

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

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

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

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

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

Abkürzungsverzeichnis

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

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

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

Ein- und Dreibuchstaben-Code der Aminosäuren:

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