

**Physiologisch-biochemische Mechanismen der
Schwermetalltoleranz bei *Armeria maritima* (Mill.)
Willd. ssp. *halleri* (Wallr.)**

Dissertation

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

vorgelegt der

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

von

Clarice de Figueiredo

geboren am 13. August 1968 in Mödling / Österreich

Gutachter: Dr. habil. D. Neumann, Institut für Pflanzenbiochemie Halle
Prof. Dr. G.-J. Krauß, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
Prof. Dr. G. Wanner, Botanisches Institut der Universität München

Verteidigung am 24.09.2002, Halle / Saale

urn:nbn:de:gbv:3-000004048

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004048>]

1	Einleitung	1
1.1	Die Wirkung von Schwermetallen und Silizium auf Pflanzen	1
1.2	Adaptationsmechanismen schwermetalltoleranter Pflanzen	3
1.3	Grundlagen der analytischen Elektronenmikroskopie	8
1.3.1	Röntgenmikroanalyse (EDXA)	10
1.3.2	Elektronenenergieverlustspektroskopie (EELS) und elementspezifisches Abbildungsverfahren (ESI)	10
1.4	Problemstellung und Ziel der Arbeit	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Verwendete Substanzen	13
2.2	Pflanzenmaterial	13
2.2.1	Pflanzen	13
2.2.2	Keimlinge	14
2.2.3	Hydroponische Pflanzen	14
2.3	Schwermetallstress	14
2.4	Allgemeine Methoden	15
2.4.1	Bestimmung der Metallkonzentrationen im Boden mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS)	15
2.4.2	Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz	15
2.4.3	Lichtmikroskopische Methoden	15
2.4.4	Extraktion löslicher phenolischer Verbindungen	16
2.4.5	Gesamtphenolbestimmung	16
2.4.6	UV/Vis-Spektren	16
2.5	Proteinanalytische Methoden	17
2.5.1	Proteinextraktion	17
2.5.2	Proteinbestimmung	17
2.5.3	Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	18
2.5.4	Coomassie-Färbung	19
2.5.5	Silber-Färbung	19
2.5.6	Affinitätschromatographie	20
2.5.7	Westernblott	20
2.5.8	Antikörper	21
2.5.9	Färben der Membranen mit Ponceau S	21
2.5.10	N-terminale Protein-Sequenzierung	21
2.6	HPLC-Methoden	22
2.6.1	Analyse phenolischer Verbindungen	22

2.6.2	Analyse von Thiolen mittels Derivatisierung mit Monobrombiman	23
2.7	Elektronenmikroskopische Methoden	24
2.7.1	Glutaraldehyd-Osmium-Fixierung und Einbettung	24
2.7.2	Ultramikrotomie	25
2.7.3	Kontrastierung der Ultradünnschnitte mit Bleicitrat	25
2.7.4	Probenpräparation zur Elementanalyse	25
	2.7.4.1 Gefrierfixierung	25
	2.7.4.2 Gefriersubstitution	26
2.7.5	EDX-Messungen	26
2.7.6	ESI-Abbildungen und EEL-Spektren	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Standorte	28
3.2	Morphologie der Blätter	28
3.3	Ausscheidung von Schwermetallen	30
	3.3.1 Ausscheidung durch Salzdrüsen	30
3.4	Speicherung von Schwermetallen in der Zellwand	34
	3.4.1 Verteilung von Cu und Zn in der Zellwand	34
3.5	Speicherung von Schwermetallen im Cytoplasma	36
	3.5.1 Bindung von Schwermetallen an Proteine und Peptide	38
	3.5.1.1 Isolierung Cu-bindender Proteine	38
	3.5.1.2 Westernblot-Analyse schwermetallinduzierter Proteine	40
	3.5.1.3 Phytochelatine	40
3.6	Speicherung von Schwermetallen in der Vakuole	41
	3.6.1 Bindung von Schwermetallen an phenolische Verbindungen	45
	3.6.1.1 Vorkommen phenolischer Verbindungen in <i>Armeria</i>	45
	3.6.1.2 Isolierung und Identifizierung der phenolischen Verbindungen	47
	3.6.1.3 Nachweis der Komplexierung von Schwermetallen	49
	3.6.1.4 Akkumulation phenolischer Verbindungen nach Belastung mit Schwermetallen	53
3.7	Zn-Expositionsversuche mit Keimlingen	55
	3.7.1 Untersuchungen zur Aufnahme und Verteilung von Zn in <i>Armeria</i>	55
	3.7.2 Nachweis der Vitalität von Keimlingen nach Schwermetallbelastung	58

3.8	Silizium in <i>Armeria</i>	59
4	Diskussion	66
4.1	Kupfer	66
4.1.1	Cu in der Zellwand	66
4.1.2	Cu im Cytoplasma	67
4.1.3	Komplexierung von Cu in der Vakuole	72
4.2	Zink	75
4.3	Silizium	78
5	Zusammenfassung	80
6	Literaturverzeichnis	83

Abkürzungen

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
cps	<i>counts per second</i>
d	Tage
d	Schnittdicke
DFT	Dichte-Funktions-Theorie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ΔE	Energieverlust
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	<i>energy dispersive X-ray microanalysis</i>
EELS	<i>electron energy loss spectroscopy</i>
EM	Elektronenmikroskop
ERL	<i>Epoxy Resin Low Viscosity</i>
ESI	<i>electron spectroscopic imaging</i>
ESI-MS	Electrospray-Massenspektrometrie
et al.	und andere
EXAFS	<i>extended X-ray absorption fine structure</i>
eV	Elektronenvolt
FG	Frischgewicht
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GA	Glutaraldehyd
G-Os	Glutaraldehyd-Osmium
GS	Glutathion-Synthetase
GSH	Glutathion (reduziert)
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HEPPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HSP	Hitzeschockprotein

I	Intensität
I_0	Intensität der ungestreuten und elastisch gestreuten Elektronen
ICP	induktiv gekoppeltes Plasma
ICP-MS	induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie
I_t	Intensität aller (gestreut und ungestreut) Elektronen
kDa	Kilodalton
λ	mittlere freie Weglänge der inelastisch gestreuten Elektronen
lmw	<i>low molecular weight</i>
LSM	Laserscan Mikroskopie
mA	Milliampère
mBrB	Monobrombiman (3,7-Dimethyl-4-brommethyl-6-methyl-1,5-diazabicyclo-[3.3.0]-octa-3,6-dien-2,8-dion)
Me	Metall
MS	Massenspektometrie
MS	Murashige & Skoog
MSA	Methasulfonsäure
MT	Metallothionein
m/z	Masse/Ladungsquotient
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS + 0,1% Tween 20
PC	Phytochelatin
PFA	Polyfluralkoxy
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVPP	Polyvinylpyrrolidon
REM	Rasterelektronenmikroskop
RP	<i>reversed phase</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	relative Standardabweichung
TCA	Trichloressigsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TG	Trockengewicht
TFA	Trifluoressigsäure

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV/Vis	Ultravioletter bis sichtbarer Lichtwellenbereich
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
Vol.	Volumenanteile
w/v	Gewicht/Volumen
XAS	<i>X-ray absorption spectroscopy</i>
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Struktur und Funktion: Die Verknüpfung beider Aspekte der Biologie gestattet dem Biologen Zusammenhänge zu erkennen, die zum Verstehen des Lebens von Organismen führen. Pflanzeneigene Strukturen weisen auf biologische Funktionen hin und umgekehrt. Dem entspricht das Konzept der vorliegenden Arbeit: Die Kenntnis über die Ultrastruktur und die räumliche Verteilung von Schwermetallen in einer schwermetalltoleranten Pflanze bilden den Ausgangspunkt, um die Mechanismen der Schwermetalltoleranz in höheren Pflanzen aufzuklären.

1.1 Die Wirkung von Schwermetallen und Silizium auf Pflanzen

Einige Schwermetalle, wie z.B. Kupfer und Zink, sind für die Pflanzen essentiell und werden zu den Mikronährstoffen gezählt (Marschner 1995). Sie sind Bestandteil verschiedener Enzyme und Proteine und für das normale Pflanzenwachstum notwendig. Beim Überschreiten einer für jedes Element und jeden Organismus spezifischen Konzentration können sie allerdings toxisch wirken. Andere Schwermetalle, wie Cd, Pb und Hg, haben dagegen keine bekannte biologische Funktion und sind schon in geringen Konzentrationen toxisch für die meisten Organismen. Die Toxizität von Schwermetallen kann generell auf die Eigenschaft dieser Metalle zurückgeführt werden, mit einer Vielzahl von organischen Molekülen in Wechselwirkung zu treten. Cu beispielsweise ist ein Spurenelement, das von allen lebenden Organismen gebraucht wird, aber auch potentiell toxisch ist. Seine Notwendigkeit und seine Toxizität beruhen in erster Linie auf der Eigenschaft des Cu-Ions in Elektronenübertragungsreaktionen zu wirken. Freie Cu-Ionen oxidieren allerdings die Thiol-Bindungen von Proteinen und zerstören somit deren Sekundärstruktur (Übersicht in: Himmelblau & Amasino 2000).

Weitere Elemente, wie Se, Co und Si, scheinen einen positiven Effekt auf das Wachstum einiger Pflanzen zu haben (Reeves & Baker 2000, Epstein 1999).

Einige Pflanzenspezies sind an Umweltbedingungen mit hohen Schwermetallgehalten im Boden adaptiert und sind in der Lage auf Böden, die mit bestimmten Schwermetallen kontaminiert sind, zu wachsen (Antonovics et al., 1971, Ernst 1974, 1992). Eine Wirkung von Schwermetallen in Pflanzen kann nur erwartet werden, wenn diese in einer für Pflanzen verfügbaren Form vorliegen (Ernst 1974). Das hängt von der chemischen Natur der

Schwermetallverbindungen, der Zusammensetzung des Bodens, z.B. können Huminsäuren Schwermetallen reversibel binden, und dem pH-Wert ab, der durch Ausscheidung von Säuren in der Rhizosphäre von den Pflanzen beeinflusst werden kann. So können Pflanzen die Verfügbarkeit von Metallen im Boden verändern, indem sie Wurzelexudate wie z.B. Phytosiderophoren ausscheiden. Diese erleichtern die Aufnahme von Zn und Fe in einigen Gräsern (Cakmak et al., 1998, Rengel 1998). Obwohl im Allgemeinen die Pflanzenverfügbarkeit der Schwermetalle sehr gering ist, reicht die Akkumulation der über einen längeren Zeitraum aufgenommenen Schwermetalle aus, um in den meisten Pflanzen Vergiftungserscheinungen auszulösen. Nur Pflanzen, die wirkungsvolle Entgiftungsmechanismen besitzen, können unter solchen Bedingungen wachsen.

Der Kupferschieferbergbau der vergangenen Jahrhunderte im Harz und Mansfelder Land verursachte die Entstehung von Standorten mit erhöhtem Vorkommen an Cu und Zn, auf denen sich eine typische Metallophytenflora ansiedeln konnte. Obwohl die meisten Metallophyten eine Resistenz gegenüber den Elementen aufweisen, die an diesen Schwermetallstandorten vorkommen, zeigen einige eine sogenannte Coresistenz gegenüber weiteren Metallen auf (Baker & Walker 1989, Verkleij & Schat 1990). *Armeria maritima* (Mill.) Willd. ssp. *halleri* (Wallr.), eine mehrjährige Plumbaginaceae, wurde bereits 1924 von Linstow als Hyperakkumulierer von Pb beschrieben. Diese Pflanze zeichnet sich aber zusätzlich durch ihre Toleranz gegenüber weiteren Schwermetallen, wie Cu und Zn, aus.

Die Toleranz von *Armeria* gegenüber Cu ist das Ergebnis von morphologischen Besonderheiten und biochemischen Veränderungen. Ein Großteil der aufgenommenen Metalle wird durch Salzdrüsen auf den Blattoberflächen aktiv wieder ausgeschieden. Eine Ausscheidung von Schwermetallen an der Blattoberfläche wird auch in *Minuartia verna* beobachtet, dort wird diese Detoxifikation durch Hydathoden erreicht (Neumann et al., 1997a). Der intrazelluläre Hauptspeicherort für Cu sind die tanninhaltigen Vakuolen der Idioblasten, worin das Metall vermutlich mit phenolischen Verbindungen komplexiert wird (Neumann et al., 1995).

Silizium ist quantitativ der am häufigsten vorkommende inorganische Bestandteil von höheren Pflanzen. Abgesehen von dessen Rolle als Zellwandbestandteil monocotyler Pflanzen, wird es allgemein nicht als essentiell für Pflanzen angesehen (Epstein 1999). Zunehmend gibt es Hinweise darauf, dass Si auch an physiologischen Prozessen beteiligt ist (Übersicht in Hodson & Evans 1995, Epstein 1999). Zahlreiche Autoren berichten von einer Verminderung der Toxizität verschiedener Elemente nach Si-Zugabe. So wird die Toxizität von Mn durch Si-Applikation reduziert (Horst & Marschner 1978), und in einigen Spezies wird

die Aufnahme von Mn durch eine Zugabe von Si erniedrigt (Bowen 1972, Galvez et al., 1989). Eine gleichzeitige Akkumulation von Al und Si in Wurzeln wurde beispielsweise in Vakuolen von *Zea mays* (Vásquez et al., 1999) und Zellwänden von *Triticum aestivum* gefunden (Cocker et al., 1998). Die gleichzeitige Akkumulation von Si und Al im Pflanzengewebe wird als Grund angegeben für die verminderte Toxizität des Al (Hodson & Sangster 1993).

Einige Si-akkumulierende Dicotyledonen sind beschrieben worden (*Minuartia verna*, *Silene vulgaris*, *Thlaspi caerulescens*, *Viola calaminaria*, *Pisum sativum*, *Cardaminopsis halleri*), bei denen Si-Ablagerungen in den Zellwänden, Interzellularen und Vakuolen gefunden wurden (Neumann et al., 1997a, Bringezu et al., 1999, Neumann & zur Nieden 2001). Die Bildung von Zinksilikat wird als einer der Schwermetalltoleranz-Mechanismen in *Cardaminopsis halleri* angesehen und könnte an der Toleranz gegenüber Zn beteiligt sein (Neumann & zur Nieden 2001).

1.2 Adaptationsmechanismen schwermetalltoleranter Pflanzen

Traditionell werden bei Adaptationen an Schwermetallstress *avoidance*- und *tolerance*-Mechanismen unterschieden. Als *avoidance* wird die Vermeidung von toxischen und schädlichen Effekten in der Pflanze verstanden, die durch Einschränkung der Schwermetallaufnahme erreicht wird (Levitt 1980). Solche *metal excluder* sind z.B. die höheren Pflanzen *Silene vulgaris* und *Minuartia hirsuta*, die beide eine Cu-Resistenz aufweisen. Die Verminderung der Schwermetallaufnahme kann durch Immobilisierung im Boden erreicht werden, z.B. durch Ausscheidung von Wurzelexudaten, durch Änderungen in der Plasmamembran, wodurch diese weitgehend impermeabel für Schwermetalle wird, oder indem Schwermetalle nach der Aufnahme wieder ausgeschieden werden. In einigen Spezies sind bestimmte Arten mit relativ hoher Toleranz gegenüber Al dafür bekannt, dass sie den pH der Nährlösung erhöhen und somit die Löslichkeit und Toxizität dieses Elements verringern (Foy 1978).

Schwermetalltolerante Pflanzen besitzen eine Reihe von Mechanismen, die darauf zielen, die intrazellulären Konzentrationen an Schwermetallen in einem Gleichgewicht zwischen Mangel und Toxizität zu halten, um einerseits die Aktivität verschiedener Enzyme und Stoffwechselwege zu gewährleisten und andererseits die toxischen Wirkungen zu minimieren.

Diese Mechanismen sind in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt und umfassen:

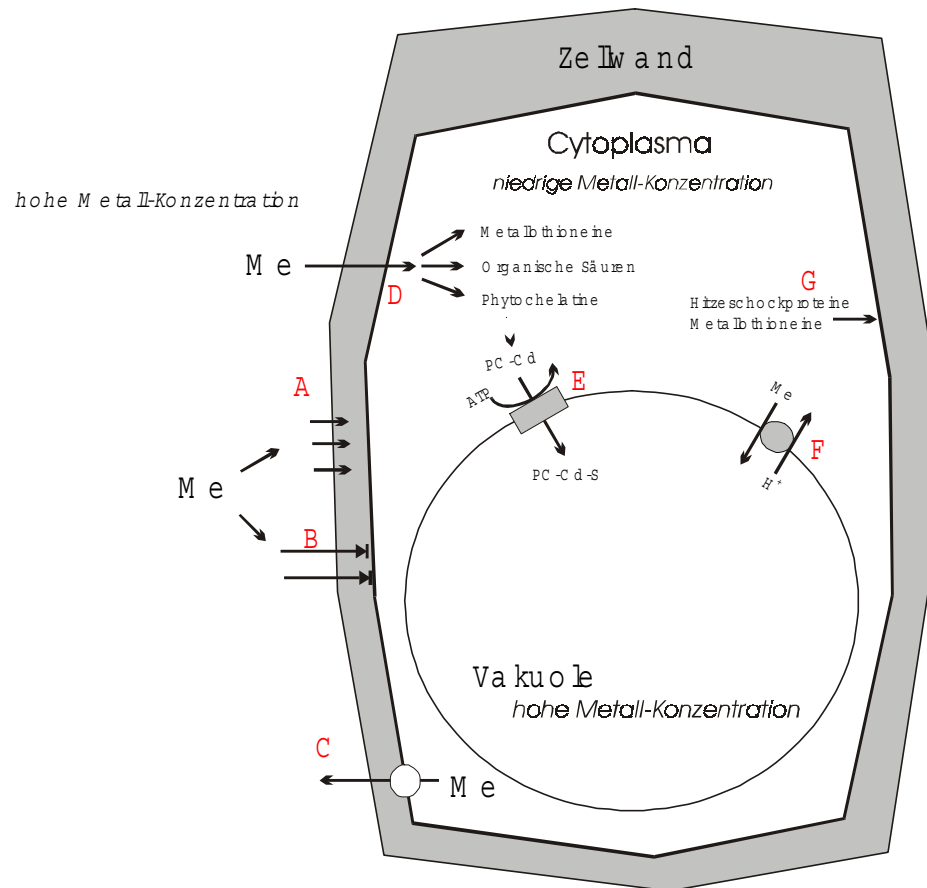


Abbildung 1.1: Zusammenfassung der möglichen Mechanismen der Schwermetall-Toleranz in höheren Pflanzen.

A: Bindung an der Zellwand. **B:** Verminderte Aufnahme an der Plasmamembran.

C: Efflux von Metall-Ionen (Me) durch das Plasmalemma. **D:** Komplexierung von Schwermetallen im Cytoplasma durch verschiedene Chelatoren. **E:** Vakuolären Transport von PC-Cd-Komplexe durch ABC-Transporter. **F:** Vakuolären Transport und Akkumulation von Metallen mittel eines Metall/H⁺-Antiport Systems. **G:** Stabilisierung und Reparatur des Plasmalemmas unter Stress.

(Verändert nach Marschner, 1995).

A Bindung von Metallen an Bestandteile der Zellwand

Die Bindung von Schwermetallen an Bestandteile in der Zellwand spielt möglicherweise eine Rolle bei der Cu-Toleranz (Turner 1970, Inouhe et al., 1991). Die Carboxyl- und die phenolischen Hydroxylgruppen der organischen Zellwandkomponenten sind wahrscheinlich

die wichtigsten Bindungsstellen für Metallionen in der Zellwand (Jones 1978). So wurde in *Neurospora crassa* die Bindung von Cu an ein zellwandgebundenes Polyphenol nachgewiesen (Suresh & Subramanyam 1998).

B, C Verminderte Aufnahme durch die Plasmamembran und aktive Ausscheidung

Eine weitere Möglichkeit, die Schwermetallkonzentration im Cytoplasma niedrig zu halten, wäre eine verminderte Aufnahme oder ein aktiver Efflux, wie in Bakterien und Hefen beschrieben ist.

Eine ganze Reihe von pflanzlichen Metalltransportern in der Plasmamembran ist mittlerweile identifiziert worden (Übersicht in: Williams et al., 2000, Clemens 2001). Die Aufnahme von Fe(II) und Zn(II) beispielsweise wird durch ZIP-Transporter vermittelt. ZIP steht für **Z**RT, **I**RT *related Proteins* (Fox & Guerinot 1998), eine neue Familie von Kationentransportern, die zunächst in Pflanzen identifiziert wurde (Eide et al., 1996) und in zahlreichen Eukaryoten vorkommt. Die Aufnahme von Cu in Arabidopsis erfolgt wahrscheinlich durch den putativen Cu-Transporter COPT1 (*copper transporter 1*) der einige Sequenzhomologien zu CTR1, einen Transportprotein aus Hefe zeigt (Kaempfenkel et al., 1995).

Es gibt in der Literatur allerdings nur sehr wenige Beispiele für einen verminderten Aufnahme- oder aktiven Ausscheidungsmechanismus in höheren Pflanzen (Hall 2002). Die Gesamtkonzentrationen an Schwermetallen in toleranten und sensitiven Zellkulturen, die mit Schwermetallen behandelt wurden, unterscheiden sich häufig nicht wesentlich voneinander. Dadurch kann eine verringerte Aufnahme oder aktive Ausscheidung nicht als ein allgemeiner und wesentlicher Mechanismus die Toleranz bei Pflanzen angesehen werden (Gupta & Goldsbrough 1991).

D Komplexierung im Cytoplasma durch verschiedene Chelatoren

Eine der wichtigsten Toleranzmechanismen besteht auf einer schnellen Verminderung freier Schwermetallionen im Cytosol und in den Zellorganellen durch Bildung von Chelat-Komplexen. Metallionen werden im Cytoplasma an Chaperone und Chelatoren gebunden. Cu beispielsweise wird intrazellulär an Cu-Chaperone gebunden, die die Cu-Ionen dann an ihre Zielproteine weitergeben. So vermittelt das Lys7p-Chaperon die Bindung von Cu-Ionen an die Cu/Zn Superoxid-Dismutase (Culotta et al., 1997). Das ATX1(Antioxidant 1) übermittelt Cu-Ionen ins Lumen eines Golgi-Vesikels mittels Ccc2p, einer P-Typ ATPase (Pufahl et al., 1997). Potentielle Chelatoren im Cytosol pflanzlicher Zellen sind Phytochelatine, Glutathion, Metallothioneine, organische Säuren und Aminosäuren.

Moleküle, die eine Komplexbildung mit Metallen eingehen, können für unterschiedliche Metalle spezifisch sein. So wird die Bildung von Metallothioneinen in einigen Spezies durch Cu induziert (Lokelma et al. 1986, Zhou & Goldsbrough 1994, Murphy & Taiz 1995) und die Konzentration an Histidin im Xylemsaft des Ni-Hyperakkumulator *Alyssum lesbiacum* nach Ni-Behandlung um ein Vielfaches erhöht (Krämer et al., 1996).

Phytochelatine und Glutathion

Glutathion (GSH), liegt in Pflanzen in relativ hohen Konzentrationen vor. Es ist ein wichtiges Antioxidans und erfüllt weitere bedeutende Funktionen als Speichermolekül für reduzierten Schwefel und bei der Detoxifikation durch Konjugation mit Xenobiotika. Die Synthese von GSH verläuft in zwei Schritten, die von zwei ATP-abhängigen Enzymen katalysiert werden, der γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase (γ -GCS) und der Glutathion-Synthetase (GS). Im ersten Schritt wird die Anbindung zwischen der γ -Carboxylgruppe des Glutamats und der Aminogruppe des Cysteins durch eine γ -GCS katalysiert. Die Aktivität der γ -EC-S wird durch Kältestress, Trockenheit, photooxidativen Stress, Ozon und Schwermetallexposition erhöht (Noctor et al. 1998). Neben der Rolle im allgemeinen Stressgeschehen ist GSH auch das Substrat für die Synthese von Phytochelatinen, die Schwermetalle an der reduzierten Thiol-Gruppe des Cysteins binden (Zenk 1996).

Phytochelatine sind die am besten untersuchten Peptide in Pflanzen, vor allem in bezug auf die Toleranz gegenüber Cd (Übersicht in: Cobbett 2000). Phytochelatine sind an der Detoxifikation und Homöostase beteiligt, indem sie Schwermetalle durch Bildung von Metall-Thiolat-Komplexen binden (Rauser 1995, Rauser & Meuwly 1995). Phytochelatine besitzen die allgemeine Struktur $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-Gly}$ ($n=2-11$) und werden aus GSH durch das Enzym Phytochelatinsynthase gebildet. Die Gene für die Phytochelatinsynthase wurden vor kurzem in Hefe, *Arabidopsis* und in *Caenorhabditis elegans* identifiziert (Clemens et al., 1999, Ha et al., 1999, Vatamaniuk et al., 1999, Clemens et al., 2001a, Vatamaniuk et al., 2001). In Hefezellen sowie im Gewebe und in Zellkulturen von Pflanzen, die nur mit Spuren essentieller Schwermetalle kultiviert wurden, können Phytochelatine bereits in niedrigen Konzentrationen nachgewiesen werden (Grill et al., 1988b, Kneer & Zenk 1992). Die Synthese von Phytochelatinen beginnt bereits nach wenigen Minuten nach der Schwermetallexposition in Zellkulturen (Grill et al., 1987) und in intakten Pflanzen nach einigen Stunden (Meuwly et al., 1995). Sulfidhaltige Schwermetall-Phytochelatin-Komplexe sind in Hefe und zahlreiche Pflanzen als Reaktion auf Cd nachgewiesen worden (Rauser 1995). In Sulfid-haltigen Komplexen von *Candida glabrata* und *Schizosaccharomyces pombe* konnten intrazelluläre Cd-S-Kristallite nachgewiesen werden, die von zahlreichen $(\gamma\text{-Glu-Cys})_2$ - oder $(\gamma\text{-Glu-Cys})_2\text{-Gly}$ -Peptiden umgeben sind (Dameron et al., 1989).

Es gibt in der Literatur zahlreiche Beispiele für und wider eine Rolle von Phytochelatinen bei der SM-Toleranz. So korrelieren in Cd-sensitiven *Arabidopsis*-Mutanten die Konzentrationen an gebildetem Phytochelatin direkt mit dem Sensitivitätsgrad der jeweiligen Mutante (Howden et al., 1995a, b). Andererseits bildet die sensitive *Silene vulgaris* bei Cu und Zn-Exposition mehr Phytochelatin als tolerante Linien. Dies deutet darauf hin, dass die Menge an Phytochelatinen bei *Silene* nicht für die Toleranz gegenüber Cu und Zn verantwortlich ist (De Vos et al., 1992; Schat & Kalff 1992, Harmens 1993a) außerdem konnte in Zellkulturen von Tomate gezeigt werden, dass in der frühen Phase nach Schwermetallbehandlung häufig höhere Phytochelatinkonzentrationen produziert werden, als für die Bindung der intrazellulären Metallionen notwendig ist (Gupta & Goldsbrough 1990).

Metallothioneine

Metallothioneine (MT) sind ubiquitär vorkommende, cysteinreiche Proteine mit niedrigem Molekulargewicht, die Metallionen in Metall-Thiolat-Clustern binden (Hamer 1986). Der größte Teil der Informationen über die Struktur von pflanzlichen Metallothioneinen kommt aus der DNA-Sequenzanalyse. Das erste Metallothionein, das aus Pflanzen gereinigt wurde, ist das *Ec*-Protein aus Weizen (Lane et al., 1987) und bis heute sind mehr als 50 metallothionein-ähnliche Sequenzen in verschiedenen Pflanzen gefunden worden (Rauser 1999). Metallothioneine werden generell in zwei Gruppen unterteilt. Pflanzliche Metallothioneine gehören hauptsächlich zur MT2-Klasse. In *Arabidopsis* wurden neben den MT1 und MT2-Klassen auch MT3 und MT4-Typen gefunden (Goldsbrough 2000). Die genaue Bedeutung von Metallothioneinen für die Schwermetalldetoxifikation in Tieren und Pflanzen ist noch weitgehend unklar (Lokelma et al., 1984, Zhou & Goldsbrough 1994, Zenk 1996, Schat et al., 2000, Cobbet & Goldsbrough 2000), es gibt aber Hinweise darauf, dass Metallothioneine Schwermetalle, vor allem Cu, komplexieren und somit detoxifizieren können (Dameron & Harrison 1998) und an der Metallhomöostase beteiligt sind.

E,F Transport von Schwermetallen durch verschiedene Transportsysteme und Komplexierung in der Vakuole

Der Transport in die Vakuole ist einer der wichtigsten Mechanismen der Schwermetalltoleranz, wodurch die Konzentration an freien Metallionen im Cytoplasma verringert wird. Für Cd ist eine Akkumulation von Cd-Sulfid in der Vakuole nach der Bildung von Cd-Phytochelatin-Komplexen im Cytoplasma und ein anschließender Transport über ABC-Transporter und Cd/H⁺ Antiporter nachgewiesen worden (Vögeli-Lange & Wagner 1990, Salt & Wagner 1993, Salt & Rauser 1995, Rea et al., 1998).

In verschiedenen Arbeiten wurde die Bedeutung der Kompartimentierung von Schwermetallen in der Vakuole für die Cd und Zn-Toleranz herausgestellt. In Wurzeln von *Thlaspi caerulescens*, dem am besten untersuchten Zn-Hyperakkumulator, wird Zn hauptsächlich in den Vakuolen und zu einem geringeren Teil in den Zellwänden gespeichert (Vásquez et al. 1992). In *Arabidopsis halleri*, einem weiteren Zn-Hyperakkumulator, werden die höchsten Zn-Konzentrationen in den Vakuolen des Palisadenparenchyms gefunden (Küpper et al. 2000, Zhao et al. 2000). Vergleichende Untersuchungen an *Silene vulgaris* zeigten, dass das Transportsystem an den Tonoplasten toleranter Zelllinien sich von dem sensitiver Linien unterscheidet und für eine höhere Akkumulation an Zn verantwortlich ist (Chardonnens et al., 1999).

Die Komplexierung in den Vakuolen erfolgt beispielsweise durch Bindung an organischen Säuren oder phenolischen Verbindungen (Mathys 1977, Wang et al., 1992, Van Stevenick et al., 1990, 1995, Neumann et al., 1995).

G **Synthese von Hitzeschockproteinen**

Als Hitzeschockproteine werden solche Proteine bezeichnet, deren Synthese unter Hitzeschockbedingungen induziert oder erhöht wird (Nover & Scharf 1984, 1997). Sie kommen in allen lebenden Organismen vor. Pflanzliche Hitzeschockproteine werden nach ihrem Molekulargewicht in verschiedenen Familien unterteilt (Vierling 1991). Am Beispiel des humanen HSP 27 konnte *in vitro* die Wirkung eines kleinen Hitzeschockproteins als Chaperon gezeigt werden (Jakob et al., 1993). Chaperone stabilisieren die Proteinfaltung bei Faltungsdefekten oder Translationsfehlern und könnten auch eine Schutz- und Reparaturfunktion bei Schwermetallstress haben, sowie zum Erhalt der Membranintegrität beitragen.

Es gibt Hinweise darauf, dass kleine Hitzeschockproteine (15-30 kDa) nach Hitze- und Schwermetallstress gebildet werden (Neumann et al., 1994, Yeh et al., 1997). In *Oryza sativa* konnte eine Erhöhung der Transkriptmengen kleiner Hitzeschockproteine nach Hitze- und Schwermetallstress beobachtet werden (Tseng et al., 1993).

1.3 **Grundlagen der analytischen Elektronenmikroskopie**

Die analytische Elektronenmikroskopie ermöglicht die komplexe Untersuchung der Ultrastruktur, der Zusammensetzung und der räumlichen Verteilung der Elemente einer

Probe. Die folgende kurze Darstellung der Grundlagen der analytischen Elektronenmikroskopie soll dem Verständnis der in den verwendeten Methoden ablaufenden Ereignisse dienen.

Die Kontrast- und Bildentstehung im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) resultiert aus der Wechselwirkung von Elektronen und Materie. Beim Durchdringen einer festen Probe kommt es zu einer Reihe von Wechselwirkungen zwischen den Elektronen des Strahles und den Probenatomen (Abbildung 1.2). Zur Darstellung der Ereignisse in der Elektronenmikroskopie wird wegen seiner Anschaulichkeit bevorzugt das Atommodell nach Bohr verwendet.

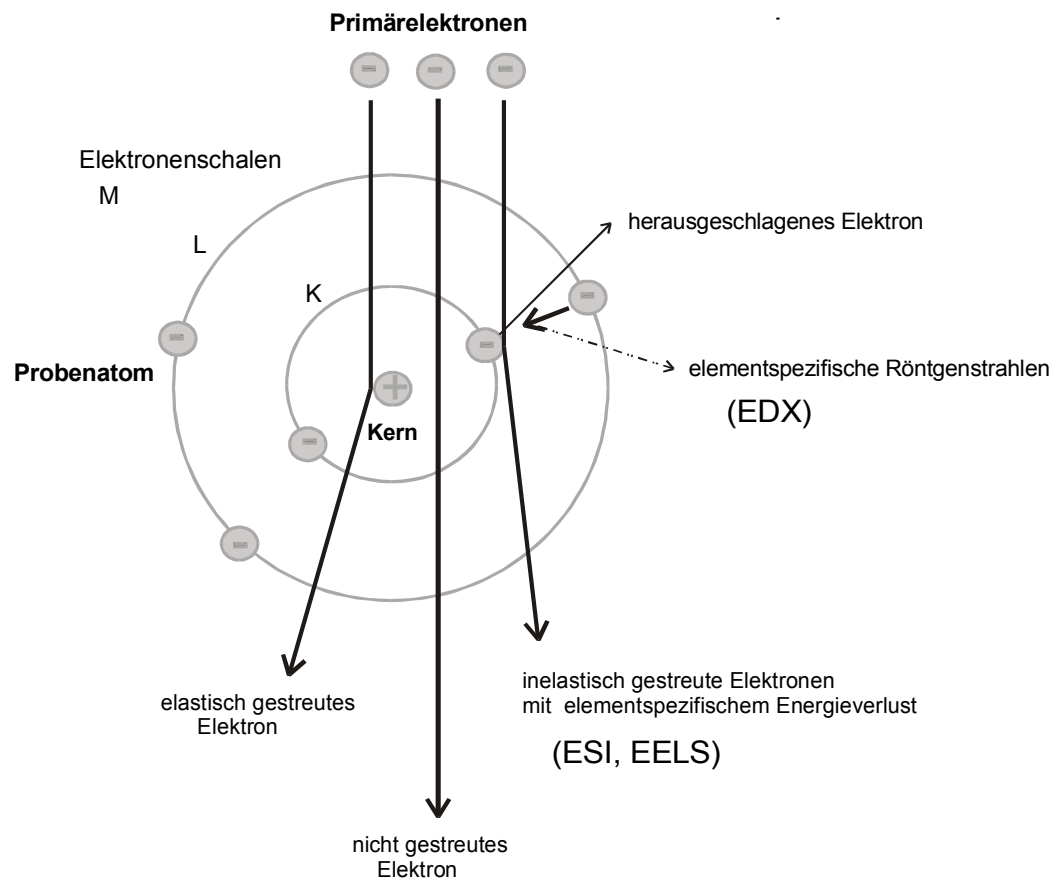


Abbildung 1.2: Wechselwirkungen zwischen Probe und Primärelektronenstrahl (modifiziert nach van Stevenick, 1978).

Nicht gestreute Elektronen gehen unverändert durch die Probe. Elastisch gestreute Elektronen gehen eine Wechselwirkung mit den Atomkernen der Probe ein. Sie werden unter einem großen Winkel gestreut und weisen keinen Energieverlust auf. Unelastisch gestreute Elektronen stoßen auf die Elektronen der Probenatome, werden unter kleinen Winkeln gestreut und weisen einen Energieverlust auf. Schwermetalle mit ihrer hohen

Ordnungszahl enthalten viele Elektronen, die auf die verschiedenen Schalen verteilt sind, und führen zu mehr Streueignissen.

1.3.1 Röntgenmikroanalyse (EDXA)

Röntgenstrahlen entstehen bei der inelastischen Streuung der Elektronen (Abbildung 1.2). Wird ein Atom durch ein Primärelektron des einfallenden Strahles getroffen, so kann die Energie, die auf ein Elektron einer inneren Schale übertragen wird, ausreichend sein um dieses Elektron aus dem Grundzustand auf ein höheres Energieniveau anzuheben. Es entsteht dabei eine Lücke in einer inneren Schale der Elektronenhülle, die durch ein Elektron aus einer Schale höherer Energie aufgefüllt wird. Die Energiedifferenz zwischen den Schalen kann in Form von Röntgenstrahlung emittiert werden, die eine für das jeweilige Element charakteristische Wellenlänge und Energie besitzt. Die erzeugte Röntgenstrahlung wird nach der Bezeichnung der Schalen (K, L, M), in denen die Lücke erzeugt wurde und der Anzahl der Schalen (α , β), die das Elektron übersprungen hat, benannt.

Der Nachweis und die Analyse der emittierten Röntgenstrahlung mit Hilfe geeigneter Detektoren erlaubt es, das Vorkommen, die Menge und die Verteilung von Elementen in einer Probe zu ermitteln. Der große Vorteil der Methode gegenüber anderen Detektionsmethoden, wie die Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS), besteht darin, dass die Probe dabei nicht zerstört werden muss und es möglich ist zwischen Zusammensetzung und räumlicher Verteilung der Elemente auf ultrastruktureller Ebene zu unterscheiden.

1.3.2 Elektronenenergieverlustspektroskopie (EELS) und elementspezifisches Abbildungsverfahren (ESI)

Auf der inelastischen Streuung des Primärelektronenstrahls durch Elektronen der Probenatome basieren zwei analytische Methoden: Die Elektronenenergieverlustspektroskopie (EELS, electron energy loss spectroscopy) und das elementspezifische Abbildungsverfahren (ESI, electron spectroscopic imaging). Die in der Probe inelastisch gestreuten Elektronen werden durch das magnetische Feld eines Elektronenfilters abgelenkt. Dadurch werden Elektronen bestimmter Energie aus der Gesamtheit der transmittierten Elektronen in einem Punkt innerhalb eines definierten Einfallkegels fokussiert.

Der Filter arbeitet wie eine Linse und wird auch als magnetisches Prisma bezeichnet. Das EEL-Spektrum stellt eine Energieverteilung der eine Probe passierenden Elektronen dar. Dieses Spektrum ist charakteristisch für jedes Element und besitzt eine kantennahe Feinstruktur, die vom Bindungszustand des Elementes abhängig ist. Der Vergleich mit Spektren von Standardverbindungen und die Interpretation der Feinstruktur der Ionisationskante mittels quantenchemischer Berechnungen erlauben die Untersuchung des Bindungszustandes eines Elementes.

Eine Abbildung der örtlichen Verteilung eines bestimmten Elements in der Probe ist mittels ESI möglich. Dabei werden die Elektronen mit dem für das betreffende Element charakteristischen Energieverlust ΔE mittels einer Spaltblende ausgeblendet und zur Bilderzeugung verwendet.

1.4 Problemstellung und Ziel der Arbeit

Zahlreiche Publikationen beschäftigen sich mit den potentiellen Mechanismen, die für die Detoxifikation und Toleranz gegenüber Schwermetallen, wie Cu, Cd, Ni und Zn, verantwortlich sind (Übersicht in: Rauser 1999, Clemens 2001, Hall 2002). In einigen Spezies sind Populationen von schwermetallreichen Böden und Populationen von normalen Böden ähnlich schwermetallresistent (Baker 1987). Das trifft auch auf *Armeria* zu.

Es ist notwendig zu prüfen, ob Populationen von Schwermetallstandorten und normalen Standorten sich tatsächlich in ihrer Schwermetallresistenz unterscheiden, bevor man die physiologische Basis ihrer Resistenzmechanismen untersucht. Vorausgegangene Langzeitexperimente mit *Armeria* aus unterschiedlich belasteten Standorten haben gezeigt, dass im Hinblick auf die Toleranz gegenüber Zn keine signifikanten Unterschiede zwischen verschiedenen Populationen bestehen (Köhl 1997). Ob sich die Verteilungsmuster von Schwermetallen in den Zellen und Kompartimenten unterscheiden, wurde dabei nicht gezeigt. Da das Überleben einer Spezies auf Schwermetallreichen Standorten von ihrer Fähigkeit abhängt, auf chronischen Schwermetallstress zu reagieren, wurde in der vorliegenden Arbeit besondere Betonung auf die Verteilung von Cu, Zn und Si in Pflanzen von unterschiedlich belasteten Standorten gelegt. Die Verwendung von Pflanzen von natürlichen Standorten verhindert außerdem Artefakte, die sich bei Fütterung von Schwermetallen im Labor nie ganz ausschließen lassen.

Um Rückschlüsse auf die Mechanismen der Schwermetalltoleranz zu erhalten wurden die Verteilungsmuster verschiedener Metalle in Pflanzen von unterschiedlichen Standorten verglichen und die möglichen Bindungspartner dieser Schwermetalle in den unterschiedlichen Kompartimenten untersucht. Außerdem sollte geprüft werden, ob bei der gleichen Spezies allgemeine Mechanismen für die Toleranz gegenüber Cu und Zn existieren oder ob verschiedene Mechanismen für unterschiedliche Metalle entscheidend sind. Die Kenntnis und Aufklärung der Verteilung im Gewebe würde einen wichtigen Beitrag für das Verständnis der Schwermetalltoleranz bei höheren Pflanzen bedeuten.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Substanzen

Die nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt) oder Fluka (Deisenhofen) bezogen. Organische Lösungsmittel und Säuren lieferten die Firmen Merck (Darmstadt) und J.T.Baker (Griesheim).

2.2 Pflanzenmaterial

2.2.1 Pflanzen

Als Untersuchungsobjekte wurden Blätter und Wurzeln der Pflanze *Armeria maritima* (Mill.) Wild. ssp. *halleri* (Wallr.) von Standorten mit unterschiedlich starker Schwermetallbelastung und eines unbelasteten Kontrollstandortes verwendet (Tabelle 2.1). Auf einer mittelalterlichen Kupferschieferhalde bei Eisleben konnten in regelmäßigen Abständen Exemplare und Samen von *Armeria* gesammelt werden. Die Pflanzen wurden samt Wurzelballen und Erde entnommen, feucht gehalten und zur Weiterverarbeitung ins Labor gebracht.

Die Abraumhalde einer ehemaligen Bronzehütte bei Langelsheim im Harz wurde im Oktober 1998 zum ersten Mal besucht. Zu diesem Zeitpunkt konnten nur Samen gesammelt werden. Bei erneuten Besuchen im April 1999 und Mai 2000 war es möglich, Pflanzen zu sammeln, die hauptsächlich für die Elektronenmikroskopie verwendet wurden. Außerdem wurde Material von einer mittelalterlichen Kupferschieferhalde (Welfesholz) und von einem Zn-belasteten Standort in der Nähe von Aachen (Schlangenberg) verwendet.

Von den Kontrollstandorten Lettin (Porphyrgestein, nahe Halle), Neuendorf (sandiger Boden, nahe Berlin) und einem Versuchsbeet im Garten des Instituts konnte in regelmäßigen Abständen Pflanzenmaterial entnommen werden.

Tabelle 2.1:

Schwermetallstandorte	Kontrollstandorte
Eisleben	Lettin
Langelsheim	Berlin
Welfesholz	Garten (Halle)
Schlangenberg	

2.2.2 Keimlinge

Sterile Suspensionskulturen wurden unter Schütteln (120 rpm) bei 25°C und Dauerlicht in MS-Medium (Murashige & Skoog, 1962) aus Samen von *Armeria* vom schwermetall-belasteten Standort Eisleben herangezogen. Für die Versuche wurden 1,5 bis 2 Wochen alte Keimlinge verwendet.

2.2.3 Hydroponische Pflanzen

Samen vom Standort Eisleben wurden unter sterilen Bedingungen in mit MS-Agar gefüllten 0,5 ml Eppendorf-Gefäßen herangezogen und eine Woche nach dem Auskeimen auf speziell angefertigte Platten gebracht, so dass nur die Wurzeln mit der Nährlösung (MS-Medium) in Berührung kamen. Die Pflanzen wurden in Gewächshäusern unter Langtagsbedingungen (16 h Licht/ 8 h Dunkelheit) und 23°C gehalten. Die Nährlösung wurde 2x wöchentlich gewechselt, die Belastung mit Schwermetallen erfolgte an 4 Monate alten Pflanzen. Nach Entnahme wurden die Pflanzenteile sofort weiterverarbeitet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

2.3 Schwermetallstreß

Den Keimlingen in Flüssigkultur wurden die entsprechenden Stammlösungen der in Wasser gelösten Schwermetalle zugesetzt.

Die Endkonzentrationen der Schwermetallsalze in den Medien betragen:

CuSO ₄ :	10 µM bis 500 µM
ZnCl ₂ :	10 µM bis 1 mM
CdCl ₂ :	50 µM

Die Versuchsdauer betrug 1 h bis 3 Wochen.

2.4 Allgemeine Methoden

2.4.1 Bestimmung der Metallkonzentrationen im Boden mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS)

Zur Bestimmung der Cu- und Zn-Konzentrationen in den Bodenproben wurden ca. 100 mg der Proben mit 6 ml konz. HNO₃, 2 ml H₂SO₄ und 2 ml H₂O versetzt und durch einen zweistufigen Aufschlussverfahren in der Mikrowelle (MDS-205, CEM) in ummantelten PFA-Aufschlußbehältern vollständig in Lösung gebracht.

Anschließend wurden die Proben mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt und mittels AAS (AAAnalyst 800, Perkin Elmer, Überlingen) im Flammenmodus (Acetylen-Luft-Gemisch) bestimmt. Die Gehalte an Cu- und Zn-Ionen wurden mittels Eichkurven im Bereich 0 - 5 mg/l bestimmt.

2.4.2 Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz

Als Vitalitätsbestimmung wurde die Messung der effektiven Quantenausbeute der photochemischen Energieumwandlung im Photosystem II (Mini-PAM, Heinz Walz GmbH, Effeltrich) bei *Armeria*-Keimlingen verwendet. Die Bestimmung des Genty-Parameters erfolgte an Blättern, die 20 min an Dunkelheit adaptiert waren, nach Applikation eines einzelnen, sättigenden Lichtpulses, welcher kurzfristig die photochemischen Reaktionen unterdrückte und eine maximale Chlorophyll-Fluoreszenz induzierte.

Bei der Auswertung wurden die Mittelwerte von jeweils fünf Messungen als *Yield* angegeben, wobei die Kontrollwerte als 100 % gesetzt wurden.

$$Yield = \Delta F / F_m \text{ (Genty-Parameter)}$$

F_m: maximale Fluoreszenz

F: Fluoreszenz kurz vor Applikation des Lichtpulses

2.4.3 Lichtmikroskopische Methoden

Um die Aufnahme von Zink *in vivo* zu untersuchen, wurde eine Reihe von Experimenten mit Keimlingen durchgeführt, wobei das Metall (100 µM ZnCl₂-Lösung) über die Wurzel appliziert wurde. Nach 24, 48 und 72 h Behandlung mit Zn wurden die Keimlinge mit dem Fluoreszenzfarbstoff Newport GreenTM (Molecular Probes) im Dunkeln 1 h inkubiert,

gewaschen und anschließend unter dem konfokalen Mikroskop (LSM 410 invert, Zeiss Oberkochen, Deutschland) beobachtet. Es wurde das ganze Wurzelsystem sowie Querschnitte der Wurzeln und Blätter untersucht. Die Fluoreszenzintensität dieses Farbstoffes erhöht sich in Folge der Bindung an Zn-Ionen.

2.4.4 Extraktion löslicher phenolischer Verbindungen

20 mg Frischmaterial wurden mit 66 µl 80 %igem Methanol (v/v) versetzt und mit einem Ultra-Turrax (Jahnke & Kunkel, Staufen) homogenisiert. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial 1 h bei RT unter Rühren extrahiert, 30 min bei 20 000 x g zentrifugiert und die Überstände abgenommen und filtriert (Centrex®MF, 0,2 µm, Schleicher & Schuell). Die methanolischen Extrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert oder direkt für die HPLC-Analyse und Bindungsassays verwendet.

2.4.5 Gesamtphenolbestimmung

Die Gesamtkonzentrationen an löslichen phenolischen Verbindungen wurden mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz nach Jennings (1981) bestimmt.

100 µl des methanolischen Extraktes wurden mit 900 µl Wasser versetzt, anschließend 0,5 ml Folin-Ciocalteu-Reagenz zugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Danach wurden 5 ml alkalisches Reagenz zugefügt und nach 30 min Inkubationszeit die Absorption bei 760 nm gemessen. Der Gesamtphenolgehalt wurde anhand einer mit Rutin oder Zimtsäure erstellten Eichkurve ermittelt.

Lösungen:	Folin-Ciocalteu Reagenz:	1 N	
	Alkalisches Reagenz:	0,1 N	NaOH
		2 %	Na ₂ CO ₃

2.4.6 UV/Vis- Spektren

Die Wechselwirkung der Flavonoide Rutin, Quercetin und der Hauptkomponente (Myricetin-3-Glucorhamnosid) mit Cu(II)- und Zn(II)-Ionen wurde mittels UV/Vis Spektroskopie bei pH 7,2 und 5,5, die in Annäherung den pH-Werten von Cytoplasma und Vakuole entsprechen, untersucht.

Die UV/Vis-Spektren von 25 µM Flavonol in 10 mM Tris-Lösung bei pH 7,2 und 5,5 wurden von 600 bis 200 nm aufgezeichnet (UV/Visible Spektrometer Cary 3E, Varian, Schweiz).

Es wurden jeweils Spektren des Flavonols, des Flavonols mit einer äquimolaren Konzentration an Cu(II)-Ionen (50 μM CuSO_4) oder Zn(II)-Ionen (50 μM ZnCl_2) und von 25 μM des Flavonols mit einer äquimolaren Konzentration an Metallionen und 125 μM EDTA aufgenommen.

2.5 Proteinanalytische Methoden

2.5.1 Proteinextraktion

Jeweils 1 g gefrorenes Blatt- oder Wurzelmaterial wurde in 1 ml Puffer auf Eis homogenisiert und nach Zugabe von 30 % Triton-100 (50 μl auf 1 ml) 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Rohextrakt durch 2 Lagen *cheese-cloth* filtriert und 15 min zentrifugiert (4°C, 20 000 x g). Der Überstand wurde entnommen und mit Chloroform/Methanol nach Wessel & Flügge (1984) gefällt.

Homogenisierungspuffer:	25 mM	KCl
	10 mM	MgCl_2
	50 mM	Tris-HCl, pH 7,8
	0,2 M	EDTA
	10 μM	PMSF
	0,08 % (v/v)	2-Mercaptoethanol
	0,05 %	PVP 20

Nach dem Trocknen wurden die Proteine entweder bei -80 °C aufbewahrt oder in Probenpuffer für die Elektrophorese aufgenommen.

2.5.2 Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit einem Fertigreagenz (Sigma) nach dem Protokoll des Herstellers.

Für die Ermittlung der Proteinkonzentrationen von Proben, die Detergenzien (z.B. SDS) und teilweise nur sehr geringe Proteinmengen enthielten, wurde eine störungsfreie Mikromethode nach Popov et al. (1975) verwendet. Hierbei bindet sich der saure Farbstoff Amidoschwarz 10^B an die Aminogruppe der Proteine und bildet mit ihnen saure Komplexe. Diese Komplexe lösen sich im basischen Milieu wieder, und die Amidoschwarzkonzentration kann dann photometrisch bei 624 nm bestimmt werden.

100 µl Standard bzw. Probe wurden mit 0,5 ml Gebrauchslösung in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 5 min bei 13 000 rpm zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 1 ml "Acid" aufgenommen. Nach kräftigem schütteln wurde wieder bei 13 000 rpm zentrifugiert. Das Waschen wurde noch zweimal wiederholt, der Überstand verworfen und das Pellet in 300 µl 0,1 N NaOH aufgenommen. Die Extinktionsbestimmung erfolgte bei 624 nm und der Proteingehalt wurde anhand einer mit BSA erstellten Eichkurve ermittelt.

Lösungen:

Proteinstandard:	100 µg /ml BSA in Aqua bidest	
Färbelösung:		
Stammlösung:	0,13 g	Amidoschwarz 10 ^B
	1 ml	100 %ige Essigsäure
	9 ml	Methanol
Gebrauchslösung:	0,5 ml	Stammlösung
	24,5 ml	"Acid"
Acid:	10 ml	Essigsäure
	90 ml	Ethanol
Alkalisches Reagenz:	0,1 N	NaOH

2.5.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in Minigelapparaturen von Biotec Fischer (Reiskirchen, Deutschland) nach der Methode von Laemmli (1970) an 10-20 %igen Gradientengelen. Die Proteinextrakte wurden mit Probenpuffer versetzt und 3 min auf 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte im Tris-Glycin-Puffer anfangs bei einer Stromstärke von 20 mA, (1 h), später bei 30 mA je Kammer. Anschließend wurden die Gele auf Nitrocellulose oder PVDF-Membranen geblottet bzw. mit Coomassie Blue G-250 Lösung gefärbt. Bei sehr kleinen Proteinmengen wurde eine Silberfärbung durchgeführt.

Lösungen:

Probenpuffer:	200 mM	Tris-HCl, pH 6,8	
	8 %	Glycerol	
	0,02 %	SDS	
	2,5 % (v/v)	2-Mercaptoethanol	
	0,006 %	Bromphenolblau	
Schwere Lösung:	20 %	Bisacrylamid	
	10 %	Saccharose	
Leichte Lösung:	10 %	Bisacrylamid	

Tris-Glycin-Puffer:	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	0,1 %	SDS, pH 8,3

2.5.4 Coomassie-Färbung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele 30-45 min mit Fixierer behandelt, anschließend ca. 2 Stunden in der Coomassie Lösung gefärbt, über mehrere Stunden entfärbt, in Geltrocknungsfolie (Promega) eingespannt und über mehrere Tage bei RT getrocknet.

Lösungen:

Fixierer:	50 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
Coomassie-Lösung:	0,025 % (w/v)	Coomassie G-250
	10 % (v/v)	Essigsäure
Entfärber:	300 ml	Methanol
	50 ml	Glycerin
	650 ml	H ₂ O

2.5.5 Silber-Färbung

Die Färbung wurde nach der Methode von Blum et al. (1987) durchgeführt. Das Gel wurde zunächst für 1 Stunde in Fixierer inkubiert und danach 2 x 20 min mit Ethanol gewaschen. Nach einer Minute Vorbehandlung mit Natriumthiosulfatlösung und Waschen mit Wasser (3x 20 s), erfolgte die Inkubation in der Silbernitratlösung für 20 min. Nach erneutem Waschen mit Wasser (3 x 20 s) wurde das Gel in Entwickler gefärbt, mit Wasser (3 x 1 min) gewaschen und die Farbreaktion durch Inkubation mit Fixierer gestoppt. Die Trocknung der Gele erfolgte wie unter 2.5.4 beschrieben.

Lösungen:

Fixieren:	50 % (v/v)	Methanol
	12 % (v/v)	Ethanol
Waschen:	50 % (v/v)	Ethanol
	(jeweils auf 100 ml)	
Vorbehandlung:	40 mg	Na ₂ S ₂ O ₃
Imprägnieren:	200 mg	AgNO ₃
	37 %	Formaldehyd
Entwickeln:	6 g	Na ₂ CO ₃

	1 mg	Na ₂ S ₂ O ₃	
	37 %	Formaldehyd	
Stoppen:	50 %	Methanol	
	12 %	Essigsäure	

2.5.6 Affinitätschromatographie

Es wurden *Hi-trap* Säulen von Pharmacia (Uppsala, Schweden) nach den Herstellerangaben verwendet.

Verwendete Lösungen:

Bindungspuffer:	0,02 M	Na ₂ HPO ₄	
	0,5 M	NaCl,	pH 7,2
Elutionspuffer:	0,02 M	Na ₂ HPO ₄	
	0,5 M	NaCl,	pH 3,5
Regenerierungspuffer:	0,02 M	Na ₂ HPO ₄	
	0,5 M	NaCl	
	0,05 M	EDTA,	pH 7,2
Aufkonzentrierung:	0,02 M	Na ₂ HPO ₄	
	0,005 M	NaCl,	pH 7,2

Die Proteine wurden in Bindungspuffer gelöst, auf die Metall-Affinitätssäule gegeben und mit 3 Säulenvolumina Bindungspuffer (0,5 ml / min) gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit jeweils 1 Säulenvolumen Elutions- und Regenerierungspuffer gewaschen. Die Eluate wurden in Centricon YM-3 (Amicon) bei 1000 x g aufkonzentriert und gleichzeitig entsalzt, mit Chloroform/Methanol gefällt, in Probenpuffer gelöst und elektrophoretisch aufgetrennt.

2.5.7 Westernblott

Nach SDS-PAGE wurden die Proteine durch "*Semi-Dry*"-Transfer auf eine Nitrocellulose- (0,1 µm Protran, Schleicher & Schuell) oder PVDF-Membran (Roti®-PVDF, Roth) übertragen. Der Proteintransfer erfolgte bei einer Stromstärke von 0,8 mA / cm² über 1 h unter Verwendung von Transferpuffer. Danach wurde die Membran mit Ponceaurot gefärbt (s. 2.5.9) und nach dem Entfärben 14 Stunden bei 4°C in Blockierungslösung geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Membran wurde anschließend 2 Stunden bei RT mit dem primären Antikörper in Blockierungslösung inkubiert und 4 x 5 min mit PBST gewaschen. Die Detektion des gebundenen primären Antikörpers erfolgte mit

einem 1:10000 verdünnten biotin-konjugierten sekundären Antikörper (DAKO, Niederlande), 1:5000 verdünntem HRP-Streptavidin (DAKO, Niederlande) und den *Super Signal@West Dura Extended Chemilumineszenz Reagens* von Pierce (Rockford, USA), entsprechend den Herstellerangaben.

Pufferlösungen:

Transferpuffer:	50 mM	Tris
	40 mM	Glycin
	0,04 %	SDS
	20 %	Methanol
PBST:	9,16 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	2,35 g	NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O
	0,1 %	Tween 20

Blockierungslösung: PBS mit 5 % fettfreier Trockenmilch (Bio-Rad, München)

2.5.8 Antikörper

Polyklonale Antikörper gegen HSP 17 standen in der Arbeitsgruppe zur Verfügung.

Ein Peptid-Antikörper gegen MT2, abgeleitet aus der Peptid-Sequenz von *Arabidopsis thaliana* und *Brassica juncea*, wurde in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Jürgen Miersch (Martin-Luther-Universität Halle) verwendet.

2.5.9 Färben der Membranen mit Ponceau S

Die Membranen wurden ca. 5 min in Ponceau-Lösung geschüttelt und danach in Wasser entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Anschließend wurden die Membranen in TBS vollständig entfärbt und für die Immunfärbung bzw. die N-terminale Sequenzierung verwendet.

Ponceau-Lösung:	0,2 %	Ponceau S
	3 %	TCA in H ₂ O
TBS:	10 mM	Tris-HCl, pH 7,8
	0,5 M	NaCl

2.5.10 N-terminale Proteinsequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mit dem Proteinsequenz-Analysesystem G1000A von Hewlett-Packard (Böblingen, Deutschland) und wurde freundlicherweise von Dr. Thorsten Nürnberger durchgeführt. Die automatische Sequenzanalyse erfolgte durch den Edman-

Abbau und anschließend mittels HPLC-Analyse der Phenylthiohydantoin-Derivate der entsprechenden Aminosäuren nach dem Protokoll des Herstellers.

2.6 HPLC-Methoden

2.6.1 Analyse phenolischer Verbindungen

Die HPLC wurde für die Identifikation der löslichen phenolischen Verbindungen sowie für das Sammeln der relevanten Fraktionen zur weiteren Charakterisierung eingesetzt.

Die Analyse der phenolischen Verbindungen erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Anlage zur analytischen HPLC:

Pumpe:	Pumpsystem 32X (Kontron Instruments, Deutschland)
Autosampler:	465 (Biotec Instruments, Deutschland)
UV/Vis-Detektor:	332 (Kontron Instruments, Deutschland)
Fluoreszenz-Detektor:	FP-920 (Jasco, Japan)
Integrator:	Int 450, später Kromasystem 3000

Stationäre Phase: Nucleosil 100C RP 18 (260 x 4 mm, Macherey & Nagel, Düren)

Mobile Phase: A: 1,5 % (v/v) ortho-Phosphorsäure
B: Acetonitril

Flussrate: 0,8 ml / min

Injektionsvolumen: 20 µl

Detektion: UV/Vis 254 nm

Gradient:

Zeit	% A	% B
0 min	90	10
13 min	79	21
33 min	65	35
40 min	0	100
50 min	90	10
60 min	90	10

Die Identifizierung der Hauptpeaks erfolgte mit Vergleichssubstanzen und Elektrospray Massenspektrometrie (ESI-MS) in der Abteilung Naturstoffchemie des Instituts für Pflanzenbiochemie (Dr. Jürgen Schmidt).

2.6.2 Analyse von Thiolen mittels Derivatisierung mit Monobrombiman

20 mg gefriergetrocknetes Material wurde in 2 ml 0,1 % TFA bei 4°C und 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß filtriert (0,2 µm) und bei 4°C aufbewahrt. Die Derivatisierung erfolgte nach dem folgenden Ansatz für 30 min im Dunkeln:

Versuchsansatz:

250 µl	Probe
10 µl	20 mM MBrB (in Acetonitril)
450 µl	200 mM HEPPS 63 mM DTPA, pH 8,2

Anschließend wurden 300 µl 1 M MSA dazugegeben und die Proben bei 4°C in lichtgeschützten Eppendorf-Gefäßen aufbewahrt.

Die Trennung der niedermolekularen Monobrombiman-Derivate erfolgte in Anlehnung an Fahey et al. (1981) unter folgenden Bedingungen:

Stationäre Phase: Nucleosil 10C RP 18 (260 x 4 mm, Macherey & Nagel, Düren)

Mobile Phase: A: 0.05 % TFA in H₂O
B: 0,05 % TFA in Acetonitril

Flussrate: 1 ml / min

Injektionsvolumen: 20 µl

Detektion: Fluoreszenz λ_{ex} : 280 nm / λ_{em} : 480 nm

UV/ Vis :254 nm

Gradient:

Zeit	% A	% B
0 min	90	10
13 min	79	21
33 min	65	35
40 min	0	100
50 min	90	10
60 min	90	10

2.7 Elektronenmikroskopische Methoden

2.7.1 Glutaraldehyd-Osmium-Fixierung und Einbettung

Für morphologischen Untersuchungen der Objekte wurde eine chemische Fixierung der Proben durchgeführt. Eine Vorfixierung erfolgte mit Glutaraldehyd (GA). Anschließend wurde das Gewebe mit Osmiumtetroxid fixiert, in einer aufsteigenden Acetonreihe entwässert und mit dem Epoxydharz ERL (*Epoxy Resin Low Viscosity*) nach Spurr (1969) infiltriert. Die Arbeitsschritte erfolgten in einem Einbettungsautomaten (Lynx™ el, Leica, Deutschland) bei 20°C nach dem folgendem Schema (Tabelle 2.2):

Tabelle 2.2: GA-OsO₄- Fixierung

	Zeit
Waschen mit Phosphatpuffer	15 min
Waschen mit Phosphatpuffer	30 min
Waschen mit Phosphatpuffer	60 min
Waschen mit Phosphatpuffer	60 min
1 % OsO ₄ / Phosphatpuffer	60 min
waschen mit Leitungswasser	20 min
waschen mit Leitungswasser	20 min
waschen mit Leitungswasser	20 min
waschen mit Leitungswasser	20 min
Aceton 20 % / Uranylacetat (2 %)	30 min
Aceton 30 %	10 min
Aceton 50 %	10 min
Aceton 75 %	10 min
Aceton 90 %	10 min
Aceton 100 %	20 min
Aceton 100 %	20 min
Aceton/ ERL (1:1)	20 min
Aceton/ ERL (1:2)	20 min
ERL 100 %	60 min
ERL 100 %	12 h

Zusammensetzung des Epoxidharzes (ERL):

ERL-4206:	10 g
DER-736 (Weichmacher):	6 g
NSA (Härter):	26 g
S1 (Initiator):	0,4 g

Nach der Infiltration der Proben wurden diese in Einbettungsgefäße überführt und zwei Tage im Trockenschrank bei 60°C polymerisiert.

2.7.2 Ultramikrotomie

Die Proben wurden mit einem Diamantmesser von Diatome (Schweiz) an einem Ultramikrotom (Ultracut S, Reichert Leica, Deutschland) geschnitten. Die ca. 60 nm dünnen Schnitte wurden mit Chloroform gestreckt und auf Cedukol-befilmte 200 *mesh* Kupferträgernetzchen aufgenommen.

2.7.3 Kontrastierung der Ultradünnschnitte mit Bleicitrat

Zur Erhöhung des Kontrastes wurden die Proben mit Blei kontrastiert. Die Kontrastierung sollte in einer CO₂-freien Umgebung erfolgen, da Kontrastmittel, die Blei enthalten, leicht Präzipitate mit dem Kohlendioxid der Luft bilden können.

Dazu wurden die Trägernetzchen in einer geschlossenen Kammer, die NaOH-Plätzchen enthielt, jeweils auf einen Tropfen Bleicitratlösung gelegt, nach 40 min mit Aqua tridest gewaschen und an der Luft getrocknet.

Bleicitratlösung: 1,5 g Bleiacetat
 1,76 g Na-citrat
 in 30 ml H₂O schütteln, nach ca. 30 min
 8 ml NaOH (frisch zubereiten) dazugeben

2.7.4 Probenpräparation zur Elementanalyse

2.7.4.1 Gefrierfixierung

Das Material wurde mit einer Rasierklinge in kleine Gewebestücke geschnitten, zwischen jeweils zwei Trägerplättchen aus Kupfer gelegt und im Kryojet (JFD 030, Balzers, Liechtenstein) von zwei Seiten mit einem Strahl des Kühlmittels (flüssiges Propan) beschossen.

Danach wurden die Proben in flüssigem Stickstoff bis zur anschließenden Gefriersubstitution aufbewahrt.

2.7.4.2 Gefriersubstitution

Die Proben wurden in ein Substitutionsgerät (Csauto, Leica, Deutschland) mit gekühltem Aceton über einen Zeitraum von 3 Tagen bei -80 °C substituiert. Nach Ablauf der Substitutionszeit wurden die nun wasserfreien Objekte langsam erwärmt (5 °C / min) und nach Erreichen der RT mit Epoxidharz (ERL) nach dem folgendem Schema (Tabelle 2.3) infiltriert:

Tabelle 2.3:

	Zeit
Aceton/ ERL 2:1	30 min
Aceton/ ERL 1:2	30 min
ERL 100%	60 min
ERL 100%	14 h

Anschließend wurden die Proben in Einbettungsgefäße überführt und 48 Stunden bei 60 °C polymerisiert.

2.7.5 EDX-Messungen

Ultradünne Schnitte des gefriersubstituierten Materials wurden am Ultramikrotom mit einem Diamantmesser hergestellt und auf unbefilmte Titan- oder Nickelträgernetze (200 *mesh*) aufgenommen. Die Messungen erfolgten unter folgenden Bedingungen:

Transmissionselektronenmikroskop EM 912 OMEGA (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einem Energiefilter (OMEGA-Filter; Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgestattet.

EDX-Analyse: EDX-System Link exl II (Oxford Instruments, High Wycombe, Bucks, U.K.)
 Spotgröße: 100 nm
 Beschleunigungsspannung: 80 keV
 Emissionsstrom: 18-20 μA

Die Cu- und Zn-Gehalte wurden mit einer Software (von Dr. O. Lichtenberger zur Verfügung gestellt) berechnet, die die entsprechenden Nettointegrale, die Schnittdicke und die Anregungswahrscheinlichkeit berücksichtigt. Die Schnittdicke lässt sich im Filtermikroskop nach folgender Formel berechnen:

$$d = \lambda \times \ln (I_t/I_0)$$

d =	Schnittdicke
λ =	mittlere freie Weglänge von gestreuten und ungestreuten Elektronen (~ 100nm)
I_t =	Belichtungszeit mit inelastisch gestreuten Elektronen
I_0 =	Belichtungszeit mit Gesamtelektronen

Die erhaltenen Konzentrationen werden entsprechend als Anzahl der Atome im Referenzvolumen ($6,283 \times 10^6 \text{ nm}^3$) angegeben.

2.7.6 ESI- und EELS-Messungen

50 - 70 nm dicke Schnitte des gefriersubstituierten Materials wurden auf unbefilmte Cu-, Ni- oder Ti-Trägernetze (200 *mesh*) gebracht.

EEL-Spektren und ESI-Bilder wurden von einer SIT TV-Kamera mit einer Energieauflösung von ~1 eV aufgenommen und mit dem Bildverarbeitungssystem ESIVISION (Zeiss, Oberkochen/ SIS Software GmbH, Münster, Deutschland) bearbeitet. Für die Abbildung der Kupferverteilung wurde die Cu-M_{2,3}-Ionisationskante benutzt. ESI-Bilder der Verteilung von Silizium in der Probe entstanden bei einem Energieverlust im Bereich der Si-L_{2,3}-Ionisationskante. Zur morphologischen Identifizierung der gemessenen Bereiche wurde bei allen Objekten das entsprechende Bild bei 0 eV (*zero loss image*) aufgenommen. Diese Bilder wurden aufgrund niedriger Kontraste nachträglich mit einem Bildverarbeitungsprogramm (Photoshop 5.0, Adobe) bearbeitet.

3 Ergebnisse

Frühere Untersuchungen an *Armeria maritima* (Mill.) Willd. ssp. *halleri* (Wallr.) vom schwermetallbelasteten Standort Eisleben (Neumann et al., 1995) zeigten, dass ein großer Teil des aufgenommenen Cu in den Vakuolen der Idioblasten, sogenannte *tannin cells*, zurückgehalten wird. Des Weiteren haben EEL-Spektren gezeigt, dass das Kupfer in diesen Vakuolen durch Komplexbildung mit polyphenolischen Komponenten chelatisiert wird.

In der Darstellung der Ergebnisse wird eine detailliertere Charakterisierung von *Armeria* im Hinblick auf ihre Schwermetalltoleranz gegenüber Cu und Zn mittels konventioneller und analytischer Elektronenmikroskopie von Pflanzen unterschiedlicher schwermetallbelasteter Standorte gezeigt. Die Untersuchungen konzentrieren sich auf Veränderungen in der Ultrastruktur und auf die Verteilung der Schwermetalle in den verschiedenen Zellkompartimenten. Ebenfalls sollten die möglichen Bindungspartner der Schwermetalle in den unterschiedlichen Kompartimenten identifiziert werden.

3.1 Standorte

Die Schwermetallstandorte im Harz (Langelsheim) und Mansfelder Land (Eisleben) sind von Ernst (1974) beschrieben und klassifiziert worden. Es handelt sich um eine Zn- und Pb-Abraumhalde (Langelsheim) und eine Kupferschieferhalde (Eisleben) mit unterschiedlich hohen Schwermetallgehalten (Tabelle 3.1). Der Kontrollstandort ist ein Versuchsbeet im Garten des Instituts, dessen Schwermetallgehalte mit denen durchschnittlicher normalversorgter Böden übereinstimmen.

Tabelle 3.1: Schwermetallgehalte des Bodens am Standort nach Totalaufschluss
Konzentration (mg / g Trockengewicht)
* Werte aus Leopold, 1993

Standort	Cu	Zn
Eisleben	4,18*	10,951*
Langelsheim	9,025	34,625
Kontrolle	0,059*	0,209*

3.2 Morphologie der Blätter

Es wurden vergleichende Untersuchungen mit Pflanzen durchgeführt, die auf unterschiedlichen schwermetallbelasteten Standorten wuchsen. Die Analysen konzentrierten

sich auf Veränderungen in der Ultrastruktur und auf die Verteilung der Schwermetalle in den verschiedenen Kompartimenten.

In Abbildung 3.1 ist ein Querschnitt durch das bifaziale Blatt von *Armeria* dargestellt. Das Mesophyll besteht aus den dicht gepackten langgestreckten Zellen des Palisadenparenchyms unterhalb der adaxialen Epidermis und dem von ausgedehnten Interzellularen durchdrungenen Schwammparenchym an der abaxialen Epidermis. Beide Oberflächen sind von einer Cuticula überzogen, und in der Epidermis sind zahlreiche Stomata und Salzdrüsen zu erkennen. Im Mesophyll sind ein zentrales und vier weitere Leitbündel eingebettet, die von Zellen mit auffälligen osmiophilen Niederschlägen umgeben sind.

Zwischen den Pflanzen von verschiedenen Standorten waren keine Unterschiede in der Struktur zu verzeichnen, mit Ausnahme der Niederschläge und der elektronentransparenten Bereiche, die in Abschnitt 3.8 gesondert behandelt werden. Das trifft auch auf Pflanzen zu, die als Kontrollen von schwermetallnormalversorgten Standorten untersucht wurden.

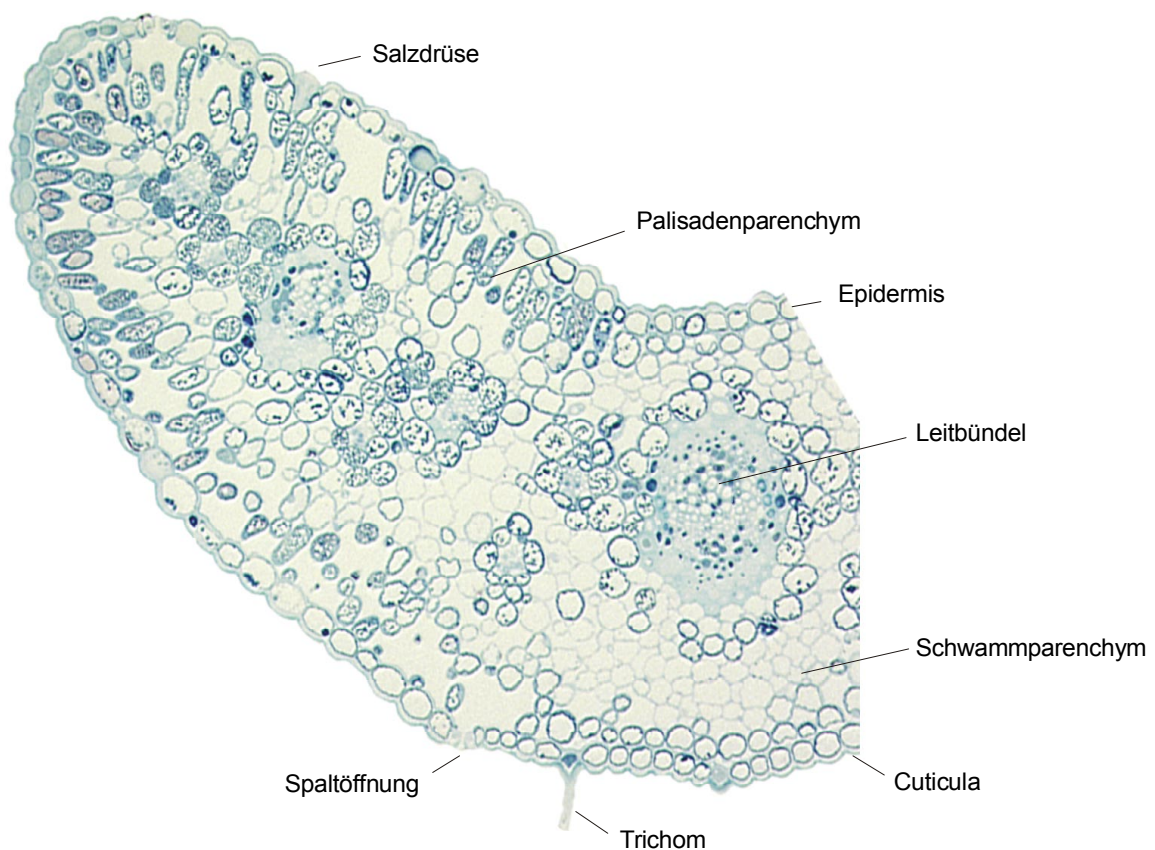


Abbildung 3.1: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch ein Blatt von *Armeria*. G-Os, Azur II /Methylenblau, Vergrößerung 126 X.

3.3 Ausscheidung von Schwermetallen

3.3.1 Ausscheidung durch Salzdrüsen

Eine beträchtliche Menge der aufgenommenen Schwermetalle wird durch Salzdrüsen aktiv wieder ausgeschieden, wobei der Sekretionsmechanismus noch nicht endgültig geklärt ist. Auf der Oberfläche dieser Drüsen befinden sich Kristalle als Ablagerungen (Abbildungen 3.3 und 3.6).

Bei allen untersuchten Pflanzen wurden zahlreiche mehrzellige Salzdrüsen gefunden, die in der Epidermis eingebettet sind. Salzdrüsen waren sowohl an der Blattoberseite als auch an der Unterseite lokalisiert (Abbildung 3.2). Ihre Anzahl und Größe waren konstant und nicht vom Standort abhängig.



Abbildung 3.2: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Salzdrüse der unteren Blattepidermis im Querschnitt. Die Drüsen bestehen aus mehreren Drüsenzellen, die durch Sammelzellen (sz) mit den umliegenden Schwammparenchymzellen in Kontakt stehen. Die Drüse ist sowohl an der Blattoberfläche (*) wie auch unten und an den Seiten mit einer Cutinschicht überzogen. v: Vakuole; nd: vakuolärer Niederschlag; zw: Zellwand; ku: Cuticula. G-Os, Azur II/Methylenblau, Vergr. 630 X

Im elektronenmikroskopischen Bild (Abbildung 3.4) erkennt man, dass Salzdrüsen aus mehreren Transferzellen die durch charakteristische Ausstülpungen der Zellwand, sogenannte Transferzellenstrukturen, die zur Vergrößerung der sekretorisch aktiven Oberfläche dienen, ausgezeichnet sind. Diese Zellen besitzen ein organellenreiches Cytoplasma ohne Chloroplasten aber mit zahlreichen Mitochondrien, einen auffällig großen Zellkern und keine Zentralvakuole.

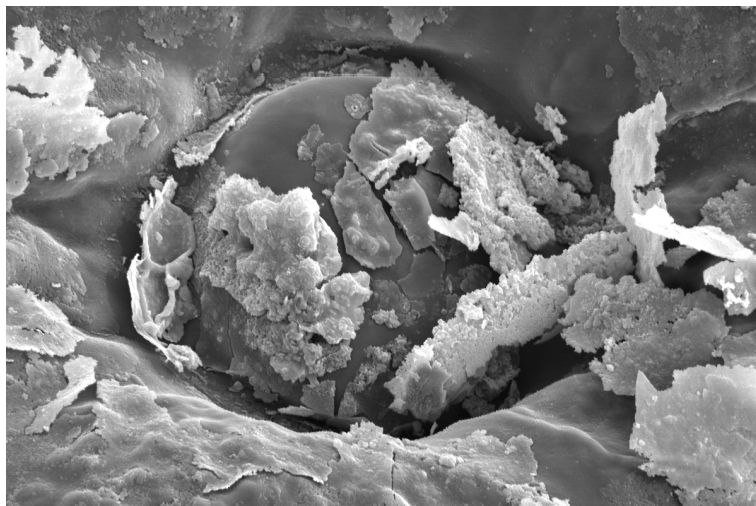


Abbildung 3.3:
REM-Aufnahme einer Salzdrüse mit Kristallablagerung auf der Oberseite eines *Armeria*-Blattes. Auf den Unter- und Oberseiten der Blätter sind zahlreiche Salzdrüsen in der Epidermis eingesenkt. Vergr. 2000 X

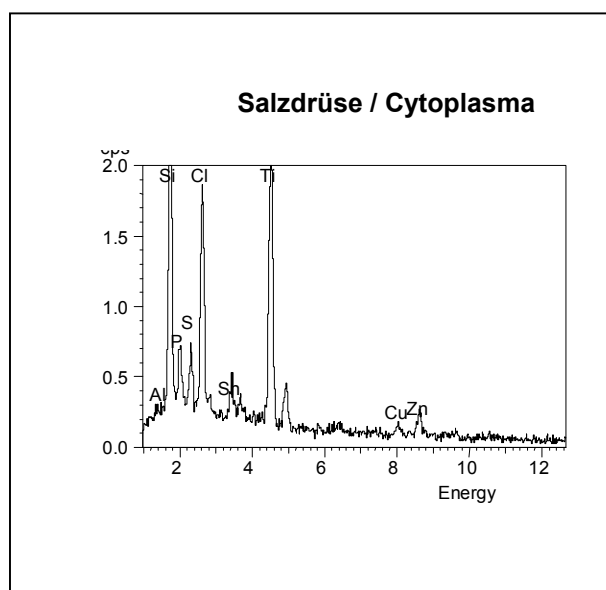
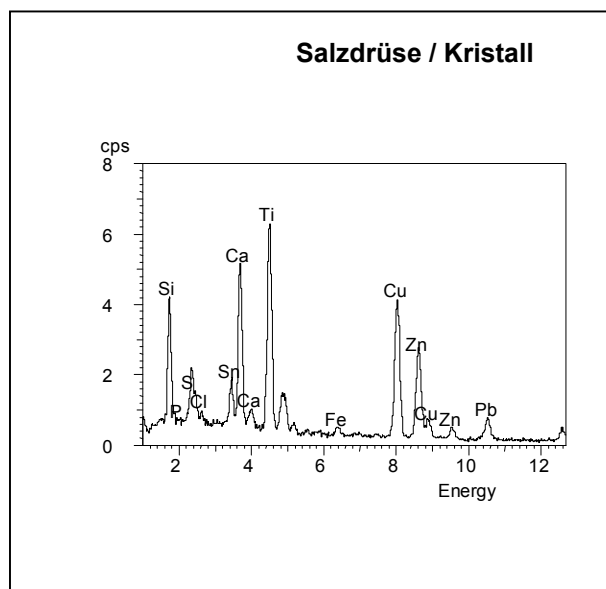
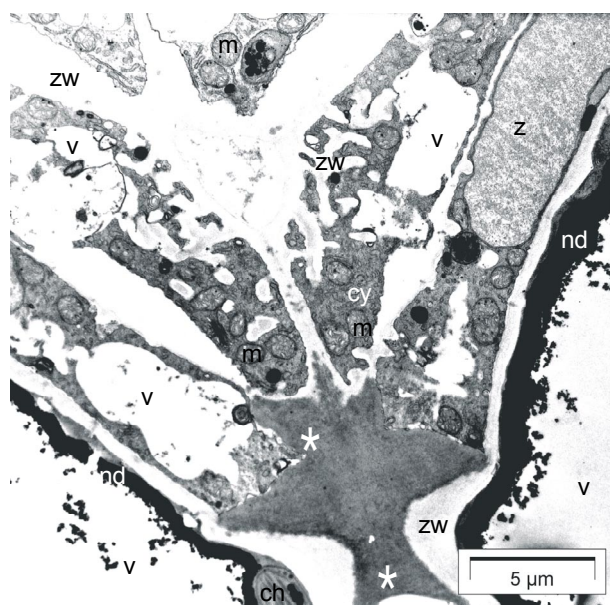


Abbildung 3.4:
Diese EM-Aufnahme zeigt einen Querschnitt durch den unteren Bereich einer Salzdrüse.
m: Mitochondrium; **zw:** Zellwand; **cy:** Cytoplasma; **nd:** vakuolärer Niederschlag; **z:** Zellkern; **ch:** Chloroplast; * Cutinschicht.
Die EDX-Spektren auf der rechten Seite zeigen die Elementverteilung eines Kristalls auf der Blattoberseite (oben) und die Elementverteilung im Cytoplasma einer Salzdrüse (unten). Der Ti-Peak wird durch das Trägernetzchen verursacht.

Bei der Beurteilung der Prozesse der Schwermetalexkretion durch Salzdrüsen ist auf einen quantitativen Vergleich der unterschiedlichen Standorte verzichtet worden. Parameter, wie der Ionengehalt des Bodens, die jahreszeitlichen Temperatur- und Feuchtigkeitsschwankungen und das Alter der Blätter, haben einen starken Einfluss auf die Exkretion der Schwermetalle. Verteilungsverhältnisse, die ähnlich denen von Salzdrüsen eines Objektes vom Standort Langelshem sind (Abbildung 3.5), wurden auch in den Blättern anderer Standorte gefunden.

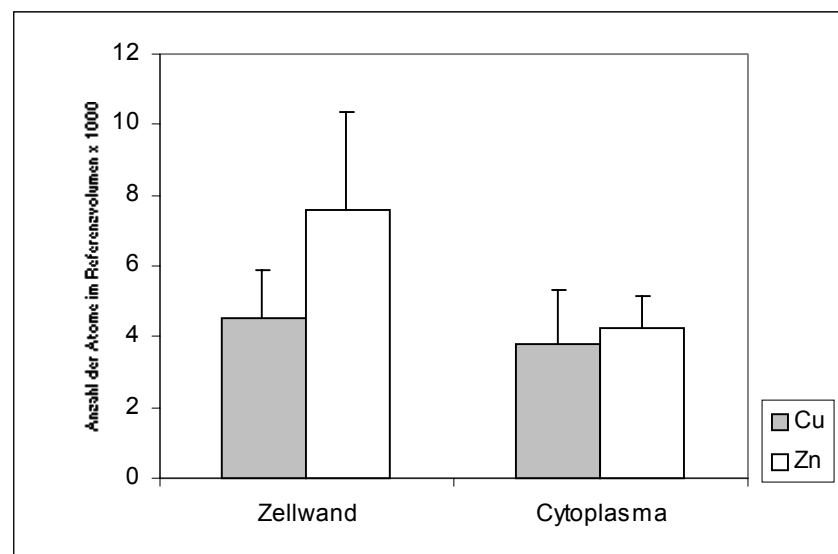


Abbildung 3.5: Cu und Zn-Gehalte in der Zellwand und im Cytoplasma einer Salzdrüse vom Standort Langelshem, erhalten mittels EDX-Analyse (Mittelwerte \pm SE, n=4).

Die EDX-Spektren zeigten, dass die Kristalle auf der Blattoberfläche unterschiedlich zusammengesetzt sind und hauptsächlich aus Cu-, Zn-, Pb-, Si-, Sn-, Al- und Ca-Salzen bestehen (Abbildung 3.4).

Cu und Zn konnten in der Cuticula, in den Zellwänden und im Cytoplasma der Drüsenzellen nachgewiesen werden, wie in Abbildung 3.6 dargestellt. Die höchste Intensität für Cu wurde in den Kristallen und Niederschlägen auf der Oberfläche der Drüsen beobachtet, was mit den durch EDX-Analyse erhaltenen Werten übereinstimmte.

In den kleinen Vakuolen der Drüsenzellen konnten Cu und Zn in kleinen Mengen nachgewiesen werden, wie in Abbildung 3.6 D für Cu dargestellt.

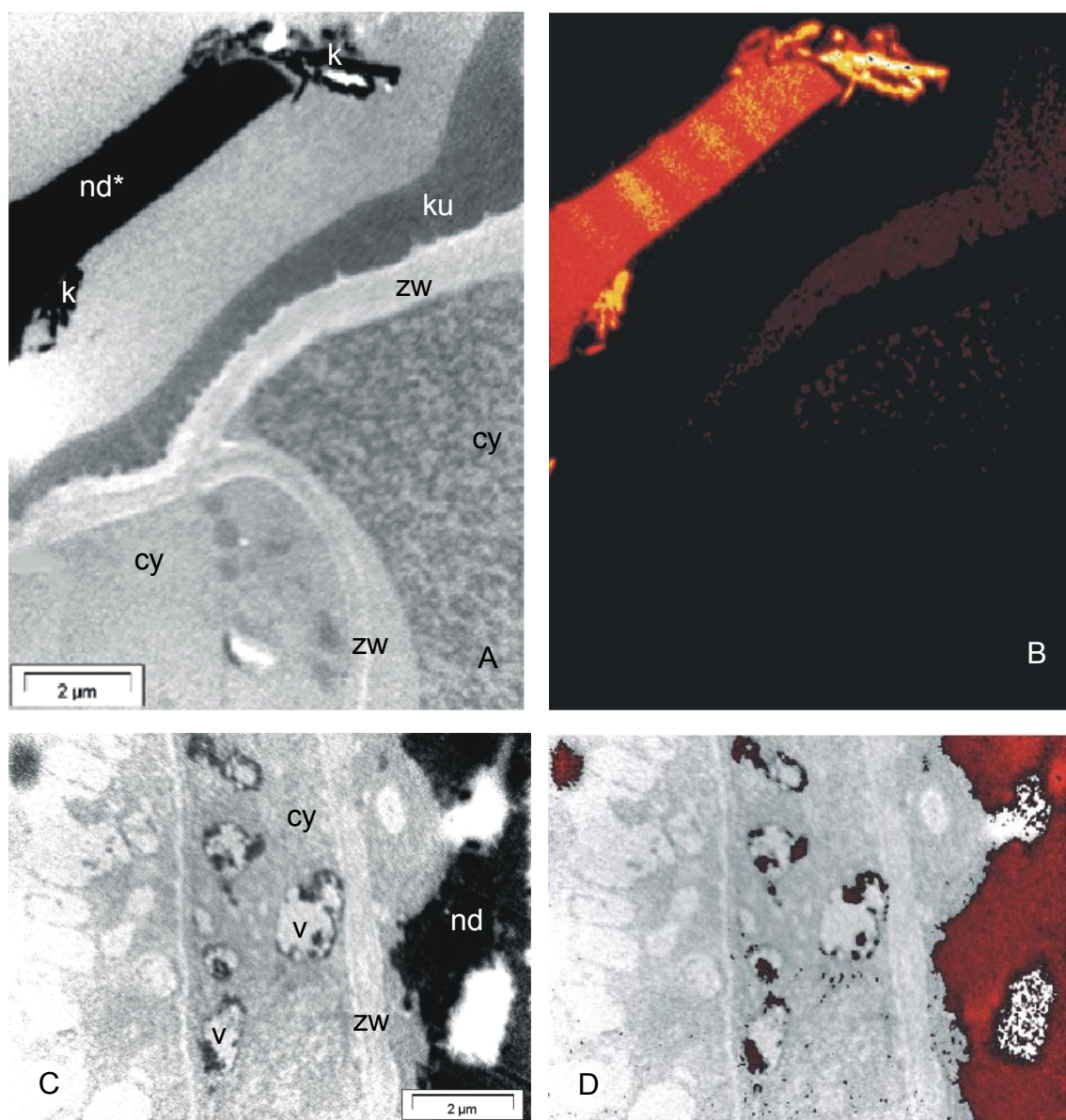


Abbildung 3.6: **A, B:** Querschnitt durch den oberen Bereich einer Salzdrüse. Links *zero loss*-Aufnahmen, rechts ESI-Bilder der Cu-Verteilung (Zwei-Fenster-Methode) an der Cu-M_{2,3}-Ionisationskante (Anstieg der Cu-Konzentration von Rot nach Gelb).
C: *zero loss*-Aufnahme einer äußeren Becherzelle mit zahlreichen kleinen Vakuolen und einer benachbarten Sammelzelle mit stark kontrastierenden Niederschlägen.
D: *Mixmap* aus *zero loss*-Aufnahme und Cu-Verteilungsbild. Die Intensität ist im vakuolären Niederschlag am höchsten. Daneben ist die Verteilung in den Vakuolen der Becherzelle deutlich sichtbar.
ku: Cuticula; **nd***: Niederschlag auf der Blattoberfläche; **nd:** vakuolärer Niederschlag; **zw:** Zellwand; **v:** Vakuole; **k:** Kristall; **cy:** Cytoplasma.

3.4 Speicherung von Schwermetallen in der Zellwand

3.4.1 Verteilung von Cu und Zn in der Zellwand

Cu und Zn konnten mittels EDX in allen Zellwänden des Blattes nachgewiesen werden. Die durch EDX-Messungen erhaltenen Ergebnisse wurden mittels ESI-Bilder der Verteilung bestätigt.

Die quantitative Elementanalyse ergab, dass die höchsten Werte für Cu und Zn in den Pflanzen vom Standort Eisleben in den Zellwänden des Parenchyms und der Epidermis zu finden waren (Tabelle 3.2). In den Pflanzen vom Standort Langelsheim waren nur in den Zellwänden des Parenchyms leicht erhöhte Werte sowohl für Cu wie auch für Zn nachweisbar. In diesen Pflanzen wurden die höchsten Werte für Zn in den Zellwänden der Spaltöffnungen sowie in Kristallen in den Zellwänden der Spaltöffnungen gefunden (Abbildung 3.7). In den Kontrollen wurden die höchsten Werte für Cu in den Zellwänden der äußeren Epidermis gefunden, wohingegen für Zn etwa gleiche Konzentrationen in allen Zellwänden gefunden wurden.

Tabelle 3.2: Cu und Zn-Konzentrationen in den Zellwänden von *Armeria*, ermittelt durch EDX-Analyse. Die Werte entsprechen der Anzahl der Atome im Referenzvolumen ($6.283 \times 10^6 \text{ nm}^3$) $\times 1000$ (Mittelwerte \pm SD, $n=3$).

Standort	Zelle	Cu	\pm SD	Zn	\pm SD
Eisleben	Transferzelle	1,692	0,8	1,976	0,5
	Parenchym	14,109	3,7	8,373	1,5
	Epidermis	14,567	2,2	5,432	0,9
Langelsheim	Transferzelle	1,096	1,2	1,181	1,1
	Parenchym	2,004	0,7	2,426	1,2
	Epidermis	1,609	1,0	1,808	0,8
Kontrolle	Transferzelle	2,095	1,4	1,454	0,9
	Parenchym	1,861	0,4	0,558	0,5
	Epidermis	5,733	1,9	0,961	0,6

Die Cu-Verteilung in der Zellwand ist in Abbildung 3.8 am Beispiel einer Sklerenchymzelle aus dem Leitbündelbereich dargestellt.

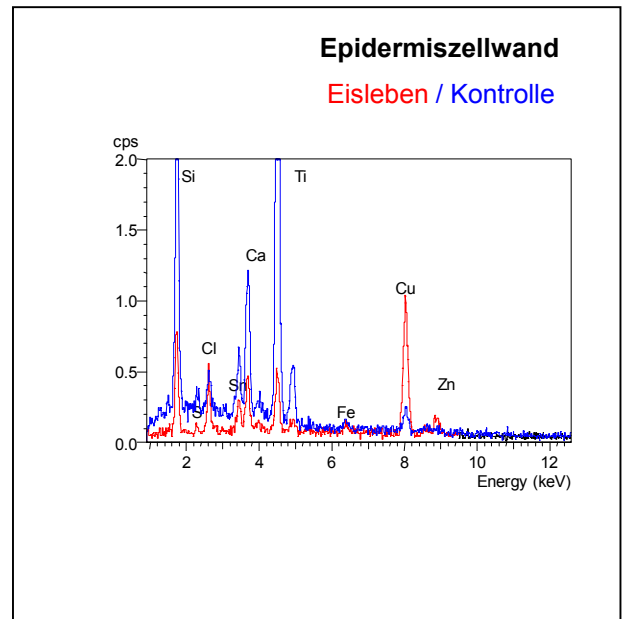
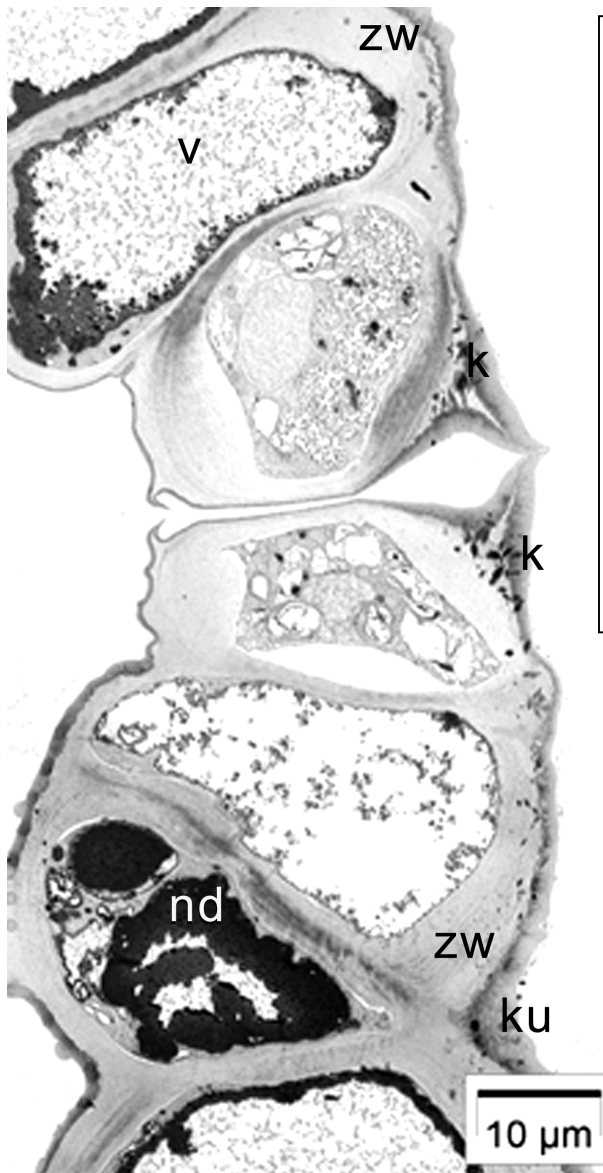


Abbildung 3.7:

Querschnitt durch eine Spaltöffnung einer Pflanze vom Standort Langelshiem. In der Zellwand der Spaltöffnungen und der Epidermis befinden sich zahlreiche Kristalle. **ku**: Cuticula; **k**: Kristall; **zw**: Zellwand; **nd**: vakuolärer Niederschlag; **v**: Vakuole EDX-Spektren der Zellwand aus belasteten Standorten (oben) zeigen deutlich größere Mengen an Cu und Zn.

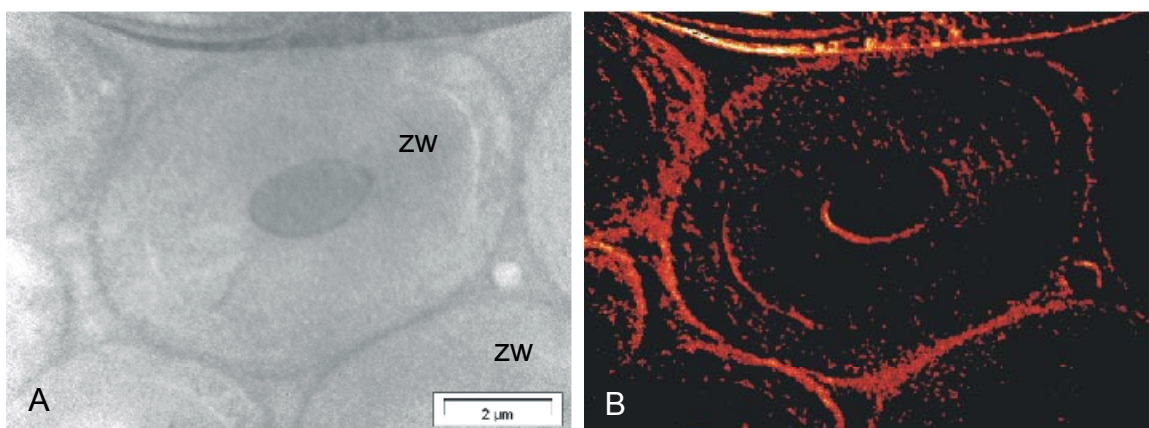


Abbildung 3.8: Querschnitt durch die dicke Zellwand einer Sklerenchymzelle aus dem Leitbündelbereich. **A:** zero loss-Bild. **B:** ESI-Bild der Cu-Verteilung (Zwei-Fenster-Methode) an der Cu-M_{2,3}-Ionisationskante. **zw**: Zellwand

In Tabelle 3.3 sind die Cu- und Zn-Konzentrationen in den Zellwänden der Epidermis in Pflanzen verschiedener Standorte dargestellt. In den Pflanzen der belasteten Standorte wurden deutlich höhere Werte als in den entsprechenden Kontrollen gefunden. Die höchsten Konzentrationen an Cu und Zn wurden in den Pflanzen vom Standort Eisleben nachgewiesen. In den Pflanzen vom Standort Langelsheim und in den Kontrollen war ein höherer Akkumulationsgrad an Cu in der äußeren Epidermiszellwand zu verzeichnen. Die Verteilungsverhältnisse von Zn lagen in allen Pflanzen in einem ähnlichen Bereich. Dabei wurden die höchsten Werte in den Pflanzen vom Standort Eisleben gemessen.

Tabelle 3.3: Cu- und Zn-Konzentrationen in der Epidermis von *Armeria*, ermittelt durch EDX-Analyse. Die Werte entsprechen der Anzahl der Atome im Referenzvolumen ($6.283 \times 10^6 \text{ nm}^3$) $\times 1000$ (Mittelwerte \pm SD, n=3).

Standort	Epidermiszellwand	Cu	\pm SD	Zn	\pm SD
Eisleben	außen	14,567	2,2	6,666	2,7
	antiklin	18,685	2,5	5,681	3,9
	innen	21,614	0,9	5,432	0,9
Langelsheim	außen	11,672	1,2	0,336	0,4
	antiklin	1,470	0,5	0,372	1,1
	innen	5,413	6,3	1,808	0,8
Kontrolle	außen	5,733	1,9	0,980	0,4
	antiklin	3,908	0,3	0,625	0,4
	innen	3,925	2,2	0,961	0,6

3.5 Speicherung von Schwermetallen im Cytoplasma

Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass Cu in erhöhten Konzentrationen im Cytoplasma nachgewiesen werden kann. EEL-Spektren des Cytoplasmas wiesen daraufhin, dass Cu dort an Proteine gebunden wird (Neumann et al., 1995).

Die EDX-Spektren zeigten, dass Cu neben Fe und Si im Cytoplasma immer nachweisbar waren und im Zellkern die höchste Cu-Intensität erreicht wurde (Abbildung 3.9 B). Die Verteilung von Cu im Cytoplasma ist in Abbildung 3.9 (C, D) am Beispiel zweier Geleitzellen aus dem Leitbündelbereich dargestellt.

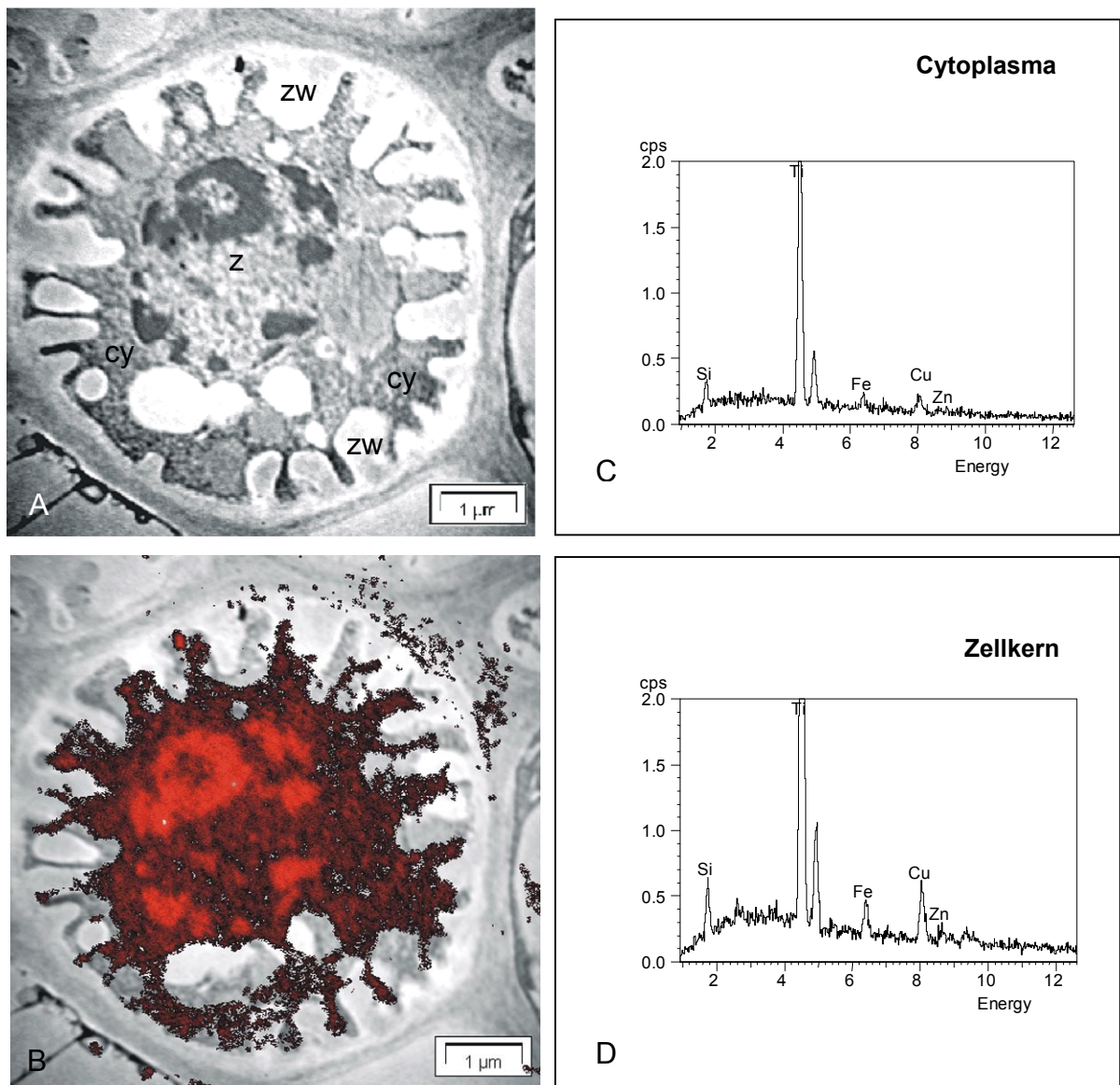


Abbildung 3.9: **A:** *zero loss*-Bild einer Geleitzelle aus dem Leitbündelbereich.
B: ESI-Bild der Cu-Verteilung (Zwei-Fenster-Methode) an der Cu- $M_{2,3}$ -Ionisationskante (Anstieg der Konzentration von Rot nach Gelb). Die Intensität ist am höchsten im Zellkern.
C: Das EDX-Spektrum zeigt die Elementverteilung im Cytoplasma einer Geleitzelle aus dem Leitbündelbereich. Si, Fe und Cu sind die Elemente mit den höchsten Konzentrationen in diesem Bereich.
D: EDX-Spektrum des Zellkernes. Der Ti-Peak wird durch das Trägernetzchen verursacht.
 cy: Cytoplasma; zw: Zellwand; z: Zellkern.

Da Cu in erhöhten Konzentrationen im Cytoplasma nachgewiesen werden kann und EEL-Spektren darauf hinwiesen, dass Cu dort an Proteine gebunden wird (Neumann et al., 1995), war es von Interesse schwermetallbindende Proteine aus unterschiedlich belasteten Pflanzen zu isolieren.

3.5.1 Bindung von Schwermetallen an Proteine und Peptide

3.5.1.1 Isolierung Cu-bindender Proteine

Durch Metallaffinitätschromatographie wurden Cu-bindende Proteine aus dem Pflanzenmaterial vom Standort Eisleben isoliert und anschließend N-terminal sequenziert. Die SDS-Gele ergaben für alle untersuchten Pflanzen ein von der Kontrolle wenig abweichendes Proteinmuster (Abbildung 3.10). Eine 2D-Gelanalyse war wegen der sehr geringen Proteinausbeute des Freilandmaterials nicht möglich. Die zur Sequenzierung eingesetzten Proteinbanden sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Von 5 Banden konnten Teile der Proteinsequenz des N-Terminus bestimmt werden (Tabelle 3.4).

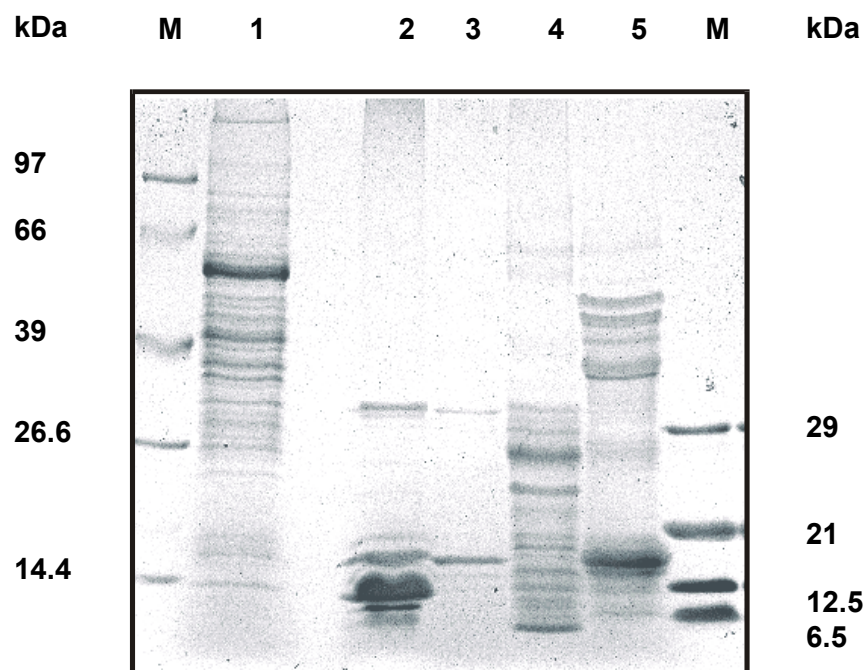
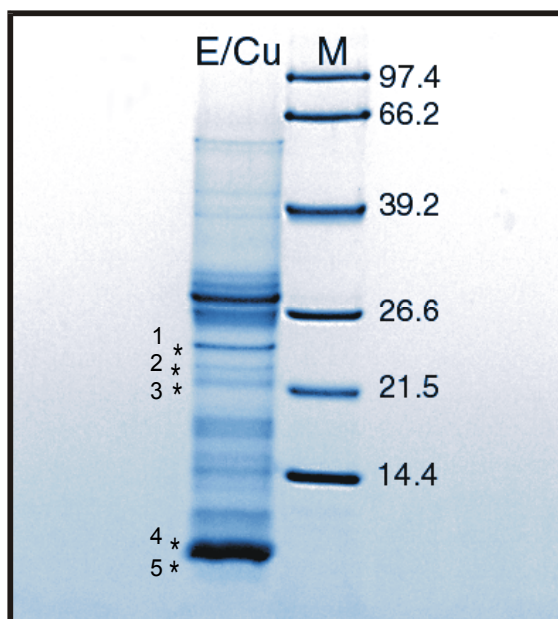


Abbildung 3.10: SDS-PAGE der Reinigungsschritte aus einer Cu-Affinitätssäule (silbergefärbtes 10-14%iges Gradientengel). Nach Auftragen des Gesamtproteins wurde die Säule mit Bindungspuffer (pH 7,2) gewaschen und die Cu-bindenden Proteine mit Elutionspuffer I (pH 3,5) und anschließend mit Elutionspuffer II (pH 7,2 + EDTA) eluiert.
 1. 8 µg Gesamtextrakt, 2. erste Waschfraktion (Bindungspuffer), 3. letzte Waschfraktion (Bindungspuffer), 4. 5 µg des Eluates, 5. Eluat nach Zugabe von EDTA.

**Abbildung 3.11:**

Coomassie gefärbtem SDS-Gradientengel.

Die Banden 1* bis 5* wurden aus dem Gel isoliert und N-terminal sequenziert.

Die Sequenzvergleiche erfolgten mittels Datenbanken (Swissprot).

Bande 1* mit einem scheinbaren Molekulargewicht zwischen 21 und 26 kDa ergab 100% Identität zur 23 kDa Untereinheit des *oxygen-evolving enhancer protein 2 precursor* (Swissprot: P29795). Bande 2* war homolog (77 %) zu einem *Precursor*-Protein der in Chloroplasten vorkommenden Cu/Zn Superoxid-Dismutase aus Spinat (Swissprot: P07507).

Tabelle 3.4:

Aminosäuresequenzen der aus dem SDS-Gel isolierten Proteine und Sequenzvergleiche mit bekannten Proteinen.

	Aminosäuresequenzen		Identität
1*	1	AYGEAANVFGK	11
<i>oxygen-evolving enhancer protein 2 precursor</i>	73	AYGEAANVAGK	83
			100 %
2*	1	AAKEAVAVLKGTSSEVVG	18
<i>cu/zn superoxide dismutase chloroplast precursor</i>	49	AAKKAHSVVLKGTSASEVVG	66
			77 %
3*	1	AKVKAVA	7
4*	1	VRFTFNNNGGG	11
		Keine Identität über 60%	
5*	1	MQIFVKTL	8
Ubiquitin	1	MQIFVKTL	8
			100 %

Bei Bande 3* waren lediglich die ersten 7 Aminosäuren identifizierbar, und es wurden keine signifikanten Homologien gefunden. Bande 5* zeigte eine 100 % Homologie zu Ubiquitin aus mehreren sehr unterschiedlichen Organismen (z.B.: Swissprot: P42739 von *Caenorhabditis elegans*). Die Homologiesuche in den Datenbanken ergab, dass kurze Sequenzen wie FNNNGG aus Bande 4* in mehreren sehr unterschiedlichen Proteinen zu

finden waren, während die erhaltene Peptidsequenz mit 11 Aminosäureresten keine Homologien über 60 % aufwies. Aufgrund der geringen Signifikanz solcher kurzen Sequenzen wurde auf Vermutungen über die Identität solcher Peptide verzichtet.

3.5.1.2 Westernblot-Analyse schwermetallinduzierter Proteine

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Jürgen Miersch (Fachbereich Biochemie/ Biotechnologie der MLU-Halle) wurde ein Peptid-Antikörper gegen MT2 benutzt, der aus den Aminosäure-Sequenzen von *Arabidopsis* und *Brassica* abgeleitet wurde (Tabelle 3.5). Dieser wurde an Rohextrakten und Fraktionen der Cu-Affinitätssäule aus Blattmaterial getestet.

Tabelle 3.5:	Aminosäuresequenz
	ETFVLGVAPAMKNQYE

Es wurden keine Proteine detektiert, die mit MT2 identisch waren.

Die Ergebnisse mit dem HSP17-Antikörper bestätigten frühere Untersuchungen mit *Armeria*, bei denen nach Schwermetallbelastung kein HSP17 in Blättern detektiert werden konnte (Leopold, 1993).

3.5.1.3 Phytochelatine

In früheren Untersuchungen wurde bei der Analyse cytosolischer Extrakte mittels HPLC-ICP-MS (Leopold, 1997) keine Schwermetall-Phytochelatin-Komplexe in Blättern und Wurzeln von *Armeria* von schwermetallbelasteten Standorten gefunden.

Da die Abwesenheit von Phytochelatinen eine bemerkenswerte Ausnahme im Pflanzenreich bedeuten würde, sollte eine Detektion nach Derivatisierung mit Monobrombiman (verändert nach Fahey et al., 1981) nachgeprüft werden. Es ist bekannt, dass die mBB-SH-Adukte sich durch eine sehr starke Fluoreszenz auszeichnen und die Empfindlichkeit der Methode Nachweise im pmol-Bereich ermöglicht (Newton et al., 1981).

Der Gehalt an GSH in allen untersuchten Blättern von *Armeria* verschiedener Standorte war vergleichbar und lag im Bereich von 16µM. Die Zugabe von CuSO₄ oder ZnCl₂ zur Nährlösung bewirkte bei Keimlingen keine signifikante Erhöhung des GSH-Gehaltes. Nur nach Zugabe von CdCl₂ wurde eine leichte Erhöhung der GSH-Konzentration auf 18µM innerhalb von 6 Tagen beobachtet.

Die Detektion der Phytochelatine erfolgte durch Vergleich mit PC2- und PC3- Standardverbindungen. Es wurden keine Phytochelatine in den Kontrollen und in den Proben von Schwermetallstandorten gefunden.

Daraufhin wurden Keimlinge in Zeitabständen von 1 bis 5 Tagen sowie hydroponische Pflanzen für 3 d mit 100 μM CuSO_4 , 100 μM ZnCl_2 und 50 μM CdCl_2 behandelt. In den Blättern der Keimlinge sowie in den Cu- und Zn-behandelten hydroponischen Pflanzen waren Phytochelatine nicht detektierbar. In den mit Cd behandelten Pflanzen konnten zwei kleine Peaks detektiert werden, die die Retentionszeiten von PC2- und PC3-Standardverbindungen aufwiesen (Abbildung 3.12, B).

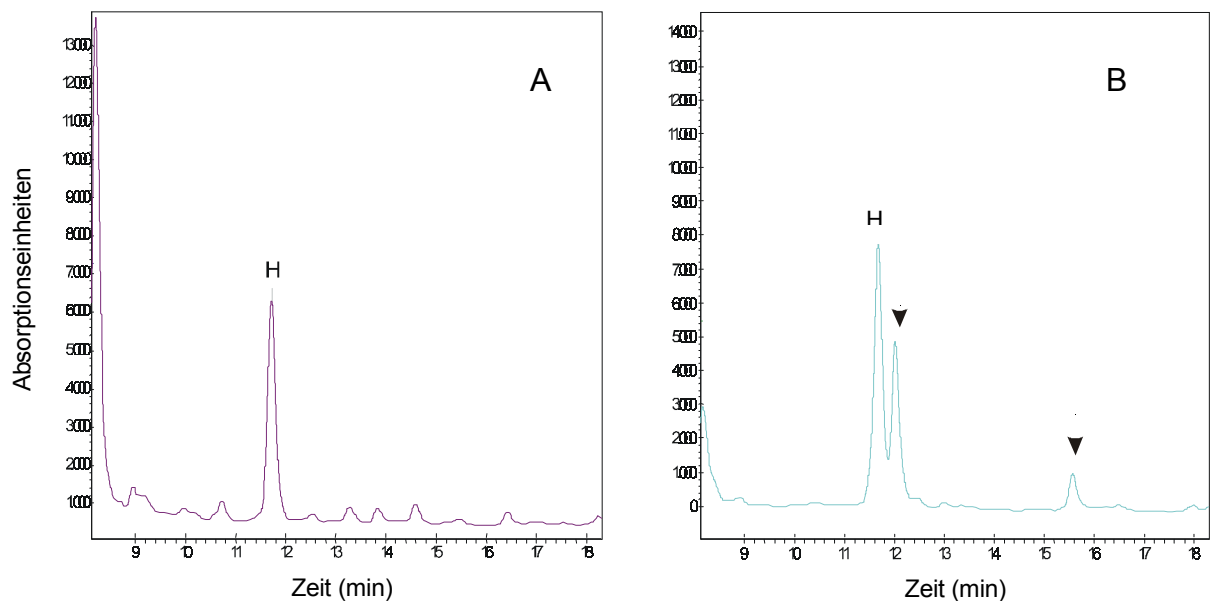


Abbildung 3.12: HPLC-Profile hydroponischer Pflanzen nach Derivatisierung mit MBrB.

A: Kontrolle; **B:** Nach 72 h Belastung mit 50 μM CdCl_2 werden zwei weiteren Peaks detektiert (Pfeilspitzen) die die Retentionszeiten von PC2 und PC3 aufweisen. H entspricht dem Hydrolysepeak, der auch in der Kontrolle vorkommt und von Newton et al. (1981) beschrieben wurde.

3.6 Speicherung von Schwermetallen in der Vakuole

Die Leitbündel im *Armeria*-Blatt sind von zahlreichen Zellen mit vakuolärem, elektronendichten Material umgeben (Abbildung 3.14). Auch im Palisadenparenchym finden sich solche Niederschläge (Abbildung 3.15). Diese Zellen werden im folgenden als Idioblasten bezeichnet. Die Art und Weise der Kontrastierung im elektronenmikroskopischen Bild weist auf einen phenolischen Charakter dieser Niederschläge hin. Durch EDX-Messungen an Blättern von *Armeria* konnte gezeigt werden, dass Cu in den Vakuolen der Idioblasten hauptsächlich an diese Strukturen gebunden wird (Neumann et al., 1995).

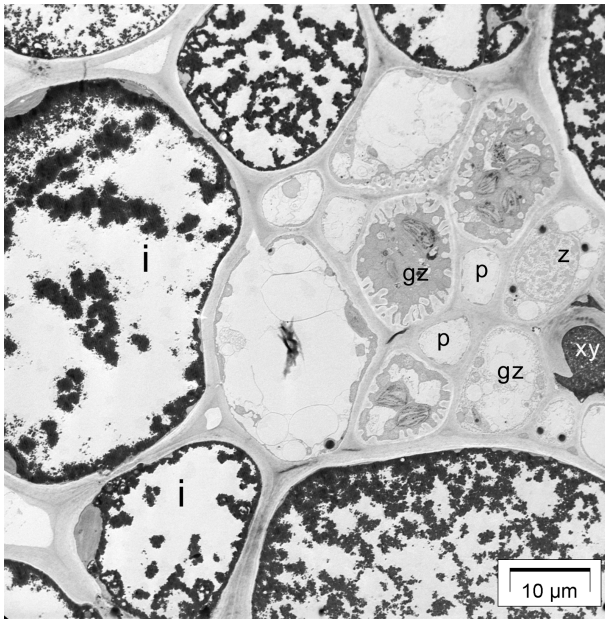


Abbildung 3.13:

Diese EM-Aufnahme zeigt einen Querschnitt durch ein Leitbündel und die umgebenden Parenchymzellen .

i: Idioblast; p: Phloem; gz: Geleitzelle; xy: Xylem; z: Zellkern.

Die EDX-Spektren auf der rechten Seite zeigen die Elementverteilung in den vakuolären Niederschlägen der Pflanzen vom Standort Eisleben verglichen mit dem Kontrollstandort (A) und vom Standort Langelsheim (B).

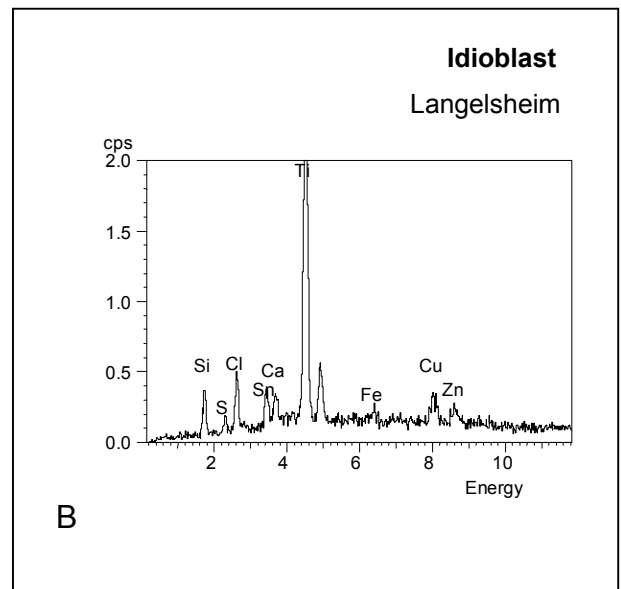
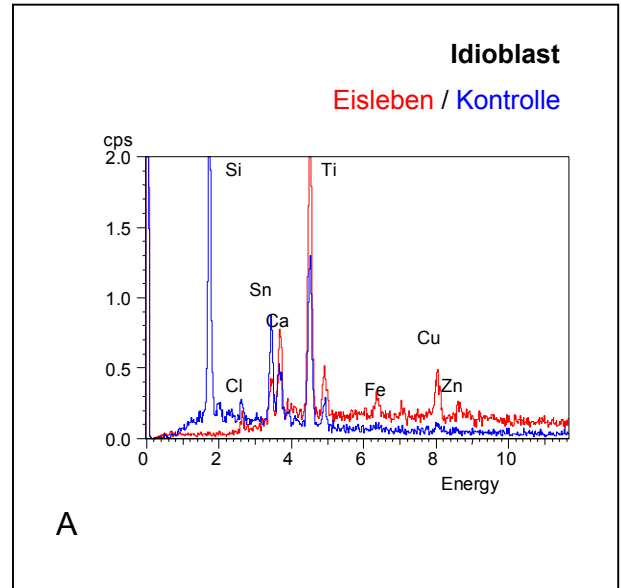


Abbildung 3.14:

Querschnitt durch das Palisadenparenchym eines *Armeria*-Blattes.

Zahlreiche große Chloroplasten befinden sich im Parenchym. Die Vakuolen sind mit auffälligen osmiophilen Niederschlägen gefüllt.

v: Vakuole; ch: Chloroplast; z: Zellkern; in: Interzellularen.

In Tabelle 3.6 sind die Cu- und Zn-Konzentrationen in den Niederschlägen der Vakuolen von Zellen der Leitbündelscheide von Pflanzen verschiedener Standorte dargestellt. In den Pflanzen aus den belasteten Standorten wurden deutlich höhere Werte gemessen als in den entsprechenden Kontrollen.

Tabelle 3.6: Cu- und Zn-Konzentrationen in den vakuolären Niederschlägen von *Armeria*, ermittelt durch EDX-Analyse. Die Werte entsprechen der Anzahl der Atome im Referenzvolumen ($6.283 \times 10^6 \text{ nm}^3$) $\times 1000$ (Mittelwerte \pm SD, n=3)

Standort	Cu	\pm SD	Zn	\pm SD
Eisleben	7,556	4,1	1,647	1,5
Langelsheim	2,557	0,8	1,540	0,9
Kontrolle	1,868	1,2	0,219	0,4

Da die Vakuolen ca. 80 % des Gesamtvolumens der Pflanzenzelle ausmachen, können diese als die Hauptspeicherorte für Cu und Zn in der Pflanze betrachtet werden. Bemerkenswert ist auch, dass Pflanzen der Kupferschieferhalde Eisleben verglichen mit den Pflanzen aus Langelsheim höhere Konzentrationen in der Vakuole aufweisen, obwohl der Cu-Gehalt im Boden von Langelsheim höher liegt (Abschnitt 3.1). Die Zn-Gehalte dagegen blieben etwa gleich, obwohl die Zn-Gehalte im Boden von Langelsheim etwa dreifach höher als am Standort Eisleben waren.

Die Cu-Verteilungsbilder der osmiophilen Niederschläge in den Vakuolen bestätigten die durch EDX erhaltenen Werte und sind in Abbildung 3.16 (B, C) dargestellt.

Mittels Elektronen-Verlust-Spektroskopie (EELS) können Informationen über den Bindungszustand eines Elementes erhalten werden. Elektronenübergänge aus den inneren Elektronenschalen führen zu einer Ionisationskante. Die Feinstruktur einer solchen Ionisationskante eines Elements ist von dessen Elektronenstruktur, seiner atomaren Umgebung und dem Bindungszustand abhängig. Die Aufklärung des Bindungszustandes des Elements ist durch Interpretation der Feinstruktur der Ionisationskante mittels quantenchemischer Berechnungen möglich.

Die quantenchemischen Berechnungen (freundlicherweise von Dr. O. Lichtenberger zur Verfügung gestellt, Abbildung 3.16 D, oben) zeigten eine Verschiebung des Peaks der Cu-L₃-Ionisationskante um 26 eV zu niedrigeren Energiewerten beim Übergang von Cu(I) zu Cu(II). Die EEL-Spektren von ein- und zweiwertigen Cu-Standardverbindungen (Abbildung 3.16 D, unten) erreichten nicht völlig den errechneten theoretischen Wert und zeigten eine Verschiebung um ca. 14 eV. Die EEL-Spektren an der Cu-L₃-Ionisationskante aus dem Bereich der vakuolären Niederschläge wiesen einen Peak bei ca. 930 eV auf, der mit dem Peak eines Cu(II)-Standards übereinstimmte (Abbildung 3.16 E), was darauf schließen lässt, dass Cu in der Vakuole vorwiegend als zweiwertiges Ion vorkommt.

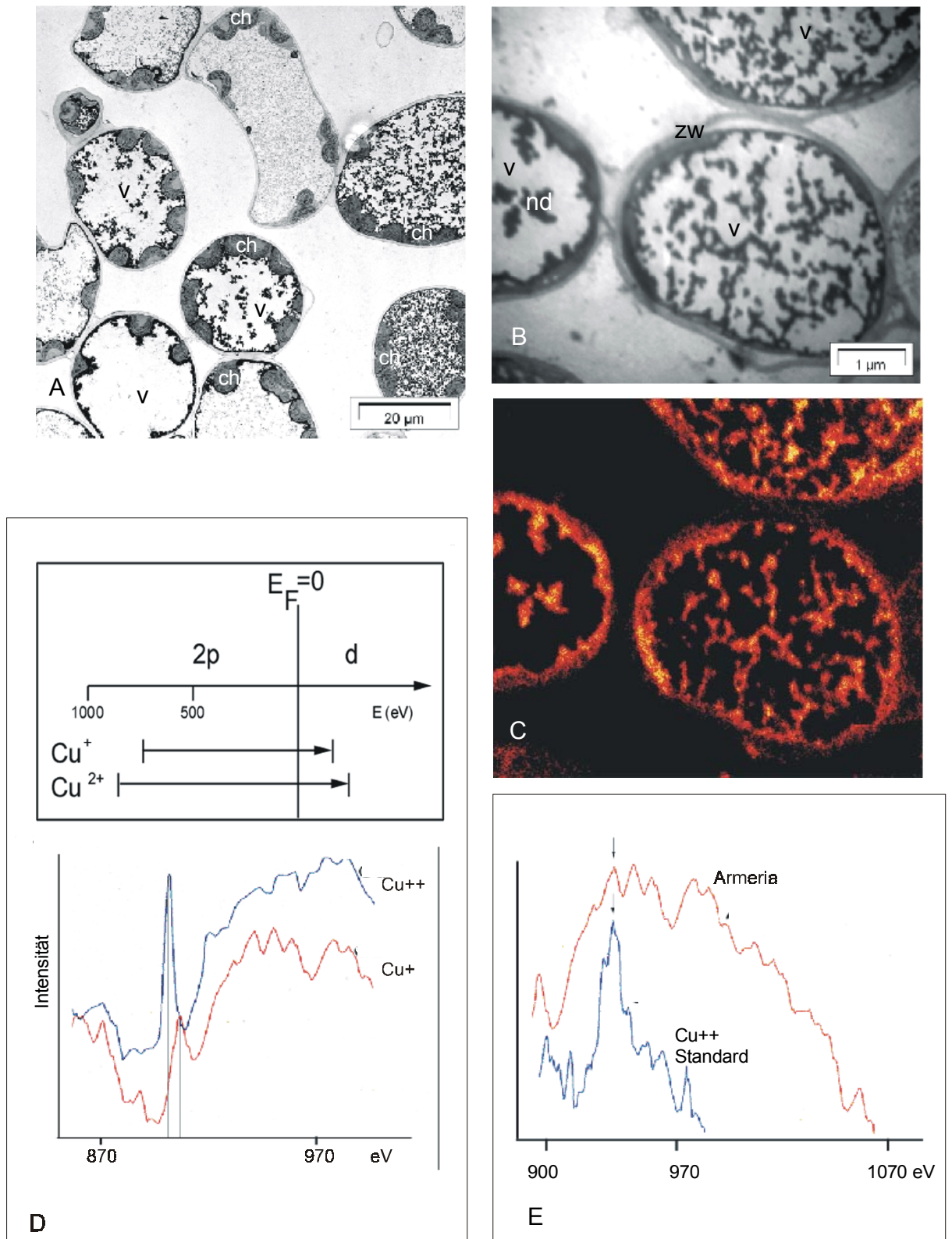


Abbildung 3.15: **A:** Querschnitt durch das Schwammparenchym eines *Armeria*-Blattes. **B:** zero loss-Bild von Idioblasten mit osmiophilen Niederschlägen in den Vakuolen. **C:** ESI-Bild der Cu-Verteilung (Zwei-Fenster-Methode) an der Cu-L₃-Ionisationskante. **D:** EEL-Spektren von Cu(I)- und Cu(II)-Standards (unten) und entsprechende quantenchemische Berechnungen (oben). **E:** EEL-Spektrum der Cu-L₃-Kante von vakuolären Niederschlägen eines Idioblasten (rote Linie) und eines Cu(II)-Standards (blaue Linie).
ch: Chloroplast; **nd:** vakuolärer Niederschlag; **v:** Vakuole; **zw:** Zellwand.

3.6.1 Bindung von Schwermetallen an phenolische Verbindungen

3.6.1.1 Vorkommen phenolischer Verbindungen in *Armeria*

Ein um 50 % erhöhter Gehalt an löslichen Phenolen konnte in den Blättern von Pflanzen von dem schwermetallbelasteten Standort Eisleben im Vergleich zur Kontrolle (normalversorgte Böden) und den Pflanzen vom Standort Langelsheim gezeigt werden. In Abbildung 3.16 sind die Gesamtgehalte an löslichen Phenolen aus jeweils zehn Blättern von fünf verschiedenen Pflanzen dargestellt.

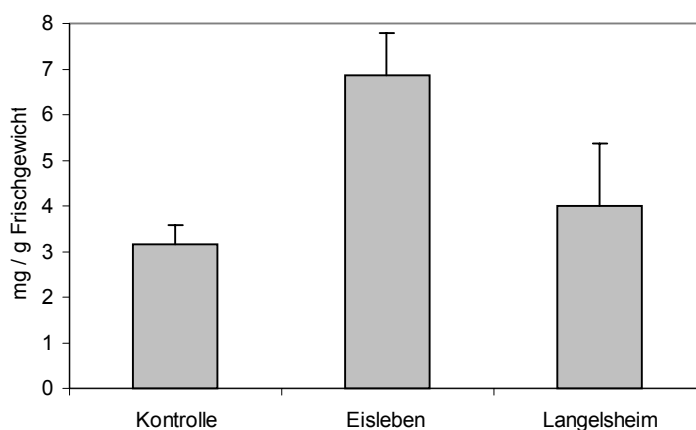


Abbildung 3.16: Lösliche Phenole in Blättern von *Armeria* unterschiedlicher Standorte.

Um dieses Phänomen zu quantifizieren und den möglichen Einfluss fremder Parameter am Standort, wie Licht und Trockenheit, auszuschließen, wurden Hydrokulturen und Keimlinge in Schüttelkultur unter konstanten Bedingungen mit Cu^{2+} , Zn^{2+} und Cd^{2+} exponiert und auf ihre phenolischen Inhaltsstoffe untersucht. Es wurden pro Probennahme jeweils 4 Pflanzen bzw. 10 Keimlinge entnommen, wobei besonders berücksichtigt wurde, dass möglichst gleichaltrige Blätter verwendet wurden. Die Schwermetallkonzentrationen wurden nach Vorversuchsreihen ausgewählt. Der Gesamtgehalt und die Zusammensetzung der Phenole sind abhängig vom Alter und der Entwicklungsstufe der Pflanzen und nur innerhalb einer Versuchsreihe vergleichbar.

In Kurzeitexperimenten mit hydroponischen Pflanzen blieben die Gesamtphenolgehalte in den Blättern nach 72 h Belastung mit Schwermetallen konstant bei ca. 1,5 mg/g Frischgewicht (Abbildung 3.17). In den Wurzeln kam es zu einer Abnahme der Konzentrationen in der Reihenfolge: Kontrolle > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Cd^{2+} .

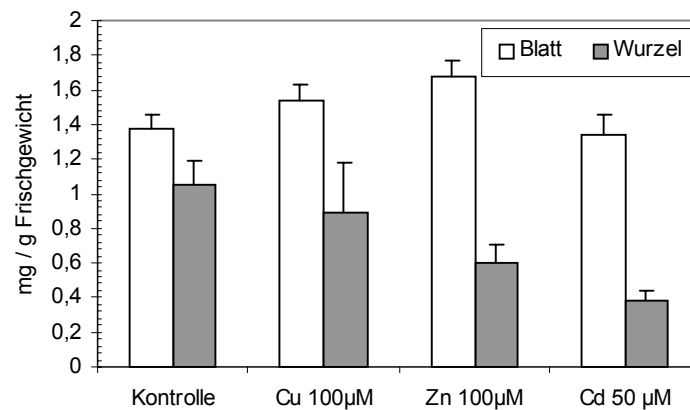


Abbildung 3.17: Lösliche Phenole aus 4 Monate alten hydroponischen Pflanzen nach 72 h Schwermetallbelastung.

Bei Langzeitexposition mit 100 µM CuSO₄ (Abbildung 3.18) kam es nach anfänglich höheren Werten nach einer Woche zu einer steten Abnahme beider Werte, während höhere Werte in den Kontrollen gefunden wurden. Die höchsten Werte waren nach einer Woche mit 1,3 µg/g Frischgewicht im Vergleich zu 0,9 µg/g Frischgewicht in den Kontrollen zu verzeichnen.

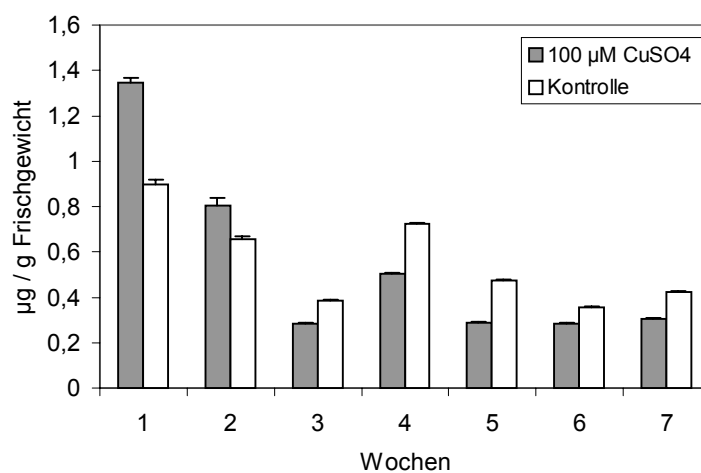


Abbildung 3.18: Lösliche Phenole aus Keimlingen nach Langzeitexposition.

3.6.1.2 Isolierung und Identifizierung der phenolischen Verbindungen

Die HPLC-Profile gleichaltr Pflanzenteile zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung der phenolischen Verbindungen in Abhängigkeit vom Standort (Abbildung 3.19).

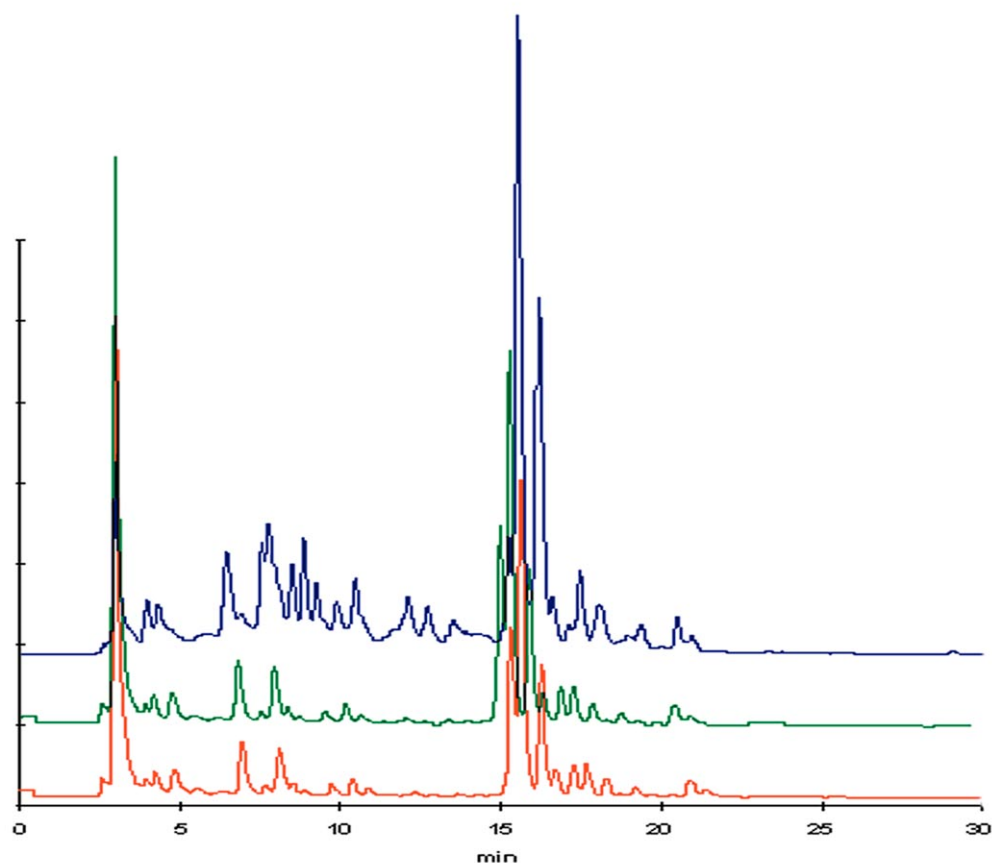


Abbildung 3.19: HPLC-Profile löslicher Phenole von *Armeria* unterschiedlicher Standorte. Kontrolle (blau), Langelsheim (grün), Eisleben (rot)

Die Detektion der Hauptkomponente und weiterhin der Flavonole Rutin und Quercetin erfolgte mittels HPLC durch Vergleich mit Standardverbindungen.

In den Versuchen nach Schwermetallbelastung zeigten sich Unterschiede in der Intensität verschiedener Peaks. Ausschnitte der HPLC-Analysen eines schwermetallbelasteten als auch eines Kontrollversuchsansatzes sind in Abbildung 3.20 ersichtlich. Rutin diente als interner Standard für die quantitative Analyse der phenolischen Verbindungen.

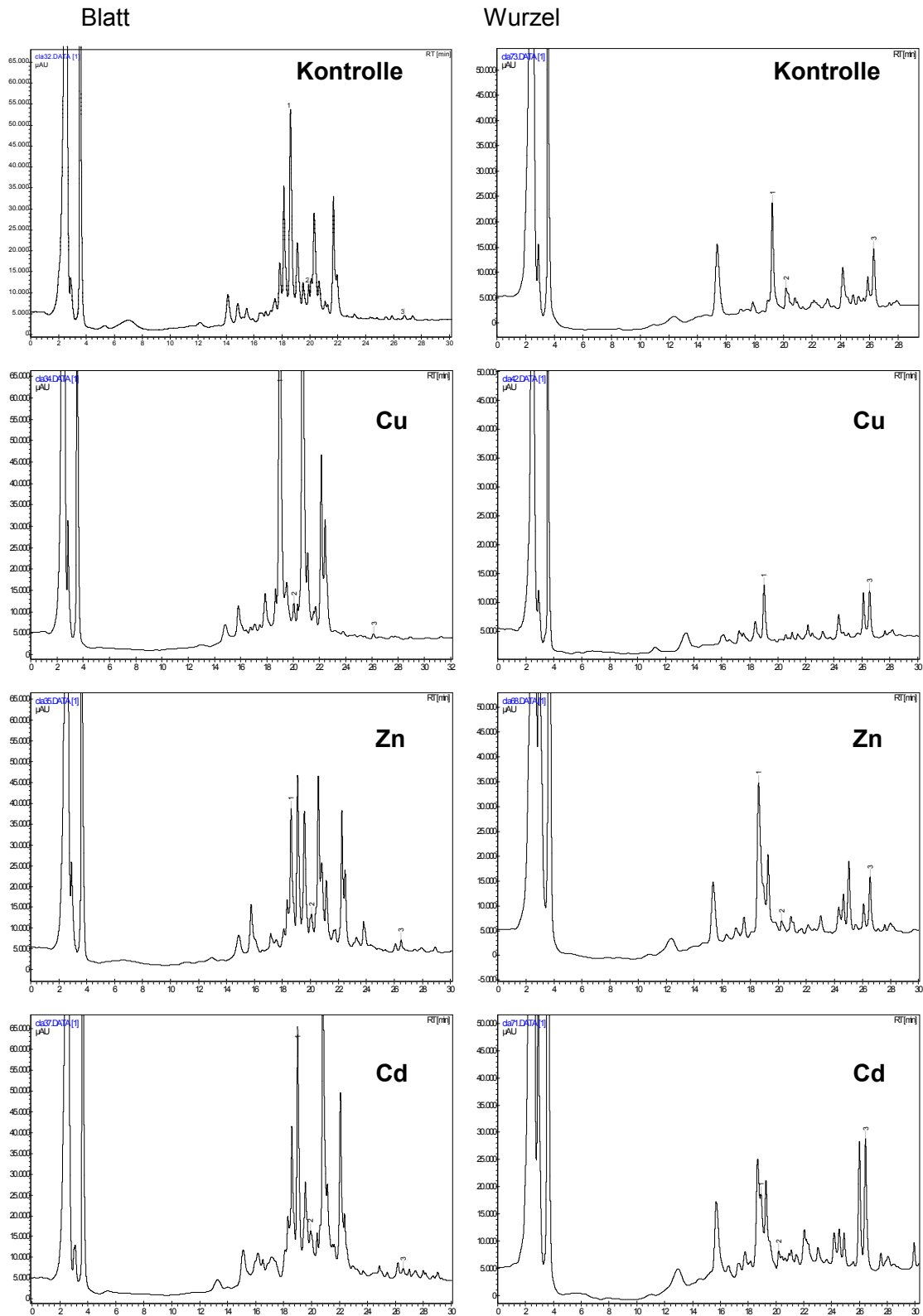


Abbildung 3.20: HPLC-Profile der löslichen phenolischen Verbindungen aus hydroponischen Pflanzen nach 72 h Belastung mit 100 $\mu\text{M CuSO}_4$, 100 $\mu\text{M ZnCl}_2$ und 50 $\mu\text{M CdCl}_2$.
1-Hauptkomponente, 2- Rutin, 3-Quercetin

Die Hauptkomponente (Peak1) der löslichen Phenole, Myricetin-3-Glucorhamnosid wurde mittels ESI/MS identifiziert (durchgeführt von Dr. Jürgen Schmidt, in Zusammenarbeit mit der Abteilung Naturstoffchemie des Instituts für Pflanzenbiochemie). Das Molekulargewicht des Flavonols ($m/z = 625$) wurde aus den ESI-Massenspektren (Abbildung 3.21) abgeleitet.

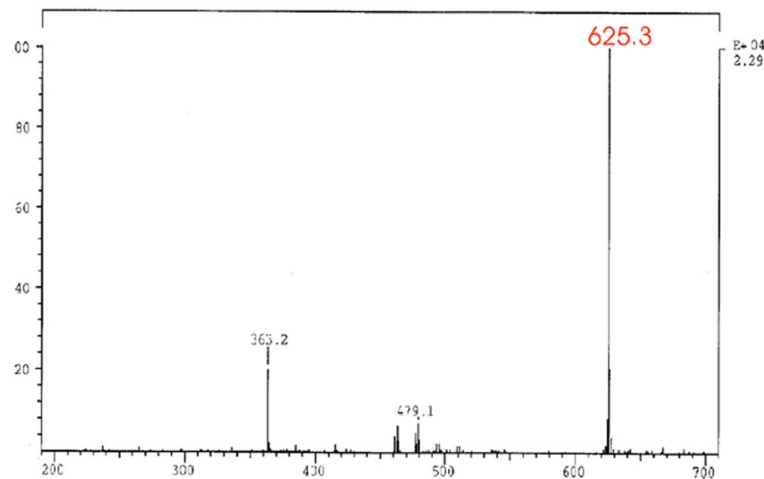


Abbildung 3.21: ESI-Massenspektrum der Hauptkomponente
Der methanolische Extrakt aus *Armeria* wurde mittels HPLC getrennt und die Fraktion mit dem Hauptpeak für die Identifizierung verwendet.

3.6.1.3 Nachweis der Komplexierung von Schwermetallen

Die Komplexierung mit einer ganzen Reihe von divalenten Metallionen (Abbildung 3.22) findet hauptsächlich an den 3'-4'-ortho-Dihydroxylgruppen am B-Ring des Flavonoids statt (Slabbert, 1992).

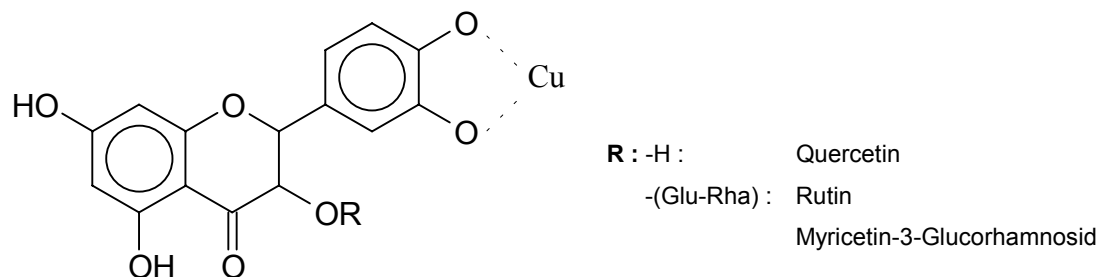


Abbildung 3.22: Metall-Flavonoid Komplex

Betrachtet man die Reaktionsenthalpien für mögliche Chelat-Komplexe von Cu(II) mit Hydroxylgruppen am Beispiel eines Moleküls Quercetin (PM3-Rechnungen durchgeführt von Dr. O. Lichtenberger), so ist die Bindung an den Di-hydroxylgruppen des B-Rings mit einer Reaktionsenthalpie von $\Delta H_R = -4,78$ kcal/mol die bevorzugte Variante (Abbildung 3.23).

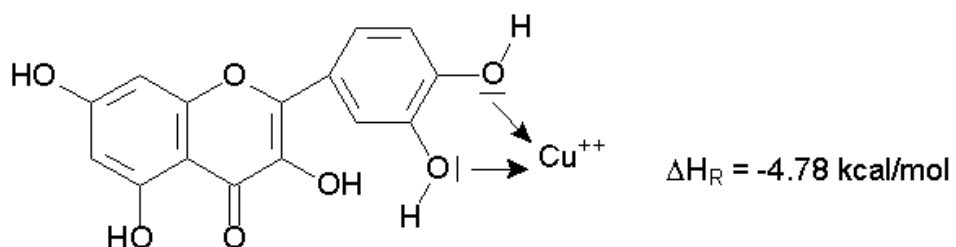
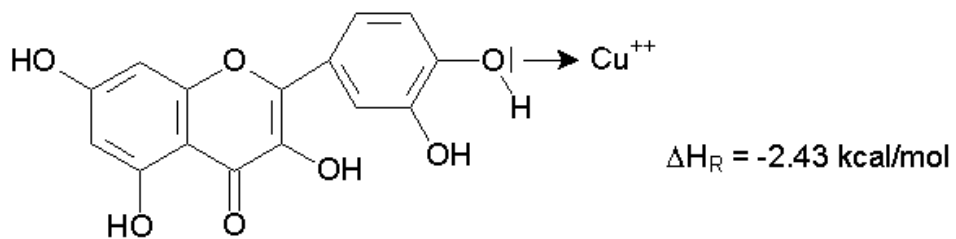
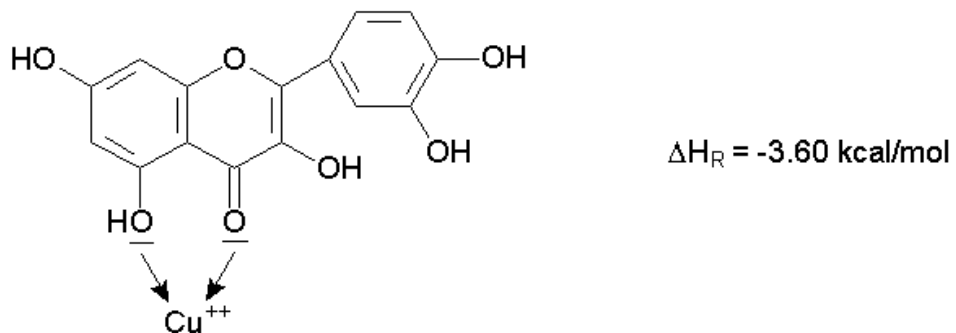
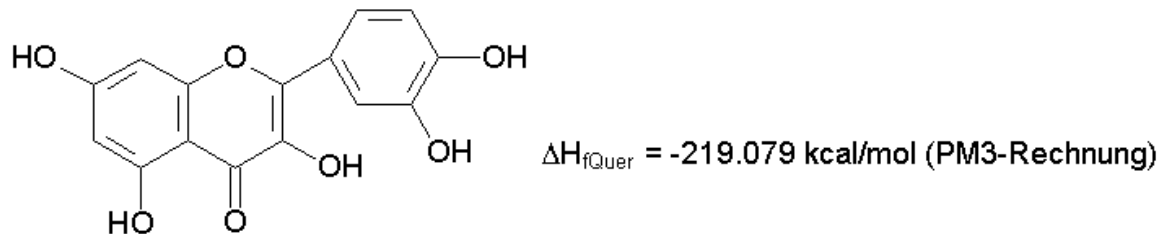


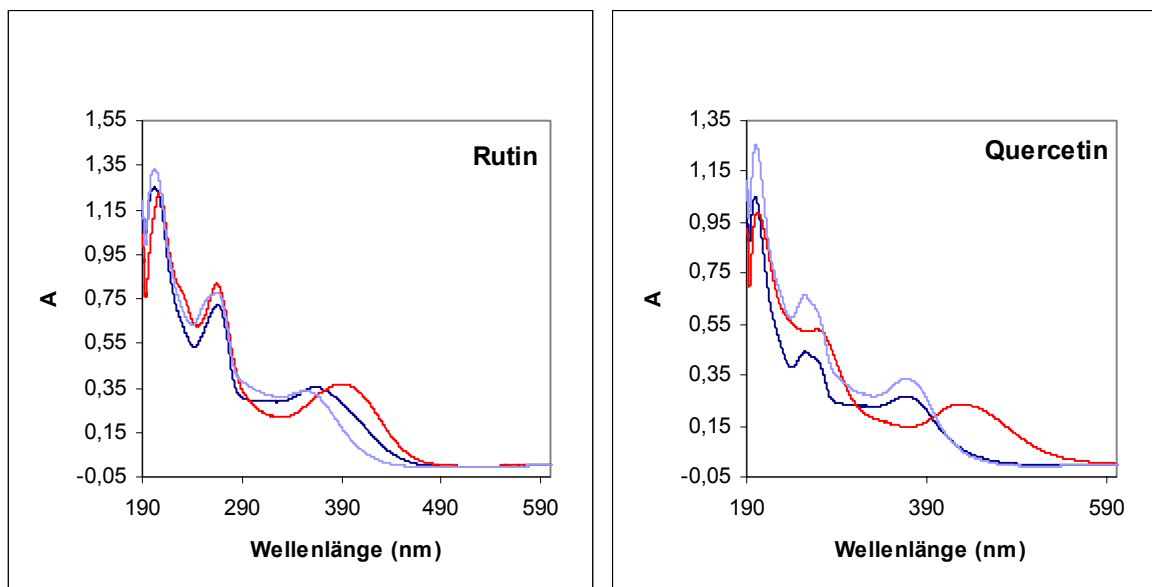
Abbildung 3.23: Thermodynamische Betrachtungen zur Bildung von Chelat-Komplexen von Cu(II) mit Quercetin

Die Wechselwirkung der Flavonoide Rutin, Quercetin und der Hauptkomponente (Myricetin-3-Glucorhamnosid) mit Cu(II) Ionen wurde mittels UV/Vis Spektroskopie bei pH 7,2 und 5,5, die den pH-Werten von Cytoplasma und Vakuole entsprechen, untersucht (Abbildungen 3.24 und 3.25).

Das UV/Vis-Spektrum von Rutin in 10 mM Tris-Lösung bei pH 7,2 zeigt Maxima bei 202, 266 und 365 nm (Abbildung 3.24). Die langwelligste Bande (320-390 nm), die der Absorption des Rings B entspricht, zeigte nach Zugabe einer äquimolaren Konzentration an Cu(II) Ionen (50 μM CuSO_4) eine Rotverschiebung von 26 nm auf 391 nm. Diese Verschiebung eines Absorptionsmaximums nach längeren Wellen wird bathochromer Effekt genannt. Ein ähnlicher Effekt wurde auch in den Spektren von Quercetin und der aus *Armeria* isolierten Hauptkomponente beobachtet (Abbildung 3.24). In allen Fällen ließ sich diese Verschiebung der Absorptionsmaxima durch Komplexierung der Metallionen nach Zugabe von 125 μM EDTA wieder aufheben (Abbildung 3.24).

Bei einer Konzentration von 25 μM Quercetin bewirkte eine äquimolare Konzentration an Cu(II)-Ionen (50 μM) einen stärkeren bathochromen Effekt der ersten Bande von 366 nm auf 430 nm. Nach Zugabe von 125 μM EDTA wurde dieser Effekt wieder aufgehoben (Abbildung 3.24).

Die Interaktion von Cu(II) mit der HPLC-Fraktion der Hauptkomponente (Myricetin-3-Glucorhamnosid) zeigte ein ähnliches Verhalten wie Rutin. Es erfolgte eine Rotverschiebung um 27 nm von 368 auf 395 nm (Abbildung 3.24).



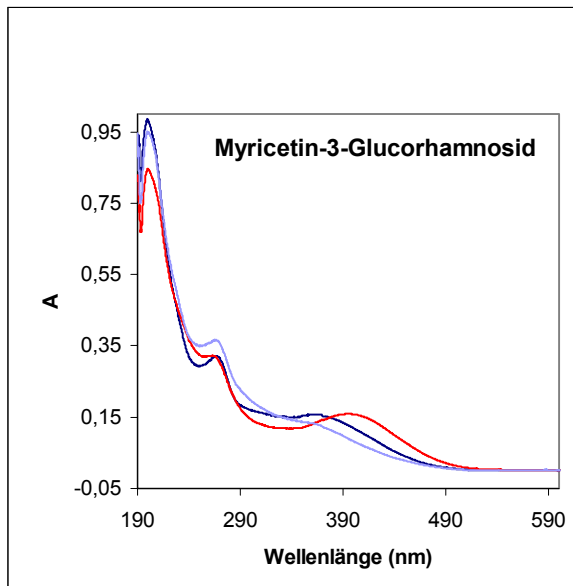


Abbildung 3.24:

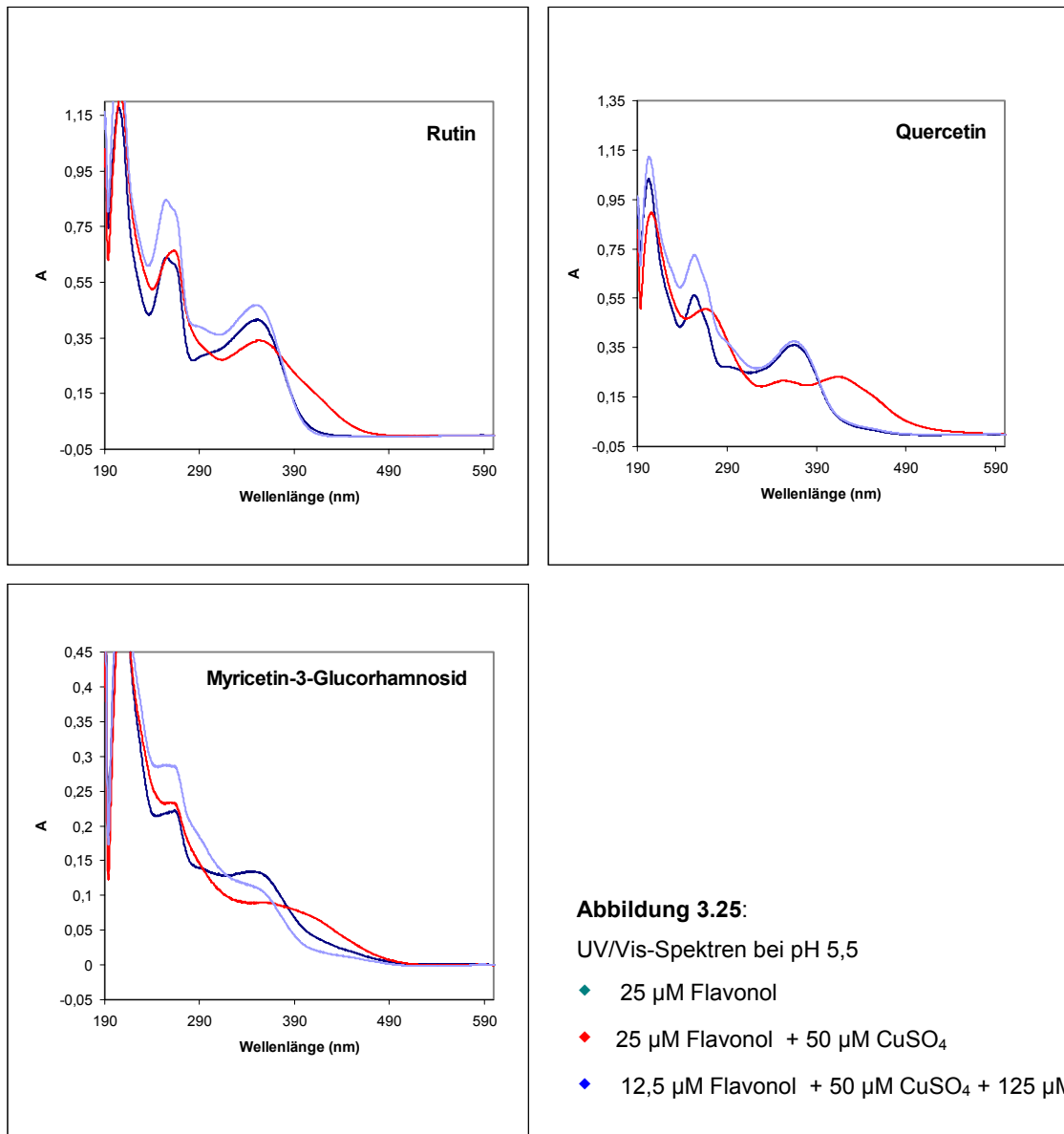
UV/Vis-Spektren bei pH 7,2

- ◆ 25 µM Flavonol
- ◆ 25 µM Flavonol + 50 µM CuSO₄
- ◆ 12,5 µM Flavonol + 25 µM CuSO₄+75 µM EDTA

Rutin absorbiert in 10 mM Tris-Lösung und pH 5,5 bei 205, 255 und 352 nm (Abbildung 3.25). Die langwelligste Bande (370-390 nm) zeigte nach Zugabe einer äquimolaren Konzentration von Cu(II)-Ionen (50 µM CuSO₄) eine leichte Rotverschiebung um 3 nm nach 355 nm, begleitet von einer Erniedrigung der Absorptionsintensität und einem Anstieg der Absorption bereits bei 490 nm. Nach Zugabe von EDTA zeigte die Spektralkurve einen ähnlichen Verlauf wie die Rutinlösung. Ein entsprechender Effekt war in allen drei Spektren der Abbildung 3.25 zu beobachten.

Bei einer Konzentration von 25 µM Quercetin bewirkte eine äquimolare Konzentration von Cu(II)-Ionen (50 µM) zusätzlich eine Rotverschiebung der Bande bei 250-285 nm um 13 nm auf 267 nm. Nach Zugabe von 125 µM EDTA kehrten beide Banden zu den ursprünglichen Wellenlängen zurück.

Die UV/Vis-Spektren von Quercetin in 10 mM Tris-Lösung bei pH 7,2 und 5,5 zeigten nach Zugabe einer äquimolaren Konzentration an Zn(II)-Ionen ähnliche, aber schwächere Effekte, wie die in Abbildungen 3.24 und 3.25 gezeigten. Die Verschiebung der Absorptionsmaxima durch Komplexbildung der Zn(II)-Ionen betrug bei pH 5,5 3 nm und bei pH 7,2 17 nm. In allen Fällen wurde die Verschiebung durch Zugabe von 125 µM EDTA wieder aufgehoben.



3.6.1.4 Akkumulation phenolischer Verbindungen nach Belastung mit Schwermetallen

Eine Belastung mit Schwermetallen, ins besondere mit Cu und Cd, verursachte eine stärkere Akkumulation des Flavonols Myricetin-3-Glucorhamnosid, während die Konzentration von Rutin nicht beeinflusst wurde (Abbildung 3.26). Der Gehalt der Hauptkomponente (Myricetin-3-Glucorhamnosid) stieg in den Blättern nach 72 h Cu-Belastung auf das doppelte der jeweiligen Menge des Kontrollansatzes an. In den Wurzeln konnte in diesem Zeitraum keine stärkere Akkumulation beobachtet werden.

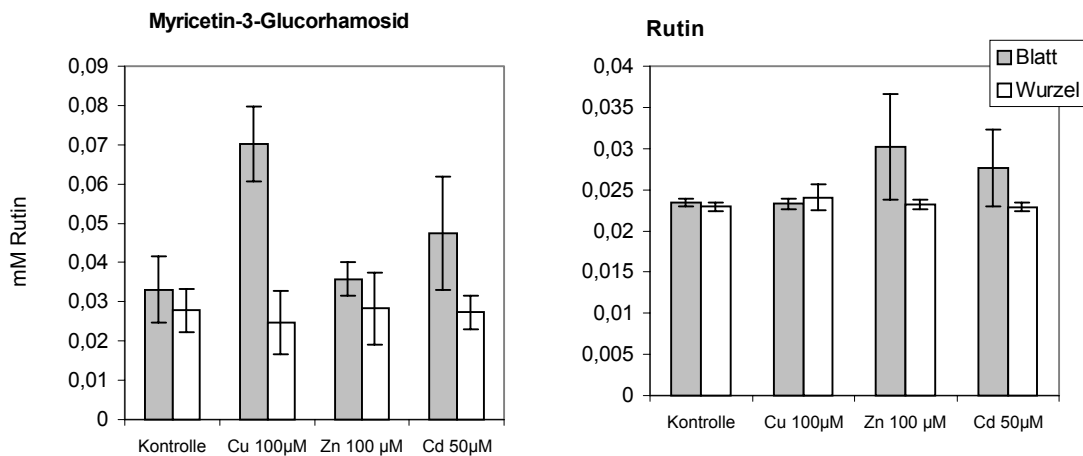


Abbildung 3.26: Akkumulation phenolischer Verbindungen in hydroponischen Pflanzen nach 72 h Schwermetallexposition.

Auch nach Behandlung von Keimlingen in Flüssigschüttelkulturen mit Schwermetallen wurde eine erhöhte Akkumulation von Myricetin-3-Glucorhamnosid registriert (Abbildung 3.27). Bei einer CuSO_4 -Konzentration von $10 \mu\text{M}$ im Medium nahm die Konzentration dieser Verbindung nach Erreichen des maximalen Wertes nach 48 h wieder ab und lag nach 72 h bei 80 % des Maximums und um 35 % höher als in den Kontrollen.

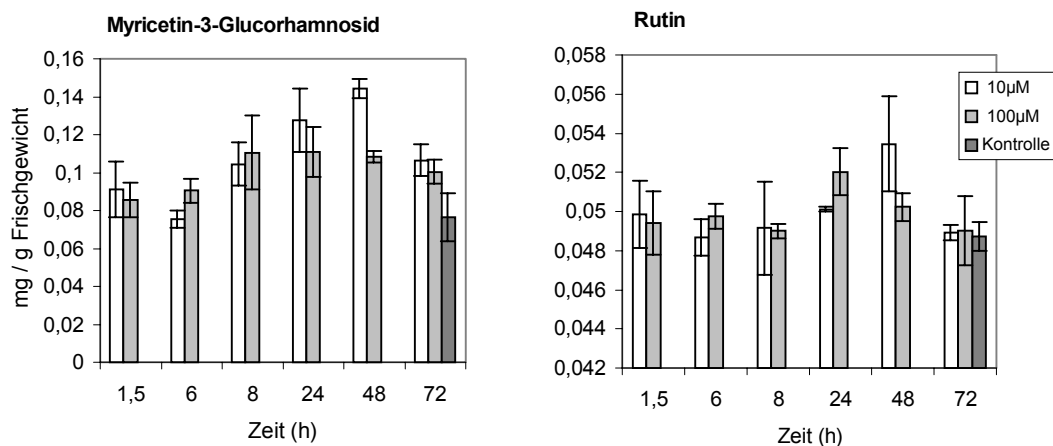


Abbildung 3.27: Zeitabhängige Akkumulation phenolischer Verbindungen in zwei Wochen alten Keimlingen von *Armeria* nach Schwermetallexposition ($10 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ CuSO_4).

Der Gehalt dieser Verbindung nahm auch bei einer Kupferkonzentration von $100 \mu\text{M}$ im Medium bis zum Maximum ($0,15 \text{ mg/g}$ Frischgewicht) nach 8 h zu. Nach 72 h lag der Gehalt noch bei 66,6 % des Maximums. Die Konzentration an Rutin stieg in dem Versuch nicht signifikant an und lag nach 72 h im selben Bereich wie in der Kontrolle.

3.7 Zn-Expositionsversuche mit Keimlingen

Es wurden mittels EDX-Messungen in Blättern Ablagerungen an Zink in den Epidermiszellwänden, den Zellwänden der Spaltöffnungen, auf der Oberfläche von Salzdrüsen und in den Vakuolen der Parenchymzellen in Pflanzen von den Schwermetallstandorten gefunden. Eine vergleichbar hohe Akkumulation von Zn wie im Falle von Cu in den Vakuolen der Idioblasten (Abschnitt 3.5.1) konnte nicht festgestellt werden.

Um den Verbleib von Zink in der Pflanze aufzuklären, wurde eine Reihe von Experimenten mit Keimlingen durchgeführt, wobei das Metall (100 μM ZnCl_2 -Lösung) über die Wurzel appliziert wurde. Nach 72 h Behandlung mit Zn wurden die Keimlinge mit dem Fluoreszenzfarbstoff Newport GreenTM im Dunkeln inkubiert und anschließend unter dem konfokalen Mikroskop beobachtet.

3.7.1 Untersuchungen zur Aufnahme und Verteilung von Zn in *Armeria*

Beim Betrachten des gesamten Wurzelsystems von Kontrollpflanzen bei schwacher Vergrößerung im konfokalen Mikroskop (Abbildung 3.28 A, B) konnte eine schwache Fluoreszenz in den Zellwänden, teilweise im Cytoplasma der Wurzelzellen und besonders in der Wurzelspitze beobachtet werden. Der Farbstoff ist spezifisch für Zn und weist auch eine geringe Affinität für weitere zweiwertige Ionen auf, so dass die beobachtete Fluoreszenz wahrscheinlich auf Ca^{++} -Ionen in der Zellwand zurückzuführen ist. In den Kontrollen (Abbildung 3.28 A) war die Fluoreszenz auf die Zellwände beschränkt, während eine deutlich stärkere Fluoreszenz in den belasteten Proben gefunden wurde und stellenweise eine Markierung des Xylems zu beobachten war (Abbildung 3.28 B, Pfeilspitzen).

Am stärksten war die Fluoreszenz in der Wurzelhaarzone der belasteten Proben (Abbildung 3.28 F, H), während in den entsprechenden Kontrollen (Abbildung 3.28 D) nur die Zellwände eine schwache Markierung aufwiesen. Die Detailaufnahme (Abbildung 3.28 G, H) zeigt deutlich die Fluoreszenz im Cytoplasma der Wurzelhaare. Diese Beobachtungen stimmten mit den durch EDX-Analyse erhaltenen Werten überein (Tabelle 3.7).

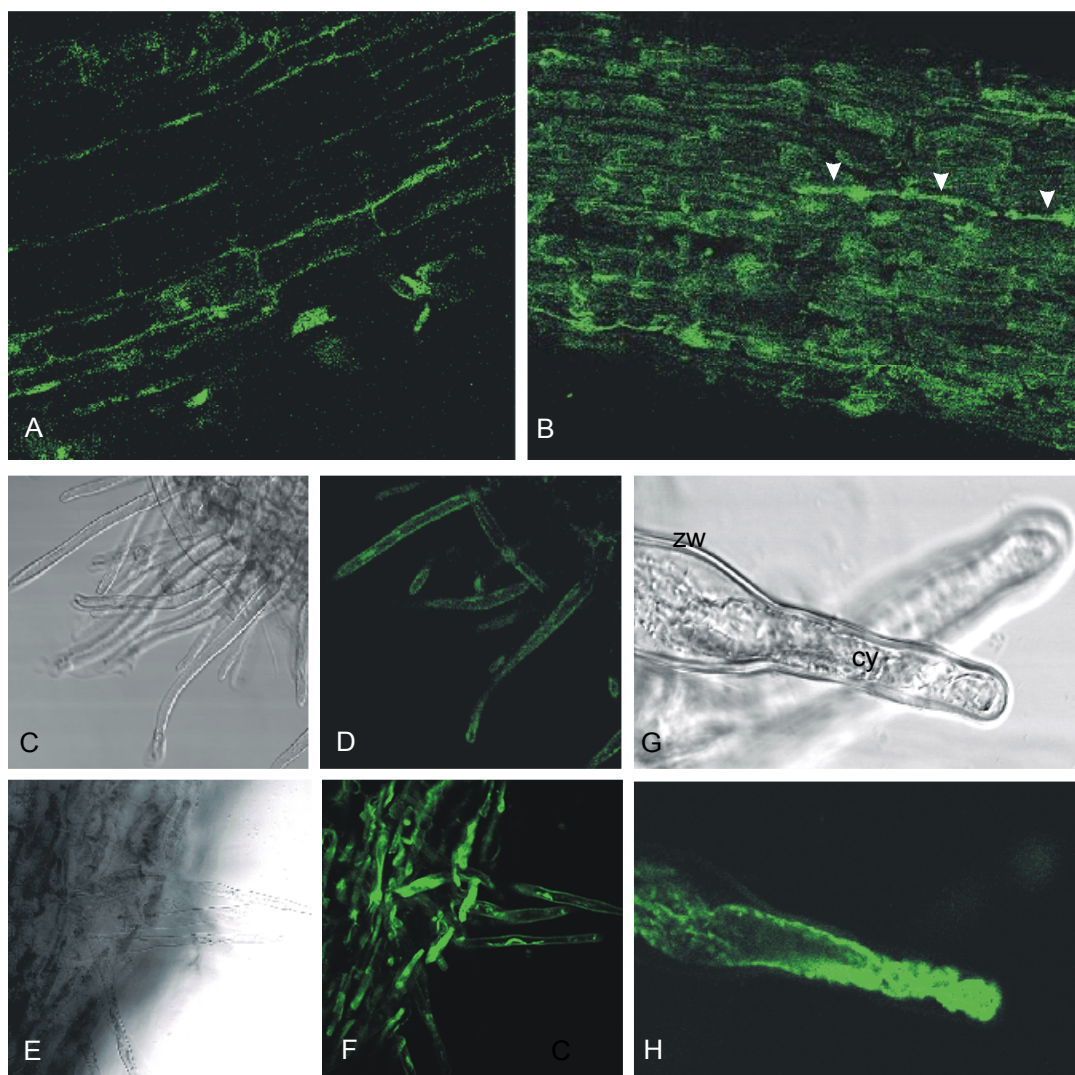


Abbildung 3.28: Konfokale Laserscan-Aufnahmen der Wurzelspitzen von *Armeria*-Keimlingen.

Die Zn-Verteilung behandelter (B, E, F, G, H) und Kontrollpflanzen (A, C, D) wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Newport Green™ sichtbar gemacht. **A:** Aufsicht auf die Apikalwurzel einer Kontrollpflanze. **B:** Aufsicht auf die Apikalwurzel nach 72 h Behandlung mit 100 µM ZnCl₂. **D, F, H:** Zn-Verteilung in Wurzelhaaren und entsprechende Transmissionsbilder (**C, G, E**). Die Aufnahme nach 72 h Behandlung mit 100 µM ZnCl₂ (**F**) und die Detailaufnahme (**H**) zeigen deutlich eine starke Fluoreszenz im Cytoplasma der Wurzelhaare, während die schwache Fluoreszenz in der Kontrolle (**D**) auf die Zellwände beschränkt ist. **zw:** Zellwand; **cy:** Cytoplasma; **Pfeilspitzen:** Xylem.

Tabelle 3.7: Zn-Konzentrationen in den Wurzelhaaren von *Armeria*-Keimlinge nach 24 h Zn-Belastung, ermittelt durch EDX-Analyse. Die Werte entsprechen der Anzahl der Atome im Referenzvolumen ($6.283 \times 10^6 \text{ nm}^3$) $\times 1000$ (Mittelwerte \pm SD, n=3)

Kompartiment	Zn	\pm SD
Zellwand	3,788	4,3
Cytoplasma	7,932	8,5
Vakuole	1,392	1,4

In den Blättern zeigte sich im konfokalen Mikroskop nach 72 h eine deutlich stärkere Akkumulation in der Epidermis, den Salzdrüsen und an den Spaltöffnungen (Abbildung 3.29 D). Die Salzdrüsen und die Spaltöffnungen waren im Fluoreszenzbild deutlich zu erkennen, während in den Kontrollen (Abbildung 3.29, B) nur die Zellwände markiert waren. Auch hier wurde eine Korrelation mit den durch EDX-Analyse erhaltenen Werten beobachtet (Abschnitt 3.4, Tabelle 3.2 und 3.3).

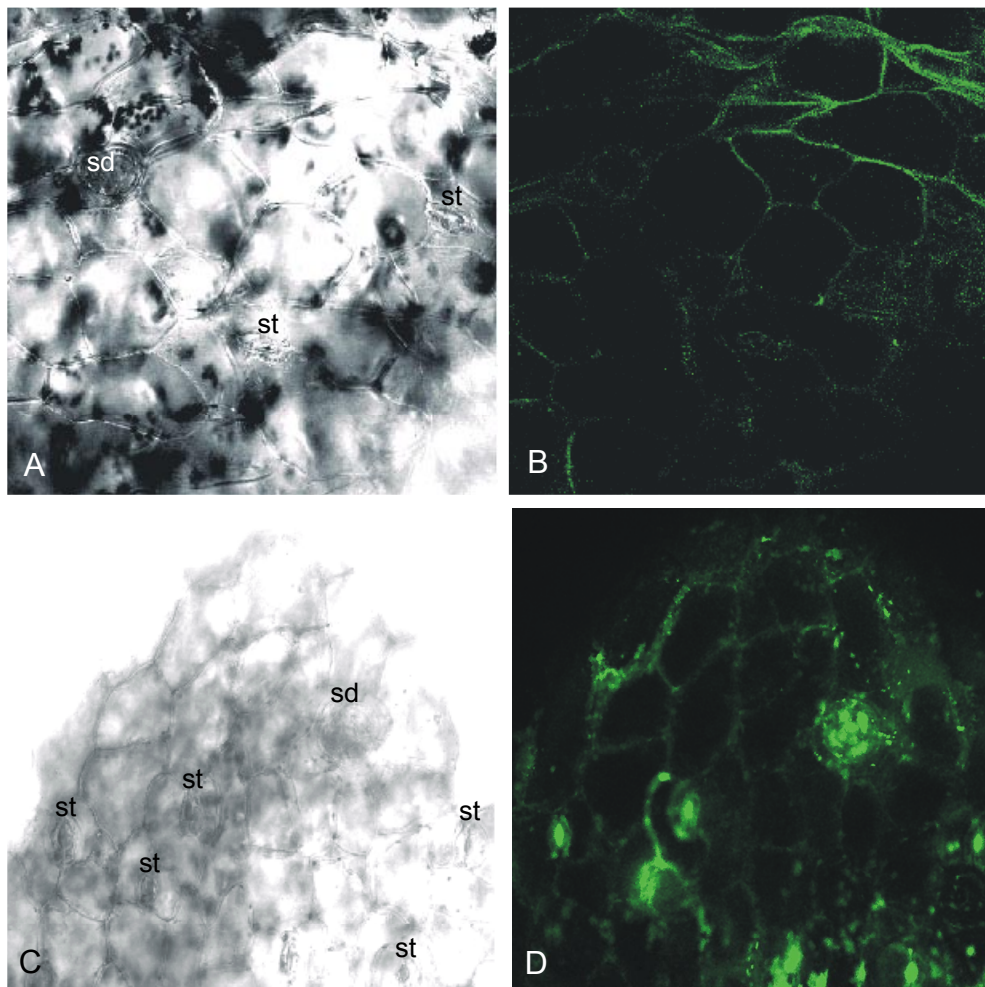


Abbildung 3.29: Zn-Verteilung in Blättern von *Armeria*-Keimlingen.

A, B: Kontrolle. **C, D:** Zn-Verteilung nach Behandlung mit 100 μM ZnCl_2 Lösung. Es ist eine starke Fluoreszenzintensität in den Salzdrüsen und in den Spaltöffnungen der Zn-behandelten Pflanzen zu verzeichnen, während in den Kontrollen die Fluoreszenz auf die Zellwände der Epidermis beschränkt ist.

st: Spaltöffnung; **sd:** Salzdrüse.

3.7.2 Nachweis der Vitalität von Keimlingen nach Schwermetallbelastung

Das PSII ist ein sensitives System für frühe Schädigungen der Pflanze. Die Aktivität des PSII als Chlorophyll-Fluoreszenz (Genty-Parameter) wurde als Maß für die Vitalität der Keimlinge nach Schwermetallbelastung verwendet.

Nach 5 Tagen Belastung mit 100 μM CuSO_4 oder ZnCl_2 (Abbildung 3.30) wurde eine geringe Erniedrigung der Fv/Fm-Verhältnisse auf 95 % des Kontrollwertes beobachtet. Nach 72 h Stunden Belastung betrug die Vitalität 98,5 % (Cu) und 95 % (Zn) der Kontrollwerte. Dieser Zeitpunkt wurde für weitere Kurzzeitexperimente ausgewählt.

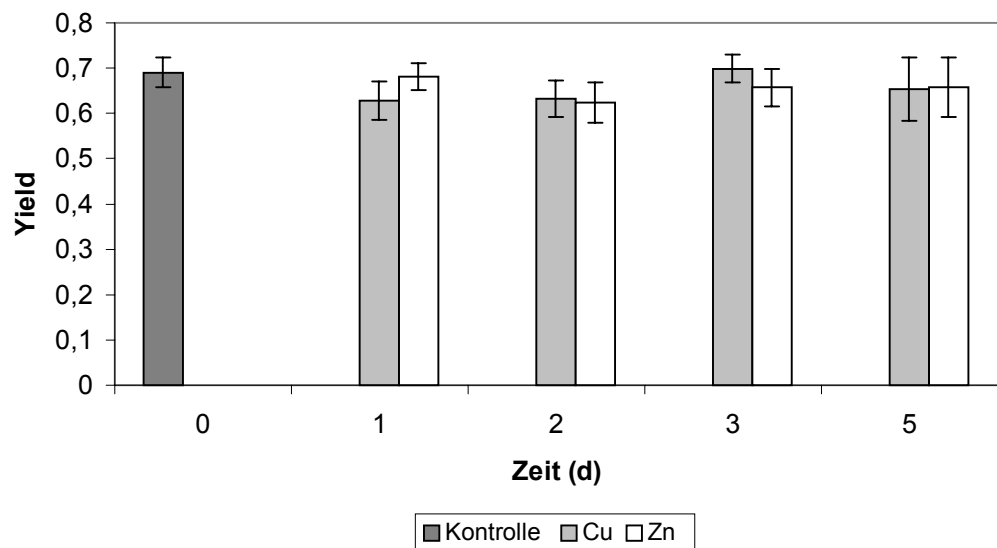


Abbildung 3.30: Vitalität von *Armeria*-Keimlingen, dargestellt als Änderungen der Fv/Fm-Verhältnisse nach Zugabe von 100 μM CuSO_4 oder 100 μM ZnCl_2 .

3.8 Silizium in *Armeria*

In früheren Untersuchungen wurde die Akkumulation von Si in verschiedenen schwermetalltoleranten dicotylen Pflanzen beschrieben (Neumann et al., 1997, 2001). Einige Spezies wie *Cardaminopsis halleri*, *Minuartia verna*, *Silene vulgaris*, *Viola calaminaria* und *Pisum sativum* zeigten Si-Ablagerungen in den Interzellularen, im Cytoplasma und in den Vakuolen.

In allen untersuchten *Armeria*-Pflanzen und dabei besonders ausgeprägt in den Pflanzen vom Standort Langelsheim, der die höchsten Schwermetallkonzentrationen im Boden aufweist (Abschnitt 3.2), konnten elektronentransparente Bereiche beobachtet werden (Abbildung 3.31).

Diese als „weisse Wolken“ erscheinenden Strukturen (Abbildung 3.31 A, B, C, D, E) wurden neben den vakuolären Niederschlägen mit phenolischem Material oft in den Vakuolen der Epidermiszellen vorgefunden. Die EDX-Spektren aus diesen Bereichen zeigten, dass die Strukturen fast ausschließlich aus Si bestehen (Abbildung 3.31 F). Weiterhin wurde die Bildung von Vesikeln oft direkt an einer entstehenden Si-Ablagerung beobachtet (Abbildung 3.31 D, E und 3.33).

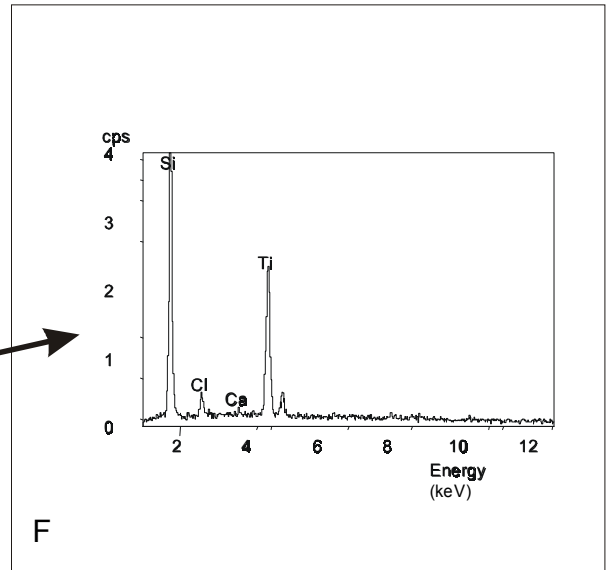
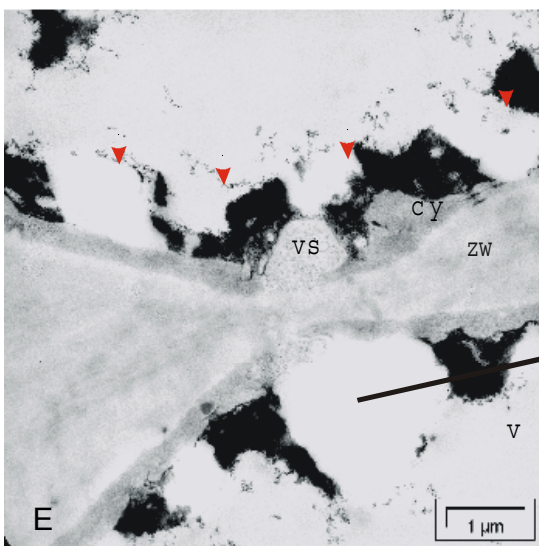
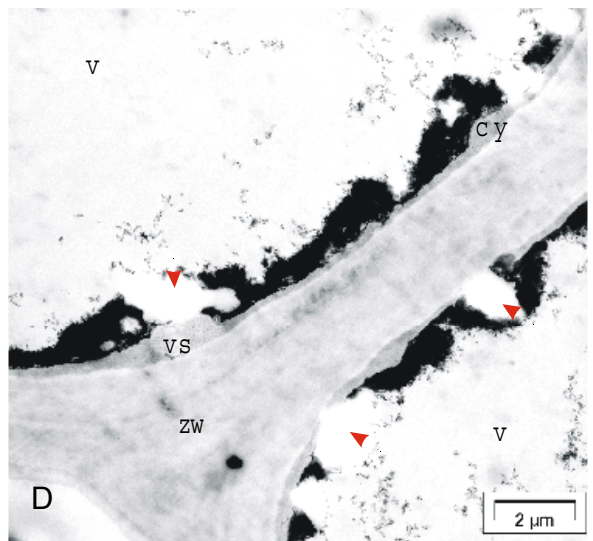
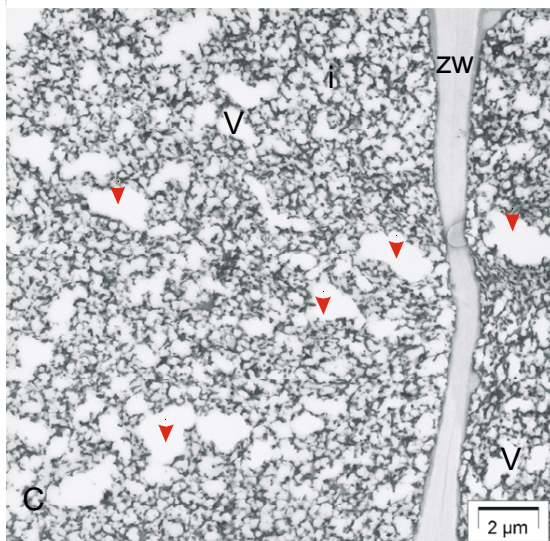
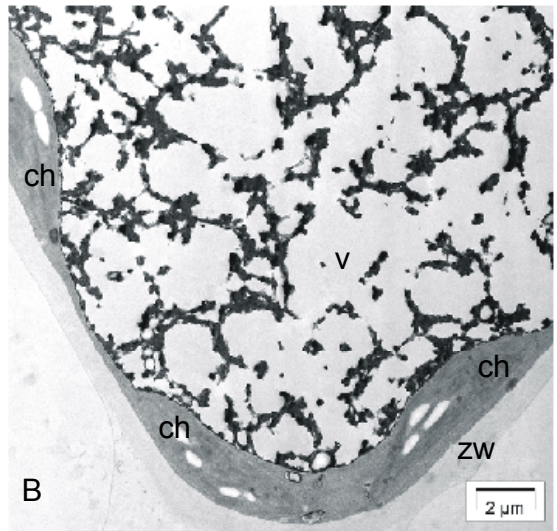
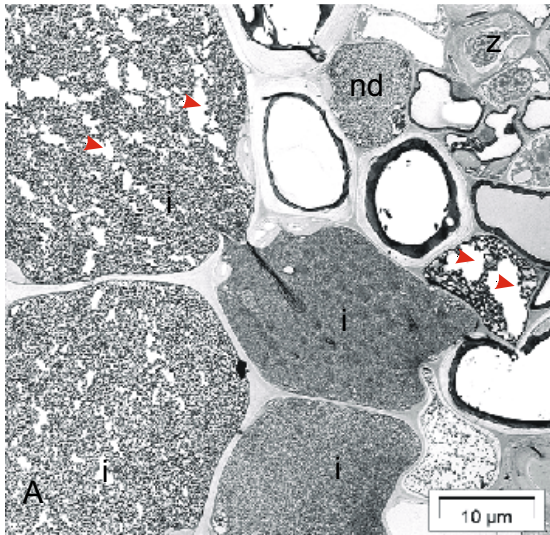
ESI-Verteilungsbilder der elektronentransparenten Bereiche bestätigten, dass diese Kristalle aus Si bestehen (Abbildung 3.32 A-H). In *Armeria* kommt Silizium als SiO₂ vor. Die Silizium-Sauerstoff Verbindung ist die am häufigsten vorkommende Verbindung in der Erdoberfläche (Werner & Roth 1983).

Mittels EEL-Spektroskopie war es möglich, Informationen über die chemische Natur und den Bindungszustand von Si zu erhalten. Wie in früheren Untersuchungen für dicotyle Pflanzen, wie *Thlaspi*, *Viola*, *Silene* und *Minuartia* (Neumann et al., 1997), gezeigt, stimmen auch in *Armeria* die EEL-Spektren der Si-L_{2,3}-Kante und der O-K-Kante sowie die entsprechenden DFT-Berechnungen von SiO₂-Standards mit denen von vakuolären Si-Kristallen überein (Abbildung 3.33 A, B).

Abbildung 3.31: Ultrastruktur von *Armeria*-Blättern.

A: Querschnitt durch ein Leitbündel und umgebende Parenchymzellen. Die Idioblasten weisen neben dem stark kontrastierten, phenolischen Inhalt auch elektronentransparente Bereiche auf. **B:** Zelle aus dem Schwammparenchym. **C:** Detailaufnahme von A. **D, E:** Elektronentransparente Bereiche in der Vakuole von Epidermiszellen. **F:** Das EDX-Spektrum aus dem elektronentransparenten Bereich zeigt, dass diese Struktur fast ausschließlich aus Si besteht. Der Ti-Peak wird durch das Trägernetzchen verursacht.

ch: Chloroplast; **cy:** Cytoplasma; **i:** Idioblast; **nd:** vakuolärer Niederschlag; **v:** Vakuole; **vs:** Vesikel; **z:** Zellkern; **zw:** Zellwand. **Pfeilspitzen:** elektronentransparente Bereiche.



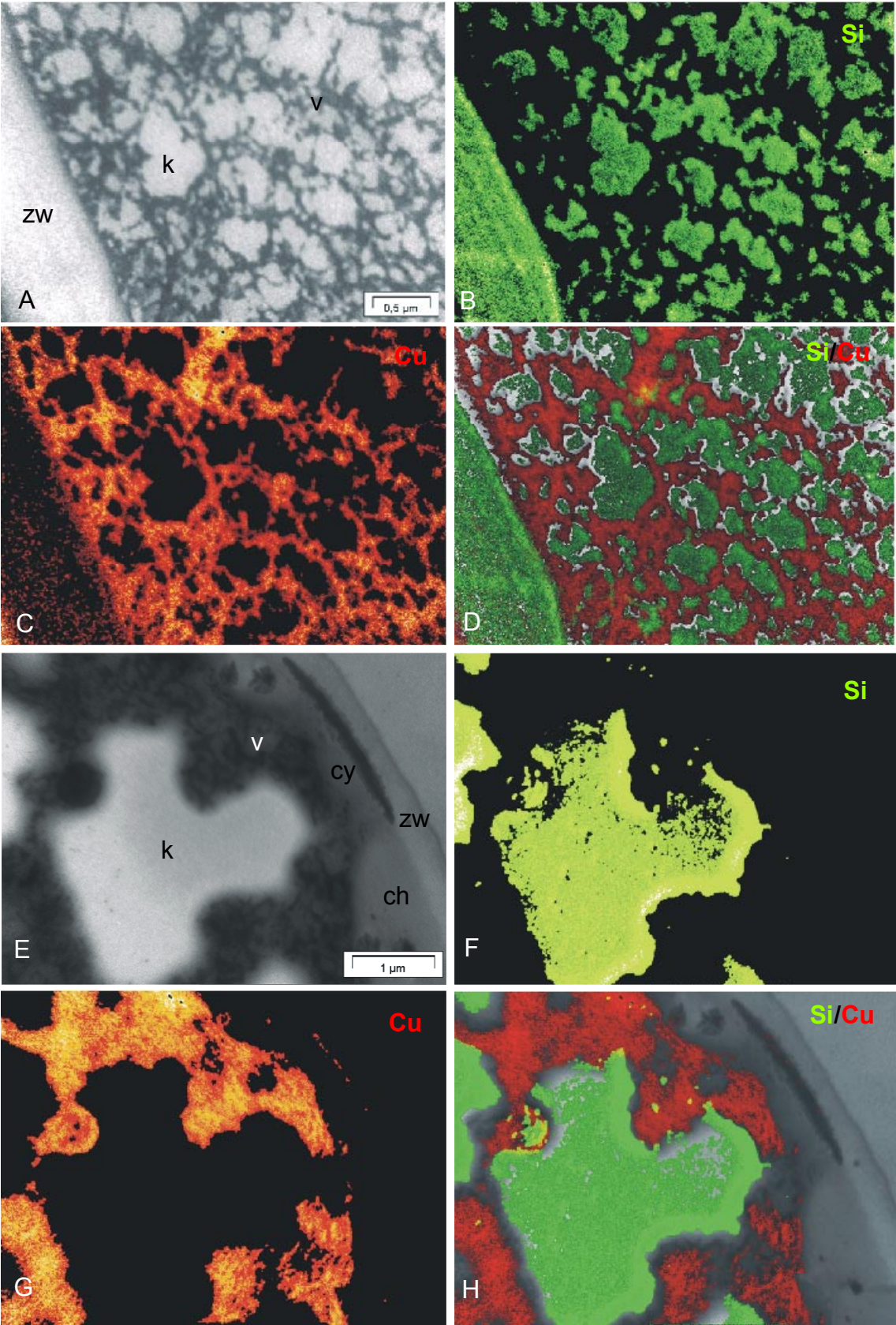


Abbildung 3.32: Vakuolen mit Niederschlägen und elektronentransparente Bereiche in Blättern von *Armeria* vom Standort Langelshelm. Cu (rot) kommt in der Zellwand und in den vakuolären Niederschlägen vor, Si (grün) in der Zellwand und in elektronentransparenten Kristallen. Das Vorhandensein von Si in der Zellwand in F und H kann durch die hohe Konzentration im Si-Kristall nicht dargestellt werden.

A, E: Zero loss-Bilder. **B, F:** ESI-Verteilungsbilder von Si (Zwei-Fenster-Methode). Die Si-Konzentration ist grün dargestellt. **C, G:** ESI-Verteilungsbilder von Cu (Konzentrationszunahme von Rot nach Gelb). **D, H:** Mixmap aus zero loss-Bild, Si- und Cu-Verteilungsbildern.

ch: Chloroplast; **cy:** Cytoplasma; **k:** Kristall; **zw:** Zellwand; **v:** Vakuole.

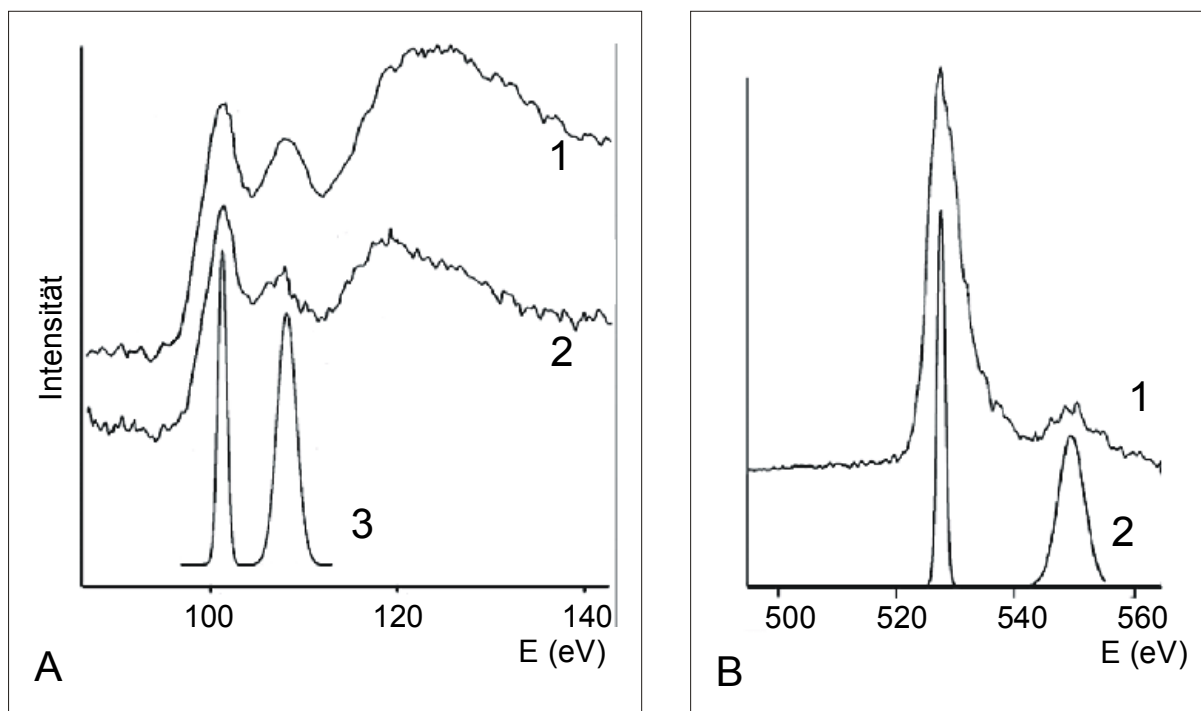


Abbildung 3.33: **A:** EEL-Spektren der Si-L_{2,3}-Kante eines SiO₂-Standards (1), eines Si-Kristalls aus *Armeria* (2) und DFT-Berechnung (3).

B: EEL-Spektren der O-K-Kante eines SiO₂-Standards (1) und entsprechende DFT-Berechnung (2).

C: Bildung von SiO₂ in pflanzlichen Zellen.

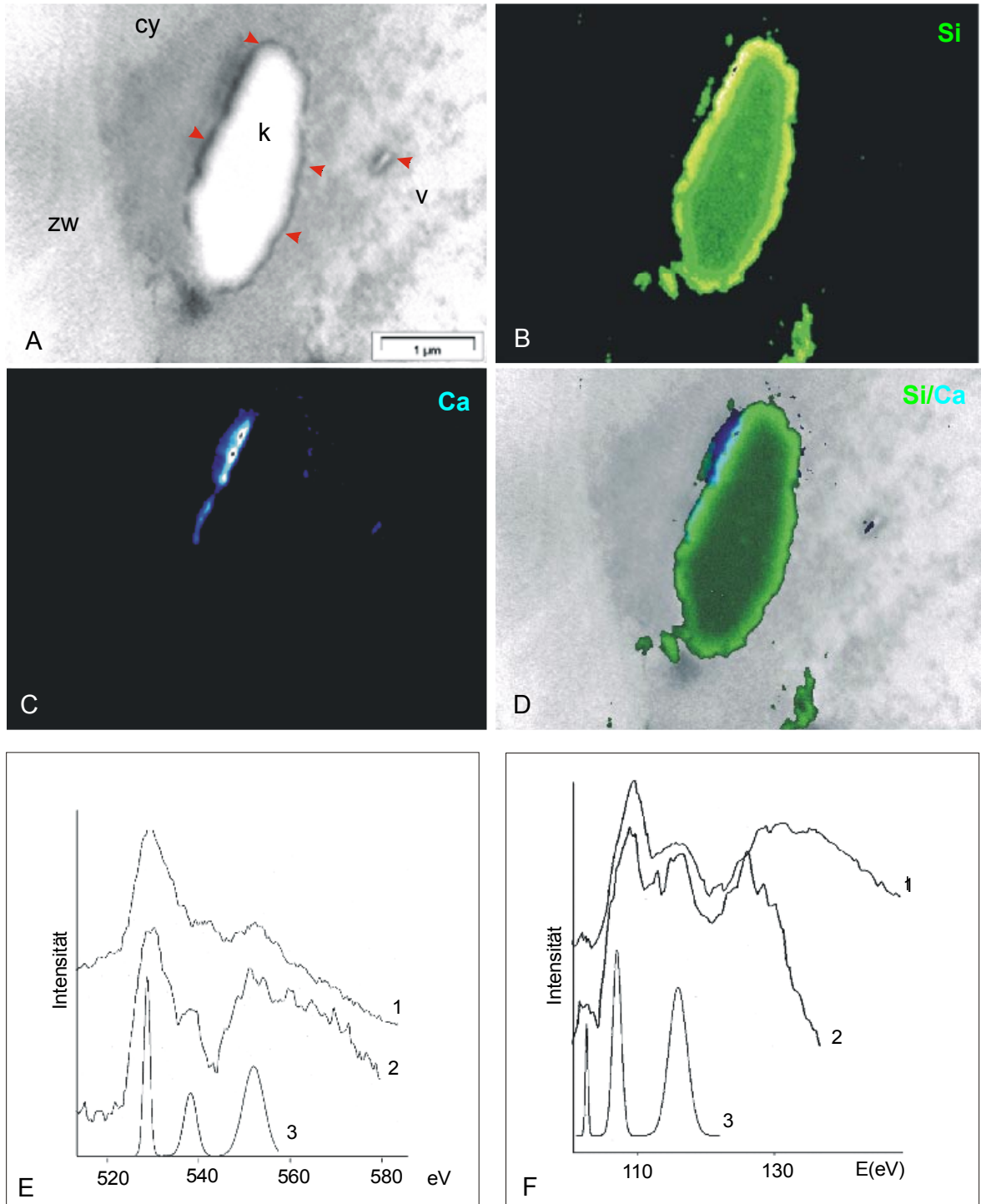


Abbildung 3.34: Si- und Ca-Verteilung in einem vakuolären SiO_2 -Kristall.

A: Zero loss-Bild. **B:** Si-Verteilung (Si- $L_{2,3}$ -Kante).

C: Ca-Verteilung (Ca- $L_{2,3}$ -Kante). **D:** Mixmap aus A, B und C.

E: EEL-Spektren der O-K-Kante eines Ca-Silikat-Standards (1), des Randbereiches eines Si-Kristalls aus *Armeria* (2) und DFT-Berechnung (3).

F: EEL-Spektren der Si- $L_{2,3}$ -Kante eines Ca-Silikat-Standards (1), des Randbereiches eines Si-Kristalls aus *Armeria* (2) und DFT-Berechnung (3).

cy: Cytoplasma; **k:** Kristall; **zw:** Zellwand; **v:** Vakuole;

Pfeilspitzen: Randbereiche des Kristalls.

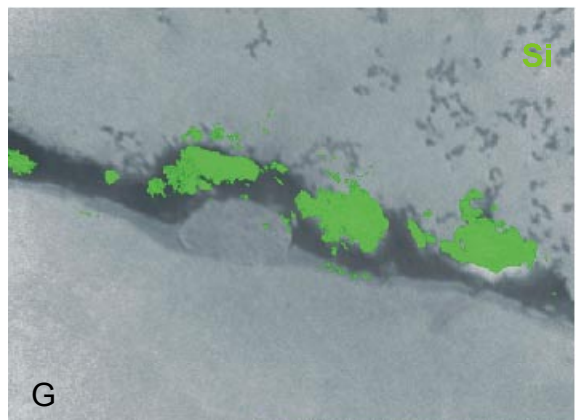
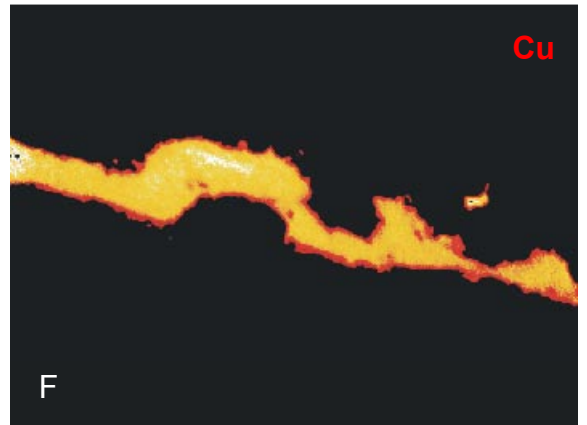
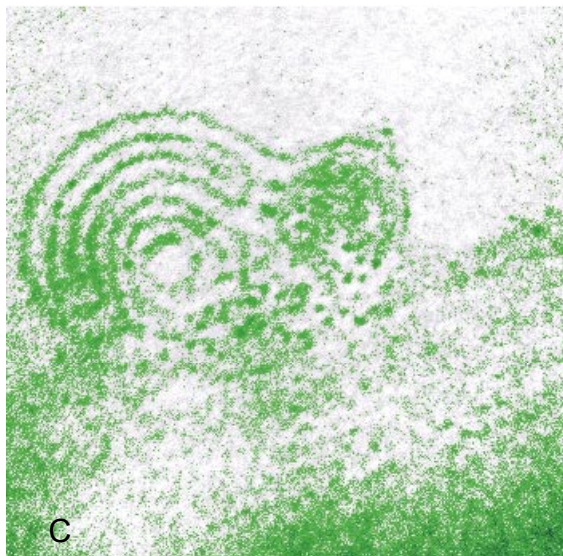
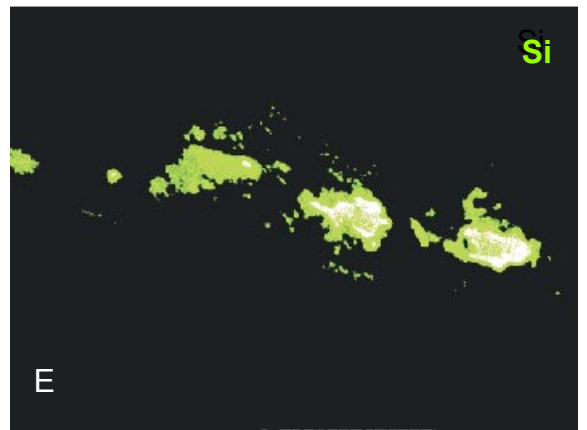
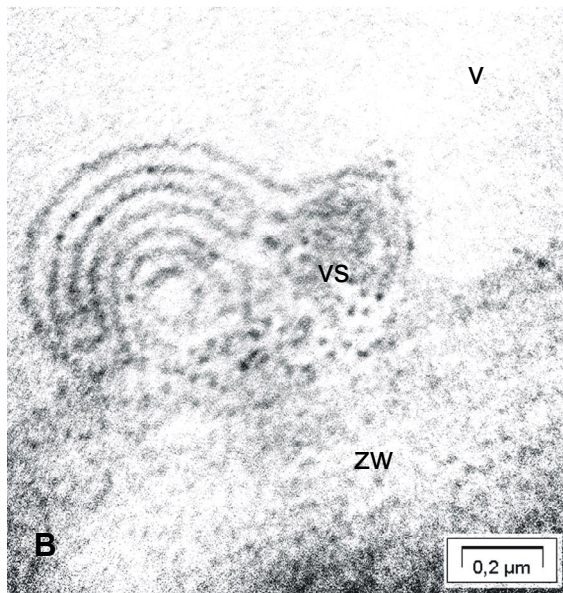
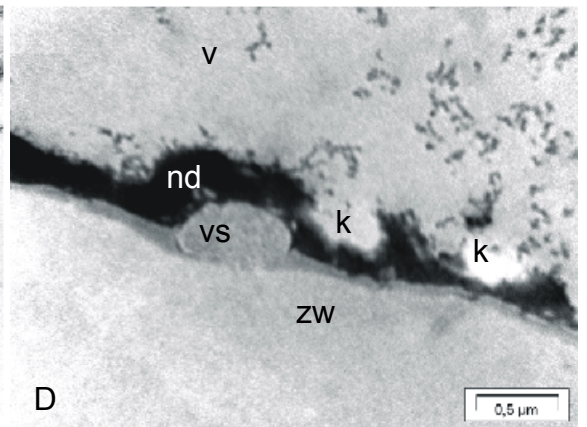
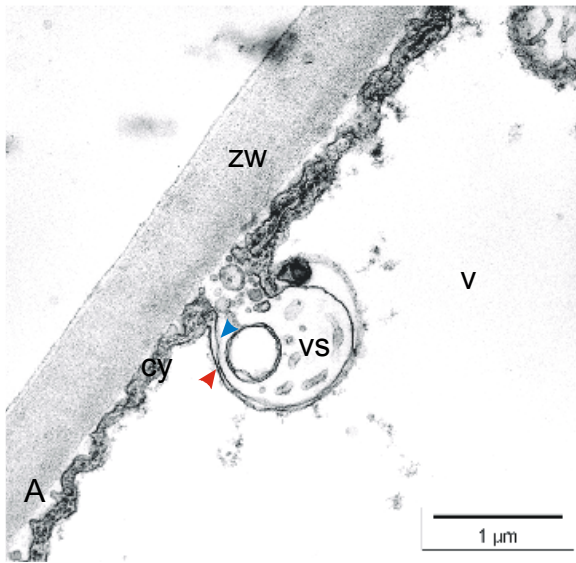
Im Randbereich von Si-Kristallen (Abbildung 3.34 A, rote Pfeilspitzen) wurden Ca-Ablagerungen gefunden. ESI-Bilder der Si- und Ca-Verteilung im Kristall zeigten das Vorkommen von Ca in der Peripherie des Si-Kristalls (Abbildung 3.34 D).

EEL-Spektren der O-K-Kante und die DFT-Berechnung eines Ca-Silikat-Standards stimmen mit denen eines Si-Kristalls aus *Armeria* überein (Abbildung 3.34, E).

Ein Teil des Si wird in *Armeria* vermutlich als lösliches Ca-Silikat in die Zellen aufgenommen, ähnlich den Vorgängen in der Cu-toleranten *Minuartia verna* (Neumann et al., 1997a). Aus dem instabilen Ca-Silikat entsteht in der Vakuole das stabilere SiO₂, aus dem die elektronentransparenten Kristalle bestehen (Abbildung 3.33 C).

Wie in Abbildung 3.35 gezeigt, wurde die Bildung von Membranausstülpungen oft in der Nähe entstehender oder vorhandener Si-Kristalle beobachtet. Diese Vesikel werden von zwei Membranen gebildet und schließen einen schmalen Plasmasaum ein. Die Abgrenzung nach außen wird durch den Tonoplasten und nach innen durch das Plasmalemma gebildet (Abbildung 3.35 A). Die ESI-Bilder der Si- und Cu-Verteilung (Abbildung 3.35 D-G) zeigen solche Ablagerungen an Silizium in der Vakuole in Form von Kristallen und einen entstehenden Kristall im vakuolären Cu-Niederschlag in unmittelbarer Nähe eines Vesikels. Dies könnte ein weiterer Hinweis auf einen alternativen Mechanismus für den Transport von Si in Vakuolen, wie von Neumann et al., 2001 vorgeschlagen, darstellen. Bedingt durch die geringe Datentiefe der SIT-Kamera (8 Bit) ist es nicht möglich, schwache Signale neben sehr hohen Signalen darzustellen, wodurch das Vorkommen von Si in der Zellwand und im Vesikel durch die sehr hohen Konzentrationen im Si-Kristall nicht gezeigt werden kann (Abbildung 3.35 E, G). Betrachtet man einem Vesikel aus einem Bereich ohne interferierende Strukturen (Abbildung 3.35 B, C), sieht man deutlich die gleichmäßige Verteilung von Si in der Zellwand und innerhalb eines Vesikels.

Abbildung 3.35: **A:** In die Vakuole hineinragende Membranausstülpungen, die von zwei Membranen (rote Pfeilspitze: Tonoplast; blaue Pfeilspitze: Plasmalemma) gebildet werden. **B:** *Zero loss*-Aufnahme eines Vesikels bei hoher Vergrößerung und niedrigem Kontrast. **C:** ESI-Verteilungsbild von Si (Zwei-Fenster-Methode). Die Si-Konzentration ist grün dargestellt. **D:** *Zero loss*-Bild. **E:** ESI-Verteilungsbild von Si. Das Vorhandensein von Si in der Zellwand ist durch die hohe Konzentration im Si-Kristall nicht darstellbar. **F:** ESI-Verteilungsbild von Cu, Konzentrationszunahme von Rot nach Gelb. **G:** *Mixmap* aus *zero loss*-Bild und Si-Verteilungsbild.
k: Kristall; **nd:** vakuolärer Niederschlag; **v:** Vakuole; **vs:** Vesikel; **zw:** Zellwand



4 Diskussion

Einige Pflanzen sind in der Lage, sich vor hohen bis sehr hohen Konzentrationen an Schwermetallen im Boden mit einer ganzen Reihe von Mechanismen zu schützen. Diese teilen sich in Vermeidungsstrategien wie eine verminderte Aufnahme, Bindung an Zellwände und extrazelluläre Exudate, sowie intrazelluläre Toleranzmechanismen.

Die SM-Toleranz von *Armeria* resultiert aus dem Zusammenspiel verschiedener Mechanismen. Einerseits werden Schwermetalle wie Cu, Zn und Pb über Salzdrüsen und cuticuläre Transpiration wieder ausgeschieden, andererseits wird ein großer Teil des aufgenommenen Cu in den Vakuolen vermutlich durch Bildung von Chelat-Komplexen mit phenolischen Verbindungen zurückgehalten (Neumann et al., 1995).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Verteilung von Cu, Zn und Si in *Armeria* mittels konventioneller und analytischer Elektronenmikroskopie untersucht, und Hinweisen bezüglich der Bindungspartner in den verschiedenen Kompartimenten nachgegangen.

4.1 Kupfer

Die Cu-Konzentrationen im Boden der Schwermetallstandorte Eisleben und Langelsheim betragen etwa das 50 bis 100 -fache der Konzentrationen eines Kontrollstandortes (Tabelle 3.1). Obwohl nur 0,05 bis 2 % (Standort Eisleben) des Cu-Gehaltes des Bodens für die Pflanzen verfügbar sind (Leopold 1993), wachsen an solchen Standorten nur Pflanzen, die Strategien entwickelt haben, um das Cu vom Cytoplasma fernzuhalten oder zu entgiften.

Die Verteilung der Schwermetalle im Boden ist nicht homogen. Es fehlen allerdings auf den mittelalterlichen Schwermetallhalden die typischen Konzentrationsgradienten, die durch die flächendeckende Erstreckung des Schwermetallstandortes entstehen, auch wenn an den Stellen, wo SM-reiche Gesteine vorkommen, die höchsten Schwermetallgehalte gefunden werden (Ernst 1974).

4.1.1 Cu in der Zellwand

Neben der Ausscheidung durch Salzdrüsen und der Speicherung in der Vakuole (Abschnitt 4.1.3) wurde Cu in allen untersuchten Pflanzen in den Zellwänden der Blätter nachgewiesen. Dort könnten die sauren Silanol-Gruppen des SiO₂ in den Zellwänden möglicherweise an der Bindung von Metallkationen beteiligt sein, allerdings sind die Carboxyl- und phenolischen Hydroxylgruppen der organischen Zellwandkomponenten wahrscheinlich die wichtigeren Bindungsstellen (Jones 1978). Die höchsten Cu-Konzentrationen wurden in den Zellwänden

der Parenchym- und Epidermiszellen des Standortes Eisleben nachgewiesen (Tabelle 3.2). Für das im freien Raum transportierte Cu ist ein Konzentrationsgradient in den Zellwänden entlang des Transpirationsstromes zu erwarten. Die höchsten Cu-Konzentrationen im Blatt wären dann in den Zellwänden der Epidermis zu finden sein. In *Armeria* vom Standort Eisleben ist dies der Fall. Die niedrigsten Cu-Konzentrationen werden in den Transferzellen im Leitbündel gefunden, die höchsten in den antiklinen und inneren Zellwänden der Epidermis (Tabellen 3.2 und 3.3).

Die Zellwand spielt mit Sicherheit eine wichtige Rolle bei Toleranzmechanismen gegenüber Schwermetallen. In allen toleranten Pflanzen werden Schwermetalle in der Zellwand gebunden gefunden. Diese Bindung ist offenbar sehr stabil. Normale Fixierungs- und Einbettungsprozeduren für die Elektronenmikroskopie beeinflussen den Schwermetallgehalt der Zellwände nicht (Bringezu et al., 1999).

Dass die Zellwände der Epidermiszellen bevorzugt Schwermetalle binden, zeigten auch die erhöhten Cu-Konzentrationen von nicht schwermetallbelasteten Kontrollstandorten. Dabei ist die Bindung von Cu an Zellwände offenbar vom Standort oder auch von der speziellen Zusammensetzung der Zellwände abhängig. So zeigten die Epidermiszellwände des Schwermetallstandortes Eisleben hohe Cu-Konzentrationen, während die am Standort Langelsheim gefundenen Werte mit denen von Kontrollstandorten vergleichbar waren.

4.1.2 Cu im Cytoplasma

Pflanzliche Zellen haben das Problem, auf der einen Seite Schwermetalle wie Cu und Zn zu benötigen, auf der anderen Seite die empfindlichen Strukturen des Cytoplasmas vor hohen, toxischen Konzentrationen zu schützen. Diese Vorgänge sind offenbar sehr fein reguliert. Es wird angenommen, dass Schwermetalle wie Cu und Zn in ungebundener Form im Cytoplasma nicht vorkommen (Lippard 1999). Es ist für die Pflanze von vitaler Bedeutung, die Konzentration an essentiellen Metallen in einem Gleichgewicht zwischen Mangel und Toxizität zu halten, um einerseits die Aktivität verschiedener Enzyme und Stoffwechselwege zu gewährleisten, andererseits die toxischen Wirkungen dieser Metalle zu minimieren. Pflanzen von schwermetallbelasteten Standorten entwickelten eine Reihe von adaptiven Strategien, die auf eine Verminderung freier Schwermetallionen im Cytoplasma zielen, wie die Synthese von Phytochelatinen und Metallothionein sowie die Bindung an reduziertes Glutathion (Übersicht in: Rauser 1999, Clemens 2001).

Im Cytoplasma des Blattparenchyms von *Armeria* von schwermetallbelasteten Standorten waren deutlich höhere Cu-Konzentrationen im Vergleich zu den entsprechenden

Kontrollpflanzen nachzuweisen (Abbildung 3.10). EEL-Spektren des Cytoplasmas wiesen auf eine Bindung an Proteine oder Peptide hin (Neumann et al., 1995).

Glutathion und Phytochelatine

Glutathion (GSH), ein in allen Pflanzen vorkommendes Antioxidans, stellt durch die nucleophile Natur der Thiol-Gruppe, und die relative Stabilität und Löslichkeit in Wasser eine ausgezeichnete biochemische Verbindung dar, um Pflanzen gegenüber verschiedenen umweltbedingte Arten von Stress, wie Schwermetalle, oxidativen Stress und Xenobiotika, zu schützen. Die Bindung einiger Xenobiotika und sekundärer Metabolite, wie Anthocyanine an GSH, wird durch eine Glutathion-S-Transferase katalysiert, und diese Verbindungen werden dann vermutlich als GSH-Konjugate in die Vakuole transportiert (Marrs 1996, Alfenito et al., 1998). Im Moos *Fontinalis antipyretica* beispielsweise spielt GSH eine essentielle Rolle bei der Schwermetall-Entgiftung während des Schwermetalltransportes durch das Cytoplasma (Bruns et al., 2001)

Der Gehalt an GSH in allen untersuchten Blättern von *Armeria* verschiedener Standorte war vergleichbar und lag im Bereich von 16 μM . Die Zugabe von CuSO_4 oder ZnCl_2 zur Nährlösung bewirkte bei Keimlingen keine signifikante Erhöhung des Glutathion-Gehaltes. Nur nach Zugabe von CdCl_2 wurde eine leichte Erhöhung der GSH-Konzentration auf 18 μM innerhalb von 6 Tagen beobachtet.

Abgesehen von seiner Rolle im allgemeinen Stressgeschehen, ist GSH auch das Substrat für die Synthese von Phytochelatinen, die Schwermetalle an der reduzierten Thiol-Gruppe des Cysteins binden (Zenk 1996).

In früheren Untersuchungen an *Armeria* von unterschiedlich belasteten Standorten konnte die Bildung von Phytochelatinen mittels HPLC-ICP-MS nicht nachgewiesen werden (Leopold 1997). Um das Ausbleiben einer Phytochelatinsynthese auszuschließen, wurden hydroponische Pflanzen für 72 h mit Zn, Cu und Cd behandelt und die Extrakte nach Derivatisierung mit MBrB mittels HPLC getrennt. Die Methode mit MBrB soll eine Detektion im pmol Bereich ermöglichen (Newton et al., 1981). In den Kontrollen sowie in den Cu- und Zn-behandelten Pflanzen waren keine Phytochelatine detektierbar. Nur nach Cd-Behandlung wurden zwei Peaks nachweisbar, die die Retentionszeiten von PC2- und PC3-Standards aufwiesen (Abbildung 3.13). Thiole mit höheren Retentionszeiten als PC3, die auf längere Phytochelatine hinweisen würden, konnten nicht gefunden werden.

Während der schwermetallinduzierten Phytochelatinsynthese wird im Allgemeinen eine deutliche Abnahme des Glutathionpools beobachtet (Tukendorf & Rauser 1990). Eine leichte Erhöhung statt einer Abnahme des GSH-Gehaltes nach Cd-Exposition wurde bei *Armeria* beobachtet. Die niedrigen PC-Konzentrationen werden also nicht durch einen Mangel an GSH verursacht, und die PC-Bildung nach Cd-Exposition in *Armeria* ist so gering, dass es für eine Änderung im GSH-Gehalt nicht ausreicht.

Es gibt in der Literatur zahlreiche Beispiele für und wider eine Rolle von Phytochelatinen bei der Schwermetalltoleranz. So korrelieren bei Cd-sensitiven *Arabidopsis*-Mutanten die Konzentrationen an gebildeten Phytochelatin direkt mit dem Grad an Sensitivität der jeweiligen Mutante (Howden et al., 1995a, b). Andererseits bildet die sensitive *Silene vulgaris* bei Cu- und Zn-Exposition mehr Phytochelatin als tolerante Pflanzen. Dies deutet darauf hin, dass die Menge an Phytochelatinen bei *Silene* nicht für die Toleranz gegenüber Cu und Zn verantwortlich ist (De Vos et al., 1992; Schat & Kalff 1992, Harmens 1993a). In Hefezellen und im Gewebe oder Zellkulturen von Pflanzen, die nur mit Spuren essentieller Schwermetalle kultiviert wurden, können Phytochelatine bereits in niedrigen Konzentrationen nachgewiesen werden (Grill et al., 1988b, Kneer & Zenk 1992). Die Synthese von Phytochelatinen in Zellkulturen beginnt bereits Minuten nach der Metall-Exposition (Grill et al., 1987) und in intakten Pflanzen nach einigen Stunden (Meuwly et al., 1995).

Bei Untersuchungen von Grill et al., (1988a) mit der schwermetalltoleranten *Silene cucubalus* und der schwermetallsensitiven Pflanze *Acer pseudoplatanus* von einem Zn- und Pb-belasteten Standort konnten Phytochelatine nachgewiesen werden, allerdings nur in den Wurzeln. Dabei konnte in *Silene* von einem Kontrollstandort kein Phytochelatin detektiert werden. Es wird vermutet, dass Pflanzen, die an Schwermetalle adaptiert sind, im Verlauf der Evolution effektivere, zusätzliche Mechanismen der Schwermetalldetoxifikation entwickelt haben müssen (Baker 1987), beispielsweise durch eine effizientere Kompartimentierung in der Vakuole, z.B. mittels eines $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiporters am Tonoplasten (Salt & Wagner 1993). Da die Phytochelatinsynthese vom cytosolischen Cd-Gehalt abhängt, würden niedrigere Konzentrationen im Cytosol, bedingt durch eine effektivere Kompartimentierung in der Vakuole, auch eine Verringerung der Induktion der Phytochelatinsynthese bewirken (Schat et al., 2000). Sollte es zutreffen, dass *Armeria* kein Phytochelatin nach Schwermetallstress bildet, so würde das eine erstaunliche Ausnahme im Pflanzenreich darstellen. Es wurde kürzlich berichtet, dass bei Untersuchungen an einer Cd-sensitiven *Vigna angularis*-Zellkultur Phytochelatine nicht nachgewiesen werden konnten (Inouhe et al., 2000). Dies wurde bereits in einer weiteren Publikation widerlegt, wobei gezeigt wurde, dass statt Phytochelatin Homophytochelatin gebildet wird (Oven et al., 2001), eine bekannte Ausnahme in der Ordnung der *Fabales* (Grill et al., 1986).

Aus den früheren Untersuchungen mit Pflanzen von schwermetallbelasteten Standorten und den hier gezeigten Ergebnissen kann gefolgert werden, dass Phytochelatine in *Armeria* unter diesen Standortbedingungen nicht nachweisbar sind und primär an der Toleranz von *Armeria* gegenüber Cu und Zn nicht beteiligt sind. Unter Cd-Stress werden sie zwar gebildet, ob sie eine Rolle für die Cd-Toleranz spielen, kann aus den hier gezeigten Untersuchungen jedoch nicht geschlossen werden.

Cu-bindende Proteine und Metallothioneine

Weitere Antworten auf Schwermetallüberschuss sind die Synthese von Stressproteinen (z.B. Hitzeschockproteine), Antioxidantien mit niedrigem Molekulargewicht (z.B. Glutathion, Ascorbinsäure, α -Tocopherol, Carotinoide) und antioxidative Enzyme (z.B. die Superoxid-Dismutase (SOD)).

Von den fünf durch Metallaffinitätschromatographie gereinigten, Cu-bindenden Proteinen, die für die Sequenzanalyse verwendet wurden, wiesen zunächst nur drei eine sinnvolle Homologie zu bekannten Proteinen auf. Das *oxygen-evolving enhancer protein 2 precursor* und die Cu/Zn Superoxid-Dismutase sind bekannte Cu-bindende Proteine. Beim dritten Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 7-8 kDa und einer 100 %igen Homologie zu bekannten Proteinen handelte es sich um Ubiquitin. Ubiquitin kommt in allen Eukaryoten vor und ist an mehreren proteolytischen Stoffwechselwegen beteiligt. Die Ubiquitinkonjugation von Proteinen markiert diese für den anschließenden Abbau durch eine Protease (Goldberg 1995). Es bleibt unklar, ob die auffällig starke Ubiquitin-Bande, die in den isolierten Cu-bindenden Proteinen vom Standort Eisleben gefunden wurde, mit den hohen Schwermetallkonzentrationen an diesem Standort zusammenhängen. Dass Ubiquitin Cu binden kann, ist nicht bekannt, allerdings könnte das Protein an ein Cu-bindendes Protein gekoppelt gewesen und unter den denaturierenden Bedingungen bei der Elektrophorese wieder freigesetzt worden sein. Ubiquitin und einige an der Ubiquitinkonjugation beteiligte Enzyme werden auch durch Hitzeschock induziert (Christensen et al., 1992). Die Aktivierung des proteolytischen Abbaus könnte also auch durch weitere Faktoren am Standort verursacht worden sein, wie z.B. eine Erhöhung der Temperatur des Cu-Schiefers, auf dem die Pflanzen wachsen und die vermutlich auch für das Vorkommen von Hitzeschockproteinen in den Wurzeln verantwortlich sein könnte.

Auf ein erhöhtes Vorkommen der Cu/Zn-SOD kann aus den experimentellen Daten nicht geschlossen werden. Dieses wäre allerdings zu erwarten, denn zahlreiche Autoren berichten von einer erhöhten Aktivität der Cu/Zn-SOD nach Zugabe von Cu- oder Al-Ionen (Luna et al., 1994, Gallego et al., 1996, Richards et al., 1998). Die Cu/Zn-SOD aus Hefe besitzt die Eigenschaften eines Cu-Stressproteins. Die Konzentrationen des Enzyms sowie seiner Transkripte werden bei Cu-Überschuss erhöht (Greco et al. 1990), und das ACE 1, ein Transkriptionsfaktor der für die Induktion von Metallothionein bei Cu-Stress in Hefe verantwortlich ist, induziert auch die Transkription des Cu/Zn-SOD Gens (Carri et al. 1991). Der größte Teil der Informationen über die Struktur von pflanzlichen Metallothioneinen kommt aus der DNA-Sequenzanalyse. Die einzigen Metallothioneine, die bis heute aus Pflanzen gereinigt wurden, sind das *Ec*-Protein aus Weizen (Lane et al., 1987) und einige Metallothioneine von *Arabidopsis* (Murphy et al., 1997).

Metallothionein 2 (MT2) ist ein Protein mit hochkonservierten Domänen, die in allen bis heute identifizierten MT2-Proteinen vorkommen. Durch den Einsatz eines Peptid-Antikörpers, abgeleitet aus der Proteinsequenz von *Arabidopsis* und *Brassica*, wurde versucht, homologe *Armeria*-Proteine zu detektieren, um sie anschließend zu reinigen und zu sequenzieren. Nach wiederholten Versuchen mit verschiedenen Cu-Konzentrationen und Expositionszeiten an Keimlingen sind keine Signale im erwarteten Molekulargewichtsbereich gefunden worden, während die als Kontrolle eingesetzten Proteine von *Arabidopsis thaliana* positive Signale zeigten.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die bisherigen experimentellen Ergebnisse (Cu-Affinitätssäule und Westernblot) keinen Beweis dafür liefern, dass Metallothioneine an der Bindung von Cu im Cytoplasma und somit an der Schwermetalltoleranz von *Armeria* beteiligt sind. Da der eingesetzte Peptid-Antikörper vermutlich zu unspezifisch für *Armeria* war und einige Cu-bindende Proteine im erwarteten Molekulargewichtsbereich N-terminal blockiert und damit nicht sequenzierbar waren, bleibt es anderen experimentellen Ansätzen (z.B. auf der Nukleinsäure-Ebene) vorbehalten, das Problem zu klären. Die Expression des MT1-Gens in Blättern von *Arabidopsis* beispielsweise ist normalerweise sehr niedrig und wird erst bei hohen Cu-Konzentrationen induziert (Himmelblau et al, 1998, Zhou & Goldsbrough 1994).

Hitzeschockproteine

Es gibt Hinweise darauf, dass kleine Hitzeschockproteine (15-30 kDa) nach Hitze- und Schwermetallstress gebildet werden (Neumann et al., 1994, Wollgiehn & Neumann 1995, 1999, Yeh et al., 1997). Verschiedene Autoren berichten von einer erhöhten Expression von Hitzeschockproteinen nach Schwermetallstress. In *Oryza sativa* konnte eine Erhöhung der mRNA-Konzentrationen kleiner Hitzeschockproteine nach Hitze- und Schwermetallstress beobachtet werden (Tseng et al., 1993). Mittels Westernblots konnte ein erhöhtes Vorkommen kleiner Hitzeschockproteine (HSP 17) nach Behandlung von Zellkulturen von *Lycopersicon peruvianum* und *Silene vulgaris* mit verschiedenen Schwermetallen gezeigt werden. Dies entspricht einer allgemeinen Reaktion pflanzlicher Zellen unabhängig von der Toleranz gegenüber Schwermetallen und ist außerdem ein temporärer Effekt, da schon nach kurzer Zeit die HSP nicht mehr nachzuweisen sind (Wollgiehn & Neumann 1999). In *Armeria* aus Cu-belasteten Böden konnte HSP 17 nur in den Wurzeln nachgewiesen werden, wobei unklar bleibt, ob es sich nicht um eine Induktion der HSP durch die erhöhte Temperatur des Cu-Schiefers, auf dem die Pflanzen gewachsen sind, handelt (Neumann et al., 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Blattmaterial hydroponischer Pflanzen nach Behandlung mit 100 μM CuSO_4 , 100 μM ZnCl_2 und 50 μM CdCl_2 zwischen 24 und 72 h auf HSP 17 getestet. Westernblots mit anti-HSP 17-Antikörpern zeigten unter solchen Bedingungen keine Signale, übereinstimmend mit früheren Untersuchungen dieses

Pflanzenmaterials (Neumann et al., 1995, Leopold 1993). Das Fehlen eines HSP-Nachweises unter Schwermetallstress in Blättern ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass in differenzierten Zellen die HSP-Synthese nur gering ist. Daraus kann gefolgert werden, dass kleine Hitzeschockproteine nicht von Bedeutung für die Schwermetalltoleranz von *Armeria* sind. Die Induktion von HSP nach Schwermetallbehandlung ist offenbar eine erste, sehr schnelle Reaktion pflanzlicher Zellen auf diesen Stress. Sollte die Zelle keine weitere Toleranzmechanismen besitzen, kommt es zu den bekannten Schädigungen und zum Zelltod.

4.1.3 Komplexierung von Cu in der Vakuole

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Cu in den Vakuolen von Blättern und Wurzeln offenbar durch Bildung von Chelat-Komplexen mit phenolischen Verbindungen gespeichert wird (Neumann et al., 1995, Lichtenberger & Neumann 1997).

Armeria besitzt konstitutiv hohe Gehalte an Polyphenolen. Pflanzen von den schwermetallbelasteten Standorten Eisleben und Langelsheim zeigten deutlich höhere Gehalte an löslichen Phenolen in den Blättern im Vergleich zu denen von Kontrollstandorten (Abbildung 3.16). Eine Vielzahl von biotischen und abiotischen Stressoren wird für die Induzierung des Phenylpropanoid-Stoffwechsels verantwortlich gemacht. So werden Phytoalexine, wie Stilbene, Psoralene, Cumarine und Flavonole, bei der Pathogenabwehr synthetisiert (Dixon & Paiva 1995) und die Synthese von Anthocyaninen und Flavone bei hohen Lichtintensitäten induziert (Beggs et al., 1987). Eisenmangel im Boden kann die Ausscheidung von phenolischen Säuren als Wurzelexudate verursachen, um vermutlich die Solubilität des Eisens zu erhöhen und entsprechend die Eisenaufnahme zu erleichtern (Marschner 1995). Es ist bekannt, dass Polyphenole, vor allem Tannine, in der Lage sind, Schwermetalle zu komplexieren (Slabbert 1992). Viel Aufmerksamkeit wurde auf die Wirkung von phenolischen Verbindungen als Antioxidantien gelenkt (Rice-Evans et al., 1997, Morel et al., 1998). Bereits 1974 beschrieb Ernst den Wechsel der Blütenfarbe von Pflanzen auf schwermetallreichen Böden. Dabei weist die Pflanze *Malcomia* cf. *maritima* aus einer Schwermetallhalde neben dem erhöhten Cu- und Zn-Gehalt der Petalen auch ein Wechsel der Blütenfarbe von Rosa in ein gelbliches Grün auf. Inwieweit diese Beobachtung auf eine Komplexbildung mit Anthocyaninen zurückzuführen ist, wurde nur spekuliert (Ernst 1974). Die Komplexierung von Flavonolen mit Metallen oder Al ist lange bekannt und wird beispielsweise für die Blütenfärbung verschiedener Pflanzen verantwortlich gemacht. Bei *Hydrangea macrophylla* hat die Blüte bei mangelnder Mineralstoffversorgung rote

Blütenblätter. Wenn die Versorgung mit Al und Mo jedoch ausreichend ist, nehmen die Blüten die normale blaue Färbung an (Goodwin et al., 1983).

In einigen wenigen Arbeiten wurde ein direkter Zusammenhang zwischen Schwermetallstress und dem Vorkommen phenolischer Verbindungen in höheren Pflanzen gezeigt. Verschiedene Autoren berichten nach Behandlung mit Schwermetallen (vor allem Cu-Salze) von einer Zunahme der Konzentration an Phytoalexinen (Rakwal et al., 1966, Dewick & Steele 1982, Osman & Fett 1983). Ein Konzentrationsanstieg des Cumarins Umbelliferon wurde in *Chamomilla* bereits 12 h nach Cu-Exposition beobachtet (Repcák et al., 2001). In *Nymphaea*, einer Wasserlilie mit konstitutiv hohen Polyphenolgehalten, wurde die Bindung von Cd durch polymerisierte Polyphenole *in vivo* gezeigt (Lavid et al., 2001). Der Ni-Hyperakkumulator *Psychotria douarrei* enthält einen um 12 % erhöhten Gesamtphenolgehalt gegenüber der verwandten Art *Ficus webbia* vom gleichen Standort (Davis et al., 2001).

Um nachzuprüfen, ob die höheren Gesamtgehalte an löslichen Phenolen in *Armeria* direkt mit den hohen Schwermetallkonzentrationen im Boden in Verbindung stehen und um den Einfluss weiterer abiotischer Parameter, wie Licht und Trockenheit, auszuschließen, wurden Experimente mit Keimlingen unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Bei einer Langzeit-Exposition mit Cu zeigten sich in den ersten zwei Wochen signifikant höhere Gesamtgehalte an Phenolen gegenüber der Kontrolle (Abbildung 3.18). Die Abnahme nach längeren Versuchszeiten weist darauf hin, dass das System nur für Kurzzeitexperimente geeignet ist. Der Effekt der Cu-Toxizität auf das Photosystem II in den Keimlings-Schüttelkulturen wurde mittels einer Vitalitätsbestimmung untersucht. Die Vitalitätsbestimmung (Abbildung 3.30) ergab, dass der Zeitpunkt von maximal 72 h für Kurzzeitexperimente geeignet war, während längere Kultivierungszeiten unabhängig von einer Schwermetallzugabe mit einer zunehmenden Abnahme der Vitalität der Keimlinge verbunden waren. Daraufhin wurden 72 h als Zeitpunkt für alle weiteren Kurzzeitexperimente gewählt.

Hydroponische Pflanzen, die einer Exposition mit verschiedenen Schwermetallen für 72 h unterzogen wurden, zeigten keine signifikante Erhöhung der Gesamtgehalte an löslichen Phenolen (Abbildung 3.17). Es wird angenommen, dass tolerante Pflanzen normalerweise konstitutiv hohe Gehalte schützender Metabolite enthalten, während diese in sensitiveren Pflanzen erst nach Stresseinwirkung induziert werden (Constabel & Ryan 1998).

Viele Metabolite des Sekundärstoffwechsels sind toxisch für die Pflanze (Matile 1987, Wink 1997), was eine Kompartimentierung zur Trennung der Entstehungs- und Speicherorte notwendig macht. Für einige glycosylierte Metabolite ist eine effiziente Kompartimentierung in der Vakuole nachgewiesen worden (Wink, 1997), wobei die Glycosylierung von Flavonolen deren Solubilität in Wasser vor ihrer Speicherung in der Vakuole erhöht (Vogt & Jones 2000).

Nach der HPLC-Trennung und ESI/MS-Analyse wurde die Hauptkomponente der löslichen Phenole aus *Armeria* als Myricetin-3-Glucorhamnosid, ein glycosyliertes Flavonol, identifiziert.

Um die Zusammensetzung der Flavonole zu untersuchen, die nach Schwermetallbehandlung akkumulieren, wurden hydroponische Pflanzen und Keimlinge mit verschiedenen Schwermetallen behandelt und die methanolischen Extrakte mittels HPLC analysiert. Bei der quantitativen Bestimmung der Konzentrationen an Flavonolen nach Behandlung mit verschiedenen Schwermetallen ist auffällig, dass die Zugabe von Cu verglichen mit der Kontrolle sowie den Zn- und Cd-behandelten Pflanzen eine um das zweifach erhöhte Akkumulation von Myricetin-3-Glucorhamnosid nach 72 h verursacht (Abbildung 3.26). Bei Keimlingen bewirkt die Zugabe von Cu einen transienten Anstieg der Verbindung mit einem Maximum nach 8 Stunden (Abbildung 3.27).

Mit EEL-Spektren der Cu $M_{2,3}$ -Kante konnte gezeigt werden, dass Cu in der Vakuole der Idioblasten von *Armeria* vorwiegend als zweiwertiges Ion vorkommt (Abbildung 3.16). Die Komplexbildung der Flavonole mit Cu(II)-Ionen wurde *in vitro* mittels UV-Vis Spektroskopie nachgewiesen. Die Wechselwirkung der Flavonole Rutin, Quercetin und Myricetin-3-Glucorhamnosid findet sowohl bei einem pH-Wert von 5,6, was etwa dem pH-Wert der Vakuole entspricht, wie auch bei einem pH-Wert von 7,2 statt (Abbildungen 3.24 und 3.25). Das Vorkommen von Cu(II)-Ionen ist ungewöhnlich. In Hefezellen beispielsweise, kommt Cu als Cu(I) im Cytoplasma vor, Plasmamembran-Reduktasen werden benötigt, um Cu(II) in Cu(I) zu reduzieren und die Aufnahme zu gewährleisten (Hasset & Kosman, 1995). In vielen Cu-Chaperonen wird Cu als Cu(I) in einer tetraedischen Dreifachkoordination mit drei S-Liganden gebunden (Harrison et al., 1999), und die Änderung des Cu(I)/Cu(II)-Redoxpotentials ist von fundamentaler Bedeutung für die Elektronentransportreaktionen in Cu-bindenden Proteinen. Auch die Anwesenheit von Reduktionsmitteln kann das Redoxpotential beeinflussen, so dass Cu im Cytoplasma in beiden Formen vorkommen kann.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass erhöhte Cu-Konzentrationen in den vakuolären Niederschlägen von Pflanzen aus Schwermetallstandorten mittels EDX nachgewiesen wurden, dass Pflanzen von Schwermetallstandorten höhere Gesamtphenolgehalte enthielten und dass im Laborversuch eine Erhöhung der Konzentration der Hauptkomponente der löslichen Phenole, des Myricetin-3-Glucorhamnosids nach Cu-Zugabe zu beobachten war. Cu kommt in der Vakuole vorwiegend als zweiwertiges Ion vor, was mittels EELS gezeigt werden konnte und kann unter den vakuolären pH-Bedingungen mit dem Flavonol Myricetin-3-Glucorhamnosid eine Komplexbildung eingehen. Die bisherigen experimentellen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass für Cu eine Sequestrierung in der Vakuole und die

anschließende Komplexierung mit Flavonolen den wichtigsten Mechanismus der Schwermetalltoleranz in *Armeria* darstellt.

4.2 Zink

Die Zn-Toleranz bei *Armeria* wird nicht durch eine verminderte Aufnahme des Metalls erreicht. Frühere vergleichende Untersuchungen verschiedener *Armeria*-Populationen von belasteten und nicht-belasteten Standorten haben gezeigt, dass Pflanzen aus Zn-reichen Böden eine etwa 3-4 fach höhere Zn-Konzentration in den grünen Blättern aufweisen (Köhl 1997). Für diese Pflanzen ist ebenfalls gezeigt worden, dass sie unter kontrolliertem Langzeitstress unabhängig von Population und Standort ähnlich tolerant reagieren und Zn in Blättern und Wurzeln konzentrationsabhängig akkumulieren.

Die Kompartimentierung in der Vakuole wird oft als einer der wichtigsten und grundlegendsten Mechanismen für die Schwermetalltoleranz angesehen (Vögeli-Lange & Wagner 1990, Ernst et al. 1992). In Wurzeln von *Thlaspi caerulescens*, dem am besten untersuchten Zn-Hyperakkumulator, wird Zn hauptsächlich in den Vakuolen und zu einem geringeren Teil in den Zellwänden gespeichert (Vásquez et al. 1992). In Blättern wurden die höchsten Konzentrationen in Kristallen von Vakuolen der Epidermiszellen gefunden (Vásquez et al. 1994). In *Arabidopsis halleri*, einem weiteren Zn-Hyperakkumulator, werden die höchsten Zn-Konzentrationen in den Vakuolen des Palisadenparenchyms gefunden (Küpper et al. 2000, Zhao et al. 2000).

Durch EDX-Analyse konnte Zn in geringen Konzentrationen in allen Geweben von *Armeria* nachgewiesen werden (Tabellen 3.2, 3.3 und 3.6). Eine erhöhte Akkumulation in den flavonolhaltigen Vakuolen der Idioblasten, wie im Falle von Cu, wurde allerdings nicht gefunden. Die gemessenen Konzentrationen in den vakuolären Niederschlägen waren sehr gering, unabhängig vom Standort und der entsprechenden Metallkonzentration im Boden. Experimente zum Nachweis der Komplexierung von Zn mit Myricetin-3-Glucorhamnosid zeigten, dass Zn mit dem Flavonol *in vitro* auch Komplexe bilden kann, wie für Cu beschrieben worden ist. Dass es der Situation *in vivo* nicht entspricht, könnte an einem nicht effizient funktionierenden Transport von Zn-Ionen in die Vakuole liegen. Höhere Zn-Konzentrationen wurden nur extrazellulär in Kristallen auf der Oberfläche von Salzdrüsen (Abbildung 3.3, 3.6) und Spaltöffnungen sowie als Ablagerungen auf der Zellwand (Abbildung 3.7) nachgewiesen. Intrazellulär wurden erhöhte Zn-Konzentrationen in den Zellwänden und den kleinen Vakuolen der Salzdrüsen gezeigt (Tabelle 3.3, Abbildung 3.6). Strukturelle Adaptationen, wie eine größere Anzahl an Salzdrüsen und Spaltöffnungen, kamen in Pflanzen von schwermetallbelasteten Standorten nicht vor.

Wenn also *Armeria* Zn konzentrationsabhängig akkumulieren kann, aber keine deutlichen Konzentrationsunterschiede im Gewebe zwischen belasteten und unbelasteten Pflanzen gemessen werden können, stellt sich die Frage, wo der Überschuss an Zn zu finden ist. Die mittels EDX gemessenen niedrigen Zn-Konzentrationen können auf mehrere Ursachen zurückzuführen sein:

1. Durch Präparation und Einbettung für die Elektronenmikroskopie können Zn-Ionen ausgewaschen werden, so dass die gemessenen Werte nicht der tatsächlichen Situation in der Pflanze entsprechen (Ernst & Weinert 1972, Van Stevenick & Van Stevenick 1991). Um diesem Problem entgegenzuwirken, muss eine Methode der Fixierung gewählt werden, die die Ultrastruktur möglichst erhält, ohne dass Moleküle diffundieren können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb die Gefrierfixierung mit flüssigem Propan und die anschließende Gefriersubstitution bevorzugt verwendet. Erst kürzlich wurden Versuche zur Lokalisierung von Zn in Blättern von *Armeria* mittels Autometallographie unter Verwendung von Silbersulfid durchgeführt (Heumann 2002). Dadurch sollten Zn-Ionen bereits bei der Fixierung mit H₂S gebunden und durch die spätere Bindung an Silber noch ein zusätzlicher Verstärkungseffekt erzielt werden. Der Nachteil der Methode ist, dass sie einerseits nicht spezifisch für Zn ist und andererseits es dabei zur Bildung von Artefakten kommt, die eine genaue Lokalisierung der Metalle im Gewebe erschweren oder sogar unmöglich machen. Bei der Entstehung von Metall-Silber-Kristallen werden alle verfügbaren Ionen aus der Umgebung herangezogen. Diese Kristalle tendieren dazu, sich bevorzugt an natürlichen Barrieren, wie Membranen und Zellwänden, anzureichern. Weiterhin wurde keine Akkumulation von Zn in den Blättern beobachtet, obwohl mit H₂S fixiert wurde. Eine Ausnahme stellt dabei die Akkumulation in Salzdrüsen dar. Die Tatsache, dass es in der vorliegenden Arbeit möglich war Zn sowohl in vakuolären Niederschlägen in niedrigen Konzentrationen als auch in Zellwänden nachzuweisen, bestätigt die Gefrierfixierung und anschließender Gefriersubstitution als Methode der Wahl, um einen Verlust von Zn-Ionen zumindest teilweise erfolgreich zu verhindern.
2. Die Exkretion durch Salzdrüsen, Spaltöffnungen und die cuticuläre Transpiration stellen die wichtigsten Mechanismen der Zn-Toleranz in *Armeria* dar. So könnten die Konzentrationsunterschiede zwischen den belasteten und den Kontrollblättern ausschließlich auf Ablagerungen an den Blattoberflächen, den Zellwänden der Epidermis, den Atemhöhlen und Salzdrüsen zurückzuführen sein. In früheren Untersuchungen mittels HPLC-ICP-MS- Analysen wurde ein Gesamtgehalt an Zn von ca. 60 mg/kg FG in Blättern von *Armeria* vom Standort Eisleben bestimmt. Dagegen lag die Zn-Konzentration in den cytosolischen Extrakten bei ca. 15 mg/kg FG. Der

überwiegende Anteil der aufgenommenen Zn-Ionen scheint als unlösliche Verbindungen oder in der Zellwand gebunden vorzuliegen, während 25 % in löslicher Form vorkommen (Leopold 1997). Wenn also die Vakuole nicht der Hauptspeicherort für Zn in *Armeria* ist und der Hauptanteil der Zn-Ionen in der Zellwand gebunden oder als Ablagerung im extrazellulärem Raum vorkommt, könnten die restlichen 25 % in Annäherung mit den gemessenen niedrigeren Konzentrationen korrelieren.

Um die Lokalisierung von Zn-Ionen *in vivo* zu untersuchen, wurde ein experimenteller Ansatz mittels konfokaler Laserscanmikroskopie unter Verwendung des Zn-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes Newport GreenTM durchgeführt (Abbildung 3.28, 3.29). Das Metall wurde durch die Wurzel aufgenommen (100 µM ZnCl₂-Lösung) und in Zeitabständen von 24, 48 und 72 h unter dem konfokalen Mikroskop beobachtet.

Beim Vergleich der gesamten Wurzel mit den Kontrollpflanzen ist die stärkere Fluoreszenz in den Zn-behandelten Wurzeln auffällig. Dabei ist in bestimmten Bereichen auch eine Markierung des Xylems sichtbar. Demgegenüber weisen die Kontrollen eine schwache Fluoreszenz auf, die auf die Zellwände beschränkt ist und wahrscheinlich von Ca²⁺-Ionen verursacht wird, die eine schwache Affinität zu Newport GreenTM haben. Im Lumen der Xylemgefäße konnte Zn durch EDX-Analyse nicht nachgewiesen werden. Durch X-ray absorption spectroscopy (XAS) an *Thlaspi caerulescens* wurde nachgewiesen, dass Zn im Xylemsaft hauptsächlich als freie hydratisierte Zn(II)-Ionen transportiert wird, wobei ein geringer Anteil an organischen Säuren gebunden wird (Salt et al. 1999). Wenn Zn im Xylemsaft von *Armeria* gleichfalls als hydratisiertes Zn(II)-Ion vorkommt und ein stetiger, gleichmäßiger Transport zu den Blättern erfolgt, ist die zu erwartende momentane Zn-Konzentration im Lumen sehr gering. Bei einer EDX-Messung (Punktanalyse) wird in einem kleinen Bereich von 100nm gemessen, wodurch bei den obengenannten Bedingungen mit Werten zu rechnen ist, die unter der Nachweisgrenze liegen.

Es wird allgemein angenommen, dass Schwermetalle hauptsächlich durch den Apoplasten transportiert werden. Um das Xylem zu erreichen, müssen die Metalle die mit Suberin imprägnierten Casparyschen Streifen überwinden und werden demzufolge in der jungen Wurzel vorzugsweise in den noch nicht voll ausdifferenzierten Gewebe der Wurzelspitze aufgenommen (Marschner 1995). Der größte Teil der Zn-Ionen in *Armeria*-Keimlingen wird dementsprechend an der Wurzelspitze über die Wurzelhaare aufgenommen, was durch die starke Fluoreszenz nach der Zn-Behandlung verdeutlicht wurde. Während in den Kontrollpflanzen nur die Zellwände der Wurzelhaare eine schwache Markierung aufwiesen, war die Fluoreszenzintensität in den Zn-behandelten Proben im Cytoplasma am stärksten (Abbildung 3.28 F,H).

Nach der histochemischen Autometallographie-Methode konnte Zink in den Zellwänden aber nicht im Cytoplasma der Wurzeln nachgewiesen werden, was als Beweis für den apoplastischen Transport von Zn in der Wurzel gesehen wurde (Heumann 2002). Dies steht im Widerspruch zu den hier gezeigten Ergebnissen, wobei Zn sowohl bei EDX-Analysen wie auch *in vivo* im Cytoplasma von Wurzelhaaren in höheren Konzentrationen als in der Zellwand nachgewiesen werden konnte (Tabelle 3.7, Abbildung 3.28). Allerdings kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht darauf geschlossen werden, ob die Zn-Ionen nach der Aufnahme durch die Wurzelhaare in Richtung Xylem symplastisch oder apoplastisch transportiert werden.

4.3 Silizium

Obwohl Si in Pflanzen in Konzentrationen vorkommt, die denen von Ca, Mg, S oder P gleichen oder übertreffen, wird es allgemein nicht als essentiell für Pflanzen angesehen (Epstein 1999). Arbeiten die darauf hinweisen, dass Si eine direkte oder indirekte positive Wirkung auf das Pflanzenwachstum unter hohen Konzentrationen von Metallen wie Al, Mn und Fe haben kann, wurden schon früher publiziert (Foy 1978) und wurden inzwischen durch zahlreichen weiteren Arbeiten bestätigt (Epstein 1994, 1999). So wird die Toxizität von Mn beispielsweise durch Si-Applikation reduziert (Horst & Marschner 1978) und in einigen Spezies wird die Aufnahme des Mn durch eine Zugabe von Si erniedrigt (Bowen 1972, Galvez et al., 1987, 1989)

Es sind einige Si-akkumulierende dicotyle Pflanzen sind beschrieben worden (*Minuartia verna*, *Silene vulgaris*, *Thlaspi caerulescens*, *Viola calaminaria*, *Pisum sativum*, *Cardaminopsis halleri*), in denen Si-Ablagerungen in den Zellwänden, Interzellularen und Vakuolen gefunden wurden (Neumann et al., 1997a, Bringezu et al., 1999, Neumann & zur Nieden 2001).

In Vakuolen des Blattparenchyms von *Armeria* wurden solche Si-Ablagerungen vorwiegend in den Epidermiszellen gefunden (Abbildungen 3.31 und 3.32). Durch EDX-Analyse konnte gezeigt werden, dass diese elektronentransparente Kristalle fast ausschließlich aus Si bestehen (Abbildung 3.31 F) und EEL-Spektren der Kristalle identisch mit denen von SiO₂-Standardverbindungen waren (Abbildung 3.33 A, B). Im Randbereich der Kristalle konnte Ca mittels ESI nachgewiesen werden (Abbildung 3.34 A-D). EEL-Spektren der Si-L_{2,3} Kante des Randbereichs eines Si-Kristalls stimmen mit denen eines Ca-Silikat-Standards und der entsprechenden DFT-Berechnung überein (Abbildung 3.34 E, F). Ein Teil des Si wird in *Armeria* vermutlich als löslichen Ca-Silikat in die Zellen aufgenommen. Aus dem instabilen

Ca-Silikat, entsteht in der Vakuole das stabilere SiO_2 aus dem die elektronentransparenten Kristalle bestehen (Abbildung 3.33 C). Ein solcher Mechanismus wurde schon früher für Ca-Silikat in *Minuartia verna* (Neumann et al., 1997a) und bei Zn-Silikat im Zn-Hyperakkumulator *Arabidopsis halleri* (Neuman & zur Nieden 2001) vorgeschlagen.

Die Bildung von Membranausstülpungen, in der Nähe entstehender oder vorhandener Si-Kristalle wurde in *Armeria* beobachtet (Abbildung 3.35). Diese Invaginationen werden von Plasmalemma und Tonoplast gebildet, zwischen beiden Membranen ist ein schmaler Plasmasaum eingeschlossen. Solche Vesikel werden in verschiedenen schwermetalltoleranten Pflanzen gefunden und könnten einen alternativen Mechanismus für den Transport von Si in der Vakuole darstellen (Neumann & zur Nieden 2001, Neumann & de Figueiredo 2002). Endocytose ist ein für Eukaryoten einzigartiger Prozess, bei dem aus Teilen der Plasmamembran durch Invagination neue Vesikel gebildet werden. Diese neu gebildeten Vesikel enthalten extrazelluläres Material, sowie an der Plasmamembran gebundene Moleküle und können mit der Zentralvakuole in Wechselwirkung treten (Marty 1997). Allerdings sind solche Vesikel normalerweise von einer einzigen Membran (Plasmamembran) umgeben, während die in den schwermetalltoleranten Pflanzen beobachteten Invaginationen direkt in die Zentralvakuole hineinragen und von zwei Membranen umgeben sind, dem Plasmalemma und dem Tonoplasten (Abbildung 3.35 A). Auch innerhalb der Vakuole werden solche Vesikel gefunden, wodurch die Richtung des Transports vom Apoplasten in die Vakuole bestätigt wird. Si konnte durch ESI sowohl in den Membranen wie auch innerhalb der Vesikel nachgewiesen werden (Abbildung 3.35 C). Si-akkumulierenden Zellen steht also ein Mechanismus zur Verfügung, wodurch sie größere Mengen an Si direkt in die Vakuole transportieren können, ohne das Cytoplasma passieren zu müssen. Dies stellt einen zusätzlichen, potentiellen Mechanismus der Schwermetalltoleranz dar, denn auch Schwermetalle können durch diesen alternativen Transportmechanismus in die Vakuole gelangen, wodurch toxische Schwermetallkonzentrationen im Cytoplasma verhindert werden. Dieses neue Aufnahmemechanismus gestattet außerdem die Aufnahme von kondensierten, höhermolekularen Silikaten, die nicht durch membranständige Proteine transportiert werden können.

5 Zusammenfassung

Die Verknüpfung ultrastruktureller Informationen und der räumlichen Verteilung von Cu, Zn und Si in der schwermetalltoleranten Pflanze *Armeria maritima* (Mill.) Willd. ssp. *halleri* (Wallr.) stellte den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit dar. Den dadurch gewonnenen Hinweisen auf die Bindungspartner dieser Elemente in den verschiedenen Zellkompartimenten wurde dabei nachgegangen. Die hier gezeigten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass in *Armeria* verschiedene Mechanismen für die Toleranz gegenüber einzelnen Metallen entscheidend sind.

Die Kompartimentierung von Cu-Ionen in der Vakuole stellt den Hauptmechanismus der Toleranz gegenüber diesem Metall in *Armeria* dar. Erhöhte Cu-Konzentrationen konnten in den vakuolären Niederschlägen von Pflanzen aus Schwermetallstandorten mittels EDX nachgewiesen werden. Dabei wurden in Pflanzen von Schwermetallstandorten höhere Gesamtphenolgehalte im Vergleich zu Kontrollpflanzen gemessen. Eine Erhöhung der Konzentration an Myricetin-3-Glucorhamnosid, der Hauptkomponente der löslichen Phenole wurde zusätzlich auch in Versuchspflanzen nach kontrollierter Cu-Zugabe beobachtet. Mittels EELS konnte gezeigt werden, dass Cu in der Vakuole vorwiegend als zweiwertiges Ion vorkommt und unter den vakuolären pH-Bedingungen mit dem Flavonol Myricetin-3-Glucorhamnosid *in vitro* eine Komplexbildung eingehen kann. Die Arbeit mit Freilandmaterial bringt einige Nachteile mit sich, besonders hinsichtlich der Untersuchung der phenolischen Metabolite, da eine Vielzahl von biotischen und abiotischen Stressoren für die Induzierung des Phenylpropanoid-Stoffwechsels verantwortlich gemacht wird (Dixon & Paiva 1995). Die Etablierung eines möglichst sterilen Systems für die Durchführung von Langzeitexperimenten an Ganzpflanzen wäre von Vorteil, möglicherweise unter Verwendung eines künstlichen Bodensystems, der die tatsächliche Verfügbarkeit der Metalle besser simuliert, als dies bei einer hydroponischen Kultur der Fall ist.

Hinsichtlich der Komplexierung von Cu im Cytoplasma kann aus den früheren Untersuchungen mit Pflanzen von schwermetallbelasteten Standorten (Leopold 1997) und den hier gezeigten Ergebnissen gefolgert werden, dass Phytochelatine in *Armeria* unter diesen Standortbedingungen nicht nachweisbar sind und primär an der Toleranz von *Armeria* gegenüber Cu und Zn nicht beteiligt sind. Unter Cd-Stress werden sie zwar gebildet, ob sie jedoch eine Rolle für die Cd-Toleranz spielen, kann aus den hier gezeigten Untersuchungen nicht geschlossen werden. Die durchgeführten proteinbiochemischen Untersuchungen (Cu-Affinitätssäule und Westernblot) liefern keinen Beweis dafür, dass Metallothioneine an der Bindung von Cu im Cytoplasma und somit an der Schwermetalltoleranz von *Armeria* beteiligt

sind. Da einige Cu-bindende Proteine im erwarteten Molekulargewichtsbereich N-terminal blockiert und damit nicht sequenzierbar waren, bleibt es anderen experimentellen Ansätzen (z.B. auf der Nukleinsäureebene) vorbehalten, das Problem zu klären. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass kleine Hitzeschockproteine nicht von Bedeutung für die Schwermetalltoleranz von *Armeria* sind. Die Induktion von Hitzeschockproteinen nach Schwermetallbehandlung ist offenbar eine erste, sehr schnelle Reaktion pflanzlicher Zellen auf diesen Stress. Sollte die Zelle keine weiteren Toleranzmechanismen besitzen, kommt es zu den bekannten Schädigungen und zum Zelltod.

Die Exkretion durch Salzdrüsen, Spaltöffnungen und die cuticuläre Transpiration stellen die wichtigsten Mechanismen der Zn-Toleranz in *Armeria* dar. *Armeria* kann Zn in Wurzeln und Blättern konzentrationsabhängig akkumulieren. Deutliche Konzentrationsunterschiede im Gewebe können jedoch zwischen belasteten und unbelasteten Pflanzen nicht gemessen werden. Durch EDX-Analyse konnte Zn in geringen Konzentrationen in allen Geweben von *Armeria* nachgewiesen werden. Eine erhöhte Akkumulation in den flavonolhaltigen Vakuolen der Idioblasten, wie im Falle von Cu, wurde allerdings nicht gefunden. Experimente zum Nachweis der Komplexbildung von Zn mit Myricetin-3-Glucorhamnosid zeigten, dass Zn mit dem Flavonol *in vitro* auch Komplexe bilden kann, wie für Cu beschrieben worden ist. Dass es der Situation *in vivo* nicht entspricht, könnte an einem nicht effizient funktionierenden Transport von Zn-Ionen in die Vakuole liegen.

In Vakuolen des Blattparenchyms von *Armeria* wurden Si-Ablagerungen vorwiegend in den Epidermiszellen gefunden. Durch EDX-Analyse konnte gezeigt werden, dass diese elektronentransparente Bereiche fast ausschließlich aus Si bestehen und EEL-Spektren der Bereiche identisch mit denen von SiO₂-Standardverbindungen waren. Ein Teil des Si wird in *Armeria* vermutlich als lösliches Ca-Silikat in die Zellen aufgenommen. Aus dem instabilen Ca-Silikat entsteht in der Vakuole das stabilere SiO₂ aus dem die elektronentransparenten Bereiche bestehen.

Die Bildung von Membranausstülpungen in der Nähe entstehender oder vorhandener Si-Kristalle wurde in *Armeria* beobachtet. Diese Invaginationen werden von Plasmalemma und Tonoplast gebildet, wobei ein schmaler Plasmasaum zwischen den beiden Membranen eingeschlossen ist. Solche Vesikel werden in verschiedenen schwermetalltoleranten Pflanzen gefunden und könnten einen alternativen Mechanismus für den Transport von Si in die Vakuole darstellen. Si-akkumulierenden Zellen steht also ein Mechanismus zur Verfügung, wodurch sie größere Mengen an Si direkt in die Vakuole transportieren können, ohne dass dabei das Cytoplasma passiert werden muss. Dies stellt einen zusätzlichen,

potentiellen Mechanismus der Schwermetalltoleranz dar, denn auch Schwermetalle können durch diesen alternativen Transportmechanismus in die Vakuole gelangen, wodurch toxische Schwermetallkonzentrationen im Cytoplasma verhindert werden. Dieses neue Aufnahme-mechanismus gestattet außerdem die Aufnahme von kondensierten, höhermolekularen Silikaten, die nicht durch membranständige Proteine transportiert werden können.

6. Literatur

Alfenito M.R.S., E., Goodman C.D., Buell R., Mol J., Koes R., Walbot V. (1998) Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione -S-transferases. *Plant Cell* 10: 1135-1149.

Antonovics, J., Bradshaw, A.D., Turner, R.G. (1971) Heavy metal tolerance in plants. *Adv.Ecol.Res.* 7, 1-85.

Baker, A.J.M. (1987) Metal tolerance. *New Phytol.* 106: 93-111.

Baker, A.J.M., Walker, P.L. (1989) Physiological responses of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity. *Chem. Spec. Bioavail.* 1, 7-17.

Beggs, C.J., Kuhn, K., Böcker, R., Wellmann, E. (1987) Phytochrome-induced flavonoid biosynthesis in mustard (*Sinapsis alba* L.) cotyledons: enzymic control and differential regulation of anthocyanin and quercetin formation. *Planta* 172, 121-126.

Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.

Bowen, J.E. (1972) Manganese-silicon interaction and its effect on growth of Sudangrass. *Plant Soil.* 37: 577-588.

Bradfort M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Bringezu K., Lichtenberger, O., Leopold I., Neumann D. (1999) Heavy metal tolerance of *Silene vulgaris*. *J. Plant Physiol.* 154: 536-546.

Bruns, I., Sutter, K., Menge, S., Neumann, D., Krauss, G-J. (2001) Cadmium lets increase the glutathione pool in bryophytes. *J. Plant Physiol.* 158: 79-89.

Cakmak, I., Erenoglu, B., Gulut, K.Y., Derici R., Romheld, V. (1998) Light-mediated release of phytosiderophores in wheat and barley under iron or zinc deficiency. *Plant Soil* 202: 309-315.

- Carri, M.T., Galiazzo, F., Ciriolo, M.R., Rotilio, G. (1991)** Evidence for co-regulation of Cu/Zn superoxide dismutase and metallothionein gene expression in yeast through transcriptional control by copper via the ACE 1 factor. *FEBS Lett.* 278, 263-266.
- Chardonnens A.N., Koevoets, P.L.M., Van Zanten, A., Schat, H., Verkleij, J.A.C. (1999)** Properties of enhanced tonoplast zinc transport in naturally selected zinc tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Physiol.* 120: 179-786.
- Christensen, A.H., Sharrock, R.A., Quail, P.H. (1992)** Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.* 12: 619-632.
- 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: 3325-3333.
- Clemens, S. (2001)** Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212: 475-486.
- Clemens, S., Schroeder, J.I., Degenkolb, T. (2001a)** *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. *Eur. J. Biochem.* 268: 3640-3643.
- Cobbet, C.S. (2000)** Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 211-216.
- Cobbet, C.S., Goldsbrough, P.B. (2000)** Mechanisms of metal resistance: phytochelatins and metallothioneins. In: Raskin, I., Enley, B.D. (eds.), *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. John Wiley & Sons Inc., New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: 247-269.
- Cocker, K.M., Evans, D.E., Hodson, M.J. (1998)** The amelioration of aluminium toxicity by silicon in higher plants: solution chemistry or an in planta mechanism? *Physiol. Plant.* 104: 608-614.
- Constabel, C.P., Ryan, Clarence. A. (1998)** A survey of wound- and methyl jasmonate-induced leaf polyphenol oxidase in crop plants. *Phytochemistry* 47: 507-511.
- Culotta, V.C., Klomp, L.W., Strain, J., Casareno R.L., Krembs, B., Gitlin, J.D. (1997)** The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 272: 23469-23472.

- Dameron, C.T., Reese, R.N., Mehra, R.K., Kortan, A.R., Caroll, P.J., Steigerwald, M.L., Brus, L.E., Winge, D.R. (1989)** Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites. *Nature* 338: 596-597.
- Dameron, C.T., Harrison, M.D. (1998)** Mechanism for protection against copper toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 67:1091-1097.
- Davis, M. A., Pritchard, S. G., Boyd, R. S., Prior, S. A. (2001)** Developmental and induced responses of nickel-based and organic defences of the nickel-hyperaccumulating shrub, *Psychotria douarrei*. *New Phytol.* 150: 49-58.
- De Vos, C.H.R., Vonk, M.J., Vooijs R., Schat H. (1992)** Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiol.* 98: 853-858.
- Dewick, P.M., Steele, M.J. (1982)** Biosynthesis of the phytoalexin phaseollin in *phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* 21: 1599-1603.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L. (1995)** Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J., Guerinot, M.L. (1996)** A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5624-5628.
- Ernst, W.H.O., Weinert, H. (1972)** Lokalisation von Zink in den Blättern von *Silene cucubalus* Wib. *Z. Pflanzenphysiol.* 66: 258-264.
- Ernst, W.H.O. (1974)** Schwermetallvegetation der Erde. Fischer-Verlag, Stuttgart.
- Ernst, W.H.O., Verkleij, J.A.C., Schat, H. (1992)** Metal tolerance in plants. *Acta Bot Neerl* 41: 229-248
- Epstein, E. (1994)** The anomaly of silicon in plant biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:11-17.
- Epstein, E. (1999)** Silicon. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 641-64.

- Fahey, R. C. N., G., L., Dorian, R., Kosower, E. M (1981)** Analysis of biological thiols: quantitative determination of thiols at the picomol level based upon derivatization with monobrombimanes and separation by cation-exchange chromatography. *Anal. Biochem.* 111: 357-365.
- Fox, T.C., Guerinot, M.L. (1998)** Molecular biology of cation transport in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 669-696.
- Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C. (1978)** The physiology of metal toxicity in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 29: 511-566.
- Gallego, S.M., Benavides, M.P., Tomaro, M.L. (1996)** Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci.* 121: 151-159.
- Galvez, L., Clark, R.B., Gourley, L.M., Maranville, J.W. (1987)** Silicon interaction with manganese and aluminium toxicity in Sorghum. *J. Plant Nutr.* 10: 1139-1147.
- Galvez, L., Clark, R.B., Gourley, L.M., Maranville, J.W. (1989)** Effects of silicon on mineral composition of sorghum grown with excess manganese. *J. Plant Nutr.* 12: 547-561.
- Goldberg (1995)** Functions of the proteasome: the lysis at the end of the tunnel. *Science* 268: 522-523.
- Goldsborough, P.B. (2000)** Metal tolerance in plants: the role of phytochelatins and metallothioneins. In: Terry, N., Banuelos, G. (eds.), *Phytoremediation of contaminated soil and water*. CRC Press: 221-233.
- Goodwin T.W., Mercer, E.I., (1983)** Introduction to plant Biochemistry. 2nd ed. Pergamon, Oxford.
- Greco, M.A., Hrab, D.I., Magner, W., Kosman, D.J. (1990)** Cu,Zn superoxide dismutase and copper deprivation and toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 172(1):317-325.
- Grill, E., Gekeler, W., Winnacker, E.-L., Zenk, M.H. (1986)** Homo-phytochelatins are heavy metal-binding peptides of homo-glutathione containing *Fabales*. *FEBS Lett.* 205, 47-50.

- 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.
- Grill, E., Winnacker, E.-L., Zenk, M.H. (1988a)** Occurrence of heavy metal binding phytochelatins in plants growing in a mining refuse area. *Experientia* 44, 539-540.
- Grill, E., Thumann, J., Winnacker, E.-L., Zenk, M.H. (1988b)** Induction of heavy-metal binding phytochelatins by inoculation of cell cultures in standard media. *Plant Cell Rep.* 7: 375-378.
- Gupta, S.C., Gouldsbrough, P.B. (1990)** Phytochelatin accumulation and stress tolerance in tomato cells exposed to cadmium. *Plant Cell Rep.* 9, 466-469.
- Gupta, S.C., Gouldsbrough, P.B. (1991)** Phytochelatin accumulation and cadmium tolerance in selected tomato cell lines. *Plant Physiol.* 97: 306-312.
- Ha, S.-B., Smith, A., Howden, R., Dietrich, W.M., Bugg, S., O'Connell, M.J., Goldsbrough, P.B., Cobbet, C.S. (1999)** Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* 11: 1153-1163.
- Hall, J.L. (2002)** Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53: 1-11.
- Hamer, D.H. (1986)** Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 913-951.
- Harmens, H., D. H., P. R., Bookum, W. M. T., Verkleij, J.A.C (1993a)** Increased zinc tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke is not due to increased production of phytochelatins. *Plant Physiol.* 103: 1305-1309.
- Harrison, M.D., Jones, C.E., Dameron, C.T. (1999)** Copper chaperones: function, structure and copper-binding properties. *JBIC* 4: 145-153
- Hasset, R., Kosman, D.J. (1995)** Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 270: 128-134.
- Heumann, H.-G. (2002)** Ultrastructural localization of zinc in zinc-tolerant *Armeria maritima* ssp. *halleri* by autometallography. *J. Plant Physiol.* 159: 191-203

- Himmelblau, E., Mira, H., Lin, S.J., Culotta, V.C., Penarrubia, L., Amasino, R.M. (1998)** Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 117: 1227-1234.
- Himmelblau, E., Amasino, R.M. (2000)** Delivering copper within plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 205-210.
- Hodson, M.J., Sangster, A.G. (1993)** The interaction between silicon and aluminium in *Sorghum bicolor* (L.) Moench: growth analysis and X-ray microanalysis. *Ann. Bot.* 72: 389-400.
- Hodson, M.J., Evans, D.E. (1995)** Aluminium / Silicon interactions in higher plants. *J. Exp. Bot.* 46: 161-171.
- Horst, W.J., Marschner, H. (1978)** Effect of silicon on manganese tolerance of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil* 50: 287-303.
- Howden, R., A., C. R., Goldsbrough, P. B., Cobbett, C.S. (1995a)** A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 107: 1067-1073.
- Howden, R., G., P. B., Andersen, C. R., Cobbett, C.S. (1995b)** Cadmium-sensitive, cad1 mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol.* 107: 1059-1066.
- Inohue, M., I A., Morita, M., Tohoyama, H., Joho, M., Murayama, T. (1991)** Native cadmium-metallothionein from the yeast *Sacharomyces cerevisiae*: its primary structure and function in heavy-metal resistance. *Plant Cell Physiol.* 32(4): 475-482.
- Inohue, M., Mitsumume, M., Tkoyama, H., Joho, M., Murayama, T. (1991)** Contributions of cell wall and metal-binding peptide to Cd- and Cu-tolerance in suspension-cultured cells of tomato. *Bot. Mag. Tokyo* 104: 217-229.
- Inohue, M., Ito, R., Ito, S., Sasada, N., Tohoyama, H., Joho, M. (2000)** Azuki bean cells are hypersensitive to cadmium and do not synthesize phytochelatin. *Plant Physiol* 107: 1059-1066.
- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., Buchner, J. (1993)** Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* 268: 1517-1520.
- Jones, L.H. (1978)** Mineral components of plant cell walls. *Am. J. Clin. Nutr.* 31: 94-98.

- Jennings, A.C. (1981)** The determination of dihydroxy phenolic compounds in extracts of plant tissues. *Anal. Biochem.* 118: 396-398.
- Kampfenkel, K., Kushnir, S., Babiychuk, E., Inze, D., Van Montagu, M. (1995)** Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *J. Biol. Chem.* 270:28479-28486.
- Kneer, R., Zenk, M.H (1992)** Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochemistry* 31(8): 2663-2667.
- Köhl, K.I. (1997)** Do *Armeria maritima* (Mill.) Willd. ecotypes from metalliferous soils and non-metalliferous soils differ in growth response under Zn stress? A comparison by a new artificial soil method. *J. Exp. Bot.* 48(316): 1959-1967.
- Krämer, U., Cotter-Howells, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M., Smith, J.A.C. (1996)** Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379: 635-638.
- Küpper, H., Zhao, F.J., McGrath, P. (1999)** Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.* 119: 305-311.
- Küpper, H., L., E., Zhao, F.J., McGrath, P. (2000)** Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta* 212: 75-84.
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lane, B., Kajioka, R., Kennedy, T. (1987)** The wheat-germ *E_c* protein is a zinc-containing metallothionein. *Biochem. Cell Biol.* 65: 1001-1005.
- Lavid, N., Schwartz, A., Yarden, O., Tel-Or, E. (2001)** The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). *Planta* 212: 323-331.
- Leopold, I. (1993)** Schwermetalle als chemische Stressoren in Pflanzen. Diplomarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- Leopold, I. (1997)** Charakterisierung schwermetall-bindender Komponenten in pflanzlichen Systemen durch Kopplung chromatographischer und atomspektroskopischer Analyseverfahren. Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Levitt, J. (1980)** Response of plants to environmental stress. 2ed. Academic Press, New York.
- Lichtenberger, O., Neumann, D. (1997)** Analytical electron microscopy as a powerful tool in plant cell biology: examples using electron energy loss spectroscopy and X-ray microanalysis. *Eur. J. Cell Biol.* 70.
- Lippard, S. J. (1999)**. Free copper ions in the cell? *Science* 284:748-749.
- Linstow, O. von, (1924)** Die natürliche Anreicherung der Metallsalzen und anderen anorganischen Verbindungen in den Pflanzen. *Feddes Repertor.* 31: 1-151.
- Lolkema, P.C., Donker, M.H., Schouten, A. J. , Ernst, W.H.O. (1984)** The possible role of metallothioneins in copper tolerance of *Silene cucubalus*. *Planta* 162: 174-179.
- Lolkema, P.C., Verkleij, R. (1986)** Copper tolerance in *Silene cucubalus*. *Planta* 167: 30-36.
- Luna, C.M., González, C.A., Trippi, V.S. (1994)** Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. *Plant Cell Physiol.* 35: 11-15.
- Marrs, K.A. (1996)** The functions and regulation of the glutathione-S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 127-158.
- Marschner, H. (1995)** Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.
- Marty, F. (1997)** The biogenesis of vacuoles: Insights from microscopy. In R.A. Leigh, D. Sanders, J.A. Callow (eds). *The Plant Vacuole: Advances in Botanical Research*, Vol. 25. Academic Press, London: 1-42.
- Mathys, W. (1977)** The role of malate, oxalate and mustard oil glycosides in the evolution of zinc resistance in herbage plants. *Physiol. Plant.* 40: 130-136.
- Matile, P. (1987)** The sap of plant cells. *New Phytol* 105: 1-26
- Meuwly, P., Thibault, P., Schwan, A.L., Rauser, W.E. (1995)** Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. *Plant J.* 7:391-400.

- Morel, I., Cillard, P., Cillard, J. (1998)** Flavonoid-metal interactions in biological systems in: Rice-Evans, C.A., Packer, L. (eds.). *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Murphy, A., Taiz, L. (1995)** Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. *Plant Physiol.* 109: 945-954.
- Murphy, A., Zhou, J., Goldsbrough, P. B., Taiz, L. (1997)** Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 113: 1293-1301.
- Neumann, D., Lichtenberger, O., Günther, D., Tschiersch, K., Nover, L. (1994)** Heat-shock induced heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta* 194: 360-367.
- Neumann, D., zur Nieden, U., Lichtenberger, O., Leopold, I. (1995)** How does *Armeria maritima* tolerate high heavy metal concentrations? *J. Plant Physiol.* 146: 704-717.
- Neumann, D., Lichtenberger, O., Schwieger, W., zur Nieden, U. (1997)** Silicon storage in selected dicotyledons. *Bot. Acta* 110: 282-290.
- Neumann, D., zur Nieden, U., Schwieger, W., Leopold, I., Lichtenberger, O. (1997a)** Heavy metal tolerance of *Minuartia verna*. *J. Plant Physiol.* 151: 101-108..
- Neumann, D., zur Nieden, U. (2001)** Silicon and heavy metal tolerance of higher plants. *Phytochemistry* 56: 685-692.
- Neumann, D., de Figueiredo, C. (2002)** A novel mechanism of Silicon uptake. *Protoplasma*, in press.
- Newton, G.L., Dorian, R., Fahey, R.C. (1981)** Analysis of biological thiols: derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 114: 383-387.
- Noctor, G., Arisi, A.M., Jouanin, L., Kunert, K.J., Rennenberg, H., Foyer, C.H. (1998)** Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J. Exp. Bot.* 49: 623-647.

- Nover, L., Scharf, K.D. (1984)** Synthesis, modification and structural binding of heat-shock proteins in tomato cell cultures. *Eur. J. Biochem.* 139: 303-313.
- Nover, L., Scharf, K.D. (1997)** Heat stress proteins and transcription factors. *Cell. Mol. Life Sci.* 53: 80-103.
- Osman, S.F., Fett, W.F. (1983)** Isoflavone glucoside stressmetabolites of soybean leaves. *Phytochemistry* 22: 1921-1923.
- Oven, M., Raith, K., Neubert, R.H.H., Kutchan, T.M., Zenk, M.H. (2001)** Homophytochelatins are synthesized in response to cadmium in azuki beans. *Plant Physiol.* 126: 1275-1280.
- Popov, N., Schmitt, M., Schulzek, S. Matthies, H. (1975)** Eine störungsfreie Mikromethode zur Proteinbestimmung des Proteingehaltes in Gewebehomogenaten. *Acta Biol. Med. Ger.* 34: 1441-1446.
- Pufahl, R.A., Singer, C.P., Peariso, K.L., Lin, S.-J., Schmidt, P.J., Fahrni, C.J., Cizewski Culotta, V., Penner-Hahn, J.E., O'Halloran, T.V. (1997)** Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science* 278: 853-856.
- Rakwal, R., Tamogami, S., Kodama, O. (1966)** Role of jasmonic acid as a signal molecule in copper chloride-elicited rice phytoalexin production. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60: 1046-1048.
- Rauser, W.E. (1995)** Phytochelatins and related peptides. *Plant Physiol.* 109: 1141-1149.
- Rauser, W.E., Meuwly, P. (1995)** Retention of cadmium in roots of maize seedlings. *Plant Physiol.* 109: 195-202.
- Rauser, W.E. (1999)** Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochem. Biophys.* 31: 19-48.
- Rea, P., Li, S.Z., Lu, Y.P., Drozdowicz, Y.M., Martinoia, E. (1998)** From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 727-760.

- Reeves, R.D., Baker, A.J.M. (2000)** Metal-accumulating plants. In: Raskin, I., Enley, B.D. (eds.), *Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment*. John Wiley & Sons Inc., New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: 193-230.
- Rengel, Z., Romheld, V., Marschner, H. (1998)** Uptake of zinc and iron by wheat genotypes differing in tolerance to zinc deficiency. *J. Plant Physiol.* 152: 433-438.
- Repcák, M., Imrich, J., Franeková, M. (2001)** Umbelliferone, a stress metabolite of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. *J. Plant Physiol.* 158: 1085-1087.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1997)** Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 4: 152-159.
- Richards, K.D., Schott, E.J., Sharma, Y.K., Davis, D.R., Gardner, R.C. (1998)** Aluminium induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 116: 409-418.
- Salt, D.E., Wagner, G.J. (1993)** Cadmium transport across tonoplast vesicles from oat roots. evidence for a $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiport activity. *J. Biol. Chem.* 268: 12297-12302.
- Salt, D.E., Rauser, W.E. (1995)** MgATP-dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiol.* 107: 1293-1301.
- Salt, D.E., Prince, R.C., Baker A.J.M., Raskin, I., Pickering, I.J. (1999)** Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 33: 713-717.
- Schat, H., Kalff, M.M.A. (1992)** Are phytochelatin involved in differential metal tolerance or do they merely reflect metal-imposed strain? *Plant Physiol.* 99: 1475-1480.
- Schat, H., Llugany M., Bernhard R. (2000)** Metal-specific patterns of tolerance, uptake and transport of heavy metals in hyperaccumulating and non-hyperaccumulating metallophytes. In: Terry, N., Banuelos, G. (eds.), *Phytoremediation of contaminated soil and water*. CRC Press, 171-188.
- Slabbert, N. (1992)** Complexation of condensed tannins with metal ions. In: Hemmingway, R.W. (ed.), *Plant Polyphenols*. Plenum Press, New York: 421-436.

- Spurr, A.R. (1969)** A low viscosity epoxy resin medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26: 31-43.
- Suresh, K., Subramanyam, C. (1998)** Polyphenols are involved in copper binding to cell walls of *Neurospora crassa*. *J. Inorg. Biochem.* 69: 209-215.
- Tseng, T.S., Tzeng, S.S., Yeh, C.H., Chang, F.C., Chen, Y.M., Lin, C.Y. (1993)** The heat-shock response in rice seedlings – isolation and expression of cDNAs that encode class-I low-molecular-weight heat-shock proteins. *Plant and Cell Physiol.* 34, 165-168.
- Tukendorf & Rauser (1990)** Changes in glutathione and phytochelatins in roots of maize seedlings exposed to cadmium. *Plant Sci.* 70: 155-166.
- Turner, R.G. (1970)** The subcellular distribution of zinc and copper within the roots of the metal tolerant clones of *Agrostis tenuis* Sibth. *New Phytol.* 69: 725-731.
- Van Steveninck, R.F.M., Van Steveninck, M.E. (1978)** Ion localization. In: Hall, J.L. (ed.), *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*. Elsevier, Holland: 187-234.
- Van Steveninck, R.F.M., Van Steveninck, M.E., Wells, A.J., Fernando, D.R. (1990)** Zinc tolerance and the binding of zinc as zinc phytate in *Lemna minor*. X-ray microanalytical evidence. *J. Plant Physiol.* 137: 140-146.
- Van Steveninck, R.F.M., Van Steveninck, M.E. (1991)** Microanalysis In: Hall, J.L., Hawes. C. (eds), *Electron microscopy of plant cells*. Academic Press, London: 415-455.
- Van Steveninck, R.F.M., Babare, A., Fernando, D.R., Van Steveninck, M.E. (1995)** The binding of zinc, but not cadmium, by phytic acid in roots of crop plants. In: Baluska et al., (eds.), *Structure and Function of Roots*. Kluwer Academic Publishers: 319-326.
- Vásquez, M.D., Barceló, J., Mádico, J., Hatton, P., Baker, A.J.M., Cope, G.H. (1992)** Localization of zinc and cadmium in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae), a metallophyte that can hyperaccumulate both metals. *J. Plant Physiol.* 140:350-355.
- Vásquez, M.D., Poschenrieder, C., Barceló, J., Baker, A.J.M., Hatton, P., Cope, G.H. (1994)** Compartmentation of zinc in roots and leaves of the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* J & C Presl. *Bot. Acta* 107: 243-250.

- Vásquez, M.D., Poschenrieder, C., Corrales, I., Barceló, J. (1999)** Changes in apoplastic Al during the initial growth response to Al by roots of a resistant maize variety. *Plant Physiol.* 119: 435-444.
- 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: 7110-7115.
- Vatamaniuk, O.K., Bucher, E.A., Ward, J.T., Rea, P.A. (2001)** A new pathway for heavy metal detoxification in animals: phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 276: 20817-20820.
- Verkleij, J.A.C., Schat, H. (1990)** Mechanisms of metal tolerance in higher plants. In: Shaw, A.J. (ed.), *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*. CRC Press: 179-193.
- Vierling, E. (1991)** The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 579-620.
- Vögeli-Lange, R., Wagner, G.J. (1990)** Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. Implication of a transport function for cadmium-binding peptides. *Plant Physiol.* 92: 1086-1093.
- Vogt, T., Jones, P. (2000)** Glycosyltransferases in plant natural product synthesis : characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci.* 5: 380-386.
- Wang, J., Evangelou, B.P., Vielsen, M.T., Wagner, G.J. (1992)** Computer simulated evaluation of possible mechanisms for sequestering metal ion activity in plant vacuoles. *Plant Physiol.* 99: 621-626.
- Werner, D., Roth, R. (1983)** Silica metabolism. In: Pirson, A., Zimmermann, M.H. (eds.) *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series Vol 15 B; Inorganic Plant Nutrition*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Tokyo, New York: 682-694.
- Wessel, D., Flügge, U. (1984)** A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138: 141-143.
- Williams, L.E., Pittman, J.K., Hall, J.L. (2000)** Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Bioch. Biophys. Acta* 1465: 104-126.

- Wink, M. (1997)** Compartmentation of secondary metabolites and xenobiotics in plant vacuoles. In: R.A. Leigh, D. Sanders, J.A. Callow (eds). *The Plant Vacuole: Advances in Botanical Research*, Vol. 25. Academic Press, London: 141-170.
- Wollgiehn, R., Neumann, D. (1995)** Stress response of tomato cell cultures to toxic metals and heat shock: differences and similarities. *J. Plant Physiol.* 146: 736-742.
- Wollgiehn, R., Neumann, D. (1999)** Metal stress response and tolerance of cultured cells from *Silene vulgaris* and *Lycopersicon peruvianum*: role of heat stress proteins. *J. Plant Physiol.* 154: 547-553.
- Yeh, C.H., Chang, P.F., Yeh, K.W., Lin, W.C., Chen, Y.M., Lin, C.Y. (1997)** Expression of a gene encoding a 16,9 kDa heat-shock protein, Oshsp16,9 in *Escherichia coli* enhances thermotolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10967-10972.
- Zenk, M.H. (1996)** Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene* 179: 21-30.
- Zhao, F.J; Lombi, E.; Breedon, T., McGrath, S.P. (2000)** Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Environ.* 23: 507-514.
- Zhou, J., Golgdsbrough, P.B. (1994)** Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6: 875-884.

Hiermit danke ich allen, die mich bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. D. Neumann für die Überlassung und Betreuung des Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft, die gewissenhafte Begutachtung dieser Dissertation und die freundschaftliche Unterstützung und Förderung.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei Herrn Prof. Dr. D. Scheel für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und die interessanten Diskussionen und Anregungen,

Herrn Prof. Dr. G.-J. Krauß (FB Biochemie/Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle) für die Begutachtung der Arbeit und für das produktive Arbeitsklima innerhalb des Graduiertenkollegs,

Herrn Dr. O. Lichtenberger (Max-Planck-Institut für Mikrostrukturphysik, Halle) für die Durchführung der DFT- und PM3-Rechnungen und für seine freundliche Unterstützung,

Herrn Dr. J. Schmidt für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Abteilung Naturstoffchemie),

Herrn Dr. T. Nürnberger für die Sequenzierung der Proteine,

Herrn Dr. J. Miersch (FB Biochemie/Biotechnologie) zur Bereitstellung des MT2-Antikörpers,

Herrn Prof. Dr. G. Wanner (Botanisches Institut der Universität München) für seine Bereitschaft zur Übernahme des Gutachtens,

und allen Mitarbeitern des Institutes, insbesondere denen der Arbeitsgruppe Stress- und Entwicklungsbiologie für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre. Den Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe möchte ich für das angenehme und produktive Arbeitsklima danken, insbesondere Frau Sylvia Krüger, Frau Brigitte Werner und Frau Dr. Uta zur Nieden.

Weiterhin gilt mein Dank Guido Fellbrich, Olga Lubaretz, Steffi Rau, Udo Roth, Magdalena Krzymovska und nicht zuletzt Cornelia Göbel die mir im Kampf mit der deutschen Grammatik geduldig zur Seite stand.

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet sowie die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben.

Clarice de Figueiredo

Halle / Saale, im Juni 2002

Lebenslauf

Name: Clarice de Figueiredo
Geburtsdatum: 13.08.68
Geburtsort: Mödling, Niederösterreich
Staatsangehörigkeit: brasilianische
Familienstand: ledig

Schulbildung

1975-1985: Colégio Visconde de Porto Seguro und Colégio Joana D'arc in São Paulo, Brasilien. Abschluss der zweiten Unterrichtsstufe
10/1997-09/1998 Studienkolleg für ausländische Studierende in Frankfurt am Main, Feststellungsprüfung

Studium

10/1988-03/1996: Studium der Biologie an der Technischen Hochschule Darmstadt

Diplomarbeit: „Morphologische und enzymatische Charakterisierung von *Agrobacterium tumefaciens*- induzierten Tumoren an Blättern von *Kalanchoë daigremontiana*“

Bisherige Tätigkeiten

11/1997-10/2001: DFG-Stipendium im Graduiertenkolleg „Adaptive-physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe“ und Anfertigung einer Promotionsarbeit in der Abteilung Streß- und Entwicklungsbiologie am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle/Saale unter Anleitung von Prof. Dr. D. Scheel und Dr. D. Neumann
seit 10/2001: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle