

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Modellorganismus und Anzucht

##### 3.1.1 Blasenmützenmoos *Physcomitrella patens*

Das terrestrische Moos *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. (Stamm s. Reski *et al.*, 1994) war das Untersuchungsobjekt der vorliegenden Arbeit. Nach Frey *et al.* (1995) wird es wie folgt klassifiziert:

Reich	Plantae
Abteilung	Bryophyta
Unterabteilung	Musci
Klasse	Bryopsida
Unterklasse	Bryidae
Ordnung	Funariales
Familie	Funariaceae
Gattung	<i>Physcomitrella</i>
Art	<i>Physcomitrella patens</i>

##### 3.1.2 ABC-Medium

Die Kultivierung von *P. patens* erfolgte in ABC-Medium. Dieses Medium enthält nach Knight *et al.* (1988) in 1 L:

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,18 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	240 mg
MgSO <sub>4</sub>	240 mg
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	12,5 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	614 µg
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	389 µg
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	55 µg
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	55 µg
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	55 µg
KI	28 µg
LiCl	28 µg
SnCl <sub>2</sub>	28 µg

Vor dem Autoklavieren wurde das Medium mit konzentrierter KOH auf pH 10 eingestellt. Nach dem Autoklavieren betrug der pH-Wert ca. 6,4.

### 3.1.3 Kultivierung

Die Kulturen (Wildtyp und  $\Delta apr$ -Mutanten) wurden in 250-mL-Erlenmeyer-Kolben (75 mL ABC-Medium) bei 25 °C, 110 rpm unter Langtagbedingungen (16 h, 40  $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ; 8 h dunkel) angezogen. Als  $\Delta apr$ -Mutanten wurden die Stämme 11-3-12 und 12-4-3 aus Koprivova *et al.* (2002) verwendet.

Alle Stammkulturen wurden einmal pro Woche mittels Ultra-Turrax homogenisiert. Nach 14 Tagen wurde die Biomasse in neues Medium überführt. Hierzu wurde die Biomasse eines Kolbens auf zwei 250-mL-Erlenmeyerkolben aufgeteilt und anschließend homogenisiert. Auf etwaige Verunreinigungen wurde regelmäßig durch Ausstrich der Kulturlösung auf LB-Platten (Luria-Bertani; 5 g L<sup>-1</sup> Hefeextrakt, 10 g L<sup>-1</sup> Bacto-Trypton, 10 g L<sup>-1</sup> NaCl, 15 g L<sup>-1</sup> Agar) geprüft. Für Experimente wurden die Kulturen nach vier Kulturtagen Vorinkubation verwendet. Durch Zugabe von autoklavierter 20 mM CdCl<sub>2</sub>-Stammlösung wurden Cd(II)-Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  eingestellt. Für Versuche unter erhöhtem Sulfatgehalt wurde vor dem Autoklavieren 1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>- bzw. 1 M MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O-Lösung zugegeben. Alle verwendeten Kulturgefäße wurden vor den Experimenten für mindestens 24 h mit 0,5 % (v/v) HNO<sub>3</sub> gespült, um an der Glasoberfläche adsorbierte Metallionen zu entfernen.

## 3.2 Biochemische und analytische Methoden

### 3.2.1 Zellaufschluss

Für alle Experimente wurde gefrorenes Material (-80 °C) von *P. patens* verwendet und in flüssigen Stickstoff mittels Mörser und Pistill zu homogenem Pulver zerrieben, wobei durch stetige N<sub>2</sub>-Zugabe ein Auftauen verhindert wurde. Mörser, Pistill und Spatel wurden für Nukleinsäure-Extraktionen autoklaviert.

### 3.2.2 Vitalitätsbestimmung

Als Vitalitätsparameter wurde der Gehalt an Chlorophyll gewählt, welches mittels ammoniakalischer Acetonlösung (80 % v/v; 0,125 % v/v NH<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O) extrahiert wurde. Dazu wurde das Pflanzenmaterial im Verhältnis 50 mg : 1 mL Acetonlösung versetzt, 1 min kräftig gevortext und 15 min bei 4 °C unter Schütteln extrahiert. Anschließend wurde zentrifugiert (4 min,

14000 g, 4 °C). Der Überstand wurde mit Acetonlösung 1:10 verdünnt. Die Absorption wurde bei 480 nm (Carotinoide), 647 nm und 664 nm (Chlorophyll a und b) gegen Acetonlösung gemessen. Die Chlorophyll-Gehalte in mg L<sup>-1</sup> wurden nach folgenden Formeln berechnet:

$$c(\text{Chl. a}) = 11,78 \times E_{664} - 2,29 \times E_{647}$$

$$c(\text{Chl. b}) = 20,05 \times E_{647} - 4,77 \times E_{664}$$

Die Bestimmung der Photosystem-II-Effizienz wurde mit Hilfe einer nach Humbeck *et al.* (1996) modifizierten Methode durchgeführt. Dazu wurde Biomasse von *P. patens* auf einen Filter (Macherey-Nagel, d = 55 mm, Dicke = 0,2 mm) abgesaugt und 15 min im Dunkeln inkubiert. Die Messung erfolgte anhand eines Chlorophyll-Fluorometers (Mini PAM, Walz, Effeltrich).

### 3.2.3 RP-HPLC-Analyse von Thiolen mittels Monobrombimanderivatisierung

Nach Sutter (2000) wurden die Thiole Cys,  $\gamma$ -EC und GSH mit Monobrombiman (mBBr) markiert (Abb. 6). Anschließend wurden die fluoreszierenden Derivate an einer RP-Phase getrennt. Die HPLC-Anlage (Merck-Hitachi LaChrom, Merck, Darmstadt) bestand aus einem Fluoreszenz-Detektor (L-7480), einem Autosampler (L-7200), einer Pumpe (L-7100) und einem Interface (D-7000). Zur HPLC-Steuerung wurde die Software D 7000 HPLC-System-Manager verwendet.

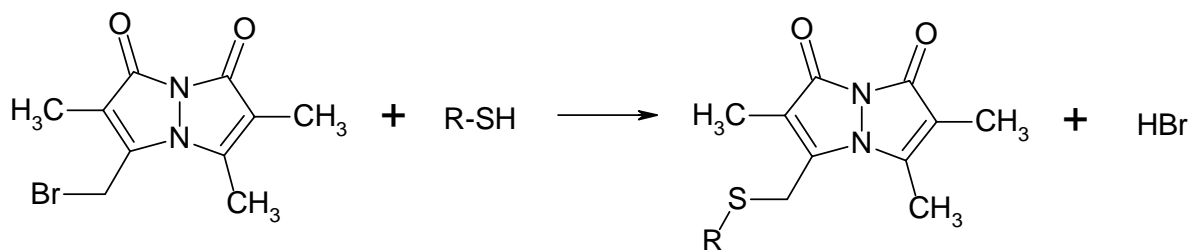


Abb. 6 Reaktionsschema von Thiolen mit Monobrombiman

Das Probenmaterial (ca. 50 mg FM) wurde mit 1 mL 0,1 M HCl versetzt und bis zur Homogenität gevortext. Anschließend wurde zentrifugiert (20 min, 12000 g, 4 °C) und 120  $\mu$ L Überstand mit 180  $\mu$ L CHES (0,2 M pH 9,3) und 30  $\mu$ L 6 mM DTT vermischt. Während der nachfolgenden Inkubation auf Eis (1 h) kam es zur Reduktion der Thiole. Im Anschluss wurde der

Ansatz mit 10  $\mu\text{L}$  mBBR (30 mM in Methanol) versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln derivatisiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 250  $\mu\text{L}$  5 % Eisessig (v/v) zugegeben.

Bis zur HPLC-Analyse wurden die Proben bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Vor der Auftrennung wurden die Proben zentrifugiert (RT, 5 min, 14000 g). Die Konzentrationen von Cys,  $\gamma$ -EC und GSH wurden anhand von Eichgeraden im Bereich  $0,1\text{-}2\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  ermittelt.

HPLC-Bedingungen:

Stationäre Phase:	LiChrospher 60 RP Select B (5 $\mu\text{m}$ , 250x4 mm)
Mobile Phase:	A) 2 % MeOH/0,25 % AcOH (v/v) pH 4,3 mit 10 N NaOH B) 90 % MeOH/0,25 % AcOH (v/v) pH 3,9 mit 0,1 N NaOH
Fluss:	0,9 mL/min
Injektionsvolumen:	50 $\mu\text{L}$
Detektion:	Fluoreszenz $\lambda_{\text{exc}} = 420\text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 520\text{ nm}$
Gradient:	

Zeit (min)	A (%)	B (%)
0.0	97	3
15.0	93	7
30.0	0	100
35.0	0	100
35.1	97	3
45.0	97	3

### 3.2.4 Enzymatische Bestimmung von GSH und GSSG

Der enzymatische Test mittels Glutathion-Reduktase (Anderson, 1985) wurde zur Bestimmung von Gesamt-Glutathion ( $\text{GSH}_{\text{ges}}$ ) und oxidiertem Glutathion (GSSG) verwendet. Zur GSSG-Bestimmung wurde zunächst das reduzierte Glutathion durch 2-Vinylpyridin (2-VP) blockiert. Anschließend wurde das oxidierte GSSG durch die Glutathion-Reduktase mit NADPH zu zwei Molekülen GSH reduziert (Reaktion 1). Danach erfolgte die Oxidation des gebildeten GSH mit DTNB [5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure)] unter Freisetzung von TNB

(5-Thio-2-Nitrobenzoesäure, Reaktion 2). TNB wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 410 \text{ nm}$  detektiert. Für die Bestimmung des Gesamt-GSH-Gehaltes entfiel die Blockierung mit 2-VP.



Lösungen:

Puffer A:	143 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
Puffer B:	143 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
Puffer C:	Na-Phosphatpuffer (A:B = 1:5,25) + 6,3 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ , pH 7,5
Puffer D:	0.248 mg/mL NADPH in Puffer C
DTNB:	6 mM DTNB in Puffer C (Lagerung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ )
GSSG-Reduktase (Hefe):	auf 266 U/mL in Puffer C verdünnen ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ )
2-Vinylpyridin:	unverdünnt ( $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ )
5-Sulfosalicylsäure:	5 % (w/v)
Triethanolamin:	unverdünnt
GSSG Standards:	aus 50 mM GSSG-Lösung ( $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) in 5 % 5-Sulfosalicylsäure

Das Probenmaterial (50 mg) wurde mit 250  $\mu\text{L}$  5 % 5-Sulfosalicylsäure versetzt und zentrifugiert (RT, 5 min, 10000 g). Anschließend wurden 100  $\mu\text{L}$  Überstand abgenommen und mit je 2  $\mu\text{L}$  2-VP bzw. Triethanolamin vermischt, kräftig gevortext und der pH-Wert durch pH-Papier überprüft (pH 6 bis pH 7). Nach 60 min Inkubation wurde der GSSG-Reduktase-Test durchgeführt.

GSSG-Reduktase-Test:

Puffer C:	700 $\mu\text{L}$
DTNB:	100 $\mu\text{L}$
Bidest:	165 $\mu\text{L}$
Probe (oder Standard)	25 $\mu\text{L}$
GSSG-Reduktase	10 $\mu\text{L}$

→ Start der Reaktion durch Zugabe von GSSG-Reduktase

### 3.2.5 Bestimmung der Biosorption und Akkumulation von Cd(II)

Mit Hilfe eines Flammen-Atomabsorptionsspektrometers (ATI Unicam, England) wurde die Cd(II)-Verteilung bestimmt. Dabei wurden extrazellulärer, an die Oberfläche gebundener und intrazellulärer Anteil gemessen. Der extrazelluläre Anteil setzte sich aus dem Medium, den Waschschritten mit Bidest (unspezifisch gebundenes Cd(II)) und dem aufgeschlossenen Rundfilter (Macherey-Nagel,  $d = 55 \text{ mm}$ , Dicke =  $0,2 \text{ mm}$ ) zusammen. Zur Messung des spezifisch an die Zellwand gebundenen Cd(II) erfolgte dessen Verdrängung durch Ni(II)-Ionen. Der intrazelluläre Anteil konnte nach mikrowellengestütztem Aufschluss ermittelt werden.

Das Probenmaterial wurde über einen Filter ( $45 \text{ }\mu\text{m}$ ) mittels Absaugvorrichtung abgesaugt und dann folgenden Schritten unterworfen:

- Abfüllen des abgetrennten Mediums (M)
- Zugabe von 25 mL Bidest, kurz aufschütteln, absaugen (W1)
- Zugabe von 25 mL 20 mM NiCl<sub>2</sub>, 5 min schütteln lassen, absaugen (Ni1)
- Zugabe von 25 mL 20 mM NiCl<sub>2</sub>, 5 min schütteln lassen, absaugen (Ni2)
- Zugabe von 25 mL Bidest, kurz aufschütteln, absaugen, verwerfen

Danach wurde über Nacht getrocknet ( $65 \text{ }^\circ\text{C}$ ) und die Trockenmasse (TM) bestimmt. Die getrocknete Biomasse bzw. der getrocknete Filter wurde mittels Mikrowelle (MARS 5, CEM, Kamp-Lintfort) aufgeschlossen. Dazu wurden die Proben in einem Aufschlussgefäß mit 2 mL 30 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 4 mL 65 % (v/v) HNO<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt und einer zweistufigen Aufschlussmethode (Tab. 5) bei 1200 W zugeführt. Danach wurde die klare Flüssigkeit mit Bidest auf 25 mL aufgefüllt. Zur Reinigung der Mikrowellengefäße wurden diese erneut mit 2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 4 mL HNO<sub>3</sub> versetzt und mittels *clean*-Programm (Tab. 5) gesäubert.

Tab. 5 Parameter für den Mikrowellenaufschluss

	<b>Stufe 1</b>	<b>Stufe 2</b>	<b>clean</b>
% Power	100	100	100
Ramp	5 min	5 min	5 min
Pressure	3 bar	10 bar	3 bar
Temperature	120 °C	175 °C	120 °C
Hold	2 min	15 min	2 min

Die Lösungen wurden mittels AAS analysiert. Dabei konnten die Cd(II)-Gehalte von Medium (M), Waschen (W1), Nickel1 (Ni1), Nickel2 (Ni2) und aufgeschlossenem Filter (MW Filter) aus den unverdünnten Flüssigkeiten ermittelt werden. Die Lösung der aufgeschlossenen Biomasse wurde mit Bidest 1:10 verdünnt. Die Cd(II)-Konzentrationen wurden mittels Eichgerade im Bereich von  $0,0625 \text{ mg L}^{-1}$  bis  $1 \text{ mg L}^{-1}$  berechnet. Dazu wurde eine  $1 \text{ g L}^{-1}$  Cd(II)-Standardlösung (Merck) benutzt.

### 3.2.6 Aufreinigung von OAS-TL-Protein

Für die Gewinnung von OAS-TL aus *P. patens* wurde das für *A. thaliana* etablierte Protokoll (AG Hell, Heidelberg) verwendet. Dazu wurde rekombinante, His-getagte SAT an eine Hi-Trap-Säule über Ni(II) gebunden. Anschließend wurde der aus *P. patens* gewonnene Proteinextrakt auf die Säule gegeben, wobei die OAS-TL-Bindung erfolgen sollte. Schließlich wurde mittels OAS eluiert. Zur Aufreinigung wurden ca. 150 g Biomasse von ungestresstem Wildtyp verwendet.

#### - Extraktion von Proteinen

Das gefrorene Material ( $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) wurde in flüssigen Stickstoff mittels Mörser und Pistill zu homogenem Pulver zerrieben. Das Pulver wurde portionsweise in 530 mL eiskalten SAT-W Puffer (50 mM Tris, 250 mM NaCl, 80 mM Imidazol, pH 8,0), welcher zusätzlich 0,5 mM PMSF und 1 mM DTT enthielt, gelöst. Anschließend wurde auf Eis gerührt und die homogene Flüssigkeit durch Miracloth filtriert. Das Filtrat wurde nun für 20 min bei 27500 g und  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Nach Bestimmung des Volumens wurde der Überstand in ein Becherglas gefüllt und auf Eis schrittweise mit Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 20 % (w/v) versetzt. Danach wurde die Mischung 10 min auf Eis gerührt, wonach sich eine erneute 20-minütige Zentrifugation bei 27500 g und  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  anschloss. Im zweiten Schritt der Ammoniumsulfat-Fällung wurde der Überstand auf eine Konzentration von 75 % (w/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  eingestellt. Da sich das Salz schwer löste, wurde zusätzlich 1 h auf Eis gerührt. Anschließend wurde erneut 20 min bei 27500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 15 mL modifizierten SAT-W Puffer (s.o.) gelöst. Die Lösung wurde nun in SS34-Zentrifugenröhrchen gegeben und 10 min bei 27500 g bzw.  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Zur Entsalzung wurden jeweils 2,5 mL Überstand auf mit SAT-W Puffer äquilibrierte PD10-Säulen gegeben. Nach Elution des Extraktes wurde dieser in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufreinigung bei  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### - Affinitätschromatographie von OAS-TL

Zur Affinitätschromatographie wurden Bakterien verwendet, welche eine His-getagte SAT überexprimieren (*E. coli*-Stamm HMS 174, F<sup>+</sup> recA hsdR(r<sub>K12</sub>-m<sub>K12</sub><sup>+</sup>) rif<sup>r</sup> (DE3)). Das Pellet von 800 mL Bakterienkultur wurde in 10 mL SAT-B Puffer (50 mM Tris, 250 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0), der zusätzlich 0,5 mM PMSF enthielt, auf Eis resuspendiert. Danach wurde die Lösung für 7 min bei 40 % Aktivität auf Eis sonifiziert (Bandelin Sonoplus GM 70) und für 10 min bei 47000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Rohextrakt wurde erneut mit 25 µL PMSF versetzt und durch einen 0,45 µm-Filter filtriert, wonach ein Aliquot von 200 µL entnommen wurde. Später wurde die an einer Pumpe (IKA Schlauchpumpe PA-SF) angeschlossene Hi-Trap Säule (Amersham HiTrap<sup>TM</sup> Chelating HP) mit Bidest bei einer Flussrate von 1 mL/min gespült. Danach wurden 10 mL 50 mM NiCl<sub>2</sub> bzw. 5 mL SAT-B Puffer durch die Säule gepumpt. Der Bakterien-Rohextrakt wurde 40 min über die Säule zirkuliert und später nochmals vollständig durchgepumpt. Danach wurde ein 500 µL-Aliquot vom Durchfluss entnommen. Die Säule konnte nun mit 10 mL SAT-W Puffer gewaschen werden. Anschließend erfolgte die Elution der aus den Bakterien stammenden, rekombinanten OAS-TL mit 5 mL einer frisch hergestellten 10 mM OAS-Lösung in SAT-W Puffer.

Der aus *P. patens* gewonnene Proteinextrakt (s.o.) wurde vor der OAS-TL-Aufreinigung nochmals bei 27500 g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand zirkulierte anschließend 40 min über die mit rekombinanter SAT beladene Säule. Vom Durchfluss wurde ein Aliquot entnommen. Die Säule wurde nochmals mit 10 mL SAT-W Puffer gewaschen. Die Elution der OAS-TL aus *P. patens* erfolgte nun mittels 10 mM OAS (in SAT-W Puffer) und wurde in 500 µL-Fractionen gesammelt. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschschriff mit 10 mL SAT-W Puffer. Die an der Säule gebundene, bakterielle SAT wurde mit 5 mL SAT-E Puffer (400 mM Imidazol) eluiert und in 1 mL-Fractionen aufgefangen. Zur Entfernung des Nickels wurde die Säule mit 10 mM EDTA gespült. Nach Waschung mit 0,25 M NaOH wurde die Säule zur Aufbewahrung mit 10 mL 0,02 % NaN<sub>3</sub> gespült und konnte dann bei 4 °C gelagert werden.

Anschließend erfolgte eine Proteinbestimmung nach Bradford (s. 3.3.4) und eine OAS-TL-Aktivitäts-Bestimmung (s. 3.3.1) der nach jedem Schritt entnommenen Aliquots.

#### - 1D-PAGE der Fraktionen

Für die Überprüfung der Fraktionen bzw. der einzelnen Chromatographie-Schritte wurden die entnommenen Aliquots einer SDS-PAGE nach Laemmli (1970) zugeführt. Dazu wurden zwei Minigele (4 % Sammelgel, 12,5 % Trenngel) für die Coomassie-Färbung bzw. für den Western-Blot verwendet.



#### - Coomassie-Färbung

Dazu wurde das Gel mit einer Lösung aus 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250 in 40 % MeOH (v/v) und 10 % Essigsäure (v/v) für 45 min gefärbt. Die Hintergrundfärbung wurde anschließend mit Entfärbelösung (20 % EtOH, 10 Essigsäure) entfernt.

#### - Western Blot

Für den Western Blot wurde das Gel nach SDS-PAGE mit kaltem Transfer-Puffer äquilibriert. Der Transfer der Proteine erfolgte mit einer Elektroblob-Apparatur (Biometra Fastblot B44) über Nacht auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schuell Transfer Membran Protan). Nach dem Blotting wurde die Membran mit Ponceau-S-Lösung (1 % Ponceau S, 5 % (v/v) Essigsäure) gefärbt und die Markerproteine gekennzeichnet. Anschließend wurde das Ponceau-S mit Bidest entfernt. Danach wurde die Membran 2 h mit 5 % (w/v) BSA in TBS (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl) behandelt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach dem Waschen mit TBS für 5 min wurde die Membran mit einem Gemisch der spezifischen Antikörper für OAS-TL A und C aus *A. thaliana* (jeweils 1:8000 in TBS und 0,5 % BSA) für 90 min inkubiert. Danach schloss sich ein dreimaliges Waschen für je 10 min in TBS an. Anschließend wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (anti-Kaninchen, 1:10000 in TBS und 0,5 % BSA), der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war, 1 h lang inkubiert. Nach zwei Waschschritten (5 min in TBS) wurde die Membran für 5 min mit AP-Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>) behandelt. Die Detektion erfolgte durch in AP-Puffer gelöstem NBT (4-Nitroblautetrazoliumchlorid) bzw. BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat).

#### - 2D-PAGE

Zur Vorbereitung der 2D-PAGE wurden die OAS-TL-Fractionen einer Aufarbeitung unterzogen. Dazu wurde 1 g Probe mit dem 10-fachen Volumen an TCA-Aceton-Lösung, bestehend aus 10 % (w/v) TCA; 0,07 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, resuspendiert. Diese Mischung wurde anschließend in flüssigem Stickstoff ca. 30 s abgekühlt und 2 h bei -20 °C inkubiert, wobei drei kurze Mischschritte nach 5, 10 und 15 min durchgeführt wurden. Danach erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 25000 g und 4 °C. Die Pellets wurden nun in 1,5 mL Waschlösung (0,07 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol in Aceton) mittels Ultraschall resuspendiert. Danach wurden die Proben erneut in flüssigem Stickstoff gekühlt (30 s) und die darin enthaltenen Proteine für 30 min bei -20 °C gefällt. Nach der Zentrifugation (15 min, 25000 g, 4 °C) wurde das Proteinpellet erneut in Waschlösung aufgenommen, sonifiziert und

gefällt (s.o.). Anschließend wurde das Aceton in einer Vakuum-Zentrifuge entfernt (10 min); die Proteine wurden bis zur Isoelektrischen Fokussierung (IEF) bei -20 °C gelagert.

Die getrockneten Proben wurden zur IEF-Vorbereitung in Rehydratisierung-Lösung (8 M Harnstoff; 2 % (w/v) CHAPS; 0,005 % (w/v) Bromphenolblau; 20 mM DTT; 0,5 % IPG-Puffer) gelöst. Anschließend wurde gevortext, resuspendiert (5 min, Ultraschalbad) und kurz zentrifugiert. Nach 1 h Schütteln (37 °C) wurde nochmals zentrifugiert (15800 g, 15 min). Die mit Rehydratisierung-Lösung gemischte Probe wurde nun durch die Rehydratisierung des IPG(*immobilized pH gradient*)-Streifens in das Gel transferiert. Der IPG-Streifen wurde mit Mineralöl überschichtet. Die Rehydration erfolgte über Nacht in einer IPGphor-Aparatur (Amersham Biosciences). Anschließend wurden die Streifen für die Trennung in der zweiten Dimension präpariert. Dazu erfolgte eine zweimalige Equilibrierung in Equilibrierungs-Stammlösung mit 65 mM DTT bzw. 25 mg/mL Iodacetamid. Danach wurde das Trenn- bzw. Sammelgel (4 % Sammelgel, 12,5 % Trenngel) hergestellt. Schließlich wurden die IPG-Streifen kurz mit Elektrodenpuffer gespült und dicht auf das Sammelgel gedrückt. Der Gellauf erfolgte bei 75 V (ca. 30 min, Sammelgel) und 150 V (ca. 60 min, Trenngel). Anschließend wurde das Gel coomassiegefärbt.

### 3.3 Bestimmung von Enzymaktivitäten

#### 3.3.1 O-Acetylserin(thiol)lyase

Die Aktivität des Enzyms O-Acetylserin(thiol)lyase (OAS-TL, EC 2.5.1.47) wurde photometrisch über das Ninhydrin-Derivat von Cystein gemessen (Gaitonde, 1967). OAS-TL katalysiert die Bildung von Cystein aus O-Acetylserin und Sulfid. Zur Extraktion wurden 10 mg gemörserte Frischmasse mit 300 µL 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 versetzt und gevortext. Anschließend wurde 10 min bei 12000 g zentrifugiert und der Überstand als Rohextrakt verwendet.

Ein 100 µL-Ansatz enthielt:

100 mM DTT:	5 µL
100 mM OAS:	12,5 µL
100 mM Na <sub>2</sub> S:	15 µL
Puffer (s.o.):	67,5 µL
Extrakt:	10 µL

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Rohextraktes gestartet und nach 10 min bei 25 °C mit 50 µL 20 % (v/v) Trichloressigsäure gestoppt. Danach wurde 10 min bei 12000 g zentrifugiert und der Überstand mit 100 µL Eisessig und 200 µL Ninhydrin-Reagenz (250 mg Ninhydrin in 10 mL AcOH:HCl, 6:4) versetzt. Schließlich wurde die Mischung 10 min bei 100 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Nach Verdünnung mit 500 µL 95 % (v/v) EtOH wurde die Extinktion bei 560 nm gemessen. Als Referenz wurde ein Ansatz mit Extraktionspuffer ohne Rohextrakt verwendet. Für die Quantifizierung wurde eine Eichgerade mit Cystein-Konzentrationen von 0,05 mM bis 0,35 mM erstellt. Zur Überprüfung der Linearität wurden die Substratkonzentrationen und die Reaktionsdauer variiert. Zur Überprüfung, ob die Aktivität *in vitro* durch Cd(II) beeinflusst wurde, wurde im Ansatz eines unbelasteten Rohextraktes eine Cd(II)-Konzentration eingestellt, welche der des Cd(II)-exponierten Materials entsprach.

### 3.3.2 $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase und Glutathion-Synthetase

Die Aktivitäten von  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase ( $\gamma$ -ECS, EC 3.2.3.3) und Glutathion-Synthetase (GSHS, EC 3.2.3.2) wurden nach Noctor *et al.* (1997) bestimmt. Die Reaktionsprodukte,  $\gamma$ -EC und GSH, wurden als Monobrombiman-Derivate detektiert (s. 3.2.3).

Zur Gewinnung des Rohextraktes wurden 100 mg gemörserte Frischmasse mit 250 µL Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA) versetzt und gevortext. Anschließend wurde 15 min bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde als Rohextrakt eingesetzt. Der Reaktionspuffer setzte sich aus 100 mM Hepes pH 8,0 und 50 mM MgCl<sub>2</sub> ( $\gamma$ -ECS) bzw. 100 mM Tris/HCl pH 8,4; 50 mM KCl und 20 mM MgCl<sub>2</sub> (GSHS) zusammen.

Der  $\gamma$ -ECS-Ansatz enthielt in 250 µL: 20 mM Glu, 1 mM Cys, 5 mM ATP, 5 mM PEP, 5 mM DTE, 10 U Pyruvat-Kinase und 75 µL Reaktionspuffer. Der GSHS-Ansatz (250 µL) setzte sich aus 1 mM  $\gamma$ -EC, 2 mM Gly, 5 mM ATP, 5 mM PEP, 5 mM DTE, 10 U Pyruvat-Kinase und 75 µL Reaktionspuffer zusammen. Die Enzymassays wurden durch Zugabe von 25 µL Rohextrakt gestartet und bei einer Temperatur von 30 °C durchgeführt. Nach 5 min (Nullprobe, beide Enzyme), 35 min (GSHS) bzw. 65 min ( $\gamma$ -ECS) wurden 120 µL Reaktionsansatz entnommen. Anschließend erfolgte die Thiolderivatisierung, HPLC-Trennung und Quantifizierung wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben. Zur Überprüfung der Linearität wurden die Substratkonzentrationen und die Reaktionsdauer variiert. Schließlich wurde analog der OAS-TL-Messung kontrolliert, ob die Enzymaktivitäten durch Cd(II) beeinflussbar waren.

### 3.3.3 Glutathion-S-Transferasen (GST)

Die Aktivität der Glutathion-S-Transferasen wurde photometrisch über die GSH-Konjugation mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzen (CDNB) gemessen (Habig *et al.*, 1974). Der 1-mL-Testansatz enthielt 200 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 6,4; 1 mM CDNB (Merck) und 1 mM GSH. Die Reaktion wurde bei 25 °C im Zweistrahl-Photometer durchgeführt und durch Extraktzugabe gestartet (Blindwert ohne Extrakt). Die Zunahme der Extinktion wurde 5 min bei 340 nm verfolgt. Die Quantifizierung erfolgte durch Bestimmung des Konjugates ( $\epsilon_{340\text{nm}}=9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### 3.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität war es notwendig, die Proteinkonzentration im Rohextrakt zu bestimmen. Dazu wurde die Methode nach Bradford (1976) verwendet. Dabei wurden 1 mL Bradford-Reagenz (Merck) und 20  $\mu\text{L}$  Extrakt gemischt und bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Zur Quantifizierung wurde eine Eichreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) benutzt.

## 3.4 Molekularbiologische Methoden

### 3.4.1 Datenbankrecherche

Die EST-Sequenzen der mittels *real-time*-PCR untersuchten Gentranskripte wurden durch Datenbanksuche auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> erhalten. Dabei wurden mehrere Einträge für dasselbe Enzym gefunden. Ein Alignment ergab, dass viele EST-Sequenzen eines Enzyms 100 % Übereinstimmung aufwiesen. Schließlich wurde die EST-Sequenz zum Primerdesign verwendet, welche die längste *high quality*-Sequenz aufwies. Die entsprechenden Zugangsnummern für die Sulfatassimilation bzw. GSH-Biosynthese sind in Tab. 6, weitere in Tab. 7 ersichtlich.

Tab. 6 Zugangsnummern der ESTs für Enzyme der Cystein- bzw. GSH-Biosynthese

Gen	Zugangsnummer (NCBI)
<i>ATPS</i>	BU052122
<i>APR</i>	BQ827272
<i>PAPSR</i>	AJ489220
<i>SrR</i>	BQ827026
<i>SAT</i>	AW599682
<i>OAS-TL</i>	BU052293
$\gamma$ <i>ECS</i>	BU052092
<i>GSHS</i>	BQ827502

Tab. 7 Zugangsnummern weiterer ESTs

Gen	Zugangsnummer (NCBI)
<i>Rubisco</i>	AB120708
<i>Actin</i>	BQ041112
<i>GAP-DH</i>	BU052519
<i>Ascorbat-Peroxidase</i>	AJ493275
<i>Ascorbat-Reduktase</i>	BQ041084
<i>GSH-Peroxidase</i>	BQ826943
<i>GSH-Reduktase</i>	BQ041226
<i>GST 1</i>	BQ826624
<i>GST 2</i>	BQ826649
<i>GST 3</i>	BU051851
<i>GST 4</i>	BU051918
<i>MT A</i>	BJ203094
<i>MT B</i>	BG409213

Der Vergleich der EST-Sequenzen mit anderen DNA-Sequenzen (blastn) sowie die Übersetzung in eine Proteinsequenz und der anschließende Vergleich mit Proteindatenbanken (blastx) fand auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> statt. Zur Abschätzung der zellulären Lokalisation wurde die EST-Sequenz auf [www.expasy.org/tools/dna.html](http://www.expasy.org/tools/dna.html) in die möglichen Proteinsequenzen umgeschrieben und auf <http://pasub.cs.ualberta.ca:8080/pa/Subcellular> die mögliche Lokalisation des putativen Proteins ermittelt.

### 3.4.2 Primerdesign

Mittels Fast PCR Software, (V. 3.6.28, Ruslan Kalendar, Helsinki Universität, Finnland) wurden spezifische Primer für die EST-Sequenzen (Tab. 6 und Tab. 7) entworfen. Als erstes wurden Sequenzen für mögliche forward- bzw. reversed Primer angegeben. Diese wurden

anschließend mit dem „Oligonucleotide Properties Calculator“ ([www.basic.northwestern.edu/biotoools/oligocalc.html](http://www.basic.northwestern.edu/biotoools/oligocalc.html)) auf Hairpin-Strukturen und Primer-Dimer-Bildung überprüft. Die Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) bezogen.

### 3.4.3 RNA-Isolation

Gesamt-RNA wurde aus *P. patens* mittels RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend dem Herstellerprotokoll extrahiert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt ( $n = 9$ ). Zur Vermeidung von Produkten genomischer DNA wurden 0,75 µg RNA mit DNase I (MBI Fermentas, Burlington, Canada) behandelt.

### 3.4.4 cDNA-Synthese

Die DNA-freie RNA (0,5 µg) wurde durch Verwendung von SuperScript II Reverse Transkriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA) gemäß Herstellerprotokoll in cDNA umgeschrieben.

### 3.4.5 Real-time-PCR

Die Ausgangsmenge an cDNA wurde mittels *Real-time*-PCR ermittelt (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Qiagen). Die Bedingungen wurden nach Bustin (2002) optimiert. Die Analysen wurden mit cDNA durchgeführt, die aus RNA dreier unabhängiger Mooskulturen erhalten wurde.

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes (20 µL):

cDNA ( <i>template</i> )	0,5 µL
2 × QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	10 µL
forward primer (10 µM)	0,6 µL
reverse primer (10 µM)	0,6 µL
Bidest, steril	8,3 µL

Die *Real-time*-PCR wurde in einem iCycler (Biorad, München, Deutschland) durchgeführt. Das PCR-Programm bestand aus folgenden Schritten:

Schritt 1 (1x):	15 min	95 °C
Schritt 2 (50x):	15 s	94 °C

	15 s	60 °C
	20 s	72 °C (Datenaufnahme)
Schritt 3 (1x):	1 min	95 °C
Schritt 4 (72x):	10 s	57 °C (je Zyklus +0,5 °C, Schmelzkurve)
Schritt 5 (1x):	∞	4 °C

Zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte beinhaltete das Programm die Erstellung einer Schmelzkurve (Gachon *et al.*, 2004). Dadurch konnte sichergestellt werden, dass keine unspezifischen PCR-Produkte in die Kalkulation einbezogen wurden.

Die Ct-Werte wurden durch die iCycler-Software berechnet. Zur relativen Quantifizierung wurde die  $\Delta\Delta Ct$  – Methode verwendet (Livak & Schmittgen, 2001).

#### 3.4.6 Überprüfung der $\Delta apr$ -Mutanten

Die  $\Delta apr$ -Mutanten wurden regelmässig auf ihre Mutation mittels RT-PCR überprüft. Dabei wurden die in Koprivova *et al.* (2002) angegebenen Primer R11 und R14 verwendet.

#### 3.4.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Größentrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese. Die Gele enthielten 1,5 % (w/v) Agarose (Roth, Karlsruhe, Deutschland), welche in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris; 0,5 mM Na-Acetat; 0,01 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 8,0) unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst wurde. Nach Abkühlen des Gels wurden 2  $\mu$ l Ethidiumbromid (0,1 mg mL<sup>-1</sup>) pro 100 ml Gel zugefügt. Die DNA-Proben wurden nach der PCR mit 6-fach konzentriertem DNA-Ladepuffer versehen. Dieser setzte sich aus 30 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau und 0,25 % (w/v) Xylencyanol zusammen. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet. Eine 50 bp DNA-Leiter (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) diente als DNA-Größenstandard.

#### 3.4.8 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen) gemäß Hersteller-Protokoll verwendet.

### 3.4.9 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzier-PCR der extrahierten PCR-Produkte wurde BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK) verwendet.

Reaktionsansatz (10  $\mu$ L):

extrahierte DNA	3 $\mu$ L
5 $\times$ BigDye Master Mix	2 $\mu$ L
forward primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
reverse primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
Bidest, steril	3 $\mu$ L

Die Sequenzier-PCR wurde in einem PCR Sprint (Hybaid, Ashford, UK) durchgeführt. Das PCR-Programm bestand aus folgenden Schritten:

Schritt 1 (1x):	10 sec	96 °C
Schritt 2 (35x):	10 s	96 °C
	4 min	47 °C
Schritt 3 (1x):	$\infty$	4 °C

Die Sequenzierreaktion wurde mit 2,5  $\mu$ L 125 mM Na<sub>2</sub>-EDTA und 30  $\mu$ L EtOH (100 %) versetzt und die DNA 15 min lang bei RT gefällt. Anschließend wurden die Proben 20 min bei 14000 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen. Danach wurde erneut 5 min bei RT und 14000 g zentrifugiert und das Pellet 2 min bei 90 °C getrocknet. Dieses wurde später mit einem Sequenziergerät vom Typ ABI Prism™ 370 DNA-Sequencer (Applied Biosystems) sequenziert. Für die Auswertung der Sequenzierdaten kam die Software „Chromas“, Version 1.43 (Conor McCarthy, Griffith Universität, Brisbane, Australien) zur Anwendung.

### 3.5 Statistik

Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde Microsoft Excel 2003 verwendet. Mittels One-way ANOVA (analysis of variance) und anschließendem Tukey-Kramer-Test wurden Signifikanzen ermittelt. Dazu wurde GraphPad InStat 3.05 (GraphPad Software San Diego California USA) genutzt. Die Signifikanz-Stufen sind durch folgende Symbolik in den Diagrammen dargestellt: \* - P<0,05 ; \*\* - P<0,01 ; \*\*\* - P<0,001.



### 3.6 Mikroskopische Dokumentation

#### 3.6.1 Lichtmikroskopische Untersuchung

Zur lichtmikroskopischen Dokumentation der Versuche wurden Proben entnommen und unter dem Mikroskop (Axiovert, Zeiss Jena) mit angeschlossener CCD-Kamera (*charge coupled device*) ausgewertet.

#### 3.6.2 Fluoreszenzmikroskopie zur Lokalisierung von Cd(II)

Zur Untersuchung der Cd(II)-Verteilung innerhalb der *P. patens*-Kultur wurde der Fluoreszenzfarbstoff BTC-5N verwendet. Da der Farbstoff auch Ca(II)-sensitiv ist, wurde das Material 3x mit Ca(II)-freiem ABC-Medium gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit 100  $\mu$ M BTC-5N (Stammlösung: 10 mM in DMSO) für 90 min im Dunkeln. Anschließend wurde erneut 3x mit Ca(II)-freiem ABC-Medium gewaschen. Danach wurde die Cd(II)-Lokalisation in einem Fluoreszenz-Mikroskop (Axiovert/Zeiss Jena, Filter FS09, Xenon-Lichtquelle) beobachtet. Es wurden jeweils zwei Bilder von einem Bildausschnitt gemacht, eines unter Normallicht und eines nach Fluoreszenzanregung.

#### 3.6.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

##### - Gefrierfixierung

Das Material wurde zwischen zwei Trägerplättchen aus Kupfer gelegt und im Kryojet (JFD 030, Balzers, Liechtenstein) von zwei Seiten mit einem Strahl des Kühlmittels (flüssiges Propan) beschossen. Danach wurden die Proben in flüssigem Stickstoff bis zur anschließenden Gefriersubstitution aufbewahrt.

##### - Gefriersubstitution

Die Proben wurden in ein Substitutionsgerät (Csauto, Leica, Deutschland) mit gekühltem Aceton über einen Zeitraum von 3 Tagen bei  $-80$  °C substituiert. Nach Ablauf der Substitutionszeit wurden die nun wasserfreien Objekte langsam erwärmt ( $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) und nach Erreichen der RT mit Epoxidharz (ERL) nach folgendem Schema infiltriert:

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

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

- EDX-Messungen

Ultradünne Schnitte des gefriersubstituierten Materials wurden am Ultramikrotom mit einem Diamantmesser hergestellt und auf Trägernetze aufgenommen. Die Messungen erfolgten unter folgenden Bedingungen:

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

- EDX-Analyse

Gerät: EDX-System Link exl II (Oxford Instruments, High Wycombe; Bucks, U.K.)

Spotgröße: 100 nm

Beschleunigungsspannung: 80 keV

Emissionsstrom: 18-20  $\mu$ A

- Kontrastierung der Ultradünnschnitte

Für Strukturaufnahmen erfolgte zur Erhöhung des Kontrastes eine Kontrastierung der Proben mit Blei und Uranylacetat.

Bleicitratlösung: 1,5 g Bleiacetat

1,76 g Na-citrat

→ in 30 ml H<sub>2</sub>O schütteln, nach ca. 30 min 8 ml NaOH (frisch zubereiten) dazugeben

Uranylacetatlösung: 5 % (w/v) Uranylacetat in H<sub>2</sub>O