

1. Einleitung

1.1 Schwermetalle: Ein Wirkungsspektrum

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

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

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

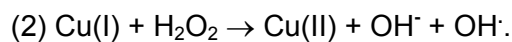
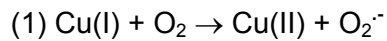
Die physiologische Bedeutung des zumeist enzymatisch gebundenen Cu liegt in seinem Redoxpotential. Zweiwertige Cu-Ionen werden leicht zu instabilen, einwertigen Ionen reduziert. Aufgrund der hohen Affinität gegenüber Sulfhydrylgruppen cysteinreicher Proteine sowie zu Karboxyl- und Phenolgruppen liegt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

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

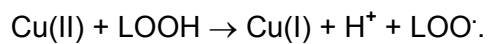
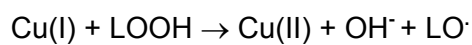
Eine Cu-Unterversorgung verursacht daher eine verringerte Lignifizierung der Zellwände und des Xylems (Lavid et al., 2001a; Marschner, 1995). Verringerte Aktivitäten des PS I und II, verbunden mit geringen Gehalten an löslichen Kohlehydraten, der gestörten Synthese von Quinonen und einer veränderten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

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

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



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



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

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

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

1.2 Mechanismen der Schwermetalltoleranz

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

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

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

1.2.1 Intrazelluläre Transportprozesse

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

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

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

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

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

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

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

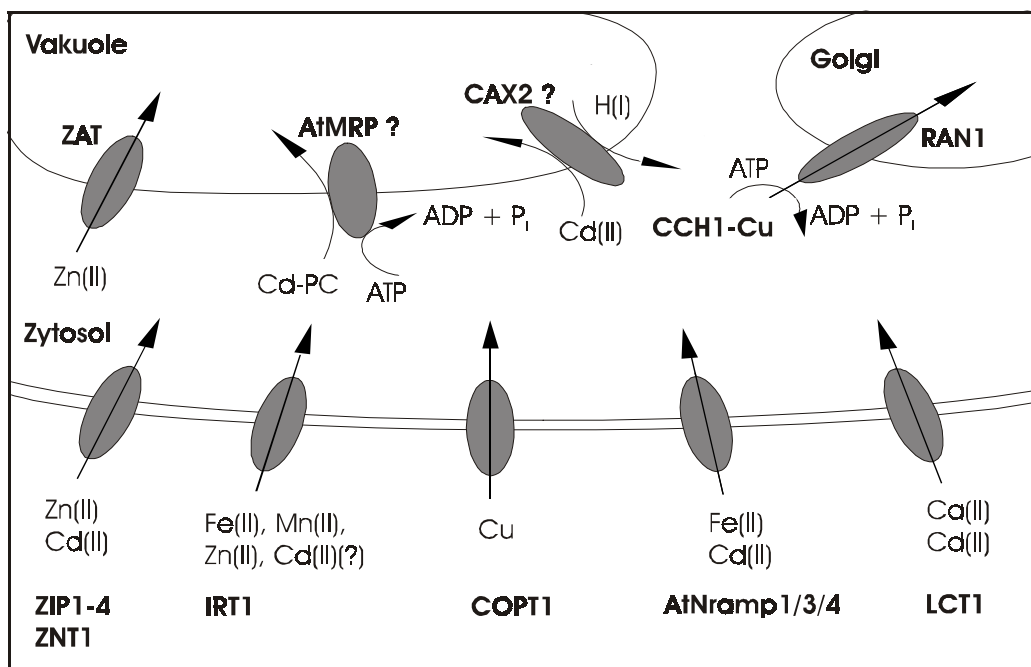


Abb. 1: Bisher identifizierte pflanzliche Metalltransporter, die in heterologen Systemen an der Aufnahme, dem Transport und der Sequestration von Metallionen beteiligt sind (Clemens, 2001).

1.2.2 Schwermetallchelatoren

1.2.2.1 Metallothioneine

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

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

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

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

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

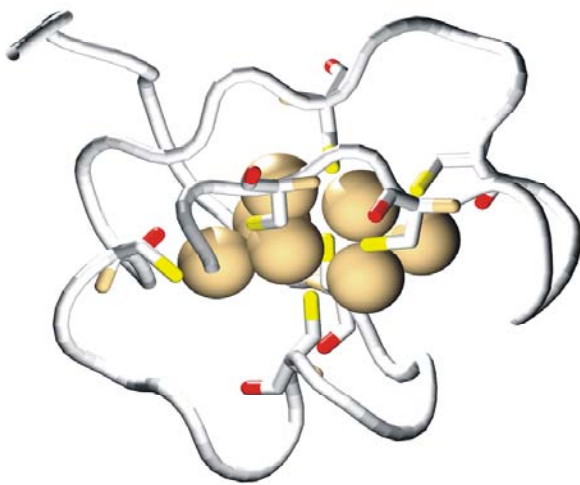


Abb. 2: NMR-Struktur des Cu(I)-Metallothionein aus *Saccharomyces cerevisiae* (Peterson et al., 1996). Dargestellt sind zwei Metall-Thiolat-Cluster mit 4 bzw. 3 Molekülen Cu(I); die Cysteinreste sind gelb gekennzeichnet.

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

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

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

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

1.2.2.2 Phytochelatine

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

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

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

1.2.2.3 Freie Aminosäuren

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

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

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

1.2.2.4 Organische Säuren

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

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

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

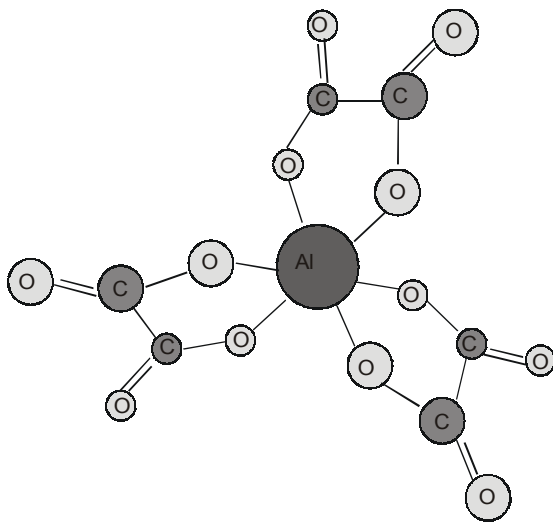


Abb. 3: Strukturmodell des Al-Oxalat-Komplexes. Al ist mit den Carboxylgruppen aus drei Molekülen Oxalsäure koordiniert (Ma, 2000).

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

1.2.2.5 Phenole

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

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

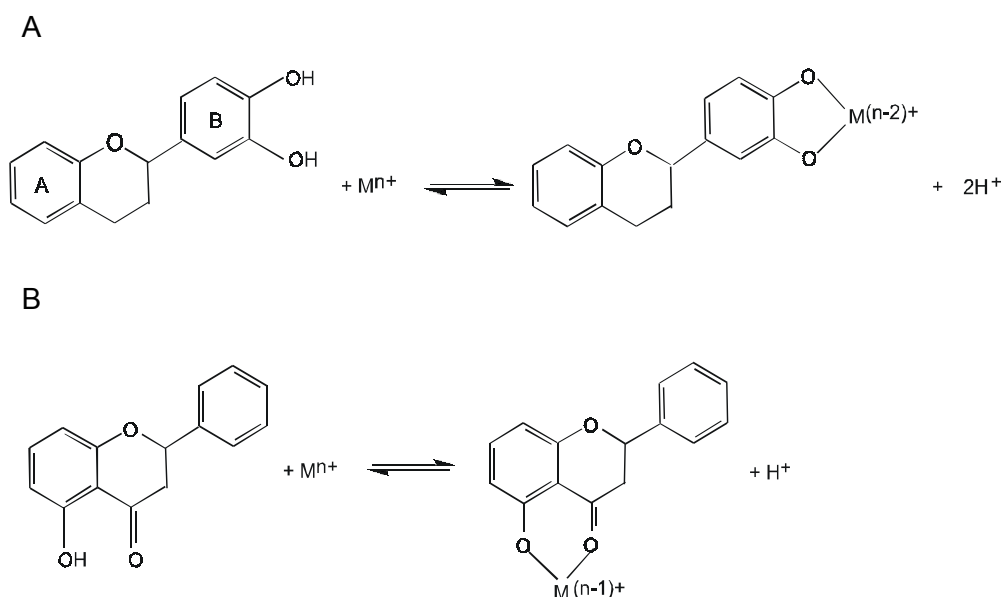


Abb. 4: Die Bildung von Metall-Flavonoid-Komplexen nach Slabbert (1992).

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

1.2.3 Die Rolle der Hitzeschockproteine und Cyclophiline

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

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

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

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

1.3 *Fontinalis antipyretica*: Im Dienste der Schwermetallstressforschung

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

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

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

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

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

1.4 Zielstellung

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

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