

5. Zusammenfassung

Submerse Moose sind ausgezeichnete Bioindikatoren für die Anzeige von Wassergüteklassen und können als Schwermetallakkumulatoren operieren (Frahm, 1998). Erste Studien zum Schwermetalleinfluss in *Fontinalis antipyretica* wiesen signifikante Unterschiede gegenüber höheren Pflanzen auf (Bruns et al., 1997; 1999; 2000; 2001). Ziel dieser Arbeit war die physiologisch-biochemische Charakterisierung schwermetallinduzierter Reaktionen von *Fontinalis antipyretica* unter Berücksichtigung proteinchemischer, zellulärer, physiologischer und genomischer Aspekte.

Vitalitätsstudien zeigten konzentrationsabhängig (25-100 μM) differente Wirkungen der Schwermetalle Cu(II), Cd(II), Pb(II) und Zn(II) auf den physiologischen Zustand des PS II. Konditioniertes Kontrollmaterial wies vitale Parameter auf, die durch die Applikation von maximal 100 μM Cu(II) und 100 μM Cd(II) bis auf 52 % bzw. auf 61% verringert wurden. Pb(II)- und Zn(II)-Belastungen zeigten bis 100 μM keine nachweisbaren Effekte auf die Vitalität. Anhand von Chlorophyllfluoreszenzmessungen wurde eine Schädigung des Elektronentransportes im PS II wie folgt ermittelt: Cu(II) >> Cd(II) >> Pb(II)/Zn(II). Diese Methode eignete sich zur sensitiven Stressindikation und lieferte grundlegende Daten zum physiologischen Zustand des Untersuchungsmaterials für weitere Versuche.

Experimente zur intrazellulären Aufnahme von Cu(II), Cd(II), Pb(II) und Zn(II) wiesen eine spezifische Abhängigkeit gegenüber der Schwermetallkonzentration des Mediums und der Inkubationszeit nach. Im Konzentrationsbereich von 25 μM -100 μM lag folgende Priorität vor: Cu(II) > Pb(II) > Zn(II) > Cd(II). AAS-Messungen ermittelten maximale, intrazelluläre Gehalte von 0,40 μmol Cu(II)/g TM; 0,33 μmol Pb(II)/g TM; 0,19 μmol Zn(II)/g TM und 0,14 μmol Cd(II)/g TM. Insgesamt erfolgte die intrazelluläre Aufnahme ab 50 μM von Cu(II), Cd(II) bzw. Zn(II) kontinuierlich. Eine Stagnation trat bei der geringen Konzentrationen von 25 μM und im Fall von Pb(II) unabhängig der applizierten Konzentration nach drei Tagen auf. Die Ergebnisse deuten auf einen Diffusionsmechanismus hin. Zur Klärung der Transportprozesse sollte deren Energieabhängigkeit geprüft sowie die Identifizierung von Membrantransportkomponenten erfolgen.

EDX-Analysen elektronendichter Niederschläge lieferten Informationen zur Elementzusammensetzung der Zellwände, des Zytoplasmas, der Plastiden sowie der Vakuolen. Infolge der intrazellulären Cu(II)-Aufnahme wurde die Kompartimentierung des Cu aus dem Zytoplasma in die Plastiden und die Vakuole nachgewiesen. Weiterhin ermittelte die EEL-Spektroskopie SH-Gruppen als mögliche Cu-Bindungspartner im Zytoplasma. In den Vakuolen werden Cu-Ionen, im Gegensatz zu höheren Pflanzen, an anorganisches Phosphat gebunden. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese von Bruns et al. (2001), wonach die Bindung der Schwermetallionen zum Transport durch das Zytoplasma von *Fontinalis antipyretica* an GSH erfolgen könnte.

Auf Proteinebene wurden schwermetall-, hitze- und kultivierungsbedingte Effekte festgestellt. Zweidimensionale Proteintrennungen zeigten schwermetallabhängig komplexe Änderungen, insbesondere im Proteinmuster des Molekulargewichtsbereiches bis 20 kDa: Cu(II) > Zn(II) > Cd(II) > Pb(II). Metallothionein p2-homologe Antigene konnten nach ein-, nicht aber nach zweidimensionaler Proteintrennung im Molekulargewichtsbereich von ca. 8 kDa nachgewiesen werden. Die Micro-Sequenzanalyse eines internen Fragmentes ermittelte eine Sequenz, die bisher keinem bekannten Protein zuzuordnen war. Die Expression der detektierten Proteine erfolgte konstitutiv und wurde infolge einer dreitägigen Cu(II)-, Cd(II)-, Pb(II)- und Zn(II)-Belastung spezifisch reprimiert: Cd(II) > Zn(II) > Cu(II) > Pb(II). Der Nachweis von MT p2-AK positiven Proteinen in hitzestressstem Material war nicht möglich.

Die Induktion des HSP 70-homologen Antigens erfolgte nach einem kurzzeitigen Cu(II)- und Cd(II)-Stress sowie nach einem kurz- und langfristigen Hitzeschock. In beiden Fällen konnte die Reaktion zeit- bzw. temperaturabhängig charakterisiert werden. HSP 17- und Cyclophilin 18-homologe Antigene wurden nicht detektiert. Mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) und kovalenter Affinitätschromatographie wurden metallbindende und thiolhaltige Proteine isoliert. Die Micro-Sequenzanalyse interner Fragmente aus Proteinen der IMAC-Kontrollfraktion ermittelte zwei cysteinreiche Sequenzen (80%ige Homologie zu einem Endochitinase-Precursor aus *Pisum sativum* bzw. 66%ige Homologie zu dem MstProx-Protein aus *Drosophila melanogaster*), eine threoninreiche Sequenz (47%ige Homologie zur Serin/Threonin-Protein-Kinase YNR047W aus *Saccharomyces cerevisiae*) sowie eine cysteinhaltige Sequenz eines internen Fragmentes der Cu(II)-belasteten Probe (90%ige Homologie zu abgeleiteten Proteinen aus *Deinococcus radiodurans*). Metallothionein-homologe Sequenzen wurden nicht identifiziert. Für die Micro-Sequenzierung relevanter 2D-Proteinspots ist deren vorherige immunologische Detektion sinnvoll, so dass eine Optimierung der Methodik im Nachweis Metallothionein-homologer Proteine in der 2D notwendig ist.

Die Biosynthese freier Aminosäuren wurde infolge der 50 μM Cu(II)-Belastung zeitabhängig gehemmt, so dass eine wesentliche Rolle der Hauptliganden Asparagin und Histidin in der Regulierung der Verfügbarkeit von Cu(II)-Ionen auszuschließen ist. Verstärkte Synthesen traten ausschließlich bei Cystein (203 %), Phenylalanin (163 %) und Glutamin (162 %) nach einem vierstündigen Cu(II)-Stress, im Fall von Glutamin auch im Langzeitversuch nach drei Tagen (174 %), auf. In der Funktion als GSH-Precursor wurde die bedeutende Rolle des Cysteins in der schnellen Schwermetallstressreaktion bestätigt. Das Cu(II)-Bindungspotential des Glutamin ist mittels EELS-Analysen zu überprüfen.

Das Vorkommen von Oxalsäure, Zitronensäure und Äpfelsäure wurde mittels ESI-MS, im Fall von Zitronensäure und Äpfelsäure zusätzlich mittels GC-MS, nachgewiesen. Die Ergebnisse deuten auf eine induzierte Synthese der beiden letztgenannten Verbindungen nach dreitägiger Cu(II)-Belastung hin. EELS-Analysen könnten deren mögliche Funktion als Cu(II)-Bindungspartner klären.

Der Gesamtphenolgehalt von *Fontinalis antipyretica* wird nicht durch eine vierstündige bzw. dreitägige 50 μM Cu(II)-Belastung beeinflusst. Die RP-HPLC-Analyse löslicher, phenolischer Verbindungen ermittelte Cu(II)-induzierte Konzentrationsschwankungen der isolierten Verbindungen. Die anhand der Retentionszeiten getroffene Zuordnung zu Standardsubstanzen konnte massenspektrometrisch nicht bestätigt werden. Spektroskopische Untersuchungen zu Wechselwirkungen der phenolischen Verbindungen mit Cu(II) schlossen eine Zugehörigkeit zur Gruppe der Flavonole aus. Die Charakterisierung der Phenole hinsichtlich einer Funktion in der Schwermetallstressantwort in *Fontinalis antipyretica* setzt deren massenspektrometrische Identifizierung voraus.

Erste Untersuchungen zur Regulation Metallothionein-ähnlicher Gene mittels einer cDNA-Sonde aus *Brassica juncea* deuteten auf eine kurzzeitige Induktion der Transkripte infolge einer Zn(II)-Belastung sowie nach einem 20 °C-Hitzeschock hin. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der immunologischen Detektion Metallothionein-ähnlicher Proteine. Aus genomischer DNA von *Fontinalis antipyretica* wurde eine Metallothionein p1-homologe Sequenz (95%ige Homologie zur Metallothionein p1-mRNA von *Zea mays*) isoliert und bietet als Sonde ideale Voraussetzungen zur Klärung der Regulation Metallothionein-ähnlicher Gene unter Schwermetalleinfluss.