

4. Diskussion

4.1 Der Einfluss von Kupfer, Cadmium, Blei und Zink auf die Vitalität von *Fontinalis antipyretica*

Vitalität beschreibt allgemein die Lebensfähigkeit, die durch die Bestimmung sensibler, physiologischer Parameter charakterisiert werden kann. Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz, das sogenannte "Stethoskop der Pflanzenphysiologen", hat sich als eine Methode zur physiologischen Stressindikation etabliert, da die photochemische Aktivität des PS II als ein empfindliches System auf jede Veränderung abiotischer Umweltfaktoren reagiert (Graham und McDonald, 2001; Lichtenthaler und Miehe, 1997). Grundsätzlich ist es möglich, mit Hilfe der Chlorophyllinduktionskinetik Aussagen zur stressinduzierten Störung der Photosyntheseaktivität und zur Änderung in der Zusammensetzung photosynthetischer Pigmente zu treffen, Seneszenz und photooxidative Prozesse (Chlorophyllabbau) zu detektieren (Buschmann und Lichtenthaler, 1999; Lichtenthaler et al., 1998; Lichtenthaler und Miehe, 1997), aber auch unterschiedliche Schwermetalleffekte auf den Photosyntheseapparat zu untersuchen (Monnet et al., 2001; Ciscato et al., 1999).

Im Gegensatz zu vorangegangenen Untersuchungen, die anhand der Bestimmungen des Chlorophyllgehaltes, des Chlorophyll a/b-Verhältnisses und der Chlorophyllabbaurate keinen signifikanten Einfluss von Cd(II) auf die Vitalität von *Fontinalis antipyretica* feststellten (Bruns, 1997), zeigten die Messungen der effektiven Quantenausbeute der photochemischen Energieumwandlung im PS II (Genty-Parameter) schwermetallspezifisch konzentrations- und zeitabhängige Schädigungen des PS II und damit eine verringerte Vitalität unter vergleichbaren Versuchsbedingungen.

Die Kontrollproben wiesen keine signifikanten Schwankungen der Vitalität während des gesamten Versuches auf, so dass von optimalen Kultivierungsbedingungen ausgegangen werden kann. Die ermittelten Werte des Genty-Parameters entsprachen den Angaben in der Literatur ($F_V/F_M = 0,84$; Maxwell und Johnson, 2000). Für weitere Untersuchungen wurden äquimolare Konzentrationen der Schwermetalle in einem Bereich eingesetzt, der oberhalb des Mikronährstoffbedarfes ($> 0,5 \text{ mg/l}$) und unterhalb einer letalen Dosis lag.

Der Einfluss der Schwermetallionen auf die Vitalität hängt zwangsläufig von deren intrazellulären Aufnahme und physiologischer Wirkung ab. So trat parallel zur effektivsten intrazellulären Aufnahme infolge der Cu(II)-Belastung auch der stärkste Vitalitätsverlust auf (Abb. 7, Seite 50). Die Applikation von $100 \mu\text{M}$ Cu(II) führte zur intrazellulären

Aufnahme von 0,40 $\mu\text{mol Cu(II)/g TM}$ sowie zu einem extremen Vitalitätsverlust bis zu 52 % gegenüber der Kontrolle. Insgesamt wurde im Bereich von 25 μM -100 μM ein konzentrationsabhängiges, signifikantes Absinken der Vitalität bis zum Versuchsende (7 d) nachgewiesen. Dabei erfolgte der Vitalitätsverlust schnell, ab 50 μM bereits signifikant nach 24 h. Auffällig war auch die sichtbare Braunfärbung der Blättchen, die wiederum von der Cu(II)-Konzentration des Mediums und der Inkubationsdauer abhängig war und auf einen Chlorophyllabbau hinwies. Bestätigt wird dies durch Untersuchungen von Bech-Otschir (1995) zur Cu(II)-bedingten Verringerung des Chlorophyllgehaltes an *Fontinalis antipyretica*. Die physiologisch toxische Wirkung der Höchstkonzentration von 100 $\mu\text{M Cu(II)}$ wird ebenso an einem reduzierten Gesamt-GSH-Spiegel deutlich (Bech-Otschir, 1995).

Sommer und Winkler (1982) stellten fest, dass eine verminderte photosynthetische Nettoleistung als Reaktion auf Cu(II)-Belastungen in dem Quellmoos auftritt. Ursache dieser massiven physiologischen Schädigung könnte in der Fähigkeit des Kupfers, freie Sauerstoffradikale zu bilden, liegen. Dabei können infolge der Autooxidation reaktive Superoxidanionen oder, durch die Reduktion von Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale (Fenton-Reaktion) entstehen. Ein wichtiges Beispiel für die toxische Wirkung freier Cu(II)-Ionen auf den Photosyntheseapparat ist der Start der Lipidperoxidation durch Bildung freier Radikale aus dem stabilen Lipidhydroperoxid. Die Peroxidation der Membranlipide führt zum Verlust der Fluidität aufgrund veränderter Phospholipidzusammensetzungen sowie zu einem gestörten Ionen-Efflux u.a. bei der Plasma- und den Chloroplastenmembranen (Quartacci et al., 2001). Clijsers und van Assche (1985) beschrieben eine Hemmung des Elektronentransportes am PS II durch Schädigung der Thylakoidmembranen. Cu(II)-induzierte Effekte an Q_B , an der Q_A -Eisen-Domäne und am D1-Protein untersuchten Yruela et al. (1993). Schröder et al. (1994) wiesen an *Spinacia oleracea* nach, dass der primär hemmende Cu(II)-Effekt auf die Photosynthese an der Akzeptorseite des PS II, speziell an einer Untereinheit des Reaktionszentrums des PS II, dem D1-Protein, auftritt. Pätsikkä et al. (1998) präzisierten diese Ergebnisse und ermittelten den Effekt von Cu(II) auf die Photoinhibition des PS II an hydroponischen Kulturen von *Phaseolus vulgaris*. Es zeigte sich, dass das Gleichgewicht zwischen der Synthese und dem Abbau des D1-Proteins durch die photoinhibitorische Wirkung der Cu(II)-Ionen in Richtung D1-Abbau verschoben wurde. Es kam zu einer konzentrationsabhängigen Verringerung der aktiven PS II-Reaktionszentren, gemessen an der effektiven Quantenausbeute des PS II. Es ist wahrscheinlich, dass ähnliche, komplexe Wirkungen irreparable Schäden am PS II von *Fontinalis antipyretica* hervorrufen und damit zu einer signifikanten Vitalitätsabnahme unter Cu(II)-Belastung führen.

Weiterhin zeigten die Untersuchungen, dass auch eine Cd(II)-Belastung im Bereich von 25 μM -100 μM kontinuierlich zu einem konzentrationsabhängigen Vitalitätsverlust führt (Abb. 8, Seite 50). Zu Versuchsende wurden Vitalitäten von 72 % bis 60 % gegenüber den Kontrollen gemessen. Interessant ist, dass Cd(II) die geringste intrazelluläre Aufnahme aller getesteten Schwermetalle (maximal 0,14 $\mu\text{mol/g}$ TM), aber die zweit toxischste Wirkung aufwies. Frühere Versuche bestätigen physiologische Schäden unter Cd(II)-Belastung im Quellmoos. So ermittelten Bech-Otschir (1995) und Sutter (2000) einen verminderten Chlorophyllgehalt bzw. eine reduzierte Chlorophyllfluoreszenz als Reaktion auf Cd(II). Ein weiterer Hinweis auf toxische Cd(II)-Effekte ist der Nachweis eines konzentrations- und zeitabhängig erhöhten Glutathionpools, verursacht durch den Anstieg des reduzierten Glutathions als Schwermetallstressantwort (Bruns et al., 2001, 2000b).

Die Schädigung des Photosyntheseapparates und die damit verbundene Verringerung des Genty-Parameters durch Cd(II) wird auch von Vassiley und Manolow (1999) durch *in-vivo* Untersuchungen an *Hordeum vulgare* bestätigt und wie folgt erklärt: Die Inaktivierung der SH-Gruppen der Enzyme des Calvin-Zyklus (Krupa et al., 1993) verursacht die Anhäufung reduzierter, geschlossener Reaktionszentren im PS II und führt folglich zur Verringerung der effektiven Quantenausbeute. Damit wird der Elektronenakzeptor Q_A vor weiteren Reduktionsreaktionen geschützt und die Nachlieferung von Elektronen vermindert. Geiken et al. (1998) und Masojidek et al. (2000) stellten die Abhängigkeit der Cd(II)-Toleranz zur Stimulation des D1-Protein-Turnover an Untersuchungen von *Pisum sativum* und *Vicia faba* fest. An beiden Objekten bewirkten Cd(II)-Belastungen über 24 h die Hemmung der D1-Synthese (Franco et al., 1999). Vassilev et al. (1995) beschrieben die Cd(II)-induzierte ultrastrukturelle Umordnung der Chloroplastenstruktur und der damit verbundenen Verringerung der Fluoreszenzkinetik. Eine drastische Abnahme des Chlorophyllgehaltes und der Anzahl der Antennenkomplexe im PS II führten in *Phaseolus vulgaris*-Blättern unter Cd(II)-Einfluss zu veränderten Photosyntheseleistungen (Tziveleka et al., 1999).

Im Gegensatz zu den Cu(II)- und Cd(II)-induzierten Effekten, zeigte *Fontinalis antipyretica* keine veränderte Vitalität unter einer Zn(II)- oder Pb(II)-Belastung bis zu 100 μM (Abb. 9 und 10, Seite 51), obwohl eine intrazelluläre Schwermetallaufnahme stattfand. So wurde bei der verwendeten Höchstkonzentration von 100 μM Zn(II) über den gesamten Versuchszeitraum von sieben Tagen eine signifikante Erhöhung des intrazellulären Zn(II)-Gehaltes bis auf 0,19 $\mu\text{mol/g}$ TM nachgewiesen (Abb. 14, Seite 55). Die Ergebnisse bestätigen somit die von Sutter (2000) getroffenen Aussagen zur geringen toxischen Wirkung der Schwermetalle Pb(II) und Zn(II) hinsichtlich einer PS II-Schädigung. Auch ein

physiologischer Effekt wurde erst ab 500 μM Pb(II) bzw. Zn(II) in Form eines GSH-Anstieges ermittelt (Bruns et al., 2001).

Versuche von Monnet et al. (2001) zeigten in *Lolium perenne* eine Zn(II)-bedingte Verringerung der effektiven Quantenausbeute des PS II nur bei sehr hohen Zn(II)-Konzentrationen ab 20 mM. In diesem Zusammenhang ist auch zu beachten, dass Zink als Spurenelement Bestandteil von mehr als 70 Enzymen (Cu/Zn-SOD, Karboanhydrase) sowie Cofaktor weiterer Enzyme und somit essentiell ist. Graham und McDonald (2001) beschrieben sogar eine durch Zn(II) erhöhte PS-Aktivität bei hitzestressen *Triticum aestivum*-Pflanzen und postulierten eine Zn(II)-bedingte Thermotoleranz. Im Gegensatz dazu wies El-Sheekh (1993) an *Chlorella fusca* eine Verringerung des Elektronentransportes im PS II infolge einer 20 mM-60 mM Zn(II)-Applikation nach. Toxische Zn(II)-Konzentrationen führten bei *Phaseolus vulgaris* zur Substitution des Mn-Atoms im wasserspaltenden Enzym der Photosynthese (van Assche und Clijsters, 1986). Der damit verbundene gestörte Energietransfers in den LHC-Komplexen kann zum völligen Erliegen der Photosynthese führen (Küpper et al., 1996).

Obwohl Pb(II), im Gegensatz zu Zn(II), kein essentieller Nährstoff ist, wurde bis 100 μM kein Effekt auf das PS II über den gesamten Versuchszeitraum gemessen. Die Ursache dafür ist nicht in einer geringen intrazellulären Aufnahme zu suchen, denn es wurden bis zu 0,33 μmol Pb(II)/g TM angereichert (Abb. 13, Seite 54). So deuten diese Ergebnisse auf eine geringe zelluläre Sensitivität, speziell des PS II, gegenüber den getesteten Pb(II)-Konzentrationen hin.

In der Literatur existieren über die photosynthetische Wirkung von Pb(II) zum Teil widersprüchliche Angaben. Sarvari et al. (1999) beobachteten an hydroponischen Kulturen von *Cucumis sativus* eine nur schwach Pb(II)-induzierte Abnahme des Chlorophyllgehaltes sowie der Aktivität des PS II. Bei *Fucus vesiculosus* tritt nach Pb(II)-Belastung eine verringerte Photosyntheseaktivität auf (Nygard und Ekelund, 1999). Dagegen wiesen Danilov und Ekelund (2001) an *Chlamydomonas reinhardtii* bei einer 24-stündigen Pb(II)-Belastung erhöhte Photosyntheseraten nach und die Toxizität im Hinblick auf die photosynthetische Aktivität wird wie folgt festgelegt: Cu(II) > Cd(II). Die Schwermetalle Zn(II) und Pb(II) zeigten positive Effekte. Für *Elodea canadensis* und andere submerse Pflanzen wird die Tendenz der Schwermetallionen das Mg-Zentralatom der Chlorophyllmoleküle zu verdrängen und damit den Elektronentransport zum PS II zu unterbrechen von Küpper et al. (1996) so beschrieben:

Hg(II) > Cu(II) > Cd(II) > Zn(II) > Ni(II) > Pb(II).

Auch die Vitalitätsuntersuchungen an *Fontinalis antipyretica* belegen spezifische toxische Wirkungen der Schwermetalle auf die Aktivität des PS II und damit auf die Vitalität. Der Grad der Toxizität wird dabei sowohl vom intrazellulären Gehalt als auch von der

physiologischen Wirkung der einzelnen Schwermetalle bestimmt. Im Konzentrationsbereich von 25 μM -100 μM ergeben sich daher folgende Prioritäten:

$\text{Cu(II)} \gg \text{Cd(II)} \gg \text{Pb(II)/Zn(II)}$.

4.2 Intrazelluläre Aufnahme von Kupfer, Cadmium, Blei und Zink durch *Fontinalis antipyretica*

Aufgrund der speziellen Morphologie des Quellmooses (Kap. 2.1.1) erfolgt die Aufnahme von Nährstoffen unmittelbar über die gesamte Blattoberfläche. Somit können die der Nährlösung zugegebenen Schwermetalle an der Zellwand extrazellulär adsorbiert, in die Zellwand eingebaut und/oder intrazellulär aufgenommen werden. Wobei der letztere Prozess von physiologisch größter Bedeutung ist (Hall, 2002).

Nach Brown und Avalos (1991) sowie Brown und Beckett (1985) können Schwermetalle in austauschbarer Form mit unterschiedlicher Affinität an anionische Komponenten der Zellwand gebunden werden. Nach Shaw und Goffinet (2000) und Marschner (1995) wird die Bindung an Karboxylgruppen der Polygalacturonsäure innerhalb der Cuticula favorisiert.

Sutter (2000) zeigte für Cd(II) , Zn(II) und Pb(II) bei *Fontinalis antipyretica* eine bis zum Erreichen des Gleichgewichtes zwischen Medium und Oberfläche zeit- und konzentrationsabhängige Zellwandadsorption. Im Hinblick auf die hohe Kationenaustauschkapazität der Mooszellwände (Shaw und Goffinet, 2000; Vazquez et al., 1999) und der submersen Lebensweise von *Fontinalis antipyretica* wird gleichzeitig die Funktion der Zellwand als Ionendepot diskutiert.

Eine Schwermetallspeicherung innerhalb der Zellwand wurde von Zn bei *Agrostis tenuis* und *Minuartia verna* beschrieben. Auch Cu wird weitgehend in den Zellwänden von *Agrostis*-Arten eingelagert (Schlee, 1992). Die epidermalen Zellwände in *Silene vulgaris* speichern z.B. Cu und Zn, gebunden an Protein bzw. als Silicat (Bringezu et al., 1999). *Cardaminopsis halleri* wies hohe Konzentrationen u.a. von Cu und Zn in epidermalen und parenchymatischen Zellwänden auf (Neumann und zur Nieden, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Aufnahme von Cu(II) , Cd(II) , Pb(II) und Zn(II) in *Fontinalis antipyretica* untersucht. Bei allen getesteten Schwermetallen erfolgte dieser Prozess zeit- und konzentrationsabhängig (Abb. 11-14, Seite 52-55). Dabei verhielten sich die intrazellulären Gehalte, unter Berücksichtigung der Kontrollwerte, wie folgt: $\text{Cu(II)} > \text{Pb(II)} > \text{Zn(II)} > \text{Cd(II)}$. Es ist ersichtlich, dass bei allen drei verwendeten Konzentrationen die höchsten Gehalte bei Cu(II) und Pb(II) , nur geringe intrazelluläre

Gehalte dagegen bei Cd(II) und Zn(II), gemessen wurden. So lagen nach Applikation von 100 μM des jeweiligen Schwermetalls zu Versuchsende am siebenten Tag 0,40 $\mu\text{mol Cu(II)/g TM}$; 0,33 $\mu\text{mol Pb(II)/g TM}$; 0,19 $\mu\text{mol Zn(II)/g TM}$ und 0,14 $\mu\text{mol Cd(II)/g TM}$ vor (Anhang Tab. 3). Die Ergebnisse deuten somit auf einen effektiveren Cu(II)-Transport in das Zellinnere, im Vergleich zu Cd(II), Pb(II) und Zn(II). Insgesamt hatte eine Zunahme der Schwermetallkonzentration im Medium auch eine Erhöhung der intrazellulären Gehalte zufolge. Der Konzentrationsanstieg von 25 μM auf 100 μM im Medium führte dabei zu einer Zunahme der intrazellulären Gehalte um den Faktor 3,6 (Cu(II)); 2,3 (Cd(II)); 2,7 (Pb(II)) bzw. 2,9 (Zn(II)). Im Vergleich dazu konnte im selben Konzentrationsbereich eine 4fache, 5fache bzw. 3,5fache Erhöhung der extrazellulär gebundenen Fraktion von Cd(II), Pb(II) und Zn(II) gezeigt werden (Sutter, 2000). Es ist somit anzunehmen, dass differente Mobilitäten aufgrund eines elementspezifischen Transportmechanismus in das Zytoplasma existieren. Insgesamt bestätigen die Ergebnisse das von Sutter (2000) und Bruns et al. (2001) beobachtete Cd(II)-, Pb(II)- und Zn(II)-Aufnahmeverhalten unter ähnlichen Versuchsbedingungen in *Fontinalis antipyretica*.

Vazquez et al. (1999) wiesen am Quellmoos bei 60-minütiger Schwermetallapplikation (0 ppm-200 ppm) eine direkte Abhängigkeit zwischen dem Metallgehalt der intrazellulären Fraktion und der Konzentration des Außenmediums nach. Die intrazelluläre Aufnahme erfolgte mit folgender Priorität: Cd(II) > Zn(II) > Cu(II) > Pb(II). Allerdings spiegeln diese Ergebnisse nicht das Aufnahmeverhalten über einen längeren Zeitraum wider und können in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. In der Literatur werden weiterhin Studien zu Kinetiken der Metallaufnahme an *Fontinalis antipyretica* angegeben, die aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen aber keine signifikanten Vergleiche zu den Ergebnissen dieser Arbeit zulassen. So zeigten Lopez et al. (1994) in Freilandversuchen über 28 Tage die Aufnahme von Schwermetallen in dieser Reihenfolge: Cd(II) > Pb(II) > Cu(II) > Zn(II). Da aber nur der Schwermetallgesamtgehalt analysiert wurde, ist eine klare Aussage zum intrazellulären Gehalt nicht möglich. Samecka-Cymerman und Kempers (1999) bestätigten allgemein die bereits erwähnte Korrelation zwischen Schwermetallkonzentration des Mediums und dem Elementgehalt des Quellmooses in Feldstudien.

Die vorliegenden Untersuchungen an *Fontinalis antipyretica* zeigten weiterhin, dass nicht nur die intrazelluläre Anreicherung sondern auch die Kinetik der Aufnahme charakteristische Unterschiede zwischen den einzelnen Schwermetallen aufwies. Generell erfolgte die intrazelluläre Aufnahme von Cd(II), Zn(II) und Cu(II), im Gegensatz zur extrazellulären Adsorption, langsam aber kontinuierlich. Nur bei geringen Konzentrationen von 25 μM stagnierte die Aufnahme nach drei bzw. fünf Tagen und war

im Fall von Pb(II) unabhängig der applizierten Konzentration im Wesentlichen nach drei Tagen abgeschlossen.

Auch Cenci (2000) wies eine Sättigung der Pb(II)-Aufnahme im Quellmoos bei Freilandversuchen nach vier Tagen nach, definierte Akkumulation aber als Summe von extrazellulärer Adsorption und intrazellulärer Aufnahme. Weiterhin widerlegen diese Befunde die von Gagnon et al. (1998) erstellte Hypothese von einem bevorzugten zellulären Cd(II)-Transport aufgrund Ca(II)- und Mg(II)-ähnlicher Eigenschaften. Auch ein gegenüber Pb(II) bevorzugter intrazellulärer Transport von Cd(II) und Zn(II) konnte nicht bestätigt werden (Brown und Sidhu, 1992). Zu diesem Thema sind in der Literatur kontrovers geführte Diskussionen vorhanden:

Im Rahmen einer Studie zur Schwermetallaufnahme im Kurzzeitversuch bei *Fontinalis antipyretica* diskutierten Vazquez et al. (1999) einen affinitätsabhängigen, transmembranen Carriertransport als energieabhängiges Transportsystem (Beckett und Brown, 1984). Lopez et al. (1994) schlossen anhand ihrer Schwermetallaufnahmekinetiken an *Fontinalis antipyretica* auf einen aktiven intrazellulären Transportmechanismus der adsorbierten Ionen. Pickering und Puia (1969) beschrieben die stoffwechselabhängige Metallabsorption im Quellmoos durch zwei Mechanismen: Diffusion und aktiven Transport.

Bereits bekannte Metallmembrantransporter sind Vertreter aus der Zn(II)-regulierten ZIP-Metall-Transport-Familie wie z.B. ZNT1 und ZTP1 aus *Thlaspi caerulescens* (Pence et al., 2000; Lasat et al., 2000; Assuncao et al., 2001) oder ZIP1-4 aus *Arabidopsis thaliana* (Mäser et al., 2001; Grotz et al., 1998). Interessant dabei sind die unterschiedlichen Co-Affinitäten zu Schwermetallen wie Cd(II), Cu(II) und Pb(II), die bei entsprechendem Ionenangebot einen transmembranen Transport zur Folge haben. Als primäres Metalltransportsystem operieren die CP_{1B}-ATPasen aus *Arabidopsis thaliana* (Axelsen und Palmgren, 2001; Williams et al., 2000). Weiterhin ist in *Arabidopsis* die multispezifische Metallaufnahme über Nramp-Transporter (natural resistance-associated macrophage protein) nachgewiesen (Thomine et al., 2000).

Insgesamt deutet die mit der Zeit verringerte Aufnahmegeschwindigkeit auf einen Diffusionsmechanismus hin (2. Fick'sches Diffusionsgesetz), ebenso die Korrelation zwischen Außenkonzentration des Mediums und intrazellulärem Schwermetallgehalt. Andererseits könnten die charakteristischen Unterschiede der intrazellulären Gehalte der einzelnen Schwermetalle das Ergebnis eines passiven (affinitätsabhängigen, durch Carrier vermittelten) oder aktiven Transportes darstellen. Die Energieabhängigkeit bleibt zu untersuchen. Ebenso sollte der Nachweis homologer, bereits identifizierter membraner Transportkomponenten auf genetischer Ebene weitere Erkenntnisse zum Schwermetallaufnahmemechanismus in *Fontinalis antipyretica* liefern.

4.3 Zelluläre Lokalisation und der Bindungsstatus von Kupfer in *Fontinalis antipyretica*

Oberste Priorität in der Schwermetalltoleranz besitzen diejenigen Mechanismen, die den Organellen und dem Zytoplasma freie Metallionen in toxischen Konzentrationen entziehen. Die Regulation der Exkretion, Komplexierung, Sequestration und Kompartimentierung von Schwermetallionen ist für deren physiologische Wirksamkeit ausschlaggebend (Hall, 2002; Clemens, 2001; Salt et al., 1998). Ein stark vereinfachtes Modell einer möglichen Schwermetallresistenz von Ernst et al. (1992) in höheren Pflanzen beschreibt die Aufnahme der Metallionen über die Zellwand, Zellmembran und den zytoplasmatischen Transport durch schwermetallbindende Liganden über den Tonoplasten in die Vakuole, dem Auffangbecken für Metabolite und Toxine.

Die vorliegenden Untersuchungen lieferten Aussagen zur ultrastrukturellen Verteilung des intrazellulär aufgenommenen Cu sowie zu Cu-Bindungspartnern, widerspiegeln also die Schwermetallkomplexierung und -kompartimentierung in *Fontinalis antipyretica*.

Die Zellwände der Kontrollen zeigten in den elektronendichten Niederschlägen Elemente wie Si, Sn, P, Ca und Cu. In Cu(II)-belasteten Proben wurde eine ähnliche Zusammensetzung gemessen, jedoch traten zusätzlich Cl und Zn auf (Abb. 15, Seite 56). Ähnliche Elementzusammensetzungen der elektronendichten Niederschläge der epidermalen Zellwand sind von *Silene vulgaris* (Bringezu et al., 1999), *Minuartia verna* (Neumann et al., 1997) und *Cardaminopsis halleri* (Neumann und zur Nieden, 2000) beschrieben. In *Fontinalis antipyretica* konnte infolge der Cu(II)-Applikation keine erhöhte Cu-Konzentration in der Zellwand mittels EDX-Spektroskopie beobachtet werden. Versuche zum Cd(II)-Aufnahmeverhalten in *Fontinalis antipyretica* wiesen dagegen auf eine Depotfunktion der Zellwand hin (Bruns et al., 2001). Die Barriere- und Speicherfunktion der Zellwand spielt bei Schwermetalltoleranzmechanismen eine große Rolle (Bringezu et al., 1999; Brunold et al., 1996; Ernst et al., 1992). In Studien zu Kationenaustauschprozessen in *Sphagnum*-Arten wurde die Bindung von z.B. Ca(II) und Mg(II) an Pektinsäure (Polygalacturonsäure), die in einer Zellulosematrix eingebunden ist (Brown, 1982), nachgewiesen. In höheren Pflanzen wurden auch zellwandspezifische Zn-Silicatkomplexe bei *Minuartia verna* (Neumann et al., 1997) und *Silene vulgaris* (Bringezu et al., 1999) sowie Cu-Proteinkomplexe in *Armeria maritima* (Neumann et al., 1995) und *Silene vulgaris* (Bringezu et al., 1999) beschrieben.

In den elektronendichten Niederschlägen des Zytosols waren u.a. die Elemente Si, Cl, S und P nachweisbar (Abb. 16, Seite 56). Cu trat in der Kontrolle, aber auch in belasteten Proben, nur in Spuren auf. Die in den Aufnahmeversuchen ermittelte intrazelluläre Cu(II)-

Anreicherung führte folglich zu einer effektiven Kompartimentierung der Ionen. Es ist ersichtlich, dass die Vermeidung toxischer Metallionenkonzentrationen im Zytoplasma von essentieller Bedeutung ist. Im Rahmen von Schwermetalltoleranzuntersuchungen an *Silene vulgaris* (Bringezu et al., 1999) und *Minuartia verna* (Neumann et al., 1997) konnten ebenfalls nur Spuren bzw. keine Schwermetalle im Zytoplasma mittels EDX-Messungen nachgewiesen werden.

Das parallele Vorkommen von S und Cu im Zytoplasma von *Fontinalis antipyretica* führte zur Bestimmung des Cu-Bindungsstatus im Hinblick auf eine gemeinsame Bindung.

Die EELS-Analyse der Schwefel-L_{2,3}-Kante zeigte eine hohe Übereinstimmung des Energieverlustspektrums von Cu-GSH und dem Zytoplasma (Abb. 19/A, Seite 58). Folglich ist eine Komplexierung der Cu-Ionen an SH-Gruppen zytoplasmatischer Proteine, wie z.B. das Cu-Chaperon CCH1 (*Arabidopsis thaliana*, Cu-Bindung an der N-terminalen Domäne MXCXXC; Mira et al., 2001b), das BCB-Protein (*Arabidopsis*, blue-copper-binding protein; Cu-Bindung an der Cys/His-Domäne; Ezaki et al., 2001) oder an Metallothionein (*Arabidopsis*, Cu-Bindung an Cys-Motiven; Murphy et al., 1997) in *Fontinalis antipyretica* möglich. Die kovalente Bindung an S konnte aufgrund abweichender Spektren ausgeschlossen werden (nicht gezeigt). Frühere Untersuchungen wiesen auf die Chelatierung von Cd(II)-Ionen durch SH-Gruppen hin (Bruns et al., 2001). Da keine durch Schwermetall induzierbare Phytochelatinsynthese im Quellmoos nachzuweisen ist, könnte die Bindung über SH-Gruppen auch an den Phytochelatin-Precursor GSH erfolgen, um den Cu-Transport zur Vakuole zu gewährleisten. Untersuchungen in *Fontinalis antipyretica* zeigten eine konzentrationsabhängig induzierte GSH-Synthese durch Cd(II), Pb(II), Zn(II) und Cu(II) (Bruns et al., 2001).

Der Transport von Cd(GSH)₂-Komplexen in die Vakuole wurde in *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben (Li et al., 1997). Vögeli-Lange und Wagner (1996) postulierten die Bindung von Cd-Ionen an GSH im Zytoplasma von *Nicotiana* und den anschließenden Transport in die Vakuole.

Die EELS-Analysen des Zytoplasmas Cu(II)-belasteter *Fontinalis*-Proben sind somit ein weiteres Indiz für die von Bruns et al. (2001) beschriebene Rolle des GSH als zelluläre Strategie zur Vermeidung von Schwermetallstress in aquatischen und terrestrischen Moosen. Weiterhin wäre die Chelatierung der Cu-Ionen durch thiolreiche Metallothioneine denkbar, deren Funktion in der Schwermetallhomöostase in höheren Pflanzen von zahlreichen Autoren beschrieben wurde (Hall, 2002; Clemens, 2001; Rauser, 1999).

Die EDX-Messungen in den Plastiden von *Fontinalis antipyretica* wiesen neben Si, S und P ein deutlich erhöhtes Vorkommen an Cl und Cu, infolge der intrazellulären Cu(II)-Aufnahme, auf (Abb. 17, Seite 57). Interessant ist außerdem der hohe Cu-Anteil in den Niederschlägen der Kontroll-Plastiden. Bekannt ist, dass mehr als 50 % des Cu in den

Chloroplasten an Plastocyanin, einem "blue-protein" der Thylakoidmembran, gebunden ist (Marschner, 1995). In den von Bringezu et al. (1999) beschriebenen Experimenten zur Elementzusammensetzung in *Silene vulgaris* von Cu-belasteten Standorten zeigte das Zytoplasma ebenfalls nur Spuren von Cu, die Plastiden dagegen hohe Gehalte. Hingegen bei *Minuartia verna* vom gleichen Standort, weder im Zytoplasma noch in den Organellen, Cu in elektronendichten Niederschlägen nachzuweisen war (Neumann et al., 1997).

EDX-Spektren der vakuolären Niederschläge in *Fontinalis antipyretica* zeigten sehr klar eine Cu-Anreicherung als Folge der intrazellulären Aufnahme. Insgesamt erfolgte also die Kompartimentierung der aufgenommenen Cu-Ionen in der Vakuole. Gleichzeitig traten auch im Vergleich zu Kontrollproben erhöhte Gehalte von Si, Zn, P, Ca sowie K auf (Abb. 18, Seite 57).

Vögeli-Lange und Wagner (1990) bezeichneten die Vakuole auch als Hauptspeicherkompartiment für toxische Verbindungen. Die vakuoläre Sequestration ist einer der wichtigsten intrazellulären Mechanismen zur Vermeidung toxischer Ionenkonzentrationen (Hall, 2002; Rauser, 1999; Neumann et al., 1995). Clemens (2001) machte dies in einem allgemeinen Modell zur Regulation der pflanzlichen Homöostase deutlich.

In *Fontinalis antipyretica* war nicht nur der Nachweis einer Aufnahme des Cu in die Vakuole von Interesse, sondern auch dessen möglicher Bindungspartner. Generell ist die vakuoläre Komplexierung von Schwermetallen abhängig von der Zusammensetzung der gespeicherten Metaboliten, dem pH-Wert und der spezifischen Affinität der Metalle gegenüber den vorhandenen Liganden. Nach computersimulierten Berechnungen von Wang et al. (1991) stellt Zitrat einen wichtigen Schwermetallkomplexor in der pflanzlichen Vakuole dar. Im Ni(II)-Hyperakkumulator *Thlaspi goesingense* lokalisierten Krämer et al. (2000) den Hauptteil des intrazellulär aufgenommenen Ni in der Vakuole, gebunden an Zitrat.

In *Fontinalis antipyretica* ermittelten EELS-Analysen, im Gegensatz zum Zytosol, anorganisches Phosphat als einen Cu-Liganden (Abb. 19/B, Seite 58). Diese Form der vakuolären Schwermetallkomplexierung ist auch für Cd(II) beschrieben (Bruns et al., 2001; Sutter, 2000) und ist in höheren Pflanzen noch nicht nachgewiesen. In beiden Fällen wurde die Übereinstimmung des Standard-Phosphatspektrums mit den vakuolären Spektren und der entsprechenden quantenchemischen Kalkulation festgestellt. Die Bindung an Schwefelspezies erfolgte nicht (Sutter, 2000). Dies lässt die Annahme zu, dass innerhalb der Vakuole eine Beteiligung der von Vögeli-Lange und Wagner (1996) in *Nicotiana tabacum* nachgewiesenen Phytochelatinkomplexen oder der von Lichtenberger und Neumann (1997) in *Lycopersicon* beschriebenen CdS/Phytochelatinkomplexen in *Fontinalis antipyretica* nicht erfolgt. Das mittels AAS

ermittelte Vorkommen von Pb(II) und Cd(II) in Kontrollmaterial konnte aufgrund der hohen biologischen Varianz des Materials anhand der EDX-Spektren nicht bestätigt werden. Um zweifelsfrei das Cu-Bindungsverhalten im Zytoplasma und der Vakuole zu klären, ist zusätzlich die Prüfung einer möglichen Glutamin- bzw. Zitrat- oder Malatbindung mittels EELS-Analyse durchzuführen. Alle drei Verbindungen können als Metallchelatoren operieren und zeigten unter Cu(II)-Belastung erhöhte Konzentrationen bzw. Vorkommen (Abb. 33, Seite 82 bzw. Anhang Abb. 6).

4.4 Untersuchungen zur Schwermetallstressantwort auf Proteinebene in *Fontinalis antipyretica*

4.4.1 Charakterisierung der ein- und zweidimensionalen Proteinmuster

Proteine sind die Werkzeuge der Zelle. Ihre Regulation unterliegt einem komplexen Netzwerk, das unter anderem auch von exogenen Faktoren beeinflusst wird. Um diese Effekte darzustellen, werden Proteingemische unterschiedlicher Pflanzenproben unter definierten Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt und proteinchemisch analysiert. Es ist bekannt, dass toxische Schwermetallkonzentrationen intrazellulär zu gravierenden qualitativen und quantitativen Veränderungen in der Proteinzusammensetzung führen können. So kann ein Überschuss an Schwermetallionen zur Synthese von Stressproteinen wie z.B. Phytochelatine und Metallothioneine führen, deren Funktion u.a. in der Regulierung intrazellulärer Schwermetallionenkonzentrationen liegt (Cobbett, 2000b; Clemens, 2001; Rauser, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit lag der Schwerpunkt der proteinchemischen Untersuchungen auf der Detektion cysteinreicher und niedermolekularer Proteine in *Fontinalis antipyretica*. Metallothioneine zeichnen sich u.a. durch folgende Eigenschaften aus: Sie sind hitzestabil (McCormick et al., 1991) und können unter anderem durch Hitze induziert, durch Schwermetalle induziert oder reprimiert werden (Rauser, 1999). Wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, wurde das Material mit 50 µM Cu(II), Cd(II), Pb(II) bzw. Zn(II) belastet und die extrahierten Proteine eindimensional gelelektrophoretisch getrennt. Die SDS-Gele der verschiedenen Proben wiesen keine signifikanten Veränderungen des Proteinmusters im Molekulargewichtsbereich bis 20 kDa, im Vergleich zu Kontrollmaterial, auf (Abb. 20, Seite 60). Weiterhin wurde die Induktion zweier Proteine (ca. 45 kDa und 50 kDa) in allen kultivierten Proben festgestellt. Im Gegensatz dazu trat eine ca. 14 kDa-Bande in frischen Standortproben verstärkt auf. Dies könnte eine Reaktion auf mechanische

Beanspruchung, Verwundung oder Temperaturschwankungen im Rahmen der Probennahme und –aufbereitung auf Proteinebene darstellen. Das natürliche Vorkommen von *Fontinalis antipyretica* wird bei Wassertemperaturen von unter 15 °C beschrieben (Nebel und Philippi, 2000). Interessanterweise kam es nur nach einem Hitzeschock von 30 °C über einen Tag zu einer signifikanten Änderung des Proteinmusters, der Induktion einer ca. 30 kDa-Bande (Abb. 21, Seite 61). Auch ein dreitägiger Hitzeschock führte nicht zu einem signifikanten Proteinabbau. Dies könnte ein Hinweis auf aktive, molekulare Schutzmechanismen wie z.B. Hitzeschockproteine sein.

Das Protein der 70 kDa-Bande wird nicht temperaturabhängig exprimiert, da die Bande in allen Temperaturvarianten (10 °C-30 °C) verstärkt auftrat (Abb. 21, Seite 61). Allerdings konnte im selben Molekulargewichtsbereich eine temperaturabhängige, positive Immunreaktion mit dem anti-HSP 70-AK festgestellt werden (Abb. 30, Seite 74). In beiden Fällen werden somit unterschiedliche Proteine beschrieben.

Die Hitzefällung (McCormick, 1991) wird fast ausschließlich zur Isolierung von MT's aus tierischem Material angewandt, setzt aber aufgrund des geringen Reinigungsfaktors eine relevante Ausgangskonzentration des gesuchten Proteins voraus.

In *Fontinalis antipyretica*-Proben wurde im Ergebnis der Hitzefällung eine differente Zusammensetzung hitzestabiler Proteine in Kontrollen und Cu(II)- bzw. Cd(II)-belasteten Proben deutlich (Abb. 22, Seite 62). Die Konzentrierung der hitzestabilen Proteine erfolgte besonders im Molekulargewichtsbereich bis 14 kDa. Eine positive Immunreaktion mit dem anti-Peptid-AK Metallothionein p2 trat in dieser Proteinfraction jedoch nicht auf. Die Cu(II)-induzierte Bande G (ca. 20 kDa) sowie die Banden E und F (ca. 14 kDa und 7 kDa), die in der Kontrolle die stärkste Expression zeigten, wurden für eine weitere Charakterisierung mittels MALDI-TOF- und Micro-Sequenzanalyse ausgewählt. Dabei stellte sich ein generelles Problem der Analytik der *Fontinalis antipyretica*-Proteine dar: Die begrenzte Identifizierung von Proteinen aus nicht sequenzierten Genomen über Peptidmassenfragmente. Daher führten die MALDI-TOF-Analysen interner Peptidfragmente aufgrund geringer Homologien zu Datenbank-Sequenzen nicht zur Identifizierung der Proteine. Die Micro-Sequenzanalyse setzte, bedingt durch die N-terminale Modifizierung der oben genannten (im Übrigen aller analysierten) Proteine, einen tryptischen Verdau voraus. Dieser Schritt erwies sich als limitierende Größe, denn Schwierigkeiten bei der Spaltung sowie der Elution der Peptide aus hochvernetzten Gelen (10-20 % Tris/Tricin) führten in zahlreichen Proben zu einer schlechten Sequenzabdeckung und damit zu keiner Sequenzinformation, wie im Fall der Proteine E, F und G (Abb. 22, Seite 62). Generell wurde eine Carboxymethylierung der Proteinproben in Vorbereitung der Micro-Sequenzierung vor der eindimensionalen Trennung durchgeführt. Ziel war die Bildung von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken

cysteinreicher Proteine und damit Aggregationen und unvollständige enzymatische Verdaus zu verhindern. Insgesamt wirkte sich die Kombination von niedermolekularen Proteinen, die nur in stark vernetzten Gelen trennbar sind und die Notwendigkeit tryptischer In-Gel-Verdaus ungünstig auf den Erfolg der Micro-Sequenzierung aus.

Durch die Anwendung der zweidimensionalen Proteintrennung konnten Unterschiede im Proteinmuster der Kontroll- und schwermetallbelasteten Proben dargestellt werden. Bislang sind 2D-Studien an Bryophyten nicht bekannt. Eine mögliche Ursache könnte in dem komplexen Vorkommen sekundärer Stoffwechselmetabolite wie z.B. Phenole, Lipide und Terpene (Shaw und Goffinet, 2000; Hegnauer, 1986) liegen. Da besonders die Trennung der ersten Dimension sensitiv gegenüber Lipiden, Phenolen, Salzen u.a. reagiert, obliegt der Probenvorbereitung die größte Bedeutung. Gleichzeitig ist eine optimale Proteinkonzentration zu ermitteln, die Aggregationen während der IEF verhindert, dennoch aber Verluste, z.B. in der Äquilibrierungsphase (Lottspeich und Zorbas, 1998), kompensiert. Die Einsatzmöglichkeiten dieser Methode sind vielfältig. Ist das Detektionsziel klar definiert, können z.B. entwicklungs- oder stressspezifische Proteine ermittelt werden. So identifizierten Pardo et al. (2000) durch 2D-Gelelektrophorese Enzyme, die an der Zellwandgenese in *Saccharomyces cerevisiae* beteiligt sind. Neu charakterisierte Proteine während der Samenkeimung beschrieben Gallardo et al. (2001) in *Arabidopsis thaliana*. Die Bedeutung der Hitzeschockproteine in der Schwermetalltoleranz in *Lycopersicon peruvianum* untersuchten Neumann et al. (1994). 2D-Studien lieferten dabei Informationen zum Cd(II)-induzierten Stressproteinmuster.

An *Fontinalis antipyretica* wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese zur Detektion niedermolekularer, schwermetallinduzierter Proteine (Metallothioneine) angewendet. Um funktionelle Aussagen aufgrund veränderter Proteinmuster treffen zu können, war eine Minimierung weiterer beeinflussender Parameter grundlegend (Kap. 3.4.2).

Trotz Einsatz einer maximal auftrennbaren Proteinmenge von 100 µg war die detektierte Anzahl an Spots relativ gering und lag je nach Probe zwischen 72 und 118. Bei direkten Vergleichen mit 2D-Proteinmustern höherer Pflanzen sind die gewebespezifische Expression als auch die Unterschiede in der Probenvorbereitung und in der Proteintrennung zu beachten.

Im Molekulargewichtsbereich bis 20 kDa erfolgte die verstärkte Expression der Proteine mit folgender Priorität: Cd(II)/Zn(II) > Cu(II) > Pb(II) und die der induzierten Proteine: Cu(II) > Zn(II) > Cd(II) > Pb(II). Im Gegensatz zu 1D-Gelen wiesen die 2D-Gele signifikante Unterschiede im Proteinmuster der einzelnen Schwermetallvarianten auf. Insbesondere sind die schwermetallinduzierten Spots 111, 112 und 113 der Cu(II)-Probe (Tab. 3, Seite 66) und der Spot 104 aus der Zn(II)-Probe (Tab. 6, Seite 69) zu beachten, da sie Molekulargewichte im Bereich von 7 kDa-10 kDa aufwiesen. Die ermittelten pl-

Werte von 7,2; 6,0; und jeweils 3,9 lagen nach Yang et al. (2000) im Bereich der Metallothioneine, die eine große Variabilität in den pI-Werten zeigen. Zur Charakterisierung der genannten Proteine wurden die 2D-Blots weiterer Cu(II), Cd(II), Pb(II) und Zn(II)-Proben mit dem anti-Peptid-AK MT p2 geprüft. Eine positive Immunreaktion trat in keinem Fall auf, so dass auf eine nachfolgende Micro-Sequenzierung im Rahmen dieser Arbeit verzichtet wurde.

Insgesamt stellte die zweidimensionale Gelelektrophorese eine hochauflösende Methode zur Detektion stressinduzierter Proteine in *Fontinalis antipyretica* dar. Als limitierender Faktor zur Identifizierung und Charakterisierung der Proteine erwies sich insbesondere die MALDI-TOF-Analyse und Micro-Sequenzierung.

4.4.2 Metallothioneine, Hitzeschockproteine und Cyclophiline

Der immunologische Nachweis spezieller Proteine setzt spezifische Kreuzreaktionen des Antikörpers voraus. Detektiert werden dabei Proteine mit Antigen-homologen Epitopen.

Die Exprimierung von Proteinen, die eine mögliche Rolle in der Schwermetallstressantwort spielen können, wurde mittels anti-Peptid-AK MT p2; anti-HSP 70-AK, anti-HSP 17-AK und anti-Cyclophilin 18-AK überprüft (Kap. 2.4.7.1).

Im Gegensatz zu tierischen anti-MT-AK'ern zeigte der anti-Peptid-AK MT p2, der in einer Verdünnung von 1:50.000 eingesetzt wurde, keinerlei unspezifische Immunreaktionen. Die nach eindimensionaler Proteintrennung detektierte Doppelbande im Molekulargewichtsbereich von ca. 8 kDa wies auf zwei konstitutive Proteine hin, deren Exprimierung in Abhängigkeit von Schwermetall und Inkubationsdauer verringert wurde (Abb. 28, Seite 72). Eine physiologische Funktion dieser Proteine hinsichtlich einer Schwermetallstressantwort ist daher auszuschließen.

Die komplexen Regulationsmechanismen der Metallothioneine sind noch unklar. Rauser (1999) gibt einen Überblick zu Wechselwirkungen von Schwermetallen, Zucker, Salzen, Temperatur, Zytokine, Salicylsäure und Abscisinsäure mit pflanzlichen Metallothioneinen. Auch entwicklungspezifische Regulationen bei Fruchtreife und Blatt-Seneszenz werden aufgeführt. Aus einer Vielzahl von Studien ist ersichtlich, dass die Transkription der MT-Gene durch Cu(II), Cd(II) und Zn(II) sowohl induziert als auch gehemmt werden kann. Zum Einfluss von Pb(II) wurden keine Angaben gemacht.

Immunologische Nachweise von MT-Proteinen in pflanzlichem Gewebe sind bislang nur aus *Cucumis sativus* (Melkonyan und Nalbandyan, 1989) und aus *Arabidopsis thaliana* mittels anti-GST-MT2a/1a (Murphy et al., 1997) bekannt. Dabei ist zu beachten, dass die entsprechenden *Arabidopsis*-Proteine aus hoch gereinigten Fraktionen, nicht aber aus

dem Rohextrakt detektiert werden konnten. Die Spezifität des anti-Peptid-AK in *Fontinalis antipyretica* ermöglichte jedoch den signifikanten Nachweis einer Protein-Doppelbande aus dem Rohextrakt. Die Micro-Sequenzanalyse der entsprechenden internen Peptidfragmente ermittelte die Sequenz eines noch nicht beschriebenen Proteins (Kap. 3.4.5.2). Dieses Ergebniss bleibt mit Sequenzanalysen weiterer Peptidfragmente zu verifizieren. Auch sollte die Ursache dafür geklärt werden, warum die Proben der 2D-Blots im Gegensatz zu den 1D-Blots keine Reaktion auf den Antikörper zeigten.

Die Detektion der Hitzeschockproteine erfolgte mit den anti-HSP 70-AK bzw. anti-HSP 17-AK, die hochspezifisch mit zytosolischen HSP's reagieren. Die induzierte Synthese von Hitzeschockproteinen ist als hochkonservierte Stressreaktion auf Hitzeschock aber auch auf Schwermetalle bekannt. (Nover et al., 1989). Die Proteine der HSP-70-Familie operieren u.a. als molekulare Faltungshelfer und verhindern somit die Aggregation denaturierter Proteine bzw. katalysieren deren korrekte Rückfaltung (Goloubinoff et al., 1999). Aufgrund der essentiellen Funktion der HSP's tritt die sogenannte Hitzeschockantwort parallel auch zu Trocken-, Kälte-, Schwermetall- und oxidativen Stress auf (Schöffl et al., 1998) und wird als das zentrale Ereignis einer Stressantwort betrachtet (Schlee, 1992). Generell wird die verstärkte Expression der HSP's unter Schwermetallstress in Verbindung mit dem Schutz zellulärer Proteine und Membranen vor toxischen Schwermetalleffekten gesehen (Hall, 2002; Lee et al., 1997).

Die positive Immunreaktion des ca. 70 kDa-Proteins in *Fontinalis antipyretica* erfolgte insgesamt unter Hitzestress deutlicher als unter Schwermetallstress. Konstitutiv wurde das Protein nicht exprimiert. Die Hitzeschockversuche an *Fontinalis antipyretica* zeigten bereits nach vier Stunden bei einer Temperatur von 20 °C eine signifikante Stressantwort. Das detektierte Proteinsignal erreichte nach einem Tag in beiden Temperaturvarianten Maximalwerte (Abb. 30, Seite 74). Dieses Ergebnis widerspiegelt die klassische Induzierbarkeit der über mehrere Tage stabilen HPS's und bestätigt gleichzeitig die physiologische Temperaturamplitude des Quellmooses.

Eine Stressantwort in Form einer signifikanten Induktion trat auch bei einer 50 µM Cd(II)- und Cu(II)-Applikation bereits nach vier Stunden auf. Langzeitbelastungen führten zu signifikant verringerten, positiven Immunreaktionen. Pb(II) und Zn(II) induzierten das Proteinsignal nur sehr schwach nach einem Tag und drei Tagen (Abb. 29, Seite 73). Diese schnelle Stressantwort könnte mit dem Schutz der Proteine vor schwermetallinduzierter Denaturierung und Aggregation und den daraus resultierenden physiologischen Schäden im Zusammenhang stehen.

Die Ergebnisse werden durch Untersuchungen von Wollgiehn und Neumann (1999) zur Rolle der HSP's in der Schwermetallstressantwort in *Silene vulgaris* und *Lycopersicon peruvianum* bestätigt. Die Autoren zeigten u.a. die Akkumulation von sHSP's nach

ebenfalls vier Stunden unter Cd(II)-Stress. Eine bedeutende Rolle wurde den HSP's in der Stressantwort zum Schutz vor toxischen Effekten an Membranen und zytoplasmatischen Strukturen zugeschrieben. Elektronenmikroskopische Studien an *Lycopersicon peruvianum* wiesen zudem eine Cd(II)-induzierte Bindung von HSP 70 an Plasmamembranen nach (Neumann et al., 1994).

Im Fall des HSP 17 konnte keine positive Immunreaktion des Antikörpers mit *Fontinalis antipyretica*-Proteinen als Hitzestress- oder Schwermetallstressantwort nachgewiesen werden (Kap. 3.4.3.3). Die Proteine der sogenannten kleinen HSP-Familie (sHSP) werden nach Wehmeyer und Vierling (2000) in hohem Maße infolge Temperaturstress induziert.

Die Synthese der HSP's bedingt die Transkription neuer mRNA. Die Stabilität der Hitzeschock-mRNA korreliert in pflanzlichen Zellen mit der Bildung zytoplasmatischer Hitzeschockgranula (Nover und Neumann, 1989). Diese Granula (HSG's) sind zusammen mit den Nucleoli die hauptsächlichsten Lokalisationsorte für HSP 70 und 17 (Schlee, 1992). Die Akkumulation der Hitzeschockgranula im Zytoplasma von *Lycopersicon peruvianum* unter Cd(II)-Einfluss beschreibt auch Neumann et al. (1994).

Im Gegensatz dazu konnte das Vorkommen der HSG's in *Fontinalis antipyretica* unter Cu(II)-Belastung auf ultrastruktureller Ebene nicht nachgewiesen werden (Herr Dr. D. Neumann, persönliche Mitteilung). Demnach könnte das detektierte HSP 70-Protein an der Plasmamembran bzw. am Nucleolus gebunden sein. Hinsichtlich der möglichen Cu(II)-induzierten Membranschäden wäre die elektronenmikroskopische Überprüfung der Lokalisation des HSP 70 interessant.

Weiterhin wurden Untersuchungen zur Expression der Cyclophiline unter Schwermetallstress durchgeführt (Kap. 3.4.3.4). Diese Proteine besitzen eine Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase-Aktivität (PPIase) und kommen als Helfer-Enzyme der molekularen Chaperone konstitutiv in pflanzlichem Gewebe vor (Marivet et al., 1994). Studien an *Zea mays* und *Vicia faba* zeigten eine Hg(II)-bedingte Akkumulation von Cyclophilin-mRNA nach bereits sechs Stunden (Marivet et al., 1992). Eine ähnliche Reaktion konnte bei verschiedenen Pflanzen auf z.B. Hitze- und Salzstress oder durch Salicylsäure (Marivet et al., 1994) erreicht werden.

In *Fontinalis antipyretica* wurde keine positive Immunreaktion des anti-Peptid-AK Cyclophilin 18 im Molekulargewichtsbereich von 18 kDa unter Cu(II)-, Cd(II)-, Pb(II)- bzw. Zn(II)-Belastung bzw. in Kontrollproben nachgewiesen. Eine Aussage zur Rolle der Cyclophiline in der Schwermetallstressantwort im Quellmoos konnte demnach nicht getroffen werden. Die Identifizierung dreier PPIasen in *Digitalis lanata* (Küllertz et al., 1999) spricht für die Spezifität des Antikörpers gegenüber pflanzlichen Cyclophilinen. Dem gegenüber reagierten in *Fontinalis antipyretica* zahlreiche Proteine im

Molekulargewichtsbereich von ca. 30 kDa-55 kDa unspezifisch auf den AK, so dass eine Erhöhung der Spezifität des Ak's der Verifizierung der Ergebnisse vorausgehen sollte.

4.4.3 Schwermetallbindende Proteine

Die physiologische Funktion pflanzlicher Metallothioneine ist bislang noch unklar. Ursache dafür ist das Fehlen von Informationen über die nativen Proteine, deren Modifikationen und molekularen Wechselwirkungen. Die Schwierigkeiten der Isolation nicht degradierter Proteine basieren auf der schnellen Proteolyse der Linkerregion zwischen den cysteinreichen Domänen (Clemens, 2001; Cobbett und Goldsbrough, 2000; Rauser, 1999). In nur zwei Fällen konnten die nativen Proteine gereinigt und charakterisiert werden: das E_c-Weizen-Protein (Lane et al., 1987) und MT p1/p2 aus *Arabidopsis thaliana* (Murphy et al., 1997).

Die Isolierung schwermetallbindender, cysteinreicher Proteine im niederen Molekulargewichtsbereich aus *Fontinalis antipyretica* erfolgte daher modifiziert nach Murphy et al. (1997). Angewendet wurde sowohl die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) als auch eine kovalente Affinitätschromatographie (Kap. 2.4.8.2 und 2.4.8.3). Dabei erwies sich die jeweilige Trennung der Rohextrakte effizienter als eine Zwei-Stufen-Reinigung. Die Fraktion der schwermetallbindenden Proteine (IMAC) betrug in Kontrollproben 0,14 % und in Cu(II)-belasteten Proben 0,15 % des applizierten Gesamtproteins (Anhang Tab. 6) und entsprach den jeweiligen Ausbeuten des Murphy-Protokolls (Kap. 3.4.4.1).

Die eindimensionale Trennung der IMAC-Eluat wies im Fall der Kontrolle zwei Hauptbanden mit ca. 40 kDa und 32 kDa auf. Eine Anreicherung Cu(II)-bindender Proteine im niedermolekularen Bereich wurde nicht erzielt. Infolge der Cu(II)-Applikation induzierte, Cu(II)-bindende Proteine wurden bei ca. 14 kDa bzw. 12 kDa (Bande H und I) detektiert (Abb. 31, Seite 76). Die Micro-Sequenzanalyse der internen Fragmente von H und I war aufgrund von Sequenzüberlagerungen nicht möglich (Kap. 3.4.5.3). Wie bereits in Kapitel 4.5.1 beschrieben, verursachte die Elution bzw. die tryptische Spaltung der Proteine im hochvernetzten Gel große Schwierigkeiten, so dass die Eluate mittels LC-MS bzw. MALDI-TOF-MS analysiert wurden. Um eine Oxidation der SH-Gruppen während der tryptischen Spaltung zu verhindern, wurden die Proteine der entsprechenden LC-Fractionen mit Guanidinhydrochlorid stark denaturiert und nach anschließender Reduktion erfolgte die Alkylierung der SH-Gruppen mittels 2-Vinylpyridin. Diese Methode wurde an Metallothionein-Standards (Kap. 2.4.9.2) überprüft und erwies sich im Gegensatz zur SH-Carboxymethylierung mittels Iodacetamid als wesentlich effizienter.

Aufgrund der schnellen Polymerisierung des nicht umgesetzten 2-Vinylpyridins war jedoch die sofortige Entsalzung über eine RP-HPLC notwendig.

Erfolgreich war die LC-MS-Analyse mit anschließender Micro-Sequenzierung der internen Fragmente aus drei Proteinen der Kontrollprobe (Kap. 3.4.5.3). Ein 4,62 kDa-Protein enthielt eine cysteinreiche Sequenz (20 %), die eine 80%ige Homologie zu einem Endochitinase-Precursor aus *Pisum sativum* und weitere Homologien zu Endochitinasen aufwies. Chitinasen sind basische, in der Vakuole oder der Zellwand lokalisierte Proteine, deren Synthese elicitor- oder pathogeninduziert erfolgt. Das Molekulargewicht dieser Enzyme wird mit ca. 25 kDa-35 kDa angegeben (Kombrink et al., 1988). Aufgrund der signifikanten Homologie könnte das detektierte 4,62-kDa-Protein aus *Fontinalis antipyretica* ein proteolytisches Fragment einer Chitinase darstellen. Als Chitinase-Induktoren sind u.a. auch Phytohormone wie Ethylen, Cytokinine und Auxine beschrieben (Roby et al., 1986). Eine verringerte Expression infolge von osmotischem Stress ist in *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen (Tateishi et al., 2001).

Des Weiteren wurde von einem 11,4 kDa-Protein eine threoninreiche Sequenz (30 %) ermittelt, die eine 47%ige Homologie zur Serin/Threonin-Protein-Kinase aus *Saccharomyces cerevisiae* sowie eine 44%ige Homologie zur Aminophospholipase2 aus *Arabidopsis thaliana* zeigte. Protein-Kinasen katalysieren die Phosphorylierungen von Proteinen und regulieren dadurch indirekt deren katalytische Aktivitäten. Die Aminophospholipase2 stellt nach Sato et al. (1997) ein integrales, metallbindendes Membranprotein aus der Familie der kationischen ATPasen-Transporter dar, das am Phospholipidtransport beteiligt ist.

Das dritte Protein aus der Kontrollprobe wies ein Molekulargewicht von 29,96 kDa auf. Die Datenbankrecherche ermittelte u.a. eine 57%ige Homologie zu dem REV1-Protein aus *Saccharomyces cerevisiae*. Das REV1-Protein operiert als Desoxycytidyltransferase während der DNA-Replikation und wird als DNA-Reparaturprotein bezeichnet (Larimer et al., 1989). Pflanzliche *Saccharomyces cerevisiae*-homologe REV1-Gene sind bisher erst aus *Arabidopsis thaliana* beschrieben (Lawrence und Maher, 2001).

Da die LC-Analyse der IMAC-gereinigten, Cu(II)-belasteten Probe keine Veränderungen im Chromatogramm im Vergleich zur Kontrolle zeigte, wurde auf eine Micro-Sequenzierung der detektierten Proteine zugunsten der Analyse der Fraktionen der kovalenten Affinitätschromatographie verzichtet.

Diese Fraktionen enthielten in Kontrollproben 0,02 % und in Cu(II)-belasteten Proben 0,01 % des applizierten Gesamtproteins (Anhang Tab. 7), im Vergleich zu *Arabidopsis thaliana* eine 100fache Ausbeute. Im Ergebnis der eindimensionalen Proteintrennung wies die Kontrolle und die Cu(II)-belastete Probe jeweils ein spezifisches Proteinmuster mit fünf bzw. vier Hauptbanden im Molekulargewichtsbereich bis 34 kDa auf. Die Bande J

(12 kDa) der Kontrolle und die Cu(II)-induzierte Bande K (11 kDa) (Abb. 32, Seite 77) wurden aufgrund des Molekulargewichtes und der Qualität für eine Micro-Sequenzanalyse ausgewählt. Dabei führte der unvollständige enzymatische Verdau zu keiner Sequenzinformation (Kap. 3.4.5.3).

Die LC-MS-Analyse detektierte in der Kontrollprobe drei Proteine mit jeweils 12,71 kDa, 30,05 kDa bzw. 31,99 kDa. Im Gegensatz dazu wies die Cu(II)-belastete Probe nur ein signifikantes Proteinsignal auf (10,88 kDa) (Anhang Abb. 2 und 3). Die Recherche der mittels MS/MS analysierten Fragmentmassen führte nicht zu einer Identifizierung der Proteine. Die Micro-Sequenzierung eines internen Fragmentes des 10,88 kDa-Proteins ermittelte eine cysteinfreie Aminosäuresequenz (Kap. 3.4.5.3) mit einer 90%igen Homologie zu zwei aus genomischer Sequenz abgeleiteten *Deinococcus radiodurans*-Proteinen. Nähere Angaben zur Funktion der Proteine sind nicht bekannt. Dieses gram-positive Bakterium zeichnet sich u.a. durch eine hohe Toleranz gegenüber oxidativen Stress aus und weist eine extreme Resistenz gegenüber radioaktiver- und UV-Strahlung auf (White et al., 1999).

Insgesamt erwies sich die Analytik der isolierten Proteine als limitierender Faktor. Einerseits bedingte die N-terminale Blockierung der Proteine eine enzymatische Spaltung, andererseits begünstigt das basische Milieu die Oxidation und die Aggregation von SH-Gruppen und verhindert somit eine erfolgreiche Sequenzanalyse. Die zusätzliche quantitative Carboxymethylierung der SH-Gruppen bzw. die quantitative Alkylierung mit anschließender RP-HPLC-Entsalzung war vorbereitend durchzuführen. Die MALDI-TOF-Analysen führten in keinem Fall zur Identifizierung der Proteine über homologe Massen, ein generelles Problem in der Analytik nicht sequenzierter Genome. Erfolgreicher verlief die Kombination von LC-MS und anschließender Micro-Sequenzierung interner Peptidfragmente, die in vier Fällen Sequenzinformationen lieferte.

4.5 Kupfereffekte auf den Primär- und Sekundärstoffwechsel in *Fontinalis antipyretica*

4.5.1 Freie Aminosäuren

Aufgrund der Reaktivität von Metallen gegenüber Sauerstoff, Schwefel und Stickstoff stellen die Carboxyl- und Aminogruppen der freien Aminosäuren potentielle Liganden für Schwermetalle dar (Clemens, 2001), wie z.B. Histidin, Glutamin und Cystein (Krämer et al., 2000; Rauser, 2000; Dawson et al., 1989).

Die an *Fontinalis antipyretica* durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss von Cu(II) auf freie Aminosäuren widerspiegeln dessen toxische Wirkung auf die Aminosäurebiosynthese. Hierzu wurden die Gesamt- und Einzelgehalte der mittels GC-C-IRMS detektierbaren Aminosäuren von Kontroll- und Cu(II)-belasteten Proben zeitabhängig erfasst und ausgewertet. Eine kurzzeitige Cu(II)-Applikation von 50 µM über vier Stunden führte, im Vergleich zur Kontrolle, zu einem nicht signifikanten Anstieg des Gesamtgehaltes an freien Aminosäuren auf 123 %. Im Gegensatz dazu reagierte das Quellmoos auf eine dreitägige Cu(II)-Belastung mit einem starken Abfall des Gesamtgehaltes auf 67 % des Kontrollwertes (Anhang Tab. 9). Diesen kurzzeitigen Anstieg des Aminosäuregehaltes bestätigen Studien von Chen et al. (2000) zur Cu(II)-regulierten Prolin-Akkumulation bei *Oryza sativa*. Sie ermittelten weiterhin erhöhte Gehalte an Glutamin, Arginin und Prolin.

In *Fontinalis antipyretica* zeigte speziell Cystein eine signifikante Induktion (203 %) (Abb. 33, Seite 82). Cystein ist ein Precursor des Tripeptids GSH, das in der Lage ist, selbst Schwermetalle zu binden (Rabenstein, 1989). Es spielt eine bedeutende Rolle als Phytochelatin-Precursor in der Reaktion höherer Pflanzen auf Schwermetallstress (Cobbett, 2000b; Cobbett und Goldsbrough, 2000) sowie in der Cd(II)-Detoxifikation von Bryophyten (Bruns et al., 2001) und ist außerdem Bestandteil des antioxidativen Abwehrsystems (Noctor und Foyer, 1998; Brunold et al., 1996; Rennenberg und Brunold, 1994). Infolge einer kurzzeitigen Cu(II)-Belastung mit bis zu 50 µM zeigte *Fontinalis antipyretica* einen Anstieg des GSH-Gehaltes (Bruns et al., 2001). Die enzym- und substratregulierte GSH-Synthese setzt dabei natürlich auch eine verstärkte Synthese von Cystein voraus (Noctor et al., 1998). Die Bedeutung erhöhter Cystein Konzentrationen liegt in der Zunahme Cu(II)-bindender SH-Gruppen im Zytoplasma des Quellmooses, deren Bindungspotential mittels EELS-Analyse nachgewiesen wurde (Abb. 19/A, Seite 58).

Weiterhin wurden erhöhte Konzentrationen von Glutamin und Phenylalanin (Abb. 33, Seite 82), einem möglichen Ausgangsstoff für die Synthese sekundärer Inhaltsstoffe, gemessen. Der erhöhte Gehalt an Glutamin scheint auf eine verstärkte Stickstofffixierung zu deuten, da es ein primäres Produkt des Stickstoffmetabolismus darstellt. Allerdings stehen toxische Cu(II)-Konzentrationen im Zusammenhang mit der Induktion von Blattseneszenz (Luna et al., 1994), ausgelöst durch Lipidperoxidationen (Quartacci et al., 2001; Chen und Kao, 1999). Palatnik et al. (1999) beobachteten den Abbau der Glutaminsynthetase unter oxidativem Stress in *Triticum aestivum*.

Somit könnte die Zunahme des Glutamins in *Fontinalis antipyretica* als Transportform des Stickstoffs infolge Cu(II)-induzierter, kataboler Prozesse zu sehen sein. Der extreme Vitalitätsverlust unter der Cu(II)-Belastung bestätigt dies (Abb. 7, Seite 50). Auch eine

Anreicherung aufgrund des seneszenzinduzierten Chlorophyll-Protein-Abbaus wäre denkbar, da nekrotische Veränderungen an den Moosblättchen unter Langzeit-Cu(II)-Belastung auftraten. Signifikant verringerte Gehalte zeigten dagegen Tyrosin, Lysin, Alanin, Serin, Valin sowie Arginin und widerspiegeln damit eine verringerte Aminosäurebiosynthese sowie Vitalität in dieser Stresssituation. Auf eine Langzeitbelastung mit 50 µM Cu(II) reagierte *Fontinalis antipyretica* allgemein mit reduzierten Aminosäuregehalten, was auf eine verminderte Aminosäurebiosynthese zurückzuführen ist. Alleinige Ausnahme bildete wiederum die im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Glutaminkonzentration (174 %) (Abb. 33, Seite 82).

Untersuchungen zum Stickstoffmetabolismus, anhand von ¹⁵N-Tracer-Studien von Sutter et al. (2001), bestätigen eine verminderte Aminosäuresynthese unter Schwermetallbelastung im Quellmoos. Die Schädigung des Primärstoffwechsels, speziell durch Cu(II), wird auch durch den mittels Chlorophyllfluoreszenz gemessenen Vitalitätsverlust infolge einer verminderten photochemischen Energieumwandlung im PS II deutlich. Zahlreiche Studien über Wechselwirkungen von Schwermetallen und Aminosäuren führten zu vergleichbaren Ergebnissen:

Eine Cd(II)-induzierte Abnahme des Gesamtgehaltes an Aminosäuren durch eine konzentrationsabhängige Hemmung der Aminosäuresynthese zeigten Boussama et al. (1999) in *Zea mays*. Costa und Morel (1994) ermittelten verringerte Aminosäuregehalte unter Cd(II)-Einfluss bei *Lactuca sativa*.

Im Quellmoos wurden, trotz der im Vergleich zur Kontrolle geringeren Werte, bei einigen Aminosäuren wie z.B. Lysin, Arginin, Alanin, Serin und Valin eine nicht signifikante Konzentrationszunahme im Langzeitversuch festgestellt. Dies könnte wiederum mit Cu(II)-induzierten, katabolen Mechanismen in Verbindung stehen.

Weiterhin zeigten die Analysen mittels Aminosäure-Analyser der Firma Knauer GmbH die Cu(II)-induzierte, zeitabhängige Abnahme der Konzentrationen verschiedener Aminosäuren, z.B. Threonin, Prolin, Glycin und Histidin und bestätigten somit den toxischen Cu(II)-Einfluss auf die Aminosäurebiosynthese in *Fontinalis antipyretica*.

Zu einer Akkumulation des Stressmetaboliten Prolin kommt es nach Chen et al. (2000) dagegen in *Oryza sativa* unter Cu(II)-Einfluss (gleichbleibender Wasserhaushalt). Da eine generelle Reduzierung der von Mullins et al. (1986) beschriebenen Cu(II)-Hauptliganden Asparagin und Histidin bzw. Tyrosin nachgewiesen wurde, ist eine wesentliche Rolle in der Regulierung des Ionengleichgewichtes im Quellmoos nicht zu vermuten. Glutamin wurde dagegen als möglicher Cu(II)-Ligand induziert. Nach Dawson et al. (1989) bindet diese Aminosäure Ni(II) effektiv im neutralen pH-Wert-Bereich. Eine weitere EELS-Analyse könnte überprüfen, ob Glutamin einen zytoplasmatischen Cu(II)-Bindungspartner in *Fontinalis antipyretica* darstellt. Da diese Aminosäure aber u.a. in Konkurrenz zu

anderen potentiellen Liganden, wie z.B. SH-Gruppen schwermetallbindender Proteine, Peptide (Kap. 3.4.5.3) oder der Zitronensäure (Kap. 3.6) steht, ist deren Bedeutung eher als Seneszenzmetabolit zu sehen.

4.5.2 Organische Säuren

Organische Säuren zeichnen sich aufgrund ihrer Carboxylgruppe durch eine potentielle Metallbindefähigkeit aus und zählen neben den Phytochelatinen und Metallothioneinen zu den wichtigsten pflanzlichen Chelatoren (Clemens, 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte das Vorkommen von Oxal-, Zitronen- und Äpfelsäure in *Fontinalis antipyretica* mittels ESI-MS bzw. GC-MS-Analyse nachgewiesen werden (Abb. 36, Seite 86). Konkrete Angaben zu Säuren im Quellmoos sind in der Literatur noch nicht bekannt. Auch aufgrund der außerordentlichen Variabilität der Inhaltsstoffe verschiedener Gattungen, ist die Übertragung bereits bekannter phytochemischer Daten auf *Fontinalis antipyretica* kaum zulässig. Asakawa (1982), Walland und Kinzel (1966) bestätigten das allgemeine Vorkommen von Äpfel- und Zitronensäure in Bryophyten. Weiterhin wurden z.B. Bernstein-, Shikimi- und Fumarsäure beschrieben (Hegnauer, 1986).

Die Untersuchungen zum zeitabhängigen Cu(II)-Einfluss auf organische Säuren zeigten eine Reaktion nach dreitägiger, nicht aber nach vierstündiger Belastung mit 50 μM (Anhang Abb. 5 und 6). Die Ergebnisse weisen auf eine Cu(II)-induzierte Synthese der identifizierten Verbindungen Zitronensäure >> Äpfelsäure hin. Die mittels GC-MS in den Proben nachgewiesenen Anteile von Fremdverbindungen ließen keine Quantifizierung der Säurekonzentrationen zu.

Inwieweit die mögliche Metallchelatierung zur Regulierung der intrazellulären Schwermetallkonzentration in *Fontinalis antipyretica* beiträgt, bleibt zu untersuchen. Dabei könnte die Existenz einer möglichen Cu-Zitrat-Bindung bzw. Cu-Malat-Bindung mittels EELS-Analysen bestimmt werden.

Die Zitronensäure kann sowohl als zytosolischer Transporter zur Vakuole als auch als Ligand zur Sequestration von Schwermetallen operieren. Die Transportfunktion ist u.a. durch thermodynamische Computersimulationen von Wang et al. (1991; 1992) und bei verschiedenen Futterpflanzen von Wagner (1993) an Zn(II) und Cd(II) beschrieben.

Eine vakuoläre Chelatierung an Zitronensäure wurde bei Cd(II) (Wang et al., 1991) und Zn(II) in *Nicotiana tabacum* (Krotz et al., 1989) und Ni(II) in *Serbertia acuminata* (Sagner et al., 1998; Godbold et al., 1984) nachgewiesen. Rauser (1999) und

Wang et al. (1991) favorisieren generell Zitrat-Schwermetallkomplexe bei einem pH-Wert zwischen 4 und 7. Die zytosolische Inaktivierung freier Zn(II)- und Ni(II)-Ionen durch Malat- und Zitratkomplexe ist als Teil des Schwermetalltoleranzmechanismus bei *Hybanthus floribundus* und *Alyssum*-Arten beschrieben (Schlee, 1992; Lee et al., 1977). Mullins et al. (1986) wiesen Cu(II)-Zitratkomplexe im Xylemsaft von *Lycopersicon* und *Glycine max* nach. Erhöhte Zn(II)-Konzentrationen führten infolge der Affinitätskonkurrenz jedoch zur Bildung von Cu(II)-Histidinkomplexen. Oxalsäure scheint als Ligand nur in Pflanzen mit einem natürlich hohen Oxalatgehalt eine Rolle zu spielen (Rauser, 1999). Da MSTFA-Derivate dieser Verbindung in den Proben nicht nachgewiesen wurden, ist eine wesentliche Rolle der Oxalsäure zur Regulation der Schwermetallkonzentration in *Fontinalis antipyretica* auszuschließen.

Welche organische Säure in der intrazellulären und vakuolären Metallkomplexierung dominiert, hängt letztlich vom pH-Wert des Milieus, von der artspezifischen Zusammensetzung der organischen Säuren sowie vom intrazellulären Schwermetallangebot und dem Vorkommen zusätzlicher Liganden, wie z.B. schwermetallbindende Peptide und Proteine, ab. Prinzipiell wäre in diesem Zusammenhang die Beteiligung der Zitronen- und Äpfelsäure an der Komplexierung des intrazellulär aufgenommenen Cu(II) (0,17 $\mu\text{mol/g}$ TM; Abb. 11, Seite 52) in *Fontinalis antipyretica* denkbar. Wie bereits oben erwähnt, könnte mittels EELS eine mögliche Cu-Bindung untersucht werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten EELS-Untersuchungen zu möglichen Cu-Bindungspartnern wiesen bisher auf eine zytosolische Chelatierung an SH-Gruppen bzw. eine vakuoläre Bindung an anorganisches Phosphat hin (Abb. 19, Seite 58).

4.5.3 Phenolische Verbindungen

Phenole, insbesondere die Gruppe der Flavonoide, spielen als Anti-Oxidantien im Schutz vor freien Radikalen eine bedeutende Rolle. Dies beruht auf ihrer reduzierenden Wirkung als Wasserstoff- oder Elektronendonator und/oder der Wirkung als Metallchelator (Brown et al., 1998; Rice-Evans et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde der zeitabhängige Einfluss von Cu(II) auf den Gesamtphenolgehalt von *Fontinalis antipyretica* gezeigt sowie in ersten Untersuchungen die extrahierten phenolischen Verbindungen charakterisiert.

Sowohl im vierstündigen Kurzzeitversuch als auch im dreitägigen Langzeitversuch wurde keine signifikante Änderung im Gesamtgehalt, ca. 0,3 mg/g FM, durch 50 μM Cu(II)

nachgewiesen (Abb. 37, Seite 88). Höhere Pflanzen enthalten generell höhere Gehalte an Phenolen, so wurde in *Lycopersicon esculentum* 3,1 mg Phenol/g FM (Rivero et al., 2001) und in *Nymphaea*-Blättern sogar 113 mg Phenol/g FM (Lavid et al., 2001b) gemessen. Beide Autoren verwandten jedoch unterschiedliche Referenzstandards bzw. Extraktionsmethoden.

Es ist bekannt, dass toxische Cu(II)-Konzentrationen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und damit zur Peroxidation von Membranenlipiden führen können (Dat et al., 2000; Sandmann und Boger, 1980). So ist interessant, dass trotz verringerter Vitalität bei einer 50 µM Cu(II)-Belastung (Abb. 7, Seite 50) kein Anstieg des Phenolgehaltes als anti-oxidative Stressreaktion in *Fontinalis antipyretica* ermittelt wurde. Offenbar bildet die gesteigerte GSH-Synthese (Bruns et al., 2001) eine effektivere Antwort auf Cu(II)-induzierten Stress.

Auch Lavid et al. (2001a,b) beobachteten in Studien zum Polyphenolgehalt in schwermetallakkumulierenden Drüsen in *Nymphaea* keine Änderung des Phenolspiegels. Die Schwermetallakkumulation führte dagegen zu einer erhöhten Polymerisierung der Phenole, vermittelt durch die Peroxidase. Folglich beruht die Schwermetallstressantwort in diesem Fall nicht auf einer gesteigerten Synthese sondern auf der Umordnung der Phenole zu polymerisierten Schwermetallkomplexoren, die die Bildung freier Radikale verhindern. Dieser Mechanismus wurde von Marschner (1995) beschrieben und bei *Arabidopsis thaliana* als Reaktion auf toxische Pb(II)-Konzentrationen von Lummerzheim et al. (1995) erwähnt.

Das allgemeine Vorkommen von Zimt- und Benzoessäurederivate in Bryophyten wurde von Shaw und Goffinet (2000) sowie Hegnauer (1986) beschrieben. Es war daher anzunehmen, Verbindungen wie z.B. 3,4-Dihydroxybenzoessäure, 4-Hydroxybenzaldehyd oder weitere einfache Phenolkarbonsäuren, z.B. Gallussäure, aus *Fontinalis antipyretica* isolieren zu können. Die anhand des Vergleiches von Retentionszeiten getroffene Zuordnung der Probenfraktionen zu Standardverbindungen konnte massenspektrometrisch nicht bestätigt werden (Kap. 3.7.2). Aufgrund der Komplexität der phenolischen Stoffklasse waren weiterführende MS-Analysen im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Über einen spektralen Vergleich wurde die Zugehörigkeit der isolierten Verbindungen zur Gruppe der Flavonole überprüft. Die Spektren wiesen jeweils eine Absorptionsschulter bei 280 nm auf und zeigten weder die flavonoltypischen Absorptionsmaxima bei 260 nm und 370 nm, noch die für die Cu(II)-Chelatierung charakteristische Absorptionsverschiebung (Anhang Abb. 11 und 12). Nach Dudley und Fleming (1985) sind Spektren mit nur ein oder zwei Banden unter 300 nm nicht charakteristisch für polycyclische, aromatische Verbindungen. Somit kann eine strukturelle Verwandtschaft der isolierten, phenolischen

Verbindungen aus *Fontinalis antipyretica* mit der Klasse der Flavonole ausgeschlossen werden.

Weiterführende Aussagen, hinsichtlich der Rolle der Phenole als Anti-Oxidantien bzw. Metallchelatoren im Rahmen einer Schwermetallstressantwort in *Fontinalis antipyretica*, bedingen die massenspektrometrische Identifizierung der isolierten Verbindungen. Weiterhin könnten elektronenmikroskopische Untersuchungen den Cu(II)-Einfluss auf die Zellwandstruktur bzw. die Aktivität der Polyphenoloxidasen klären.

4.6 Metallothionein: Das genetische Potential von *Fontinalis antipyretica*

Die Aktivität der Metallothioneingene wird durch Schwermetalle wie Cu(II) und Zn(II), Hormone (ABA), Hitze, Kälte, osmotischen Stress, Verwundung oder Seneszenz beeinflusst (Cobbett und Goldsbrough, 2000; Rauser, 1999; Garcia-Hernandez et al., 1998). Pflanzliche Metallothioneine werden von Multigenfamilien codiert. Bis 1998 wurden insgesamt 58 cDNA-Sequenzen Metallothionein-ähnlicher Gene aus Pflanzen veröffentlicht (Rauser, 2000). Es existieren keine Angaben zum Vorkommen von MT-ähnlichen Genen in Bryophyten. Unklar ist bislang die physiologische Bedeutung dieser Proteine bzw. deren Genregulation. Nach Garcia-Hernandez et al. (1998) besitzen die Isoformen spezielle Funktionen in den Geweben.

In *Fontinalis antipyretica* deuten erste Untersuchungen auf eine Zn(II)- und temperatur-regulierte Transkription MT-ähnlicher Sequenzen hin (Kap. 3.8.1). Die mit der MT p2-18-Sonde aus *Brassica juncea* detektierten Transkriptsignale lagen im Größenbereich von ca. 600 bp. Zu beachten ist, dass die von Murphy und Taiz (1995) beschriebene Cu(II)-induzierte Expression von MT p2 in *Arabidopsis thaliana* unter den gegebenen Bedingungen nicht bestätigt werden konnte.

Schäfer et al. (1997) wiesen mit einer MT p2-Sonde aus *Arabidopsis thaliana* ein Transkript von 580 pb in *Brassica juncea* nach, dessen cDNA später als Sonde für die oben beschriebenen Versuche verwendet wurde. Die Autoren zeigten außerdem die Cu(II)-induzierte Verringerung der MT p2-mRNA, ein Cd(II)-Einfluss war nicht nachweisbar. Auch die Ergebnisse der immunologischen Detektion MT p2-positiver Proteine in *Fontinalis antipyretica* deuten auf eine Verminderung der Expression unter Schwermetallbelastung hin (Abb. 28, Seite 72). Die Probennahme erfolgte dabei zur Transkriptionsanalyse nach zwei Stunden, die der immunologischen Tests ab vier Stunden. Das als zweite Metallothioneinsonde eingesetzte PaMT f1-Fragment aus

Podospora anserina hybridisierte in keinem Fall mit *Fontinalis antipyretica*-mRNA. Die Ursachen dafür könnten in deren geringer Spezifität bzw. an nicht stringenten Bedingungen liegen. Insgesamt bleibt das mit der MT p2-18-Sonde detektierte Ergebnis nach einer weiteren Optimierung der Methode zu verifizieren.

Der von Rauser (1999) gegebene Überblick zur Regulation von pflanzlichen MT-Genen widerspiegelt die funktionelle Vielfalt der MT's. So wiesen Hsieh et al. (1995) und Choi et al. (1996) eine Cu(II)-induzierte MT-Gen-Aktivierung in *Oryza sativa* (OsMT p1) und *Nicotiana glutinosa* nach. Andererseits wird die Transkription in der Cu(II)-toleranten *Mimulus guttatus* durch Cu(II)-Einfluss reduziert (de Miranda et al., 1990), ebenso in *Vicia faba* (Foley und Singh, 1994) und *Glycine max* (Kawashima et al., 1991).

Des Weiteren wurde aus genomischer DNA von *Fontinalis antipyretica* eine Metallothionein-ähnliche Gensequenz mit einer Größe von ca. 220 bp aus zwei unabhängigen DNA-Proben amplifiziert (Abb. 38, Seite 90). Die BLASTN-Datenbankrecherche der Sequenz ergab hohe Homologien zu MT p1-ähnlichen mRNA's verschiedener monokotyle und dikotyle Spezies. Diese Sequenzen zeichneten sich insgesamt durch hochkonservierte, cysteinreiche Bereiche aus. Im Fall der Metallothionein-mRNA aus *Zea mays* (Accession: X82186) handelt es sich um eine Sequenz, deren Transkription durch D-Glukose-Mangel induziert wird (Chevalier et al., 1995). Dagegen wird die ids-mRNA in Wurzeln von *Hordeum vulgare* bei Eisenmangel verstärkt transkribiert (Okumura et al., 1991). Diese Beispiele verdeutlichen die spezifische Regulation der Transkripte, abhängig von Gewebetyp sowie exogenen und endogenen Faktoren.

Durch die Isolierung des DNA-Fragmentes ist die Grundlage für die Herstellung einer *Fontinalis*-spezifischen Sonde für weitere Untersuchungen zum Expressionsverhalten MT-homologer Gensequenzen gelegt. Weiterhin wäre die Identifizierung der mittels MT p2-Primer, abgeleitet aus *Brassica juncea* (Schaefer et al., 1998), amplifizierten DNA-Fragmente (ca. 200 bp und 230 bp) wünschenswert, deren Sequenz bisher nicht ermittelt werden konnte.