSOVA, I., SEIBEL, G. L., SINGH, U. C., WEINER, P. K. & KOLLMAN, P. A. (2002). AMBER 7. In: University of California, San Francisco, USA.
- CHEN, S., VETRO, J. A. & CHANG, Y. H. (2002). The specificity *in vivo* of two distinct methionine aminopeptidases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 398 (1): 87-93.
- CHEREST, H., DAVIDIAN, J. C., THOMAS, D., BENES, V., ANSORGE, W. & SURDIN-KERJAN, Y. (1997). Molecular characterization of two high affinity sulfate transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 145 (3): 627-635.
- CLARKSON, C., STAERK, D., HANSEN, S. H., SMITH, P. J. & JAROSZEWSKI, J. W. (2006). Discovering new natural products directly from crude extracts by HPLC-SPE-NMR: chinane diterpenes in *Harpagophytum procumbens*. *J Nat Prod* 69 (4): 527-530.
- CLEMENS, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88 (11): 1707-1719.
- CLEMENS, S., KIM, E. J., NEUMANN, D. & SCHROEDER, J. I. (1999). Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J.* 18 (12): 3325-3333.
- COBBETT, C. S. (1999). A family of phytochelatin synthase genes from plant, fungal and animal species. *Trends Plant Sci.* 4 (9): 335-337.
- COBINE, P. A., MCKAY, R. T., ZANGGER, K., DAMERON, C. T. & ARMITAGE, I. M. (2004). Solution structure of Cu₆ metallothionein from the fungus *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* 271 (21): 4213-4221.
- COLS, N., ROMEROISART, N., CAPDEVILA, M., OLIVA, B., GONZALEZDUARTE, P., GONZALEZDUARTE, R. & ATRIAN, S. (1997). Binding of excess cadmium(II) to Cd-7-metalllothionein from recombinant mouse Zn-7-metalllothionein 1. UV-VIS absorption and circular dichroism studies and theoretical location approach by surface accessibility analysis. *J. Inorg. Biochem.* 68 (3): 157-166.
- COURBOT, M., DIEZ, L., RUOTOLO, R., CHALOT, M. & LEROY, P. (2004). Cadmium-responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (12): 7413-7417.

- CULOTTA, V. C., HOWARD, W. R. & LIU, X. F. (1994). CRS5 encodes a metallothionein-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 269 (41): 25295-25302.
- DAMERON, C., SMITH, B. & WINGE, D. (1989). Glutathione-coated cadmium-sulfide crystallites in *Candida glabrata*. J. Biol. Chem. 264 (29): 17355-17360.
- DIJKSTERHUIS, J. (2003). Confocal microscopy of Spitzenkörper dynamics during growth and differentiation of rust fungi. Protoplasma 222 (1-2): 53-59.
- DUFFUS, J. H. (2002). "Heavy metals" - A meaningless term? (IUPAC technical report). Pure Appl. Chem. 74 (5): 793-807.
- DYSON, H. J. & WRIGHT, P. E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. Nat Rev Mol Cell Biol 6 (3): 197-208.
- ENGELHARDT, U. & RENZ-KREIKEBOHM, C. (1989). Dimerer Cadmium(II)-komplex mit Dihydrazidothiophosphorsäurephenylester als zweizähnigem *S,N*-Chelatligand. Acta Cryst C 45: 1679-1683.
- ENGELHARDT, U., STROMBURG, B. & RENZ-KREIKEBOHM, C. (1991). Polymerer Cadmium(II)-Komplex mit Di(pyrazolidino)thiophosphorsäure-O-phenylester als dreizähnigem *S,N,N*-Ligand. Acta Cryst C 47: 286-289.
- ERNST, W. H. O., KRAUSS, G.-J., VERKLEIJ, J. A. C. & WESENBERG, D. (2008). Interaction of heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. Plant, Cell & Environment 31 (1): 123-143.
- FASMAN, G. D. (1996). Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. Plenum Press, New York, USA.
- FISCHER, G. (2000). Chemical aspects of peptide bond isomerization. Chem Soc Rev 29: 119-127.
- FISCHER, G. & AUMÜLLER, T. (2003). Regulation of peptide bond cis/trans isomerization by enzyme catalysis and its implication in physiological processes. Rev Physiol Biochem Pharmacol 148: 105-150.
- FREISINGER, E. (2008). Plant MTs-long neglected members of the metallothionein superfamily. Dalton Trans (47): 6663-6675.
- FRIEBOLIN, H. & SCHILLING, G. (1994). Zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Chemie in unserer Zeit 28 (2): 88-101.
- FROTTIN, F., MARTINEZ, A., PEYNOT, P., MITRA, S., HOLZ, R. C., GIGLIONE, C. & MEINNEL, T. (2006). The proteomics of N-terminal methionine cleavage. Mol Cell Proteomics 5 (12): 2336-2349.
- FUREY, W. F., ROBBINS, A. H., CLANCY, L. L., WINGE, D. R., WANG, B. C. & STOUT, C. D. (1986). Crystal structure of Cd,Zn metallothionein. Science 231 (4739): 704-710.

- GADD, G. M. & MOWLL, J. L. (1983). The relationship between cadmium uptake, potassium release and viability in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Lett. 16: 45-48.
- GADD, G. M., RAMSAY, L., CRAWFORD, J. W. & RITZ, K. (2001). Nutritional influence on fungal colony growth and biomass distribution in response to toxic metals. FEMS Microbiol. Lett. 204 (2): 311-316.
- GADD, G. M. & WHITE, C. (1989). Heavy metal and radionuclide accumulation and toxicity in fungi and yeasts. In: Metal & Microbe Interactions (Poole, R. K. & Gadd, G. M., Hrsg.). IRL Press, Oxford, S. 19-38.
- GALLI, U., MEIER, M. & BRUNOLD, C. (1993). Effects of cadmium on nonmycorrhizal and mycorrhizal norway spruce seedlings *Picea abies* (L) Karst and its ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* (Scop Ex Fr) Bk and Br - Sulfate reduction, thiols and distribution of the heavy metal. New Phytol. 125 (4): 837-843.
- GANZ, P. (2006). Die Rolle des Sulfides innerhalb des Schwefelstoffwechsels in aquatischen Hyphomyceten unter Schwermetallbelastung. Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg.
- GUIMARAES-SOARES, L., FELICIA, H., BEBIANNO, M. J. & CÁSSIO, F. (2006). Metal-binding proteins and peptides in the aquatic fungi *Fontanospora fusiramosa* and *Flagellospora curta* exposed to severe metal stress. Sci. Total Environ. 372 (1): 148-156.
- GUIMARAES-SOARES, L., PASCOAL, C. & CASSIO, F. (2007). Effects of heavy metals on the production of thiol compounds by the aquatic fungi *Fontanospora fusiramosa* and *Flagellospora curta*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 66 (1): 36-43.
- HEBNER, F. (2007). Schwermetallstress und Thiolpeptidinduktion in aquatischen Pilzen – Ein Stammvergleich. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- HELL, R. (2002). Der assimilatorische Schwefelstoffwechsel in Pflanzen. BIOSpektrum 3: 248-251.
- HENTSCHER, P., KRUCKER, M., GRYNBAUM, M. D., PUTZBACH, K., BISCHOFF, R. & ALBERT, K. (2005). Determination of regulatory phosphorylation sites in nanogram amounts of a synthetic fragment of ZAP-70 using microprobe NMR and on-line coupled capillary HPLC-NMR. Magn Reson Chem 43 (9): 747-754.
- HIBBETT, D. S., BINDER, M., BISCHOFF, J. F., BLACKWELL, M., CANNON, P. F., ERIKSSON, O. E., HUHDORF, S., JAMES, T., KIRK, P. M., LUCKING, R., THORSTEN LUMBSCH, H., LUTZONI, F., MATHENY, P. B., MCCLAUGHLIN, D. J., POWELL, M. J., REDHEAD, S., SCHOCH, C. L., SPATAFORA, J. W., STALPERS, J. A., VILGALYS, R., AIME, M. C., APTROOT, A., BAUER, R., BEGEROW, D., BENNY, G. L., CASTLEBURY, L. A., CROUS, P. W., DAI, Y. C., GAMS, W., GEISER, D. M., GRIFFITH, G. W., GUEIDAN, C., HAWKSWORTH, D. L., HESTMARK, G., HOSAKA, K., HUMBER, R. A., HYDE, K. D., IRONSIDE, J. E., KOLJALG, U., KURTZMAN, C. P., LARSSON, K. H., LICHTWARDT, R., LONGCORE, J., MIADLIKOWSKA, J., MILLER, A., MONCALVO, J. M., MOZLEY-STANDRIDGE, S., OBERWINKLER, F., PARMASO, E., REEB, V., ROGERS, J. D., ROUX, C., RYVARDEN, L., SAMPAIO, J. P., SCHUSSLER, A., SUGIYAMA, J., THORN, R. G., TIBELL, L., UNTEREINER, W. A., WALKER, C., WANG, Z., WEIR, A., WEISS, M.,

- WHITE, M. M., WINKA, K., YAO, Y. J. & ZHANG, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol. Res.* 111 (5): 509-547.
- HILLIS, D. M. & DIXON, M. T. (1991). Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol* 66 (4): 411-453.
- HOPPLE, J. S., JR. & VILGALYS, R. (1999). Phylogenetic relationships in the mushroom genus *Coprinus* and dark-spored allies based on sequence data from the nuclear gene coding for the large ribosomal subunit RNA: divergent domains, outgroups, and monophyly. *Mol Phylogenet Evol* 13 (1): 1-19.
- HOWE, R., EVANS, R. L. & KETTERIDGE, S. W. (1997). Copper-binding proteins in ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* 135 (1): 123-131.
- HUGHES, A. L., TODD, B. L. & ESPENSHADE, P. J. (2005). SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. *Cell* 120 (6): 831-842.
- HWANG, C. S. & KOLATTUKUDY, P. E. (1995). Isolation and characterization of genes expressed uniquely during appressorium formation by *Colletotrichum gloeosporioides* conidia induced by the host surface wax. *Mol. Gen. Genet.* 247 (3): 282-294.
- IMAI, K., OBATA, H., SHIMIZU, K. & KOMIYA, T. (1996). Conversion of glutathione into cadystins and their analogs catalyzed by carboxypeptidase Y. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60 (7): 1193-1204.
- ISOBE, M., HAYASHI, Y., IMAI, K., NAKAGAWA, C.-W., UYAKUL, D., MUTOH, N. & GOTO, T. (1991). Structure and biosynthesis of cadystin [γ -EC-Peptides (γ -EC)nG] of fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. In: *Metallothioneins* (Stillman, M. J., F., S. C. & Suzuki, K. T., Hrsg.). VCH Publishers, S. 226-243.
- JACOB, C., COURBOT, M., MARTIN, F., BRUN, A. & CHALOT, M. (2004). Transcriptomic responses to cadmium in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *FEBS Lett.* 576 (3): 423-427.
- JAECKEL, P. (2002). Wirkungen von Schwermetallen auf aquatische Pilze aus mikrobiellen Biozönosen des Mansfelder Landes. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- JAECKEL, P., KRAUSS, G., MENGE, S., SCHIERHORN, A., RÜCKNAGEL, P. & KRAUSS, G.-J. (2005). Cadmium induces a novel metallothionein and phytochelatin 2 in an aquatic fungus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333 (1): 150-155.
- JARAI, G. & MARZLUF, G. A. (1991). Sulfate transport in *Neurospora crassa*: regulation, turnover, and cellular localization of the CYS-14 protein. *Biochemistry* 30 (19): 4768-4773.
- JASPERS, C. J. & PENNINGCKX, M. J. (1984). Glutathione metabolism in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence that γ -glutamyltranspeptidase is a vacuolar enzyme. *Biochemie* 66 (1): 71-74.

- JIANG, D. T., HEALD, S. M., SHAM, T. K. & STILLMAN, M. J. (1994). Structures of the cadmium, mercury, and zinc thiolate clusters in metallothionein: XAFS study of Zn₇-MT, Cd₇-MT, Hg₇-MT, and Hg₁₈-MT formed from rabbit liver metallothionein 2. *J. Am. Chem. Soc.* 116 (24): 11004-11013.
- KELLY, S. M., JESS, T. J. & PRICE, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* 1751 (2): 119-139.
- KESSLER, H., GEHRKE, M. & GRIESINGER, C. (1988). Zweidimensionale NMR-Spektroskopie, Grundlagen und Übersicht über die Experimente. *Angew. Chem.* 100 (4): 507-554.
- KETTER, J. S., JARAI, G., FU, Y. H. & MARZLUF, G. A. (1991). Nucleotide sequence, messenger RNA stability, and DNA recognition elements of *cys-14*, the structural gene for sulfate permease II in *Neurospora crassa*. *Biochemistry* 30 (7): 1780-1787.
- KETTER, J. S. & MARZLUF, G. A. (1988). Molecular cloning and analysis of the regulation of *cys-14+*, a structural gene of the sulfur regulatory circuit of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell Biol.* 8 (4): 1504-1508.
- KING, T. E. & MORRIS, R. O. (1967). Determination of acid-labile sulfide and sulfhydryl group. *Methods Enzymol.* 10: 634-637.
- KIRK, P. M. (2009). www.indexfungorum.org. In: CABI.
- KLEBER, H.-P., SCHLEE, D. & SCHÖPP, W. (1988). *Biochemisches Praktikum*, 3. Auflage. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- KRAUSS, G., BÄRLOCHER, F., SCHRECK, P., WENNRICH, R., GLÄSSER, W. & KRAUSS, G.-J. (2001). Aquatic hyphomycetes occur in hyperpolluted waters in Central Germany. *Nova Hedwigia* 72: 419-428.
- KRAUSS, G., SCHLOSSER, D. & KRAUSS, G.-J. (2005). Aquatic fungi in heavy metal and organically polluted habitats. In: *Biodiversity of fungi - Their role in human life* (Deshmukh, S. K. & Rai, M. K., Hrsg.). Science Publishers, Enfield (NH), USA, S. 221-249.
- KRUCKER, M., LIENAU, A., PUTZBACH, K., GRYNBAUM, M. D., SCHUGER, P. & ALBERT, K. (2004). Hyphenation of capillary HPLC to microcoil H-1 NMR spectroscopy for the determination of tocopherol homologues. *Anal. Chem.* 76 (9): 2623-2628.
- KUZOFF, R. K., SWEERE, J. A., SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S. & ZIMMER, E. A. (1998). The phylogenetic potential of entire 26S rDNA sequences in plants. *Mol. Biol. Evol.* 15 (3): 251-263.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (259): 680-685.
- LAMBERT, M., STAERK, D., HANSEN, S. H. & JAROSZEWSKI, J. W. (2005). HPLC-SPE-NMR hyphenation in natural products research: optimization of analysis of *Croton membranaceus* extract. *Magn Reson Chem* 43 (9): 771-775.

- LANE, T. W. & MOREL, F. M. M. (2000). A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (9): 4627-4631.
- LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P. A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J. & HIGGINS, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23 (21): 2947-2948.
- LASKOWSKI, R. A., MACARTHUR, M. W., MOSS, D. S. & THORNTON, J. M. (1993). PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26: 283-291.
- LEE, H., BIEN, C. M., HUGHES, A. L., ESPENSHADE, P. J., KWON-CHUNG, K. J. & CHANG, Y. C. (2007). Cobalt chloride, a hypoxia-mimicking agent, targets sterol synthesis in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 65 (4): 1018-1033.
- LEHMANN, T. (2007). 1H-NMR-Spektroskopie. In: FU Berlin, Berlin, S. 48.
- LERCH, K. (1980). Copper metallothionein, a copper-binding protein from *Neurospora crassa*. *Nature* 284 (5754): 368-370.
- LEYH, B. (2009). Einzelzellanalytik und Zellspezifizierung der pilzlichen Modellorganismen *Heliciscus lugdunensis* H4-2-4 und *Clavariopsis aquatica* WD(A)-00-01. Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg.
- LI, Z.-S., LU, Y.-P., ZHEN, R.-G., SZCZYPKA, M., THIELE, D. J. & REA, P. A. (1997). A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1): 42-47.
- LOTTSPREICH, F. & ENGELS, J. W. (2006). 17. Magnetische Resonanzspektroskopie von Biomolekülen. In: Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag.
- LOWRY, O. N., ROSENBOUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MA, B., ZHANG, K., HENDRIE, C., LIANG, C., LI, M., DOHERTY-KIRBY, A. & LAJOIE, G. (2003). PEAKS: Powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17 (20): 2337-2342.
- MALIKAYIL, J. A., LERCH, K. & ARMITAGE, I. M. (1989). Proton NMR-studies of a metallothionein from *Neurospora crassa*: sequence-specific assignments by NOE measurements in the rotating frame. *Biochemistry* 28 (7): 2991-2995.
- MANAVATHU, M., GUNASEKARAN, S., PORTE, Q., MANAVATHU, E. & GUNASEKARAN, M. (1996). Changes in glutathione metabolic enzymes during yeast-to-mycelium conversion of *Candida albicans*. *Can. J. Microbiol.* 42 (1): 76-79.
- MARGOSHES, M. & VALLEE, B. L. (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79 (17): 4813-4814.

- MARZLUF, G. A. (1997). Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 73-96.
- MEHRA, R. K., MULCHANDANI, P. & HUNTER, T. C. (1994). Role of CdS quantum crystallites in cadmium resistance in *Candida glabrata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200 (3): 1193-1200.
- MENDOZA-CÓZATL, D. G. & MORENO-SANCHEZ, R. (2006). Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. Pathway modeling for plants. *Journal of Theoretical Biology* 238 (4): 919-936.
- MERRIFIELD, M. E., CHASELEY, J., KILLE, P. & STILLMAN, M. J. (2006). Determination of the Cd/S cluster stoichiometry in *Fucus vesiculosus* metallothionein. *Chem. Res. Toxicol.* 19 (3): 365-375.
- MICHOT, B., HASSOUNA, N. & BACHELLERIE, J. P. (1984). Secondary structure of mouse 28S rRNA and general model for the folding of the large rRNA in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 12 (10): 4259-4279.
- MICHOT, B., QU, L. H. & BACHELLERIE, J. P. (1990). Evolution of large-subunit rRNA structure. The diversification of divergent D3 domain among major phylogenetic groups. *Eur. J. Biochem.* 188 (2): 219-229.
- MIERSCH, J., GANZ, P., ROTHER, M., EHRMAN, J. M. & BAUMBACH, R. Sulphide generation in the aquatic hyphomycete *Heliscus lugdunensis* in response to cadmium. unpublished data.
- MORRIS, A. L., MACARTHUR, M. W., HUTCHINSON, E. G. & THORNTON, J. M. (1992). Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins* 12 (4): 345-364.
- MÜNGER, K., GERMANN, U. A. & LERCH, K. (1985). Isolation and structural organization of the *Neurospora crassa* copper metallothionein gene. *EMBO J.* 4 (10): 2665-2668.
- MÜNGER, K., GERMANN, U. A. & LERCH, K. (1987). The *Neurospora crassa* metallothionein gene. Regulation of expression and chromosomal location. *J. Biol. Chem.* 262 (15): 7363-7367.
- MÜNGER, K. & LERCH, K. (1985). Copper metallothionein from the fungus *Agaricus bisporus*: Chemical and spectroscopic properties. *Biochemistry* 24 (24): 6751-6756.
- MURASUGI, A. (2008). Cadystin (phytochelatin) synthesis induced by cadmium and resulted formation of cadmium sulphide nanoparticles in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Topics in Biotechnology* 4: 65-73.
- NARULA, S. S., BROUWER, M., HUA, Y. X. & ARMITAGE, I. M. (1995). Three-dimensional solution structure of *Callinectes sapidus* metallothionein-1 determined by homonuclear and heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 34 (2): 620-631.

- NATHAN, P. (2007). Physiologische und molekularbiologische Untersuchungen zur Regulation des Schwefelmetabolismus unter Schwermetallstress in *Heliscus lugdunensis*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- NAZARETH, S. & MARBANIANG, T. (2008). Effect of heavy metals on cultural and morphological growth characteristics of halotolerant *Penicillium* morphotypes. *J. Basic Microbiol.* 48 (5): 363-369.
- NESTERENKO, M. V., TILLEY, M. & UPTON, S. J. (1994). A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys. Methods* 28 (3): 239-242.
- NGU, T. T. & STILLMAN, M. J. (2009a). Metalation of metallothioneins. *IUBMB Life* 61 (4): 438-446.
- NGU, T. T. & STILLMAN, M. J. (2009b). Metal-binding mechanisms in metallothioneins. *Dalton Trans* (28): 5425-5433.
- NGU, T. T., STURZENBAUM, S. R. & STILLMAN, M. J. (2006). Cadmium binding studies to the earthworm *Lumbricus rubellus* metallothionein by electrospray mass spectrometry and circular dichroism spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351 (1): 229-233.
- NYBERG, N. T., BAUMANN, H. & KENNE, L. (2003). Solid-phase extraction NMR studies of chromatographic fractions of saponins from *Quillaja saponaria*. *Anal. Chem.* 75 (2): 268-274.
- OSZ, K. (2008). A new, model-free calculation method to determine the coordination modes and distribution of copper(II) among the metal binding sites of multihistidine peptides using circular dichroism spectroscopy. *J. Inorg. Biochem.* 102 (12): 2184-2195.
- PARK, H., SONG, B. & MOREL, F. M. M. (2007). Diversity of the cadmium-containing carbonic anhydrase in marine diatoms and natural waters. *Environmental Microbiology* 2 (9): 403-413.
- PEARSON, R. G. (1963). Hard and soft acids and bases. *J. Am. Chem. Soc.* 85 (22): 3533-3536.
- PENNINCKX, M. J. (2002). An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res.* 2 (3): 295-305.
- PEROZA, E. A. & FREISINGER, E. (2007). Metal ion binding properties of *Triticum aestivum* E_c-1 metallothionein: evidence supporting two separate metal thiolate clusters. *J. Biol. Inorg. Chem.* 12 (3): 377-391.
- PEROZA, E. A., SCHMUCKI, R., GUNTERT, P., FREISINGER, E. & ZERBE, O. (2009). The beta(E)-domain of wheat E(c)-1 metallothionein: a metal-binding domain with a distinctive structure. *J. Mol. Biol.* 387 (1): 207-218.
- PICKERING, I. J., GEORGE, G. N., DAMERON, C. T., KURTZ, B., WINGE, D. R. & DANCE, I. G. (1993). X-ray absorption spectroscopy of cuprous-thiolate multinuclear clusters in proteins and model systems. *J. Am. Chem. Soc.* 115 (21): 9498-9505.

- POCSI, I., PRADE, R. A. & PENNINGCKX, M. J. (2004). Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 49: 1-76.
- PONDER, J. W. & CASE, D. A. (2003). Force fields for protein simulations. *Adv Protein Chem* 66: 27-85.
- QU, X., SWANSON, R., DAY, R. & TSAI, J. (2009). A guide to template based structure prediction. *Curr Protein Pept Sci* 10 (3): 270-285.
- RASPANTI, E., CACCIOLA, S. O., GOTOR, C., ROMERO, L. C. & GARCIA, I. (2009). Implications of cysteine metabolism in the heavy metal response in *Trichoderma harzianum* and in three *Fusarium* species. *Chemosphere* 76 (1): 48-54.
- RAUSER, W. E. (2000). The role of thiols in plants under metal stress. In: *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants* (Brunold, C., Hrsg.). Paul Haupt, Bern, Switzerland, S. 169-183.
- RENZ-KREIKEBOHM, C., STROMBURG, B. & ENGELHARDT, U. (1991). Di(hexahydropyridazido)thiophosphorsäure-O-phenylester als zweizähniger *S,N*-Ligand in einem dimeren Cadmium(II)-Komplex. *Acta Cryst C* 47: 1403-1406.
- RICHTER, S., LINDENSTRAUSS, U., LÜCKE, C., BAYLISS, R. & BRÜSER, T. (2007). Functional Tat transport of unstructured, small, hydrophilic proteins. *J. Biol. Chem.* 282 (46): 33257-33264.
- ROBBINS, A. H., MCREE, D. E., WILLIAMSON, M., COLLETT, S. A., XUONG, N. H., FUREY, W. F., WANG, B. C. & STOUT, C. D. (1991). Refined crystal structure of Cd, Zn metallothionein at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 221 (4): 1269-1293.
- ROEPSTORFF, P. & FOHLMAN, J. (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass-spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* 11 (11): 601-601.
- ROSS, G. (1995). Applications of the HP^{3D}Capillary Electrophoresis System Vol. 2. Hewlett-Packard Company, Waldbronn.
- ROTHER, M. (2002). Zur Bildung schwermetallbindender Proteine in *Heliscus lugdunensis* Saccardo et Therry unter Cadmium-Streß. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- ROTHER, M., KRAUSS, G. J., GRASS, G. & WESENBERG, D. (2006). Sulphate assimilation under Cd stress in *Physcomitrella patens* - Combined transcript, enzyme and metabolite profiling. *Plant Cell Environ.* 29 (9): 1801-1811.
- SAIER, M. H., JR. (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 64 (2): 354-411.
- SAITO, K. (2000). Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3 (3): 188-195.
- SALI, A. & BLUNDELL, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234 (3): 779-815.

- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2nd edition. NY Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), Cold Spring Harbor, NY.
- SANCHEZ, R. & SALI, A. (2000). Comparative protein structure modeling. Introduction and practical examples with MODELLER. *Methods Mol Biol* 143: 97-129.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. (1977). DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (12): 5463-5467.
- SCHÄGGER, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat Methods* 1 (1): 16-22.
- SCHÄGGER, H. & VON JAGOW, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166 (2): 368-379.
- SCHLOSSER, D., SOLÉ, M., WESENBERG, D., GEYER, R. & KRAUSS, G. (2008). Fungal responses to organic pollutants. In: *Novel techniques and ideas in mycology* (Sridhar, K., Bärlocher, F. & Hyde, K., Hrsg.). Fungal Diversity Press, Hongkong, in press.
- SCHLOTTERBECK, G., ROSS, A., HOCHSTRASSER, R., SENN, H., KUHN, T., MAREK, D. & SCHEFF, O. (2002). High-resolution capillary tube NMR. A miniaturized 5-microL high-sensitivity TXI probe for mass-limited samples, off-line LC NMR, and HT NMR. *Anal. Chem.* 74 (17): 4464-4471.
- SCHULTZE, P., WÖRGOTTER, E., BRAUN, W., WAGNER, G., VASAK, M., KÄGI, J. H. R. & WÜTHRICH, K. (1988). Conformation of [Cd₇]-metallothionein-2 from rat-liver in aqueous-solution determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 203 (1): 251-268.
- SEGER, C. & STURM, S. (2007). HPLC–SPE–NMR — A Novel Hyphenation Technique. *LCGC Europe* 20 (0): 587.
- SIPPL, M. J. (1993). Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins* 17 (4): 355-362.
- SMITH, F. W., HAWKESFORD, M. J., PROSSER, I. M. & CLARKSON, D. T. (1995). Isolation of a cDNA from *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a high affinity sulphate transporter at the plasma membrane. *Mol. Gen. Genet.* 247 (6): 709-715.
- STEINBERG, G. (2007). Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkörper. *Eukaryot Cell* 6 (3): 351-360.
- STEPHEN, D. W. S. & JAMIESON, D. J. (1997). Amino acid-dependent regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* GSH1 gene by hydrogen peroxide. *Mol. Microbiol.* 23 (2): 203-210.
- STILLMAN, M. J., PRESTA, A., GUI, Z. & JIANG, D. T. (1994). Spectroscopic studies of copper, silver and gold-metallothioneins. *Met Based Drugs* 1 (5-6): 375-394.

- STILLMAN, M. J., THOMAS, D., TREVITHICK, C., GUO, X. & SIU, M. (2000). Circular dichroism, kinetic and mass spectrometric studies of copper(I) and mercury(II) binding to metallothionein. *J. Inorg. Biochem.* 79 (1-4): 11-19.
- STILLMAN, M. J. & ZELAZOWSKI, A. J. (1988). Domain specificity in metal binding to metallothionein. A circular dichroism and magnetic circular dichroism study of cadmium and zinc binding at temperature extremes. *J. Biol. Chem.* 263 (13): 6128-6133.
- STURM, S., SEGER, C., GODEJOHANN, M., SPRAUL, M. & STUPPNER, H. (2007). Conventional sample enrichment strategies combined with high-performance liquid chromatography-solid phase extraction-nuclear magnetic resonance analysis allows analyte identification from a single minuscule *Corydalis solida* plant tuber. *J. Chromatogr. A* 1163 (1-2): 138-144.
- TAKAHASHI, M., MIZUGUCHI, M., SHINODA, H., AIZAWA, T., DEMURA, M., OKAZAWA, H. & KAWANO, K. (2009). Polyglutamine tract binding protein-1 is an intrinsically unstructured protein. *Biochim Biophys Acta* 1794 (6): 936-943.
- TATSIS, E. C., BOEREN, S., EXARCHOU, V., TROGANIS, A. N., VERVOORT, J. & GEROTHANASSIS, I. P. (2007). Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry* 68 (3): 383-393.
- THIELE, D. J. (1988). ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. *Molecular and Cellular Biology* 8 (7): 2745-2752.
- THORVALDSEN, J. L., SEWELL, A. K., MCCOWEN, C. L. & WINGE, D. R. (1993). Regulation of metallothionein genes by the ACE1 and AMT1 transcription factors. *J. Biol. Chem.* 268 (17): 12512-12518.
- TRÜPER, H. G. & SCHLEGEL, H. G. (1964). Sulphur metabolism in Thiorhodaceae I. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii*. *Antonie van Leeuwenhoek* 30: 225-238.
- UBIYVOVK, V. M., BLAZHENKO, O. V., GIGOT, D., PENNINGKX, M. & SIBIRNY, A. A. (2006). Role of γ -glutamyltranspeptidase in detoxification of xenobiotics in the yeasts *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol. Int.* 30 (8): 665-671.
- VÁŠÁK, M. (2007). Advances in metallothionein structure and functions. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19 (1): 13-17.
- VILLARREAL, L., TIO, L., CAPDEVILA, M. & ATRIAN, S. (2006). Comparative metal binding and genomic analysis of the avian (chicken) and mammalian metallothionein. *Febs Journal* 273 (3): 523-535.
- WALKER, K. W. & BRADSHAW, R. A. (1999). Yeast methionine aminopeptidase I: Alteration of substrate specificity by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 274 (19): 13403-13409.
- WEBB, A. G. (2005). Nuclear magnetic resonance coupled microseparations. *Magn Reson Chem* 43 (9): 688-696.

- WEBSTER, J. (1981). Biology and ecology of aquatic hyphomycetes. In: The Fungal Community (Wicklow, D. T. & Carrol, G. C., Hrsg.). Marcel Dekker, New York, S. 681-691.
- WEBSTER, J. & WEBER, R. W. S. (2007). Introduction to Fungi, Third Edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- WRIGHT, G. D., ARLT, J., POON, W. C. & READ, N. D. (2007). Optical tweezer micromanipulation of filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* 44 (1): 1-13.
- WRIGHT, P. E. & DYSON, H. J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J. Mol. Biol.* 293 (2): 321-331.
- WU, J. S., SUNG, H. Y. & JUANG, R. H. (1995). Transformation of cadmium-binding complexes during cadmium sequestration in fission yeast. *Biochem Mol Biol Int* 36 (6): 1169-1175.
- WÜNSCHMANN, J., BECK, A., MEYER, L., LETZEL, T., GRILL, E. & LENDZIAN, K. J. (2007). Phytochelatins are synthesized by two vacuolar serine carboxypeptidases in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 581 (8): 1681-1687.
- YALOVEGA, G., SMOLENTSEV, G., SOLDATOV, A., CHAN, J. & STILLMAN, M. (2007). Cd-metallothionein: Analysis of local atomic structure. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment - Proceedings of the XVI International Synchrotron Radiation Conference - SR 2006 575* (1-2): 162-164.
- YANG, J. T., WU, C. S. & MARTINEZ, H. M. (1986). Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods Enzymol.* 130: 208-269.
- YOU, C., MACKAY, E. A., GEHRIG, P. M., HUNZIKER, P. E. & KÄGI, J. H. (1999). Purification and characterization of recombinant *Caenorhabditis elegans* metallothionein. *Arch. Biochem. Biophys.* 372 (1): 44-52.
- ZHANG, J. & SHU, W.-S. (2006). Mechanisms of heavy metal cadmium tolerance in plants. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* 32 (1): 1-8.

8. Anhang

8.1. Bestimmung der Trockenmassen

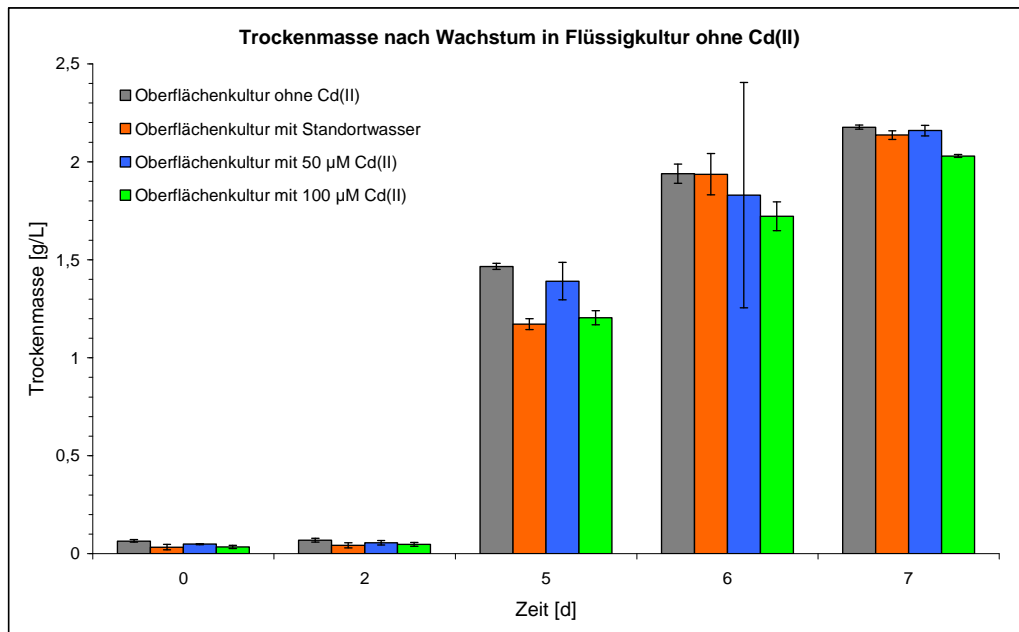


Abb. 8-1: Bestimmung der Trockenmasse von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur ohne Zugabe von Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), mit Standortwasser, 50 und 100 µM Cd(II).

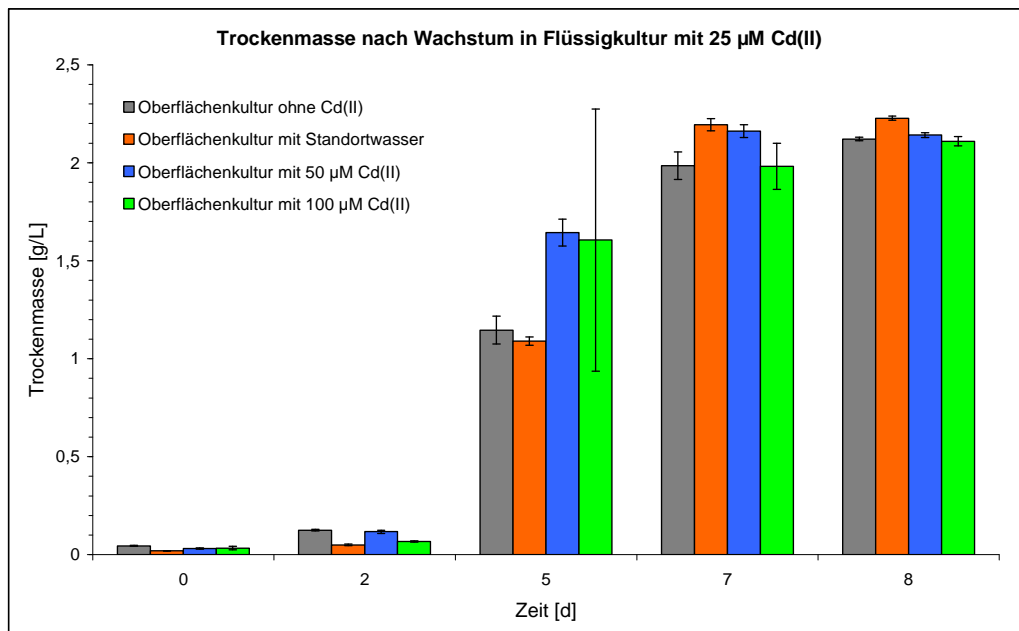


Abb. 8-2: Bestimmung der Trockenmasse von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur nach Zugabe von 25 µM Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), mit Standortwasser, 50 und 100 µM Cd(II).

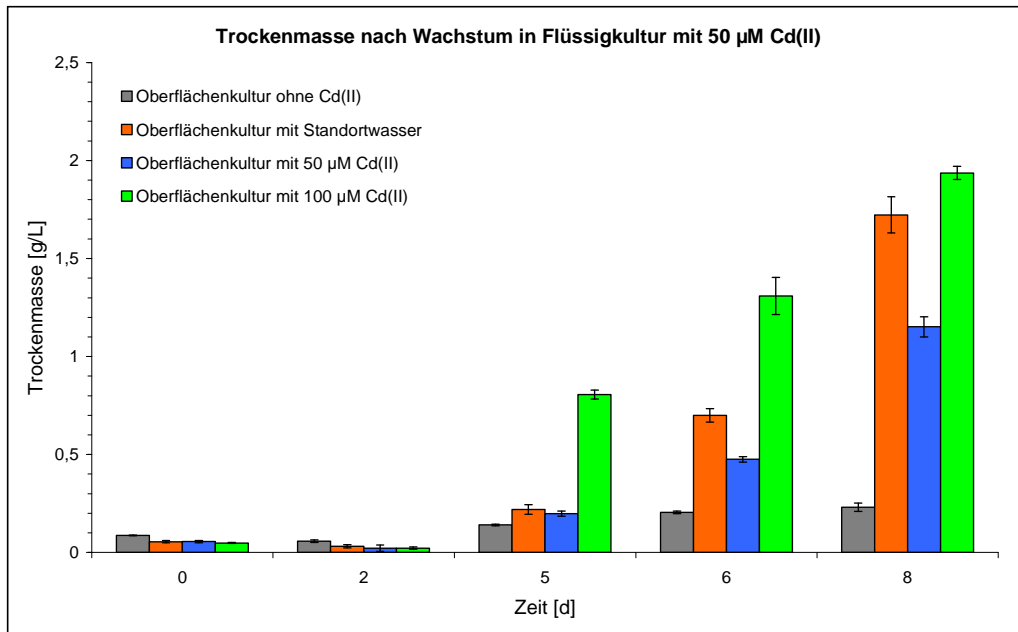


Abb. 8-3: Bestimmung der Trockenmasse von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur nach Zugabe von 50 μM Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), mit Standortwasser, 50 und 100 μM Cd(II).

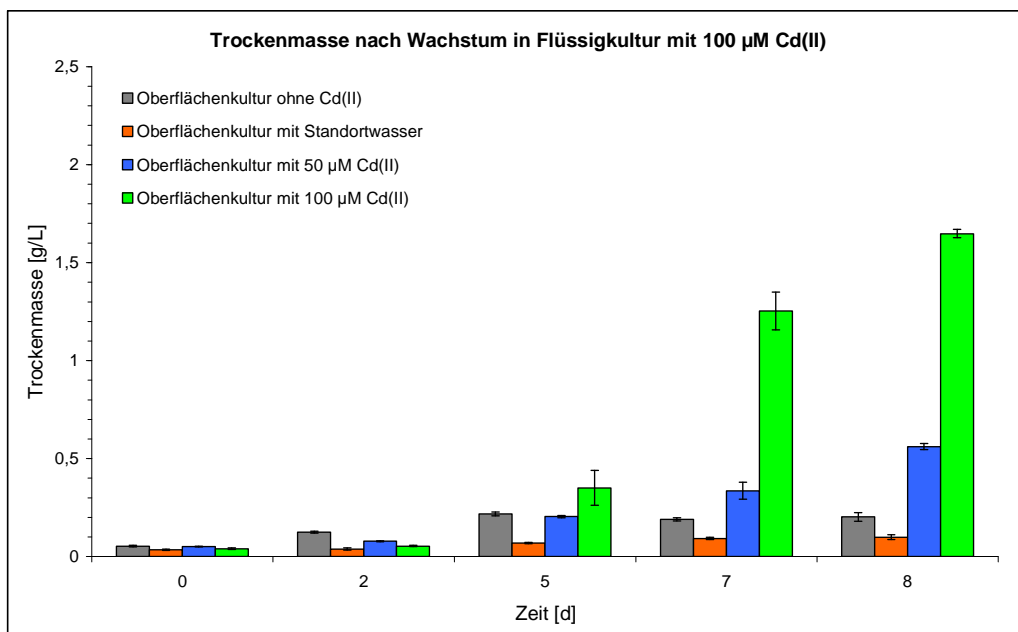


Abb. 8-4: Bestimmung der Trockenmasse von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur nach Zugabe von 25 μM Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), mit Standortwasser, 50 und 100 μM Cd(II).

Tab. 8-1: Bestimmung der Trockenmasse von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur ohne Zugabe von Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), mit Standortwasser, 50 und 100 µM Cd(II)

Flüssigkultur ohne Cd(II)	Oberflächenkultur ohne Cd(II)		Oberflächenkultur mit Standortwasser		Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II)		Oberflächenkultur mit 100 µM Cd(II)	
Tag	MW [g/L]	STABW	MW [g/L]	STABW	MW [g/L]	STABW	MW [g/L]	STABW
0	0,0653	0,0063	0,0341	0,0144	0,0493	0,0022	0,0345	0,0079
2	0,0689	0,0086	0,0429	0,0128	0,0564	0,0122	0,0480	0,0095
5	1,4688	0,0150	1,1720	0,0276	1,3911	0,0855	1,2038	0,0361
6	1,9392	0,0489	1,9368	0,1048	1,8297	0,5748	1,7220	0,0738
7	2,1772	0,0111	2,1359	0,0223	2,1592	0,0265	2,0297	0,0071

Tab. 8-2: Bestimmung der Trockenmasse von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur nach Zugabe von 25 µM Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), mit Standortwasser, 50 und 100 µM Cd(II)

Flüssigkultur mit 25 µM Cd(II)	Oberflächenkultur ohne Cd(II)		Oberflächenkultur mit Standortwasser		Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II)		Oberflächenkultur mit 100 µM Cd(II)	
Tag	MW [g/L]	STABW	MW [g/L]	STABW	MW [g/L]	STABW	MW [g/L]	STABW
0	0,0452	0,0027	0,0200	0,0007	0,0320	0,0035	0,0340	0,0081
2	0,1255	0,0038	0,0501	0,0044	0,1177	0,0082	0,0894	0,0030
5	1,1459	0,0712	1,0895	0,0214	1,6433	0,0692	1,6056	0,6687
7	1,9841	0,0702	2,1944	0,0313	2,1616	0,0321	1,9820	0,1179
8	2,1207	0,0092	2,2273	0,0101	2,1413	0,0119	2,1093	0,0237

Tab. 8-3: Bestimmung der Trockenmasse von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur nach Zugabe von 50 µM Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), mit Standortwasser, 50 und 100 µM Cd(II)

Flüssigkultur mit 50 µM Cd(II)	Oberflächenkultur ohne Cd(II)		Oberflächenkultur mit Standortwasser		Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II)		Oberflächenkultur mit 100 µM Cd(II)	
Tag	MW [g/L]	STABW	MW [g/L]	STABW	MW [g/L]	STABW	MW [g/L]	STABW
0	0,0871	0,0017	0,0549	0,0057	0,0557	0,0059	0,0484	0,0028
2	0,0580	0,0069	0,0323	0,0087	0,0215	0,0167	0,0224	0,0056
5	0,1403	0,0040	0,2197	0,0245	0,1983	0,0136	0,8057	0,0236
6	0,2047	0,0069	0,6996	0,0340	0,4753	0,0141	1,3088	0,0950
8	0,2311	0,0208	1,7229	0,0918	1,1517	0,0510	1,9369	0,0337

Tab. 8-4: Bestimmung der Trockenmasse von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur nach Zugabe von 100 µM Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), mit Standortwasser, 50 und 100 µM Cd(II)

Flüssigkultur mit 100 µM Cd(II)	Oberflächenkultur ohne Cd(II)		Oberflächenkultur mit Standortwasser		Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II)		Oberflächenkultur mit 100 µM Cd(II)	
Tag	MW [g/L]	STABW	MW [g/L]	STABW	MW [g/L]	STABW	MW [g/L]	STABW
0	0,0539	0,0040	0,0356	0,0032	0,0515	0,0017	0,0409	0,0045
2	0,1247	0,0041	0,0393	0,0058	0,0791	0,0025	0,0541	0,0030
5	0,2180	0,0099	0,0695	0,0023	0,2043	0,0056	0,3505	0,0892
7	0,1897	0,0080	0,0928	0,0050	0,3360	0,0434	1,2539	0,0964
8	0,2027	0,0219	0,0992	0,0127	0,5613	0,0158	1,6476	0,0211

8.2. Bestimmung der Verhältnisse von Frischmasse zu Trockenmasse

Tab. 8-5: Bestimmung des Verhältnisses von Trockenmasse zu Frischmasse von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur ohne Zugabe von Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), mit Standortwasser, 50 und 100 µM Cd(II)

Flüssigkultur ohne Cd(II)	Oberflächenkultur ohne Cd(II)		Oberflächenkultur mit Standortwasser		Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II)		Oberflächenkultur mit 100 µM Cd(II)	
Tag	MW [FM/TM]	STABW	MW [FM/TM]	STABW	MW [FM/TM]	STABW	MW [FM/TM]	STABW
0	32,2328	3,5102	63,8249	23,6139	46,0826	2,1546	65,8441	9,9311
2	27,4047	4,9740	40,8935	14,0151	33,0768	6,9277	38,9113	5,4209
5	6,2828	0,2079	7,4713	0,2331	6,7056	0,0800	6,7142	0,1422
6	5,4546	0,2285	5,8997	0,1435	5,8259	1,8045	5,7041	0,2800
7	4,9272	0,1894	5,6580	0,0197	5,8109	0,0820	5,2053	0,1315

Tab. 8-6: Bestimmung des Verhältnisses von Trockenmasse zu Frischmasse von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur nach Zugabe von 25 µM Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), mit Standortwasser, 50 und 100 µM Cd(II)

Flüssigkultur mit 25 µM Cd(II)	Oberflächenkultur ohne Cd(II)		Oberflächenkultur mit 25 µM Cd(II)		Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II)		Oberflächenkultur mit 100 µM Cd(II)	
Tag	MW [FM/TM]	STABW	MW [FM/TM]	STABW	MW [FM/TM]	STABW	MW [FM/TM]	STABW
0	44,3522	2,1544	102,4189	3,5069	66,6069	8,3139	65,9847	14,6178
2	20,4641	0,3731	43,6084	7,2929	20,0425	3,1914	32,8430	2,4413
5	6,2413	0,2458	6,4610	0,1542	5,2613	0,1172	5,1325	1,5456
7	4,8037	0,1168	4,9820	0,0462	4,9171	0,0122	4,8417	0,1346
8	5,2252	0,1931	5,6004	0,2856	5,3102	0,2015	5,6119	0,1454

Tab. 8-7: Bestimmung des Verhältnisses von Trockenmasse zu Frischmasse von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur nach Zugabe von 50 µM Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), mit Standortwasser, 50 und 100 µM Cd(II)

Flüssigkultur mit 25 µM Cd(II)	Oberflächenkultur ohne Cd(II)		Oberflächenkultur mit 25 µM Cd(II)		Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II)		Oberflächenkultur mit 100 µM Cd(II)	
Tag	MW [FM/TM]	STABW	MW [FM/TM]	STABW	MW [FM/TM]	STABW	MW [FM/TM]	STABW
0	25,0329	0,9767	37,3738	3,5354	39,2563	5,6389	43,5449	2,6354
2	34,7014	20,2381	55,1533	21,5594	158,9037	153,2901	92,0956	24,9259
5	18,9294	0,4406	14,7947	1,4881	14,7995	0,3653	8,1502	0,5567
6	13,1244	0,1827	7,5762	0,1819	9,1556	0,4931	5,5619	0,1750
8	13,9285	1,3299	5,6790	0,1931	6,3671	0,1248	4,8288	0,0585

Tab. 8-8: Bestimmung des Verhältnisses von Trockenmasse zu Frischmasse von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur nach Zugabe von 100 µM Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), mit Standortwasser, 50 und 100 µM Cd(II)

Flüssigkultur mit 25 µM Cd(II)	Oberflächenkultur ohne Cd(II)		Oberflächenkultur mit 25 µM Cd(II)		Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II)		Oberflächenkultur mit 100 µM Cd(II)	
Tag	MW [FM/TM]	STABW	MW [FM/TM]	STABW	MW [FM/TM]	STABW	MW [FM/TM]	STABW
0	38,5146	2,5929	63,6855	7,6776	43,6642	2,7817	53,5048	7,1333
2	19,5062	0,4286	48,4747	7,4312	28,0388	1,7907	45,2539	5,6984
5	11,8612	0,3489	23,7844	2,1695	12,5605	0,9458	11,9778	3,5622
7	14,1178	1,0061	27,3257	3,0102	10,8426	0,9343	5,8880	0,2405
8	14,2646	2,3455	25,1913	0,5688	8,7517	0,2160	5,6374	0,1122

8.3. Bestimmung des Sulfid- und des Sulfatgehaltes

Tab. 8-9: Bestimmung des intrazellulären Gehaltes an Sulfid von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur nach Zugabe von 0, 25, 50 und 100 µM Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II) und mit 50 µM Cd(II) am Tag 5

Sulfid-Gehalt	Oberflächenkultur ohne Cd(II)		Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II)	
Cd(II) in Flüssigkultur	MW [µmol/g TM]	STABW	MW [µmol/g TM]	STABW
0 µM Cd(II)	0,607783	0,254849	0,829703	0,327177
25 µM Cd(II)	2,779702	0,376446	1,217547	0,333845
50 µM Cd(II)	27,229015	4,349928	11,977943	4,200983
100 µM Cd(II)	16,198410	1,756563	13,962827	4,452061

Tab. 8-10: Bestimmung des intrazellulären Gehaltes an Sulfat von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur nach Zugabe von 0, 25, 50 und 100 µM Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II) und mit 50 µM Cd(II) am Tag 5

Sulfat-Gehalt intrazellulär	Oberflächenkultur ohne Cd(II)		Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II)	
Cd(II) in Flüssigkultur	MW [µmol/g TM]	STABW	MW [µmol/g TM]	STABW
0 µM Cd(II)	19,006163	2,465177	22,534810	9,220617
25 µM Cd(II)	68,162113	18,547871	30,444103	18,307031
50 µM Cd(II)	318,491114	64,752473	188,205803	71,058408
100 µM Cd(II)	66,732011	12,300584	163,345220	108,902187

Tab. 8-11: Bestimmung des extrazellulären Gehaltes an Sulfat von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur am Tag 0 und am Tag 5 nach Zugabe von 0, 25, 50 und 100 µM Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II) und mit 50 µM Cd(II)

Sulfat-Gehalt extrazellulär	Oberflächenkultur ohne Cd(II)		Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II)	
Cd(II) in Flüssigkultur	MW [µmol/g TM]	STABW	MW [µmol/g TM]	STABW
Tag 0 - 0 µM Cd(II)	270,061587	56,040825	268,135242	34,375451
Tag 0 - 0 µM Cd(II) angeimpft	301,676472	16,881988	271,971687	29,453643
Tag 5 - 0 µM Cd(II)	175,469789	15,763916	161,972633	42,900478
Tag 5 - 25 µM Cd(II)	123,784635	10,513519	152,358319	49,206556
Tag 5 - 50 µM Cd(II)	170,580080	42,511827	151,711327	59,309981
Tag 5 - 100 µM Cd(II)	243,400576	26,090770	216,614783	24,312278

8.4. Bestimmung der Vitalität

Tab. 8-12: Bestimmung der Vitalität von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur nach Zugabe von 0, 25, 50 und 100 µM Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), mit Standortwasser, 50 und 100 µM Cd(II) am Tag 5

Vitalität des Pilzes	Oberflächenkultur ohne Cd(II)		Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II)		
Cd(II) in Flüssigkultur	MW [$\Delta F/\text{min} \cdot \mu\text{g Protein}$]		STABW	MW [$\Delta F/\text{min} \cdot \mu\text{g Protein}$]	STABW
0 µM Cd(II)	5,908949		3,556317	6,067660	2,550075
25 µM Cd(II)	4,695335		3,083385	5,310982	3,370410
50 µM Cd(II)	3,163081		1,222568	4,601055	1,223300
100 µM Cd(II)	2,961909		0,903673	3,186803	1,012087

8.5. Bestimmung der Thiolgehalte

Tab. 8-13: Intrazellulärer Gehalt an Cystein von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur nach Zugabe von 0, 25, 50 und 100 µM Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), mit Standortwasser, 50 und 100 µM Cd(II) am Tag 5

Cd(II) in Flüssigkultur	0 µM Cd(II)		25 µM Cd(II)		50 µM Cd(II)		100 µM Cd(II)	
Cys	µmol/g TM	STABW	µmol/g TM	STABW	µmol/g TM	STABW	µmol/g TM	STABW
Oberflächenkultur ohne Cd(II)	0,124384	0,043145	1,337276	0,790027	3,618914	1,394428	3,994477	0,853755
Oberflächenkultur mit Standortwasser	0,161592	0,020697	0,260409	0,113614	0,683886	0,150716	4,873058	2,636543
Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II)	0,345177	0,082352	0,918348	0,477588	5,067993	5,138335	2,352885	2,129570
Oberflächenkultur mit 100 µM Cd(II)	0,208701	0,087630	0,429861	0,130153	1,319873	0,730583	5,641642	2,581726

Tab. 8-14: Intrazellulärer Gehalt an Cysteinylglycin (Cys-Gly) von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur nach Zugabe von 0, 25, 50 und 100 µM Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), mit Standortwasser, 50 und 100 µM Cd(II) am Tag 5

Cd(II) in Flüssigkultur	0 µM Cd(II)		25 µM Cd(II)		50 µM Cd(II)		100 µM Cd(II)	
Cys-Gly	µmol/g TM	STABW	µmol/g TM	STABW	µmol/g TM	STABW	µmol/g TM	STABW
Oberflächenkultur ohne Cd(II)	0,033376	0,029394	0,444371	0,322004	0,732548	0,375438	4,491770	1,299166
Oberflächenkultur mit Standortwasser	0,010953	0,003367	0,031642	0,021332	0,096603	0,012925	0,904589	0,402752
Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II)	0,030835	0,007357	0,070167	0,050523	0,836971	0,648825	1,897837	2,653403
Oberflächenkultur mit 100 µM Cd(II)	0,023090	0,007183	0,045087	0,019086	0,157869	0,060529	4,408413	2,750360

Tab. 8-15: Intrazellulärer Gehalt an γ -Glutamylcystein (γ -EC) von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur nach Zugabe von 0, 25, 50 und 100 µM Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), mit Standortwasser, 50 und 100 µM Cd(II) am Tag 5

Cd(II) in Flüssigkultur	0 µM Cd(II)		25 µM Cd(II)		50 µM Cd(II)		100 µM Cd(II)	
γ -EC	µmol/g TM	STABW	µmol/g TM	STABW	µmol/g TM	STABW	µmol/g TM	STABW
Oberflächenkultur ohne Cd(II)	0,062928	0,026326	5,723274	4,379983	17,864928	7,369416	37,579069	7,610451
Oberflächenkultur mit Standortwasser	0,173456	0,017282	0,394922	0,128040	1,602162	0,175460	24,298947	10,653802
Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II)	0,127694	0,029348	1,122147	0,748811	15,890789	16,161635	13,514444	11,233433
Oberflächenkultur mit 100 µM Cd(II)	0,174161	0,176290	0,953186	0,386226	6,160783	3,614044	33,586264	5,727648

Tab. 8-16: Intrazellulärer Gehalt an Glutathion (Gesamt-GSH) von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur nach Zugabe von 0, 25, 50 und 100 µM Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), mit Standortwasser, 50 und 100 µM Cd(II) am Tag 5

Cd(II) in Flüssigkultur	0 µM Cd(II)		25 µM Cd(II)		50 µM Cd(II)		100 µM Cd(II)	
GSH	µmol/g TM	STABW	µmol/g TM	STABW	µmol/g TM	STABW	µmol/g TM	STABW
Oberflächenkultur ohne Cd(II)	9,945546	1,984255	35,208084	18,814050	52,943000	20,798672	67,444489	9,650879
Oberflächenkultur mit Standortwasser	9,814656	1,029689	14,528547	5,125644	25,096403	3,226188	58,517460	27,915383
Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II)	11,379671	1,857894	21,965428	10,798253	58,689152	52,241475	22,203353	18,884220
Oberflächenkultur mit 100 µM Cd(II)	10,588403	2,983801	15,062755	4,890139	22,316377	11,504744	55,443774	10,705572

Tab. 8-17: Intrazellulärer Gehalt an oxidiertem Glutathion (GSSG) von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur nach Zugabe von 0, 25, 50 und 100 µM Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), mit Standortwasser, 50 und 100 µM Cd(II) am Tag 5

Cd(II) in Flüssigkultur	0 µM Cd(II)		25 µM Cd(II)		50 µM Cd(II)		100 µM Cd(II)	
	µmol/g TM	STABW	µmol/g TM	STABW	µmol/g TM	STABW	µmol/g TM	STABW
GSSG								
Oberflächenkultur ohne Cd(II)	0,180714	0,053284	0,322694	0,132887	1,095035	0,520161	1,599191	0,395379
Oberflächenkultur mit Standortwasser	0,234026	0,017618	0,169958	0,023013	0,580819	0,204889	1,044864	0,419887
Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II)	0,154181	0,035081	0,120143	0,034734	0,824780	0,644209	1,104782	0,282224
Oberflächenkultur mit 100 µM Cd(II)	0,325058	0,315908	0,245799	0,270675	0,379647	0,232226	1,226831	0,558404

8.6. Bestimmung des Gehaltes an Phytochelatin 2

Tab. 8-18: Intrazellulärer Gehalt an Phytochelatin 2 (PC2) von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur nach Zugabe von 0, 25, 50 und 100 µM Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), mit Standortwasser, 50 und 100 µM Cd(II) am Tag 5

Cd(II) in Flüssigkultur	K		25 µM Cd(II)		50 µM Cd(II)		100 µM Cd(II)	
	nmol/g TM	STABW	nmol/g TM	STABW	nmol/g TM	STABW	nmol/g TM	STABW
PC2 (GSH-Aquivalente)								
Oberflächenkultur ohne Cd(II)	1,2830	2,0420	29,0157	17,0229	412,7379	147,0363	416,3032	72,3286
Oberflächenkultur mit Standortwasser	7,5303	6,2645	11,1302	6,6113	300,3187	131,2698	1125,2706	868,3776
Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II)	4,8664	1,2279	22,4603	4,1471	497,8444	210,3426	597,2256	133,0335
Oberflächenkultur mit 100 µM Cd(II)	4,8448	2,7010	15,6952	13,7627	166,3726	122,9508	639,9972	64,2589

8.7. Bestimmung des Gehaltes an Metallothioneinen

Tab. 8-19: Intrazellulärer Gehalt an MT2_NECLU von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur nach Zugabe von 0, 25, 50 und 100 µM Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), mit Standortwasser, 50 und 100 µM Cd(II) am Tag 5

Cd(II) in Flüssigkultur	K		25 µM Cd(II)		50 µM Cd(II)		100 µM Cd(II)	
	nmol/g TM	STABW	nmol/g TM	STABW	nmol/g TM	STABW	nmol/g TM	STABW
MT2_NECLU								
Oberflächenkultur ohne Cd(II)	10,2817	9,5601	29,8514	9,3766	164,3999	75,2013	53,2837	27,0398
Oberflächenkultur mit Standortwasser	12,0630	13,1520	15,9936	21,4017	57,5431	17,6037	111,8508	96,9479
Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II)	13,5763	9,9964	12,6071	7,6643	85,7657	62,1295	41,6923	14,3224
Oberflächenkultur mit 100 µM Cd(II)	15,0206	9,6967	12,7085	2,3869	38,8352	11,7317	80,9211	24,1562

Tab. 8-20: Intrazellulärer Gehalt an Met-MT2_NECLU von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der Flüssigkultur nach Zugabe von 0, 25, 50 und 100 µM Cd(II) und nach Vorkultur auf Oberflächenkultur ohne Cd(II), mit Standortwasser, 50 und 100 µM Cd(II) am Tag 5

Cd(II) in Flüssigkultur	K		25 µM Cd(II)		50 µM Cd(II)		100 µM Cd(II)	
	nmol/g TM	STABW	nmol/g TM	STABW	nmol/g TM	STABW	nmol/g TM	STABW
Met-MT2_NECLU								
Oberflächenkultur ohne Cd(II)	4,0513	4,7251	19,4057	26,4571	59,9470	64,8036	17,6452	30,4519
Oberflächenkultur mit Standortwasser	11,8780	20,5733	19,1897	32,3367	23,7066	19,9210	26,9050	46,6009
Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II)	2,1954	5,3777	4,5357	7,1394	31,3839	19,5967	1,1238	2,5130
Oberflächenkultur mit 100 µM Cd(II)	5,2242	3,3008	3,5096	1,4028	13,8901	9,0022	21,0516	16,7048

8.8. Fraktionierung eines Pilzextraktes für massenspektrometrische Untersuchungen

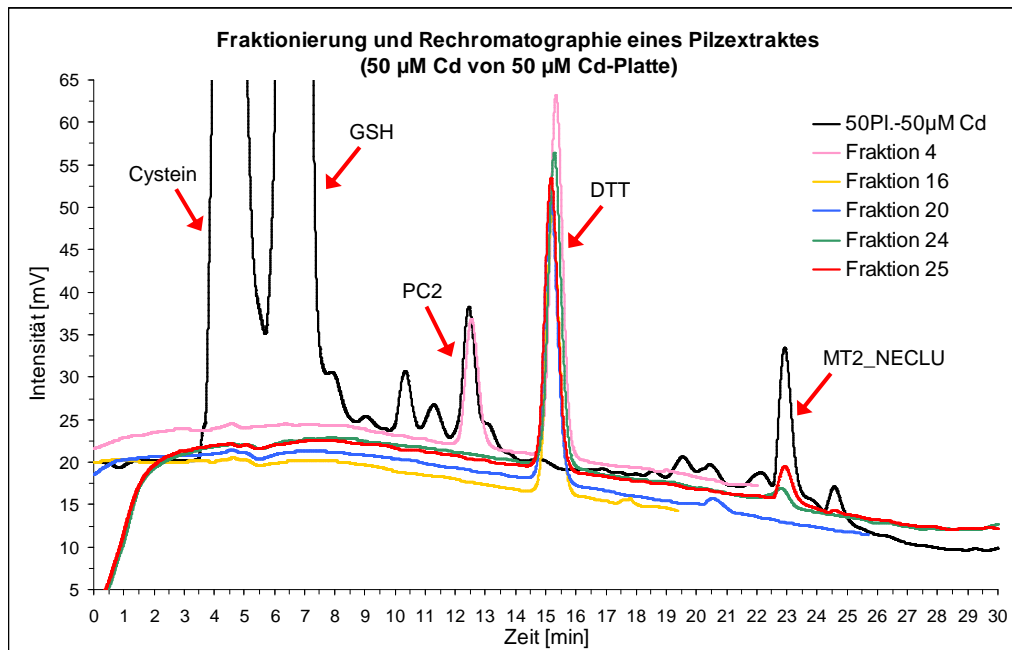


Abb. 8-5: Fraktionierung und Rechromatographie eines Extraktes von *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 nach Oberflächenkultur mit 50 µM Cd(II) und Wachstum mit 50 µM Cd(II) in der Flüssigkultur; Fraktion Nr. 25 wurde massenspektrometrisch untersucht (s. 3.2.6.).

Tab. 8-21: Zuordnung der Fragmente des HPLC-Peaks mit m/z 2343,8 $[M+H]^+$ (MT2_NECLU) zu den a-, b- und y-Fragmenten

Nr.	b	a	Sequenz	y	y-H ₂ O	y-NH ₃	Nr.
1			S				24
2	201,08		P	2256,76			23
3	288,11	260,07	C				22
4	389,15	361,15	T				21
5	492,16		C	1955,61		1938,60	20
6	579,19	551,20	S	1852,60	1834,55		19
7	696,23	652,25	T	1765,54			18
8	783,25	782,27	C	1664,50	1646,50		17
9	897,31		N	1561,52			16
10	1000,31		C	1447,49	1429,49	1430,52	15
11	1071,36		A	1344,45	1326,47		14
12	1128,32	1084,36	G	1273,42	1255,42	1256,34	13
13	1215,47		A	1216,40	1198,51	1199,42	12
14	1302,43		C	1145,35		1128,32	11
15	1430,52		N	1042,35	1024,32	1025,40	10
16			T	928,30	910,30	911,27	9
17	1620,54		C	827,27	809,24		8
18			S	724,24	706,22		7
19			C	637,21			6
20	1911,57		T	534,19	516,16		5
21			S	433,14	415,15		4
22			C	346,12	328,11		3
23			S	243,11			2
24			H	156,08			1

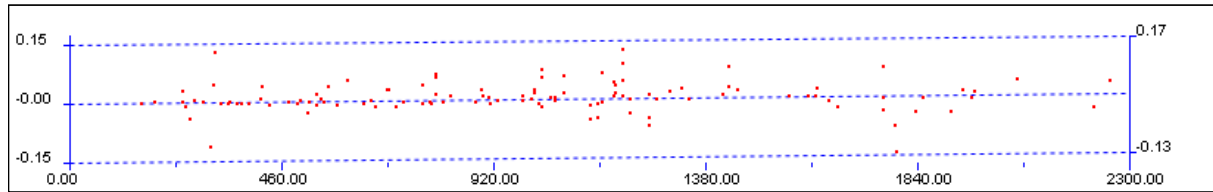


Abb. 8-6: Tolerierbare Abweichungen der Peptid- und Fragmentmassenfehler des MT2_NECLU ($< \pm 0,15$ Da) von der theoretisch bestimmten Zerfallsmasse ($\pm 0,15$ bis $\pm 0,2$ Da).

8.9. Gen- und Proteinsequenz-alignment

Gensequenz-alignment

Die erhaltene DNA-Sequenz des Serin-Hydrolase-ähnlichen Gens aus *H. lugdunensis* ist nur 550 bp lang, für die *alignments* wurde die revers komplementäre Sequenz verwendet.

```

H. lugdunensis -----ACFTTACCATTGTC 14
A. flavus      CGCACCGATATCCCTATTAGAGCGTTAAACCTCCATTTTAATGTCAACTTCCCTATTGTT 1560
                ***** * *****

H. lugdunensis AGCCAGGTCAACCCGCACATCAACCTCTTCCTCTTCTCGTCTCGGGGTTGCGGTTGGCCAC 74
A. flavus      TCACAGGTGAACCCCTCATATCAATCTCTTTTCTTCAGCTCTCGAGGATCCGTTGGTCCG 1620
                ***** ** ***** ***** ***** ***** * * * * *

H. lugdunensis CCGGTGACACACCGCAAGGGGCGAGGATGGCGTGGCGGCTATCTCATGTGCGGCTTTTGGAG 134
A. flavus      CCGGTTACACATCGCAGAGGCCGAGGGTGGCGCGGCGGTTTCTTGGGGTCTGTATAGAA 1680
                ***** ***** ** ***** ***** ***** * * * * *

H. lugdunensis AACTACCTCAAGCTAGACATGAATAAATGGCTCAAGTTCATCAGGCACGCGGAGCTGCTT 194
A. flavus      CAGTATATTAAGCTGGATTTGAATAAATGGCTTAGAGTCTGCGACACTTAGAAGTGTTA 1740
                * * * * * ***** * * * * *

H. lugdunensis CCGCGGCGCTTGGGACAAGACTGGAGTCAAGTTCAGTCTGGCTGCAGCAATTCAGCGGCACCATC 254
A. flavus      CCACGACCACTGGGCCAAGATTGGAGCGAGATTGGCTGCAAAAATTCAGTGGGACCATA 1800
                ** * * * * ***** ***** * * * * *

H. lugdunensis ACCATATGGCCCAAATCAATCCCGTCGGACTTTTGGCATATTCTGACGGACCCGGATCCC 314
A. flavus      ACAATCTGGCCAAAACCATCCCGTCCGATTTCTACTATATCCTTTCCGACCCCTACCC 1860
                ** * * ***** * * * * *

H. lugdunensis TCGACGCTAGCCCGCATGATTACAGAGGACGACAGAGCGGTTCCCGAAGCTCAAGTTC 374
A. flavus      GAGCGATTGGCAGCATGCTTAACGTGGGCCAGCAGAGCGCCTTTCCCATGATACAATTC 1920
                * * * * *

H. lugdunensis ATAGCGAACCGGCTCAAGTGGAGCGGCTGGTGGAGCAGGGTCCGGCAGAGT-CGCGGCC 433
A. flavus      ATCAAGAACCGGCTCAAGATCGAGAATCGGATCTTAAAGGGGTACACCAACTACTCCCC 1980
                ** ***** * * * * *

H. lugdunensis ATGGGTGCGCAGAGGAAGTCTCCCCACCATCATGA--GTGACGATGACCTGCGCAGCCTT 491
A. flavus      GCGGTGTCACCGCGCAGTCCCGTCCGAAACGCGGTCATGCCGCAAGCCTTCGGATCCG 2040
                ** * * * * *

H. lugdunensis ATGGTGCATGAGATTGGAAACGAGG-CGACGACAGAGGACGAGACGGAAGGGGAGGA 550
A. flavus      ATGGTAGAACGCTTTGACCATAATCTCCCGATCGTCAAGCCGACAAACAAAGAGGATTA 2100
                ***** ** * * * * *

```

Proteinsequenz-alignment

Die erhaltene DNA-Sequenz des Serin-Hydrolase-ähnlichen Gens aus *H. lugdunensis* ist nur 550 bp lang, für die *alignments* wurde die revers complementäre Sequenz verwendet.

```

H. lugdunensis -----FTIVSQVNPINLFLFSSRGSVGH 24
A. flavus      KR DGT LAP YSFGHKWKDGSLRTDIP I RALNLHFN VNFPIV SQVNPINLFFFSSRGSVGR 540
                * .*****:*****:
H. lugdunensis PVTHRKRGRGWRGGYLMSAFENYLKLD MNKWLKFI RHAELLPRPLGQDWSQLWLQQFSGTI 84
A. flavus      PVTHRRGRGWRGGFLGSAIEQYIKL DLNKWLRVLRHLELLPRPLGQDWS EIW LQKFSGTI 600
                *****:*****:* **:*:*:***:***: .:** *****:*****:***:*****
H. lugdunensis TIWPKSIP SDFWHIL TDPDPSTL ARMIHEGRQSAFPKLF IANRLKLERLVEQGRRESRP 144
A. flavus      TIWPKTIP SDFYI LSDPTPERL ARMLNVGQSAFPMIQFIKNRLKIENAILKGLHQYSP 660
                *****:*****:***:* * . *****: *:*:***** :*** *****:* . : * : : *
H. lugdunensis WVR-----RG-----SLPTIMSDDDL RSLMVDEIGNEATTEDETEGE 182
A. flavus      AVSPAQSR RKRGHAGKPSDPMVERLDHNL PDRQPDNKEDLS DSSGIDSNVSSRDSCLQPS 720
                * ** .** .*: . *.:.:.*. : .
H. lugdunensis -----
A. flavus      SNRRNR RRSTGNIFQEMRRQSAVFFDSDLYAEDDKKVE 759

```

Deutlich zu erkennen sind die relativ hohen Identitäten (70 %) zwischen der in *H. lugdunensis* identifizierten Serin-Hydrolase-ähnlichen Gen- und Proteinsequenz und der putativen Patatin-like Serin-Hydrolase-Gen- und -Proteinsequenz aus dem Acomyceten *Aspergillus flavus* (XM_002374447.1).

8.10. Sekretionsstrategie in *K. lactis* (laut Herstellerangaben, NEB)

Die Sekretionsstrategie wurde in Anlehnung an das Handbuch durchgeführt. Es ist dazu notwendig, die α -MF Sekretionsdomäne, die im Vektor vorhanden ist, zu nutzen, wobei der gleiche *reading frame* für das Gen und die α -MF-Domäne eingehalten werden muß (Abb. 8-7). Weiterhin ist es notwendig, eine Kex-Protease *processing site* (KR) zwischen der α -MF-Domäne und dem N-Terminus des MT1_NECLU einzufügen. Die einzufügende XhoI-Schnittstelle muss dabei *upstream* der Kex-*processing site* liegen. Die Selektion von Transformanten erfolgte über die Möglichkeit zur Spaltung von Acetamid als Stickstoff-Quelle, da nur die mit dem Vektor transformierten Zellen das Gen *amdS* besitzen und somit Acetamid spalten und als Stickstoffquelle nutzen können. Die Induktion der Expression des MT1_NECLU sollte durch das Vorhandensein von Galaktose im Medium erfolgen, da sich im Vektor vor dem Gen *mt1_neclu* ein Galaktose-induzierbarer LAC4-Promotor befindet.

Der verwendete Vektor pKLAC1 wurde in *E. coli* BL21 amplifiziert, isoliert und gereinigt (Abb. 8-8). Zunächst wurde das Gen *mt1_neclu* mittels PCR so amplifiziert, dass es am 5'-Ende eine Restriktionsschnittstelle für das Restriktionsenzym XhoI und am 3'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym NotI enthielt. Dazu wurden je ein *forward*- und ein *reverse*-Primer mit den jeweiligen Schnittstellen versehen und eine PCR-

Reaktion durchgeführt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde dann mit den beiden Enzymen geschnitten und in den ebenfalls mit diesen beiden Enzymen geschnittenen Vektor pKLAC1 ligiert (pKLAC1::*mt1*). Dieser Vektor wurde zunächst in *E. coli* BL21 transformiert, amplifiziert, isoliert und gereinigt. Es erfolgte dann eine Restriktion des Vektors mit dem Restriktionsenzym SacII. Anschließend wurde der linearisierte Vektor pKLAC1::*mt1* in die kompetenten *K. lactis*-Zellen transformiert. Dort sollte dann die Insertion des Vektors mit dem Gen *mt1_neclu* in das Genom von *K. lactis* über homologe Rekombination erfolgen (Abb. 8-9). Nur die Transformanden, die den linearisierten Vektor mit dem Gen *amdS* in ihr Genom integriert hatten, konnten dann auf dem Selektivagar YCB + 5 mM Acetamid (mit Acetamid als alleiniger Stickstoffquelle) wachsen. Diese Transformanden wurden dann in YPGal-Medium 1-4 Tage bei 30 °C angezogen, in diesem sollte durch die Galaktose der LAC4-Promotor angeschaltet und somit das Protein MT1_NECLU exprimiert und sekretiert werden. Zum Nachweis der Expression des MT1_NECLU wurde anschließend das abzentrifugierte Medium einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen.

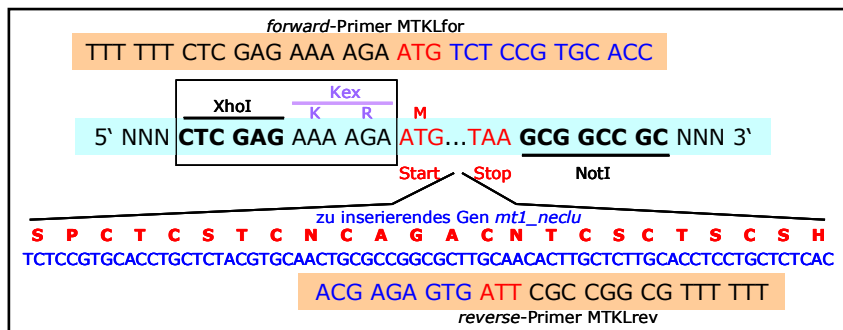


Abb. 8-7: Klonierungsstrategie des Gens *mt1_neclu* in den Vektor pKLAC1 mit Spaltungsstelle für die Kex-Protease.

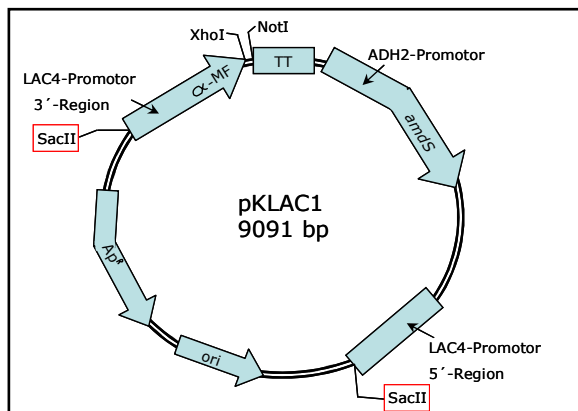


Abb. 8-8: Vektor pKLAC1 für die Proteinexpression in *K. lactis* (NEB).

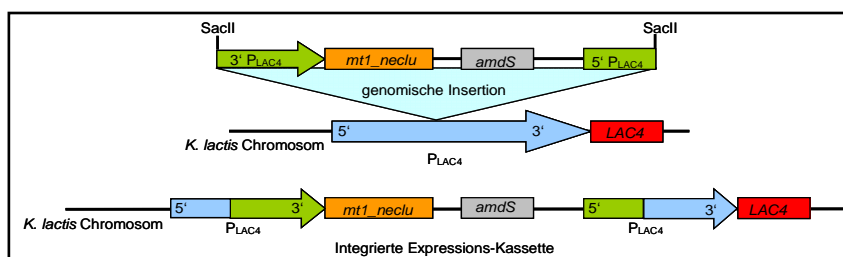


Abb. 8-9: Insertion des mit dem Restriktionsenzym SacII geschnittenen Vektors pKLAC1 in das Genom von *K. lactis* (NEB).

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gerd-Joachim Krauß für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg 416 der DFG als Stipendiatin, Überlassung des interessanten Themas, für seine Diskussionsbereitschaft, so manchen guten Rat und seine Unterstützung während der gesamten Zeit.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Dirk Wesenberg für seine sehr gute Betreuung und viele gute Anregungen und Gespräche.

Den Mitgliedern der gesamten Arbeitsgruppe Ökologische und Pflanzen-Biochemie danke ich ganz besonders für die tolle Arbeitsatmosphäre! Anja Bräutigam, Corinna Bleuel und Corinna Hermsen danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Freundschaft, viele gute Tipps und für stets „offene Ohren“. Ich danke auch meinen Diplomanden Franka Hebner, Petra Nathan und Benjamin Leyh, die es mit mir ausgehalten haben. Danke Euch allen! Ganz besonders danken möchte ich Traudel Püschel, ohne die die vielen HPLC-Analysen nicht möglich gewesen wären. Frau Funke und Frau Hoffart möchte ich auch einen Dank für Ihre gute Zusammenarbeit aussprechen.

Bei Herrn Prof. Dr. Klaus Albert bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die Messzeit, die er mir gewährt hat. Danken möchte ich Marc Bayer für die Unterstützung bei meinem Vorhaben, für die vielen guten Tipps und für seine Hilfsbereitschaft bei Problemen im Labor sowie für das Korrekturlesen. Volker Friebolin danke ich für die Hilfe beim Packen der Säulen und beim Erstellen der Spektren für Dokumente. Karsten Holtin und Max Kühnle möchte ich ebenso für die freundliche Aufnahme und ihre Diskussionsbereitschaft danken. Ein Dankeschön geht auch an Herrn Schuler für die Messungen am *microcoil* 600 MHz-NMR-Spektrometer.

Mein besonderer Dank gebührt Frau Dr. Carmen Mrestani-Klaus für die Messungen am 400 MHz-NMR-Spektrometer, für ihre stetige Unterstützung bei der Vorbereitung von Vorträgen und bei der Auswertung der Spektren, für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und ganz besonders für das Korrekturlesen und ihre sehr guten Ideen.

Herrn Dr. Golbik danke ich für die Messungen am CD-Spektropolarimeter, für seine Diskussionsbereitschaft, seine Unterstützung bei den Proteinbestimmungen und für das Korrekturlesen.

Ein Dankeschön geht auch an Frau PD Dr. Thondorf für Ihre Diskussionsbereitschaft und das Korrekturlesen, Frau Dr. Gebauer danke ich für die Erstellung der Homologiemodelle.

Danken möchte ich auch Frau Dr. Schierhorn (MPI, Halle) und Herrn Dr. Schmelzer (Institut für Pharmazie, Uni Halle) für die massenspektrometrischen Untersuchungen meiner Proben und ihre Diskussionsbereitschaft bei so manchen Fragen.

Frau Lindenstrauß (AG Dr. Brüser, Institut für Biologie, Bereich Mikrobiologie, Uni Halle) danke ich für die Sequenzierungen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Krauß und Frau Krause für die Einführung in die Kultivierung der Pilze und für die Bereitstellung/Stammhaltung des Stammes H4-2-4, sowie Herrn Dr. Wennrich für die ICP-AES-Messungen (UFZ, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung, Leipzig).

Ich danke Frau A. Halász und ihrer Stiftung für die finanzielle Unterstützung der Strukturuntersuchungen in Tübingen.

Ebenso danke ich der FAZIT-Stiftung für das gewährte Stipendium, um meine Dissertation beenden zu können.

Danken möchte ich meinen Schwiegereltern für ihre immerwährende Unterstützung und Geduld. Ebenso möchte ich meiner Mutter, meiner Schwester mit Familie und meinen Großeltern danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Jens. Ihm danke ich herzlich für seine Unterstützung, für kritische Fragen, Motivation und für die computertechnische Hilfe. Danke für alles!

Lebenslauf

ANGABEN ZUR PERSON

Name	Diana Meißner, geb. Steiner
Adresse	Jüdenstrasse 34, 06886 Lutherstadt Wittenberg
geb. am	26.08.1977 in Halle (Saale)

BERUFLICHER WERDEGANG

seit Oktober 2009 wissenschaftliche Mitarbeiterin bei der BLE GmbH,
Hermannswerder 14, 14473 Potsdam

AUSBILDUNG

September 2005- September 2009	Doktorandin (Stipendiatin) an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie, Abteilung für Ökologische und Pflanzen-Biochemie (Prof. Dr. G.-J. Krauß)
Oktober 1997- Oktober 2004	Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachrichtung: Biologie, Diplomarbeit im Hauptfach Mikrobiologie: „Osmotoleranz bei anaeroben Bakterien des <i>Clostridium</i> -Clusters XI“ (Prof. Dr. J. R. Andreesen)
1996-1997	Freiwilliges Soziales Jahr in einem Seniorenheim in Halle
1991-1996	Abitur am Torgymnasium Halle
1986-1991	POS „Otto Schlag“ Halle
1984-1986	POS „Johann Wolfgang von Goethe“ Halle
Sprachen	Englisch Russisch (Grundkenntnisse)

Mitglied des Neuen Chores Halle e.V. von 1998-2004

Mitglied des Mädchenchores am Torgymnasium von 1986-1998

TÄTIGKEITEN ALS WISSENSCHAFTLICHE HILFSKRAFT UND PRAKTIKA

April-September 2005	Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung - UFZ Leipzig, Umwelt-biotechnisches Zentrum, Thema: „Bestimmung der Wasserqualität einer Pflanzenkläranlage nach WHO“ (Dr. Bederski, Dr. Müller)
März 2003	Scil Proteins Halle, Thema: „Expression, Faltung und Reinigung eines neuen humanen Wachstumsfaktors nach Expression in <i>E. coli</i> “
Juli-August 2002	Unilever Bestfoods Deutschland, Werk Pratau, berufsbezogenes Praktikum in der Qualitätssicherung

VORTRÄGE

- | | |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 11.-13. Januar
2009 | 19. Doktorandenseminar Hohenroda 2009; Vortrag mit dem Titel:
„Isolierung und Charakterisierung eines <i>small metallothioneins</i> aus
dem aquatischen Pilz <i>Heliscus lugdunensis</i> “ |
| 27.-29. August
2008 | International Conference on LC-NMR and Related Techniques:
„Challenges in Biological Systems“ in Jena; Vortrag und Poster mit
dem Titel: „Cd-induced structure of a small metallothionein
determined by capillary HPLC-NMR“ |

PUBLIKATIONEN

- | | |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| in Vorbereitung: | „The small metallothionein in <i>Heliscus lugdunensis</i> strain H4-2-4 is
induced in dependence of metal content“ |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Halle (Saale), 29.01.2010

.....

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig, ohne fremde Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere, dass die Arbeit an keiner anderen Einrichtung zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht wurde.

Halle (Saale), 29.01.2010

.....

