

Cadmiumstressantwort in *Chlamydomonas reinhardtii* - Physiologie & Analytik von Thiolen

KUMULATIVE 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-Biochemikerin
Anja Bräutigam

geb. 1983 in Hildburghausen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Gerd-Joachim Krauß
2. Prof. Dr. Uwe Karst
3. Prof. Dr. Jörg Feldmann

Halle (Saale), den 20. Juni 2011

Für meine Mutsch.

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	2
2.	Einleitung	3
2.1.	Modellorganismus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	3
2.2.	Metalle.....	4
2.3.	Metallentgiftung.....	5
	Glutathion	6
	Phytochelatine.....	6
2.4.	Analyse von Thiolen	11
	Cystein & Glutathion.....	11
	Phytochelatine.....	13
3.	Zielstellung	15
4.	Ergebnisse	17
4.1.	ABC 2009: „Analytical approach for characterization of cadmium-induced thiol peptides-a case study using <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> “	17
4.2.	Metallomics 2010: „Quantification of Phytochelatins in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> using ferrocene-based derivatization.“	19
4.3.	ABC 2010: „Rapid and simple UPLC-MS/MS method for precise phytochelatin quantification in alga extracts.“	21
4.4.	„Physiological characterisation of cadmium exposed <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .“	23
5.	Zusammenfassende Diskussion.....	25
5.1.	Identifizierung und Quantifizierung von Phytochelatinen	25
5.2.	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> unter Cadmiumstress	33
6.	Ausblick	39
7.	Anhang.....	41
8.	Danksagung	43
9.	Lebenslauf	45
10.	Erklärung.....	47
11.	Literaturverzeichnis	48

1. Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
ESI	Elektro-Spray-Ionisation
FMEA	Ferrocencarboxylsäure(2-maleimidoyl)ethylamid
GGT	γ -Glutamyltranspeptidase
GSH	reduziertes Glutathion
GSHS	GSH-Synthetase
GSSG	oxidiertes Glutathion
HMW	<i>high molecular weight complex</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSAB	<i>hard-soft-acid-base</i>
ICP	<i>inductively coupled plasma</i>
LC	<i>liquid chromatography</i>
LMW	<i>low molecular weight complex</i>
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionisation</i>
MBB	Monobromobimban
MRM	<i>multi reaction monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
MT	Metallothionein
NWG	Nachweisgrenze
PC	Phytochelatin
PCS	Phytochelatinsynthase
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RP	<i>reversed phase</i>
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
TNB	5-Thio-2-Nitrobenzoesäure
TOF	<i>time of flight</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
UPLC	<i>ultra performance liquid chromatography</i>
γ -EC	γ -Glutamylcystein
γ -ECS	γ -EC-Synthetase

2. Einleitung

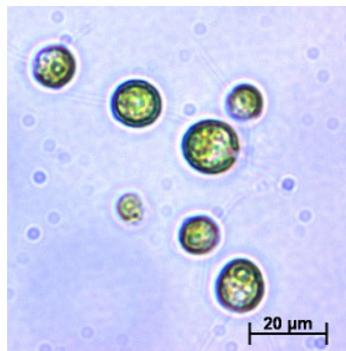
2.1. Modellorganismus *Chlamydomonas reinhardtii*

Im 19. Jahrhundert erhielt die einzelligen Grünalge *Chlamydomonas* (griech.: chlamys=Mantel, monas=eins) ihren Namen durch Ehrenberg. Diese Gattung kommt in Süßwasserhabitaten und feuchten Bodenschichten natürlich vor. Die Art *Chlamydomonas reinhardtii* wurde 1888 von Dangeard nach ihrem Entdecker Reinhardt benannt.

Chlamydomonas besitzt eine elipsoide Zellform und kann sich mittels zweier gleichlanger Flagellen fortbewegen. Der Chloroplast umschließt becherförmig den Zellkern und enthält einen oder mehrere Pyrenoide. Pyrenoide sind nicht durch eine Membran abgegrenzte Bereiche, die hauptsächlich aus RuBisCO (**R**ibulose-1,5-**bis**phosphat-**c**arboxylase/-**o**xxygenase) bestehen und oft von Stärkekörnern umgeben sind. Im Vergleich zu höheren Pflanzen enthält die Zellwand der Alge keine Cellulose (Horne *et al.*, 1971), sondern besteht zum Großteil aus hydroxyprolinreichen Glykoproteinen mit Arabinose und Galaktose als dominierenden Zuckern (Jiang & Barber, 1975).

Nach Pentecost (2002) wird *Chlamydomonas reinhardtii* taxonomisch wie folgt eingeordnet:

Reich	Plantae
Abteilung	Chlorophyta
Klasse	Chlorophyceae
Ordnung	Volvocales
Familie	Chlamydomonadaceae
Gattung	<i>Chlamydomonas</i>



Die Grünalge besitzt neben der einfachen Handhabung eine Vielzahl von Vorteilen:

- Haploidie in der vegetativen Wachstumsphase
- Möglichkeit der mixotrophen Anzucht
- Methodenvielfalt zur Transformation
- Genom von Plastiden und Kern ist sequenziert (Maul *et al.*, 2002; Merchant *et al.*, 2007)
- Stammsammlungen mit einer Vielzahl von Mutanten und Wildtypen (z. B. <http://sagdb.uni-goettingen.de>).

Daher wird *Chlamydomonas reinhardtii* in der Forschung zur Untersuchung z. B. der circadianen Rhythmik (Mittag & Wagner, 2003), zur Photosynthese (Davies & Grossman, 1998) und auch zur Metallhomöostase (Hanikenne, 2003) als Modellorganismus (Harris, 2001) eingesetzt.

Die meisten der heutzutage genutzten Wildtyp-Stämme stammen von einer Zygote ab, die 1945 durch Smith in den USA isoliert wurde (Harris, 1989; Coleman & Mai, 1997).

2.2. Metalle

Oft wird in Zusammenhang mit toxischen Metallen das Wort „Schwermetall“ gebraucht. Die Definition des Begriffs „Schwermetall“ ist jedoch nicht eindeutig festgelegt. Sie werden u. A. nach ihrer Dichte oder Atommasse eingeteilt (Duffus, 2002). Da keine verbindliche Definition des Begriffs vorliegt, soll dieser im Folgenden keine Verwendung finden. Des Weiteren ist in der vorliegenden Arbeit, mit dem Begriff „Metall“, immer die ionische Form gemeint.

In den Biowissenschaften ist die Einteilung der Metalle in essenziell und nicht-essenziell sinnvoll. Viele der Übergangsmetalle sind essenziell. Diese können, wie z. B. Eisen und Kupfer, in verschiedenen Oxidationsstufen vorliegen und somit Elektronentransportvorgänge ermöglichen. Den nicht-essenziellen Metallen Blei und Quecksilber konnten hingegen bisher keine physiologischen Funktionen nachgewiesen werden. Auch Cadmium gehört zu den nicht-essenziellen Metallen, hat jedoch unter Zinkmangel eine physiologische Funktion in einer Carboanhydrase der marinen Diatomee *Thalassiosira weissflogii* (Lane *et al.*, 2005).

Metalle sind natürliche Bestandteile der Erdkruste. Lokal erhöhte Einträge in die Umwelt haben vorwiegend anthropogene Ursachen, wie z. B. den Kupferschieferbergbau im Mansfelder Land (Krauss *et al.*, 2001). Die natürliche Cadmium-Konzentration im Boden beträgt 0,04-0,32 μM , ist die Konzentration höher gilt der Boden als belastet (Wagner, 1993; Sanità Di Toppi & Gabbrielli, 1999). Die höchste in der Umwelt gemessene Cadmium-Konzentration in Bodenlösung beträgt 68 μM und wurde in der Nähe einer Kunststofffabrik in Taiwan gemessen (Lee *et al.*, 2004). In Gewässern sind Konzentrationen von bis zu 600 μM Cadmium bekannt (Río Tinto, Spanien, Aguilera & Amils, 2005). Entscheidend für die Toxizität von Metallen ist jedoch nicht die Gesamtkonzentration, sondern deren Bioverfügbarkeit. Letztere wird u. A. durch den pH-Wert, Temperatur und Huminsäuren beeinflusst (Tessier & Turner, 1996; Petrovic *et al.*, 1999; Pinheiro *et al.*, 1999; Ernst *et al.*, 2008).

Die Metallaufnahme in das Zellinnere wird durch eine Vielzahl von Transportern vermittelt (Saier, 2000; Krämer, 2010). Bei *C. reinhardtii* ist wenig über Metallaufnahmesysteme bekannt. Die Aufnahme von Eisen erfordert eine kupferhaltige Ferroxidase (Herbik *et al.*, 2002; La Fontaine *et al.*, 2002). Cadmium kann durch den Metalltransporter DMT1 der Nramp-Familie (*natural resistance associated macrophage proteins*), der divalente Ionen transportiert (z. B. Magnesium, Kupfer, Eisen - aber kein Zink, Rosakis & Köster, 2005), in die Zelle gelangen. Basierend auf einer *in-*

silico-Analyse postulieren Hannikene *et al.* (2005a) die mögliche Beteiligung eines ZIP-Proteins (ZRT/IRT-ähnliche Proteine; ZRT/IRT-*zinc/iron regulated transporter*) bei der Cadmiumaufnahme. Auch die intrazelluläre Metallhomöostase wird durch die Beteiligung einer Vielzahl von Transportern reguliert (Krämer *et al.*, 2007). Bei *C. reinhardtii* wurde unter Cadmiumstress z. B. die Induktion des mitochondrial lokalisierten ABC-Transporters (ATP-binding cassette) CrCds1 nachgewiesen (Hanikenne *et al.*, 2005b).

Liegen essenzielle Metalle in suboptimalen (hier: zu hohen) Konzentrationen oder nicht-essenzielle Metalle in Spuren intrazellulär vor, können sie toxisch wirken. Ein wesentlicher Bestandteil der Zellschädigung ist die Affinität der Metalle zu Sulfhydrylgruppen (Irving & Williams, 1948; Pearson, 1963; Schützendübel & Polle, 2002), wodurch Proteine/Enzyme inaktiviert werden können. Enzyme können auch durch die Verdrängung ihrer Metall-Kofaktoren inhibiert werden (DalCorso *et al.*, 2008). Zum Beispiel kann Cadmium aufgrund seiner chemischen Ähnlichkeit zu Zink dieses in Enzymen verdrängen (Strasdeit, 2001; Clemens, 2006b). Redoxaktive Metalle, wie z. B. Eisen, können oxidativen Stress hervorrufen (Fenton-Reaktion, Haber-Weiß-Reaktion, Koppenol, 2001). Auch nicht redoxaktive Metalle, wie Cadmium, können indirekt durch die Freisetzung von redoxaktiven Metallen, Hemmung von Redox-Enzymen oder Bindung an Glutathion (GSH) oxidativen Stress verursachen (Stoys & Bagchi, 1995), dies gilt auch für Algen (Pinto *et al.*, 2003).

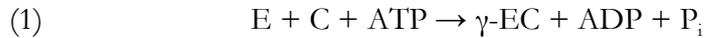
2.3. Metallentgiftung

Im Laufe der Evolution haben Pflanzen eine Vielzahl von Strategien gegen Metallstress entwickelt. *Avoidance*-Mechanismen verhindern die Metall-Aufnahme z. B. durch extrazelluläre Bindung an die Zellwand. Für *C. reinhardtii* wurde die Fähigkeit beschrieben, Metalle extrazellulär an die Zellwand zu binden (Macfie & Welbourn, 2000). Bei pH 7 erfolgt die extrazelluläre Bindung von Cadmium hauptsächlich über Carboxylgruppen (Adhiya *et al.*, 2002). Die hohe Abundanz an hydroxyprolinreichen Glykoproteinen der Zellwand von *C. reinhardtii* (Jiang & Barber, 1975; Voigt, 1985) wird als ein weiterer Grund für die Adsorptionskraft gegenüber Metallen diskutiert.

Tolerance-Mechanismen führen zur Detoxifizierung von Metallen, die ins Zellinnere gelangt sind. Als intrazelluläre Chelatoren spielen vor allem Glutathion (GSH), Phytochelatine (PC) und Metallothioneine (MT) eine Rolle. Diese cysteinhaltigen Verbindungen binden Metalle nicht nur, sondern tragen auch zu deren Kompartimentierung bei (Ernst *et al.*, 2008). Außer in der Braunalge *Fucus vesiculosus* (Merrifield *et al.*, 2004; Merrifield *et al.*, 2006) sind in Algen bisher keine Metallothioneine beschrieben worden.

Glutathion

Das Molekül Glutathion (GSH) wurde 1921 zum ersten Mal beschrieben (Hopkins, 1921; Harington & Mead, 1935). GSH ist ein Tripeptid aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin. Die Synthese erfolgt enzymatisch über zwei ATP-abhängige Schritte:



Die Knüpfung der partiellen Isopeptidbindung wird durch das Enzym γ -Glutamylcystein-Synthetase katalysiert (γ -ECS, (1)). Diese Reaktion ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und der Hauptregulationspunkt in der GSH-Synthese (May *et al.*, 1998; Rausch *et al.*, 2007). Anschließend wird Glycin durch die GSH-Synthetase (GSHS) auf die γ -EC-Einheit übertragen ((2), Noctor *et al.*, 2002).

GSH ist von zentraler Bedeutung bei der Entgiftung von Metallen. Das Tripeptid dient als Metall-Chelator, Redoxpuffer und Edukt bei der Phytochelatinsynthese. Die Thiolgruppe des GSH bindet als weiche Lewis-Base die weiche Lewis-Säure Cadmium (Pearson, 1963). GSH ist als Antioxidans an der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt, wobei die oxidierte Form GSSG entsteht (Dixon *et al.*, 1998; Noctor, 2006). Das Verhältnis von GSH zu GSSG kann somit als Maß für oxidativen Stress dienen. So steigt der GSSG-Gehalt bei *C. reinhardtii* nach Cadmiumexposition an (Siripornadulsil *et al.*, 2002; Bräutigam *et al.*, 2011). Bei der Einschätzung von metallinduziertem Stress muss man jedoch in Betracht ziehen, dass das Verhältnis GSH/GSSG nicht nur vom Redoxstatus selbst beeinflusst wird. Zum Einen wird GSH durch die Phytochelatinsynthese aus dem zellulärem *pool* entzogen und zum Anderen steht durch Metall gebundenes GSH nicht mehr als Redoxpuffer zur Verfügung.

Neben Glutathion sind in der Literatur auch Analoga beschrieben, bei denen die endständige Aminosäure Glycin durch β -Alanin (Homo-GSH, Klapheck, 1988), Serin (Hydroxymethyl-GSH, Klapheck *et al.*, 1992) oder Glutamat (Meuwly *et al.*, 1993) ersetzt ist. Homo-GSH wurde das erste Mal von Price (1957) beschrieben, aber erst 1963 wurde das Alanin als β -Alanin identifiziert (Carnegie, 1963). Die Synthese von Homo-GSH aus γ -EC wird durch eine Homo-GSHS katalysiert (Frendo *et al.*, 2001).

Phytochelatine

Phytochelatine (PC) wurden erstmalig in *Schizosaccharomyces pombe* entdeckt und zunächst als Cadystine bezeichnet (Murasugi *et al.*, 1981; Kondo *et al.*, 1984). Wenig später fand man sie auch in Pflanzen, wodurch sie ihren heute gebräuchlichen Namen, Phytochelatine, erhielten (Grill *et al.*, 1985; Grill, 1987). PC sind Oligopeptide mit der Struktur $\gamma\text{-(EC)}_n\text{G}$. Ihre Synthese erfolgt enzymatisch durch die Phytochelatinsynthase (PCS), eine Dipeptidyltransferase (Clemens &

Peršoh, 2009). Die Reaktion erfolgt in zwei Schritten über ein Acyl-Enzymintermediat (Vatamaniuk *et al.*, 2004; Vivares *et al.*, 2005):



Ein alternativer Weg für die PC-Synthese katalysiert durch eine Carboxypeptidase konnte sowohl *in vivo* für *Schizosaccharomyces pombe* (Isobe *et al.*, 1991) und *Saccharomyces cerevisiae* (Wünschmann *et al.*, 2007) als auch *in vitro* (Imai *et al.*, 1996) nachgewiesen werden.

PCS-Gene wurden erstmals 1999 unabhängig von drei Gruppen identifiziert (Clemens *et al.*, 1999; Ha *et al.*, 1999; Vatamaniuk *et al.*, 1999). Die PCS ist ein konstitutiv exprimiertes Enzym (Grill *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1997; Clemens & Peršoh, 2009). Die Regulation der PC-Synthese erfolgt durch die posttranskriptionelle Aktivierung des Enzyms und ist von der Art und der Konzentration der intrazellulären Metalle abhängig. Cadmium gilt als der stärkste Induktor der PCS (Hirata *et al.*, 2005). Zunächst wurde angenommen, dass die PCS durch freie Metallionen aktiviert wird (Grill *et al.*, 1989). Später postulierten Ha *et al.* (1999), dass Metallionen an Cysteinresten der PCS binden und somit zur Aktivierung führen, wohingegen Vatamaniuk *et al.* (2000) die Beteiligung von Metall-GSH-Komplexen diskutieren. Clemens (2006a) vermutet eine Übertragung der Metalle von GSH auf die PCS. Wie der Aktivierungsmechanismus durch Metalle tatsächlich abläuft ist noch nicht abschließend geklärt.

Jedoch erfolgt die Regulation der PCS nicht nur durch auf Enzymebene, sondern auch durch die metallinduzierte Verstärkung der Transkription und Translation der PCS, wie aktuelle Studien belegen (Heiss *et al.*, 2003; Estrella-Gómez *et al.*, 2009).

Die Bildung von PC ist ein wesentlicher Mechanismus zur Detoxifizierung von Metallen und Metalloiden in vielen höheren Pflanzen und Algen (Perales-Vela *et al.*, 2006; Ernst *et al.*, 2008; Vetterlein *et al.*, 2009). Tabelle 1 (S. 10) zeigt einen Überblick metallinduzierter PC in Grünalgen. Metalle binden an den Sulfhydrylgruppen der PC analog zu GSH. Die Komplexbildung von Cadmium erfolgt tetraedrisch an SH-Gruppen von einem oder mehreren PC-Molekülen (Strasdeit *et al.*, 1991; Cruz *et al.*, 2002; Dorcák & Krezel, 2003). Die Metall-PC-Komplexe (auch Metall-GSH) können dann in der Vakuole gelagert werden. Als Transporter für diese Verbindungen wurden in *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* ABC-Proteine (Ortiz *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1997; Prévéral *et al.*, 2009; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2010) nachgewiesen. Auch in Pflanzen wird eine Beteiligung dieser Transporter diskutiert (Bovet *et al.*, 2003; Bovet *et al.*, 2005). Bei *C. reinhardtii* wurde nach Cadmiumzugabe die Erhöhung der Transkriptionsrate des

ABC-Transporters CrMRP2 und dessen Beteiligung bei der Bildung vakuolärer Cadmium-PC-Komplexe nachgewiesen (Wang & Wu, 2006).

In den Vakuolen von Pflanzen und Pilzen werden höhermolekulare Komplexe gebildet. Zunächst entstehen LMW-Komplexe (*low molecular weight*), die aus Metall und Thiolen bestehen. Durch zusätzliche Einlagerung von Sulfid und Metall bilden sich die stabileren HMW-Komplexe (*high molecular weight*, Murasugi *et al.*, 1983; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005). Auch in *C. reinhardtii* wurden diese Komplexe detektiert (Hu *et al.*, 2001).

In *Euglena gracilis* und *C. reinhardtii* wurden Cadmium und PC zusätzlich in den Chloroplasten lokalisiert (Nagel *et al.*, 1996; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005; Nishikawa *et al.*, 2006). Nagel *et al.* (1996) zeigten für *C. reinhardtii*, nach Dichtegradientenzentrifugation des homogenisiertem Zellmaterials, dass ein Großteil des intrazellulären Cadmiums im Chloroplasten lokalisiert und an Peptide gebunden ist. Nishikawa *et al.* (2006) wiesen durch Elektronenmikroskopie neben dem Cytosol, der Zellmembran und der Vakuole den Chloroplasten als Hauptakkumulationsort für Cadmium bei *C. reinhardtii* und *C. acidophila* nach.

Bei der Identifizierung von Metall-Species (Metallothiolom, Wesenberg *et al.*, 2010) und der Untersuchung detoxifizierungsrelevanter Enzyme (z. B. PCS) ist somit die Kompartimentierung von Metallen, Komplexbildnern und Enzymen innerhalb der Zelle zu berücksichtigen.

Eine Gemeinsamkeit aller PC ist die Abfolge von n γ -EC-Einheiten, wobei n meist mit 2-11 angegeben wird. PC_{>6} wurden bisher jedoch nur in wenigen Arbeiten beschrieben und sind vermutlich auf Artefakte bei der Analyse zurückzuführen (Grill *et al.*, 1986b; Grill *et al.*, 1987; Torres *et al.*, 1997). Neben den klassischen/kanonischen PC ((EC)_nG) werden in einigen Pflanzen auch Isoformen gebildet (Iso-PC, Abbildung 1, Rauser, 1995). Isoformen der PC unterscheiden sich in den endständigen Aminosäuren von den klassischen PC. Das C-terminale Gly kann fehlen oder durch andere Aminosäuren ersetzt sein (Cobbett & Goldsbrough, 2002; Pawlik-Skowronska, 2002). Die Synthese von Homo-PC ((EC)_nA) benötigt vermutlich eine spezielle PCS (Homo-PCS), welcher Homo-GSH als Substrat dient (Oven *et al.*, 2002). DesGlyPC_{n-1} können aus kanonischen PC_n durch die Abspaltung des endständigen Gly entstehen, welche durch eine Carboxypeptidase oder die PCS katalysiert sein kann. Auch die Synthese von CysPC_{n-1} könnte durch den Abbau von PC_n erklärt werden. Die Spaltung der γ -Peptidbindung zwischen Glu und Cys könnte durch eine γ -Glutamyltranspeptidase (GGT) erfolgen (Martin & Slovin, 2000). Ob dieses Enzym neben GSH und GS-Konjugaten auch PC als Substrat verwenden kann, ist jedoch noch nicht bekannt.

Als physiologische Erklärung für das Vorkommen von Iso-PC, die aus GSH-Analoga synthetisiert werden, postulieren Sarry *et al.* (2006), dass der GSH-*pool* für andere zelluläre

Prozesse erhalten bleiben soll. Beim Vergleich verschiedener Cadmium-Konzentrationen detektierten die Autoren vor allem bei höheren Metallkonzentrationen Iso-PC in *Arabidopsis thaliana*. Die Frage, ob Iso-PC weitere Vorteile gegenüber den kanonischen PC besitzen, z. B. in ihren Metallbindeeigenschaften, bleibt bisher unbeantwortet.

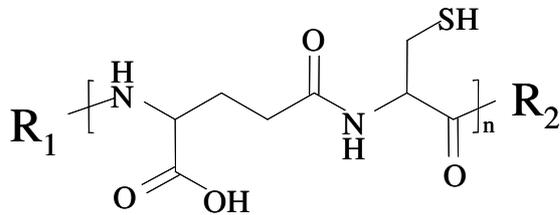


Abbildung 1: Phytochelatine; kanonische PC: R₁=H, R₂=Gly; Homo-PC: R₁=H, R₂=Ala; Hydroxymethyl-PC: R₁=H, R₂=Ser; PCGlu: R₁=H, R₂=Glu; PCGln=: R₁=H, R₂=Gln; CysPC: R₁=Cys, R₂=Gly; desGlyPC: R₁=H, R₂=OH.

PC mit einem zusätzlichem N-terminalem Cys (CysPC) wurden in der Grünalge *Stigeoclonium tenue* nach Zink-Belastung nachgewiesen (Pawlik-Skowronska, 2003). Ein Vergleich zeigte, dass ein Zink-toleranter Ökotyp gegenüber einem Zink-sensitiven Ökotypus dieser Alge bis zu 22-mal mehr CysPC enthielt. Auch in anderen Grünalgen kann die Existenz von Iso-PC vermutet werden, da in vielen Arbeiten von einer unvollständigen Identifizierung und fehlerhafter Quantifizierung der PC ausgegangen werden kann (Tabelle 1). Mögliche Fehlerquellen bei der Analytik von Phytochelatinen werden im folgenden Kapitel näher besprochen.

Tabelle 1: Grünalgen in denen PC nachgewiesen wurden, **/* die Bildung weiterer PC und Isoformen ist wahrscheinlich/spekulativ

Grünalge	Metallexposition	PC	Referenz
<i>Chlamydomonas acidophila</i>	60/1500 µM Cd	PC ₂₋₆	(Nishikawa et al., 2006)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	20 µM Cd	PC ₂₋₅	(Gekeler et al., 1988)
	120 µM Cd	PC	(Howe & Merchant, 1992) *
	10 µM Hg		
	100 µM Cd	PC ₂₋₄	(Hu et al., 2001) *
	50 µM Cd	PC ₂₋₄ (PC ₂₋₃ desGly)**	(Kobayashi et al., 2006)
	500 µM As(III)	PC ₂₋₄ (PC ₂₋₃ desGly)**	
	6 µM	PC ₂₋₄	(Nishikawa et al., 2006)
<i>Chlamydomonas moenussii</i>	8,9-89 µM Cd	PC ₂₋₄ *	(Suárez et al., 2010)
<i>Chlorella fucsa</i>	20 µM Cd	PC ₂₋₆	(Gekeler et al., 1988)
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,9 µM Cd	PC ₂₋₃	(Simmons et al., 2009)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	200 µM Zn	PC ₂₋₆	(Tsuji et al., 2003) *
	400 µM Cd		
<i>Euglena gracilis</i>	25/100 µM Cd	PC ₂₋₃	(Mendoza-Cózatl et al., 2006) *
<i>Monoraphidium minutum</i>	20 µM Cd	PC ₂₋₆	(Gekeler et al., 1988)
<i>Scenedesmus acutiformis</i>	20 µM Cd	PC ₂₋₆	(Gekeler et al., 1988)
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	1000 µM Cd	PC ₂₋₆	(Le Faucheur et al., 2005) *
	46 µM Cu	PC ₂	(Le Faucheur et al., 2006) *
	31/41 µM Pb		(kein PC ₂ unter
	8/20 µM As(III)		Zn, Ni, Ag, Sb(V)
	8/20 µM As(V)		
	20/50 µM Sb(III)		
<i>Stigeoclonium tenue</i>	15/30 µM Zn	PC ₂₋₄	(Pawlik-Skowronska, 2003) *
		CysPC ₂₋₃	
<i>Stichococcus bacillaris</i>	100 µM As(III)	PC ₂₋₃	(Pawlik-Skowronska et al., 2004) *
	100 µM As(V)		
	10 µM Pb	PC ₂₋₄	(Pawlik-Skowronska, 2002)
	20 µM Cd	PC ₂₋₆ PC ₂ desGly	(Gekeler et al., 1988)

2.4. Analyse von Thiolen

„There is a bewildering variety of published methods for the determination of thiols and their reaction products in biological fluids and tissues.” (Dalle-Donne & Rossi, 2009)

Cystein & Glutathion

Die Analyse von Thiolen ist in vielen Bereichen der Medizin, Toxikologie und Physiologie von zentraler Bedeutung. Vor allem für Cystein, GSH und GSSG ist bereits eine Vielzahl von Methoden zur quantitativen Bestimmung publiziert. Während die klassische Methode der photometrischen GSH-Bestimmung ursprünglich über eine Enzymreaktion im *batch* erfolgte (Tietze, 1969), haben sich im Laufe der Zeit chromatographische Methoden durchgesetzt (auch in Kopplung an Massenspektrometrie). Erst kürzlich erschien eine Sonderausgabe des *Journal of Chromatography B* zur Analyse von Thiolen (Volume 877, Issue 28 (2009)), die eine umfassende Übersicht bietet.

Die **Extraktion** der Thiole ist der erste Schritt zur Analyse. Wenn eine Diskriminierung von GSH und GSSG erfolgen soll, muss eine artifizielle Entstehung von GSSG möglichst verhindert werden. Daher empfiehlt sich aufgrund der raschen Autooxidation von Thiolen ($E^{\circ}(GSSG/GSH) \approx -240 \text{ mV}$) eine Aufarbeitung bei $\text{pH} < 7$ (Aslund *et al.*, 1997; Camera & Picardo, 2002). Weiterhin führt die Aufarbeitung bei niedrigem pH-Wert zu einer Aufreinigung des Extraktes durch Denaturierung von Proteinen, während Cystein und kurzkettige Thiolpeptide in Lösung bleiben. Bei der Untersuchung von Metallstress ermöglicht der saure pH-Wert darüber hinaus die Dissoziation der Cadmium-Thiol-Komplexe.

Der zweite Schritt der Thiolanalyse ist die **Reduktion** der Disulfide. Als Reduktionsmittel stehen zahlreiche Reagenzien zur Verfügung, z. B. Natrium-Borhydrid, 2-Mercaptoethanol, Dithiotreitol (DTT) und Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP). Reduktionsmittel, die selbst eine Thiolgruppe enthalten, können bei der Analyse zu falschpositiven Ergebnissen führen. Als effektivstes Reduktionsmittel hat sich TCEP erwiesen, welches über einen breiten pH-Bereich aktiv und unempfindlicher gegenüber Autooxidation als z. B. DTT ist (Burns *et al.*, 1991; Han & Han, 1994; Getz *et al.*, 1999).

An die Reduktion schließt sich ein SH-Gruppen-selektiver **Derivatisierungsschritt** an (Shimada & Mitamura, 1994; Iwasaki *et al.*, 2009; Monostori *et al.*, 2009). Es gibt eine Vielzahl von Derivatisierungsreagenzien zum Beispiel:

- Fluorophore: Jodoacetamidofluorescein (IAF, Santa *et al.*, 2006), Monobromobiman (MBB, Kosower & Kosower, 1995; Newton & Fahey, 1995)
- Benzofurane: Ammonium-7-fluorobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonat (SBD-F, Santa *et al.*, 2006); Orthophthalaldehyd (OPA, Molnar-Perl, 2001)

-Chromophore: 5,5-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB, Ellman, 1959)

-Metallhaltige Reagenzien: Ferrocene (Seiwert & Karst, 2007; Bomke *et al.*, 2010a), 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA, Ahrends *et al.*, 2007).

Soll nicht nur eine Quantifizierung des Gesamt-GSH, sondern eine Differenzierung zwischen GSH und GSSG erfolgen, werden vor der Reduktion zusätzliche Schritte erforderlich (z. B.: Blockierung der freien SH-Gruppe beispielsweise mit N-Ethylmaleimid, Lock & Davis, 2002; Hansen & Winther, 2009; Monostori *et al.*, 2009). Eine Möglichkeit der simultanen Bestimmung der oxidierten und reduzierten Form ist die sequentielle Derivatisierung mit zwei Ferrocenen, die sich in der LC und MS unterscheiden lassen (Seiwert & Karst, 2007; Seiwert *et al.*, 2008). Hierzu wird zunächst FEM (N-(2-ferrocenethyl)maleimid) and GSH gebunden. Nach Entfernung des überschüssigen FEM und Reduktion von GSSG kann FMEA (Ferrocencarboxylsäure-(2-maleimidoyl)ethylamid) an die nun zugänglichen Thiolgruppen binden (Abbildung 2).

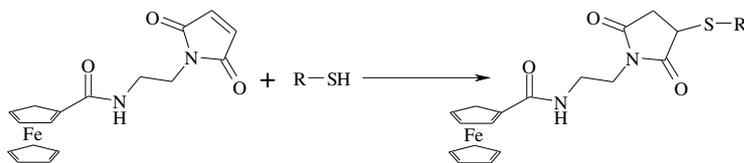


Abbildung 2: Reaktion von FMEA mit Thiolen (Michael-Addition) unter Bildung einer Thioetherbindung

Eine Derivatisierung der Thiole kann folgende Vorteile haben: Findet eine Vorsäulen-Derivatisierung statt, wird die Oxidation der Thiolgruppe während der Analyse verhindert. Zusätzlich verbessern hydrophobe Derivatisierungsreagenzien die Trennung der Derivate auf *reversed-phase*-Säulenmaterial (RP). Wenn das Derivatisierungsreagenz außerdem metallhaltig ist, können Nachweisgrenzen in der *inductively-coupled-plasma*-Massenspektrometrie (ICP-MS) verbessert werden. So ist die Detektion von Thiolen über ^{32}S in der ICP-MS aufgrund des hohen Ionisierungspotenzials (10,357 eV) von Schwefel und der Interferenz mit dem isobaren Molekülion $^{16}\text{O}^{16}\text{O}^+$ schwierig. Nach Derivatisierung mit einem metallhaltigen Reagenz kann die ICP-MS-Detektion des Thiols über das Metall unter bestimmten Voraussetzungen zu wesentlich besseren Ergebnissen führen (Bomke *et al.*, 2010b; Tholey & Schaumlöffel, 2010).

Bei einer Derivatisierung sind aber auch Nachteile zu erwarten. Geringe Selektivität des Reagenz kann zu falschpositiven Ergebnissen führen. Zum Beispiel reagiert OPA nicht nur mit Thiolen sondern auch mit primären Aminen. Eine weitere Fehlerquelle ist die u. U. nicht vollständige Derivatisierung. Nicht zu vernachlässigen sind auch zeitlicher wie pekuniärer Mehraufwand, den eine Derivatisierung mit sich bringt.

Letztendlich erfolgt die **Detektion**, je nach verwendetem Derivatisierungsreagenz z. B. photometrisch, massenspektrometrisch oder elektrochemisch.

Phytochelatine

Die Analyse von Phytochelatinen (PC) erfolgte bei deren erstmaligen Publikation chromatographisch durch Größenausschlusschromatographie und Detektion ihrer Cadmium-Komplexe bei 250 nm (Cadmium-Thiol-Bindung, Murasugi *et al.*, 1981). Drei Jahre später wurde bereits eine C₁₈-Säule zur Trennung der nativen PC eingesetzt (Detektion bei 220 nm, Peptidbindung) und PC₂ und PC₃ mittels *fast-atom-bombardement*-MS detektiert (Kondo *et al.*, 1984). Auch Grill *et al.* (1985) setzten eine RP-LC-Methode zum Nachweis von PC in Pflanzen ein. Die PC wurden durch Edman-Abbau sequenziert.

Die **DTNB**-Nachsäulenderivatisierung (5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure), Ellman-Reagenz) wurde erstmals 1986 zur thiol-selektiven Detektion von PC eingesetzt (Grill *et al.*). DTNB reagiert mit Thiolgruppen unter Freisetzung von 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure (TNB; Abbildung 3), die bei einer Wellenlänge von 410 nm detektiert werden kann (Ellman, 1959). Bis heute wird diese Methode aufgrund ihrer einfachen Durchführung sowohl für die qualitative als auch quantitative Bestimmung von PC angewandt (Vetterlein *et al.*, 2009). Unter den Analysebedingungen absorbieren jedoch auch Cumarine und können somit falschpositive Ergebnisse verursachen (Berlich *et al.*, 2002). Um dies auszuschließen, müssen zusätzliche Analysen ohne DTNB-Zugabe aber mit *pH-shift* durchgeführt werden.

Ein weiterer Nachteil der Nachsäulen-Derivatisierung ist die Oxidation der PC während der Analyse, welche nicht nur zur inakkuraten Quantifizierung, sondern auch zur falschpositiven Identifizierung führen kann. DTNB reagiert nicht mit oxidierten SH-Gruppen, so dass eine intramolekulare Oxidation die Quantifizierung verfälscht. Findet die Oxidation intermolekular und unvollständig statt, entstehen Moleküle die DTNB-positiv sind und in ihren Retentionseigenschaften höheren PC ähneln (z. B. CysPC₃-CysPC₃ (1740 Da) *vs.* PC₇ (1681 Da)).

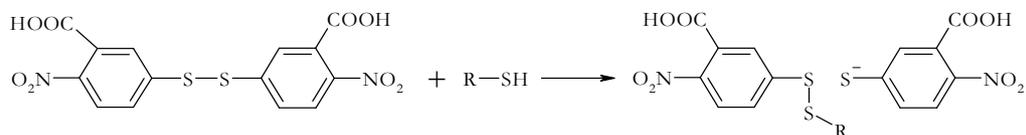


Abbildung 3: Reaktion von DTNB mit Thiolen unter Freisetzung von TNB

Eine weitere Methode zur PC-Analyse ist die Vorsäulen-Derivatisierung mit dem nicht-fluoreszierenden Monobromobiman (**MBB**), welches mit Thiolen zu einem fluoreszierendem Derivat reagiert (Abbildung 4) (Newton *et al.*, 1981; Figueroa *et al.*, 2007; Schulz *et al.*, 2008). Die Thiolgruppen sind während der Analyse vor Oxidation geschützt. Der Nachteil von MBB ist aber die schlechtere Derivatisierungseffizienz im Vergleich zu DTNB. Da die SH-Gruppen bei den

PC in räumlicher Nähe sind, kann es zu sterischen Behinderungen der Biman-Moleküle kommen (Sneller *et al.*, 2000). Des Weiteren ist MBB lichtempfindlich und reagiert mit Phosphinen (z. B. TCEP, Graham *et al.*, 2003).

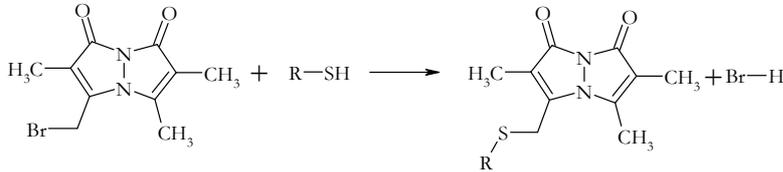


Abbildung 4: Reaktion von MBB mit Thiolen unter Bildung des fluoreszierenden Addukts

Ein Nachteil der photometrischen Detektion bei beiden o. g. Methoden ist, dass zur Identifizierung der PC entsprechende Standardsubstanzen benötigt werden, die aufwendig synthetisiert werden müssen. Mit der Existenz von Iso-PC kommt ein weiterer Komplexitätsfaktor hinzu, was die Beschaffung der Standard-PC schwierig und kostenintensiv gestaltet.

Eine Alternative bietet hier die **Massenspektrometrie** (MS) als sehr spezifische und sensitive Detektionsmethode. Zur absoluten Quantifizierung kann die Element-MS mit ICP eingesetzt werden. Da bei der ICP alle molekülspezifischen Informationen zerstört werden (bis zu 7000 K im Plasma), ist die zusätzliche Identifizierung der Thiole unabdingbar. Zur Identifizierung eignen sich molekülspezifische Ionisationsverfahren, die unter Atmosphärendruck stattfinden wie die Elektrospray-Ionisation (ESI) und *matrix assisted laser desorption ionisation* (MALDI). Da MALDI nur bedingt zur Kopplung an LC geeignet ist und ESI als sanfte Ionisierungsmethode sehr gut für die Identifizierung von Peptiden geeignet ist, bietet letztere Methode sich auch für die Analyse von PC an (Chassaigne *et al.*, 2000). ESI-MS/MS wurde bereits erfolgreich zur Identifizierung von PC aus komplexen Extrakten (Vacchina *et al.*, 2000; Chassaigne *et al.*, 2001; Bräutigam *et al.*, 2009b) und in der Kopplung mit Flüssigchromatographie eingesetzt (El-Zohri *et al.*, 2005; Sarry *et al.*, 2006; Bräutigam *et al.*, 2010a).

Einen umfassenden Überblick zu Möglichkeiten und Grenzen der PC-Analytik mittels MS- und LC-MS-Verfahren geben Wesenberg *et al.* (2010). Nur MS-basierte Methoden ermöglichen die eindeutige Identifizierung und akkurate Quantifizierung von PC-Apoformen. Jedoch bleibt die Analytik der Metall-Komplexe (Metallothiolom) mittels MS immer noch eine Herausforderung (Di Marco & Bombi, 2006; Keith-Roach, 2010; Wesenberg *et al.*, 2010).

3. Zielstellung

Seit mehr als 20 Jahren ist bekannt, dass *C. reinhardtii* in Reaktion auf Cadmiumstress Phytochelatine bildet (Gekeler *et al.*, 1988). Hinweise zur Existenz von Iso-PC in diesem Organismus wurden jedoch nicht weiter verfolgt (Kobayashi *et al.*, 2006). Unter Verwendung einer ökologisch relevanten Cadmiumkonzentration, die nicht zur signifikanten Einschränkung der Vitalität führt, wurde erstmals in der Arbeitsgruppe Krauß der Nachweis der Isoform CysPC erbracht (Bräutigam, 2006; Lippmann, 2007). Jedoch bot die eingesetzte HPLC-Methode mit Detektion durch DTNB-Nachsäulenderivatisierung bzw. *offline*-ESI-MS-Analyse weder die nötige chromatographische Auflösung noch Sensitivität für die komplette Aufklärung des PC-Musters. Da zur physiologischen Charakterisierung der Alge unter Cadmium-Stress die Kenntnis von Qualität und Quantität der induzierten PC unabdingbar ist, war die Entwicklung einer präzisen Methode zur PC-Analyse ein wichtiges Ziel dieser Arbeit.

Zunächst war es notwendig, die Cadmium-induzierten PC und deren Isoformen in *C. reinhardtii* zu identifizieren (**Kap. 4.1, Bräutigam *et al.*, 2009b**). Um auch gering konzentrierte PC nachzuweisen, war es von Bedeutung ein adäquates Anreicherungs- und Aufreinigungsprotokoll für Rohextrakte zu erarbeiten. Anschließend sollte der Extrakt durch Direktinfusion in ein ESI-QTOF-Massenspektrometer auf PC und mögliche Isoformen untersucht und deren Sequenz durch Tandem-MS-Analysen bestätigt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Methode zur PC-Quantifizierung. Zwei Strategien sollten verfolgt und verglichen werden: Zum Einem sollte eine Methode zur Derivatisierung mit einem Ferrocen (FMEA) und anschließender Detektion mit ICP-MS entwickelt werden (**Kap. 4.2, Bräutigam *et al.*, 2010a**). Zum Anderen sollten die PC in ihrer nativen Form mit einer UPLC-MS-Kopplung quantitativ analysiert werden (**Kap. 4.3, Bräutigam *et al.*, 2010b**).

Abschließend sollten weiterführende Untersuchungen zur Physiologie durchgeführt werden (**Kap. 4.4, Bräutigam *et al.*, 2011**). Der Einfluss von Cadmium auf die Konzentration der PC-Vorläufermoleküle Cys, γ -EC und GSH sollte bestimmt werden. Um eine Aussage zur in die Zelle aufgenommenen und damit biologisch wirksamen Menge an Metall treffen zu können, reicht die alleinige Angabe der zugefügten Metallmenge nicht aus. Aus diesem Grund sollten sowohl der zellwandgebundene als auch der intrazelluläre Gehalt an Cadmium quantifiziert werden. Aufgrund der Abundanz der CysPC, waren weitere Untersuchungen zu diesen Isoformen zielführend. Die mRNA-Menge des Enzyms γ -Glutamyltranspeptidase, welches möglicherweise an der Bildung von CysPC beteiligt ist, sollte bestimmt werden. Zusätzlich sollten

durch *docking*-Experimente die Bindung von GSH und CysGSH an die Phytochelatinsynthese verglichen werden, um die mögliche Hemmung des Enzyms durch Iso-PC zu prüfen.

4. Ergebnisse

- 4.1. ABC 2009: „Analytical approach for characterization of cadmium-induced thiol peptides-a case study using *Chlamydomonas reinhardtii*“

Bräutigam, A.; Schaumlöffel, D.; Krauss, G. J.; Wesenberg, D.

Analytical and Bioanalytical Chemistry **2009**, 395 (6), 1737-1747

DOI 10.1007/s00216-009-2921-7

Eigenanteil

Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente; Manuskriptentwurf; korrespondierende Autorin

Anal Bioanal Chem (2009) 395:1737–1747
DOI 10.1007/s00216-009-2921-7

ORIGINAL PAPER

Analytical approach for characterization of cadmium-induced thiol peptides—a case study using *Chlamydomonas reinhardtii*

Anja Bräutigam · Dirk Schaumlöffel · Gerd-Joachim Krauss · Dirk Wesenberg

Received: 14 April 2009 / Revised: 11 June 2009 / Accepted: 15 June 2009 / Published online: 10 July 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Phytochelatins (PC) were described earlier to play a role in metal detoxification in *Chlamydomonas reinhardtii* but were not clearly identified. The focus of this case study was to identify PC synthesized by *C. reinhardtii* exposed to Cd. Only low intracellular concentrations of cadmium (85 nmol g⁻¹ fresh weight) were sufficient to cause significant changes in thiol peptide pools. Thus, results showed a progressive decline of the glutathione content, accompanied by an induction of phytochelatins. Not only canonic phytochelatins but for the first time also the iso-phytochelatins CysPC_n and PC₂Ala were identified in this unicellular green alga using electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. Additionally, CysPC_ndesGly, PC_ndesGly, CysPC_nGlu, and PC₂Glu were found throughout MS analysis. Also, low abundant PCs could be detected due to the high sample preconcentration combined with little sample amounts (0.3 μL min⁻¹) necessary for electrospray. Identified PCs had a maximum number of 5 γ-glutamyl cysteine (γ-GluCys) units. Thiol peptides of higher molecular masses suggesting PC_n with n>5 could be identified as intermolecular oxidation products of smaller PCs. Thiols may

easily be oxidized. Therefore, PCs were reduced prior to MS analysis. Dithiothreitol and tris(2-carboxyethyl) phosphine were compared concerning their reduction effort.

Keywords Cadmium · *Chlamydomonas* · Thiols · Iso-phytochelatins · DTT · TCEP

A. Bräutigam (✉) · G.-J. Krauss · D. Wesenberg
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Institut für Biochemie und Biotechnologie,
Ökologische und Pflanzen-Biochemie,
Kurt-Mothes-Straße 3,
06120 Halle (Saale), Germany
e-mail: anja.braeutigam@biochemtech.uni-halle.de

D. Schaumlöffel
CNRS—Université de Pau,
Laboratoire de Chimie Analytique
Bio Inorganique et Environnement, UMR 5254 IPREM,
Hélioparc, 2, av. Pr. Angot,
64053 Pau, France

 Springer

4.2. Metallomics 2010: „Quantification of Phytochelatins in *Chlamydomonas reinhardtii* using ferrocene-based derivatization.”

Bräutigam, A.; Bomke, S.; Pfeifer, T.; Karst, U.; Krauss, G-J.; Wesenberg, D.

Metallomics **2010**, 2 (8), 565–570

DOI: 10.1039/c005014h

Eigenanteil

Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente, Optimierung der FMEA-Derivatisierung, PC-Identifizierung und -Quantifizierung gemeinsam mit S. Bomke und T. Pfeifer; Manuskriptentwurf

Quantification of Phytochelatins in *Chlamydomonas reinhardtii* using ferrocene-based derivatization†

Anja Bräutigam,^a Susanne Bomke,^b Thorben Pfeifer,^b Uwe Karst,^b
Gerd-Joachim Krauss^a and Dirk Wesenberg^{*a}

Received 10th April 2010, Accepted 8th June 2010

DOI: 10.1039/c005014h

A method for the identification and quantification of canonic and isoforms of phytochelatins (PCs) from *Chlamydomonas reinhardtii* was developed. After disulfide reduction with tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) PCs were derivatized with ferrocenecarboxylic acid (2-maleimidoyl)ethylamide (FMEA) in order to avoid oxidation of the free thiol functions during analysis. Liquid chromatography (LC) coupled to electrospray mass spectrometry (ESI-MS) and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) was used for rapid and quantitative analysis of the precolumn derivatized PCs. PC₂₋₄, CysGSH, CysPC₂₋₄, CysPC₂desGly, CysPC₂Glu and CysPC₂Ala were determined in the algal samples depending on the exposure of the cells to cadmium ions.

^a Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Ökologische und Pflanzen-Biochemie, Kurt-Mothes-Straße 3, 06120 Halle (Saale), Germany.
E-mail: dirk.wesenberg@biochemtech.uni-halle.de;
Fax: +49 3455527012

^b Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Corrensstrasse 30, 48149, Münster, Germany

† Electronic supplementary information (ESI) available: ICP-MS signal of ⁵⁶Fe, LC gradient course, measured and calculated exact masses of phytochelatins and concentrations of Fe, Cu and Zn in the TAP culture medium determined by ICP-OES. See DOI: 10.1039/c005014h

- 4.3. ABC 2010: „Rapid and simple UPLC-MS/MS method for precise phytochelatin quantification in alga extracts.”

Bräutigam, A.; Wesenberg, D.; Preud'homme, H.; Schaumlöffel, D.

Analytical and Bioanalytical Chemistry **2010**, 398 (2), 877-883

DOI 10.1007/s00216-010-3970-7

Eigenanteil

Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente; Manuskriptentwurf;
korrespondierende Autorin

Rapid and simple UPLC-MS/MS method for precise phytochelatin quantification in alga extracts

Anja Bräutigam · Dirk Wesenberg ·
Hugues Preud'homme · Dirk Schaumlöffel

Received: 11 May 2010 / Revised: 23 June 2010 / Accepted: 24 June 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Quantitative phytochelatin (PC) analysis is, due to oxidation sensitivity of the PCs, matrix effects, and time consuming sample preparation, still a challenging analytical task. In this study, a rapid, simple, and sensitive method for precise determination of native PCs in crude extracts of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* was developed. Algae were exposed 48 h to 70 μM Cd. Coupling of ultra performance liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry with multi-reaction mode transitions for detection permitted the required short-time, high-resolution separation and detection specificity. Thus, under optimized chromatographic conditions, 10 thiol peptides were baseline-separated within 7 min. Relative detection limits in the nanomolar range in microliter sample volumes were achieved (corresponding to absolute detection limits at femtomol level). Next to glutathione (GSH), the most abundant cadmium-induced PCs in *C. reinhardtii*,

namely CysGSH, PC₂, PC₃, CysPC₂, and CysPC₃, were quantified with high reproducibility at concentrations between 15 and 198 nmol g⁻¹ fresh weight. The biological variation of PC synthesis of nine independently grown alga cultures was determined to be on average 13.7%.

Keywords Phytochelatin quantification · *Chlamydomonas* · UPLC · ESI-MS/MS

A. Bräutigam (✉) · D. Wesenberg
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Institut für Biochemie und Biotechnologie,
Ökologische und Pflanzen-Biochemie,
Kurt-Mothes-Straße 3,
06120 Halle (Saale), Germany
e-mail: anja.braeutigam@biochemtech.uni-halle.de

H. Preud'homme · D. Schaumlöffel
Université de Pau et des Pays de l'Adour/CNRS UMR 5254,
Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique
et Environnement/IPREM,
Hélioparc, 2 av. du Président Angot,
64053 Pau, France

Present Address:

A. Bräutigam
Landeskriminalamt Sachsen-Anhalt,
Lübecker-Str. 53-63,
39124 Magdeburg, Germany

Published online: 15 July 2010

 Springer

4.4. „Physiological characterisation of cadmium exposed *Chlamydomonas reinhardtii*.”

Bräutigam, A.; Schaumlöffel, D.; Preud'homme, H.; Thondorf, I.; Wesenberg, D.

Plant Cell and Environment **2011**

DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02404.x

Eigenanteil

Planung, Durchführung und Auswertung folgender Experimente: Algenanzucht, AAS, Molekularbiologie, Thiolanalyse; Manuskriptentwurf

Physiological characterization of cadmium-exposed *Chlamydomonas reinhardtii*

ANJA BRÄUTIGAM¹*, DIRK SCHAUMLÖFFEL², HUGUES PREUD'HOMME², IRIS THONDORF¹ & DIRK WESENBERG¹

¹Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Ökologische und Pflanzen-Biochemie, 06120 Halle (Saale), Germany and ²Université de Pau et des Pays de l'Adour/CNRS UMR 5254, Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement/IPREM, Hélioparc, 64053 Pau, France

ABSTRACT

Chlamydomonas reinhardtii is a common model organism for investigation of metal stress. This green alga produces phytochelatins in the presence of metal ions. The influence of cadmium is of main interest, because it is a strong activator of phytochelatin synthase. Cell wall bound and intracellular cadmium content was determined after exposition to 70 μM CdCl_2 , showing the main portion of the metal outside the cell. Nevertheless, imported cadmium was sufficient to cause significant changes in thiolpeptide metabolism and its transcriptional regulation. Modern analytical approaches enable new insights into phytochelatin (PC) distribution. A new rapid and precise UPLC-MS method allowed high-throughput PC quantification in algal samples after 1, 4, 24 and 48 h cadmium stress. Initially, canonic PCs were synthesized in *C. reinhardtii* during cadmium exposition, but afterwards CysPCs became the major thiolpeptides. Thus, after 48 h the concentration of the PC-isoforms CysPC_{2,3} and CysGSH attained between 105 and 199 nmol g^{-1} fresh weight (FW), whereas the PC_{2,3} concentrations were only 15 nmol g^{-1} FW. The relative quantification of γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT) mRNA suggests the generation of CysPCs by glutamate cleavage from canonic PCs by γ -GT. Furthermore, a homology model of *C. reinhardtii* phytochelatin synthase was constructed to verify the use of crystal structures from *Anabaena* sp. phytochelatin synthase (PCS) for docking studies with canonical PCs and CysPCs. From the difference in energy scores, we hypothesize that CysPC may prevent the synthesis of canonical PCs by blocking the binding pocket. Finally, possible physiological reasons for the high abundance of CysPC compared with their canonic precursors are discussed.

Key-words: cadmium; glutathione; phytochelatins; phytochelatin synthase; γ -glutamyl transpeptidase.

Correspondence: D. Wesenberg. e-mail: dirk.wesenberg@biochemtech.uni-halle.de

*Present address: Landeskriminalamt Sachsen-Anhalt, Lübecker Str. 53–63, 39124 Magdeburg, Germany.

© 2011 Blackwell Publishing Ltd

1

5. Zusammenfassende Diskussion

5.1. Identifizierung und Quantifizierung von Phytochelatinen

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Publikationen (Bräutigam *et al.*, 2009b; Bräutigam *et al.*, 2010a; Bräutigam *et al.*, 2010b) beschreiben die Herangehensweise zur Etablierung eines Analyseprotokolls für eine geeignete Methodik zur Identifizierung und Quantifizierung von Phytochelatinen am Modellorganismus *Chlamydomonas reinhardtii*. Eine kurze Übersicht der erarbeiteten Methoden bieten Abbildung 5 und Tabelle 2 (S. 41).

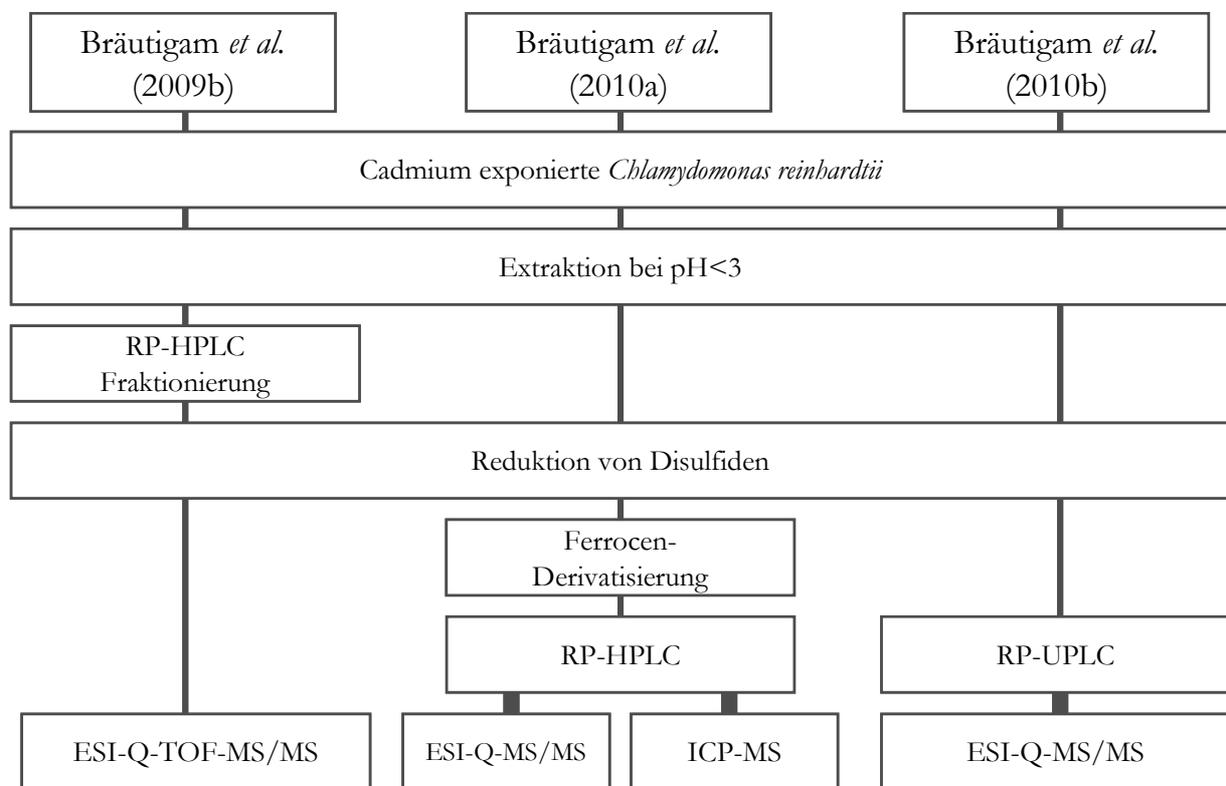


Abbildung 5 Methodische Vorgehensweise der vorliegenden Arbeit für die Identifizierung und Quantifizierung der Apoformen von PC.

Ogleich die Synthese von PC als Reaktion auf Cadmium für diese Alge bereits seit mehr als 20 Jahren bekannt ist (Gekeler *et al.*, 1988), versäumten die Autoren bisheriger Studien die gewissenhafte qualitative Analyse dieser Thiole. Als Analyse-Methode wurde in der Regel HPLC mit DTNB-Nachsäulenderivatisierung eingesetzt. Die vermeintliche Identifizierung in *C. reinhardtii* erfolgte entweder anhand von Standardsubstanzen oder aufgrund eines Vergleichs der Retentionszeiten mit anderen Arbeiten (Howe & Merchant, 1992; Kobayashi *et al.*, 2006; Nishikawa *et al.*, 2006). Photometrische Methoden allein sind zur eindeutigen Identifizierung

komplexer Muster an PC nicht geeignet. Bei bisherigen Arbeiten mit *C. reinhardtii* wurde immer außer Acht gelassen, dass unter bestimmten Bedingungen Cumarine die gleichen UV/VIS-Absorptionseigenschaften wie PC haben (Berlich *et al.*, 2002). Analog zu *C. reinhardtii* kann auch bei anderen Organismen davon ausgegangen werden, dass durch unzureichende PC-Analyse eventuell gebildete Isoformen nicht identifiziert wurden (Tabelle 1, S. 10). Der Einsatz von ESI-MS bietet eine Möglichkeit, PC mit hoher Sensitivität und Selektivität zu identifizieren (Wesenberg *et al.*, 2010).

Im Folgenden soll auf zwei wesentliche Faktoren für eine vollständige und akkurate PC-Analyse näher eingegangen werden: Autooxidation und Sequenzhomologien der PC.

Die Bildung von intra- bzw. intermolekularen Disulfidbrücken durch **Autooxidation** stellt eine potenzielle Fehlerquelle sowohl bei der qualitativen als auch quantitativen Analyse dieser Peptide dar. Trotz Zugabe von DTT als Reduktionsmittel konnten oxidierte PC in *C.-reinhardtii*-Extrakten mittels ESI-MS/MS nachgewiesen werden (Bräutigam *et al.*, 2009b). Die Oxidationsrate war so hoch, dass bei nur oberflächlicher Betrachtung der Massenspektren die Existenz einiger PC übersehen werden könnte, da die Signalintensität der reduzierten PC nur sehr gering war. Auffällig bei nicht vollständig reduzierten Proben war die Abundanz von Peaks bei m/z mit einer Differenz von -1 bis -n zu den jeweiligen reduzierten PC_n, wobei es sich um Oxidationsprodukte handeln kann (exemplarisch für CysPC₃ in Tabelle 3, S. 41). Auch bei Pawlik-Skowronska *et al.* (2002, Fig. 2) war die Zugabe von DTT nicht ausreichend. Augenscheinlich ist, dass PC₂ nicht nur beim m/z 540 detektiert wurde, sondern als wesentlich intensiverer Peak beim m/z 538. Durch näheres Betrachten der ESI-MS-Spektren erkennt man Peaks bei den m/z von 641 und 872, die keinem PC zugeordnet wurden. Es könnte sich jedoch um oxidierte Formen von CysPC₂ (intra- o. intermolekulare Oxidation, $[M+H]^+/[M+2H]^{2+}$) und CysPC₃ (intermolekulare Oxidation, $[M+2H]^{2+}$) handeln. Des Weiteren wurde das m/z 711 detektiert, welches ein oxidiertes PC₃desGly oder oxidiertes CysPC₂Glu sein könnte (s. u.). Bei der untersuchten Grünalge *Stichococcus bacillaris* wurden also vermutlich nicht alle gebildeten PC identifiziert. Analog zu Pawlik-Skowronska *et al.* (2002) muss aufgrund unzureichender Reduktion in vielen Arbeiten von einer unvollständigen Identifizierung und fehlerhafter Quantifizierung von PC ausgegangen werden (Tabelle 1, S. 10).

Vermutlich beruht auch das Dogma, dass PC mit bis zu elf γ -EC-Einheiten gebildet werden, auf einem durch Oxidation verursachten Artefakt. Grill *et al.* (1987) postulieren die Bildung von PC₁₁ in *Raunolfia serpentina* nach einer HPLC-Analyse der Zellextrakte. Ob zusätzlich eine Aminosäureanalyse durchgeführt wurde, geht aus der Arbeit nicht hervor. Die Autoren behandelten die Probe zwar mit Natriumborhydrid, aber nach diesem Reduktionsschritt folgten

weitere Aufarbeitungsschritte und die Chromatographie. Die Bildung oxidierter PC ist also wahrscheinlich. Somit ist die falschpositive Detektion eines intermolekularen Disulfids (z. B. PC₅-Dimer, 2468 Da) als PC₁₁ (2627 Da) möglich, da diese Moleküle ähnliche Retentionseigenschaften bei der Gelpermeationschromatographie haben können.

Zwar ist durch Anwendung von Tandem-MS prinzipiell auch eine Sequenzierung oxidierter PC möglich, da aber auch gemischte Oxidationsprodukte (z. B. PC_{2,3}, Bräutigam *et al.*, 2009b) auftreten können, ist die Zahl der möglichen m/z kaum überschaubar. Des Weiteren ist die Zahl der gebildeten Fragmentionen gering, da die Disulfidbindungen bei einer „*low energy collision induced dissociation*“ stabil sind (Montes-Bayón *et al.*, 2004; Mormann *et al.*, 2008). Der Einsatz eines effektiven Reduktionsmittels ist für die möglichst vollständige PC-Identifizierung unumgänglich. Häufig wird DTT (E° -330 mV) verwendet. Aufgrund seines Redoxpotenzials ist DTT effektiver als 2-Mercaptoethanol (E° -260 mV) und prinzipiell auch bei der MS-Analyse von Thiolpeptiden geeignet (El-Zohri *et al.*, 2005). DTT ist jedoch nur in seiner negativ geladenen Form (-S⁻, Thiolation) aktiv. Weist die Probe aber einen sauren pH-Wert auf, ist die Verwendung von DTT nicht oder nur nach pH-Neutralisierung (verbunden mit Matrixeintrag) sinnvoll. Aufgrund der beiden Thiolgruppen des DTT-Moleküls kann es, analog zu den PC, rasch autooxidieren. In früheren Studien wurde nachgewiesen, dass TCEP ein effektiveres Reduktionsmittel als DTT ist (Han & Han, 1994; Getz *et al.*, 1999). Unsere Arbeiten bestätigen dies auch für die Reduktion von oxidierten PC (Bräutigam *et al.*, 2009b).

Die Beobachtung von oxidierten PC trotz Einsatz von TCEP (Simmons *et al.*, 2009), ist vermutlich auf den Einsatz einer zu geringen Konzentration des Reduktionsmittels zurückzuführen. Um die Oxidation von vornherein zu vermeiden, entwickelten die Autoren eine aufwendige Strategie, bei der die Probe weitestgehend unter Sauerstoffausschluss aufgearbeitet wird. Da in den letzten Jahren eine Beteiligung von PC bei der Entgiftung von ROS diskutiert wird (Tsuji *et al.*, 2002; Gonzalez-Mendoza *et al.*, 2007), könnte der Ansatz von Simmons *et al.* (2009) einen Beitrag zur Quantifizierung der *in vivo* oxidierten PC liefern. Allerdings kann selbst unter sauerstofffreien Bedingungen eine artifizielle Oxidation nicht ausgeschlossen werden, da bei der Zellextraktion sowohl redoxaktive Metalle freigesetzt werden als auch Wasserstoffperoxid entstehen kann (Zerstörung der Peroxisomen). Deshalb ist die Publikation von Baralkiewicz *et al.* (2009) äußerst kritisch zu betrachten ist. Hier wird die mögliche artifizielle Entstehung der oxidierten Formen nicht einmal in Betracht gezogen. Die Identifizierung von *in vivo* vorliegenden PC ist nicht trivial und bis heute nicht gelungen, da keine Diskriminierung zu den bei der Aufarbeitung entstandenen oxidierten PC möglich ist.

Obwohl ESI eine sanfte Ionisierungsmethode ist, kann es aufgrund des Curtain-Gases und der angelegten Spannung zu einem Zerfall der Analyten in der Ionenquelle kommen (*in-source*-Fragmentierung). Da alle PC **Sequenzhomologien** aufweisen, führt dieser Zerfall zu falschpositiven Ergebnissen, weil manche dieser Fragmente die gleiche Masse wie unfragmentierte PC haben (z. B. y_6 von PC₃ -E\CECECG- *vs.* CysPC₂ -CECECG-). Die von Pawlik-Skowronska *et al.* (2002) mittels offline MS-Analyse nicht-zugeordneten Peaks könnten somit theoretisch aus einer *in-source*-Fragmentierung stammen, wie sie auch bei Vacchina *et al.* (1999) und Bräutigam *et al.* (2009b) beobachtet wurden. Eine solche Fragmentierung ist bei Pawlik-Skowronska *et al.* (2002) aber nicht in jedem Fall wahrscheinlich. So ist beispielsweise in einem Massenspektrum neben dem zugeordneten Peak bei m/z 483 ein weiterer Peak bei m/z 641 zu erkennen, welcher kein Fragment von der niedermolekularen Substanz sein kann (höhere PC sind in diesem Spektrum nicht detektiert).

Des Weiteren führt die alleinige Bestimmung des m/z aufgrund von Sequenzhomologien bei der PC-Analyse nicht hinreichend zur eindeutigen Identifizierung. So haben CysPC_nGlu dieselbe monoisotopische Masse wie PC_{n+1}desGly (z. B. CECE *vs.* ECEC). Um diese beiden Isoformen eindeutig nachzuweisen, müssen Tandem-MS-Experimente durchgeführt werden. Hierbei unterscheidet sich nur jedes zweite b- und y-Fragmentation der Substanzen voneinander (Bräutigam *et al.*, 2009b). Außerdem haben PC₂Ala ($[M+H]^+=554,1590$) und CysPC₄ ($[M+2H]^{2+}=554,1318$) ähnliche m/z . Bei einer *offline*-Analyse gibt auch hier nur die Fragmentierung der Peptide Aufschluss (Bräutigam *et al.*, 2009b).

Um falschpositive Identifizierungen aufgrund von *in-source*-Fragmentierungen oder isobarer Ionen möglichst auszuschließen und die Ionisierungssuppression durch Matrixbestandteile zu vermeiden, kann die Kombination von LC und MS genutzt werden. Hier dient die Retentionszeit als zusätzliches Identifizierungsmerkmal. Da es während der LC zur Oxidation der PC kommen kann und die Retentionseigenschaften der polaren PC auf RP-Säulenmaterial verbessert werden sollten, wurde eine Methode zur Vorsäulenderivatisierung mit dem Ferrocen **FMEA** entwickelt (Bräutigam *et al.*, 2010a). FMEA besitzt eine N-substituierte Maleimidgruppe, die bei neutralem pH-Wert selektiv mit Thiolen reagiert (Abbildung 2, S.12, Smyth *et al.*, 1960). Für eine vollständige Derivatisierung müssen auch hier zunächst mögliche PC-Disulfide reduziert werden. Die Reduktionsmittel DTT, 2-Mercaptoethanol und TCEP reagieren jedoch selbst mit Maleimiden (NEM, Shafer *et al.*, 2000; Rhodamin Red C2 Maleimid, Tyagarajan *et al.*, 2003), wobei TCEP die Derivatisierungseffizienz an Thiolen am wenigsten herabsetzt (Tetramethylrhodamin-Maleimid-Derivatisierung von Meromyosin (HMM), Getz *et al.*, 1999). So wurde für die Reduktion der PC aus *C. reinhardtii* TCEP eingesetzt (Bräutigam *et al.*, 2010a).

Die PC-FMEA-Derivatisierungsprodukte sind hydrophober als native PC und haben somit verbesserte Retentionseigenschaften in der RP-HPLC. Die Detektion der Ferrocene kann mit UV/VIS-Spektroskopie und auch elektrochemisch erfolgen, da sich das Eisen(II) einfach in Eisen(III) umwandeln lässt (Seiwert & Karst, 2008). Eisen eignet sich aber auch zur elementspezifischen Detektion mit Atomabsorptionsspektroskopie oder ICP-MS.

Die Grundvoraussetzung für die akkurate quantitative LC-ICP-MS-Analyse der Ferrocen-Derivate ist die Basislinientrennung der eisenhaltigen Substanzen sowie die eindeutige Zuordnung der Peaks (Tholey & Schaumlöffel, 2010). Aus diesem Grund wurde zunächst die LC-ESI-MS zur Peakidentifizierung genutzt. Obwohl die Derivate recht unpolar sind, kann aufgrund der elektrochemischen Oxidation des Eisens in der Ionenquelle das Kation $[M]^+$ mit der ESI-MS detektiert werden (Huang *et al.*, 1998). Da PC_n n Thiolgruppen enthalten, kann das PC_n -FMEA_n ein- bis n-fach positiv geladen vorliegen. Neben den verschiedenen $[M]^{x+}$ können auch die positiv geladenen Ionen $[M+H]^{x+}$ und „Mischformen“ des Fe(III)-Komplexes und Protonenaddukts entstehen. Hinzu kommt die natürliche Abundanz von Isotopen (z. B. ⁵⁷Fe, ¹³C), so dass für jedes PC-FMEA eine Vielzahl von Kationen in der ESI-MS detektiert werden können (Abbildung 6). Bei einer Direktinfusion kommt hinzu, dass manche Ionen, wie z. B. einfach positiv geladenes CysGSH-FMEA₂ und zweifach positiv geladenes CysPC₃desGly-FMEA₄ ähnliche m/z haben (Abbildung 6, S. 42 Anhang). Die ESI-MS-Spektren der FMEA-Derivate sind also recht komplex, so dass für eine *de-novo*-Sequenzierung der PC die ESI-MS der nativen PC zu bevorzugen ist (Bräutigam *et al.*, 2009b). Da aber die von *C. reinhardtii* synthetisierten PC unter den gewählten Bedingungen (48 h, 70 µM Cadmium) bereits bekannt waren, konnten die Peaks der PC-FMEA-Derivate mittels ESI-MS zugeordnet werden und somit war die Messung mit der LC-ICP-MS möglich.

Obwohl die Ionisierung bei der ICP-MS weitestgehend matrixunabhängig ist, war eine Quantifizierung allein anhand des Eisen-Signals ohne Standardsubstanzen nicht möglich, da die Trennung der PC-FMEA-Derivate nur durch einen Acetonitril-Gradienten erreicht werden konnte. Ein hoher Anteil an organischem Lösungsmittel kann zu Kohlenstoffablagerungen an den Konen führen. Trotz Einsatz von Sauerstoff als Reaktionsgas, um den Kohlenstoff zu oxidieren und somit Rußablagerungen zu verhindern, war das Eisen-Signal nicht konstant (Bräutigam *et al.*, 2010a). Mit Hilfe von Standardsubstanzen konnten für CysPC₂ und PC₂ Nachweisgrenzen von 690 bzw. 590 nM erreicht werden. Für GSH, CysPC₃ und PC₃ konnten aufgrund fehlender chromatographischer Auflösung keine Berechnungen durchgeführt werden.

Es wurde gezeigt, dass die PC-Derivatisierung mit Ferrocenen nahezu vollständig verläuft und auch eine Quantifizierung prinzipiell möglich ist. Um jedoch möglichst alle PC quantifizieren zu können, muss die Trennung weiter optimiert werden. Für eine präzise und akkurate Spezies-

unabhängige Quantifizierung mit der ICP-MS wäre eine Basislinientrennung unter isokratischen Bedingungen wünschenswert. Beispielsweise könnte die Verwendung eines UPLC-Systems eine solche Optimierung ermöglichen und zusätzlich die Analysenzeit herabsetzen.

Trotz der Vorteile beim Einsatz von Ferrocenen ist generell zu überlegen, ob Eisen das geeignete Element zur Detektion mit der ICP-MS ist. Zum Einem kommt Eisen als essenzielles Metall ubiquitär vor (z. B. Eisen-Schwefel-Proteine) und hat somit ein hohes Untergrundsignal. So wurden auch in dieser Arbeit bei Algenextrakten Eisen-EDTA-Komplexe sowie eine Vielzahl nicht identifizierter eisenhaltiger Substanzen detektiert (Bräutigam *et al.*, 2010a). Eisen hat zum Anderen den Nachteil, dass eine Vielzahl interferierender polyatomarer Verbindungen (z. B. $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ vs. ^{56}Fe), deren Bildung bei Einsatz von Sauerstoff zur Vermeidung von Kohlenstoffablagerungen noch verstärkt wird, den spektralen Hintergrund erhöhen. Um die falschpositive Detektion zu vermeiden, muss entweder eine Reaktions-/Kollisionszelle eingesetzt werden oder ein hochauflösendes MS verwendet werden, was gleichzeitig zum Verlust an Sensitivität führen kann (Tanner *et al.*, 2000; Ingle *et al.*, 2002).

Ein Element mit wenigen polyatomaren Interferenzen und niedrigem biologischen Hintergrund ist Quecksilber. Die Verwendung von quecksilberhaltigen Reagenzien zur thiolelektiven Derivatisierung von Proteinen (Takatera & Watanabe, 1992; Kutscher & Bettmer, 2009) und auch PC (Atomfluoreszenzspektroskopie-Detektion, Bramanti *et al.*, 2006) wurde bereits beschrieben. Nachteil von Quecksilber ist dessen geringe Ionisierungseffizienz und die Toxizität der organischen Quecksilberverbindungen.

Alternativ bietet sich der Einsatz von Derivatisierungsreagenzien an, die Metalle der Seltenen Erden enthalten (z. B. Lanthanoide). Diese Elemente können in der ICP-MS aufgrund ihrer niedrigen Ionisierungspotenziale, geringen Hintergrundsignale und der praktischen Abwesenheit von interferierenden Molekülen sehr sensitiv gemessen werden (Tholey & Schaumlöffel, 2010). Ahrends *et al.* (2007) beschreiben die quantitative Analyse von Proteinen durch Einsatz von ICP-MS nach Derivatisierung mit einem lanthanoidhaltigen Reagenz. Dieses Reagenz besteht aus einem Komplexbildner (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure, DOTA), einem *spacer* und einem Maleimid zur thiolelektiven Derivatisierung. Dieses Reagenz würde also die Vorteile von Maleimiden bei der Derivatisierung und von Lanthaniden bei der ICP-MS-Detektion vereinen. Die Thiolgruppen der PC sind nur durch eine Aminosäure getrennt, was zu sterischen Behinderungen bei der Reaktion führen kann. Die Anwendbarkeit des Reagenz für die Quantifizierung von PC müsste also aufgrund der Größe des Moleküls zunächst hinsichtlich der Derivatisierungseffizienz getestet werden. Für die Identifizierung möglicher unvollständiger Derivate kann die ESI- oder MALDI-MS/MS genutzt werden (Ahrends *et al.*, 2007; Gregorius *et al.*, 2010).

Solange keine Methode für die spezie-unabhängige Quantifizierung derivatisierter PC zur Verfügung steht, muss die Analyse mittels Standardsubstanzen durchgeführt werden. Da bisher der Einsatz von PC-Standards unabdingbar ist und eine Derivatisierung die Analyse zusätzlich kompliziert (Zeitaufwand, Derivatisierungs-Effizienz, selektive Detektion), wurde in dieser Arbeit eine quantitative Analysemethode für nicht derivatisierte PC entwickelt (Bräutigam *et al.*, 2010b). Hierbei ist die hohe Sensitivität und geringe Analysenzeit der etablierten Methode im Gegensatz zu existierende Ansätzen für LC-ESI-MS-basierte Quantifizierung nativer PC hervorzuheben. So erreichten El-Zhori *et al.* (2005) Nachweisgrenzen (NWG) von 33 nM für PC_{2,3}. Sarry *et al.* (2006) setzten eine LC-MS-Kopplung für die Analyse von kanonischen und Iso-PC ein. Simmons *et al.* (2009) konnten NWG von 81 nM, 440 nM und 120 nM für GSH, PC₂ bzw. PC₃ ermitteln. Allerdings war der Zeitaufwand für die Analyse aufgrund der Chromatographie (25-45 min) auch ohne Anwendung einer Derivatisierung hoch. Hinzu kommt, dass die underivatisierten Thiole während der langwierigen Trennung oxidieren können und somit die Quantifizierung verfälscht werden kann. Um die chromatographische Trennung zu verbessern, bietet sich die **UPLC** an. Bereits vorhandene HPLC-Methoden können einfach auf die UPLC übertragen werden. Die Trennleistung der UPLC ist aufgrund der geringen Partikeldurchmesser der stationären Phase (< 2 µm) wesentlich besser (Guillarme *et al.*, 2009). Bei Anwendung für die PC-Analyse verbleibt also ein kürzerer Zeitraum für die potenzielle Oxidation der Peptide. Außerdem ermöglicht die UPLC einen hohen Probendurchsatz bei geringem Lösungsmittelverbrauch.

In der vorliegenden Arbeit wurde vor der Analyse TCEP zur Reduktion eingesetzt (Bräutigam *et al.*, 2010b). Um die Vollständigkeit der Reduktion zu überprüfen wurde GSSG analysiert, welches nach Einsatz von TCEP nicht mehr detektiert werden konnte, obwohl TCEP direkt ohne Pufferung zu dem Algenrohextrakt (in 0,1 N HCl, pH≈2) gegeben wurde. Die Möglichkeit, die Extrakte ohne weitere Aufreinigung oder pH-Neutralisierung für die Analyse einsetzen zu können, führt nicht nur zu einer Zeitersparnis sondern vermeidet auch Fehlerquellen. Nach der Reduktion konnten die Proben direkt zur UPLC-ESI-MS-Analyse verwendet werden. Bräutigam *et al.* (2010b) gelang mit der UPLC die Basislinien-Trennung von GSH, CysGSH, PC₂, CysPC₂, PC₃ und CysPC₃ aus Rohextrakten von *C. reinhardtii* innerhalb von 6 min. Die Detektion erfolgte durch ESI-MS/MS im *multi-reaction-monitoring*-Modus (MRM). Trotz der spezifischen Detektion im MRM-Modus, war eine Basilientrennung der PC notwendig. Andernfalls wäre aufgrund der o. g. Sequenzhomologien die Quantifizierung durch die Abundanz von *in-source*-Fragmentierungen fehlerhaft. Da keine Puffersubstanzen eingesetzt wurden, konnten Matrixeffekte (z. B. Suppression der Ionisierung) gering gehalten werden. Dennoch war die

Analyse von Cystein und γ -EC unter den gewählten Bedingungen nicht möglich, da diese im Ausschlussvolumen eluierten.

Für die untersuchten Thiole konnten Nachweisgrenzen zwischen 2,5 (CysPC₂) und 16,8 nM (PC₃) erreicht werden. Auch PC₄ und CysPC₄ wurden analysiert, die Quantifizierung erfolgte aufgrund fehlender Standardsubstanzen relativ. Die entwickelte UPLC-ESI-MS/MS-Methode bietet also die Möglichkeit der schnellen und sensitiven PC-Quantifizierung aus *C.-reinhardtii*-Rohextrakten (absolute NWG im fmol-Bereich). Grundsätzlich ist der erfolgreiche Einsatz der Methode auch bei anderen Modellorganismen zu erwarten.

Die Ergebnisse der Quantifizierung durch die UPLC-ESI-MS bestätigten die Abschätzung der relativen PC-Abundanzen von PC₂, CysPC₂, PC₃ und CysPC₃, die durch Direktinfusion in die ESI-MS vorgenommen wurde (Bräutigam *et al.*, 2009b). Es kann also bei gleichen Bedingungen von einer ähnlichen Ionisierungseffizienz der PC in der ES-Ionenquelle ausgegangen werden. Dies ermöglicht die grobe Einschätzung von PC-Mengenverhältnissen, auch ohne das Vorhandensein von Standardsubstanzen.

Die ESI-MS ist demzufolge das derzeit wertvollste Analyseverfahren für die PC-Identifizierung und auch -Quantifizierung. Selbst wenn in Zukunft eine Spezies-unabhängige PC-Quantifizierungsmethode durch Einsatz metallhaltiger Derivate etabliert werden kann, wird die ESI-MS zur Peakidentifizierung und zur Überprüfung von Reduktion und Derivatisierungseffizienz weiterhin eine wesentliche Rolle spielen.

5.2. *Chlamydomonas reinhardtii* unter Cadmiumstress

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Methoden zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von PC (Bräutigam *et al.*, 2009b; Bräutigam *et al.*, 2010b) ermöglichten die repräsentative Untersuchung der PC-Gehalte in *C. reinhardtii* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe von Cadmium (Bräutigam *et al.*). Um ein komplexes physiologisches Bild der Alge unter Cadmiumstress zeichnen zu können, wurden weitere Parameter untersucht: die extra- und intrazelluläre Cadmiumkonzentration; Gehalte an Cystein, γ -EC, GSH, GSSG und der relative mRNA-Gehalt detoxifizierungsrelevanter Enzyme (Bräutigam *et al.*).

Obwohl Umweltbedingungen im Labor nur schwer nachzuempfinden sind, sollte die bei der Untersuchung von Cadmiumstress einzusetzende **Cadmiumkonzentration** bewusst gewählt werden. Zum Einem sollte diese ökologisch relevant und zum Anderen sollten die exponierten Zellen noch vital sein (Ernst *et al.*, 2008). Die in dieser Arbeit eingesetzte Cadmiumkonzentration von 70 μ M (als CdCl₂) ist in Bodenlösung gemessen worden (Lee *et al.*, 2004) und hat unter den gewählten Experimentalparametern keinen signifikanten Einfluss auf Wachstum und Chlorophyllgehalt des untersuchten Wildtypstammes 11/32b, der ursprünglich aus dem Boden isoliert wurde (Harris, 1989; Bräutigam, 2006; Bräutigam *et al.*, 2010a).

Für eine Bewertung der Toxizität ist neben der zugesetzten Menge des Metalls insbesondere dessen intrazelluläre Konzentration von Bedeutung. Aufgrund von Adsorptionseffekten (z. B. an der Glaswand) oder Präzipitation (abhängig vom Kulturmedium) kann der bioverfügbare Metallgehalt variieren. Die physiologisch wirksame und demnach relevante Konzentration ist aber die intrazelluläre. Da die hohe Affinität der Zellwand von *C. reinhardtii* gegenüber Cadmium bekannt war, wurde auch der so immobilisierte Anteil des Metalls bestimmt.

Bei der Auswertung der Daten zur Cadmiumakkumulation kommt es scheinbar zu einem Widerspruch: Die Absolutmenge an adsorbiertem und intrazellulär akkumuliertem Cadmium sank während der Inkubationszeit ab, obwohl die Konzentration im Medium noch hoch war. Betrachtet man aber die Relativwerte, so kam es zu einer Erhöhung des zellwandgebundenen und einem konstanten Wert des intrazellulären Metalls. Dieses Phänomen resultiert aus der Biomassezunahme während der 48 h Experimentierzeit. Maeda *et al.* (1990) beobachteten ein ähnliches Verhalten bei *Chlorella vulgaris* (109 μ M Cadmium). Die Autoren verglichen tote Biomasse und vitale Zellen in ihrer Cadmiumbindefähigkeit. Während die adsorbierte

Cadmiummenge des toten Materials kontinuierlich stieg, kam es bei den Zellen zu einem Abfall dieser nach 5 d Inkubation (Maeda *et al.*, 1990).

In der vorliegenden Arbeit lag der Großteil des zugegebenen Cadmiums extrazellulär vor (Bräutigam *et al.*). Diese Situation konnte auch bei anderen Stämmen der Grünalge beobachtet werden (Bräutigam *et al.*, 2009a). *C. reinhardtii* kann Cadmium u. A. an Carboxylgruppen der Zellwand adsorbieren (Adhiya *et al.*, 2002). Dass die Zusammensetzung der Zellwand entscheidend für deren Cadmiumbindefähigkeit ist, wurde bereits an Rotalgen gezeigt. García-Ríos *et al.* (2007) wiesen bei *Gracilaria cornea*, deren Zellwand Polysaccharide enthält, eine höhere Bindekapazität im Vergleich zu *Chondrophycus poiteaui*, welche keine unlöslichen Polysaccharide besitzt, nach. Auch bei *C. reinhardtii* hat eine veränderte Zellwandzusammensetzung Einfluss auf die Bindung der Metallionen. Der Mutante CW15 fehlen Schichten der Zellwand, die einen hohen Anteil an hydroxyprolinreichen Glykoproteinen aufweisen, die vermutlich auch an der Cadmiumbindung beteiligt sind (Harris, 1989). So kam es bei dieser Mutante zu einer verzögerten Biosorption des Metalls an der Zellwand im Vergleich zum Wildtypstamm 11/32b (S.42, Abbildung 7).

Beim Wildtyp 11/32b wurde nur wenig Cadmium ins Zellinnere aufgenommen ($0,07\text{--}0,67 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$ Trockenmasse). Bei CW15 konnte nach 48 h Cadmiumexposition intrazellulär eine höhere Cadmiumkonzentration nachgewiesen werden (S. 42, Abbildung 7). Im Vergleich zur untersuchten Grünalge wurden bei der Rotalge *C. poiteaui* ähnliche intrazelluläre Konzentrationen schon unter Zugabe von nur $8,9 \mu\text{M}$ Cadmium gemessen (García-Ríos *et al.*, 2007). So leistet beim *C. reinhardtii* Wildtyp als auch bei der Mutante die Zellwand einen großen Anteil bei der Detoxifizierung von Cadmium (*avoidance*-Mechanismus).

Obwohl vergleichsweise wenig Metall von *C. reinhardtii* inkorporiert wurde, war die Konzentration ausreichend um signifikante Änderungen im **Thiolmetabolismus** hervorzurufen. Cadmium verursachte eine signifikante Abnahme des Gehaltes an Cystein, γ -EC und GSH beim Stamm 11/32b. Auch beim Wildtypstamm C9 wurde ein Absinken dieser Thiole verzeichnet ($70 \mu\text{M}$ Cd, TAP-Medium, Bräutigam *et al.*, 2009a). Zum Einfluss von Cadmium auf die Cys- und γ -EC-Konzentration in *C. reinhardtii* existieren in der Literatur jedoch auch widersprüchliche Ergebnisse. Beispielsweise wurden bei verschiedenen Wildtypstämmen ($100 \mu\text{M}$ Cd, modifiziertes TAP-Medium, Howe & Merchant, 1992; $70 \mu\text{M}$ Cd, TAP-Medium, Bräutigam *et al.*, 2009a) und Mutanten ($100 \mu\text{M}$ Cd, modifiziertes TAP-Medium, Hu *et al.*, 2001) eine erhöhte Cysteinkonzentration detektiert. Die Diskrepanz in den Ergebnissen kann ihre Ursache in den unterschiedlichen Bedingungen bei der Kulturführung (z. B. Metallkonzentration, Medium, Inkubationsdauer) haben. So konnten Suárez *et al.* (2010) bei *Chlamydomonas moewusii* einen Anstieg

oder aber Abfall des Cysteins feststellen, abhängig von der Cadmiummenge. Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten stimmten die experimentellen Parameter überein, so dass hier verschiedene *C. reinhardtii*-Stämme miteinander verglichen werden konnten. Die Wildtypstämme C9, CC124, CC125 und 11/32b unterschieden sich in Art und Intensität ihrer Reaktion auf Cadmiumstress bezüglich ihres Cystein- und γ -EC-Gehaltes, obwohl sie vom selben Isolat abstammen (Lippmann, 2007). Nach der Weitergabe der von 1949 Smith isolierten Kultur an verschiedene Arbeitsgruppen in den 50er Jahren kam es also zu einer divergenten Entwicklung (Harris, 1989).

Betrachtet man das GSH, so ist in vielen Studien ein eindeutiger Trend zu beobachten. Cadmium verursacht ein Absinken der GSH-Konzentration (Howe & Merchant, 1992; Hu *et al.*, 2001; Bräutigam *et al.*, 2009a; Bräutigam *et al.*). Auch bei den PC bildenden Pflanzen *A. thaliana* (Sarry *et al.*, 2006) und *Vicia faba* (El-Zohri *et al.*, 2005) ist bei Cadmiumbelastung ein absinkender GSH-Gehalt zu beobachten. Dies ist mit dem erhöhten Verbrauch des Tripeptids durch die PC-Synthese zu erklären.

Lediglich eine Studie beschreibt eine Zunahme der GSH-Konzentration bei *C. reinhardtii* im Vergleich zur Kontrolle, jedoch ohne simultan den PC-Gehalt zu untersuchen (Stoiber *et al.*, 2010). Der Grund für die GSH-Erhöhung ist vermutlich die geringe Menge an zugegebenem Cadmium (im nM-Bereich). In diesem Konzentrationsbereich kann die Zelle durch Enzymregulation den erhöhten Bedarf an GSH ausgleichen. Die Autoren konnten zwar keine Erhöhung der γ -ECS mRNA feststellen, aber durch eine Aktivitätssteigerung könnte dennoch vermehrt GSH synthetisiert werden. Für *C. acidophila* konnte dies bereits nachgewiesen werden (Nishikawa *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde für *C. reinhardtii* nach 24 und 48 h Cadmiumbelastung eine Erhöhung der γ -ECS-mRNA im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Die GSHS-Expression hingegen wurde nicht signifikant erhöht. Da die γ -ECS der geschwindigkeitsbestimmende Faktor der GSH-Synthese ist, erfolgt deren Regulation vorwiegend über dieses Enzym.

Wie bereits im Kapitel 5.1 beschrieben, synthetisiert *C. reinhardtii* **Phytochelatine** als Reaktion auf Cadmium. Die Gesamtkonzentration der PC steigt während der Inkubationsdauer an. Im Gegensatz dazu beschreiben Nishikawa *et al.* (2006) für *C. acidophila* KT-1 ein Absinken der PC von Tag 1 auf Tag 4 nach Cadmiumgabe. Ein Grund hierfür kann die Analysenmethode, bei der nur kanonische PC untersucht wurden, sein (siehe 6.1). Die Autoren setzten weiterhin die Cadmiumakkumulationsfähigkeit zweier *C. acidophila*-Stämme mit deren PC-Konzentration in Relation und kommen zu dem Ergebnis „*Phytochelatins do not correlate with the level of Cd accumulation in Chlamydomonas spp.*“ (Nishikawa *et al.*, 2006). Diese Schlussfolgerung ist nicht haltbar, solange

keine Aussage über eventuell gebildete Iso-PC getroffen werden kann. Auch bei *C. moewusii* könnten neben den klassischen PC Isoformen gebildet werden, was u. U. den Rückgang der Konzentration an PC_{2,4} bei steigender Cadmiumgabe erklären kann (Suárez *et al.*, 2010). Für *C. reinhardtii* wäre es denkbar, dass ähnlich wie bei *A. thaliana*, Isoformen vorwiegend bei hohen Metallkonzentrationen gebildet werden (Sarry *et al.*, 2006). Sarry *et al.* wiesen PC_{3,4}-Ser, PC₂Glu und PC₃Gln nur bei Zusatz von 200 µM Cadmium nach (nicht bei 50, 5 u. 0,5 µM). Die Autoren vermuten, dieser Mechanismus dient dazu GSH für andere zelluläre Prozesse aufzusparen. Auch in dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, was der Vorteil von Iso-PC, insbesondere der CysPC, gegenüber den kanonischen PC ist (Bräutigam *et al.*). CysPC sind höchstwahrscheinlich Abbauprodukte von kanonischen PC. So steht die Einsparung von GSH durch die alternative Verwendung von GSH-Isoformen in diesem Fall nicht zur Diskussion. Für die hohe Abundanz der CysPC in *C. reinhardtii* (Bräutigam *et al.*) und *S. tenue* (Pawlik-Skowronska, 2003) können andere Vorteile angenommen werden: a.) Jedes CysPC_n „spart“ gegenüber seinem Vorläufermolekül PC_{n+1} bei gleich bleibender Anzahl der Cysteine ein Glutamat. Das recycelte Glutamat kann wieder für die Synthese von GSH eingesetzt werden, zumal Cadmium einen erhöhten Bedarf an dem Tripeptid verursacht. b.) Da zusätzlich die *de-novo*-Synthese von Glutamat durch das Metall gestört wird, kann dies neben der gesteigerten Glutamat-Dehydrogenase-Aktivität ein alternativer Weg für die Bereitstellung der Aminosäure sein (Devriese *et al.*, 2001; Dominguez *et al.*, 2003; Mosulén *et al.*, 2003; Gillet *et al.*, 2006). c.) CysPC_n könnten gegenüber PC_{n+1} (gleiche Cystein-Anzahl) eine erhöhte Bindekapazität aufweisen. d.) Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit die mögliche Inhibierung der PCS von *Chlamydomonas* durch CysPC postuliert (Bräutigam *et al.*). Modelling-Experimente zeigten, dass CysGSH (CysPC) mit GSH (PC) um das aktive Zentrum des Enzyms konkurriert. Aufgrund der höheren Bindungskapazität der Isoformen können diese als kompetitive Inhibitoren für die PC-Synthese agieren. Die Verifizierung dieser Hypothese bedarf jedoch weiterführender Studien. Ein *in-vitro*-Aktivitätstest der PCS in Gegenwart von GSH und verschiedener Konzentrationen CysPC könnte Anhaltspunkte liefern. Da die Thiole *in vivo* kompartimentiert vorliegen, ist eine Kenntnisnahme der lokale Konzentration notwendig. Die Gesamtkonzentration der Thiole einer Zelle ist wenig aussagekräftig, weil PC in Vakuole und/oder Chloroplast transportiert werden (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005). Da die PCS im Cytosol aktiv ist, muss die cytosolische Konzentration der Thiole berücksichtigt werden (Blum *et al.*, 2010). Wenn beispielsweise GSH in deutlich höherer Konzentration vorliegen würde als CysPC, wäre eine tatsächliche Hemmung der PCS durch die CysPC unwahrscheinlich. Ein weiterer Faktor ist die Cadmiumbeladung der Thiole, denn nur die Apoformen der Thiole können an das aktive Zentrum der PCS binden. Die

Analyse zellulärer Metall-Thiol-Komplexe (Metallothiolom) ist Gegenstand aktueller Forschung (Wesenberg *et al.*, 2010).

Weiterhin bleibt die Frage zu klären wie und wo CysPC entstehen. Für *C. reinhardtii* wird die Abspaltung des Glutamats durch eine γ -Glutamyltranspeptidase (GGT) postuliert (Bräutigam *et al.*, 2009b). Die Beteiligung dieses Enzyms am Abbau von GSH wurde bereits nachgewiesen (Martin & Slovin, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde nach Cadmiumzugabe eine Erhöhung der Expression, der für dieses Enzym codierenden mRNA, festgestellt (Bräutigam *et al.*). *In-silico*-Studien (www.wolfsort.org) konnten jedoch keinen eindeutigen Enzym-Zielort vorhersagen. Somit muss auch die intrazelluläre Lokalisation der GGT in weiterführenden Experimenten geklärt werden. *A. thaliana* z. B. hat vier funktionelle Gene für GGT (Martin *et al.*, 2007). GGT1 und GGT2 sind extrazellulär lokalisiert (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007), während GGT4 in der Vakuole vorkommt und dort am Abbau von GSH-Xenobiotika-Komplexen beteiligt ist (Grzam *et al.*, 2007; Blum *et al.*, 2010). Auch *Raphanus sativus* besitzt eine vakuolär lokalisierte GGT (Nakano *et al.*, 2006). Falls die GGT von *C. reinhardtii* auch vakuolär lokalisiert ist, muss geklärt werden ob die entstehenden CysPC *in vivo* überhaupt mit der PCS in Kontakt kommen.

Eine weitere Frage, die sich im Zuge der Untersuchung bzw. bei der Sichtung von PC-Literatur stellt, ist ob PC mit bis zu 11 γ -EC-Einheiten synthetisiert werden. **PC₁₁** wird zwar vielfach zitiert, wurde aber nur einmal in der Literatur beschrieben (Grill *et al.*, 1987). Wie bereits in Kapitel 5.1. diskutiert, handelt es sich hierbei vermutlich um eine falschpositive Identifizierung. Torres *et al.* (1997) beschreiben PC₉ in *Phaeodactylum tricornutum*, allerdings nur auf Grundlage einer UV-Detektion (214 nm) ohne massenspektrometrischen Nachweis. Für *A. thaliana* ist PC₅ massenspektrometrisch nachgewiesen worden (Sarry *et al.*, 2006). Das größte in *C. reinhardtii* detektierte PC hat sechs γ -EC-Einheiten und ist nur gering konzentriert (Bräutigam *et al.*). Neben der fehlenden analytischen Evidenz von PC_{>6}, ist also deren physiologische Relevanz fraglich. Die Abundanz von PC und CysPC ist schon ab n>3 in *C. reinhardtii* nur gering (Bräutigam *et al.*, 2009b; Bräutigam *et al.*, 2010b). Die Bedeutung höherer PC bei der Cadmiumbindung ist also vernachlässigbar. Die Synthesewahrscheinlichkeit sinkt mit steigender Kettenlänge. Bei der PC₂-Synthese wird γ -EC auf GSH übertragen, während die Synthese höherer PC_n ein schon vorhandenes PC_{n-1} benötigt. Außerdem dient nur cadmiumfreies GSH bzw. PC der PCS als Substrat. Gusmão *et al.* (2010) zeigen, dass PC_n mit bis zu drei n PC_{n-1} als Cadmiumchelator verdrängen können. Also wird dem GSH das Cadmium durch PC entzogen, so dass PC mit höherer Wahrscheinlichkeit als Cadmiumchelat vorliegen und nicht durch die PCS verlängert werden können. Hinzukommt der Abtransport der metallbeladenen Thiole aus dem Cytosol in andere Kompartimente. Weiterhin konnten Gusmão *et al.* (2010) bei PC_{3,5} keine steigende

Metallbindefähigkeit mit steigender Kettenlänge beobachten, so dass die Bildung höherer PC vermutlich nicht zu stabileren Metallkomplexen führen würde.

6. Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden bieten die Möglichkeit der selektiven und sensitiven Identifizierung und Quantifizierung von PC-Apoformen aus Algenrohextrakten (Bräutigam *et al.*, 2009b; Bräutigam *et al.*, 2010b). Es können nun wichtige grundsätzliche Informationen über die PC-Zusammensetzung und deren Kinetik während einer Metallinkubation gewonnen werden. Die Methode ist generell auch auf andere Organismen anwendbar und durch Einsatz zusätzlicher Standardsubstanzen auf die Bestimmung weiterer PC ausdehnbar. Jedoch sind für eine detaillierte Beschreibung der Physiologie eines Organismus neben der Bestimmung von Summenparameter aus homogenisiertem Zellmaterial weitere Studien wünschenswert:

- Diskriminierung zwischen einzelnen Zelltypen bei mehrzelligen Organismen
- Die subzelluläre Verteilung der Thiole und der Metalle
- Die Zusammensetzung der Metall-Thiolkomplexe (unter Berücksichtigung weiterer Bindungspartner wie Sulfid und Carboxylaten)

Diese Differenzierungen sind sowohl auf Ebene der Probenvorbereitung als auch gerätetechnisch eine Herausforderung. Für die Isolation von Zellen oder Geweben aus Pflanzenorganen besteht die Möglichkeit der Laser-Mikrodissektion (Outlaw W.H. & Zhang, 2001; Murray, 2007). Die differenzielle Analyse von Zellkompartimenten (Cytosol, Chloroplast, Mitochondrium, Vakuole) kann durch Dichtegradientenzentrifugation nach dem Zellaufschluss erfolgen, wie es für *C. reinhardtii* bereits beschrieben ist (Nagel *et al.*, 1996). Da hierbei die Zerstörung einzelner Organellen nicht gänzlich vermeidbar ist, besteht Kontaminationsgefahr. Weiterhin führen Veränderungen des pH-Wertes oder die Freisetzung redoxaktiver Substanzen zur Dissoziation oder Bildung artifizierter Komplexe.

Die Analyse des Metallothioloms basierend auf MS-Techniken ist nicht trivial, da nur geringe Probenvolumina zur Verfügung stehen und die Komplexe während der Messung nicht stabil sind (Wesenberg *et al.*, 2010). Alternative Analysemöglichkeiten der Metallbindungspartner auf zellulärer Ebene bestehen in der Röntgenabsorptionsspektrometrie (XAFS/XANES, Isaure *et al.*, 2006) und der bildgebenden Sekundärionenmassenspektrometrie (SIMS, Boxer *et al.*, 2009).

Bei der Planung zukünftiger Studien bezüglich des Metallothioloms sollte beachtet werden, dass an metallbelasteten Standorten in der Umwelt häufig mehrere Metalle in erhöhter Konzentration vorliegen (im Mansfelder Land u. A. Cd, Cu, Fe, Mn, Krauss *et al.*, 2001). Die intrazellulären Metallverbindungen sind also unter natürlichen Bedingungen weitaus komplexer, als unter Zugabe von nur einem Metall.

Die hohe Abundanz von CysPC nach Cadmiumzugabe in *C. reinhardtii* warf die Frage nach deren Entstehung auf (Bräutigam *et al.*, 2011). Es wurde postuliert, dass das Enzym γ -Glutamyltranspeptidase (GGT) das Glutamat eines PC_n unter Entstehung von CysPC_{n-1} abspaltet. Als Indiz wurde die im Vergleich zur Kontrolle erhöhte mRNA-Menge bei Cadmium belasteten Zellen angeführt. Da dies nicht zwangsläufig mit einem erhöhten Substratumsatz einhergeht, muss zusätzlich die Proteinmenge als auch die Aktivität des Enzyms *in vivo* bestimmt werden. Weiterhin sollte getestet werden ob die GGT PC als Substrat verwenden kann. Hierzu ist ein *in-vitro-assay* bei dem ein synthetisches PC_n zu dem gereinigten Enzym (aus *C. reinhardtii* oder rekombinat gewonnen) gegeben wird durchzuführen und anschließend mittels MS die Entstehung von CysPC_{n-1} zu überprüfen.

In-situ-Experimente zur Bindekapazität von CysPC an das aktive Zentrum der PC ließen den Schluss zu, dass die Isoformen das Enzym kompetitiv hemmen können (Bräutigam *et al.*, 2011). Unter Berücksichtigung der subzellulären Konzentration der Thiole muss dies *in vitro* überprüft werden. Die PC-Syntheserate der *Chlamydomonas*-PCS muss zwischen zwei Ansätzen verglichen werden: Zugabe a.) von GSH und b.) von GSH und CysPC. Für die Auswertung dieser Experimente kann die PC-Quantifizierung mittels UPLC-MS erfolgen (Bräutigam *et al.*, 2010b).

7. Anhang

Tabelle 2: Überblick der etablierten Probenvorbereitungsstrategien für die PC-Analyse

	Bräutigam <i>et al.</i> (2009b)	Bräutigam <i>et al.</i> (2010a)	Bräutigam <i>et al.</i> (2010b)
Extraktion	0,1 N HCL	1 mM Na ₂ -EDTA in 0,1 N HCL	0,1 N HCL
Aufreinigung/ Anreicherung	HPLC Fraktionierung/ Lyophilisation	-	-
Reduktion	2 mM TCEP in 10 mM CH ₃ CO ₂ NH ₄ 1,5 h	100 mM TCEP in 100 mM NH ₄ HCO ₃ 1 h	50 mM TCEP in H ₂ O 0,5 h
Derivatisierung	-	20 mM FMEA in ACN	-
Trennung	-	HPLC	UPLC
Detektion	ESI-QTOF-MS/MS	ESI-Q-MS/MS ICP-MS	ESI-Q-MS/MS
Zeit pro Probe	≈ 2 d	≈ 3 h	≈ 1 h

Tabelle 3: m/z der oxidierten Formen von CysPC₃

Oxidation	[M+H⁺]	[M+2H⁺]
keine	875,2043	
intermolekular		
1 –S-S-	1747,3852	874,1965
2 –S-S-	1745,3695	873,1887
3 –S-S-	1743,3539	872,1805
4 –S-S-	1741,3382	871,1730
intramolekular		
1 –S-S-	873,1887	
2 –S-S-	871,1730	

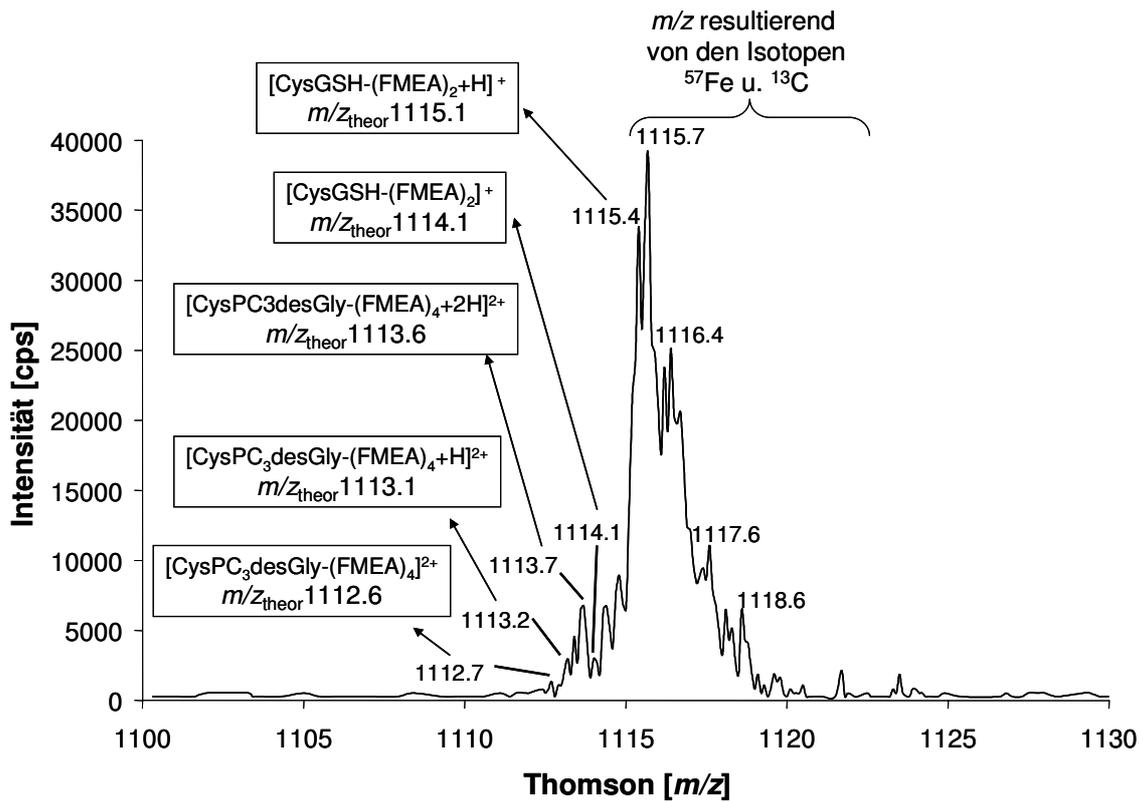


Abbildung 6: ESI-Massenspektrum von CysGSH-FMEA₂ und dem putativen CysPC₃desGly-FMEA₄ in einem Extrakt einer 48 h mit Cadmium gestressten *C. reinhardtii*-Kultur

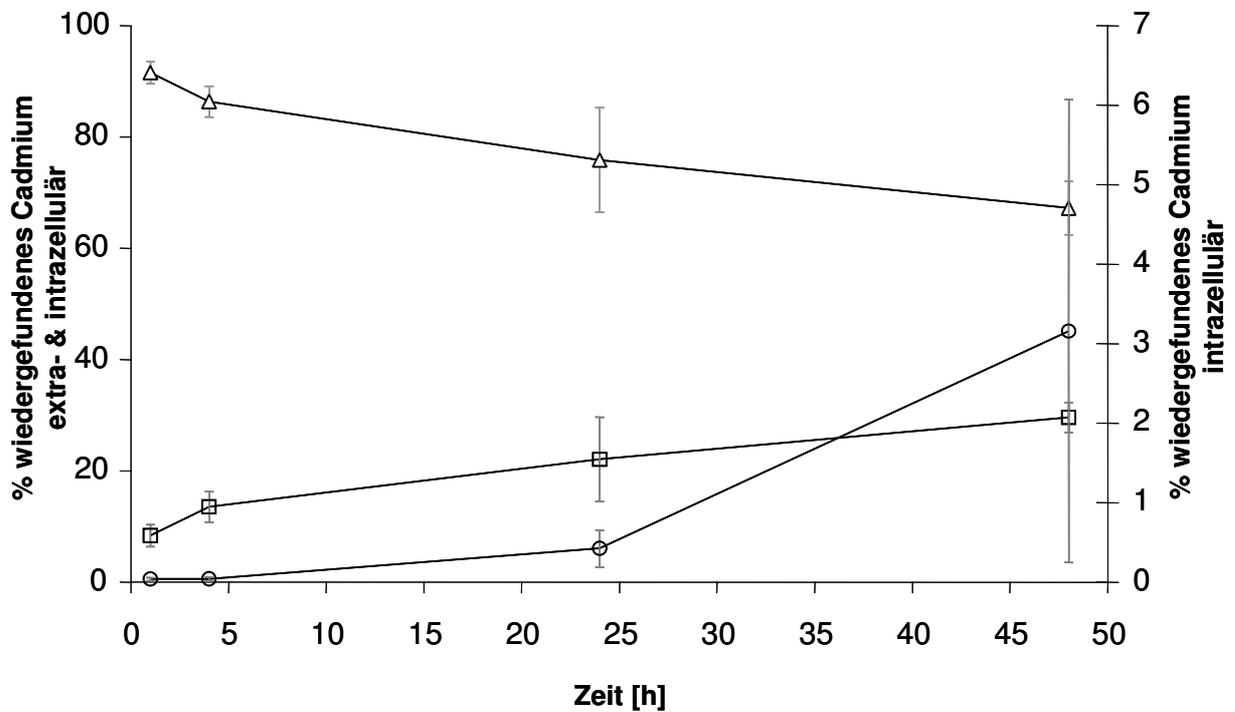


Abbildung 7: Cadmiumgehalt von *C. reinhardtii* Stamm CW15 nach Zugabe von 70 μM Cadmium, Δ -extrazellulär ungebunden, \square -extrazellulär Zellwand gebunden, \circ -intrazellulär

8. Danksagung

Ich danke...

Prof. Dr. Gerd-Joachim Krauß für die Überlassung der interessanten Chlamy-Story und seine große Unterstützung (auch über seine Emeritierung hinaus), ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Dr. Dirk Wesenberg für sein Engagement für diese Arbeit über die Jahre, in denen ich Pflanze war, seine (von mir häufig in Anspruch genommene) Personal-Computer Betreuung und seine alternative Sicht auf die Dinge.

PD Dr. habil. Dirk Schaumlöffel für die hervorragende Zusammenarbeit, die Zeit in Pau, in der ich so viel gelernt habe, und, dass ihm lange Messtage und nicht enden wollende Zahlenkolonnen niemals aus der Ruhe gebracht haben.

Prof. Dr. Uwe Karst für die freundliche und unkomplizierte Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, so dass die knappe Zeit in Münster zu reichlich Ergebnissen führen konnte.

der gesamten AG Ökologische und Pflanzen-Biochemie für das nicht zu erschütternd gute Arbeitsklima. Anja-Maria Möller und Petra Nathan. Ehrentraud Püschel und Edeltraud Funke für ihre fleißigen Hände. Meinem Diplomanden Rico Lippmann für seine stoische Gelassenheit. Vor allem Corinna Bleuel (& Markus Otto), Corinna Hermsen, und Diana Meißner, ohne die der Laboralltag dröge gewesen wäre, für Rat, Tat und Freundschaft.

der AG Mikrobiologie für die zeitweise Überlassung von Geräten. Daniel Thieme für das Teilen von Freud und Leid u. A. an der AAS.

Susanne Bomke und Thorben Pfeifer für die prima Zusammenarbeit über Nah- und Ferndistanz.

Dr. Hugues Preud´homme für die Einweisung und Hilfe bei den massenspektrometrischen Messungen in Pau.

PD Dr. habil. Iris Thondorf für das Erstellen der PCS-Modelle und ihre große Diskussionsbereitschaft.

PD Dr. habil. Doris Vetterlein für die Zusammenarbeit und Einblicke auf dem Gebiet der Arsenentgiftung von *Pteris vittata*.

dem bilateralen Programm des DAAD-EGIDE (PROCOPE) und der GdCh, für die finanzielle Unterstützung, die mir die Messungen am CNRS in Pau ermöglicht hat.

Christina Rappel für die herzliche Aufnahme im Labor sowie in Heim und Garten während meiner Zeit in Frankreich.

meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben, für ihre stete Unterstützung und Motivation.

9. Lebenslauf

Angaben zur Person

Anja Bräutigam

geb. 1983 in Hildburghausen

anja.braeutigam@biochemtech.uni-halle.de

Ausbildung/Beruflicher Werdegang

- seit April 2010 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Landeskriminalamt Sachsen-Anhalt
- 2006 - 2010 wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung für Ökologische und Pflanzen-Biochemie
- 2005 - 2006 Diplomarbeit: „Biochemisch-physiologische Untersuchungen zur Metall- und Thiolpeptidhomöostase in *Chlamydomonas reinhardtii* DANGÉARD unter Cadmiumstress“
- 2001 - 2006 Biochemie-Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Publikationen

Bräutigam, A.; Schaumlöffel, D.; Preud'homme, H.; Thondorf, I.; Wesenberg, D.; 2011. Physiological characterization of Cadmium exposed *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Cell and Environment.

Bräutigam, A.; Wesenberg, D.; Preud'homme, H.; Schaumlöffel, D.; 2010. Rapid and simple method for precise Phytochelatin determination in alga extracts. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 398 (2), 877-883.

Bräutigam, A.; Bomke, S.; Pfeifer, T.; Karst, U.; Krauss, G. J.; Wesenberg, D.; 2010. Quantification of Phytochelatins in *Chlamydomonas reinhardtii* using ferrocene-based derivatization. Metallomics, 2(8): 565–570.

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*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 395(6), 1737-1747.

Vetterlein, D.; Wesenberg, D.; Nathan, P.; Bräutigam, A.; Schierhorn, A.; Mattusch, J.; Jahn, R.; 2009. *Pteris vittata* - Revisited: Uptake of As and its speciation, impact of P, role of phytochelatins and S. Environmental Pollution, 157, 3016-3024.

Bräutigam, A.; Lippmann, R.; Krauss, G. J.; Schaumlöffel, D.; Wesenberg, D.; 2009. Cadmium induced thiol peptides in *Chlamydomonas reinhardtii* strains. In A. Sirko, L. J. De Kok, S. Haneklaus, M. J. Hawkesford, H. Rennenberg, K. Saito, E. Schnug, & I. Stulen, eds. Regulatory Aspects Significance of Sulfur in the Food Chain, Agriculture and the Environment. Weikersheim: Margraf Publishers, 273-276.

Vorträge

Schaumlöffel, D.; Bräutigam, A.; Preud'homme, H.; Thondorf, I.; Krauß, G. J.; Wesenberg, D.; Physiological characterisation of cadmium exposed *Chlamydomonas reinhardtii* employing rapid and precise mass spectrometric quantification of phytochelatins, 26. Jahrestagung der GMS 2010, Leipzig, 7.-9. Oktober 2010

Bomke, S.; Bräutigam, A.; Pfeifer, T.; Buscher, W.; Wesenberg, D.; Krauß, G. J.; Karst, U.; Determination of ferrocene-derivatized phytochelatins by LC/ESI-MS and LC/ICP-MS, TraceSpec, Mainz, 15.-18. September 2009

Bräutigam, A.; Schaumlöffel, D.; Krauß, G. J.; Wesenberg, D.; *Chlamydomonas* synthesises several phytochelatin isoforms upon Cd-stress, 2nd Sulphyton Meeting, Norwich (England), 13.-15. September 2009

Bomke, S.; Hayen, H.; Bräutigam, A.; Pfeifer, T.; Krauß, G. J.; Wesenberg, D.; Karst, U.; Organometallic derivatizing agents for peptides and proteins, International Symposium on Metallomics, Cincinnati (USA), 07.-10. Juni 2009

Bräutigam, A.; AK G. J. Krauß, Analyse von Thiolpeptiden aus der Cd-exponierten Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, 18. Doktorandenseminar, Hohenroda, 06.-08. Januar 2008

Bräutigam, A.; Lippmann, R.; Krauß, G. J.; Wesenberg, D.; Cadmium induced thiol peptides in *Chlamydomonas reinhardtii* strains, 7th Workshop on Sulfur Metabolism in Plants, Warschau (Polen), 13.-16. Mai 2008

Bräutigam, A.; Lippmann, R.; Krauß, G. J.; Wesenberg, D.; Cadmium induced thiol peptides in *Chlamydomonas reinhardtii* strains, Pau (Frankreich), 11. Juli 2008

Schaumlöffel, D.; Rappel, C.; Bräutigam, A.; Wesenberg, D.; Krauß, G. J.; Analytical strategies for characterization and quantification of cadmium-induced thiolpeptides in algae, 2nd European Conference on Metallobiolomics, Berlin, 3.-4. Dezember 2008

Poster

Bräutigam, A.; Schaumlöffel, D.; Krauß, G. J.; Wesenberg, D.; Phytochelatin identification by nanoelectrospray ionization mass spectrometry, DGMS, Halle, 07.-10. März 2010

Bräutigam, A.; Wesenberg, D.; Krauß, G. J.; Der Einsatz der Graphitrohr-AAS zur Bestimmung der Cadmium-Biosorption und -Akkumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*, CANAS, Konstanz, 18.-21. März 2007

Stipendium

Publikationsstipendium für die Zeitschrift „Analytical & Bioanalytical Chemistry“, ausgereicht von der Gesellschaft Deutscher Chemiker, 2008

Ad hoc reviewer für die Zeitschrift: “Analytical & Bioanalytical Chemistry”

10. 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.

Die Arbeit wurde nur an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität eingereicht.

Magdeburg, im Januar 2011

Anja Bräutigam

11. Literaturverzeichnis

- ADHIYA, J., CAI, X.-H. & TRAINA, S., RT. (2002). Binding of aqueous cadmium by the lyophilized biomass of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 210: 1-11.
- AGUILERA, A. & AMILS, R. (2005). Tolerance to cadmium in *Chlamydomonas sp* (Chlorophyta) strains isolated from an extreme acidic environment, the Tinto River (SW, Spain). *Aquat. Toxicol.* 75 (4): 316-329.
- AHRENDTS, R., PIEPER, S., KUHN, A., WEISSHOFF, H., HAMESTER, M., LINDEMANN, T., SCHELER, C., LEHMANN, K., TAUBNER, K. & LINSCHIED, M. W. (2007). A metal-coded affinity tag approach to quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 6 (11): 1907-1916.
- ASLUND, F., BERNDT, K. D. & HOLMGREN, A. (1997). Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. *J. Biol. Chem.* 272 (49): 30780-30786.
- BARALKIEWICZ, D., KOZKA, M., PIECHALAK, A., TOMASZEWSKA, B. & SOBCZAK, P. (2009). Determination of cadmium and lead species and phytochelatins in pea (*Pisum sativum*) by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MSⁿ. *Talanta* 79 (2): 493-498.
- 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.
- BLUM, R., MEYER, K. C., WÜNSCHMANN, J., LENDZIAN, K. J. & GRILL, E. (2010). Cytosolic action of phytochelatin synthase. *Plant Physiol.* 153 (1): 159-169.
- BOMKE, S., PFEIFER, T., MEERMANN, B., BUSCHER, W. & KARST, U. (2010a). Liquid chromatography with complementary electrospray and inductively coupled plasma mass spectrometric detection of ferrocene-labelled peptides and proteins. *Anal Bioanal Chem* 397 (8): 3503-3513.
- BOMKE, S., SPERLING, M. & KARST, U. (2010b). Organometallic derivatizing agents in bioanalysis. *Anal Bioanal Chem.*
- BOVET, L., FELLER, U. & MARTINOIA, E. (2005). Possible involvement of plant ABC transporters in cadmium detoxification: a cDNA sub-microarray approach. *Environment International* 31 (2): 263-267.
- BOVET, L., MARTINOIA, E. & FELLER, U. (2003). Possible involvement of *Arabidopsis* ABC transporters in cadmium detoxification. Second European Bioremediation Conference, Chania, Crete, S. 275-278.
- BOXER, S. G., KRAFT, M. L. & WEBER, P. K. (2009). Advances in Imaging Secondary Ion Mass Spectrometry for Biological Samples. *Ann Rev Biophys* 38: 53-74.
- BRAMANTI, E., TONCELLI, D., MORELLI, E., LAMPUGNANI, L., ZAMBONI, R., MILLER, K. E., ZEMETRA, J. & D'ULIVO, A. (2006). Determination and characterization of phytochelatins

- by liquid chromatography coupled with on line chemical vapour generation and atomic fluorescence spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 1133 (1-2): 195-203.
- BRÄUTIGAM, A. (2006). Biochemisch-physiologische Untersuchungen zur Metall- und Thiolpeptidhomöostase in *Chlamydomonas reinhardtii* DANGEARD unter Cadmiumstress. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- BRÄUTIGAM, A., BOMKE, S., PFEIFER, T., KARST, U., KRAUSS, G. J. & WESENBERG, D. (2010a). Quantification of Phytochelatins in *Chlamydomonas reinhardtii* using ferrocene-based derivatization. *Metallomics* 2 (8): 565–570.
- BRÄUTIGAM, A., LIPPMANN, R., KRAUSS, G. J., SCHAUMLÖFFEL, D. & WESENBERG, D. (2009a). Cadmium induced thiol peptides in *Chlamydomonas reinhardtii* strains. In: Sulfur Metabolism in Plants - Regulatory Aspects Significance of Sulfur in the food chain, Agriculture and the Environment (A. Sirko, L. J. D. K., S. Haneklaus, M.J. Hawkesford, H. Rennenberg, K. Saito, E. Schnug, I. Stulen, Hrsg.). Margraf Publishers, Weikersheim, S. 273-276.
- BRÄUTIGAM, A., SCHAUMLÖFFEL, D., KRAUSS, G. J. & WESENBERG, D. (2009b). Analytical approach for characterization of cadmium-induced thiol peptides-a case study using *Chlamydomonas reinhardtii*. *Analyt. Bioanalyt. Chem.* 395 (6): 1737-1747.
- BRÄUTIGAM, A., SCHAUMLÖFFEL, D., PREUD´HOMME, H., THONDORF, I. & WESENBERG, D. (2011). Physiological characterisation of cadmium exposed *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant, Cell and Environment*.
- BRÄUTIGAM, A., WESENBERG, D., PREUD´HOMME, H. & SCHAUMLÖFFEL, D. (2010b). Rapid and simple UPLC-MS/MS method for precise Phytochelatin quantification in alga extracts. *Analyt. Bioanalyt. Chem.* 398 (2): 877-883.
- BURNS, J. A., BUTLER, J. C., MORAN, J. & WHITESIDES, G. M. (1991). Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-Carboxyethyl)Phosphine. *J Org Chem* 56 (8): 2648-2650.
- CAMERA, E. & PICARDO, M. (2002). Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 781 (1-2): 181-206.
- CARNEGIE, P. R. (1963). Isolation of a homologue of glutathione and other acidic peptides from seedlings of *Phaseolus aureus*. *Biochem. J.* 89 (3): 459-&.
- CHASSAIGNE, H., VACCHINA, V., KUTCHAN, T. M. & ZENK, M. H. (2001). Identification of phytochelatin-related peptides in maize seedlings exposed to cadmium and obtained enzymatically in vitro. *Phytochemistry* 56 (7): 657-668.
- CHASSAIGNE, H., VACCHINA, V. & LOBINSKI, R. (2000). Elemental speciation analysis in biochemistry by electrospray mass spectrometry. *Trends Anal. Chem.* 19 (5): 300-313.
- CHEN, J., ZHOU, J. & GOLDSBROUGH, P. B. (1997). Characterization of phytochelatin synthase from tomato. *Physiol. Plant.* 101 (1): 165-172.
- CLEMENS, S. (2006a). Evolution and function of phytochelatin synthases. *J. Plant Physiol.* 163 (3): 319-332.

- CLEMENS, S. (2006b). 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.
- CLEMENS, S. & PERŠOH, D. (2009). Multi-tasking phytochelatin synthases. *Plant Sci.* 177 (4): 266-271.
- COBBETT, C. & GOLDSBROUGH, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53: 159-182.
- COLEMAN, A. W. & MAI, J. C. (1997). Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 sequence comparisons as a tool for predicting genetic relatedness. *Journal of Molecular Evolution* 45 (2): 168-177.
- CRUZ, B. H., CRUZ, J. M. D., SESTAKOVA, I., VELEK, J., ARINO, C. & ESTEBAN, M. (2002). Differential pulse voltammetric study of the complexation of Cd(II) by the phytochelatin (γ -Glu-Cys)₂Gly assisted by multivariate curve resolution. *J Electroanal Chem* 520 (1): 111-118.
- DALCORSO, G., FARINATI, S., MAISTRI, S. & FURINI, A. (2008). How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. *J Integr Plant Biol* 50 (10): 1268-1280.
- DALLE-DONNE, I. & ROSSI, R. (2009). Analysis of thiols. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877 (28): 3271-3273.
- DAVIES, J. P. & GROSSMAN, A. R. (1998). The use of *Chlamydomonas* (Chlorophyta : Volvocales) as a model algal system for genome studies and the elucidation of photosynthetic processes. *J. Phycol.* 34 (6): 907-917.
- DEVRIESE, M., TSAKALOU, V., GARBAYO, I., LEON, R., VILCHEZ, C. & VIGARA, J. (2001). Effect of heavy metals on nitrate assimilation in the eukaryotic microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol. Biochem.* 39 (5): 443-448.
- DI MARCO, V. B. & BOMBI, G. G. (2006). Electrospray mass spectrometry (ESI-MS) in the study of metal-ligand solution equilibria. *Mass Spectrom. Rev.* 25 (3): 347-379.
- DIXON, D. P., CUMMINS, L., COLE, D. J. & EDWARDS, R. (1998). Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1 (3): 258-266.
- DOMINGUEZ, M. J., GUTIERREZ, F., LEON, R., VILCHEZ, C., VEGA, J. M. & VIGARA, J. (2003). Cadmium increases the activity levels of glutamate dehydrogenase and cysteine synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol. Biochem.* 41 (9): 828-832.
- DORCÁK, V. & KREZEL, A. (2003). Correlation of acid-base chemistry of phytochelatin PC2 with its coordination properties towards the toxic metal ion Cd(II). *Dalton T* (11): 2253-2259.
- DUFFUS, J. H. (2002). "Heavy metals" - A meaningless term? (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem.* 74 (5): 793-807.

- ELLMAN, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82: 70-77.
- EL-ZOHRI, M. H., CABALA, R. & FRANK, H. (2005). Quantification of phytochelatin in plants by reversed-phase HPLC-ESI-MS-MS. Anal Bioanal Chem.
- 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.
- ESTRELLA-GÓMEZ, N., MENDOZA-CÓZATL, D., MORENO-SÁNCHEZ, R., GONZÁLEZ-MENDOZA, D., ZAPATA-PÉREZ, O., MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, A. & SANTAMARÍA, J. M. (2009). The Pb-hyperaccumulator aquatic fern *Salvinia minima* Baker, responds to Pb(2+) by increasing phytochelatin via changes in SmPCS expression and in phytochelatin synthase activity. Aquat. Toxicol. 91 (4): 320-328.
- FIGUEROA, J. A. L., AFTON, S., WROBEL, K., WROBEL, K. & CARUSO, J. A. (2007). Analysis of phytochelatin in nopal (*Opuntia ficus*): A metallomics approach in the soil-plant system. J. Anal. At. Spectrom. 22 (8): 897-904.
- FRENDO, P., JIMENEZ, M. J. H., MATHIEU, C., DURET, L., GALLES, D., VAN DE SYPE, G., HEROUART, D. & PUPPO, A. (2001). A medicago truncatula homoglutathione synthetase is derived from glutathione synthetase by gene duplication. Plant Physiol. 126 (4): 1706-1715.
- GARCÍA-RÍOS, V., FREILE-PELEGRÍN, Y., ROBLEDO, D., MENDOZA-CÓZATL, D., MORENO-SÁNCHEZ, R. & GOLD-BOUCHOT, G. (2007). Cell wall composition affects Cd²⁺ accumulation and intracellular thiol peptides in marine red algae. Aquat. Toxicol. 81 (1): 65-72.
- GEKELER, W., GRILL, E., WINNACKER, E. L. & ZENK, M. H. (1988). Algae sequester heavy-metals via synthesis of phytochelatin complexes. Arch. Microbiol. 150: 197-202.
- GETZ, E. B., XIAO, M., CHAKRABARTY, T., COOKE, R. & SELVIN, P. R. (1999). A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. Anal. Biochem. 273 (1): 73-80.
- GILLET, S., DECOTTIGNIES, P., CHARDONNET, S. & LE MARECHAL, P. (2006). Cadmium response and redoxin targets in *Chlamydomonas reinhardtii*: a proteomic approach. Photosynthetic Research 89 (2-3): 201-211.
- GONZALEZ-MENDOZA, D., MORENO, A. Q. & ZAPATA-PEREZ, O. (2007). Coordinated responses of phytochelatin synthase and metallothionein genes in black mangrove, *Avicennia germinans*, exposed to cadmium and copper. Aquat. Toxicol. 83 (4): 306-314.
- GRAHAM, D. E., HARICH, K. C. & WHITE, R. H. (2003). Reductive dehalogenation of monobromobimane by tris(2-carboxyethyl)phosphine. Anal. Biochem. 318 (2): 325-328.
- GREGORIUS, B., SCHAUMLÖFFEL, D., HILDEBRANDT, A. & THOLEY, A. (2010). Characterization of metal-labelled peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 24 (22): 3279-3289.

- GRILL, E. (1987). Phytochelatins, the heavy metal binding peptides of plants: Characterization and sequence determination. *Experientia Suppl.* 52: 317-322.
- GRILL, E., GEKELER, W., WINNACKER, E. L. & ZENK, H. H. (1986a). Homo-phytochelatins are heavy metal-binding peptides of homo-glutathione containing fabales. *FEBS Lett.* 205: 47-50.
- GRILL, E., LOEFFLER, S., WINNACKER, E. L. & ZENK, M. H. (1989). Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific (γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the National Academy of Science USA* 86: 6838-6842.
- GRILL, E., WINNACKER, E. L. & ZENK, M. H. (1985). Phytochelatins: The principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230: 674-676.
- GRILL, E., WINNACKER, E. L. & ZENK, M. H. (1986b). Synthesis of seven different homologous phytochelatins in metal-exposed *Schizosaccharomyces pombe* cells. *FEBS Lett.* 197: 115-120.
- GRILL, E., WINNACKER, E.-L. & ZENK, M. H. (1987). Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 439-443.
- GRZAM, A., MARTIN, M. N., HELL, R. & MEYER, A. J. (2007). γ -Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 581 (17): 3131-3138.
- GUILLARME, D., RUTA, J., RUDAZ, S. & VEUTHEY, J. L. (2009). New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches. *Anal Bioanal Chem* 397 (3): 1069-1082.
- GUSMÃO, R., ARINO, C., DIAZ-CRUZ, J. M. & ESTEBAN, M. (2010). Electrochemical survey of the chain length influence in phytochelatins competitive binding by cadmium. *Anal. Biochem.* 406 (1): 61-69.
- HA, S.-B., SMITH, A. P., HOWDEN, R., DIETRICH, W. M., BUGG, S., O'CONNELL, M. J., GOLDSBROUGH, P. B. & COBBETT, C. S. (1999). Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* 11 (6): 1153-1164.
- HAN, J. C. & HAN, G. Y. (1994). A procedure for quantitative determination of tris(2-carboxyethyl)phosphine, an odorless reducing agent more stable and effective than dithiothreitol. *Anal. Biochem.* 220 (1): 5-10.
- HANIKENNE, M. (2003). *Chlamydomonas reinhardtii* as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance. *New Phytol.* 159 (2): 331-340.
- HANIKENNE, M., KRAMER, U., DEMOULIN, V. & BAURAIN, D. (2005a). A comparative inventory of metal transporters in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Physiol.* 137 (2): 428-446.
- HANIKENNE, M., MOTTE, P., WU, M. C. S., WANG, T., LOPPE, R. & MATAGNE, R. F. (2005b). A mitochondrial half-size ABC transporter is involved in cadmium tolerance in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Environ.* 28 (7): 863-873.

- HANSEN, R. E. & WINTHER, J. R. (2009). An introduction to methods for analyzing thiols and disulfides: Reactions, reagents, and practical considerations. *Anal. Biochem.* 394 (2): 147-158.
- HARRINGTON, C. R. & MEAD, T. H. (1935). Synthesis of glutathione. *Biochem. J.* 29 (7): 1602-1611.
- HARRIS, E. H. (1989). The *Chlamydomonas* Sourcebook : A comprehensive guide to biology and laboratory use. Academic Press, San Diego.
- HARRIS, E. H. (2001). *Chlamydomonas* as a model organism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52 (1): 363-406.
- HEISS, S., WACHTER, A., BOGS, J., COBBETT, C. & RAUSCH, T. (2003). Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure. *J. Exp. Bot.* 54 (389): 1833-1839.
- HERBIK, A., BOLLING, C. & BUCKHOUT, T. J. (2002). The involvement of a multicopper oxidase in iron uptake by the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 130 (4): 2039-2048.
- HIRATA, K., TSUJI, N. & MIYAMOTO, K. (2005). Biosynthetic regulation of phytochelatin, heavy metal-binding peptides. *J. Biosci. Bioeng.* 100 (6): 593-599.
- HOPKINS, F. G. (1921). On an Autoxidisable Constituent of the Cell. *Biochem. J.* 15 (2): 286-305.
- HORNE, R. W., DAVIES, D. R., NORTON, K. & GURNEY, S. M. (1971). Electron Microscope and Optical Diffraction Studies on Isolated Cells from *Chlamydomonas*. *Nature* 232 (5311): 493-495.
- HOWE, G. & MERCHANT, S. H. (1992). Heavy metal-activated synthesis of peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 98: 127-136.
- HU, S., LAU, K. W. K. & WU, M. (2001). Cadmium sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* 161 (5): 987-996.
- HUANG, X., XU, R., HAWLEY, M. D., HOPKINS, T. L. & KRAMER, K. J. (1998). Electrochemical oxidation of N-acyldopamines and regioselective reactions of their quinones with N-acetylcysteine and thiourea. *Arch. Biochem. Biophys.* 352 (1): 19-30.
- 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): 1193-1194.
- INGLE, C., LANGFORD, N., HARVEY, L., DAINTY, J. R., ARMAH, C., FAIRWEATHER-TAIT, S., SHARP, B., CREWS, H., ROSE, M. & LEWIS, J. (2002). Development of a high-resolution ICP-MS method, suitable for the measurement of iron and iron isotope ratios in acid digests of faecal samples from a human nutrition study. *J Anal Atom Spectrom* 17 (11): 1498-1501.

- IRVING, H. & WILLIAMS, R. J. P. (1948). Order of Stability of Metal Complexes. *Nature* 162 (4123): 746-747.
- ISAURE, M. P., FAYARD, B., SAFFET, G., PAIRIS, S. & BOURGUIGNON, J. (2006). Localization and chemical forms of cadmium in plant samples by combining analytical electron microscopy and X-ray spectromicroscopy. *Spectrochim Acta B* 61 (12): 1242-1252.
- ISOBE, M., HAYASHI, Y., IMAI, K., NAKAGAWA, C.-W., UYAKUL, D., MUTOH, N. & GOTO, T. (1991). Biosynthesis of Cadystin
Structure and Biosynthesis of Cadystin [γ -EC-Peptides (γ -EC) $_n$ G] of Fission Yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. In: *Metallothioneins*, S. 226-243.
- IWASAKI, Y., SAITO, Y., NAKANO, Y., MOCHIZUKI, K., SAKATA, O., ITO, R., SAITO, K. & NAKAZAWA, H. (2009). Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877 (28): 3309-3317.
- JIANG, K.-S. & BARBER, G. A. (1975). Polysaccharide from cell walls of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* 14 (11): 2459-2461.
- KEITH-ROACH, M. J. (2010). A review of recent trends in electrospray ionisation-mass spectrometry for the analysis of metal-organic ligand complexes. *Analyt. Chim. Acta* 678 (2): 140-148.
- KLAPHECK, S. (1988). Homoglutathione: Isolation, quantification and occurrence in legumes. *Physiol. Plant.* 74: 727-732.
- KLAPHECK, S., CHROST, B., STARKE, J. & ZIMMERMANN, H. (1992). γ -Glutamylcysteinylserine - A new homologue of glutathione in plants of the family *Poaceae*. *Bot. Acta* 105: 174-179.
- KOBAYASHI, I., FUJIWARA, S., SAEGUSA, H., MATSUMOTO, H., TSUZUKI, M. & INOUE, M. (2006). Relief of arsenate toxicity by Cd-stimulated phytochelatin synthesis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Marine Biotechnology* 8 (1): 94-101.
- KONDO, N., IMAI, K., ISOBE, MINORU, GOTO, T., MURASUGI, A., WADA-NAKAGAWA, C. & HAYASHI, Y. (1984). Cadystin a and b, major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced in a fission yeast - separation, revision of structures and synthesis. *Tetrahedron Lett.* 25 (35): 3869-3872.
- KOPPENOL, W. H. (2001). The Haber-Weiss cycle - 70 years later. *Redox Rep* 6 (4): 229-234.
- KOSOWER, E. M. & KOSOWER, N. S. (1995). Bromobimane probes for thiols. *Methods Enzymol.* 251: 133-148.
- KRÄMER, U. (2010). Metal hyperaccumulation in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 517-534.
- KRÄMER, U., TALKE, I. N. & HANIKENNE, M. (2007). Transition metal transport. *FEBS Lett.* 581 (12): 2263-2272.
- 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.

- KUTSCHER, D. J. & BETTMER, J. (2009). Absolute and relative protein quantification with the use of isotopically labeled p-hydroxymercuribenzoic acid and complementary MALDI-MS and ICPMS detection. *Anal. Chem.* 81 (21): 9172-9177.
- LA FONTAINE, S., QUINN, J. M., NAKAMOTO, S. S., PAGE, M. D., GOHRE, V., MOSELEY, J. L., KROPAT, J. & MERCHANT, S. (2002). Copper-dependent iron assimilation pathway in the model photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* 1 (5): 736-757.
- LANE, T. W., SATTO, M. A., GEORGE, G. N., PICKERING, I. J., PRINCE, R. C. & MOREL, F. M. M. (2005). A cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* 435 (7038): 42.
- LE FAUCHEUR, S., BEHRA, R. & SIGG, L. (2005). Phytochelatin induction, cadmium accumulation, and algal sensitivity to free cadmium ion in *Scenedesmus vacuolatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (7): 1731-1737.
- LE FAUCHEUR, S., SCHILDKNECHT, F., BEHRA, R. & SIGG, L. (2006). Thiols in *Scenedesmus vacuolatus* upon exposure to metals and metalloids. *Aquat. Toxicol.* 80 (4): 355-361.
- LEE, T. M., LAI, H. Y. & CHEN, Z. S. (2004). Effect of chemical amendments on the concentration of cadmium and lead in long-term contaminated soils. *Chemosphere* 57 (10): 1459-1471.
- 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.
- LIPPMANN, R. (2007). Vergleich der Metall- und Thiolpeptidhomöostase in verschiedenen Wildtypstämmen von *Chlamydomonas reinhardtii* unter Schwermetallstress., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- LOCK, J. & DAVIS, J. (2002). The determination of disulphide species within physiological fluids. *Trac-Trend Anal Chem* 21 (12): 807-815.
- MACFIE, S. M. & WELBOURN, P. M. (2000). The cell wall as a barrier to uptake of metal ions in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39 (4): 413-419.
- MAEDA, S., MIZOGUCHI, M., OHKI, A. & TAKESHITA, T. (1990). Bioaccumulation of Zinc and Cadmium in freshwater alga, *Chlorella vulgaris* .1. Toxicity and accumulation. *Chemosphere* 21 (8): 953-963.
- MARTIN, M. N., SALADORES, P. H., LAMBERT, E., HUDSON, A. O. & LEUSTEK, T. (2007). Localization of Members of the γ -Glutamyl Transpeptidase Family Identifies Sites of Glutathione and Glutathione S-Conjugate Hydrolysis. *Plant Physiol.* 10.1104/pp.106.094409.
- MARTIN, M. N. & SLOVIN, J. P. (2000). Purified gamma-glutamyl transpeptidases from tomato exhibit high affinity for glutathione and glutathione S-conjugates. *Plant Physiol.* 122 (4): 1417-1426.

- MAUL, J. E., LILLY, J. W., CUI, L., DEPAMPHILIS, C. W., MILLER, W., HARRIS, E. H. & STERN, D. B. (2002). The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. *Plant Cell* 14 (11): 2659-2679.
- MAY, M., VERNOUX, T., LEAVER, C., VAN MONTAGU, M. & INZE, D. (1998). Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J. Exp. Bot.* 49 (321): 649-667.
- MENDOZA-CÓZATL, D., DEVARAS, S., LOZA-TAVERA, H. & MORENO-SÁNCHEZ, R. (2002). Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Physiol. Plant.* 115 (2): 276-283.
- MENDOZA-CÓZATL, D., LOZA-TAVERA, H., HERNÁNDEZ-NAVARRO, A. & MORENO-SÁNCHEZ, R. (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 653-671.
- MENDOZA-CÓZATL, D. G., RODRÍGUEZ-ZAVALA, J. S., RODRÍGUEZ-ENRIQUEZ, S., MENDOZA-HERNANDEZ, G., BRIONES-GALLARDO, R. & MORENO-SÁNCHEZ, R. (2006). Phytochelatin-cadmium-sulfide high-molecular-mass complexes of *Euglena gracilis*. *FEBS Journal* 273 (24): 5703-5713.
- MENDOZA-CÓZATL, D. G., ZHAI, Z., JOBE, T. O., AKMAKJIAN, G. Z., SONG, W. Y., LIMBO, O., RUSSELL, M. R., KOZLOVSKYY, V. I., MARTINOIA, E., VATAMANIUK, O. K., RUSSELL, P. & SCHROEDER, J. I. (2010). Tonoplast-localized Abc2 transporter mediates phytochelatin accumulation in vacuoles and confers cadmium tolerance. *J. Biol. Chem.*
- MERCHANT, S. S., PROCHNIK, S. E., VALLON, O., HARRIS, E. H., KARPOWICZ, S. J., WITMAN, G. B., TERRY, A., SALAMOV, A., FRITZ-LAYLIN, L. K., MARECHAL-DROUARD, L., MARSHALL, W. F., QU, L. H., NELSON, D. R., SANDERFOOT, A. A., SPALDING, M. H., KAPITONOV, V. V., REN, Q., FERRIS, P., LINDQUIST, E., SHAPIRO, H., LUCAS, S. M., GRIMWOOD, J., SCHMUTZ, J., CARDOL, P., CERUTTI, H., CHANFREAU, G., CHEN, C. L., COGNAT, V., CROFT, M. T., DENT, R., DUTCHER, S., FERNANDEZ, E., FUKUZAWA, H., GONZALEZ-BALLESTER, D., GONZALEZ-HALPHEN, D., HALLMANN, A., HANIKENNE, M., HIPPLER, M., INWOOD, W., JABBARI, K., KALANON, M., KURAS, R., LEFEBVRE, P. A., LEMAIRE, S. D., LOBANOV, A. V., LOHR, M., MANUELL, A., MEIER, I., METS, L., MITTAG, M., MITTELMEIER, T., MORONEY, J. V., MOSELEY, J., NAPOLI, C., NEDELICU, A. M., NIYOGI, K., NOVOSELOV, S. V., PAULSEN, I. T., PAZOUR, G., PURTON, S., RAL, J. P., RIANO-PACHON, D. M., RIEKHOF, W., RYMARQUIS, L., SCHRODA, M., STERN, D., UMEN, J., WILLOWS, R., WILSON, N., ZIMMER, S. L., ALLMER, J., BALK, J., BISOVA, K., CHEN, C. J., ELIAS, M., GENDLER, K., HAUSER, C., LAMB, M. R., LEDFORD, H., LONG, J. C., MINAGAWA, J., PAGE, M. D., PAN, J., POOTAKHAM, W., ROJE, S., ROSE, A., STAHLBERG, E., TERAUCHI, A. M., YANG, P., BALL, S., BOWLER, C., DIECKMANN, C. L., GLADYSHEV, V. N., GREEN, P., JORGENSEN, R., MAYFIELD, S., MUELLER-ROEBER, B., RAJAMANI, S., SAYRE, R. T., BROKSTEIN, P., DUBCHAK, I., GOODSTEIN, D., HORNICK, L., HUANG, Y. W., JHAVERI, J., LUO, Y., MARTINEZ, D., NGAU, W. C., OTILLAR, B., POLIAKOV, A., PORTER, A., SZAJKOWSKI, L., WERNER, G., ZHOU, K., GRIGORIEV, I. V., ROKHSAR, D. S. & GROSSMAN, A. R. (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318 (5848): 245-250.
- 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.

- MERRIFIELD, M. E., NGU, T. & STILLMAN, M. J. (2004). Arsenic binding to *Fucus vesiculosus* metallothionein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324 (1): 127-132.
- MEUWLY, P., THIBAUT, P. & RAUSER, W. E. (1993). γ -Glutamylcysteinylglutamic acid - A new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium. *FEBS Lett.* 336 (3): 472-476.
- MITTAG, M. & WAGNER, V. (2003). The circadian clock of the unicellular eukaryotic model organism *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biol. Chem.* 384 (5): 689-695.
- MOLNAR-PERL, I. (2001). Derivatization and chromatographic behavior of the o-phthaldialdehyde amino acid derivatives obtained with various SH-group-containing additives. *J. Chromatogr. A* 913 (1-2): 283-302.
- MONOSTORI, P., WITTMANN, G., KARG, E. & TURI, S. (2009). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: an in-depth review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877 (28): 3331-3346.
- MONTES-BAYÓN, M., MEIJA, J., LEDUC, D. L., TERRY, N., CARUSO, J. A. & SANZ-MEDEL, A. (2004). HPLC-ICP-MS and ESI-Q-TOF analysis of biomolecules induced in *Brassica juncea* during arsenic accumulation. *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (1): 153-158.
- MORMANN, M., EBLE, J., SCHWOPPE, C., MESTERS, R. M., BERDEL, W. E., PETER-KATALINIC, J. & POHLENTZ, G. (2008). Fragmentation of intra-peptide and inter-peptide disulfide bonds of proteolytic peptides by nanoESI collision-induced dissociation. *Anal Bioanal Chem* 392 (5): 831-838.
- MOSULÉN, S., DOMÍNGUEZ, M. J., VIGARA, J., VÍLCHEZ, C., GUIRAUM, A. & VEGA, J. M. (2003). Metal toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*. Effect on sulfate and nitrate assimilation. *Biomolecular Engineering* 20 (4-6): 199-203.
- MURASUGI, A., WADA, C. & HAYASHI, Y. (1981). Cadmium-binding peptide induced in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biochemistry* 90 (5): 1561-1564.
- MURASUGI, A., WADA, C. & HAYASHI, Y. (1983). Occurrence of acid-labile sulfide in cadmium-binding peptide 1 from fission yeast. *J Biochem (Tokyo)* 93 (2): 661-664.
- MURRAY, G. I. (2007). An overview of laser microdissection technologies. *Acta Histochemica* 109 (3): 171-176.
- NAGEL, K., ADELMEIER, U. & VOIGT, J. (1996). Subcellular distribution of cadmium in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Plant Physiol.* 149: 86-90.
- NAKANO, Y., OKAWA, S., PRIETO, R. & SEKIYA, J. (2006). Subcellular localization and possible functions of gamma-glutamyltransferase in the radish (*Raphanus sativus* L.) plant. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70 (7): 1790-1793.
- NEWTON, G. L., DORIAN, R. & FAHEY, R. C. (1981). Analysis of biological thiols: Derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase HPLC. *Anal. Biochem.* 114: 383-387.

- NEWTON, G. L. & FAHEY, R. C. (1995). Determination of biothiols by bromobimane labeling and high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.* 251: 148-166.
- NISHIKAWA, K., ONODERA, A. & TOMINAGA, N. (2006). Phytochelatin do not correlate with the level of Cd accumulation in *Chlamydomonas spp.* *Chemosphere* 63 (9): 1553-1559.
- NOCTOR, G. (2006). Metabolic signalling in defence and stress: The central roles of soluble redox couples. *Plant Cell Environ.* 29 (3): 409-425.
- NOCTOR, G., GOMEZ, L., VANACKER, H. & FOYER, C. H. (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J. Exp. Bot.* 53 (372): 1283-1304.
- OHKAMA-OHTSU, N., RADWAN, S., PETERSON, A., ZHAO, P., BADR, A. F., XIANG, C. B. & OLIVER, D. J. (2007). Characterization of the extracellular gamma-glutamyl transpeptidases, GGT1 and GGT2, in Arabidopsis. *Plant Journal* 49 (5): 865-877.
- ORTIZ, D. F., KREPPPEL, L., SPEISER, D. M., SCHEEL, G., MCDONALD, G. & OW, D. W. (1992). Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *EMBO J.* 11 (10): 3491-3499.
- OUTLAW W.H., J. & ZHANG, S. (2001). Single-cell dissection and microdroplet chemistry. *J. Exp. Bot.* 52 (356): 605-614.
- OVEN, M., PAGE, J. E., ZENK, M. H. & KUTCHAN, T. M. (2002). Molecular characterization of the homo-phytochelatin synthase of soybean *Glycine max.* Relation to phytochelatin synthase. *J. Biol. Chem.* 277 (7): 4747-4754.
- PAWLIK-SKOWRONSKA, B. (2002). Correlations between toxic Pb effects and production of Pb-induced thiol peptides in the microalga *Stichococcus bacillaris*. *Environ. Pollut.* 119 (1): 119-127.
- PAWLIK-SKOWRONSKA, B. (2003). When adapted to high zinc concentrations the periphytic green alga *Stigeoclonium tenue* produces high amounts of novel phytochelatin-related peptides. *Aquat. Toxicol.* 62 (2): 155-163.
- PAWLIK-SKOWRONSKA, B., PIRSZEL, J., KALINOWSKA, R. & SKOWRONSKI, T. (2004). Arsenic availability, toxicity and direct role of GSH and phytochelatin in As detoxification in the green alga *Stichococcus bacillaris*. *Aquat. Toxicol.* 70 (3): 201-212.
- PEARSON, R. G. (1963). Hard and soft acids and bases. *J. Am. Chem. Soc.* 85 (22): 3533-3536.
- PENTECOST, A. (2002). Order Volvocales. In: *The freshwater algal flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae* (John, D. M., Whitton, B. A. & Brook, A. J., Hrsg.). University Press, Cambridge, S. 303-327.
- PERALES-VELA, H. V., PENA-CASTRO, J. M. & CANIZARES-VILLANUEVA, R. O. (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere* 64 (1): 1-10.
- PETROVIC, M., KAŠTELAN-MACAN, M. & HORVAT, A. J. M. (1999). Interactive sorption of metal ions and humic acids onto mineral particles. *Water, Air, and Soil Pollution* 111 (1-4): 41-56.

- PINHEIRO, J. P., MOTA, A. M. & BENEDETTI, M. F. (1999). Lead and calcium binding to fulvic acids: Salt effect and competition. *Environ. Sci. Technol.* 33 (19): 3398 -3404.
- PINTO, E., SIGAUD-KUTNER, T. C. S., LEITAO, M. A. S., OKAMOTO, O. K., MORSE, D. & COLEPICOLO, P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.* 39 (6): 1008-1018.
- PRÉVÉRAL, S., GAYET, L., MOLDES, C., HOFFMANN, J., MOUNICOU, S., GRUET, A., REYNAUD, F., LOBINSKI, R., VERBAVATZ, J. M., VAVASSEUR, A. & FORESTIER, C. (2009). A common highly conserved cadmium detoxification mechanism from bacteria to humans: heavy metal tolerance conferred by the ATP-binding cassette (ABC) transporter SpHMT1 requires glutathione but not metal-chelating phytochelatin peptides. *J. Biol. Chem.* 284 (8): 4936-4943.
- PRICE, C. A. (1957). A new thiol in legumes. *Nature* 180 (4577): 148-149.
- RAUSCH, T., GROMES, R., LIEDSCHULTE, V., MULLER, I., BOGS, J., GALOVIC, V. & WACHTER, A. (2007). Novel Insight into the Regulation of GSH Biosynthesis in Higher Plants. *Plant Biol.* 9 (5): 565-572.
- RAUSER, W. E. (1995). Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol.* 109 (4): 1141-1149.
- ROSAKIS, A. & KÖSTER, W. (2005). Divalent metal transport in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* is mediated by a protein similar to prokaryotic Nramp homologues. *BioMetals* 18 (1): 107-120.
- SAIER, M. H. (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol R* 64 (2): 354-+.
- SANITÀ DI TOPPI, L. & GABBRIELLI, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* 41 (2): 105-130.
- SANTA, T., AOYAMA, C., FUKUSHIMA, T., IMAI, K. & FUNATSU, T. (2006). Suppression of thiol exchange reaction in the determination of reduced-form thiols by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after derivatization with fluorogenic benzofurazan reagent, 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonate and 4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole. *Biomed Chromatogr* 20 (6-7): 656-661.
- SARRY, J.-E., KUHN, L., DUCRUIX, C., LAFAYE, A., JUNOT, C., HUGOUIVIEUX, V., JOURDAIN, A., BASTIEN, O., FIEVET, J. B., VAILHEN, D., AMEKRAZ, B., MOULIN, C., EZAN, E., GARIN, J. & BOURGUIGNON, J. (2006). The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *PROTEOMICS* 6 (7): 2180 - 2198.
- SCHULZ, H., HARTLING, S. & TANNEBERG, H. (2008). The identification and quantification of arsenic-induced phytochelatins - comparison between plants with varying As sensitivities. *Plant Soil* 303 (1-2): 275-287.

- SCHÜTZENDÜBEL, A. & POLLE, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: Heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* 53 (372): 1351-1365.
- SEIWERT, B., HAYEN, H. & KARST, U. (2008). Differential labeling of free and disulfide-bound thiol functions in proteins. *J Am Soc Mass Spectrom* 19 (1): 1-7.
- SEIWERT, B. & KARST, U. (2007). Simultaneous LC/MS/MS determination of thiols and disulfides in urine samples based on differential labeling with ferrocene-based maleimides. *Anal. Chem.* 79 (18): 7131-7138.
- SEIWERT, B. & KARST, U. (2008). Ferrocene-based derivatization in analytical chemistry. *Anal Bioanal Chem* 390 (1): 181-200.
- SHAFER, D. E., INMAN, J. K. & LEES, A. (2000). Reaction of Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) with maleimide and alpha-haloacyl groups: anomalous elution of TCEP by gel filtration. *Anal. Biochem.* 282 (1): 161-164.
- SHIMADA, K. & MITAMURA, K. (1994). Derivatization of thiol-containing compounds. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 659 (1-2): 227-241.
- SIMMONS, D. B., HAYWARD, A. R., HUTCHINSON, T. C. & EMERY, R. J. (2009). Identification and quantification of glutathione and phytochelatins from *Chlorella vulgaris* by RP-HPLC ESI-MS/MS and oxygen-free extraction. *Anal Bioanal Chem* 395 (3): 809-817.
- SIRIPORNADULSIL, S., TRAINA, S., VERMA, D. P. S. & SAYRE, R. T. (2002). Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell* 14 (11): 2837-2847.
- SMYTH, D. G., NAGAMATSU, A. & FRUTON, J. S. (1960). Some reactions of N-Ethylmaleimide. *J Am Chem Society* 82 (17): 4600-4604.
- SNELLER, F. E. C., HEERWAARDEN, L. M. v., KOEVOETS, P. L. M., VOOIJS, R., SCHAT, H. & VERKLEIJ, J. A. C. (2000). Derivatization of phytochelatins from *Silene vulgaris*, induced upon exposure to arsenate and cadmium: Comparison of derivatization with Ellman's reagent and monobromobimane. *J. Agric. Food Chem.* 48 (9): 4014-4019.
- STOHS, S. J. & BAGCHI, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal-ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18 (2): 321-336.
- STOIBER, T. L., SHAFER, M. M. & ARMSTRONG, D. E. (2010). Differential Effects of Copper and Cadmium Exposure on Toxicity Endpoints and Gene Expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Toxicol. Chem.* 29 (1): 191-200.
- STRASDEIT, H. (2001). Das erste cadmiumspezifische Enzym. *Angew. Chem.* 113 (4): 730-732.
- STRASDEIT, H., DUHME, A. K., KNEER, R., ZENK, M. H., HERMES, C. & NOLTING, H. F. (1991). Evidence for discrete Cd(S-Cys)₄ units in cadmium phytochelatin complexes from EXAFS spectroscopy. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*: 1129-1130.

- SUÁREZ, C., TORRES, E., PÉREZ-RAMA, M., HERRERO, C. & ABALDE, J. (2010). Cadmium toxicity on the freshwater microalga *Chlamydomonas moewusii* Gerloff: Biosynthesis of thiol compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* 29 (9): 2009-2015.
- TAKATERA, K. & WATANABE, T. (1992). Application of High-Performance Liquid-Chromatography Inductively Coupled Plasma Mass-Spectrometry to the Speciation of Cadmium-Binding Metallothionein-Like Protein in a Cyanobacterium. *Anal Sci* 8 (4): 469-474.
- TANNER, S. D., BARANOV, V. I. & VOLLKOPF, U. (2000). A dynamic reaction cell for inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-DRC-MS) - Part III. Optimization and analytical performance. *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (9): 1261-1269.
- TESSIER, A. & TURNER, D. R. (1996). Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. Wiley, Chichester.
- THOLEY, A. & SCHAUMLÖFFEL, D. (2010). Metal labeling for quantitative protein and proteome analysis using inductively-coupled plasma mass spectrometry. *Trac-Trend Anal Chem* 29 (5): 399-408.
- TIETZE, F. (1969). Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione - Applications to Mammalian Blood and Other Tissues. *Anal. Biochem.* 27 (3): 502-&.
- TORRES, E., CID, A., FIDALGO, P., HERRERO, C. & ABALDE, J. (1997). Long-chain class III metallothioneins as a mechanism of cadmium tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin. *Aquat. Toxicol.* 39: 231-246.
- TSUJI, N., HIRAYANAGI, N., IWABE, O., NAMBA, T., TAGAWA, M., MIYAMOTO, S., MIYASAKA, H., TAKAGI, M., HIRATA, K. & MIYAMOTO, K. (2003). Regulation of phytochelatin synthesis by zinc and cadmium in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Phytochemistry* 62 (3): 453-459.
- TSUJI, N., HIRAYANAGI, N., OKADA, M., MIYASAKA, H., HIRATA, K., ZENK, M. H. & MIYAMOTO, K. (2002). Enhancement of tolerance to heavy metals and oxidative stress in *Dunaliella tertiolecta* by Zn-induced phytochelatin synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293 (1): 653-659.
- TYAGARAJAN, K., PRETZER, E. & WIKTOROWICZ, J. E. (2003). Thiol-reactive dyes for fluorescence labeling of proteomic samples. *Electrophoresis* 24 (14): 2348-2358.
- VACCHINA, V., CHASSAIGNE, H., OVEN, M., ZENK, M. H. & LOBINSKI, R. (1999). Characterisation and determination of phytochelatin in plant extracts by electrospray tandem mass spectrometry. *Analyst* 124 (10): 1425-1430.
- VACCHINA, V., LOBINSKI, R., OVEN, M. & ZENK, M. H. (2000). Signal identification in size-exclusion HPLC-ICP-MS chromatograms of plant extracts by electrospray tandem mass spectrometry (ES MS/MS). *J. Anal. At. Spectrom.* 15: 529-534.
- VATAMANIUK, O. K., MARI, S., LANG, A., CHALASANI, S., DEMKIV, L. O. & REA, P. A. (2004). Phytochelatin synthase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with gamma-glutamylcysteine during catalysis: Stoichiometric and site-directed mutagenic

- analysis of *Arabidopsis thaliana* PCS1-catalyzed phytochelatin synthesis. J. Biol. Chem. 279 (21): 22449-22460.
- VATAMANIUK, O. K., MARI, S., LU, Y.-P. & REA, P. A. (1999). AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: Isolation and in vitro reconstitution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (12): 7110-7115.
- VATAMANIUK, O. K., MARI, S., LU, Y.-P. & REA, P. A. (2000). Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase: Blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. J. Biol. Chem. 275 (40): 31451-31459.
- VETTERLEIN, D., WESENBERG, D., NATHAN, P., BRÄUTIGAM, A., SCHIERHORN, A., MATTUSCH, J. & JAHN, R. (2009). *Pteris vittata* - Revisited: Uptake of As and its speciation, impact of P, role of phytochelatin and S. Environ. Pollut. 157 (11): 3016-3024.
- VIVARES, D., ARNOUX, P. & PIGNOL, D. (2005). A papain-like enzyme at work: Native and acyl-enzyme intermediate structures in phytochelatin synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (52): 18848-18853.
- VOIGT, J. (1985). Extraction by lithium chloride of hydroxyproline-rich glycoproteins from intact-cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. Planta 164 (3): 379-389.
- WAGNER, G. J. (1993). Accumulation of Cadmium in Crop Plants and Its Consequences to Human Health. Advances in Agronomy, Vol 51 51: 173-212.
- WANG, T. L. & WU, M. (2006). An ATP-binding cassette transporter related to yeast vacuolar ScYCF1 is important for Cd sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Cell Environ. 29 (10): 1901-1912.
- WESENBERG, D., KRAUSS, G.-J. & SCHAUMLÖFFEL, D. (2010). Metallo-thiolomics: Investigation of thiol peptide regulated metal homeostasis in plants and fungi by liquid chromatography-mass spectrometry; doi:10.1016/j.ijms.2010.10.026. International Journal of Mass Spectrometry.
- WÜNSCHMANN, J., BECK, A., MEYER, L., LETZEL, T., GRILL, E. & LENDZIAN, K. J. (2007). Phytochelatin synthesis is regulated by two vacuolar serine carboxypeptidases in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 581 (8): 1681-1687.