

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Vitalität und des Phänotyps

4.1.1 Chlorophyllgehalt

Zur Charakterisierung der Vitalität unter Cd(II)-Stress wurde die Chlorophyllkonzentration bestimmt. In Abb. 7 ist der Gesamtchlorophyllgehalt dargestellt.

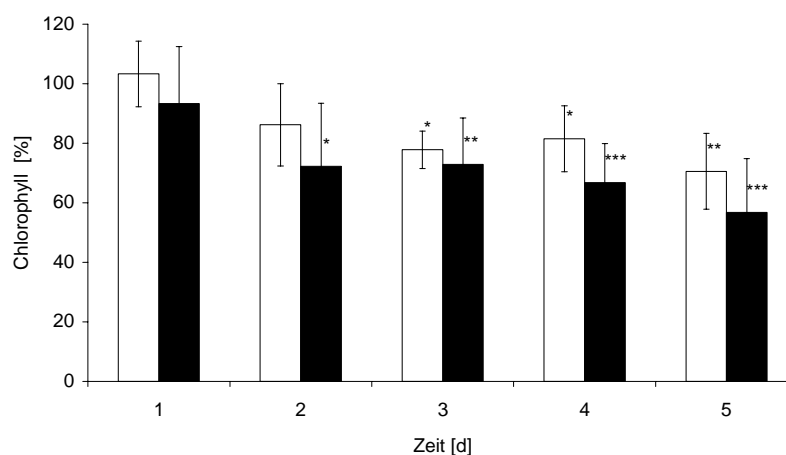


Abb. 7 Einfluss verschiedener Cd(II)-Konzentrationen auf den Gesamtchlorophyllgehalt in *P. patens* (% der Kontrolle, □ - 5 µM, ■ - 10 µM; n=4)

Die Chlorophyll-Konzentration in *P. patens* nahm nach Cd(II)-Exposition mit zunehmender Versuchsdauer kontinuierlich ab. Im Vergleich mit unbehandelten Proben war der Gehalt bereits zwei (10 µM) bzw. drei Tage (5 µM) nach Beginn des Experimentes signifikant geringer. Unter 10 µM Cd(II) wurde eine stärkere Abnahme des Chlorophyllgehaltes beobachtet als in mit 5 µM Cd(II) exponierten Proben. Die Auswirkungen auf Chlorophyll a und b sind in Abb. 8 dargestellt.

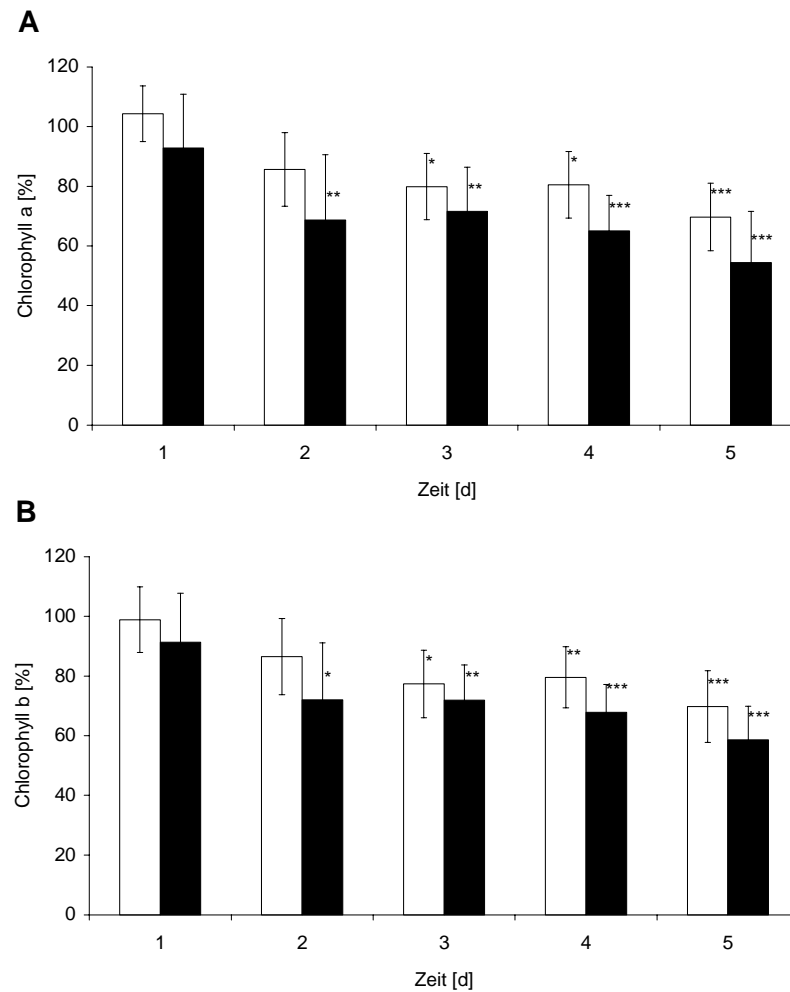


Abb. 8 Einfluss von Cd(II) auf den Gehalt von Chlorophyll a (A) und b (B) in *P. patens* (% der Kontrolle, \square - 5 μ M, \blacksquare - 10 μ M; n=4)

Von der Abnahme waren sowohl Chlorophyll a als auch Chlorophyll b betroffen. Der Anteil an Chlorophyll b verringert sich bei den 10 μ M-Cd(II)-Proben etwas stärker im Vergleich mit Chlorophyll a. Dies wird besser durch den Quotienten aus Chlorophyll a und Chlorophyll b verdeutlicht (Abb. 9).

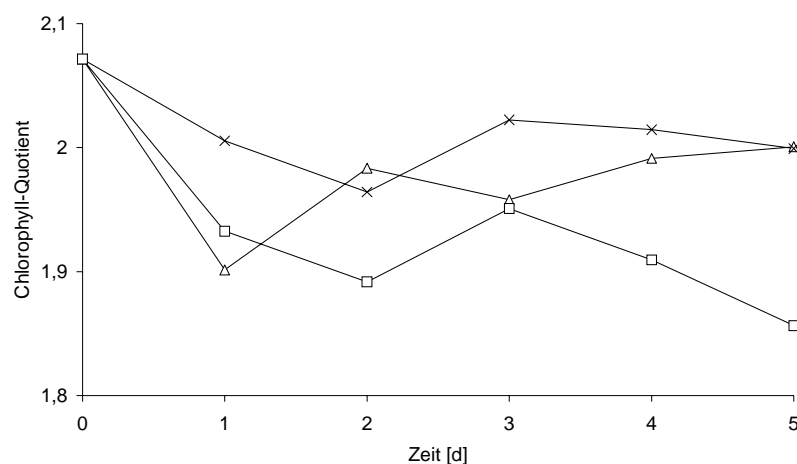


Abb. 9 Einfluss von Cd(II) auf den Chlorophyll-Quotienten in *P. patens* (x - Kontrolle, Δ - 5 µM, □ - 10 µM; n=4)

In *P. patens* wurde ein Absinken des Chlorophyll-Quotienten bei 10 µM Cd(II) im Medium beobachtet.

In Abb. 10 ist der Carotinoid-Gehalt dargestellt.

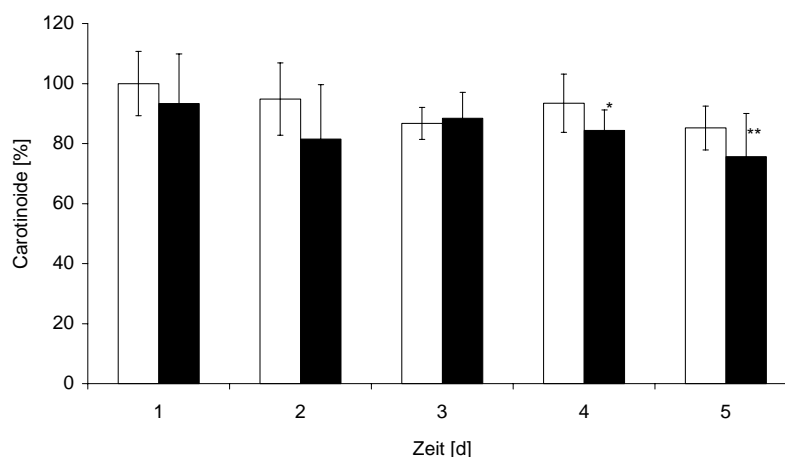


Abb. 10 Einfluss von Cd(II) auf den Gehalt an Carotinoiden in *P. patens* (% der Kontrolle, □ - 5 µM, ■ - 10 µM; n=4)

Im Vergleich mit Chlorophyll verringerte sich der Carotinoid-Gehalt in *P. patens* weniger stark. Erst nach vier Tagen 10 µM Cd(II) wurde eine signifikante Abnahme auf etwa 80 % des Kontrollwertes ermittelt.

Als weiterer Vitalitätsparameter wurde die Photosystem-II-Effizienz gewählt. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 dargestellt.

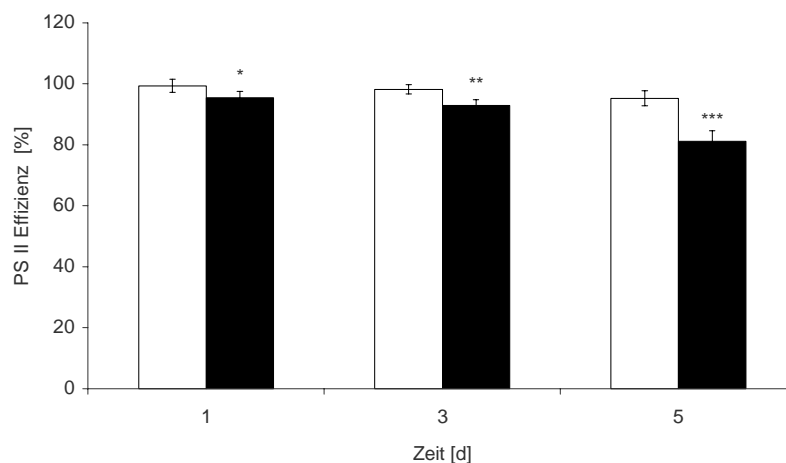


Abb. 11 Einfluss von Cd(II) auf die Photosystem-II-Effizienz in *P. patens* (% der Kontrolle, □ - 5 μ M, ■ - 10 μ M; n=3)

Die Photosystem-II-Effizienz nahm in den Cd(II)-Kulturen proportional zur Versuchsdauer und Cd(II)-Konzentration kontinuierlich ab. Im Gegensatz zu den mit 5 μ M Cd(II) gestressten Kulturen war die Abnahme bei den 10 μ M-Cd(II)-Proben signifikant.

Der Gesamtchlorophyllgehalt der Δapr -Mutanten ist in Abb. 12 dargestellt.

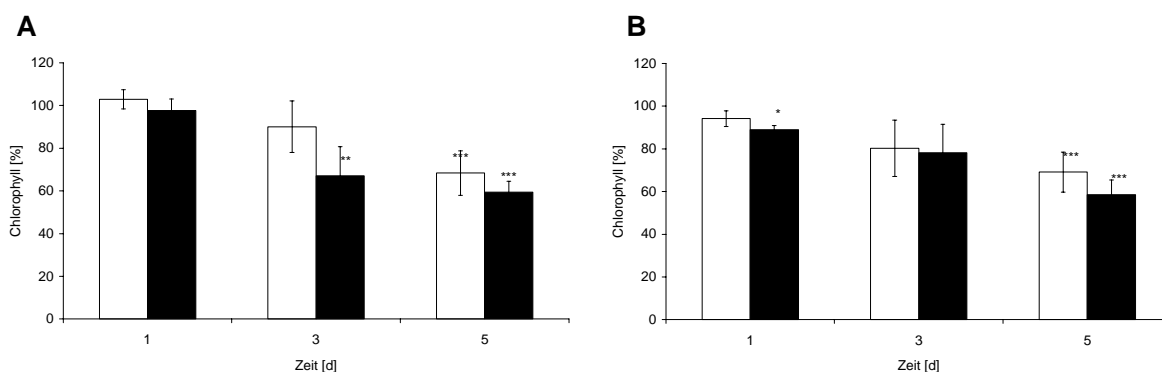


Abb. 12 Auswirkungen von Cd(II) auf den Gesamtchlorophyllgehalt bei Mutante 11-3-12 (A) bzw. Mutante 12-4-3 (B) (% der Kontrolle, □ - 5 μ M, ■ - 10 μ M; n=4)

Bei den Δapr -Mutanten wurde ein dem Wildtyp vergleichbarer Rückgang der Chlorophyll-Konzentration unter Cd(II)-Stress beobachtet. Der Gesamtchlorophyllgehalt der ungestressten Kulturen von Wildtyp und Mutanten ist in Abb. 13 dargestellt.

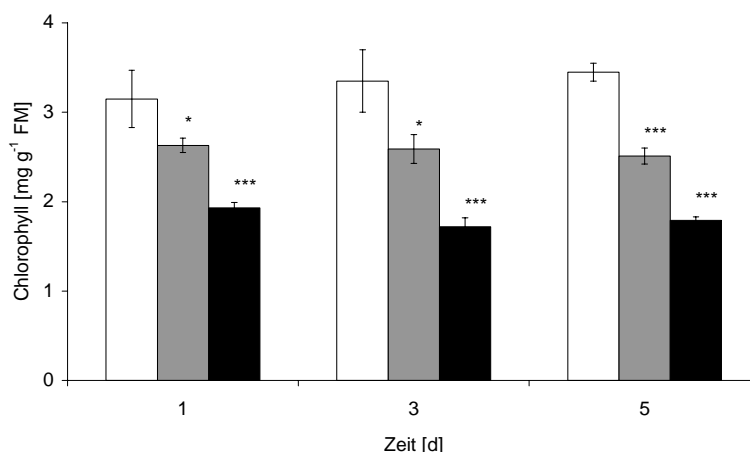


Abb. 13 Gesamtchlorophyllgehalt von Wildtyp (□), Mutante 11-3-12 (■) und Mutante 12-4-3 (■) in Abhängigkeit von der Kulturzeit

Im Vergleich zum Wildtyp war die Chlorophyll-Konzentration der Mutanten-Kulturen signifikant niedriger. Während Mutante 11-4-3 noch etwa 80 % des Wildtyp-Gehaltes aufwies, betrug dieser Wert bei Mutante 12-4-3 nur ca. 50 %.

4.1.2 Lichtmikroskopische Dokumentation

Lichtmikroskopische Beobachtungen dienten zur Feststellung Cd(II)-bedingter Veränderungen morphologischer bzw. physiologischer Natur. Die Cd(II)-behandelten Kulturen wiesen eine bräunliche Verfärbung auf, die mit Expositionsdauer und Konzentration weiter zunahm. Die Verfärbung war nicht gleichmässig ausgeprägt: während die einzelnen Moosblättchen noch dunkelgrün und vital erschienen, zeigten die Zellen der Chloronemata deutliche Verfärbungen. Hinsichtlich der Zellteilung wurden weitere Unterschiede zwischen unbehandelten und Cd(II)-gestressten Kulturen gefunden. Dabei offenbarten letztere eine auffallend höhere und unregelmässigeren Verzweigungsrate im Vergleich zur Kontrolle. Außerdem waren die daraus entstandenen Zellen abnorm und verkümmert, häufig besaßen sie eine anomale Zellform. Fortgesetztes Längenwachstum blieb an diesen Verzweigungsstellen meistens aus (Anhang B, S. xiii, Abb. 1). Erst nach längerer Cd(II)-Einwirkung konnte eine Verdickung der Zellwand beobachtet werden. Sie ist durch eine bräunliche Auflagerung auf die ursprüngliche Wand gekennzeichnet und tritt nur vereinzelt bei Chloronemata-Zellen auf. Diese Veränderung kann jedoch auch extrem Ausmaße erreichen, wobei die ursprüngliche Zelldicke überschritten werden kann (Anhang B, S. xiv, Abb. 2).

Die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes BTC-5N ermöglichte die Untersuchung der Cd(II)-Verteilung in *P. patens*. Neben einer schwachen Hintergrundfluoreszenz (Kontroll- und

Cd(II)-Proben), welche von einer Ca(II)-Bindung des Farbstoffes herrührt, konnten in den Cd(II)-gestressten Zellen Niederschläge entdeckt werden, die den gesamten Protoplasten ausfüllen. Zudem wiesen die BTC-5N-positiven Zellen keine Chloroplasten auf (Anhang B, S. xv, Abb. 3-Abb. 5).

4.1.3 Elektronenmikroskopische Analysen

Zur Bestimmung der Cd(II)-Lokalisation in *P. patens* wurde die EDX-Elektronenmikroskopie (*energy dispersive X-ray*, s. 3.6.3) benutzt. Wie man den Spektren (Abb. 14) entnehmen kann, konnte kein Cd(II) nachgewiesen werden. Der Cd(II)-Peak hätte sich zwischen Cl- und Sn-Peak befunden. Es wurden mehrere Messungen durch gezielte Punktanalysen durchgeführt.

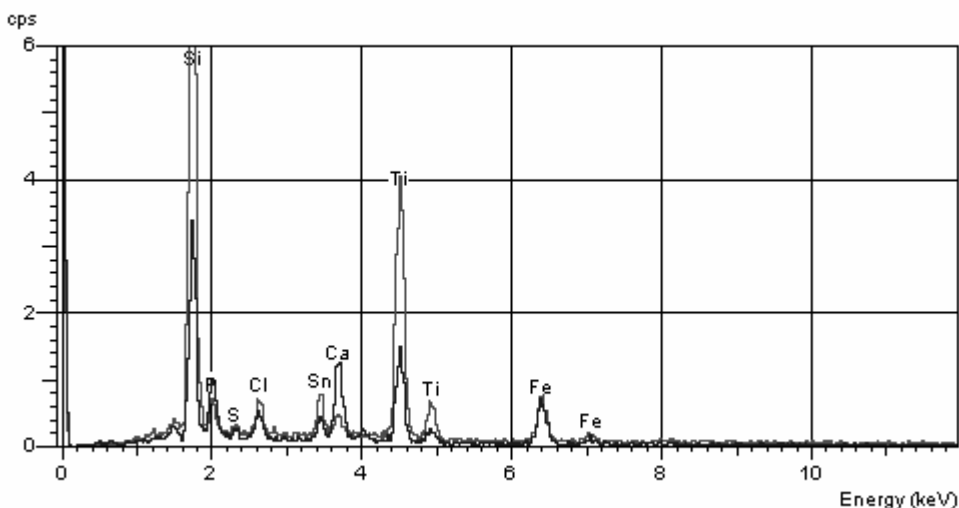


Abb. 14 EDX-Spektren von Niederschlägen in mit 10 μM Cd(II) gestressten *P. patens*

4.2 Untersuchungen zur Biosorption und Bioakkumulation von Cd(II)

4.2.1 Biosorption und Bioakkumulation in herkömmlichen ABC-Medium

Die Cd(II)-Biosorption und -Bioakkumulation in *P. patens* wurde gemäss 3.2.5 bestimmt. Die Wiederfindungsraten lagen im Bereich von 90 % bis 110 % (s. Anhang A, S. iii). In Abb. 15 ist die Biosorption von *P. patens* dargestellt.

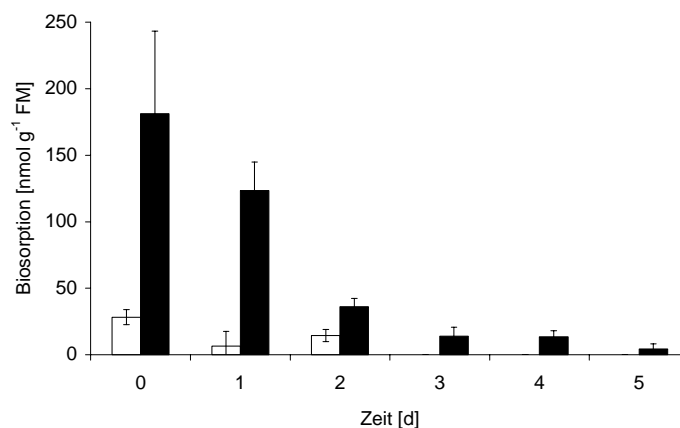


Abb. 15 Biosorption durch *P. patens* in Abhängigkeit von der Cd(II)-Konzentration unter normalen Kultivierungsbedingungen (□ - 5 µM, ■ - 10 µM; n=3) Null Tage stellen dabei die Ergebnisse nach einminütiger Inkubation mit Cd(II) dar

Die Cd(II)-Biosorption nahm stetig ab. Bei Exposition mit 10 µM Cd(II) wurde deutlich mehr Cd(II) biosorbiert als bei mit 5 µM Cd(II) behandelten Kulturen. Bereits nach drei Tagen fiel die adsorbierte Menge der 5 µM-Cd(II)-Proben unter die Nachweisgrenze.

Die Ergebnisse der Cd(II)-Bioakkumulation von *P. patens* sind in Abb. 16 dargestellt.

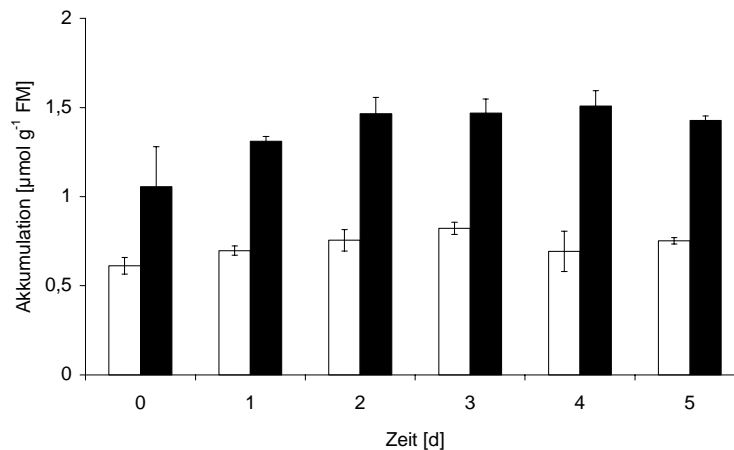


Abb. 16 Bioakkumulation durch *P. patens* in Abhängigkeit von der Cd(II)-Konzentration (□ - 5 µM, ■ - 10 µM; n=3)

Im Gegensatz zur Biosorption stellt die Bioakkumulation einen wesentlichen Anteil der Cd(II)-Verteilung in *P. patens* dar. Dabei akkumulierten die mit 10 µM Cd(II) behandelten Kulturen etwa die doppelte Cd(II)-Menge im Vergleich mit den 5 µM-Cd(II)-Proben. Sehr schnell wurde ein Maximum erreicht (10 µM : 2 d; 5 µM : 3 d), welches sich auch nach längerer Inkubation nicht änderte.

4.2.2 Bioakkumulation unter erhöhtem Sulfat-Gehalt

Zur Überprüfung, ob die Bioakkumulation (4.2.1) durch zusätzliche Sulfatgabe beeinflussbar war, wurden Mooskulturen in Medium mit erhöhter Sulfatkonzentration und $10 \mu\text{M Cd(II)}$ kultiviert. Als Sulfatsalze wurden Natrium- und Magnesiumsulfat zur Differenzierung zwischen mono- und bivalenten Kationen verwendet. Die Ergebnisse wurden statistisch mit den unter herkömmlichen Anzuchtbedingungen (1 mM MgSO_4) erhaltenen Werten verglichen und sind in Abb. 17 dargestellt.

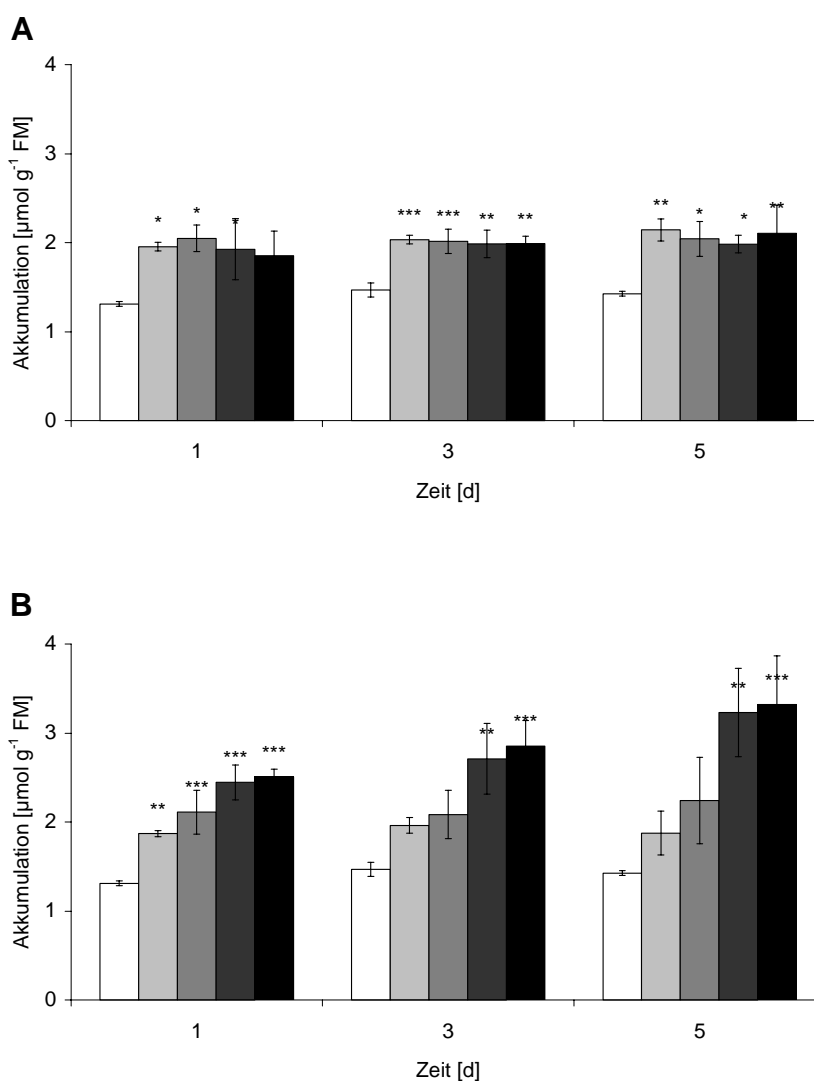


Abb. 17 Cd(II)-Akkumulation durch *P. patens* in Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration im Medium, (A – Na_2SO_4 , B – MgSO_4) (□ - ABC-Medium, ■ - 2 mM, ■ - 4 mM, ■ - 6 mM, ■ - 8 mM; n=3)

P. patens akkumuliert in Medium mit erhöhter Sulfatkonzentration signifikant mehr Cd(II) als bei Anzucht in nicht-modifiziertem Medium. Bereits 24 h nach Cd(II)-Gabe wurde eine um ca. 50 % höhere Aufnahme beobachtet. Während die akkumulierte Cd(II)-Menge bei den

verschiedenen Na_2SO_4 -Konzentrationen konstant blieb, wurde bei Erhöhung der MgSO_4 -Gehalte eine kontinuierliche Steigerung der intrazellulären Cd(II)-Menge erreicht.

4.3 Datenbank-Recherche

Mit Ausnahme der APK konnten für alle Enzyme der Cys- bzw. GSH-Biosynthese frei zugängliche EST-Sequenzen von *P. patens* ermittelt werden. Zum Zeitpunkt der Experimente wurde je eine Sequenz für ATPS, APR, PAPR, SAT, γ -ECS bzw. GSHS gefunden. Für SiR bzw. OAS-TL waren zwei Sequenzen verfügbar, jedoch wurde nur für jeweils eine Sequenz das PCR-Produkt erhalten. Zusätzlich wurde getestet, ob die verwendeten Primerpaare an neuere EST-Sequenzen des gleichen Enzyms binden. Dies war nicht der Fall. Demzufolge handelt es sich bei den Induktionsraten nicht um einen summarischen Parameter aller möglichen Isoformen. Anhand von *in silico*-Analysen (s. 3.4.1) wurde überprüft, ob die EST-Sequenzen von *P. patens* Homologien mit den in Datenbanken verfügbaren Sequenzinformationen aufweisen. Dies geschah sowohl auf DNA- als auch auf Protein-Ebene. Außerdem wurde die mögliche zelluläre Lokalisierung der aus den EST-Daten abgeleiteten Proteine ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8 Mögliche Lokalisierung (in %) der aus den EST-Sequenzen abgeleiteten Proteine sowie Homologien (in %) mit Datenbankeinträgen entsprechender Enzyme auf DNA-(blastn) bzw. Protein-Ebene (blastx)

	Lokalisierung	[%]	blastn	Organismus	blastx	Organismus
			[%]		[%]	
ATPS	-	-	88	<i>Allium cepa</i>	82	<i>A. thaliana</i>
			79	<i>Brassica napus</i>	82	<i>Brassica juncea</i>
			78	<i>A. thaliana</i>	79	<i>Glycine max</i>
APR	Chloroplast	99,7	90	<i>A. thaliana</i>	59	<i>Glycine max</i>
			89	<i>Glycine max</i>	58	<i>A. thaliana</i>
PAPR	Chloroplast	99,7	-	-	70	<i>Selaginella lepidophylla</i>
SiR	Cytoplasma	99,9	88	<i>Glycine max</i>	71	<i>Glycine max</i>
			85	<i>Oryza sativa</i>	71	<i>A. thaliana</i>
SAT	-	-	-	-	67	<i>Nicotiana tabacum</i>
					62	<i>Glycine max</i>
OAS-TL	Mitochondri m	100	82	<i>Oryza sativa</i>	77	<i>Oryza sativa</i>
			79	<i>Brassica juncea</i>	76	<i>A. thaliana</i>
			78	<i>A. thaliana</i>		
γ -ECS	Chloroplast	99,7	86	<i>Triticum aestivum</i>	72	<i>Nicotiana tabacum</i>
			84	<i>Oryza sativa</i>	71	<i>A. thaliana</i>
GSHS	Chloroplast	99,7	90	<i>Pisum sativum</i>	61	<i>Zea mays</i>
					58	<i>A. thaliana</i>
GST3	Cytoplasma	100			56	<i>Glycine max</i>
					55	<i>A. thaliana</i>
GST4	Cytoplasma	100	93	<i>A. thaliana</i>	43	<i>A. thaliana</i>

4.4 Analysen zur Genexpression

Mit Hilfe der *real-time*-PCR wurde die cDNA-Menge einer unbekanntenen Probe bestimmt. Dabei wird ein fluoreszierendes Reportersignal im PCR-Reaktionsansatz detektiert, welches proportional zur Menge an PCR-Produkt ist. Im vorliegenden Fall wurde der in doppelsträngige DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®]-Green I benutzt. Ein typischer Amplifikationsgraph nach *real-time* PCR ist in Abb. 18 dargestellt. Dabei ist auf der Abszisse die Zyklenzahl dargestellt, die Ordinate gibt die Fluoreszenzeinheiten nach Basislinien-Subtraktion

in logarithmischer Form wieder. Aufgrund dieser Darstellungsweise erscheint die exponentielle Phase der PCR-Reaktion linear. Anschließend wird bei einer bestimmten Fluoreszenzintensität (horizontaler Balken) das Lot gefällt und der entsprechende Ct-Wert ermittelt. Die verwendete Intensität wurde optimiert und betrug bei der Datenermittlung immer 100,9. Der Ct-Wert (*threshold cycle*, Schwellenwert) ist durch denjenigen Zyklus innerhalb einer PCR-Reaktion gekennzeichnet, bei dem die Konzentration eines PCR-Fragmentes eine bestimmte Schwellenkonzentration überschreitet. Je früher diese erreicht wird, desto größer war die Menge an DNA zu Beginn der PCR, d.h. Ct-Wert und DNA-Menge sind umgekehrt proportional.

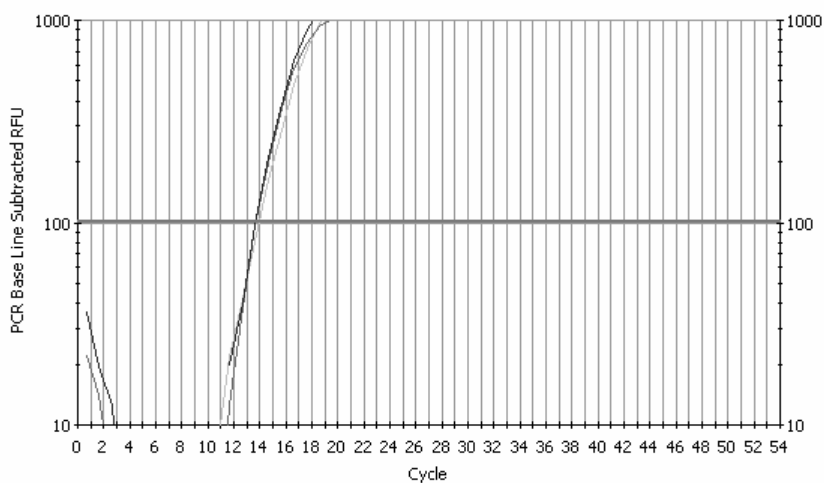


Abb. 18 *real-time* PCR-Amplifikationsgraph, Rubisco, Kontrolle 3 Tage (n=3)

Am Ende des *real-time* PCR-Programms wurde eine Schmelzkurve zur Überprüfung der Produktspezifität aufgenommen (s. Abb. 19). Zur Optimierung wurden die Ergebnisse der Schmelzkurven zusätzlich durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

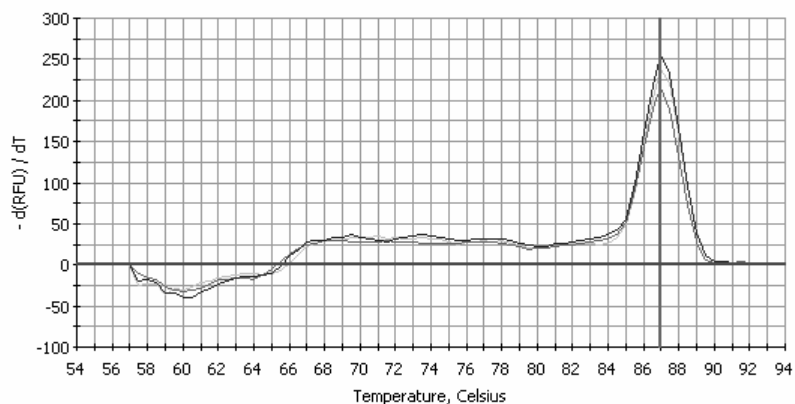


Abb. 19 Schmelzkurve nach *real-time* PCR, Rubisco, Kontrolle 3 Tage (n=3)

Ein einziger scharfer Peak bei Temperaturen von 80-90 °C stellte dabei das gewünschte PCR-Produkt dar. Ein breiter Peak bei niedrigeren Temperaturen war ein Indiz für die Bildung von Primerdimeren. In diesem Fall, sowie bei Erhalt mehrerer Peaks in der Schmelzkurve oder bei Bildung von spezifischen Produkten in der Negativkontrolle, wurden die Ergebnisse nicht verwendet.

4.4.1 Bestimmung eines Referenzgens

Zu Beginn der Untersuchungen zur Expression bestimmter Gene musste ein Gen ermittelt werden, welches auf Transkriptionsebene nicht durch Cd(II)-Stress beeinflussbar war. Die Bestimmung dieses, im Nachfolgenden als Referenzgen bezeichneten Gens, war schwierig, da Schwermetallstress die Transkription vieler Gene beeinflusst. Als Kandidaten wurden die in der Literatur häufig verwendeten Gene von Aktin, GAP-DH und Rubisco (kleine Untereinheit, kernkodiert) gewählt. Die Ergebnisse sind in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9 Ct-Werte (Mittelwerte±Standardabweichung) möglicher Referenzgene bei unterschiedlicher Inkubationsdauer und verschiedenen Cd(II)-Konzentrationen in *P. patens* (n = 3)

Zeit [d]		Kontrolle	5 µM CdCl ₂	10 µM CdCl ₂
	Aktin			
1		23,9 ± 0,2	22,8 ± 0,1	22,9 ± 0,3
3		23,6 ± 0,3	21,3 ± 0,3	20,5 ± 0,6
5		23,9 ± 0,4	22,0 ± 0,2	21,7 ± 0,4
	GAP-DH			
1		25,7 ± 0,2	23,1 ± 0,8	23,1 ± 0,3
3		25,0 ± 0,4	21,4 ± 0,7	20,7 ± 0,2
5		26,2 ± 0,8	22,8 ± 0,1	22,1 ± 0,6
	Rubisco			
1		14,1 ± 0,2	13,9 ± 0,3	14,2 ± 0,5
3		13,8 ± 0,1	13,9 ± 0,5	14,4 ± 0,2
5		14,2 ± 0,5	15,0 ± 0,3	15,0 ± 0,3

Aktin und GAP-DH kamen als Referenzgene nicht in Frage, da die Befunde auf eine Induktion der Transkription hinwiesen. Im Gegensatz dazu wurde die Transkription des *Rubisco*-Gens

unter Cd(II)-Stress kaum verändert. Aus diesem Grund wurde *Rubisco* als Referenzgen für die Berechnungen der Transkriptionsinduktion bzw. -repression verschiedener Gene ausgewählt.

4.4.2 Gene der Sulfatassimilation und der Glutathionbiosynthese

Zur Quantifizierung der Transkription mittels *real-time* PCR wurde die Methode der relativen Quantifizierung verwendet. Diese beinhaltet die im Vergleich zu einem Referenzgen ermittelte Induktion bzw. Repression der Transkription. Für die Berechnungen wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet. Voraussetzung für deren Anwendung ist eine identische PCR-Effizienz der untersuchten Gene, welche durch gleiche Anstiege im exponentiellen Teil des Amplifikationsgraphs gegeben ist. Die Produktlänge betrug 100-150 bp und als Primer wurden Oligonukleotide verwendet, welche keine Sekundärstrukturen und keine Primerdimere bilden (einzelne Primer und Primerpaare).

Transkriptionsstudien wurden von folgenden Genen der Cys- bzw. GSH-Biosynthese durchgeführt: ATP-Sulfurylase (ATPS), APS-Reduktase (APR), PAPS-Reduktase (PAPR), Sulfit-Reduktase (SiR), Serin-Acetyl-Transferase (SAT), O-Acetylserin(thiol)lyase (OAS-TL), γ -Glutamylcystein-Synthetase (γ -ECS) und Glutathion-Synthetase (GSHS). Die Ergebnisse für einen Tag Cd(II)-Inkubation sind in Abb. 20 dargestellt.

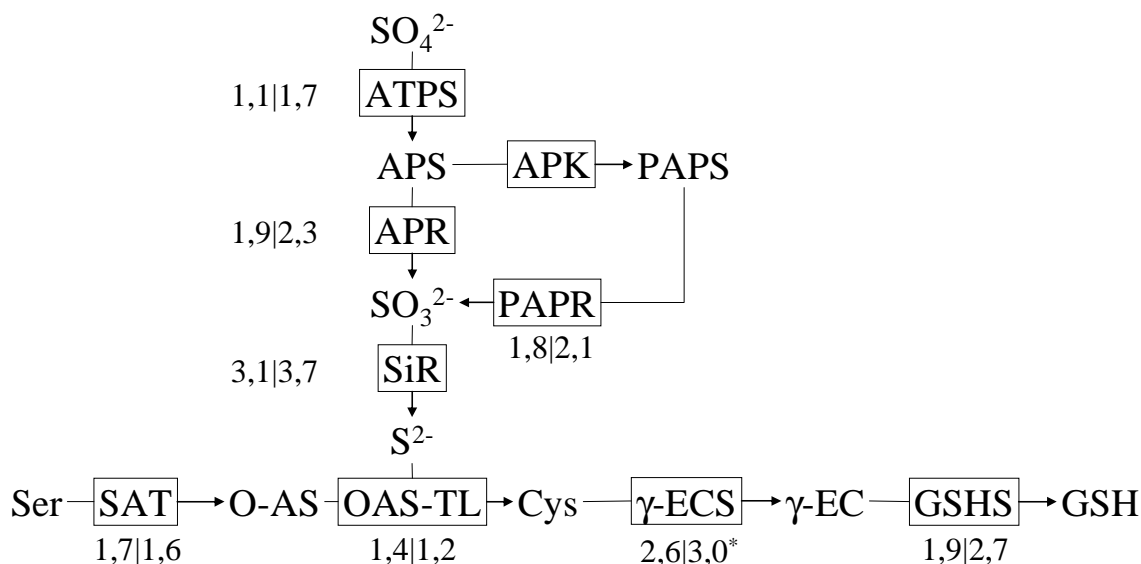


Abb. 20 Veränderung der Transkriptmengen von Enzymen der Sulfatassimilation und der Glutathionbiosynthese in *P. patens* unter Cd(II)-Stress im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle nach einem Tag Inkubationsdauer (5 μ M Cd(II) | 10 μ M Cd(II), n=3)

Nach einem Tag Cd(II)-Exposition wurde bei den Genen von Enzymen der Sulfatassimilation nur eine geringe, nicht-signifikante Transkriptionsinduktion festgestellt. Im Fall der Sulfit-

Reduktase wurde mit einer 3,1- (5 μM) bzw. 3,7- (10 μM) fachen Erhöhung der mRNA-Menge das Maximum erreicht. Die Induktionsraten der GSH-Biosyntheseenzyme waren denen der Cysteinbiosynthese ähnlich. Die Transkriptmenge der γ -EC-Synthetase war unter 10 μM Cd(II) signifikant erhöht.

Die Resultate für den dritten Tag nach Cd(II)-Zugabe sind in Abb. 21 dargestellt.

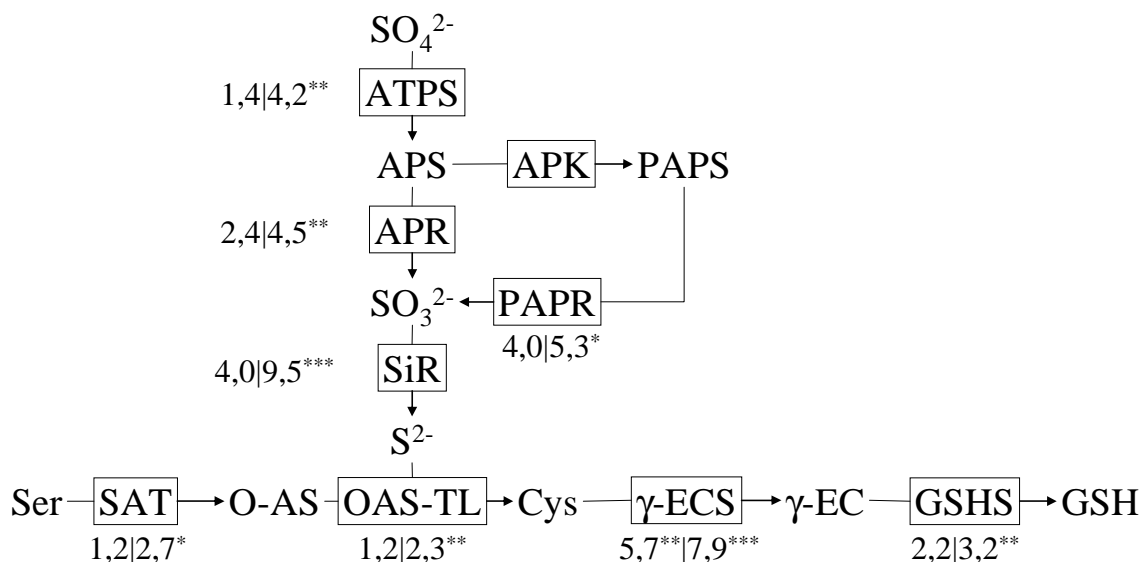


Abb. 21 Veränderung der Transkriptmengen von Enzymen der Sulfatassimilation und der Glutathionbiosynthese in *P. patens* unter Cd(II)-Stress im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle nach drei Tagen Inkubationsdauer (5 μM Cd(II) | 10 μM Cd(II), n=3)

Nach drei Tagen war die Transkription aller getesteten Gene der Cystein- bzw. Glutathionbiosynthese in den mit 10 μM Cd(II) behandelten Kulturen signifikant induziert. Die höchsten Induktionsraten von 9,5 und 7,9 wiesen die Sulfid-Reduktase bzw. die γ -EC-Synthetase auf, während die mRNA-Mengen von SAT, OAS-TL und GSHS vergleichsweise geringe Anstiege zeigten. Im Gegensatz dazu sind die Ergebnisse der 5 μM Cd(II)-Proben den Resultaten ähnlich, welche nach einem Tag unter 10 μM Cd(II) erzielt wurden. Analog dazu konnte nur bei der γ -ECS eine signifikante Erhöhung der Transkriptmenge um das 5,7-fache festgestellt werden, wobei die anderen Enzyme mit Ausnahme von PAPR und SiR (jeweils 4-fach) kaum Veränderungen der mRNA-Mengen aufwiesen.

In Abb. 22 sind die Ergebnisse nach fünftägiger Cd(II)-Belastung dargestellt.

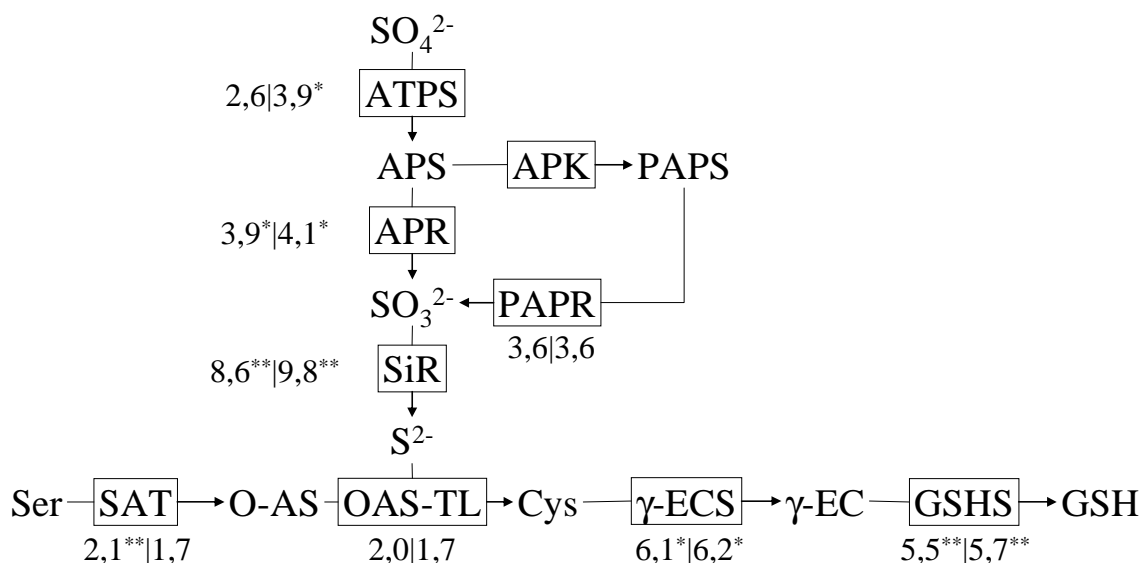


Abb. 22 Veränderung der Transkriptmengen von Enzymen der Sulfatassimilation und der Glutathionbiosynthese in *P. patens* unter Cd(II)-Stress im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle nach fünf Tagen Inkubationsdauer (5 μM Cd(II) | 10 μM Cd(II), n=3)

Die Induktionsraten waren nach fünf Tagen Versuchsdauer bei beiden Cd(II)-Konzentrationen annähernd gleich. Zu diesem Zeitpunkt stellten erneut die Sulfit-Reduktase und die γ -EC-Synthetase die am stärksten induzierten Enzyme dar. Verglichen mit früheren Zeitpunkten zeigte die Glutathion-Synthetase einen auffälligen Anstieg des Transkriptlevels.

4.4.3 Gene, deren Produkte an der Redox-Homöostase beteiligt sind

Zur Analyse der Transkription von Genen, deren Produkte an der Redox-Homöostase beteiligt sind, wurden EST-Sequenzen von Genen verwendet, die Ascorbat-Peroxidase, Ascorbat-Reduktase, Glutathion-Peroxidase bzw. Glutathion-Reduktase kodieren (s. Tab. 7). In Abb. 23 sind die Ergebnisse dargestellt.

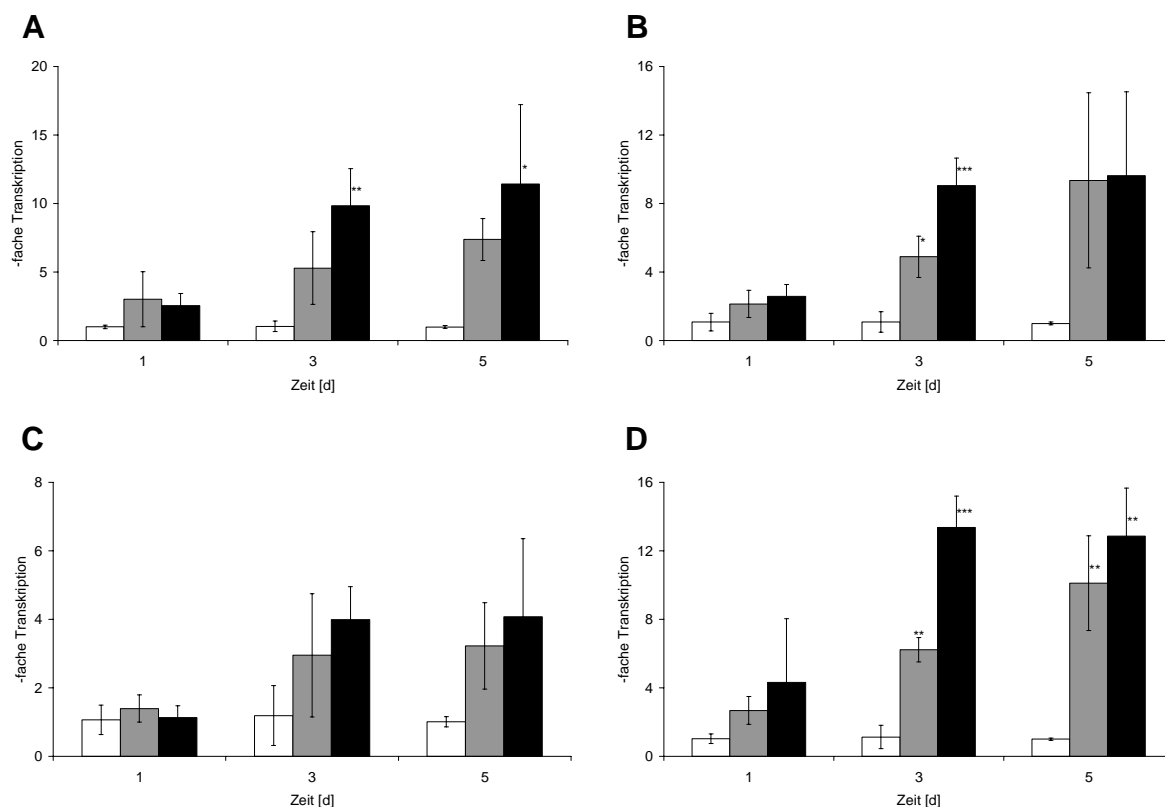


Abb. 23 Veränderung der Transkriptmengen von Genen, deren Produkte an der Redox-Homöostase beteiligt sind in *P. patens* unter Cd(II)-Stress im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (A – Ascorbat-Peroxidase, B – Ascorbat-Reduktase, C – GSH-Peroxidase, D – GSH-Reduktase, □ - Kontrolle, ■ - 5 µM Cd(II), ■ - 10 µM Cd(II), n=3)

Im Fall der GSH-Peroxidase war die Genexpression der Cd(II) nur leicht erhöht: bei diesem Enzym konnten nur geringe, nicht-signifikante Induktionen ab dem dritten Tag beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten die anderen Redox-Enzyme eine konzentrations- und zeitabhängige Erhöhung der Transkriptmenge. Während 24 h nach Cd(II)-Gabe nur schwache Anstiege der mRNA-Gehalte feststellbar waren, konnten nach längerer Expositionsdauer signifikante Unterschiede beobachtet werden. So war die Transkriptmenge von Ascorbat-Peroxidase bzw. Ascorbat-Reduktase um das Zehnfache höher (10 µM CdCl₂) als die der Kontrollproben. Bei der GSH-Reduktase wurde eine 6- bis 14-fache Steigerung der Genexpression in den Cd(II)-gestressten Kulturen ermittelt.

4.4.4 Glutathion-S-Transferasen

Zur Untersuchung der Transkription von Glutathion-S-Transferasen wurden vier EST-Sequenzen (GST1 - GST4) verwendet (s. Tab. 7), die keine Sequenzübereinstimmung untereinander aufwiesen. Die Ergebnisse sind in Abb. 24 dargestellt.

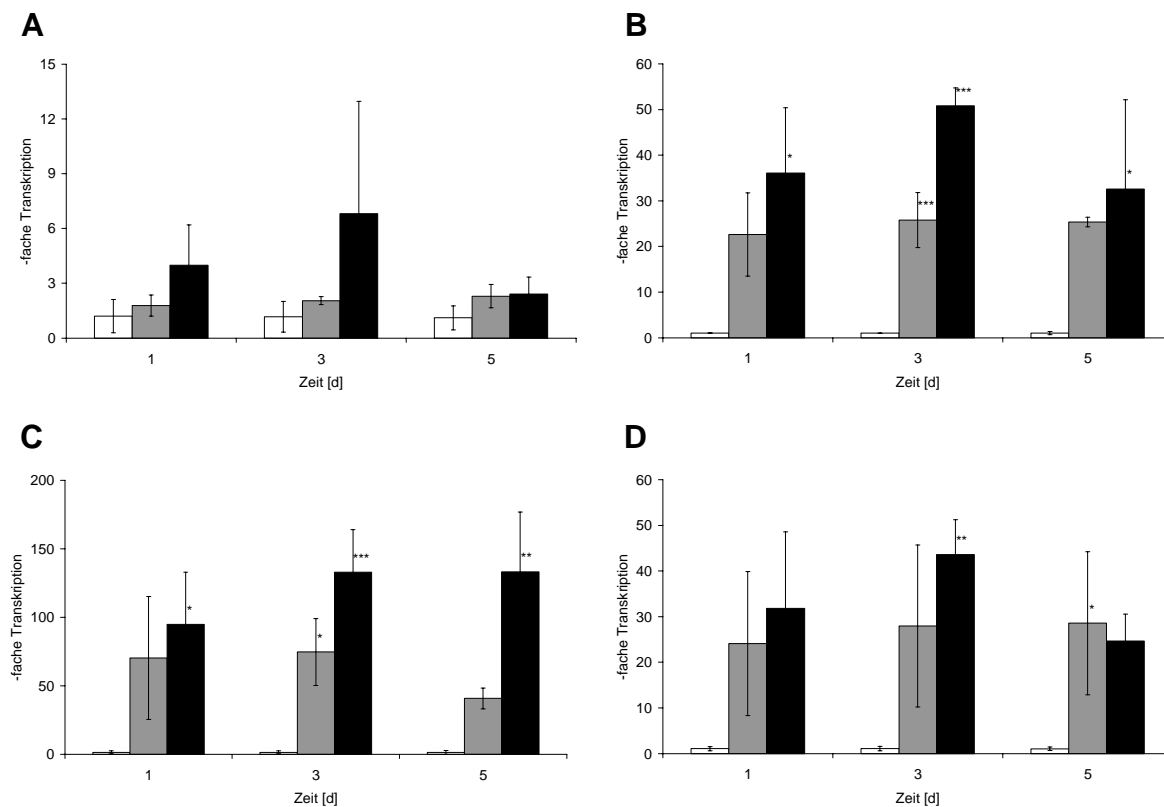


Abb. 24 Veränderung der Transkriptmengen von Glutathion-S-Transferasen in *P. patens* unter Cd(II)-Stress im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (A - GST1, B – GST2, C – GST3, D – GST4, □ - Kontrolle, ■ - 5 μM Cd(II), ■ - 10 μM Cd(II), n=3)

Die Analysen zur Messung der GST-Transkription zeigten die höchsten Werte, die anhand der *real-time*-PCR-Messungen ermittelt wurden. Bereits einen Tag nach Cd(II)-Zugebe wurden Raten von 20- bis 100-facher Induktion (GST2, GST3, GST4) festgestellt. Nach drei Tagen wurden die höchsten Induktionsraten berechnet: bei den mit 10 μM Cd(II) behandelten Kulturen war die mRNA-Menge bis zu 140-fach (GST3) erhöht. Im Fall von GST2 und GST3 waren die Werte signifikant. Im Gegensatz dazu zeigte GST1 keine signifikanten Änderungen im Versuchszeitraum.

4.4.5 Metallothioneine

Zur Analyse der Transkription von Genen, deren Produkte an der Cd(II)-Detoxifizierung beteiligt sein könnten, wurden EST-Sequenzen für ein Metallothionein-ähnliches Protein (*metallothionein-like protein*) „MT A“ und ein Metallothionein „MT B“ verwendet (s. Tab. 7). In Abb. 25 sind die Ergebnisse dargestellt.

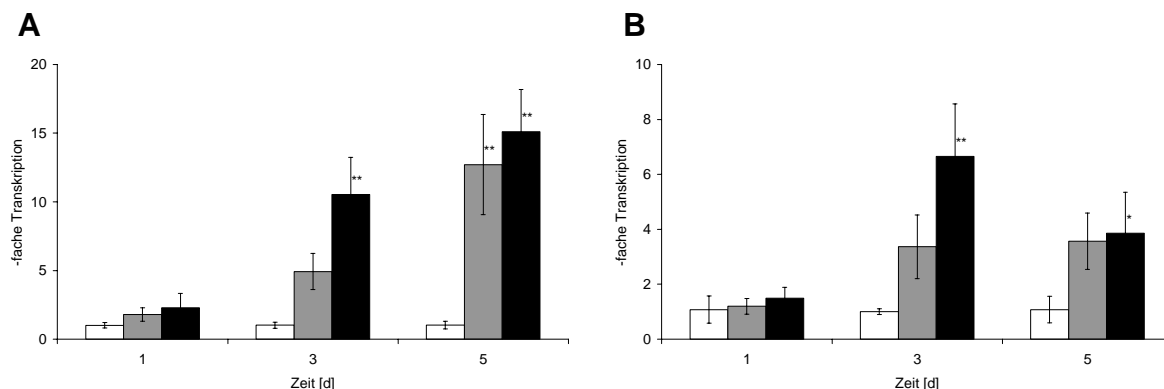


Abb. 25 Veränderung der Transkriptmengen von Genen, deren Produkte zur Schwermetall-Detoxifikation in *P. patens* beitragen könnten im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (A – MT A, B – MT B, □ - Kontrolle, ■ - 5 µM Cd(II), ■ - 10 µM Cd(II), n=3)

MT A und MT B zeigten signifikante Steigerungen ihrer Expression. So betrug die Transkriptmenge von MT A nach fünf Tagen das 13- (5 µM) bzw. 15-fache (10 µM) der Kontrollwerte. Im Fall von MT B wurden nach drei Tagen Zuwächse um das vier- (5 µM) bzw. siebenfache (10 µM) erreicht.

4.5 Untersuchungen zur Enzymaktivität

Aufgrund der Schlüsselstellung innerhalb des Cys- bzw. GSH-Stoffwechsels wurden die Aktivitäten von OAS-TL, γ-ECS und GSHS durch *in vitro*-Enzymassays gemessen.

4.5.1 OAS-TL

Das Enzym O-Acetylserin(thiol)lyase (OAS-TL) katalysiert den letzten Schritt der Sulfat-assimilation (s. 3.3.1). Es überträgt Sulfid auf O-Acetylserin, wobei Cystein entsteht. Die Ergebnisse des OAS-TL-Enzymassays sind in Abb. 26 dargestellt.

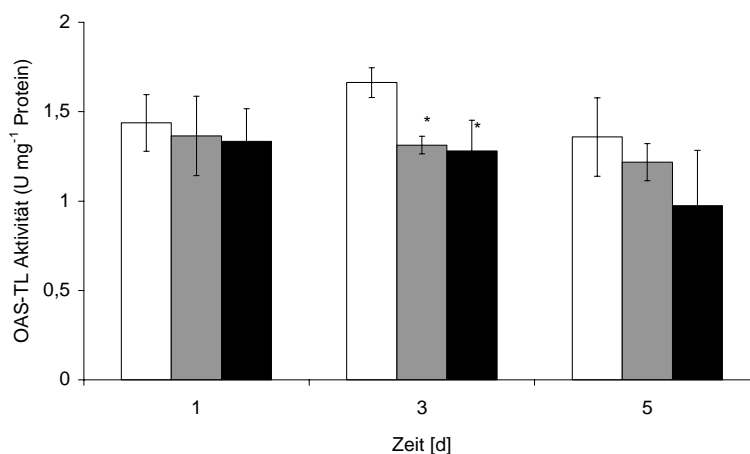
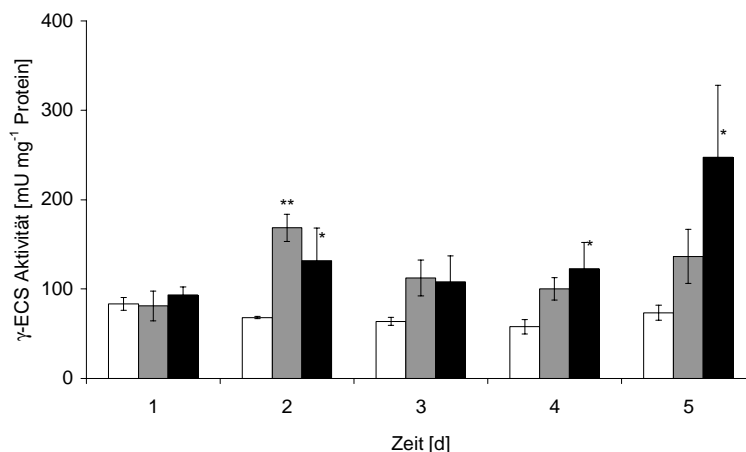


Abb. 26 OAS-TL-Aktivität von *P. patens* (□ - Kontrolle, ■ - 5 μ M Cd(II), ■ - 10 μ M Cd(II); n=3)

Die OAS-TL-Aktivität war in den Cd(II)-exponierten Kulturen niedriger als unter Kontrollbedingungen. Am dritten Tag des Experimentes konnte eine signifikante Abnahme festgestellt werden.

4.5.2 γ -ECS und GSHS

Die γ -Glutamylcystein-Synthetase (γ -ECS) katalysiert den ersten Schritt der GSH-Biosynthese. Die γ -ECS-Aktivitäten von Kontroll- und Cd(II)-Proben sind in Abb. 27 dargestellt.

Abb. 27 γ -ECS-Aktivität von *P. patens* (□ - Kontrolle, ■ - 5 μ M Cd(II), ■ - 10 μ M Cd(II); n=3)

Die Proben wiesen bereits nach zwei Tagen deutliche Unterschiede auf. Hierbei war die γ -ECS-Aktivität unter Cd(II)-Stress höher im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen, die konstante Werte im Untersuchungszeitraum aufwiesen. Während am zweiten bzw. dritten Tag die Aktivität bei 5 μ M Cd(II) noch höher war als unter 10 μ M Cd(II), kehrte sich dieser Trend nach vier Tagen Versuchsdauer um, wobei die höchste Aktivität nach fünf Tagen und 10 μ M Cd(II) erreicht wurde.

Außerdem wurde die Aktivität der Glutathionsynthetase (GSHS) bestimmt, die den letzten Schritt der GSH-Biosynthese ausführt. Dabei wird ein Glycinrest auf γ -Glutamylcystein unter Bildung von Glutathion übertragen, wobei wieder ATP erforderlich ist. In Abb. 28 sind die GSHS-Aktivitäten ersichtlich.

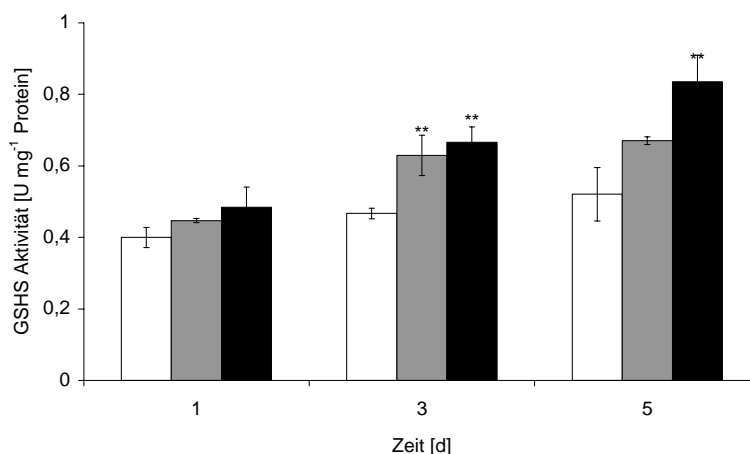


Abb. 28 GSHS-Aktivität von *P. patens* (□ - Kontrolle, ■ - 5 μM Cd(II), ■ - 10 μM Cd(II); n=3)

Auch die Aktivität der Glutathionsynthetase stieg in den Cd(II)-behandelten Proben an. Diese Erhöhung war proportional zur Cd(II)-Konzentration und Expositionsdauer. Bereits nach drei Tagen wurden signifikante Steigerungen festgestellt.

4.5.3 Glutathion-S-Transferasen

Zur Bestimmung der Aktivität von Glutathion-S-Transferasen (GST) wurde ein Enzymassay verwendet, welcher die photometrische Bestimmung des CDNB-GSH-Konjugates beinhaltet. In Abb. 29 sind die Ergebnisse dargestellt.

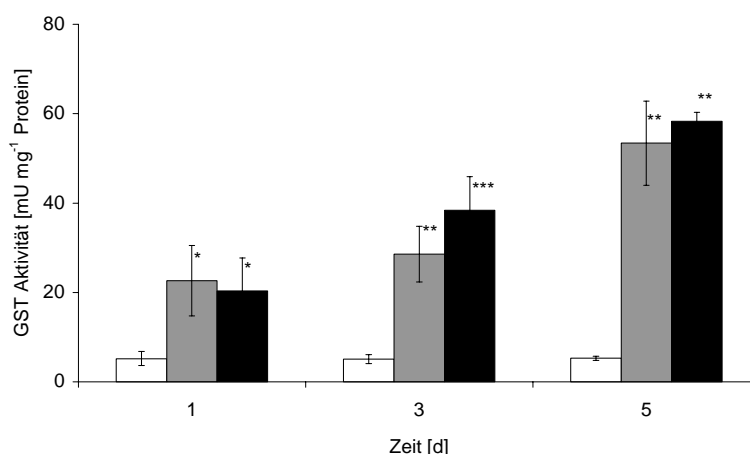


Abb. 29 GST-Aktivität von *P. patens* (□ - Kontrolle, ■ - 5 μM Cd(II), ■ - 10 μM Cd(II); n=3)

Die GST-Aktivität war in den Cd(II)-belasteten Proben bereits nach einem Tag signifikant erhöht. Mit längerer Versuchsdauer nahm diese weiter zu: nach drei bzw. fünf Tagen betrug die

GST-Aktivität in den mit 5 μM Cd(II) versetzten Kulturen das Sechs- bzw. Zehnfache der Kontrolle. Durch Exposition mit 10 μM Cd(II) wurden Aktivitätszunahmen um das Acht- bzw. Zwölffache erreicht. Bei keinem der übrigen Enzyme wurden vergleichbar hohe Werte erhalten.

4.6 Untersuchungen der Thiolgehalte unter Cd(II)-Stress

Auf Metabolit-Ebene wurden die Konzentrationen von Cystein (Cys), γ -Glutamylcystein (γ -EC) und Glutathion (GSH) bestimmt. Cys, γ -EC und Gesamt-GSH (GSH_{ges}) wurden nach 3.2.3 ermittelt. Für die Bestimmung von GSSG und GSH_{red} wurde der enzymatische GSH-Reduktase-Test (s. 3.2.4) verwendet.

4.6.1 Cystein und γ -Glutamylcystein

Cystein stellt das Endprodukt der assimilatorischen Sulfatreduktion dar. In Abb. 30 ist der Cys-Gehalt von *P. patens* dargestellt.

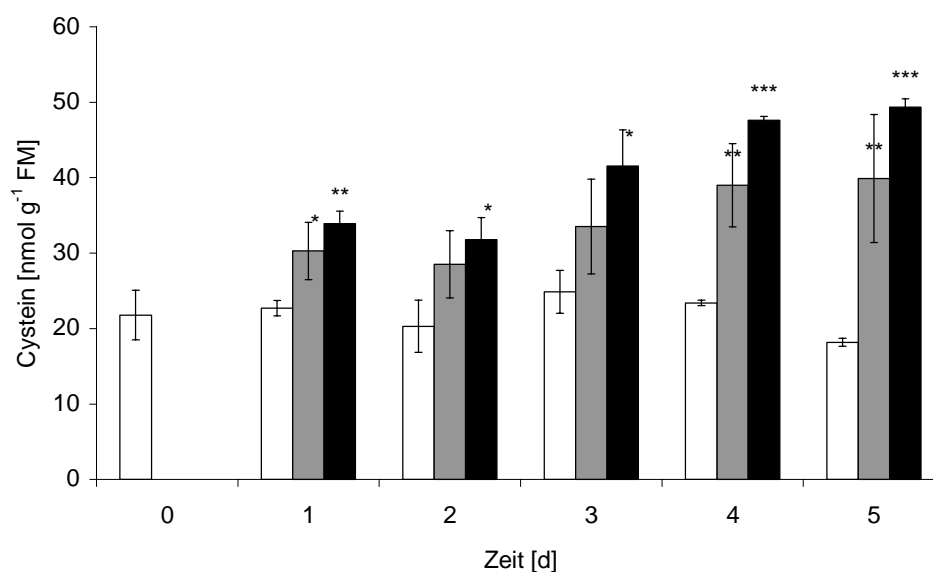


Abb. 30 Cystein-Gehalt von *P. patens* (□ - Kontrolle, ■ - 5 μM Cd(II), ■ - 10 μM Cd(II); n=3)

Unter Cd(II)-Stress stieg die intrazelluläre Cystein-Konzentration im Vergleich zu unbelasteten Proben kontinuierlich an. So war der Cystein-Pool in den Mooskulturen bereits 24 h nach Exposition mit 10 μM Cd(II) signifikant erhöht. Die Werte nach vier Tagen Cd(II)-Inkubation zeigten eine Verdopplung an. Für mit 5 μM Cd(II) behandelte *P. patens*-Kulturen zeichnete sich ein ähnlicher Verlauf ab. In diesem Fall wurden jedoch erst nach vier Tagen signifikante

Unterschiede zur Kontrolle erkennbar, nach fünf Tagen konnte auch hier eine Verdopplung der Cys-Konzentration festgestellt werden.

Neben Cys wurde der γ -EC-Gehalt von *P. patens* ermittelt. Dieser ist in Abb. 31 dargestellt.

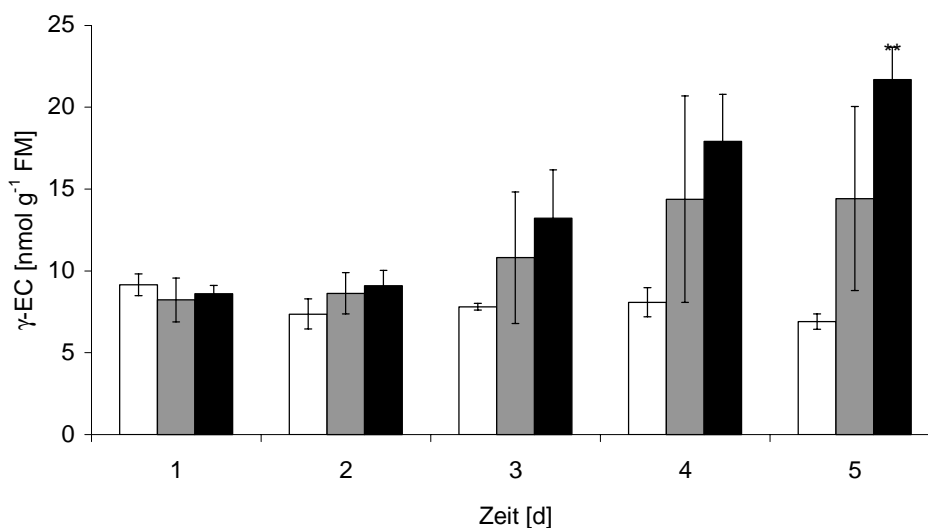


Abb. 31 γ -EC-Gehalt von *P. patens* (□ - Kontrolle, ■ - 5 μ M Cd(II), ■ - 10 μ M Cd(II); n=3)

Auch γ -EC wies einen Anstieg in den Cd(II)-behandelten Proben auf. Auffällig sind die hohen Standardabweichungen der Cd(II)-Ansätze. Nach fünf Tagen 10 μ M Cd(II) wurde eine signifikante Erhöhung festgestellt.

4.6.2 Glutathion

Die Bestimmung des GSH-Gehaltes erfolgte sowohl durch mBBr-Derivatisierung/HPLC als auch mittels GSH-Reduktase. Der enzymatische Test war notwendig, da die GSSG-Bestimmung mittels HPLC keine reproduzierbaren Ergebnisse lieferte.

Der GSH_{ges}-Gehalt (HPLC-Bestimmung) ist in Abb. 32 dargestellt.

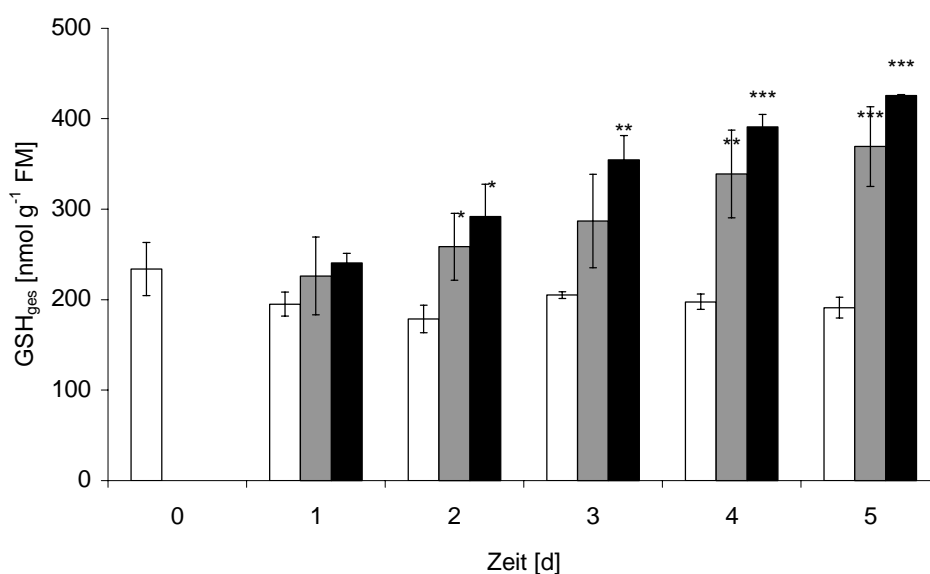


Abb. 32 Gehalt an Glutathion (gesamt) von *P. patens*, HPLC-Bestimmung (□ - Kontrolle, ■ - 5 µM Cd(II), ■ - 10 µM Cd(II); n=3)

Die Konzentration von GSH_{ges} in *P. patens* war etwa um das Zehn- bzw. Zwanzigfache höher im Vergleich mit den Gehalten an Cys bzw. γ-EC. Nach Cd(II)-Belastung wurde eine Erhöhung des GSH-Pools festgestellt. Dies war sowohl durch HPLC-Analyse als auch mittels enzymatischer Bestimmung (Abb. 33) erkennbar. Bei einer Belastung mit 10 µM Cd(II) wurde bereits nach zwei Tagen eine signifikante Erhöhung des GSH-Gehaltes ermittelt. Mit zunehmender Versuchsdauer stieg die GSH-Konzentration weiter an. Wie im Fall des Cysteins war auch hier eine Verdopplung nach vier Tagen zu beobachten. Auch die 5 µM-Cd(II)-gestressten Kulturen reagierten mit einem Anstieg des GSH-Gehaltes. Hier zeigten sich erst ab dem vierten Tag signifikante Werte.

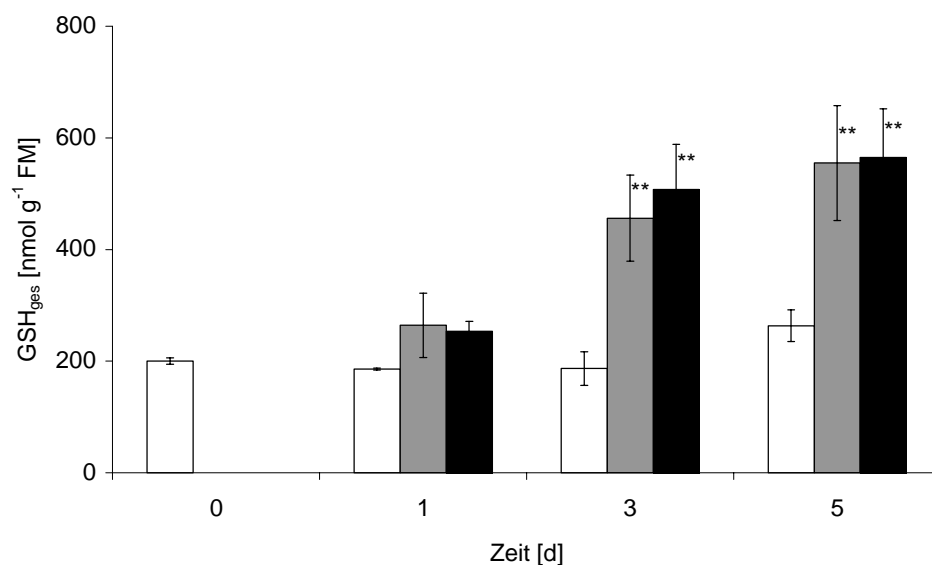


Abb. 33 Gehalt an Glutathion (gesamt) von *P. patens*, enzymatische Bestimmung (□ - Kontrolle, ■ - 5 µM Cd(II), ■ - 10 µM Cd(II); n=3)

Die Bestimmung des oxidierten (GSSG) bzw. reduzierten Glutathions (GSH_{red}) war durch Verwendung des Glutathion-Reduktase-Tests möglich. Die GSH_{red}-Konzentration wurde als Differenz von Gesamt- und oxidiertem GSH bestimmt. In Abb. 34 sind die Ergebnisse für GSSG dargestellt; Abb. 35 zeigt die Werte für reduziertes GSH.

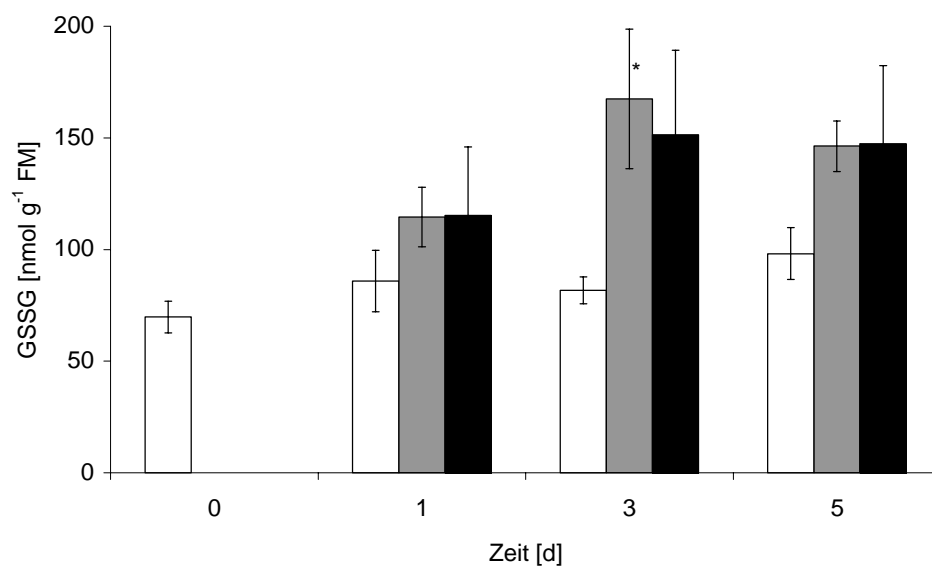


Abb. 34 Gehalt an Glutathion (oxidiert) von *P. patens* (□ - Kontrolle, ■ - 5 µM Cd(II), ■ - 10 µM Cd(II); n=3)

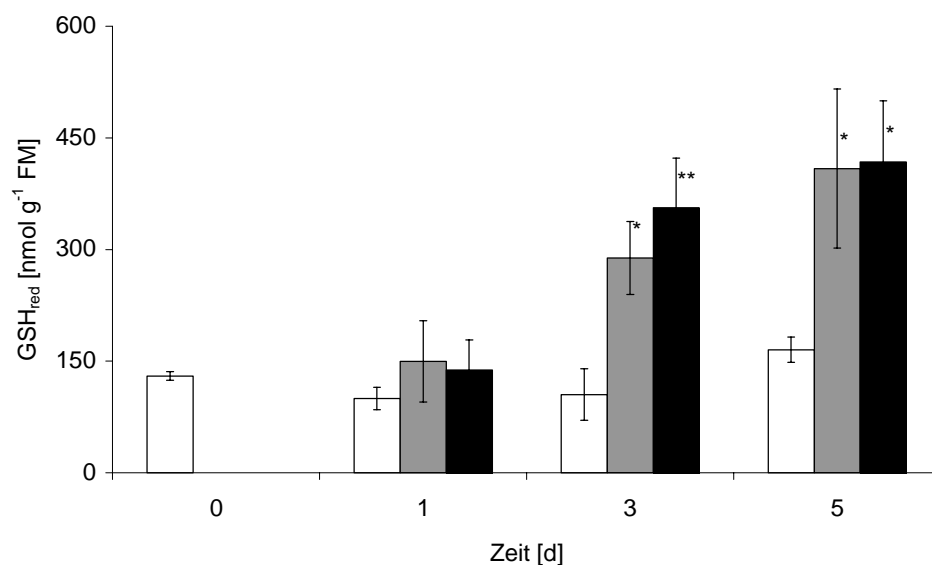


Abb. 35 Gehalt an Glutathion (reduziert) von *P. patens* (□ - Kontrolle, ■ - 5 μM Cd(II), ■ - 10 μM Cd(II); n=3)

Der GSH_{red}-Gehalt war in ungestressten Kulturen von *P. patens* höher als der GSSG-Gehalt. Unter Cd(II)-Stress stiegen beide Metabolite an, GSH_{red} jedoch stärker als GSSG. Bei beiden Cd(II)-Konzentrationen wurden nach drei Tagen signifikante Erhöhungen festgestellt. Die Konzentrationen von GSH_{red} und GSSG wurden zur Berechnung des GSH_{red}/GSSG-Verhältnisses verwendet. Der Verlauf dieses Quotienten ist in Abb. 36 dargestellt.

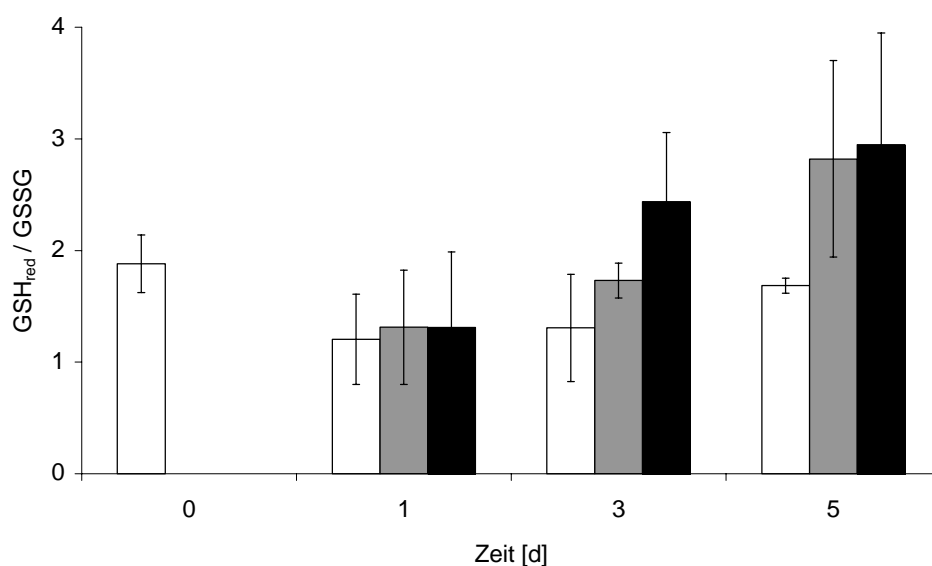


Abb. 36 GSH_{red}/GSSG-Verhältnis in *P. patens* (□ - Kontrolle, ■ - 5 μM Cd(II), ■ - 10 μM Cd(II); n=3)

In *P. patens* wurde ein Anstieg des GSH_{red}/GSSG-Verhältnisses nach drei Tagen Cd(II)-Einwirkung beobachtet. Der prozentuale GSSG-Anteil am GSH_{ges}-Gehalt ist in Abb. 37 dargestellt.

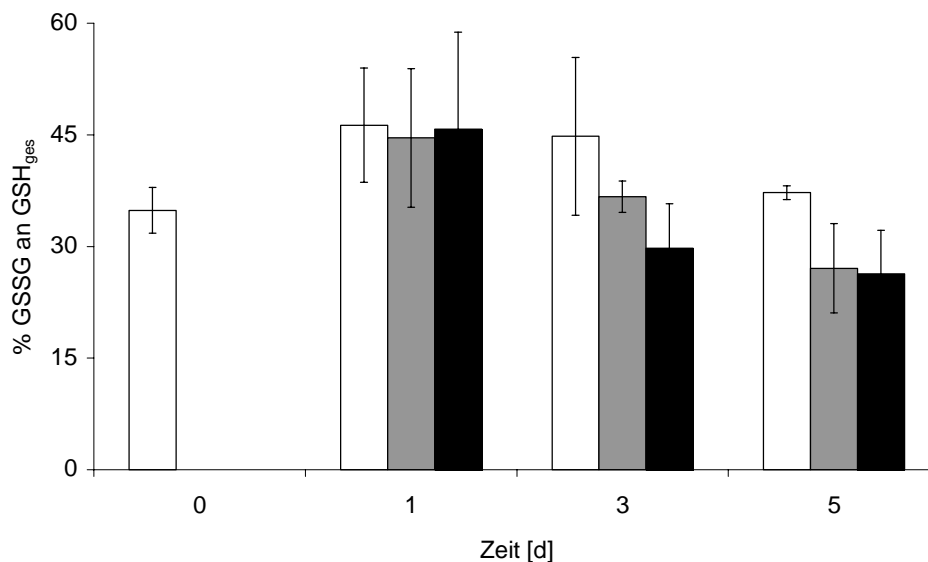


Abb. 37 Prozentualer GSSG-Anteil an GSH_{ges} in *P. patens* (□ - Kontrolle, ■ - 5 μM Cd(II), ■ - 10 μM Cd(II); n=3)

Bei dieser Auftragungsweise war eine Abnahme des GSSG-Anteils am GSH_{ges} bei Cd(II)-Stress erkennbar, die sich im Laufe des Experimentes weiter verstärkt, aber keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle zeigt.

4.6.3 Konzentrationen von Cys und GSH der Δapr-Mutanten

Neben dem Wildtyp wurden die Cys- bzw. GSH_{ges}-Gehalte auch für die Δapr-Mutanten bestimmt. Abb. 38 zeigt die Ergebnisse für Mutante 11-3-12.

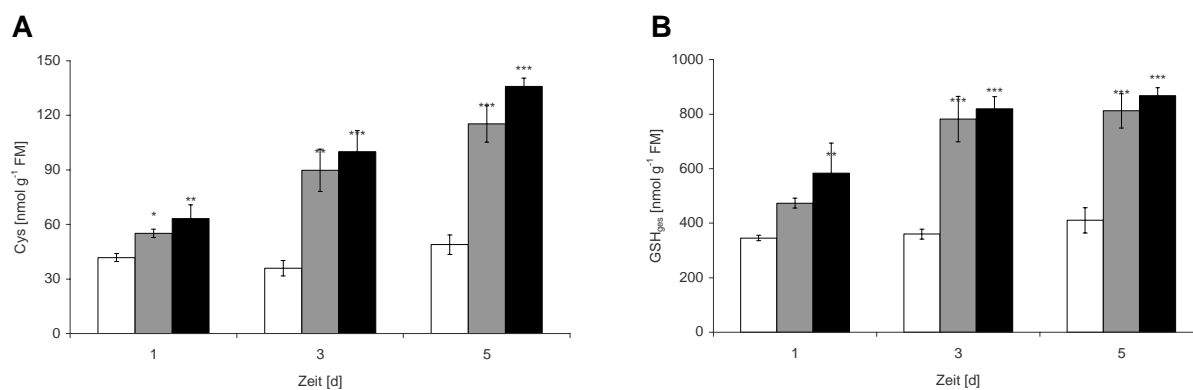


Abb. 38 Gehalt an Cystein (A) bzw. Glutathion (gesamt, B) von Δapr-Mutante 11-3-12, HPLC-Bestimmung (□ - Kontrolle, ■ - 5 μM Cd(II), ■ - 10 μM Cd(II); n=3)

Die Konzentrationen an Cys und GSH der 11-3-12-Mutante waren nach drei Tagen Cd(II)-Applikation mehr als doppelt so hoch im Vergleich mit den Cd(II)-freien Kontrollen. Für Cys (GSH) wurden bereits nach einem (drei) Tag(en) signifikante Unterschiede für beide Cd(II)-Konzentrationen ermittelt.

In Abb. 39 sind die Konzentrationen an Cys und GSH_{ges} für Mutante 12-4-3 dargestellt.

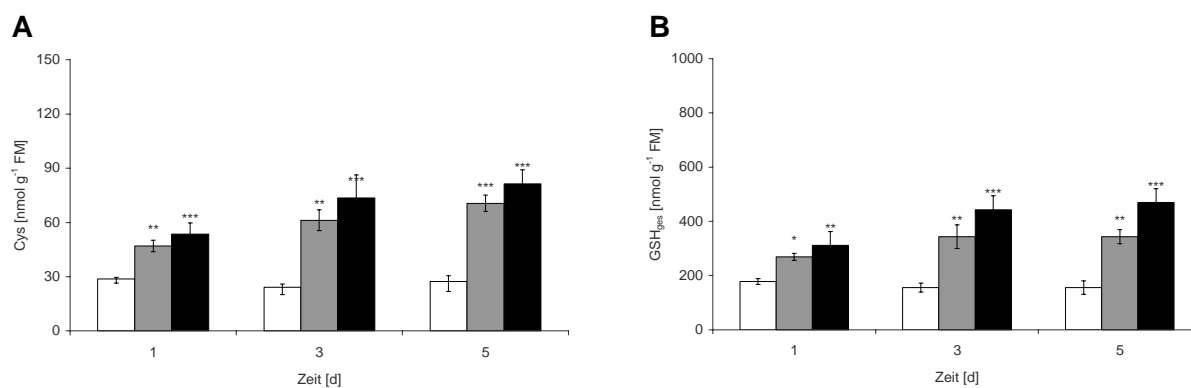


Abb. 39 Gehalt an Cystein (A) bzw. Glutathion (gesamt, B) von Δapr -Mutante 12-4-3, HPLC-Bestimmung (\square - Kontrolle, \blacksquare - 5 μM Cd(II), \blacksquare - 10 μM Cd(II); n=3)

Mutante 12-4-3 weist ebenfalls erhöhte Thiolgehalte nach Inkubation mit Cd(II) auf. Die Konzentrationen von Cys und GSH sind jedoch deutlich niedriger verglichen mit Mutante 11-3-12. Auch in diesem Fall wurden doppelt (5 μM) bis dreifach (10 μM) erhöhte Werte nach drei Tagen Cd(II)-Behandlung beobachtet.

4.6.4 Thiolkonzentrationen unter erhöhtem Sulfat-Gehalt

Da *P. patens* in Medium mit erhöhter Sulfatmenge größere Mengen Cd(II) akkumuliert als unter herkömmlichen Anzuchtbedingungen (s. 4.2.2), war die Bestimmung der Cys- bzw. GSH-Konzentrationen von Interesse. Die Cys-Werte sind in Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42 dargestellt.

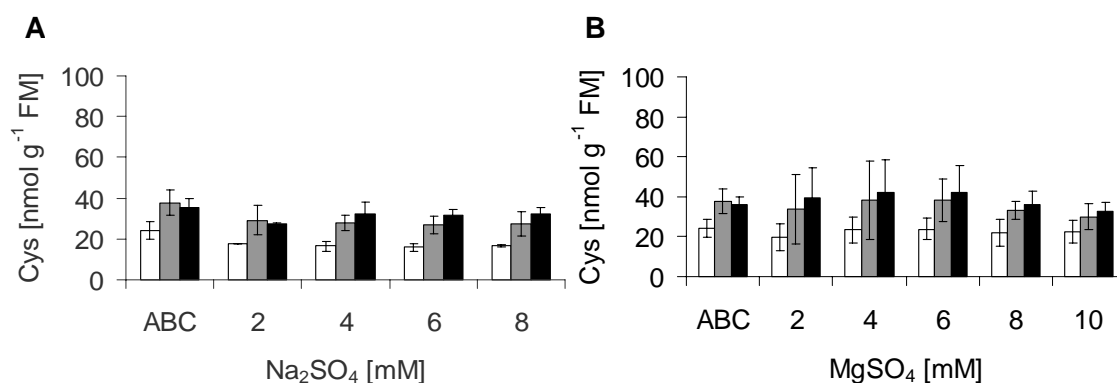


Abb. 40 Cys-Gehalte in *P. patens* in Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration im Medium nach einem Tag, (A – Na₂SO₄, B – MgSO₄; □ - 0 µM Cd(II), ■ - 5 µM Cd(II), ■ - 10 µM Cd(II); n=3)

Nach eintägigem Wachstum in Medium mit erhöhtem Sulfatgehalt waren nur geringe Unterschiede der Cys-Konzentration beim jeweiligen Vergleich der un- bzw. Cd(II)-behandelten Kulturen feststellbar (Abb. 40). Sowohl zusätzliches Na₂SO₄ als auch MgSO₄ führten nicht zu einer weiteren Zunahme des Cys-Gehaltes.

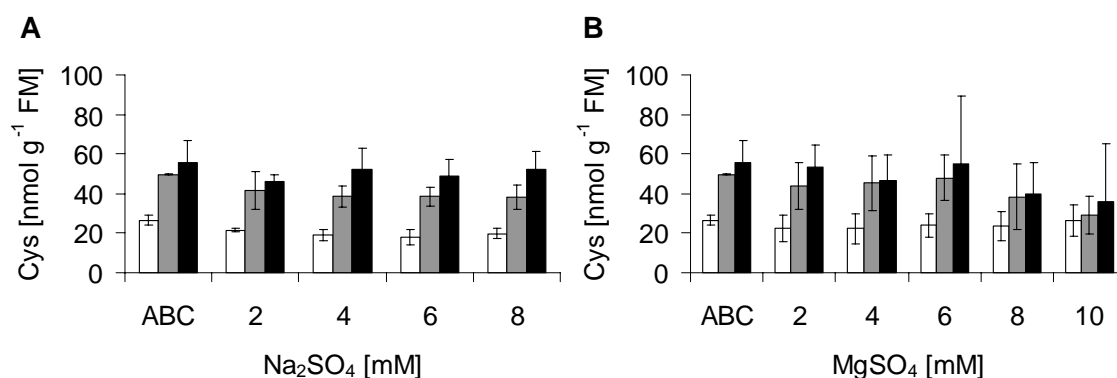


Abb. 41 Cys-Gehalte in *P. patens* in Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration im Medium nach drei Tagen, (A – Na₂SO₄, B – MgSO₄; □ - 0 µM Cd(II), ■ - 5 µM Cd(II), ■ - 10 µM Cd(II); n=3)

Auch nach drei Tagen waren kaum Differenzen zwischen den Verlauf der Cd(II)-Ansätze untereinander erkennbar (Abb. 41). Im Vergleich mit unbehandelten Kulturen war der Cys-Gehalt um etwa das Doppelte erhöht. Im Unterschied dazu wurde eine abnehmende Cys-Konzentration in den unter 8 mM bzw. 10 mM MgSO₄ angezogenen Cd(II)-Proben beobachtet.

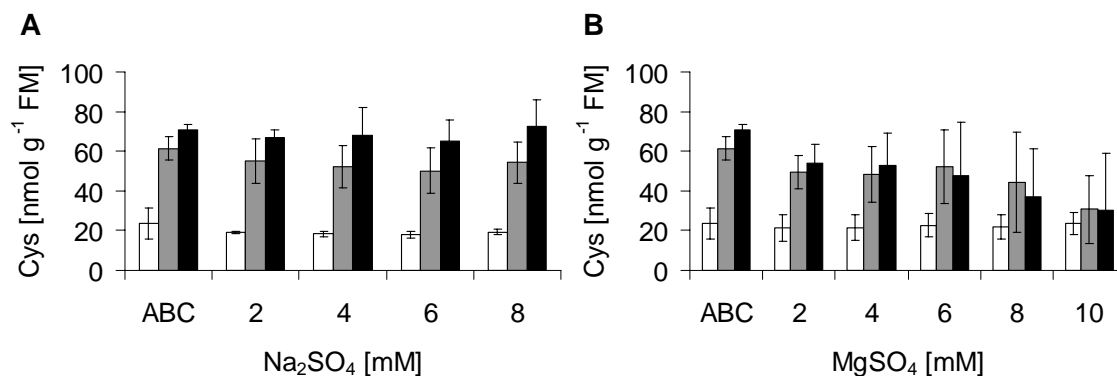


Abb. 42 Cys-Gehalte in *P. patens* in Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration im Medium nach fünf Tagen, (A – Na₂SO₄, B – MgSO₄; □ - 0 μM Cd(II), ■ - 5 μM Cd(II), ■ - 10 μM Cd(II); n=3)

Nach fünf Tagen Versuchsdauer waren Abweichungen zwischen Na₂SO₄- und MgSO₄-Kulturen ersichtlich (Abb. 42). Während der Cys-Pool der Na₂SO₄-Proben über den gesamten Konzentrationsbereich für die Verläufe von 5 μM Cd und 10 μM Cd konstant war, wurde bei den Cd(II)-behandelten Mg(II)-Ansätzen ein Rückgang mit zunehmender Sulfatmenge beobachtet. Bei Inkubation mit 10 mM MgSO₄ sanken die Werte auf Kontrollniveau ab.

Neben Cys wurde auch der GSH-Gehalt bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 43, Abb. 44 und Abb. 45 dargestellt.

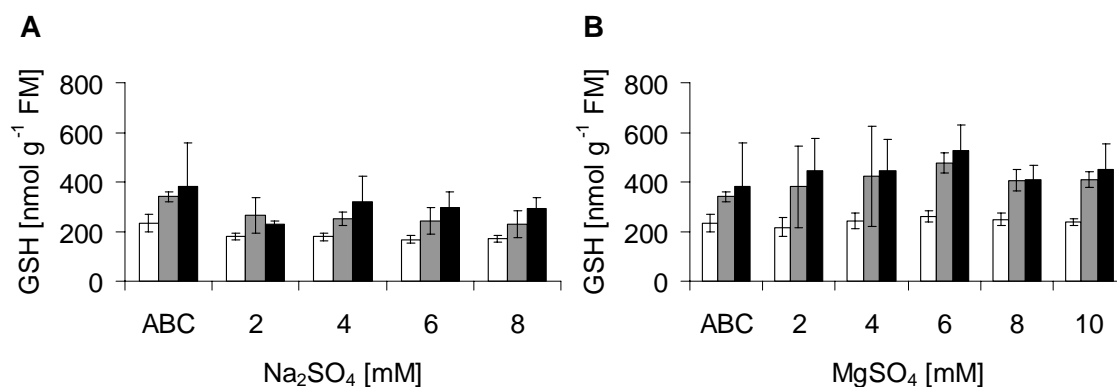


Abb. 43 GSH-Gehalte in *P. patens* in Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration im Medium nach einem Tag, (A – Na₂SO₄, B – MgSO₄; □ - 0 μM Cd(II), ■ - 5 μM Cd(II), ■ - 10 μM Cd(II); n=3)

Im Fall von GSH waren bereits nach einem Tag Unterschiede zwischen Na₂SO₄- und MgSO₄-Behandlung sichtbar (Abb. 43). Der Verlauf des GSH-Gehaltes der Na₂SO₄-Proben blieb bei K, 5 μM Cd(II) bzw. 10 μM Cd(II) nahezu konstant. Jedoch wurde bei den mit Cd(II) behandelten MgSO₄-Ansätzen ein geringer Anstieg des GSH-Pools beobachtet, der bei 6 mM ein Maximum erreichte.

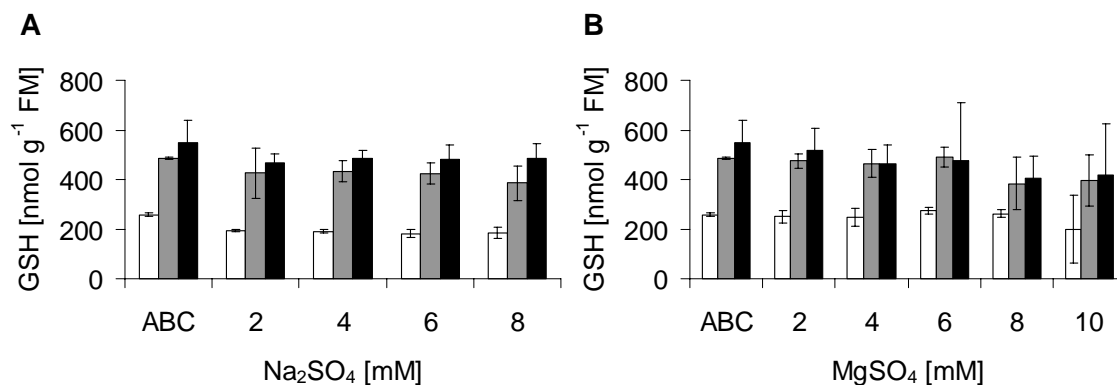


Abb. 44 GSH-Gehalte in *P. patens* in Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration im Medium nach drei Tagen, (A – Na₂SO₄, B – MgSO₄; □ - 0 μM Cd(II), ■ - 5 μM Cd(II), ■ - 10 μM Cd(II); n=3)

Nach dreitägigem Wachstum unter erhöhtem Sulfatgehalt waren nur geringe Unterschiede im Verlauf der GSH-Konzentration von K- und Cd(II)-Ansätzen erkennbar (Abb. 44).

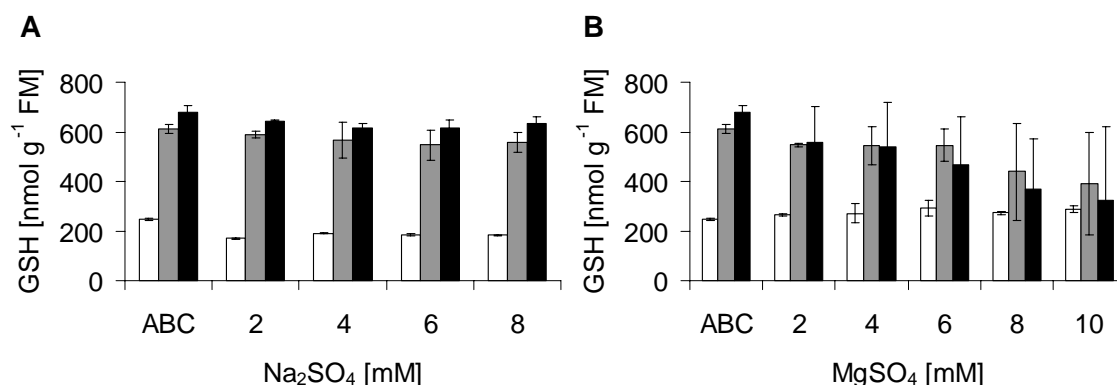


Abb. 45 GSH-Gehalte in *P. patens* in Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration im Medium nach fünf Tagen, (A – Na₂SO₄, B – MgSO₄; □ - 0 μM Cd(II), ■ - 5 μM Cd(II), ■ - 10 μM Cd(II); n=3)

Hingegen wurde fünf Tage nach Versuchsbeginn ein Rückgang des GSH-Gehaltes der Cd(II)-Kulturen mit steigender MgSO₄-Konzentration beobachtet (Abb. 45). Der Verlauf des GSH-Pools der Na₂SO₄-Ansätze war über den Konzentrationsbereich für K, 5 μM Cd(II) und 10 μM Cd(II) konstant.

4.7 OAS-TL-Reinigung

Die für *A. thaliana* etablierte Methode zur OAS-TL-Aufreinigung wurde auch bei *P. patens* angewandt. Während der Säulenelution wurde in den Fraktionen 1 bis 4 eine gelbliche Färbung beobachtet, was auf ein Vorhandensein des OAS-TL-Cofaktors Pyridoxalphosphat hindeutete.

Aufgrund der Farbstärke wurden die Fraktionen 1 und 4 bzw. 2 und 3 zu den Fraktionen 1-4 bzw. 2-3 vereint.

Zunächst wurde eine Proteinbestimmung (Tab. 10) bzw. OAS-TL-Aktivitätsanalyse (Tab. 11) von Aliquots der Aufreinigungsschritte durchgeführt.

Tab. 10 Proteinbestimmung von Aliquots der OAS-TL-Aufreinigungsschritte aus *P. patens*
BR-Bakterien-Rohextrakt, BD-Bakterien-Durchfluss, OAS-Bakt.-Elutionsfraktion der bakteriellen OAS-TL, PR-*P. patens*-Rohextrakt, PD-*P. patens*-Durchfluss, OAS X-OAS-TL-Elutionsfraktion

	BR	BD	OAS- Bakt.	PR	PD	OAS 1-4	OAS 2-3	OAS 5	OAS 6
Protein [$\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$]	6,46	6,28	0,15	10,08	8,93	0,1	0,33	0,06	0,03

Der Proteingehalt vom Bakterien- bzw. *P. patens*-Durchfluss war geringer als der des Rohextraktes. Dies deutete auf eine Bindung von rekombinanter SAT bzw. OAS-TL-Protein aus *P. patens* an die Säule hin. Die OAS-Elutionsfraktionen 1-4 und 2-3 wiesen mit $0,1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ bzw. $0,33 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ die höchste Protein-Konzentration auf.

Tab. 11 OAS-TL-Aktivitätsbestimmung von Aliquots der OAS-TL-Aufreinigungsschritte aus *P. patens* (n=3)

Fraktion	Spezifische Aktivität [U mg^{-1}]	Gesamt-Aktivität [U]
<i>Physcomitrella</i> -Rohextrakt	$1,85 \pm 0,36$	$476,4 \pm 92,8$
<i>Physcomitrella</i> -Durchfluss	$0,42 \pm 0,02$	$105,8 \pm 4,1$
Fraktion 1-4	$203,10 \pm 9,19$	$21,5 \pm 1,0$
Fraktion 2-3	$129,45 \pm 12,88$	$46,6 \pm 4,6$

Während der Aufreinigung kam es zu einem deutlichen Verlust an OAS-TL-Enzymaktivität. Dies fällt beim Vergleich der Differenz von Rohextrakt und Durchfluss mit der Summe der Aktivität der Elutionsfraktionen auf. So betrug die Restaktivität nur noch 18,4 %, d.h. über vier Fünftel Enzymaktivität ging während der Aufarbeitung verloren.

- 1D-PAGE

Mittels 1D-PAGE (Abb. 46) war ein Überblick über den Verlauf der OAS-TL-Reinigung möglich.

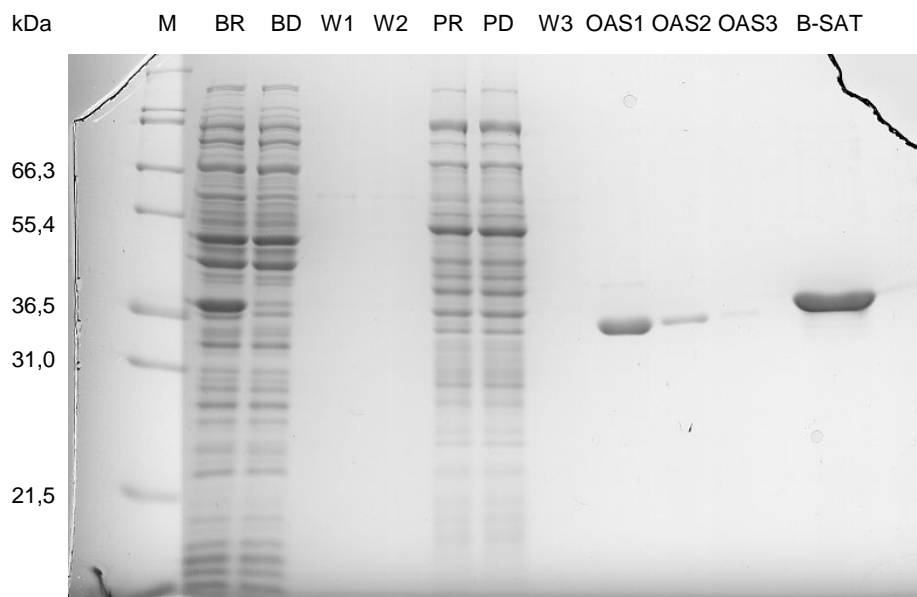


Abb. 46 Coomassie-gefärbtes 1D-Gel (11,25 %) von OAS-TL-Aufreinigungsschritten aus *P. patens*. M–Marker; BR–Bakterien-Rohextrakt, BD–Bakterien-Durchfluss, W1–3–Waschschritte, PR–*P. patens*-Rohextrakt, PD–*P. patens*-Durchfluss, OAS1–3–OAS-TL-Elutionsfraktion 2–3 (1=1 µg, 2=200 ng, 3=50 ng), B-SAT–bakterielle SAT

Bei Gegenüberstellung des Bandenmusters von bakteriellem Rohextrakt (BR) und bakteriellem Durchfluss (BD) ist eine Intensitätsabnahme der Proteinbande über der 36,5 kDa-Markerbande ersichtlich. Dies wird durch die His-Tag-Bindung des rekombinanten SAT-Proteins an die Ni(II)-Säule verursacht. Im Gegensatz dazu ist der Vergleich von *P. patens*-Rohextrakt mit *P. patens*-Durchfluss weniger aufschlussreich. Die Färbung der OAS-TL-Elutionsfraktion 2–3 nimmt entsprechend ihrer Proteinkonzentration ab. Der Großteil von OAS-TL-Protein aus *P. patens* besitzt würde demnach ein Molekulgewicht von ca. 34 kDa aufweisen.

- Western Blot

Mittels Western-Blot (Abb. 47) sollte untersucht werden, ob der spezifische Antikörper gegen OAS-TL A bzw. OAS-TL C aus *A. thaliana* auf die aus *P. patens* isolierten Proteine reagiert.

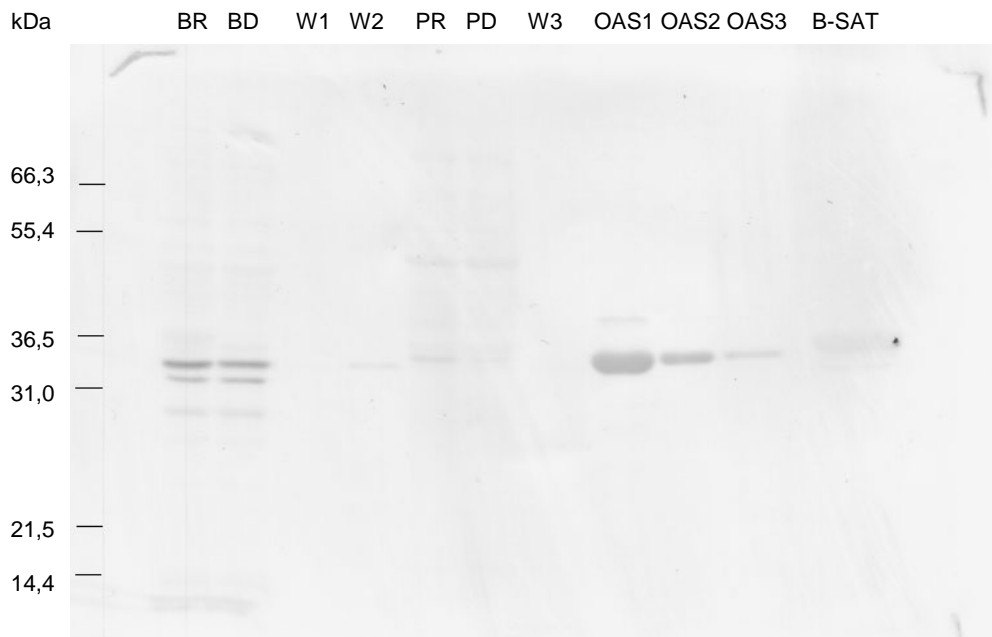


Abb. 47 Western-Blot von Aufreinigungsschritten der OAS-TL-Extraktion aus *P. patens*
 BR–Bakterien-Rohextrakt, BD–Bakterien-Durchfluss, W1–3–Waschschritte, PR–*P. patens*-Rohextrakt,
 PD–*P. patens*-Durchfluss, OAS1–3–OAS-TL-Elutionsfraktion 2-3 (1=1 µg, 2=200 ng, 3=50 ng),
 B-SAT–bakterielle SAT

Im Unterschied zum Coomassie-gefärbten 1D-Gel ist beim Western-Blot die Abnahme einer Proteinbande (zwischen 31 kDa- und 36,5 kDa-Marker) bei Vergleich von Rohextrakt und Durchfluss von *P. patens* erkennbar. Diese liegt auf der Höhe des Proteins, welches in der OAS-TL-Elutionsfraktion erkennbar ist. Anscheinend reagiert der Antikörper gegen AtOAS-TL A und C mit den aus *P. patens* isolierten Proteinen.

- 2D-PAGE

Die Durchführung der 2D-PAGE (Abb. 48) der Elutionsfraktion 2-3 sollte nun das Vorhandensein potentieller OAS-TL-Isoformen in *P. patens* untersuchen. Isoformen sind meist durch ein ähnliches Molekulargewicht und Unterschiede im isoelektrischen Punkt charakterisiert.

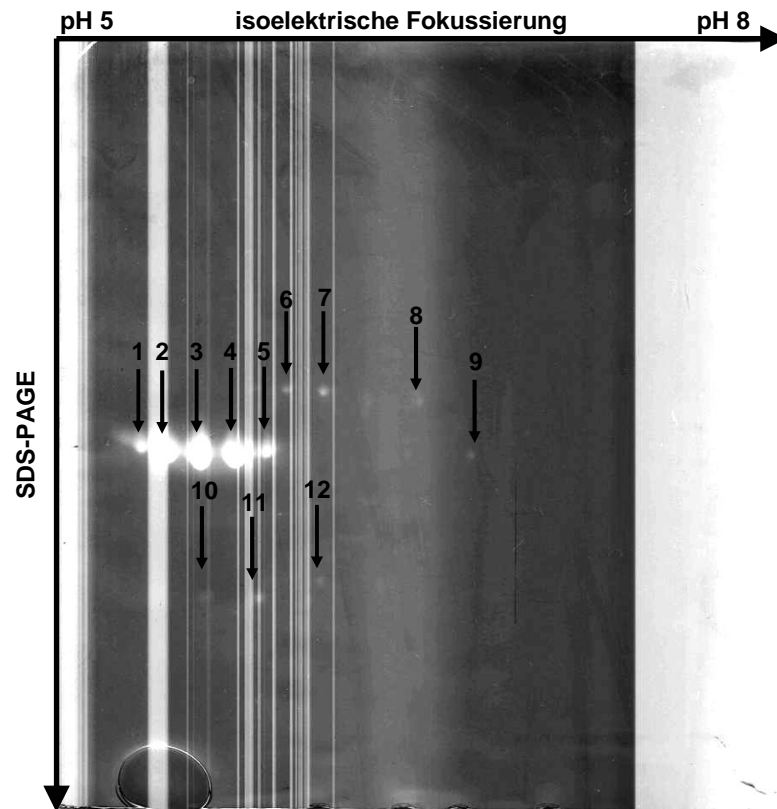


Abb. 48 Negativ eines Silber-gefärbten 2D-Gels der OAS-TL-Elutionsfraktion 2-3 aus *P. patens*, die Helligkeit und der Kontrast wurden verändert, um die schwachen Spots (8-12) besser sichtbar zu machen

Die Proteinspots 1 bis 5 könnten einer Isoform entsprechen, welche unterschiedlich modifiziert wird. Die obere Reihe (6-8) zeigt wahrscheinlich eine andere Isoform, die offenbar in geringerer Konzentration vorhanden ist. Einen Abbau von OAS-TL-Protein stellen möglicherweise die Spots 10 bis 12 dar.