

Institut für Bodenökologie
GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

Transport, Kompartimentierung und Abbau von glutathionhaltigen
Fremdstoffmetaboliten in Gerste (*Hordeum vulgare* L.)

Christian Ernst Scheer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. F. Elstner
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. P. Schröder
2. Univ.-Prof. Dr. B. Hock

Die Dissertation wurde am 27. März 2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 16. Juni 2003 angenommen.

I	EINLEITUNG	1
1	Dreiphasenmodell der Detoxifizierung	2
1.1	Phase-I-Reaktion	2
1.2	Phase-II-Reaktion	3
1.3	Phase-III-Reaktion.....	5
2	Metabolismus von Glutathionkonjugaten	6
2.1	Metabolismus von Glutathionkonjugaten im Tier.....	6
2.2	Metabolismus von Glutathionkonjugaten in Pflanzen.....	8
3	Transport von Glutathionkonjugaten in Pflanzen	9
3.1	Intrazellulärer Transport	9
3.2	Interzellulärer Transport.....	11
4	Zielsetzung	12
II	MATERIAL UND METHODEN	13
1	Anzucht von Gerstenpflanzen	13
2	Transportstudien	13
2.1	Fluoreszenzmikroskopie.....	14
2.1.1	Präparation von Gerstenkeimlingen für die Fluoreszenzmikroskopie	14
2.1.2	Applikation der fluoreszierenden Modellsubstanzen	15
2.1.3	Datenanalyse.....	16
2.2	Laserscanningmikroskopie (LSM)	16
2.2.1	Präparation von Gerstenkeimlingen für die LSM.....	18
2.2.2	Applikation der fluoreszierenden Modellsubstanzen	18
2.2.3	Datenanalyse.....	19
2.2.4	Beeinflussung des aktiven Transportes	19
3	Enzymologische Untersuchungen	20
3.1	Proteinextraktion	20
3.1.1	Herstellung eines Rohextraktes	20
3.1.2	Ammoniumsulfatfällung und Entsalzung	20
4	Proteinanalytik	22
4.1	Kationenaustauschchromatographie.....	22
4.2	Affinitätschromatographie.....	23
4.3	Entsalzung gereinigter Proteinfraktionen	24
5	Herstellung von Thiol-Xenobiotika-Konjugaten	25
6	Bestimmung von Enzymaktivitäten	27
6.1	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....	27
6.2	Bestimmung der Carboxypeptidase-Aktivität mittels eines optischen Tests	29
6.3	Messung der GST-Aktivität <i>via</i> Fluoreszenzspektrometer	30
7	Co-Faktoren der untersuchten Enzyme	31
8	Präparation von Protoplasten und Vakuolen aus dem Mesophyll von Gerstenprimärblättern	32
8.1	Reagenzien.....	32
8.2	Primärblatternte	33
8.3	Protoplastenisolierung	34
8.4	Vakuolenisolierung.....	35
8.5	Vakuolenfraktionierung.....	36

9	Bestimmung von Bezugsgrößen	37
9.1	Quantifizierung der Proteinkonzentration	37
9.2	Quantifizierung der Protoplasten-/Vakuolenfraktion	38
10	Gelelektrophorese.....	39
10.1	1D-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	39
10.2	2D-SDS-PAGE.....	41
III	ERGEBNISSE.....	43
1	Transportstudien auf Gewebe- und Zellebene.....	43
1.1	Monobrombiman: Applikation an Wurzelspitze und Basis	43
1.2	Monochlorbiman: Applikation an Wurzelspitze und Basis.....	45
1.3	Monochlorbiman: Beobachtungen auf Zellebene.....	47
1.3.1	Beeinflussung des tonoplastenständigen ABC-Transporters	51
1.4	Glutathion-Biman-Konjugat: Applikation an Wurzelspitze und Basis	54
2	Proteinchemische Untersuchungen.....	57
2.1	Nachweis der Carboxypeptidase- und Dipeptidase- Aktivität	57
2.1.1	Identifizierung der Reaktionsprodukte	58
2.1.2	Zeitabhängigkeit der Reaktion.....	59
2.1.3	Substratabhängigkeit der Reaktion	60
2.2	Enzymreinigung.....	62
2.2.1	Reinigung der Carboxypeptidase.....	62
2.2.2	Reinigung der Dipeptidase	64
2.2.3	Bildung eines Cysteinylglycin-DNB-Konjugates	67
2.3	Gelelektrophorese.....	70
2.4	Lokalisierung und Charakterisierung von Enzymaktivitäten	73
2.4.1	Glutathion S-Transferase-Aktivität	74
2.4.1.1	Lokalisierung der Glutathion S-Transferase-Aktivität.....	74
2.4.2	Carboxypeptidase-Aktivität.....	75
2.4.2.1	Lokalisierung der Carboxypeptidase-Aktivität	75
2.4.2.2	Charakterisierung der Carboxypeptidase-Aktivität	77
2.4.3	Dipeptidase-Aktivität.....	78
2.4.3.1	Lokalisierung der Dipeptidase-Aktivität	78
2.4.3.2	Charakterisierung der Dipeptidase-Aktivität.....	80
IV	DISKUSSION	81
1	Aufnahme und interzellulärer Transport von Glutathionkonjugaten	82
2	Intrazellulärer Transport von Glutathionkonjugaten	84
3	Nachweis der vakuolären Enzymaktivitäten	86
3.1	Nachweis der Carboxy- und Dipeptidase-Aktivität.....	86
3.2	Reinigung der Carboxy- und Dipeptidase-Aktivität.....	88
3.3	Lokalisierung der Carboxy- und Dipeptidase-Aktivität	90
3.4	Schlussfolgerung für den Katabolismus von Glutathionkonjugaten	92
V	ZUSAMMENFASSUNG.....	94
VI	SUMMARY.....	95
VII	LITERATURVERZEICHNIS.....	96

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ABC	'ATP-binding cassette'
ACN	Acetonitril
ATP(ase)	Adenosin-5'-triphosphat(ase)
BM	Betain-Medium
BSA	Rinderserumalbumin
CDNB	1-Chloro-2,4-Dinitrobenzol
CG	Cysteinylglycin
CG-X	Cysteinylglycinkonjugat
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CP	Carboxypeptidase
Cys	Cystein
Cys-X	Cysteinylkonjugat
d	Tag
DNB	Dinitrobenzol
DP	Dipeptidase
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N'-tetraacetat
FG	Frischgewicht
FPLC	'Fast Protein Liquid Chromatography'
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$)
Glu	Glutamin
Gly	Glycin
GS-B	Glutathionbimankonjugat
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
GST	Glutathion S-Transferase
GS-X	Glutathionkonjugat
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HPLC	'High Pressure Liquid Chromatography'
IEP	Isoelektrischer Punkt
kDa	Kilodalton
K _M	MICHAELIS-MENTEN-Konstante
KOH	Kaliumhydroxid
L.	LINNÉ, CARL VON (1707-1778)
Leu	Leucin
LSM	Laserscanningmikroskopie
MBB	Monobrombiman
MCB	Monochlorbiman
MCP	Mesophyll-Protoplasten

MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MRP	'multidrug resistance-associated protein'
MS	Massenspektrometrie
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
N _{liq}	Stickstoff (flüssig)
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PVP	Polyvinylpyrrolidon
r,LF	relative Luftfeuchtigkeit
r ²	Korrelationskoeffizient
R _T	Retentionszeit
S	Schwefel
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SM	Sorbitmedium
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	N-tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Umsatz von 1 μM Substrat pro min
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolette Strahlung
V _{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
ZnCl ₂	Zinkchlorid
γGC	γGlutamylcystein
γGC-X	γGlutamylcysteinylkonjugat

I Einleitung

Der Eintrag von Xenobiotika in Böden hat in den letzten Jahren kontinuierlich zugenommen. So entstehen bei vielen industriellen Produktionsprozessen toxische Substanzen, die in die Umwelt gelangen und Böden und Pflanzen kontaminieren. Zusätzlich steigt durch die zurückgegangene Bodenbearbeitung der Gebrauch von Agrochemikalien auf vielen landwirtschaftlichen Flächen innerhalb der EU weiterhin an (AGROW 2002).

Als sessile Organismen sind höhere Pflanzen dem Einfluss von Schadstoffen und Agrochemikalien in besonderer Weise ausgeliefert und besitzen deshalb spezielle enzymatische Detoxifizierungs- und Sequestrierungsmechanismen, mit denen sie ihre lebenden Zellen schützen. Diese Mechanismen sind zum Teil sehr effektiv und können sogar mit der Resistenzbildung einer Pflanze gegen Herbizide bzw. mit der Selektivität für Herbizide einhergehen (COUPLAND 1991, LAMOUREUX *et al.* 1991, COLE 1994, COCKER *et al.* 1999). Diese Abwehrmechanismen sind in Pflanzen wohl ursprünglich in Folge abiotischer Umwelteinflüsse (Naturkatastrophen etc.) entstanden und damit ein Produkt kontinuierlicher selektiver Prozesse. Außerdem schützt sich die Pflanze damit vor Sekundärstoffen, die z.B. nach Induktion durch Elicitoren, Infektionen oder Insektenfraß in den betroffenen Pflanzenteilen gebildet werden (WINK 1997). Somit muss davon ausgegangen werden, dass Enzyme, die sonst eine andere Rolle im Zellstoffwechsel spielen, nur aufgrund ihrer geringen Substratspezifität die Umsetzung von Fremdstoffen anthropogenen Ursprungs (Xenobiotika) und deren Metaboliten eher zufällig katalysieren.

Um der Bildung von Herbizidresistenzen vorzubeugen, oder aber den Verbleib von Agrochemikalien in Pflanzen und Böden abschätzen zu können, ist es notwendig, den Entgiftungsmechanismus für Fremdstoffe weiter aufzuklären.

Zum Verständnis der Entgiftungsmechanismen in Pflanzen wird häufig ein generelles, dreiphasiges Reaktionsschema vorgeschlagen (Abb. 1), das in Analogie zu den in der Leber von Säugern vorkommenden vergleichbaren Entgiftungsreaktionen verwendet wird (SHIMABUKURO 1976). Aufgrund der dabei auffälligen Überschneidungen in den beteiligten Enzymen und Kompartimentierungsschritten in der Leber und in Pflanzen prägte SANDERMANN (1994) den Begriff der ‚grünen Leber‘.

1 Dreiphasenmodell der Detoxifizierung

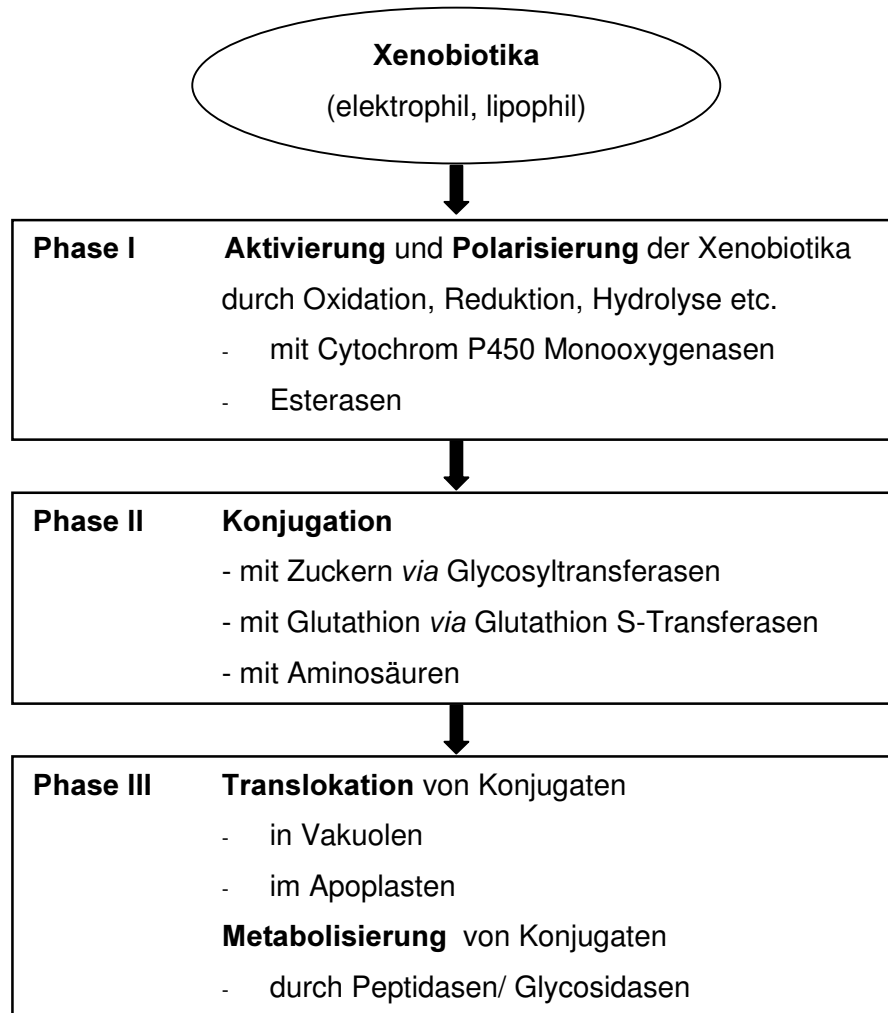


Abb. 1: Dreiphasenmodell der Detoxifizierung von Xenobiotika in Pflanzen (verändert nach SHIMABUKURO 1976).

1.1 Phase-I-Reaktion

Phase I: In diesem Kompartimentierungsschritt werden die in das Cytosol eingedrungenen, stark lipophilen Substanzen durch Hydroxylierung, Reduktion, Oxidation oder Hydrolyse für die weitere Metabolisierung polarisiert und aktiviert. Zumeist werden diese Reaktionen von Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen (P450) katalysiert. Die Monooxygenasen aus Pflanzen sowie die besser untersuchten tierischen P450 der Säugerleber sind microsomale, am endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisierte Häm-Thiolat-Proteine. Während die tierischen Isoformen der Cytochrom P450 Monooxygenasen eine breite und überlappende

Substratspezifität besitzen (DENISON und WHITLOCK 1995), scheinen die entsprechenden pflanzlichen Enzyme erheblich spezifischer zu sein (DONALDSON und LUSTER 1991) und katalysieren vornehmlich Reaktionen in der Synthese von Sekundärstoffen (COLE 1994). Außerdem wird P450 eine Rolle in der Pathogenabwehr sowie bei Verletzungen zugeschrieben. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Einfluss von Fremdstoffen und eines spezifischen Umsatzes von Cytochrom P450-Enzymen konnte bislang in Pflanzen nicht hergestellt werden. Somit ist die P450-abhängige Aktivierung einer Vielzahl von Xenobiotika allein durch die hohe Abundanz verschiedener Cytochrom P450-Enzyme zu erklären und daher in Pflanzen eher ein positiver Nebeneffekt (DURST *et al.* 1997).

1.2 Phase-II-Reaktion

Phase II: In Pflanzen werden die in Phase I gebildeten Primärmetaboliten im Cytosol mit zelleigenen niedermolekularen Verbindungen entweder glycosyliert, oder an die reduzierte Form des Tripeptides Glutathion (γ -Glutamylcysteinylglycin, GSH) gebunden. Die Glycosylierung wird durch UDP-Glycosyltransferasen katalysiert, wobei als Reaktionsprodukte eine Vielzahl an zuckerhaltigen Verbindungen entstehen können (SANDERMANN *et al.* 1997). Dieser Reaktionstyp besitzt innerhalb des tierischen Entgiftungsmechanismus kein unmittelbares Pendant. Dort ist die durch UDP-Glucuronyltransferasen katalysierte Konjugationsreaktion mit Glucuronsäure am häufigsten. Daneben treten in den Hepatozyten der Leber Konjugationen mit Aminosäuren, Sulfatierungen und Glutathion-Konjugationen auf (ISHIKAWA 1984). Konjugationen von Herbiziden mit reduziertem Glutathion (GSH) sind in Pflanzen seit 1970 bekannt (Abb. 2; LAMOUREUX *et al.* 1970) und spielen dort bei der Bildung nicht-toxischer Intermediate als Entgiftungsreaktion nach der Glycosylierungsreaktion die zweitwichtigste Rolle. In dieser Reaktion greift das Thiolat-Anion des Glutathions (GS^-) das Herbizid an und ersetzt dort das elektrophile Zentrum durch eine nucleophile Substitution. Diese Reaktion kann spontan (nichtenzymatisch) stattfinden, wird aber zumeist von Glutathion S-Transferasen (GST) katalysiert. GST (EC 2.5.1.18) sind stets Dimere und bestehen aus homo- oder heterodimeren Untereinheiten, die ein Molekulargewicht zwischen 25 bis 30 kDa aufweisen. GST kommen mit variierenden und teils überschneidenden Substratspezifitäten in nahezu allen Organismen vor (HABIG *et al.* 1974, MARRS 1996, NEUEFEIND *et al.* 1997, COLE *et al.* 1997). Es ist zu erwähnen, dass sich über den Mechanismus zwei weitere Reaktionstypen der GST-katalysierten Glutathionkonjugation,

nämlich die nukleophile Addition und die MICHAEL-Addition, unterscheiden lassen (LAMOUREUX und RUSNESS 1989).

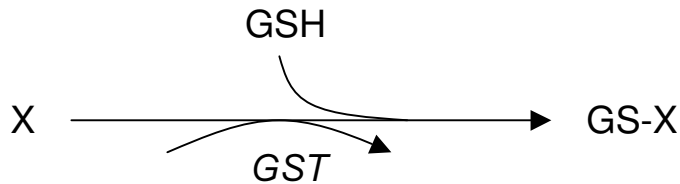


Abb. 2: Modell der Glutathionkonjugation. X: Xenobiotikum; GSH: Glutathion; GST: Glutathion S-Transferase; GS-X: Glutathionkonjugat.

GST sind, ebenso wie das Tripeptid GSH, im Cytoplasma von Pflanzen ubiquitär verbreitet und repräsentieren z.B. in Maisblättern mehr als 1 % des löslichen Proteins (MARRS 1996). Individuelle Genanalysen zeigten, dass es in Pflanzen wenigstens 25 verschiedene für GST codierende Gene gibt und alle GST auf Proteinebene eine mindestens zehnpromtente Übereinstimmung in ihrem Aminosäuremuster aufweisen (EDWARDS *et al.* 2000). Während GST durch anthropogene Einflüsse, wie z.B. Herbizide (COUPLAND 1991, LAMOUREUX *et al.* 1991, COLE 1994, ROSSINI *et al.* 1996, COLEMAN *et al.* 1997, KUK *et al.* 1999, SCHRÖDER und COLLINS 2002) oder Schwermetalle (ZENK 1996) induzierbar sind, sind ihre natürlichen Rollen im endogenen Pflanzenmetabolismus weitgehend unbekannt. So sind bislang GST katalysierte GSH-Konjugationen lediglich für einige Phytoalexine beschrieben worden (LI *et al.* 1997). Trotzdem kommt es aber unter abiotischem Stress, wie z.B. Pathogenbefall (MAUCH und DUDLER 1993), UV-Strahlung (LOYALL *et al.* 2000), Trockenstress (IUCHI *et al.* 2000), Ozon (SHARMA und DAVIS 1994, NOCTOR und FOYER 1998) und einigen biotischen Stressfaktoren wie z.B. Seneszenz (MCGONIGLE *et al.* 2000) zu der Expression einer Reihe von spezifischen GST. ROXAS und Mitarbeiter (1997) konnten z.B. eine durch Kältestress induzierte Überexpression von Glutathionperoxidase in Tabakpflanzen zeigen. Außerdem werden den GST neben der Funktion im Konjugationsprozess auch Aufgaben als Binde- und Carrierprotein sowie in der katalytischen GSH-Transformation zugeschrieben (EDWARDS *et al.* 2000).

Glutathion S-Transferasen (GST) sind in den bisher untersuchten Pflanzenspezies meistens im Cytosol lokalisiert; es wurden aber auch einige membrangebundene Formen charakterisiert,

die mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und anderen mikrosomalen Fraktionen assoziiert sind (DIESPERGER und SANDERMANN 1979, SCHRÖDER und BELFORD 1996).

Im tierischen System katalysieren ebenfalls GST die Konjugation von GSH an Xenobiotika, wodurch in der Leber zum einen kanzerogene Substanzen detoxifiziert werden und zum anderen die Wirksamkeit vieler Pharmazeutika determiniert ist. Außerdem verfügen GST über eine Glutathionperoxidase-Aktivität und schützen damit den Organismus vor reaktiven Sauerstoffspezies. Es sind im Menschen 20 cytosolische und fünf mikrosomale GST bekannt (ARMSTRONG 1997, MORGENSTERN *et al.* 1985).

Die Produkte der Phase-II-Reaktion sind in allen Organismen immer Fremdstoffkonjugate, welche generell weniger toxisch sind, aber über eine höhere Wasserlöslichkeit verfügen (LAMOUREUX und RUSNESS 1989, SANDERMANN 1994, KREUZ *et al.* 1996).

1.3 Phase-III-Reaktion

Phase III: Während die in den ersten beiden Teilschritten beschriebenen Reaktionen als die eigentlichen Entgiftungsreaktionen angesehen werden, umfasst die letzte Phase die Degradierung der entstandenen Produkte. Da eine Akkumulation der Phase-II-Produkte im Cytosol die enzymatische Konjugationsleistung und damit die Entgiftung erheblich verringert, schlugen SHIMABUKURO (1976) und ISHIKAWA (1992) vor, die weiteren Abbauschritte als Phase III zu bezeichnen. In der Leber werden konjugierte Xenobiotika über verschiedene Transportproteinkomplexe (*MRP*, *Multi Drug resistance-associated proteins*) durch die Membran der Hepatocyten in das exkretorische System geschleust. Diese *MRP* akzeptieren ein breites Spektrum an anionischen Glucuronid-, Glutathion- oder Sulfat-Konjugaten (ISHIKAWA 1992).

In Pflanzen konnte am Beispiel des Herbizides Tridiphan gezeigt werden, dass das gebildete Glutathionkonjugat (GS-X) als starker Inhibitor der GST-Aktivität wirkt (LAMOUREUX und RUSNESS 1986). Da Pflanzen nicht über ein exkretorisches System verfügen, kommt es zunächst zu einer Deposition der Fremdstoffkonjugate entweder im Apoplasten oder in der Vakuole (COUPLAND 1991, MAARS *et al.* 1995). Damit verläuft die Sequestrierung der verschiedenen Konjugate in Vakuole oder Apoplast identisch zum Metabolismus von Naturstoffkonjugaten und stellt einen funktionellen Vorteil für die Pflanze dar. So werden viele Glucosidkonjugate in den Apoplasten exportiert, um dort in die unlöslichen Polymere Cellulose oder Lignin eingebaut zu werden (DAVIN und LEWIS 1992) und finden damit als

gebundene Rückstände in der Zellwand ihren metabolischen Endpunkt (LANGEBARTELS und HARMS 1985). Alternativ zeigten GAILLARD und Mitarbeiter (1994), dass β -D-Glucoside auch aktiv in die Vakuole transportiert werden, um dort intermediäre Pools zu bilden, die von Glucosidasen und Malonylesterasen bei Bedarf reguliert werden können (LAMOUREUX *et al.* 1993). Der Transport der Glycosidkonjugate erfolgt über MRP (ATPasen) und ist durch Vanadat inhibierbar. Doch konnten BARTHOLOMEW und Mitarbeiter (2002) für den Transport eines Chorsulfuron-Glycosidkonjugates in vakuoläre Membranvesikel die Beteiligung einer nicht durch Vanadat zu inhibierenden, membranständigen Protonenpumpe zeigen. Hieraus wird deutlich, dass es mehrere unterschiedliche Membranpumpen gibt.

Bei der Betrachtung des dreiphasigen Modells im Zusammenhang mit dem Konzept der ‚grünen Leber‘ fällt auf, dass viele Abbaumechanismen in Leber und Pflanze sehr ähnlich zueinander sind. Deshalb wird postuliert, dass sich beide Detoxifizierungsprozesse zueinander co-evolutionär entwickelt haben (SANDERMANN 1994).

2 Metabolismus von Glutathionkonjugaten

Da die Degradation von Glutathionkonjugaten (GS-X) eine wichtige medizinische Rolle im Metabolismus von Medikamenten spielt, ist der Abbau im tierischen Organismus besonders gut untersucht und könnte auch Rückschlüsse auf bislang unbekannte Abbauprozesse im pflanzlichen System zulassen.

2.1 Metabolismus von Glutathionkonjugaten im Tier

Je nach Fettlöslichkeit gelangen die Glutathionkonjugate über den bereits erwähnten *MRP*-Transportproteinkomplex vom Cytosol der Hepatocyten entweder in die Lebersinusoiden oder in die Gallenkapillaren und werden dann über die Niere bzw. über den Darm ausgeschieden (MÜLLER *et al.* 1994). Beide Abbauewege beschreiben das exkretorische System, in dem zunächst eine γ Glutamyltranspeptidase (γ GT; EC 2.3.2.2) die Abspaltung des γ Glutamyl-Rests vom Glutathionkonjugat katalysiert. Das entstandene Cysteinylglycinkonjugat (CG-X) wird durch eine Dipeptidase (EC 3.4.13.6) unter Freisetzung von Glycin hydrolytisch zu

einem Cysteinylkonjugat (Cys-X) degradiert, welches über das Blut wieder in die Hepatocyten gelangt und dort entweder durch eine N-Acetyl-Transferase zur Mercaptursäure acetyliert und danach ausgeschieden, oder durch eine β -Lyase zu einem Sulfhydrylderivat (SH-X) des Fremdstoffes umgebaut werden kann. SH-X sind im exkretorischen System jedoch stark toxisch und können zu schweren Schädigungen der Nieren führen (HABIG *et al.* 1974, MEISTER und TATE 1976, ARMSTRONG 1997). Der Abbau von GS-X ist in Abb. 3 zusammengefaßt.

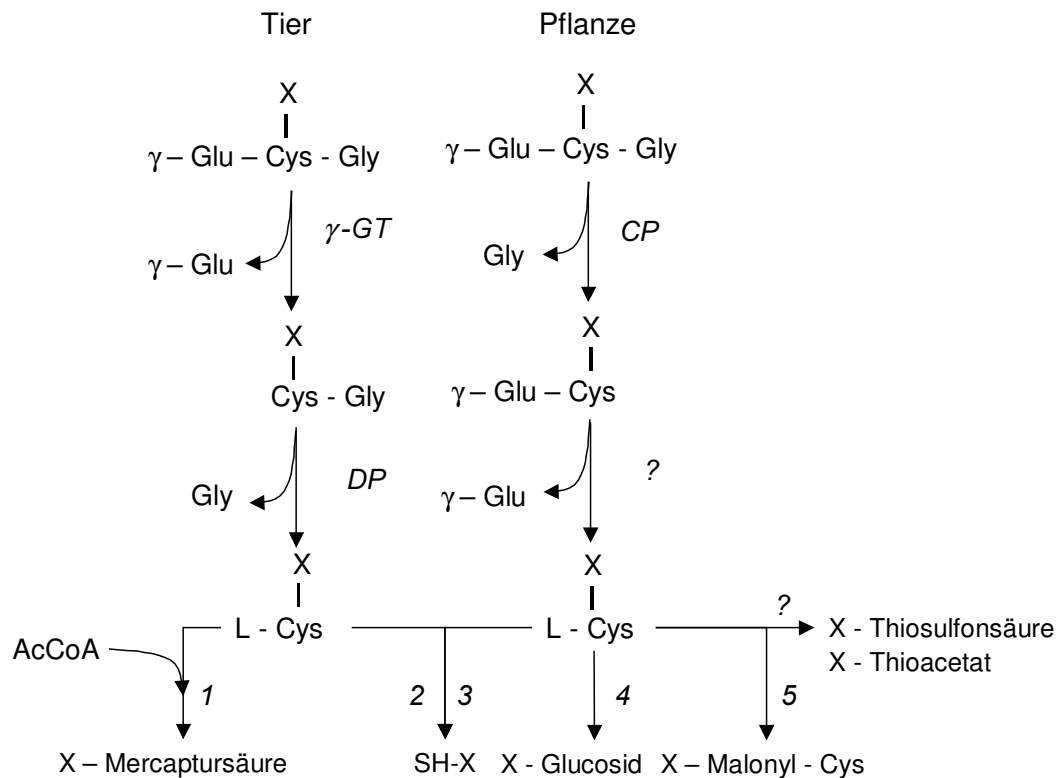


Abb. 3: Degradierung von Glutathionkonjugaten in Tier und Pflanze. DP: Dipeptidase, CP: Carboxypeptidase, γ -GT: γ Glutamyltranspeptidase, 1: N-Acetyltransferase; 2: β -Lyase; 3: Alkylcystein-Lyase; 4: Glycosyltransferase; 5: Malonyltransferase.

2.2 Metabolismus von Glutathionkonjugaten in Pflanzen

Der Abbau von Glutathionkonjugaten (GS-X) wurde in der Vergangenheit vor allem im Verlauf von Rückstandsuntersuchungen bearbeitet. LAMOUREUX und Mitarbeiter haben in herbizidbehandelten Zellkulturen die Degradation von GS-X untersucht und dabei eine Vielzahl verschiedener Metaboliten analytisch aufgeklärt (LAMOUREUX und RUSNESS 1989, LAMOUREUX *et al.* 1993). Die Untersuchungen implizierten, dass Glutathionkonjugate offensichtlich einer hintereinander geschalteten Sequestrierung unterliegen, dessen erster Metabolit ein γ Glutamylcysteinylkonjugat (γ GC-X) ist. WOLF und Mitarbeiter (1996) fanden heraus, dass in diesem ersten Abbauschritt GS-X von einer vakuolären Carboxypeptidase unter Abspaltung des Glycins decarboxyliert wird. Da als freier Metabolit immer auch ein Cysteinylkonjugat in den Zellkulturen nachgewiesen werden konnte (LAMOUREUX und RUSNESS 1980), wird vermutet, dass es sich dabei um das Produkt einer weiteren Degradierung von γ GC-X handelt (SCHRÖDER 1997). Ob diese Reaktion, wie aus dem tierischen Metabolismus bekannt, ebenfalls enzymatisch katalysiert wird, konnte bislang nicht gezeigt werden.

Für die enzymatische Degradierung von Cys-X konnten bereits mehrere Enzyme von verschiedenen Autoren beschrieben werden. So ist z.B. in *Allium ssp.*, in Keimlingen von *Acacia farnesiana* und in Spinat eine S-Alkyl-L-Cystein-Lyase (EC 4.4.1.6) charakterisiert worden (MAZELIS *et al.* 1975; LAMOUREUX und RUSNESS 1980, NOCK und MAZELIS 1986, STALTON und MAZELIS 1991). In Extrakten aus Fichtenzellkulturen und in der Zwiebel konnte außerdem die Präsenz einer Adenosyl-Methionin-Methyl-Transferase gezeigt werden (LAMOUREUX und RUSNESS 1980, LAMOUREUX *et al.* 1993). SANDERMANN (1991) belegte mit dem Abbau von Cys-X zu glycosidierten Fremdstoffmetaboliten eine S-Glycosyltransferaseaktivität. Eine weitere Möglichkeit im Katabolismus von Cys-X liegt im enzymatischen Umbau zu einem Malonylcysteinylkonjugat, dem am weitesten verbreiteten Endprodukt (LAMOUREUX und RUSNESS 1983). Diese Reaktion ähnelt der aliphatischen Acylierung von pflanzlichen Sekundärstoffen. Als weitere Abbauprodukte von Cys-X wurden in Fichtenzellkulturen Thiolacetate (LAMOUREUX *et al.* 1991) und Sulfonsäuren (LAMOUREUX *et al.* 1993) detektiert. Über am Degradationsprozess beteiligte Enzymaktivitäten liegen aber bislang keine Aussagen vor.

Eine von LAMOUREUX und Mitarbeitern (1991) beschriebene Degradierung des Glutathionkonjugates zu einem γ Glutamylcysteinylkonjugat ist im tierischen Organismus eher von untergeordneter Bedeutung (SCHRÖDER 1997) und wurde in diesem Modell nicht berücksichtigt. Bei einem Vergleich beider Abbauewege fällt auf, dass das Cysteinylkonjugat als gemeinsames Intermediat sowohl beim Tier als auch in der Pflanze eine zentrale Rolle spielt und dass für beide Organismen das Sulfhydryl-Derivat SH-X einen gemeinsamen katabolischen Endpunkt darstellt.

3 Transport von Glutathionkonjugaten in Pflanzen

3.1 Intrazellulärer Transport

Wie bereits erwähnt, hemmt die Akkumulation von GS-X im Cytosol die GST-Aktivität und damit die eigentliche Entgiftungsleistung der Phase II Enzyme. Im folgenden Kapitel soll deshalb die zelluläre Disposition von GS-X in die Vakuole beschrieben werden.

Während im tierischen System ein aktiver Transport von GS-X aus dem Cytosol der Hepatocyten in das exkretorische System über verschiedene Transportproteinkomplexe (*MRP*) beschrieben ist, lagen lange Zeit nur begrenzte Informationen über zelluläre Transportmechanismen von GS-X in Pflanzen vor.

Mittlerweile wird vermutet, dass der Transport von GS-X im Cytosol, ähnlich der Verteilung von GSH, entweder der Cytoplasmaströmung folgt oder über Transportvesikel durchgeführt wird. Inkubationen von pflanzlichem Gewebe mit Phytochelatinen (Polymere des γ Glutamylcysteins) mit Monochlorbiman (MCB), einem Thiolindikator, der nach Aufnahme intrazellulär zum fluoreszierenden Biman-Glutathionkonjugat umgewandelt wird, deuten diesen Mechanismus an (SCHRÖDER und STAMPFL unveröffentlicht).

Prinzipiell können für eine Verlagerung von Glutathionkonjugaten aus dem Cytosol und dem Transport in die Vakuole zwei Prozesse verantwortlich sein:

(1) GS-X könnten z.B. in Vesikel, die sich vom ER oder dem Golgi-Apparat abschüren, zunächst in der Nähe des Tonoplasten akkumulieren und schließlich, unter Freisetzung ihres Inhaltes in die Vakuole, mit der Tonoplastenmembran verschmelzen. Der vesikel-vermittelte Transport von Makromolekülen zwischen Organellen des endomembranen Systems und Membranen ist bereits vielfach für vakuoläre Speicherproteine etc. beschrieben worden

(ROBINSON *et al.* 1998, NEBENFÜHR 2002), ist aber für den Transport von GS-X in die Vakuole offensichtlich nicht verantwortlich.

(2) Beim GS-X kommt es vielmehr zu einem aktiven Transport am Tonoplasten, d.h. es kommt zu einem direkten Übergang von GS-X aus dem Cytosol in das vakuoläre Lumen. Für diesen Transport sind bereits seit 1992 tonoplastenständige und energieabhängige GS-X-Pumpen in Pflanzen beschrieben (SZE *et al.* 1992, MARTINOIA *et al.* 1993, REA *et al.* 1998). Diese sind ATP-abhängige, multispezifische Transportproteinkomplexe aus der Familie der ABC-Transporter, die im Gegensatz zu den bereits seit langem bekannten Protonenpumpen nicht auf ein Membranpotential angewiesen sind (ISHIKAWA 1992, REA 1999). Der Transport von GS-X in die Vakuole scheint ubiquitär in vielen Pflanzen vorzukommen (LI *et al.* 1995b). Es konnte an isolierten Vakuolen gezeigt werden, dass die Aufnahme von GS-X wie z.B. GS-Metolachlor, GS-Dinitrobenzol oder Diglutathion (GSSG, oxidiertes GSH, das eine Bindung mit einem weiteren GSH-Molekül eingeht) strikt ATP-abhängig war (LI *et al.* 1995a, KREUZ *et al.* 1996). Durch Zugabe von Vanadat, einem Phosphatanalogon, das die intermediäre Bindung des Phosphatrests am Transportprotein inhibiert, konnte die Aufnahme von GS-X in die Vakuole dagegen stark reduziert werden (MARTINOIA *et al.* 1993, BARTHOLOMEW *et al.* 2002). Interessanterweise konnte die Aufnahme verschiedener Glutathionkonjugate durch andere GS-X gehemmt werden, wobei diese Hemmung um so stärker war, je hydrophober die an das GSH konjugierte xenobiotische Gruppe war (BLAKE-KLAFF und COLEMAN 1997).

ABC Transportproteine bilden die größte Gruppe an bekannten Transportproteinen und sind mittlerweile in allen untersuchten Organismen nachgewiesen worden (ISHIKAWA *et al.* 1997). Trotz ihrer weiten Verbreitung ist ihre tatsächliche Transportfunktion und die Substratspezifität des jeweiligen Transporters, von denen meist nur Gensequenzen bekannt sind, häufig unklar. Pflanzliche ABC-Transporter sind mit ca. 150 kD relativ große Proteinkomplexe. Sie besitzen alle eine ähnliche Struktur und bestehen aus zwei paarigen hydrophoben und hydrophilen Strukturelementen, sog. integralen, membrandurchspannenden Domänen (MSD) und einer dem Cytoplasma zugewandten Nukleotid-Bindungsfalte (NBF) (LINTON und HIGGINS 1998). MSD und NBF bilden sog. konservierte Regionen, deren Auftreten in einer Nukleotidsequenz immer auf einen ABC-Transporter hinweist. Im entschlüsselten Arabidopsis-Genom wurden dadurch insgesamt 53 für ABC-Transporter kodierende Gene gefunden (SANCHEZ-FERNANDEZ *et al.* 2001). Die Familie der ABC-Transporter wird ebenso wie der im Hepatocyten lokalisierte Multitransportkomplex (ebenfalls ein ABC Transporter) der Gruppe der Multidrug-Resistance-Related Proteine (*MRP*) zugeordnet (MARTINOIA *et al.* 2002).

Die Induktion eines ABC-Transporters konnte in Pflanzen mit Hilfe von Safenern gezeigt werden. Nach einer Behandlung von Gerste mit dem Herbizid-Safener Cloquintocet-mexyl wurde in den Pflanzen neben einer erhöhten Transportleistung auch eine erhöhte GST-Aktivität gemessen (GAILLARD *et al.* 1994). Die Überexpression von GST und MRP nach einer Safener-Behandlung konnte die parallele Induzierbarkeit dieser Entgiftungsproteine in Weizen bestätigen (THEODOULOU *et al.* 2003).

Nachdem bereits der Metabolismus und der zelluläre Transport von GS-X erläutert wurden, soll im Folgenden der Frage nachgegangen werden, mit welchen Transportmechanismen Glutathionkonjugate und deren Abbaumetabolite innerhalb der Pflanze verlagert werden können.

3.2 Interzellulärer Transport

Ein interzellulärer Stoffaustausch kann über Plasmodesmata erfolgen. Diese sind mit Desmotubuli durchzogene Mikrokanäle, die alle Protoplasten und damit das gesamte symplastische System einer Pflanze miteinander verbinden (NULTSCH 1991). Über diese Zellverbindungen kann ein 'Zell zu Zell' Transport von kleinen Metaboliten, Aminosäuren, Peptiden und Ionen im cytosolischen Kontinuum stattfinden, ohne dass Membranen passiert werden müssen (LUKAS 1999). Dieser Transport erreicht diffusive Geschwindigkeiten von einigen Zentimetern pro Stunde und reicht damit für größere Verlagerungen von Metaboliten nicht aus (MÜLLER 1986). Da die Konjugation des Xenobiotikums mit GSH im Cytosol und damit im symplastischen System stattfindet, ist ein Transport von Glutathionkonjugaten über Plasmodesmata nicht auszuschließen.

Ein Langstreckentransport konnte für GS-X bislang nicht gezeigt werden, die Kenntnis darüber ist aber von großem Interesse, da eine mögliche Verlagerung von Herbizid-metaboliten z.B. in den Boden diskutiert wird.

4 Zielsetzung

Zum generellen Verständnis des pflanzlichen Detoxifizierungsprozesses ist es notwendig, die Aufnahme und Verlagerung von Fremdstoffmetaboliten in Pflanzen besser zu verstehen. Zunächst sollte daher in dieser Arbeit geklärt werden, in welchen spezifischen Gewebekompartimenten der Modellpflanze Gerste bodenbürtige Xenobiotika bevorzugt konjugiert werden. Dazu sollten mit Hilfe fluoreszierender Fremdstoffmetaboliten in Wurzeln, die Konjugation, der sich anschließende Transport und schließlich die Deposition der gebildeten Glutathionkonjugate *in vivo* dargestellt und charakterisiert werden. Es ging dabei vornehmlich um die Frage, ob Glutathionkonjugate über die Wurzel in den Boden verlagert und evtl. über die Wurzel wieder aufgenommen werden können. Darüber hinaus sollte mit Hilfe der Laserscanningmikroskopie die cytologische Verteilung von Entgiftungs- und Transportprozessen nach der Xenobiotika-Applikation *in vivo* dargestellt werden.

In einem weiteren Schwerpunkt sollte der Frage nachgegangen werden, wie sich die bislang nur teilweise aufgeklärte Degradation von Glutathionkonjugaten in der Vakuole verhält. Dabei wurde untersucht, ob neben der bereits bekannten vakuolären Carboxypeptidase, die für den Abbau vom Glutathionkonjugat (GS-X) zum γ Glutamylcysteinylkonjugat (γ GC-X) verantwortlich ist, ein zweites Enzym existiert, welches γ GC-X zu einem Cysteinylkonjugat (Cys-X) umbaut. Die an diesem Abbauprozess beteiligten Enzyme sollten in der Zelle lokalisiert und nach partieller Reinigung charakterisiert werden.

II Material und Methoden

1 Anzucht von Gerstenpflanzen

Alle Experimente der vorliegenden Arbeit wurden mit Braugerste, *Hordeum vulgare* L. var. Cherie, durchgeführt. Für die Transportstudien wurde Gerste auf gewässertem Filterpapier in Petrischalen für 24 h dunkel vorgekeimt. Danach wurden die Keimlinge in verschlossenen Petrischalen im Labor Tageslichtverhältnissen ausgesetzt und bei Raumtemperatur weiterhin feucht gehalten. Alle Transportexperimente wurden mit 5 d alten Gerstenpflanzen durchgeführt.

Für die enzymologischen Untersuchungen wurde Gerste auf Pflanzschalen in Einheitserde (Fruhstorfer Erde, Typ T) ausgesät und unter kontrollierten Bedingungen (18°C, 70 % r. LF, 12 h Lichtperiode, Leitungswasser) in einer Klimakammer angezogen. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Pflanzen im beginnenden Zweiblattstadium (ca. 10 d) geerntet und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

2 Transportstudien

In den *in vivo*-Transportstudien wurden die Aufnahme und Verteilung von glutathion-konjugierbaren Substanzen in der Wurzel von Gerstenkeimlingen untersucht. Als xenobiotische Modellsubstrate dienten dazu Monobrombiman (MBB, Calbiochem), das an alle SH-Gruppen (z.B. von Glutathion und von Peptiden) bindet, sowie Monochlorbiman (MCB, Sigma) als Indikator für Glutathion (GSH) und MCB-konjugierende Glutathion S-Transferasen (GST). Diese Substanzen haben die Eigenschaft, dass ihre Konjugate bei einer Anregung mit 380 nm fluoreszieren und somit in der Wurzel sichtbar gemacht und quantifiziert werden können. Weiterhin sind sie lipophil und membranpermeabel. Mit diesen Stoffen bzw. deren fluoreszierenden Thiolkonjugaten wurden die Wurzeln 5 d alter Gerstenkeimlinge behandelt. Sie wurden mit 380 nm angeregt und ihre Fluoreszenz bei 510 nm quantitativ detektiert. Die Herstellung von MCB-/MBB-GS-Konjugaten (GS-B) ist in Kap. II 5 beschrieben.

2.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Transportstudien auf Gewebeebene wurden mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie in Zusammenarbeit mit A. Stampfl (Institut für Toxikologie, GSF) durchgeführt. Dafür konnte eine Methode entwickelt werden, mit der es möglich war, physiologische Aufnahme- und Verteilungsprozesse von fluoreszierenden Substanzen in Wurzeln darzustellen.

Alle fluoreszenzmikroskopischen Arbeiten wurden mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 100, Objektiv: Plan Neofluar 20x/0,50, Zeiss, Göttingen) durchgeführt. In einem Vorexperiment wurde die optimale Anregungswellenlänge für die maximale UV-Emission für die Konjugate von MBB und MCB mit einem Monochromator (Till Vision, München) nach der Methode von SCHRÖDER und STAMPFL (1999) ermittelt. Diese betrug 380 nm, die Emissionswellenlänge lag bei 510 nm.

Die Fluoreszenzmessungen erfolgten über einen Zeitraum von 40 min und wurden in drei bis fünf Versuchen wiederholt. Dabei wurde die Wurzel im Abstand von 5 s für jeweils 20 ms mit 380 nm angeregt und die Fluoreszenz mit einer elektronischen CCD-Kamera detektiert.

2.1.1 Präparation von Gerstenkeimlingen für die Fluoreszenzmikroskopie

Sowohl die inverse Konstruktion des Fluoreszenzmikroskops mit einer Auflicht-Lichtquelle als auch der Einsatz fluoreszierender Substanzen erforderte einen speziellen Versuchsaufbau, der es ermöglichte, Applikations- und Untersuchungsbereich voneinander abzutrennen, bzw. eine Durchmischung beider Bereiche zu vermeiden.

Dazu wurde jeweils ein ca. 2 cm langes Stück einer Wurzelspitze abgeschnitten und so in ein Loch in einem ca. 1 cm² großen Latexgummi gesteckt, dass der Applikationsbereich ca. 2 mm herausragte. Mit dem Gummi wurde so der Applikationsbereich sauber vom Untersuchungsbereich abgedichtet. Anschließend wurde beides auf einen Wassertropfen auf einem Objektträger gelegt (Abb. 4). Nun konnten die Substanzen von oben appliziert werden. Es wurde darauf geachtet, dass nur Gummimaterial ohne Autofluoreszenz verwendet wurde. Um ein Abschnüren der Wurzel durch den Gummi zu vermeiden, wurde mit einer heißen Nadel ein Loch mit dem entsprechenden Durchmesser in den Gummi gestochen.

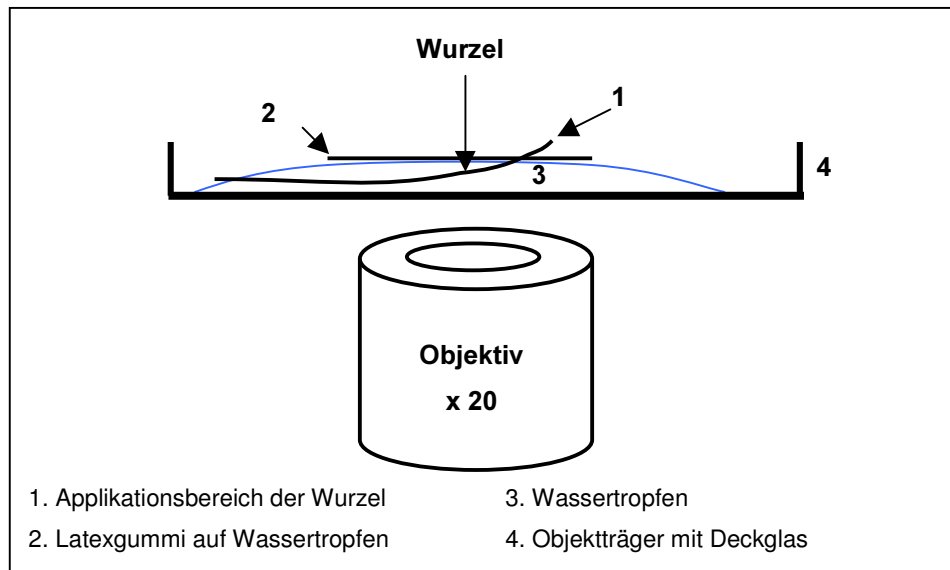


Abb. 4: Schematische Darstellung des Objektträgers für die fluoreszenzmikroskopischen Transportstudien: Es wurde ein ca. 2 cm langes Stück einer 5 d alten Gerstenwurzelspitze abgeschnitten und so durch ein Loch in einem ca. 1 cm² großen Latexgummi gesteckt, dass der Applikationsbereich (1) ca. 2 mm herausragte. Das Wurzelstück wurde mit dem Gummi (2) auf einen Wassertropfen auf dem Objektträger (4) gelegt. Mikroskop: Axiovert 100, Zeiss.

Während der gesamten Untersuchung wurde darauf geachtet, dass die Applikationslösung nicht in den Untersuchungsbereich gelangte. Um osmotische Effekte gering zu halten, wurde Leitungswasser verwendet.

2.1.2 Applikation der fluoreszierenden Modellsubstanzen

Die Applikation von Biman bzw. von fluoreszierenden Bimankonjugaten für die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte stets 2 min nach dem Start der Messung. In diesem Zeitraum wurde die Autofluoreszenz der Wurzel bestimmt. Es wurden 4 µl der jeweiligen Substanz (50 µmol) direkt im Applikationsbereich (apikal oder basal) der Wurzel appliziert (Abb. 5). Da Biman sofort in das betreffende Gewebe eindringt, von den Zellen aufgenommen und konjugiert wird, ermöglichte dieses Verfahren die visuelle Verfolgung der Konjugate in der Wurzel und die Ermittlung der Transportrichtung und Transportgeschwindigkeit.

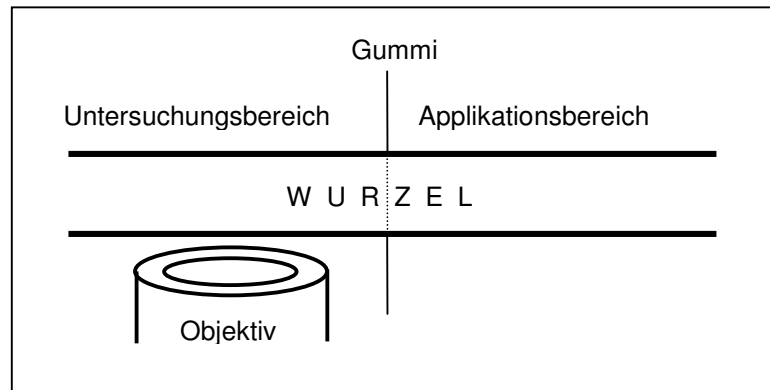


Abb. 5: In dieser Skizze ist das Applikationsschema der Bimanverbindungen dargestellt. Der Applikationsort wurde durch ein Gummi vom Ort der Fluoreszenzmessung abgetrennt, so dass keine Lösungen an der Wurzel seitlich vorbeilaufen (entweder an der basalen Seite, oder an der Spitze). Es wurden jeweils 5 d alte Gerstenwurzeln eingesetzt.

2.1.3 Datenanalyse

Die Fluoreszenz der Konjugate wurde während des gesamten Messzeitraums von einer CCD-Kamera detektiert und über das Softwareprogramm Vision (Till Vision, München) ausgewertet. Mit dieser Software war es außerdem möglich, die durch phenolische und ligninhaltige Zellsubstanzen hervorgerufene Autofluoreszenz (KOGA *et al.* 1988) von der bimaninduzierten Fluoreszenz zu subtrahieren. Dadurch wurden voneinander unabhängige Versuche vergleichbar. In jeder Messung wurden definierte Flächen mit der *Region-of-Interest* (ROI) Funktion ausgewertet. Die erhaltenen Daten wurden in Excel konvertiert und mit SigmaPlot 2000 statistisch ausgewertet.

2.2 Laserscanningmikroskopie (LSM)

Sämtliche Experimente mit dem Laserscanningmikroskop wurden in Zusammenarbeit mit M.D. Fricker (Institute of Plant Science, Oxford, UK) und J.O.D. Coleman (Brooks University, Oxford, UK) durchgeführt.

Mit Hilfe der LSM konnten die zelluläre Aufnahme und Verteilung der applizierten Fremdstoffe und deren Metaboliten untersucht werden. Diese Methode ermöglichte eine 3-D Visualisierung des Gewebes und erlaubte damit auch einen Einblick in tiefere

Zellschichten. Ausführliche Informationen zu dieser Technik sind bei PADDOCK (1999) nachzulesen.

Die Versuche wurden mit dem LSM 510 Axioplan (Carl Zeiss, Wetzlar) durchgeführt. Als Objektiv diente ein C-Apochromat (40x/ 1.2 Wasser). Das gesamte System wurde mit der Zeiss Werkssoftware (LSM 5.0) gesteuert.

Bimankonjugate (GS-B) konnten nach Anregung mit einem Argonlaser (458 nm, Leistung: 5 %) dargestellt werden. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 40 min. Dabei wurde die Wurzel alle drei Minuten angeregt. Mit einer Kalibriergeraden (250 μmol , 500 μmol und 1000 μmol) wurde die Menge an gebildeten GS-B Konjugaten nach Applikation mit MCB quantifiziert (Abb. 6).

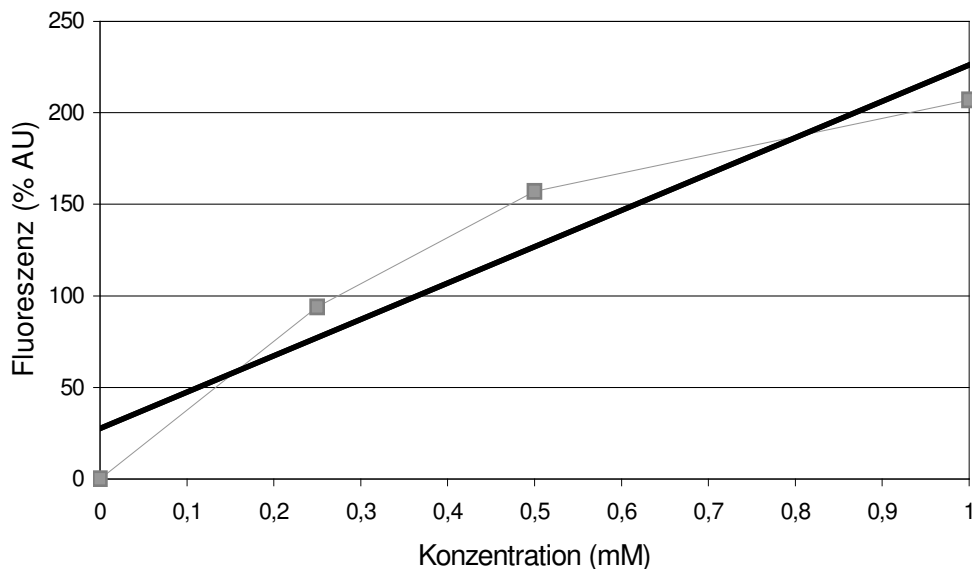


Abb. 6: Kalibriergerade eines GS-B-Konjugates. Es wurden Konzentrationen von 250 μmol , 500 μmol und 1000 μmol verwendet.

Weitere Einstellungen der LSM 5.0 Software (Zeiss, Wetzlar):

Scan Zoom: 1.0, Average: Line sum 4, Filters: BP 475-525, Beam Splitters: Track 1, MSB:

HFT 458, DBS1: Mirror, DBS2: NFT 545, DBS3: Plate, FW1: None, NDD_NT2, NDD_NT1

2.2.1 Präparation von Gerstenkeimlingen für die LSM

Die Transportstudien mit dem Laserscanningmikroskop erforderten einen modifizierten Versuchsaufbau, da hier mit einem planaren System gearbeitet wurde, d.h. das Objekt wurde von oben betrachtet. Vor den Experimenten mussten dazu spezifische Untersuchungskammern hergestellt werden (Abb. 7).

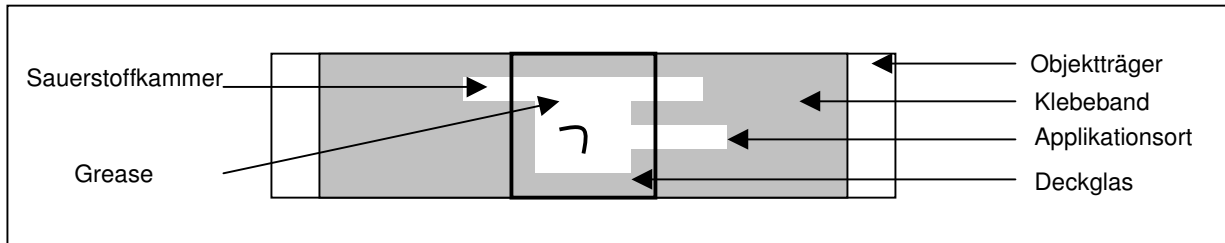


Abb. 7: Modell einer Untersuchungskammer, wie sie für die LSM Studien eingesetzt wurde. Die Anwesenheit von Sauerstoff ist für die meisten physiologischen Prozesse notwendig, deshalb wurde eigens eine Sauerstoffkammer in das Klebeband geschnitten. Durch mehrere Lagen Klebeband konnte das Volumen der Kammer vergrößert werden. Mit ‚Grease‘, einer vaselineartigen, fetthaltigen und optisch neutralen Substanz wurde die Kammer abgedichtet.

Dazu wurden Objektträger je nach Kammergröße und Wurzelstärke mit mehreren Lagen Isolierband beklebt. Danach wurde mit einer Rasierklinge das in Abb. 7 dargestellte Kammerdesign in das Klebeband geschnitten. Zur Untersuchung wurden ca. 2 cm lange Wurzelspitzen von 5 d alten Gerstenkeimlingen verwendet. Diese wurden vor jeder Untersuchung frisch präpariert.

2.2.2 Applikation der fluoreszierenden Modellsubstanzen

Der Applikationsort für MCB und GS-B ist bereits in Abb. 4 dargestellt. Es wurden 50 µl MCB in einer Konzentration von 50 µmol in die dafür vorgesehene Applikationskammer pipettiert. Aus verfahrenstechnischen Gründen konnte erst ca. 2 min nach Applikation mit der Online-Messung begonnen werden.

2.2.3 Datenanalyse

Die ermittelten Daten wurden mit der Carl Zeiss Software LSM 5.0 ausgewertet. Pro Messung wurden drei bis vier Zellen mit der *Region-of-Interest* Funktion (ROI) exakt ausgewertet, wobei folgende Parameter nicht verändert werden durften, da nur so voneinander unabhängige Wiederholungen miteinander verglichen werden konnten:

Modus: Rainbow-Palette, Helligkeit: 83, Kontrast: 75

Alle Daten wurden in Excel transformiert und ausgewertet. Zur einfachen Bildbearbeitung wurde ein frei verfügbarer *Image Browser* <http://www.zeiss.de> verwendet.

2.2.4 Beeinflussung des aktiven Transportes

Um im Cytosol der Wurzelzelle eine Sättigung von konjugiertem GSH zu erzielen und damit eine Endpunktbestimmung durchführen zu können, wurde der Abtransport des Konjugates in die Vakuole verhindert. Dazu wurde die Wurzel vor der Behandlung mit MCB für 30 min mit 5 mM Natriumazid (NaN_3) inkubiert. Die Anwesenheit von NaN_3 als starkes Zellgift hemmt den aktiven Transport von GS-Konjugaten in die Vakuole (MEYER *et al.* 2001). Eine Stimulation des Transporters sollte mit dem Einsatz des Herbizid-Safener Cloquintocet-mexyl (Syngenta) induziert werden. Dazu wurden die Wurzeln 24 h vor dem Experiment mit einer 10 μmol Lösung des Safeners inkubiert.

3 Enzymologische Untersuchungen

3.1 Proteinextraktion

3.1.1 Herstellung eines Rohextraktes

Zur Präparation des Rohextrakts wurden die bei -80°C gelagerten Pflanzen unter flüssigem Stickstoff gemörsert und das homogenisierte Pulver im Verhältnis 1:5 mit Extraktionspuffer pH 5 (Tab. 1) versetzt. Zur Extraktion vakuolärer Proteine bietet sich ein Puffer mit einem leicht saurem Optimum pH 5 (MES) an, da der physiologische pH in der Vakuole zwischen 5 und 6 liegt. Anschließend wurde das Gemisch unter ständigem Rühren auf Eis ca. 30 min lang inkubiert.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Extraktionspuffers

MES-Puffer 0,1M pH5	+ 1 % PVP K30
	+ 1 mM EDTA
	+ 1 mM DTE
	+ 5 μmol Pepstatin A
	+ 0,5 % Nonidet

Danach wurde das Homogenat für 30 min bei 20000 U/min abzentrifugiert (Beckman & Coulter, JA 21, 4°C), das Pellet in Mirachloth (Calbiochem) ausgedrückt und verworfen. Der Überstand wurde als Rohextrakt bei 4°C gelagert oder weiterverarbeitet.

3.1.2 Ammoniumsulfatfällung und Entsalzung

Zur weiteren Aufreinigung der Proteine wurde das Rohextrakt bei 4°C einer fraktionierten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung unterzogen. Dabei wird den Proteinen unter kontinuierlicher Zugabe von Salz ihre Hydrathülle entzogen, so dass sie, abhängig von ihrer Ladungsstärke, ausfallen und zentrifugal getrennt werden können. Im ersten Schritt wurde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis zu einer Konzentration von 35 % zugegeben, im zweiten bis 80 %.

Die benötigte Salzmenge wurde nach einer Formel von JAENICKE (1984) berechnet, die die gewünschte Salzmenge in Abhängigkeit von Volumen und vorgegebener Salzmenge beschreibt:

$$\text{Ammoniumsulfatmenge [g]} = \frac{1,77 * V * (S - s)}{3,54 - S}$$

V : Volumen der Proteinlösung [ml]
S : erwünschte Salzkonzentration (als Dezimalbruchteil von 1)
s : vorgelegte Salzkonzentration (als Dezimalbruchteil von 1)

Um eine optimale erste Fällung zu erreichen, wurde das zuvor fein gemörserte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ unter ständigem Rühren innerhalb von 30 min dem Extrakt zugegeben und danach für weitere 30 min äquilibriert. Das nach der ersten Fällung ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert (30 min, 20000 U/min, Beckman & Coulter, JA 21, 4°C), und als Pellet verworfen. Der Überstand wurde nun in der zweiten Fällung unter gleichen Bedingungen bis zu 80 % Salz gefällt und zentrifugiert, wobei jedoch nun das Pellet in 2,5 ml MES (25 mM, pH 5) resuspendiert wurde. Zur Erhöhung der Proteinkonzentration bot sich das Poolen von mehreren Aufarbeitungen in diesem Schritt an. Diese wurden alle in 2,5 ml MES (25 mM, pH 5) resuspendiert. Dieses hochkonzentrierte Proteinextrakt eignete sich hervorragend für weitere Untersuchungen.

Zur Entsalzung der Proteine wurden PD-10-Gelfiltrationssäulen mit Sephadex G-25-Material (Supelco) verwendet. Wie vom Hersteller empfohlen, wurden die Säulen vor Gebrauch mit 20 ml MES äquilibriert. Anschließend wurden 2,5 ml Proteinextrakt aufgegeben und das dabei austropfende Eluat verworfen. Das Protein wurde nun mit 3,5 ml des Äquilibrierungspuffers von der Säule eluiert und in Eppendorfgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei -80°C sind Proteine nahezu unbegrenzt haltbar.

4 Proteinanalytik

4.1 Kationenaustauschchromatographie

In Arbeiten von WOLF (1996) konnte mittels der Kationenaustauschchromatographie eine vakuoläre Carboxypeptidase (CP) angereichert werden. Nun sollte geprüft werden, ob sich auch andere vakuoläre Proteine mit dieser Methode anreichern lassen.

Diese Methode wurde mit einem Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC)–System durchgeführt, das eine chromatographische Trennung von Proteinen im Niederdruckbereich ermöglichte. Bei Verwendung einer Kationenaustauschsäule (stationäre Phase, Econo-Pac High-S, BioRad) gehen positiv geladene Gruppen von Proteinen elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Gruppen (S-haltige Anionen) der Säulenmatrix (Polystyrol) ein. Je nach Anzahl und Dichte der negativen und positiven Ladungen der Proteine werden diese unterschiedlich stark gebunden, d.h. die Proteine werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Gesamtladung bzw. Ladungsverteilung aufgetrennt. Durch Erhöhung der Ionenstärke im Puffer (mobile Phase) werden die Proteine schließlich von der Matrix verdrängt und können eluiert bzw. fraktioniert werden. Da vakuoläre Proteine zellulär in einem physiologisch sauren Milieu (pH 5,5 - 6,5) vorliegen, kann angenommen werden, dass diese von Anionen zurückgehalten werden. Vor der Durchführung wurde das FPLC-System (Abb. 8, BioRad) gespült und die Säule, wie vom Hersteller empfohlen, kalibriert.

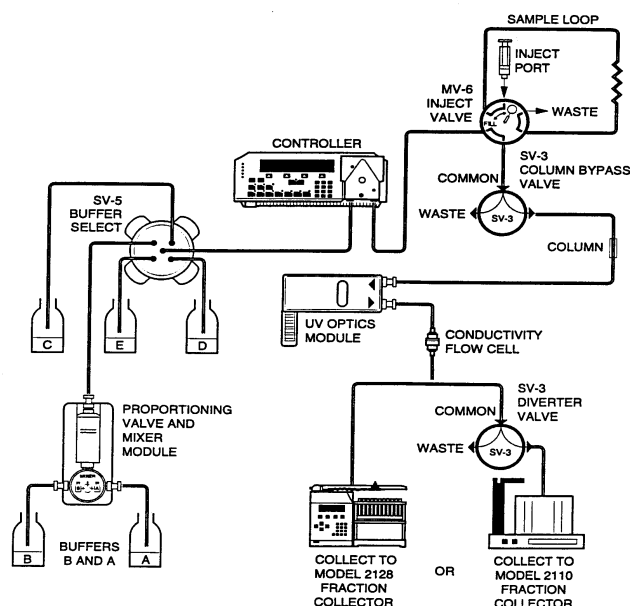


Abb. 8: Gesamtübersicht der FPLC-Komponenten (Bio-Rad)

Dabei verwendete, entgaste FPLC Laufmittel: Puffer A: 0,1 M, MES pH 5,5
Puffer B: 0,1 M. MES pH 5,5, 1 M NaCl

Die aufgetragene Probe hatte ein Volumen von 3 ml und bestand aus gefällten und entsalzten hochkonzentrierten Proteinfractionen (>1,5 mg/ml). Die aufgetragenen Proteine wurden mit einem aufsteigenden NaCl-Gradienten bei einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Hierbei erhöhte sich der Anteil an Puffer B innerhalb von 50 min linear auf 100 %. Relevante Enzyme eluierten innerhalb einer NaCl Konzentration von 30 bis 55 %. Die gesamte Trennung wurde bei 4°C durchgeführt.

4.2 Affinitätschromatographie

Mit dieser Methode sollte geprüft werden, ob vakuoläre Enzyme glutathionabhängig sind. Mit Hilfe der Affinitätschromatographie kann ein Protein bzw. eine Proteingruppe in einem Reinigungsschritt aus einem komplexen Proteingemisch herausgetrennt werden. Grundvoraussetzung ist, dass die Proteine eine spezifische, reversible Wechselwirkung mit den kovalent an die Grundmatrix gebundenen Liganden des Säulenmaterials eingehen. Die Kopplung der Liganden an das Trägermaterial geschieht über sog. *Spacer*, Zwischenstücke mit einer Länge von 6-10 C-Atomen. Sie erfüllen den Zweck, den Liganden vom Trägermaterial fernzuhalten, damit er sterisch ungehindert mit dem zu reinigenden Molekül in Wechselwirkung treten kann. Somit werden nur solche Proteine in der Säule festgehalten, die eine hohe Affinität zum Liganden besitzen, während die restlichen Proteine und andere Bestandteile des Extraktes ungehindert eluieren. Durch Zugabe von freien Liganden und/oder Änderung der Salzkonzentration im Elutionspuffer kann das gebundene Protein wieder von der Matrix gelöst und aufgefangen werden.

Die verwendeten Matrices bestanden aus Agarose, als Ligand wurde GSH (an den *Spacer* gekoppelt *via* S) verwendet, mit dem die Reinigung glutathionabhängiger Glutathion-S-Transferasen (GST) bereits erfolgreich durchgeführt wurde (MOZER *et al.* 1983, GÖTZBERGER 1994).

Nach Äquilibrierung der Säule mit dem Probenpuffer wurde 1 ml des Probenmaterials auf die Säule aufgetragen. Nach dem Einfüllen der Probe in die Säule wurde diese verschlossen und für ca. 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Öffnen der Säule konnten die nicht gebundenen Proteine durch sechsmalige Zugabe von 1 ml MES/KOH-Puffer (25 mM, pH 5) aufgefangen werden. Anschließend wurden die glutathionabhängigen Proteine mit einem GSH/NaCl-Stufengradienten eluiert (GSH: 1 bis 16 mM, NaCl: 0,1-0,4 M). Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 1 ml in Eppendorfgefäßen gesammelt und bis zum Enzymtest auf Eis gelagert. Die verschiedenen GSH/NaCl-Konzentrationen (s. Tab. 2) wurden in MES/KOH-Puffer (25 mM, pH 5) angesetzt.

Tab. 2: Konzentrationen der GSH/Salz-Fraktionen für die Affinitätschromatographie

GSH/Salz-Konzentrationen in Tris/HCl-Puffer[mM]:					
GSH	1	2	4	8	16
NaCl	100	150	200	300	400

Alle Fraktionen wurden im Anschluss entsalzt (Kap.II.4.3), die Proteinwerte nach Bradford (1976) ermittelt (Kap.II 9.1) und Enzymaktivitäten bestimmt (Kap.II 6).

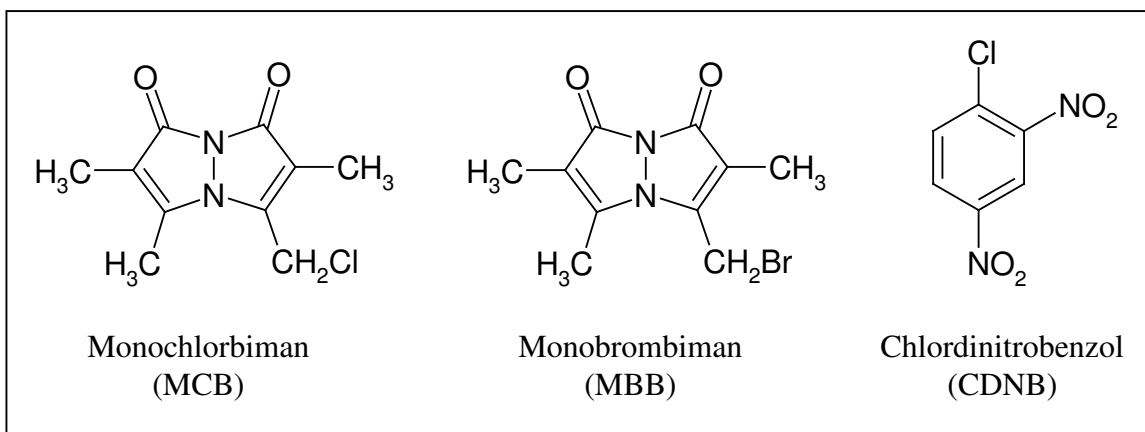
4.3 Entsalzung gereinigter Proteinfractionen

Da nach der Proteinfractionierung die gesammelten Fraktionen in bis zu 0,5 M NaCl-Konzentrationen vorlagen, war es notwendig, alle Fraktionen zu entsalzen. Kleine Volumina (0,5 bis 1,5 ml) wurden über 5 ml Sepharose Säulen (HiTrap Desalting, Amersham) entsalzt. Zunächst wurden dabei alle Säulen mit 25 ml des Proteinpuffers (25 mM, pH 5-5,5) äquilibriert und dann 1,5 ml des Proteins aufgetragen. Wurden nur 1 ml Fraktionen separiert, mussten die Fraktionen entsprechend verdünnt werden. Das aufgetragene Protein wurde mit 2 ml desselben Puffers eluiert und entsprechend weiterverarbeitet. Danach wurden die Säulen mit 10 ml HCl (0,1 M) gespült und zur Entsalzung der nächsten Proteinfraction erneut äquilibriert. Die Wiederfindungsrate des Proteins lag bei ca. 80 bis 90 %.

5 Herstellung von Thiol-Xenobiotika-Konjugaten

Die Synthese von Konjugaten beruhte auf einer spontanen Substitutionsreaktion thiolischer Substanzen (Glutathion, γ Glutamylcystein, Cystein) mit halogenierten Xenobiotika im basischen Milieu. Dabei wird die reaktive Gruppe des Xenobiotikums durch die SH-Gruppe des Thiols verdrängt und es entsteht ein stabiles Konjugat.

Folgende Xenobiotika wurden verwendet:



Zur Herstellung von 5 ml Konjugat (1 mM) wurde wie folgt pipettiert:

- 50 μ l 0,1 M GSH (Fluka), γ GC (Sigma), L-Cys (Fluka)
- 250 μ l 0,03 M Xenobiotikum (in EtOH)
- 4700 μ l 0,025 M KPP (pH 8)

Das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde das nicht konjugierte überschüssige Xenobiotikum vom gebildeten Konjugat physikalisch getrennt. Dazu wurde die Lösung mit 1 ml Dichlormethan versetzt, geschüttelt und anschließend 30 s lang zentrifugiert. Überschüssiges Xenobiotikum befand sich nun in der unteren Phase (Dichlormethan) und im Überstand das Konjugat. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt.

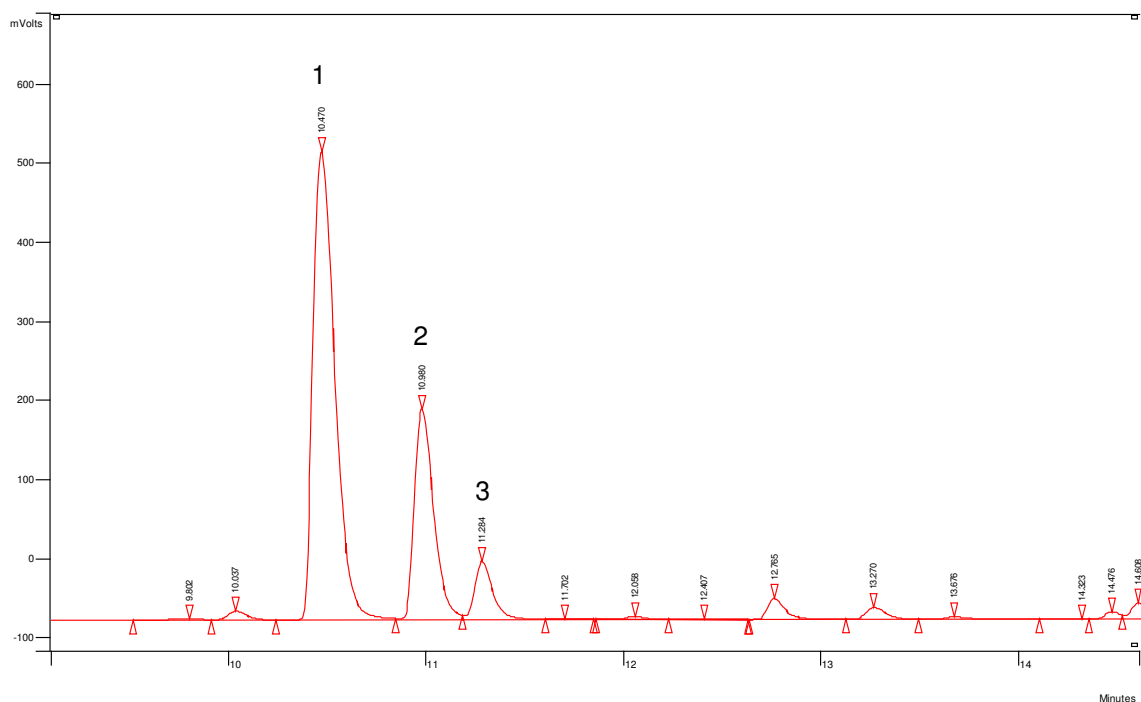


Abb. 9: HPLC-Chromatogramm der drei eingesetzten Dinitrobenzol-Konjugate: (1) GS-DNB, (2) γ GC-DNB, (3) Cys-DNB. Während der Untersuchungen gab es technisch bedingte leichte Änderungen der Retentionszeiten (± 1 min), die Abstände zwischen den Peaks waren jedoch aufgrund des Gradienten konstant (Säule: Hypersil-ODS, Bischoff). Zwischen GS-DNB (1) und γ GC-DNB (2) liegen ca. 0,5 min und zwischen γ GC-DNB (2) und Cys-DNB (3) ca. 0,3 min bei dem in Kap. II 6.1 beschriebenen Gradienten.

Die Konjugate wurde via HPLC identifiziert (Abb. 9) und zur Überprüfung freundlicherweise von A. Güntner, (Institut für Bodenökologie, GSF) massenspektroskopisch untersucht. Das Konjugat ist bei 4°C einige Wochen haltbar, kann aber zur weiteren Stabilisierung und zur Konzentration gefriergetrocknet werden. Danach wurde es in H₂O bis zur 4,5-fachen Molarität resuspendiert. Ausgefallene Xenobiotika können per Zentrifugation getrennt und erneut mit Dichlormethan entfernt werden.

6 Bestimmung von Enzymaktivitäten

6.1 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Da sich die Spektren der Glutathionkonjugate von denen der enzymatischen Abbauprodukte im Bereich von 220 nm bis 700 nm praktisch nicht unterscheiden und deshalb ein photometrischer Test nicht möglich war, wurden die Abbauprodukte *via* HPLC detektiert. Vor diesem Hintergrund wurde ein Enzymtest etabliert, der die Quantifizierung aller GS-DNB-Abbauprodukte mittels HPLC ermöglicht. Als Modellsubstrate wurden Glutathion-DNB (GS-DNB), γ Glutamylcysteinyl-DNB (γ GC-DNB) und Cysteinyl-DNB (Cys-DNB) verwendet. Da zur Aktivitätsbestimmung zunächst spezifische Aktivitäten berechnet wurden, konnte sich die eingesetzte Enzymmenge unterscheiden.

Die Testansätze hatten folgende Zusammensetzung:

MES 100 mM, (pH 5)

DNB-Konjugat, (50 mM im Ansatz)

Enzym-/Vakuolenextrakt in MES, 0,1 M, (pH 5,5)

Dieser Ansatz wurde je nach Inkubationszeit bei Raumtemperatur inkubiert und mit der gleichen Menge einer Stopplösung (20% ACN + 0,1% TFA) versetzt. Das denaturierte Protein wurde nachfolgend 5 min lang bei 13000 U/min (Beckman, SpinVac) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und in HPLC-Gefäße überführt.

Das verwendete HPLC-System bestand aus automatischem Probengeber (Hewlett Packard), Pumpe (Varian ProStar 230), UV-Monitor (Gynkotek GP4) sowie einer Auswertungseinheit (Varian Star Workstation 5.5). Der Computer war über ein externes Modul (Star 800) mit dem UV-Monitor verbunden und die Pumpe über ein GPIB-Board mit dem Computer. Zur Trennung des Stoffgemisches wurden ein gegenläufiger Acetonitril (ACN)/H₂O Gradient von 20 % ACN bis 100 % ACN bei einer Flussrate von 1 ml/min (Tab. 3) und eine Hypersil-ODS Säule (5,0 μ m, 250 x 4,0 mm, Bischoff, Leonberg) verwendet. Beide Laufmittel enthielten 0,1 % TFA, wurden im Ultraschallbad entgast und bei Raumtemperatur verwendet.

Tab. 3: HPLC Gradient zur Elution von Thiokonjugaten

Zeit (min)	A: Acetonitril, ACN (%)	B: H ₂ O _{dd} (%)
5	20	80
15	100	0
5	100	0
5	20	80

Es wurden jeweils 60 µl Probe mit dem Autosampler injiziert, die Detektion der Konjugate erfolgte bei 280 nm. Um eine Abbaurate der Glutathionkonjugate zu ermitteln, wurden für γ Glutamylcysteinyl-DNB und Cysteinyl-DNB Kalibrierungskurven (Abb. 10) erstellt, mit deren Steigung der Gesamtumsatz berechnet werden konnte. Der Gesamtumsatz pro Proteinmenge ergab schließlich eine spezifische Enzymaktivität.

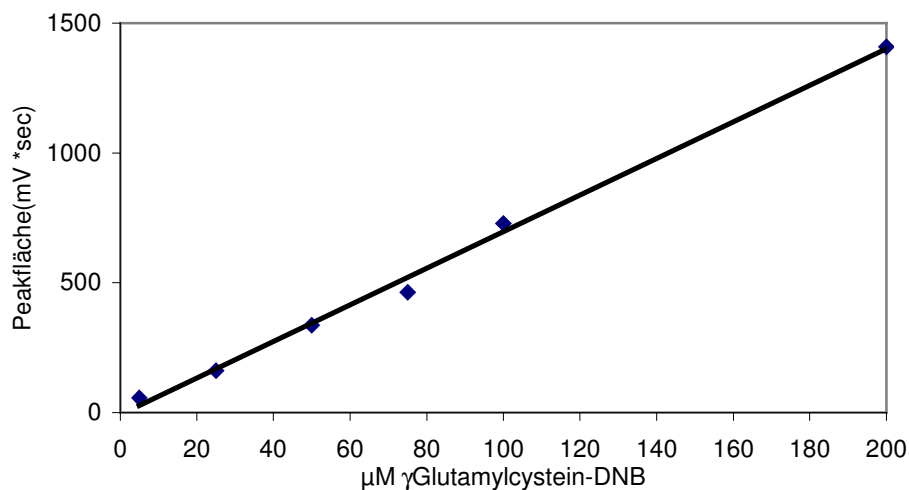


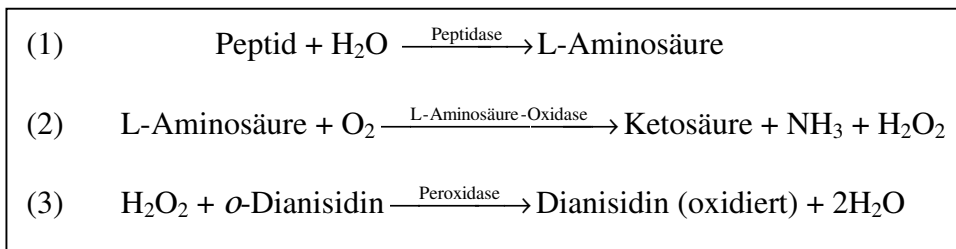
Abb. 10: Beispiel einer Kalibriergeraden für γ Glutamylcysteinyl-DNB. Dargestellt ist eingesetzte Menge an Konjugat gegen die detektierte Peakfläche. Die Geradengleichung lautet: $y = 7,05x - 8,6$. Mit der Steigung konnte die Gesamtaktivität berechnet werden

Zur Peakidentifizierung wurden entweder Referenzstandards (s. Kap. II. 5) oder Massenspektren präparierter Produktpeaks eingesetzt.

Die enzymkinetische Einheit Unit (U) beschreibt den Umsatz von μ M Substrat pro min.

6.2 Bestimmung der Carboxypeptidase-Aktivität mittels eines optischen Tests

Dieser Test beruht auf einer Gelfärbemethode von LEWIS und HARRIS (1967). WOLF und WEISER (1976) haben aus dieser Methode einen gekoppelten optischen Test zur Messung von Peptidaseaktivitäten entwickelt. Die Methode beruht auf folgenden Reaktionen:



Die durch Hydrolyse (1) aus dem Peptid frei gewordene L-Aminosäure wird in Reaktion (2) durch die L-Aminosäure-Oxidase unter Freisetzung von H_2O_2 desaminiert. In Reaktion (3) wird schließlich *o*-Dianisidin von H_2O_2 unter Farbumschlag oxidiert. Diese Reaktion wird durch die Zugabe von Peroxidase zusätzlich katalysiert, wobei sich das Reaktionsgleichgewicht bis zum Endpunkt nach rechts verschiebt. Oxidiertes Dianisidin (bräunlich) wird bei 405 nm detektiert.

Der Einsatz dieses Tests nach einer GSH-abhängigen Affinitätschromatographie ist nicht möglich, da zugesetztes GSH in die Reaktion (3) antioxidativ eingreift und auf diese Weise einen Farbumschlag verhindert.

Die verwendeten Lösungen hatten folgende Zusammensetzung:

Testlösung (10 ml): Kaliumphosphat-Puffer 0,2 M, pH 7,0
 + L-Aminosäure-Oxidase (Sigma), 0,0025 g
 + Peroxidase (Horseradish), 0,0040 g
 + MnCl_2 (nur bei langen Inkubationen nötig) 0,0009 g

Peptidlösung (10 ml): Kaliumphosphat-Puffer 0,2 M, pH 7,0
 + 0,0322 g Z-Gly-Leu (Bachem)

Dianisidinlösung: 2 mg *o*-Dianisidin-Dihydrochlorid (Sigma)/ml H_2O

Die Testlösung wurde unmittelbar vor dem Photometertest mit der Peptidlösung im Verhältnis 1:1 vermischt und in einem Gesamtvolumen von 200 μl in dreifacher Wiederholung auf Multi-Well Platten pipettiert (Tab. 4):

Tab. 4: Pipettieransatz für den optischen CP Test.

Medium	[μl]
Test-/Proteinlg (1:1)	181,8
Dianisidinlösung	9,1
Enzymmenge	9,1
Gesamtvolumen pro Well	200

Es wurden bei innerhalb von 1,5 h 90 Messungen (SPECTRAMax PLUS 384, Molecular Devices) bei Raumtemperatur durchgeführt und die ermittelten Absorptionseinheiten gegen einen Nullwert verrechnet.

WOLF und WEISER (1976) konnten zeigen, dass 0,725 Absorptionseinheiten (OD) der Bildung von 100 nM L-Leucin äquivalent sind. Bis zu 1,5 (OD) ist der Anstieg linear. In Verbindung mit der Proteinkonzentration konnte die CP-Aktivität berechnet werden.

6.3 Messung der GST-Aktivität *via* Fluoreszenzspektrometer

Parallel zu den cytologischen Transportuntersuchungen *in vivo* wurde die spezifische Enzymaktivität der Wurzel-GSTs *in vitro* überprüft. Dabei wurde zunächst mit MBB die Gesamtmenge an SH-Gruppen bestimmt. Im weiteren wurden die spontane Bindungsrate von MCB mit GSH sowie die GST induzierte Bindung von MCB an GSH detektiert. Diese Versuche wurden sowohl bei pH 7,5 als auch bei pH 6,4 durchgeführt.

Mit Hilfe dieses Experimentes konnte die GST-abhängige Menge an gebildeten Glutathionkonjugat berechnet werden. Außerdem ließen sich Aussagen über die pH-Abhängigkeit dieser Reaktion treffen. Im folgenden sind ein Pipettierschema und wichtige Messparameter dargestellt (Tab. 5).

Tab. 5: Pipettierschema zur Bestimmung der GST-Aktivität.

	MCB (spontan)	MCB (Enzym)
Puffervolumen (KPP, 0,1 M) ¹	925 µl	900 µl
GSH-Menge (20 mM)	50 µl	50 µl
Enzymmenge	-	25 µl
Substratmenge (20 mM)	25 µl	25 µl
Gesamtvolumen in der Küvette	1000 µl	1000 µl
Substrat in Küvette [mM]	1	1
GSH in Küvette [mM]	1	1
Anregung [nm]	380	380
Fluoreszenz [nm]	480	480

1) Diese Versuche wurden sowohl mit KPP-Puffer von pH 7,5 als auch mit pH 6,4 durchgeführt.

Alle Reagenzien wurden in der oben genannten Reihenfolge in eine Fluoreszenzmakroküvette pipettiert und solange gemessen, bis der Endpunkt der Reaktion erreicht war (ca. 1 h). Die Messungen erfolgten in einem Fluoreszenzspektrometer (Spectrofluorimeter JV3 D, ISA Instruments, USA), dessen Spannungsänderung über ein Digitalvoltmeter (Voltcraft M-4990, A. Conrad electronics, Hirschau) angegeben und über eine Software (Digiscop for Win, Conrad electronics, Hirschau) online aufgezeichnet wurde. Die Daten konnten als Exceldatei exportiert und mit SigmaPlot 2000 graphisch dargestellt werden.

7 Co-Faktoren der untersuchten Enzyme

Die Entsalzung des gefällten Rohextraktes über eine PD10 Säule kann mit dem Verlust essentieller Co-Faktoren einhergehen. Aus diesem Grund wurden dem Reaktionsansatz zur Aktivitätsbestimmung die in Tab. 6 zusammengefassten Co-Faktoren zugegeben. Alle Co-Faktoren wurden in konzentrierten Stocklösungen (0,1 mM) angesetzt und bei 4°C gelagert.

Tab. 6: Konzentrationen der eingesetzten Co-Faktoren.

Co-Faktor	mM
ZnCl ₂	6
MnCl ₂	10
ATP	5
Pyridoxalphosphat (Vitamin B6)	0,05

8 Präparation von Protoplasten und Vakuolen aus dem Mesophyll von Gerstenprimärblättern

Die Präparation erfolgte mit Hilfe differentieller Zentrifugation, bei der Gradienten unterschiedlicher spezifischer Dichte geschichtet wurden. Die Zellorganelle können dabei aufgrund ihrer eigenen Dichte auf bestimmte Phasengrenzen fokussiert werden. Zur Zentrifugation war ein *Swing Out* Rotor unbedingt erforderlich, alle Behältnisse wurden offen zentrifugiert (500 x g oder 700 U/min, 4°C). Nach dem Verdau mussten alle Arbeitsschritte bei 4°C durchgeführt werden. Die Isolierung der Protoplasten und Vakuolen aus dem Mesophyll erfolgte nach RENTSCH und MARTINOIA (1991).

8.1 Reagenzien

Die folgenden Medien sollten als Stammlösung in den angegebenen Mengen hergestellt werden. Bei den Percoll Lösungen stellte sich der geforderte pH-Wert bereits durch die Zugabe der beschriebenen Puffermenge ein, ein exakter Wert ist nicht messbar, da der Anteil an H^+/OH^- in Percoll nicht bekannt ist.

MCP-Medium	g/l
0,5 M Sorbit	91,1
1 mM $CaCl_2$	0,14
10 mM MES/KOH (pH 5,6)	2,14

Sorbitmedium (SM) pH 7,2	g/l
0,4 M Sorbit	72,87
30 mM K-Gluconat	7,03
20 mM HEPES/KOH (pH 7,2)	4,77

Betainmedium (BM) pH 7,2	g/0,2 l
0,4 M Glycinbetain	9,36
30 mM K-Gluconat	1,40
20 mM HEPES/KOH (pH 7,2)	0,95

Percoll 100 % pH 7,2*	g/50 ml
0,5 M Sorbit	4,55
20 mM HEPES	0,24
Percoll	ad 50 ml

*(pH Wert stellt sich selbst ein)

Percoll 100 % pH 6*	g/50 ml
0,5 M Sorbit	4,55
20 mM MES	0,21
Percoll	ad 50 ml

*(pH Wert stellt sich selbst ein)

Folgende Medien wurden unmittelbar vor der Präparierung frisch angesetzt. BSA war lediglich zur Stabilisierung der Vakuolen für zytologische Aufnahmestudien notwendig. Bei der Analyse vakuolärer Enzyme konnte es ebenso wie DTT (verfälscht die Proteinbestimmung nach BRADFORD 1976) weggelassen werden.

Betainmedium (BM) pH 7,2	20 ml
+ DTT	20 µl
BSA	0,020 g

Sorbitmedium (SM) pH7,2	150 ml
+ DTT	150 µl
BSA	0,15 g

Percoll 25 % pH 7,2	60 ml
Percoll 100 % pH 7,2	15 ml
Frisches Sorbitmedium (SM) pH 7,2 (mit DTT und BSA)	ad 45 ml

8.2 Primärblatternte

Für die Isolierung von Mesophyll-Vakuolen aus Gerste wurden 10 d alte Primärblätter geerntet, die nach Kap. II 1 angezogen worden sind. Nur der vollständig entfaltete, apikale Teil des Blattes wurde verwendet. Die Blätter wurden an der adaxialen Seite mit einer stumpfen Rasierklinge ca. 1 cm unterhalb der Blattspitze angeritzt (Durchtrennung der adaxialen Epidermis und Mesophyll). Nun wurde die Spitze nach hinten abgeklappt und mit ihr die abaxiale Epidermis abgezogen. Die Blätter wurden mit dem freigelegten Mesophyll nach unten nebeneinander in große Petrischalen gelegt, in denen sich gerade soviel im Verhältnis 1:3 verdünntes MCP-Medium befand, dass die offenen Blätter nicht austrockneten. Pro Präparation konnten unter Mithilfe innerhalb von 2 h ca. 10 große Petrischalen mit aneinander gereihten Blättern zubereitet werden.

8.3 Protoplastenisolierung

Nach der vollständigen Vorbereitung von ca. 10 Petrischalen wurde das verdünnte MCP-Medium mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und durch 10 ml frisch angesetztes Verdaumedium (VM) ersetzt.

Verdaumedium (VM)	120 ml
+ Cellulase ‚Onozuka‘ 0,3 %	0,360 g
+ Pectolyase 0,03 %	0,036 g
MCP-Medium	ad 120 ml

Nach ca. 2 h Inkubation bei 30°C (Inkubationsschrank) wurde das VM so abgesaugt, dass alle Protoplasten noch locker im Zellverband verblieben. Nun wurden 10 ml MCP-Medium pro Schale dazugegeben und durch leichtes kreisendes Schütteln die Protoplasten aus dem Zellverband herausgelöst. Alle Suspensionen wurden auf 4 Zentrifugenbecher (50 ml) dekantiert. Die verbleibenden Gewebereste wurden noch einmal mit 10-20 ml MCP nachgespült und ausgedrückt. Im nächsten Schritt sollten die erhaltenen Protoplasten konzentriert werden. Dazu wurde die gesammelte Suspension mit ca. 500 µl 100 % Percoll (pH 6) unterschichtet, wozu man eine Pasteurpipette verwendete. Danach wurden die Becher 5 min lang zentrifugiert (*Swing Out*, 500 x g oder 750 U/min, 4°C). Die Protoplasten sedimentierten auf dem Percollkissen. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Protoplasten mit dem Percoll vermischt. Diese Suspension sollte jetzt eine Percollkonzentration von ca. 35 % (bis zu 50 %) haben.

Zur Aufreinigung der Protoplasten wurde das Gemisch auf zwei Zentrifugenbecher (50 ml) verteilt, wobei die anderen beiden Becher mit ca. 10 ml Percoll (pH 6) ausgespült wurden. Beide Becher wurden etwas geschüttelt und mit einem gleichen Volumen Percoll (25 %, pH 7,2) und einem halben Volumen SM überschichtet. Nach 5 min Zentrifugation lagen die gereinigten Mesophyllprotoplasten in einer bis zu 2 cm breiten dunkelgrünen oberen Interphase vor (in der unteren Interphase waren Zelltrümmer und inhomogene Protoplasten). Diese Phase konnte als reine Mesophyllprotoplasten-Fraktion gesammelt werden.

8.4 Vakuolenisolierung

Mit einer 5 ml Spritze, in der sich bereits 2 ml SM befanden, wurden die Mesophyllprotoplasten (obere Interphase) abgezogen. Alles wurde in der Spritze mit einer Luftblase geschüttelt und druckvoll in ein hohes Becherglas gespritzt. Dadurch sollten ca. 50 % der Protoplasten durch Scherkräfte platzen, so dass sich freie Vakuolen in dem Lysat befanden.

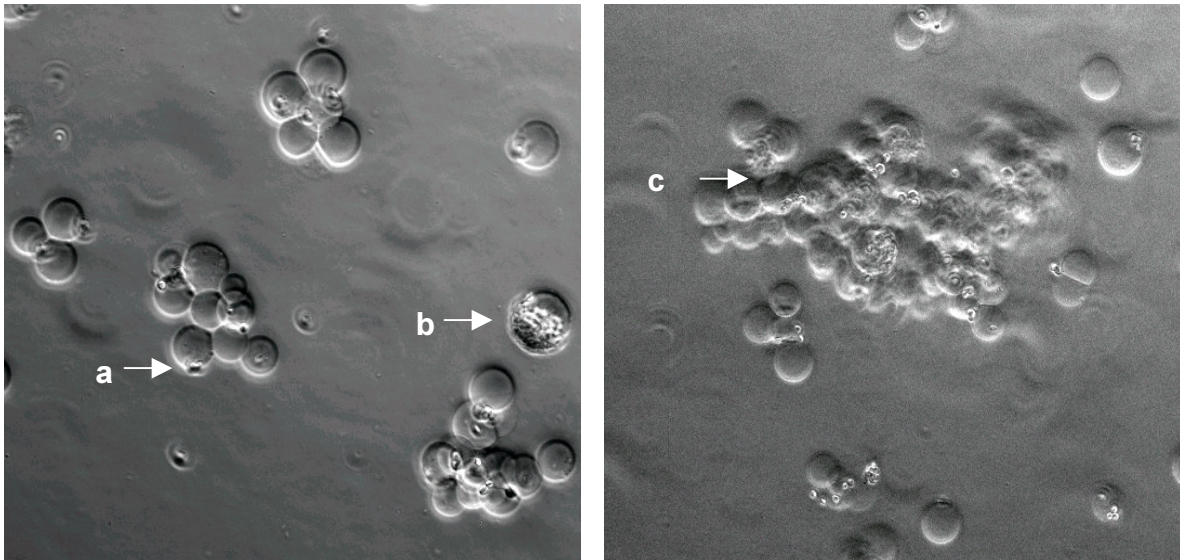


Abb. 11: Vakuolen der oberen hellgrünen Interphase nach der ersten Reinigung. Es sind noch vereinzelte, den Vakuolen aufliegende, cytosolische Reste (a) sowie Protoplasten (b) erkennbar. Es ist die deutliche Bildung von Clustern (c) innerhalb der Interphase zu erkennen. Dieses Phänomen kann auf den Verzicht von BSA in dieser Fraktionierung zurückgeführt werden, welches die Polarisierung der Membranen herabsetzt. Die Zugabe einiger Tropfen Betain in das Medium auf dem Objektträger erhöhte den Brechungsindex und verbesserte damit die Visualisierung (Lichtmikroskopische Aufnahme, Zeiss Axiovert, 20-fach).

Das Lysat wurde auf vier kleinere Glaszentrifugenröhrchen verteilt. Darauf wird ein gleiches Volumen SM und schließlich ein halbes Volumen Betainmedium (BM) pipettiert. Nach 5 min Zentrifugation (*Swing Out*, 500 x g oder 750 U/min, 4°C) lagen die gereinigten Vakuolen in einer dünnen hellgrünen oberen Interphase (Abb. 11) vor (in der unteren Interphase sind intakte Protoplasten, im Pellet sind reine Chloroplasten). Die Vakuolen wurden gesammelt und konnten bei Bedarf noch mal gereinigt werden. Dazu wurden sie mit 1 ml Percoll 100 % (pH 7,2) versetzt und erneut mit SM und BM überschichtet und 5 min unter den beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Nun lagen die Vakuolen in einer gelblichen oberen Interphase vor und wurden entweder für mikroskopische Zwecke auf Eis gelagert oder sofort in $N_{liq.}$ überführt.

8.5 Vakuolenfraktionierung

Die gewonnenen Vakuolen wurden *via* Ultrazentrifugation bei 50000 U/min fraktioniert. Der Überstand stellte die lösliche Proteinfraction dar, im Pellet befanden sich Tonoplastenmembranen, die in MES 25 mM, (pH 5,5) resuspendiert wurden. Die eingesetzte Menge MES entsprach der Menge des Überstandes. Um membranständige Proteine freizusetzen, wurde der Membranfraction zusätzlich das Detergenz Nonidet (0,5 %) zugesetzt.

9 Bestimmung von Bezugsgrößen

9.1 Quantifizierung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung in den Enzymextrakten und Vakuolen wurde nach der Methode von BRADFORD (1976) durchgeführt. Bei dem BRADFORD-Reagenz handelt es sich um ein Protein-Assay-Konzentrat (BioRad), das im Verhältnis 1:10 mit H_2O_{dd} Wasser verdünnt und verwendet wird. Das Testprinzip beruht auf der spezifischen Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 an aromatische Aminosäuren und deren photometrischer Detektion bei 595 nm (SPECTRAMax PLUS 384, Molecular Devices). Zur Kalibrierung wurde mit BSA eine Eichkurve (Abb. 12) angefertigt.

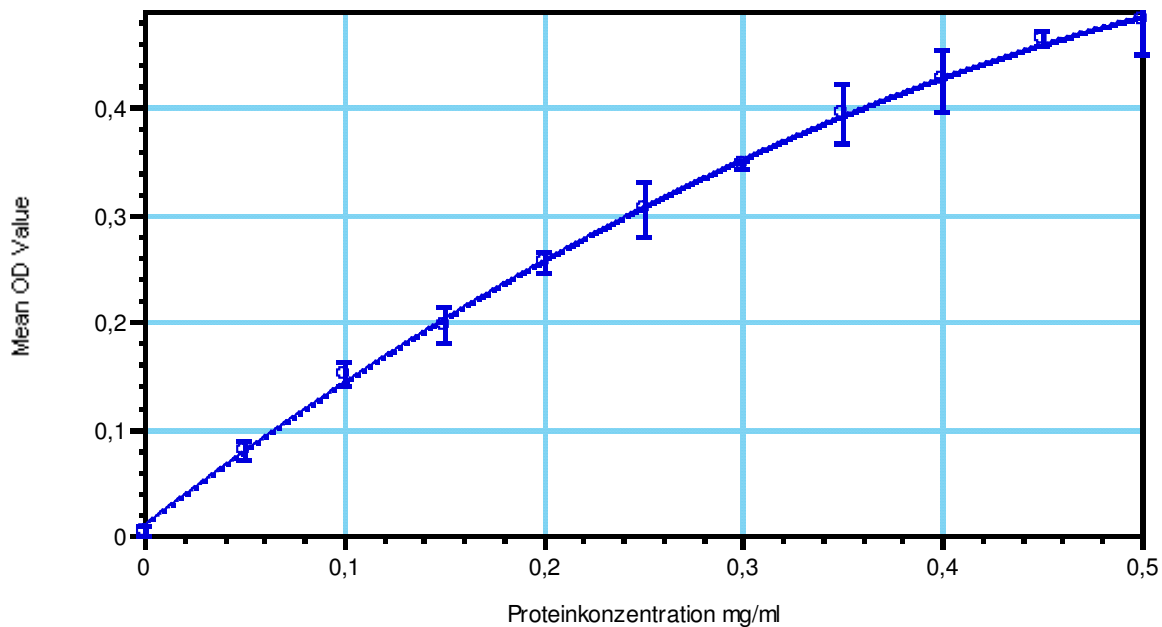


Abb. 12: Beispiel einer Standardeichkurve zur Bestimmung des Proteingehaltes nach BRADFORD (1976). Es wurden 10 verschiedene BSA-Konzentrationen (0,05 – 0,5 mg/ml) eingesetzt.

Zur Messung wurde jeweils 100 μ l BRADFORD-Reagenz mit 10 μ l Probe in Multiplatten pipettiert und der Farbumschlag nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur gemessen. Die OD Werte wurden mit der Software SOFTmaxPro (Molecular Devices) ausgewertet. Zur genauen Bestimmung der Proteinkonzentration sollte die Konzentration von schwefelhaltigen Stabilisatoren (DTT, DTE) in der Probe die Konzentration von 1 mM nicht überschreiten (BRADFORD 1976).

9.2 Quantifizierung der Protoplasten-/Vakuolenfraktion

Zur Ermittlung der Protoplasten- oder Vakuolendichte einer Suspension wurde die α -Mannosidase-Aktivität photometrisch bestimmt. α -Mannosidase ist ein tonoplastenständiges Markerenzym, das Substrate (hier: p-Nitrophenyl- α -Mannopyranosid, Sigma) hydrolytisch spaltet (KAISER *et al.* 1986). Das entstehende Produkt (hier: p-Nitrobenzol) konnte bei 405 nm detektiert werden. Es wurde wie folgt gearbeitet:

40 mg p-Nitrophenyl- α -Mannopyranosid wurden in 200 μ l DMF gelöst und mit 20 ml 0,1 M Citratpuffer (pH 4) versetzt (Substratlösung). Nun wurden 200 μ l Substratlösung mit 25 μ l Protoplasten-/Vakuolenfraktion bei 36°C (Heizblock) inkubiert. Nach 1 h wurde die Reaktion mit 500 μ l Na₂CO₃ (0,2 M) abgestoppt und unverzüglich gegen einen Nullwert (ohne Vakuolen) gemessen. Die erhaltenen OD-Werte ermöglichten einen Vergleich zu bereits quantifizierten Vakuolenpräparationen. So entspricht ein OD-Wert von 0,7 einer Anzahl von 10⁵ Vakuolen oder 10⁵ Protoplasten/25 μ l (DIETZ *et al.* 1992). Da diese Quantifizierung linear verläuft, stellt damit ein OD-Wert von 1,0 eine Vakuolen-/ Protoplastenkonzentration von 5,7 Mio./ml dar. Zur Volumenverteilung der Vakuolen-/ Protoplastenfraktion lassen sich folgende Bezüge herstellen (WINTER *et al.* 1993): 10⁵ Mesophyllprotoplasten haben ein Volumen von 2,5 mm³ und 10⁵ Vakuolen ein Volumen von 1,6 mm³. 1305 mm³ Blattvolumen entsprechen einem Frischgewicht (FW) von 1 g. Daraus ergeben sich folgende Gewichtsbeziehungen:

10⁵ Mesophyllvakuolen wiegen 1,22 mg

10⁵ Mesophyllprotoplasten wiegen 1,91 mg

Außerdem ließen sich, verbunden mit einer Proteinbestimmung (Kap. II 9.1) die kompartimentierten Enzymaktivitäten der vakuolären Enzyme in den Fraktionen bestimmen. Dazu wurden die in Kap. II 6 beschriebenen Enzymtests durchgeführt.

10 Gelelektrophorese

10.1 1D-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die angereicherten FPLC-Fractionen, in denen sich CP- und DP- Aktivität befand, sollten zur weiteren Identifizierung mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Dazu wurden die entsalzten Proben zunächst lyophilisiert und in H₂O_{dd} resuspendiert.

Zur Gelelektrophorese wurden folgende Reagenzien benötigt:

SDS Untergel Puffer pH 8,8	500 ml
Tris/HCl Puffer (1,5 M), pH 8,8	480 ml
4 % SDS (10 % Stocklösung)	20 ml

SDS Obergel Puffer pH 6,8	500 ml
Tris/HCl Puffer (0,5 M), pH 6,8	480 ml
4 % SDS (10 % Stocklösung)	20 ml

10 x SDS Laufpuffer pH 8,3	1000 ml
SDS (1%)	10 g
Tris (0,25M)	30 g
Glycerin (1,92M)	144 g
H ₂ O _{dd}	+ 1000 ml

2 x SDS Proben Puffer	15,5 ml
3,87 % SDS (10 % Stocklösung)	6 ml,
Tris (1 M) pH 6,8	1,9 ml
β-Mercaptoethanol (20%)	3 ml
H ₂ O _{dd}	1 ml
3,87 mM ETDA (0,2 M Stocklösung)	0,3 ml
Glycerin (100 %)	3 ml
0,1% Bromphenol Blau	0,3 ml

Zunächst wurde ein zwölfprozentiges unteres Gel hergestellt. Dafür wurden 18 ml H₂O_{dd} mit 10 ml ‚Untergel‘ Puffer und 12 ml 2-D Stock-Acrylamid (40 %) vermischt und im Becherglas gerührt. Danach wurde das Gemisch im Exikator 15 min lang entgast und mit 400 µl Ammoniumpersulfat (10 %) und 20 µl TEMED versetzt. Nun wurde zuerst das Gelmedium und danach Glycerin (75 %) in die Gelkammer (Hoefer, USA) gepumpt. Zum Begradigen wurde die obere Gelkante mit 1 ml H₂O_{dd} überschichtet und für 45 min auspolymerisiert.

Zur Herstellung des oberen Gels wurden folgende Substanzen vermengt:

Oberes Gel	
H ₂ O _{dd}	6,3 ml
Obergel Puffer	2,5 ml
2-D Stock Acrylamid	1,1 ml
Glycerin	1,5 ml

Alle Substanzen wurden unter Rühren vermischt, 8 min lang entgast und mit 85 µl Ammoniumpersulphat (10 %) und 15µl TEMED versetzt. Danach wurde das obere Gel zügig mit Hilfe einer 5 ml Spritze bis zur oberen Kante der Glasplatte auf das Untergel auftragen. Nun wurden die Gelkämme in das Obergel gesteckt und das Gel für ca. 2 h auspolymerisiert.

Zur Beladung wurden die Gele zunächst vorsichtig mit Hilfe einer Rasierklinge getrennt und in die Elektrophoresekammer gegeben. Nach dem Entfernen des Kammes wurden die Taschen mit 1 x Laufpuffer gefüllt. Das Protein wurde auf 50 µg/ml gebracht, im Verhältnis 1:1 mit SDS-Proben-Puffer verdünnt und 3 min bei 95°C denaturiert. Danach wurde die Probe auf Eis abgekühlt und zusammen mit einem Protein-Standard (5 µl Precision Plus Protein + 5 µl SDS- Proben Puffer) kurz zentrifugiert (6000 U/min). Nun wurde der 1 x Laufpuffer wieder aus den Taschen entfernt und 12 µl–24 µl der vorbereiteten Probe sowie ein Protein-Standard auf das Gel pipettiert. Schließlich wurden Taschen und Kammer mit 1 x Laufpuffer gefüllt und das Gel für ca. 1,75 h bei konstant 200 V, 200 mA und 300 W aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel 2-16 h lang in eine Box mit 100 ml Fixierungsmittel gegeben und permanent geschüttelt.

Das fixierte Gel wurde zunächst dreimal 20 s lang mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ und danach zweimal für 30 min mit Ethanol (30 %) im Schüttler gespült. Die Gele wurden nun 30 min lang in Silbernitratlösung gegeben und dann für 15 s in Wasser gespült. Jetzt wurde das Gel für 5-15 min entwickelt, wobei nach 2 min der Entwickler durch neuen ersetzt wurde. Je nach Farbintensität wurde der Entwicklungsvorgang mit Essigsäure (3 %) 5 min gestoppt und zweimal 2 min lang mit Ethanol (10 %) gespült. Ethanol wurde schließlich 15 s mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ ausgewaschen und das fertige Gel zur Aufbewahrung in Glycerin (10 %) gelagert. Abschließend wurden die Gele auf einem Transilluminator betrachtet und das Ergebnis mit einer Videodokumentationsanlage digital gespeichert.

10.2 2D-SDS-PAGE

Für die 2D-SDS-PAGE Elektrophorese wurde zunächst ein Rehydratisierungspuffer benötigt:

Rehydratisierungspuffer	
Thioharnstoff (10 M)	10 g
CHAPS (2 %)	0,4 g
DTE (0,15 %)	0,03 g
EDTA - Na_4 (2,5 mM)	100 μl EDTA (0,5 M Stock)
EGTA (2,5 mM)	100 μl EGTA (0,5 M Stock)
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	ad 20 ml
	+200 μl 0,5% Bromphenolblau
	+400 μl IGP-Puffer oder Bio-Lyte

Für die erste Dimension (isoelektrische Fokussierung) wurde die zu untersuchende Probe in den vorbereiteten Rehydratisierungspuffer pipettiert. Das Gemisch sollte ein Volumen von 125 μl nicht überschreiten und eine Proteinmenge von ca. 2 bis 3 μg haben. Dieser Ansatz wurde in die IPG-Gelträger pipettiert und vorsichtig mit je einem DryStrip Gel (Amersham) überdeckt. Dabei sollte das Gel mit der Unterseite in den Ansatz eintauchen. Damit das Gel nicht austrocknet, wurde es mit etwas Öl (CoverFluid, Amersham) beschichtet und zum Quellen für ca. 10 h bei Raumtemperatur gelagert. Danach wurde der IPG Gelträger zur isoelektrischen Fokussierung bei folgendem Programm auf der IPGphor-Apparatur platziert.

Programm der IPGphor-Apparatur (Amersham):

Programm:	50 μ A/ Strip bei 20°C
1 Gradient	0,1 kVh
2 Gradient	3,4 kVh
3 Step & Hold	3,7 kVh

Das Gel für die zweite Dimension wurde wie ein unter Kap. 9.1 beschriebenes Untergel hergestellt, jedoch wurde es bis ca. 1 cm unterhalb der oberen Gelkammerkante gegossen, so dass das DryStrip-Gel aufgesetzt werden konnte.

Das DryStrip-Gel musste vor dem Auftragen auf das Gel äquilibriert werden. Dazu wurden verschiedene Stammlösungen hergestellt.

Stammlösungen zur Äquilibration des DryStrip-Geles:

Stammlösung A	
1M Tris pH 6,8	1 ml
Harnstoff	7,2 g
Glycerin 80 %	7,5 ml
SDS (20%)	2 ml
H ₂ O _{dd}	ad 20 ml
Äquilibrationlösung B1	
Stammlösung A	10 ml
DTE	0,2 g
Äquilibrationlösung B2	
Stammlösung A	10 ml
Iodacetamid	0,25 g
Bromphenolblau 0,1 %	200 μ l

Zur Stabilisierung der Proteine im DryStrip wurde dieser jeweils für 15 min nacheinander in beiden o.g. Lösungen (B1 und B2) äquilibriert und danach vor dem Einlegen in das Gel kurz in den 1 x SDS Laufpuffer getaucht. Der Strip sollte vorsichtig mit der Plastikseite zur Glasseite im Gel platziert werden. Mit Hilfe eines Stücks Filterpapier wurde der Marker aufgetragen und alles mit einem Agarosegel (0,5%) bis zur Gelkante überschichtet. Schließlich wurde die Gelkammer mit 1 x SDS Laufpuffer befüllt und verschlossen. Das Gel wurde für ca. 1,75 h bei 200 V, 200 mA und 300 W aufgetrennt. Danach wurde die Agarose samt DryStrip entfernt und das Gel wie oben beschrieben gefärbt.

III Ergebnisse

1 Transportstudien auf Gewebe- und Zellebene

Die folgenden *in vivo*-Studien sollten die Aufnahme und die Verteilung von Xenobiotika in Gerstenwurzeln qualitativ und quantitativ darstellen. Dazu wurden mit verschiedenen Methoden (Kap. II 2) Wurzeln von 5 d alte Gerstenpflanzen mit Monobrombiman (MBB), Monochlorbiman (MCB) und einem fluoreszierenden Glutathionkonjugat (GS-B) behandelt. Die physikochemischen Eigenschaften der Modellsbstanzten sind in Tab. 7 zusammengefaßt.

Tab. 7: Übersicht über die physikochemischen Eigenschaften der verwendeten Modellsbstanzten MBB und MCB.

Monobrombiman (MBB)	Monochlorbiman (MCB)
Indikator für: <ul style="list-style-type: none"> • alle SH-Gruppen (GSH, Peptide etc.) • unspezifisch 	Indikator für: <ul style="list-style-type: none"> • GSH • MCB-konjugierende GST • unspezifisch
<ul style="list-style-type: none"> • lipo-/elektrophil • membranpermeabel • fluoresziert bei 380 nm 	

1.1 Monobrombiman: Applikation an Wurzelspitze und Basis

Mit diesem Experiment sollte das Vorhandensein aller Substanzen mit SH-Gruppen, in der Hauptsache Glutathion (GSH), in der Wurzel untersucht werden. MBB bindet sich unspezifisch an SH-Gruppen, hat darüber hinaus lipophile Eigenschaften und kann somit Membranen passieren. Durch ihre zusätzliche Elektrophilie sind Bimane reaktiv und gehen auch Bindungen mit Biomolekülen, wie z.B. GSH ein (COLEMAN *et al.* 1997). Der Verlauf der *in vivo* Aufnahme von Biman in Gerstenwurzeln ist in Abb. 13 dargestellt. Bereits wenige Sekunden nach der Applikation von 3 µl MBB (50 µmol) an der Wurzelspitze ist ein Anstieg der Fluoreszenz in diesem Bereich zu erkennen. Appliziert man Biman von der Wurzelbasis aus, ergibt sich eine andere Kinetik. In Abb. 14 ist der Fluoreszenzverlauf nach einer Spitzen- und einer basalen Applikation graphisch gegeneinander dargestellt. Die Aufnahme von MBB

über die Wurzelspitze ist im Vergleich zur basalen Aufnahme schon nach 15 min signifikant schneller (T-Test, $p < 0,05$). Im weiteren Reaktionsverlauf wird nach 25 min sogar ein Signifikanzniveau von $p < 0,005$ erreicht.

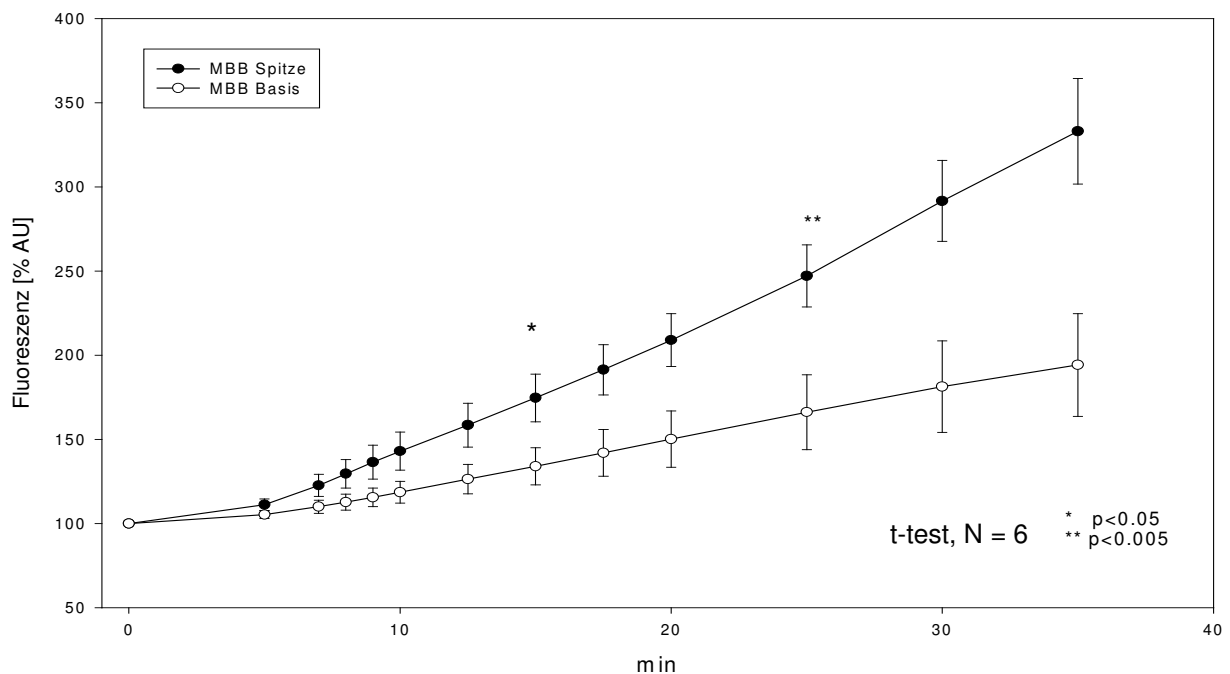
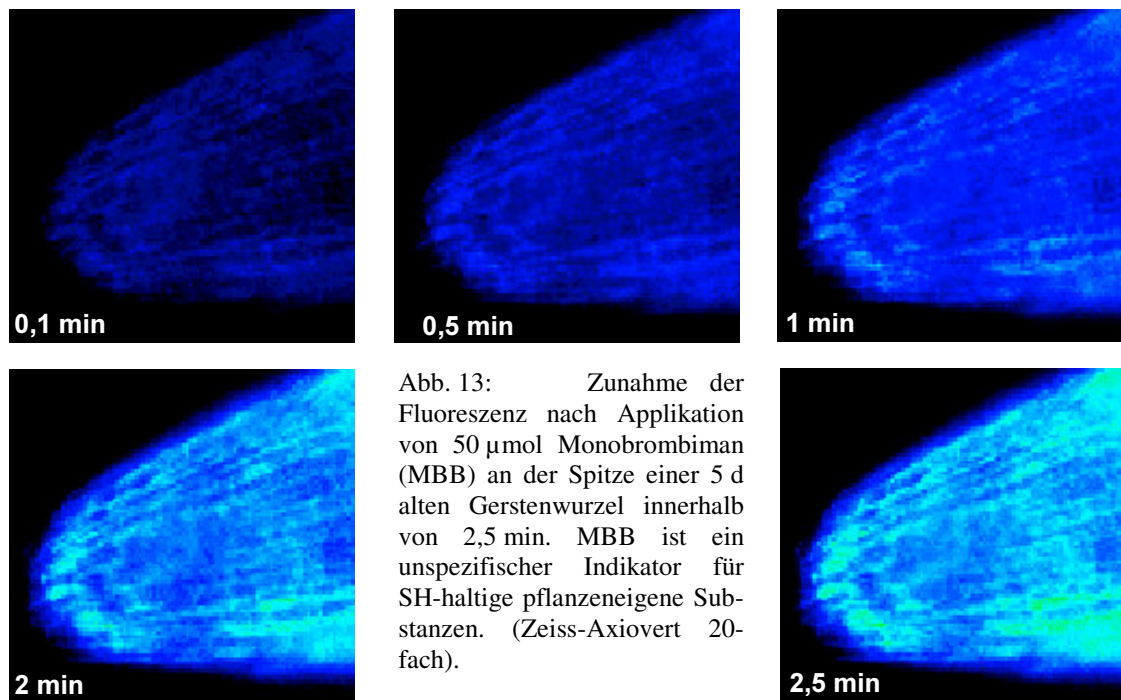


Abb. 14: Fluoreszenzanstieg der Wurzelspitze und Wurzelbasis nach Applikation (Zeitpunkt 0 min) von MBB (Monobrombiman) an 5 d alten Gerstenpflanzen über einen Messzeitraum von 35 min. Im basalen Ansatz wurde MBB in einer phloemsaftüblichen Zuckerkonz. (0,1 M) gelöst. t-test (zweiseitig, unabhängig):* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$. Datenpunkte: MV \pm SEM, N = 6.

Die Applikation von MCB an der Wurzelspitze und Wurzelbasis ergab ein grundsätzlich anderes Bild bezüglich Verlauf und Intensität von Aufnahme und Fluoreszenzentwicklung. Dieses lässt sich mit der spezifischeren Reaktion des MCB erklären.

1.2 Monochlorbiman: Applikation an Wurzelspitze und Basis

Bereits wenige Sekunden nach Applikation von MCB an der Spitze von Gerstenwurzeln ist eine Zunahme der Fluoreszenz im Bereich des apikalen Wurzelmeristems zu erkennen. Da MCB auch als Markersubstanz für MCB-konjugierende GST eingesetzt wird, belegt dieser Versuch, dass diese Zone offenbar den Ort der enzymabhängigen Konjugation von Xenobiotika an GSH und damit den Ort der Phase-II-Reaktion darstellt (Abb. 15a, b). Im weiteren Verlauf des Experimentes konnte ein Abtransport der Konjugate in Richtung der Wurzelbasis über den Zentralzylinder beobachtet werden (Abb. 15c, d).

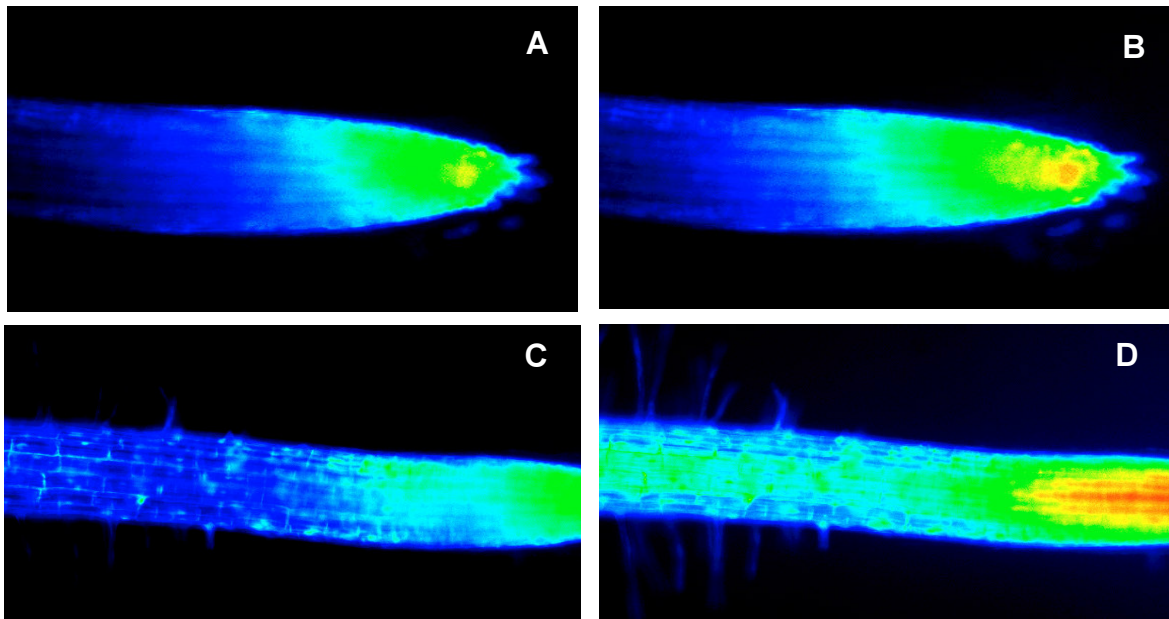


Abb. 15: A, B: Zunahme der Fluoreszenz unmittelbar nach Applikation von 50 μmol Monochlorbiman (MCB) an der Spitze einer 5 d alten Gerstenwurzel (Aufnahmen im Abstand von 60 s). Das apikale Meristem (gelber bis roter Bereich, Fehlfarben) ist der Ort der Konjugation von MCB an Glutathion. C, D: Abtransport der gebildeten GS-B Konjugate durch den Zentralzylinder in den sich anschließenden Spross (Aufnahmen im Abstand von 60 s, Zeiss-Axiovert 20-fach).

Die Applikation von MCB an der Wurzelbasis (Elongationszone) zeigte ein völlig anderes Bild. Obwohl MCB in einer phloemsaftüblichen 0,1 M Zuckerlösung der Wurzelbasis angeboten wurde, konnte so gut wie keine Fluoreszenzentwicklung und entsprechend kein

Transport zur Wurzelspitze beobachtet werden (ohne Abb.). Offenbar fehlt diesem Transport die vorgeschaltete Phase II – Reaktion, wie sie z.B. im apikalen Meristem abläuft.

Die Transportkinetik der beiden Experimente ist in Abb. 16 gegeneinander dargestellt. Bereits 5 min nach Applikation unterscheiden sich beide Transportraten signifikant (t-test, $P < 0,05$).

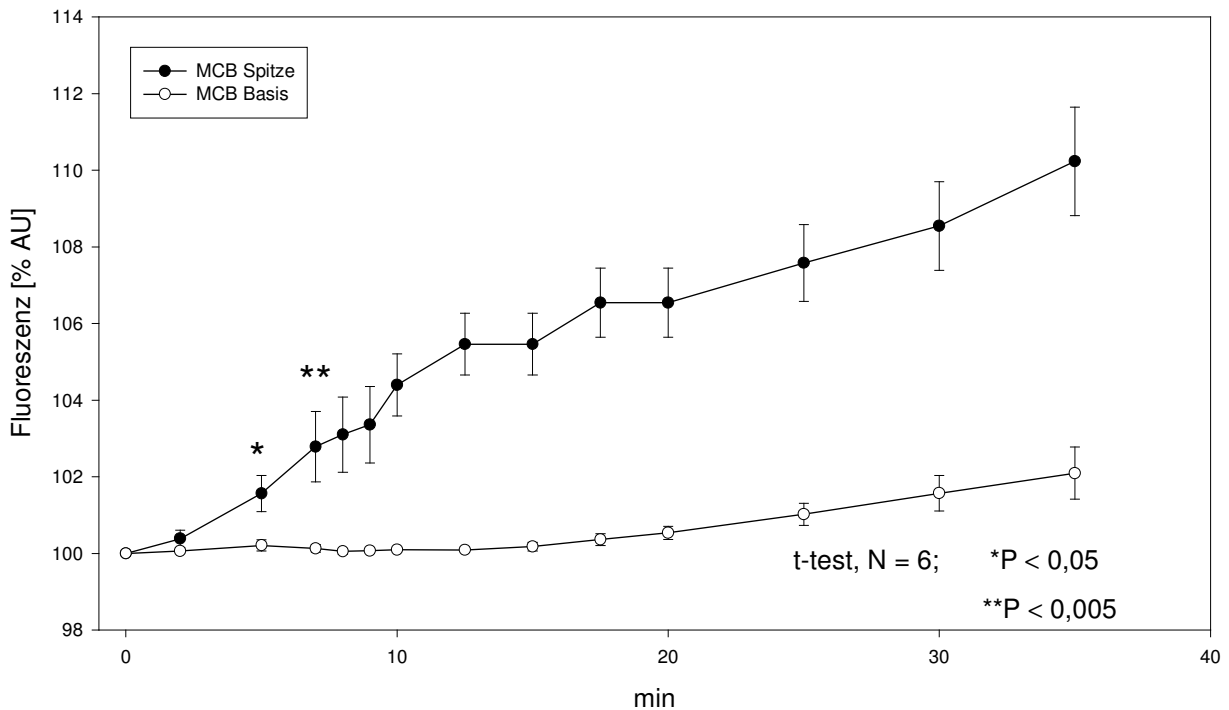


Abb. 16: Fluoreszenzveränderung der Wurzelspitze und Wurzelbasis nach Applikation (Zeitpunkt 0 min) von 3 μ l MCB (Monochlorbiman, 50 μ mol) an 5 d alten Gerstenpflanzen über einen Zeitraum von 35 min. MCB wurde im basalen Ansatz in einer phloemsaftüblichen Zuckerkonz. (0,1 M) gelöst. Während es nach der Spitzenapplikation zu einer deutlichen Erhöhung der Fluoreszenz kommt, bleibt die Fluoreszenz nach Applikation an der Wurzelbasis nahezu unverändert. Beide Kinetiken sind signifikant verschieden; t-test (zweiseitig, unabhängig): * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$. Datenpunkte: $MV \pm SEM$, $N = 6$.

Ein detaillierteres Bild (LSM-Aufnahme) des apikalen Meristems ist in Abb. 17 dargestellt. Hier ist eine deutlich erhöhte Fluoreszenz im Bereich der meristemalen Epidermis im Vergleich zu den umliegenden Zellen der Wurzelspitze zu beobachten. Diese Zellen enthalten offensichtlich vermehrt MCB konjugierende GST bzw. höhere GSH Konzentrationen. Darüber hinaus ist eine Anfärbung der Vakuolen in den gestreckten Calyptrazellen an der Wurzelspitze zu beobachten.

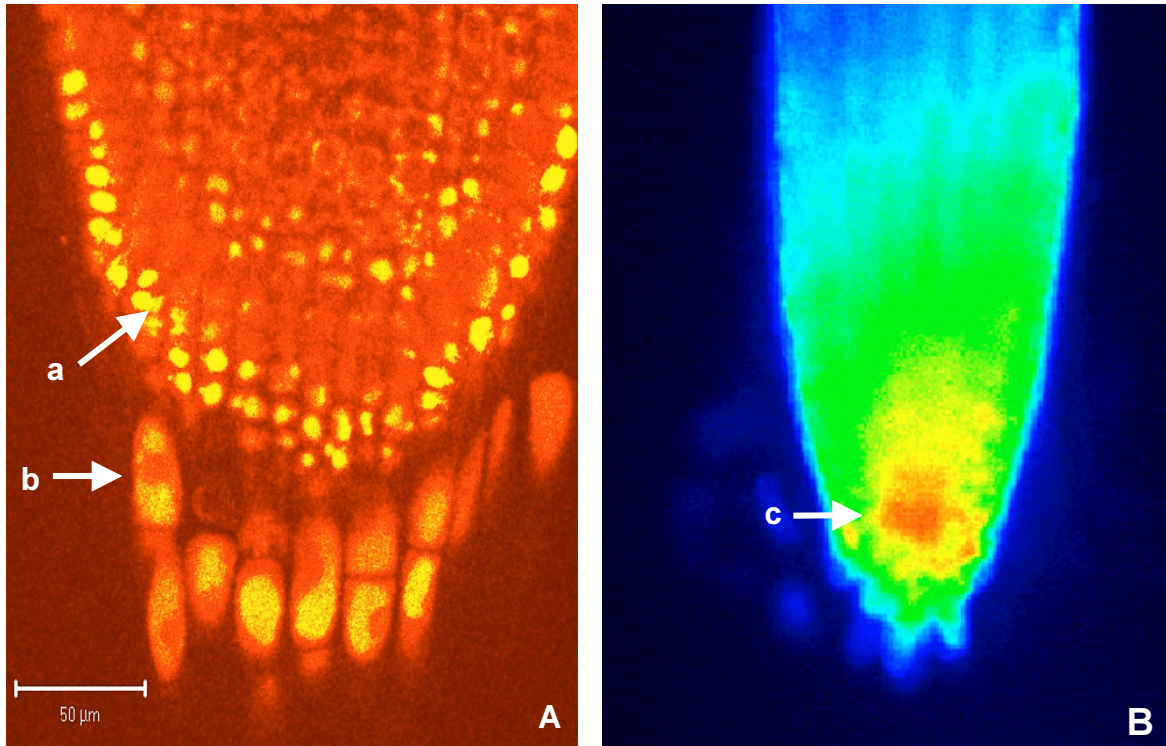


Abb. 17: A: LSM Aufnahme einer Wurzelspitze 30 min nach Applikation mit 50 μmol MCB, Zeiss-Axioplan LSM 510 (40-fach). Im Bereich des meristemalen Gewebes (a) ist eine deutlich erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zu den umliegenden Zellen der Wurzelspitze zu beobachten. Der Durchmesser der Zellen des Meristems beträgt etwa ca. 10 μm . b: lang gestreckte Calyptrazellen, in denen die Vakuole im Vergleich zu den Zellkernen bereits deutlich angefärbt ist. B: Fluoreszenzaufnahme einer Wurzelspitze 2 min nach Applikation mit 50 μmol MCB. Im rot gefärbten Bereich (c) befindet sich das apikale Meristem (Zeiss-Axiomvert 20-fach).

1.3 Monochlorbiman: Beobachtungen auf Zellebene

Die GS-B-Konjugationsrate und die zelluläre Verteilung des GS-B-Konjugats konnte mit Hilfe der Laserscanningmikroskopie (LSM) dargestellt werden. Damit war es möglich, gezielt ausgewählte Wurzelzellen 40 min lang dreidimensional zu erfassen und zu beobachten. Neben der Phase-II-Reaktion wurde auch der Abtransport des gebildeten Konjugates in die Vakuole und dessen dortige Akkumulation charakterisiert (Abb. 18). Die Fluoreszenzänderungen im Verlauf beider Experimente sind im folgenden Diagramm dargestellt (Abb. 19). Mit dem hier beschriebenen experimentellen Konzept konnte damit sowohl die MCB vermittelnde GST-Aktivität als auch die Transportkapazität des tonoplastenständigen ABC-Transporters *in vivo* bestimmt werden (Tab. 8). Die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten lieferten darüber hinaus Informationen über die GSH-Konzentrationen in verschiedenen Zellkompartimenten.

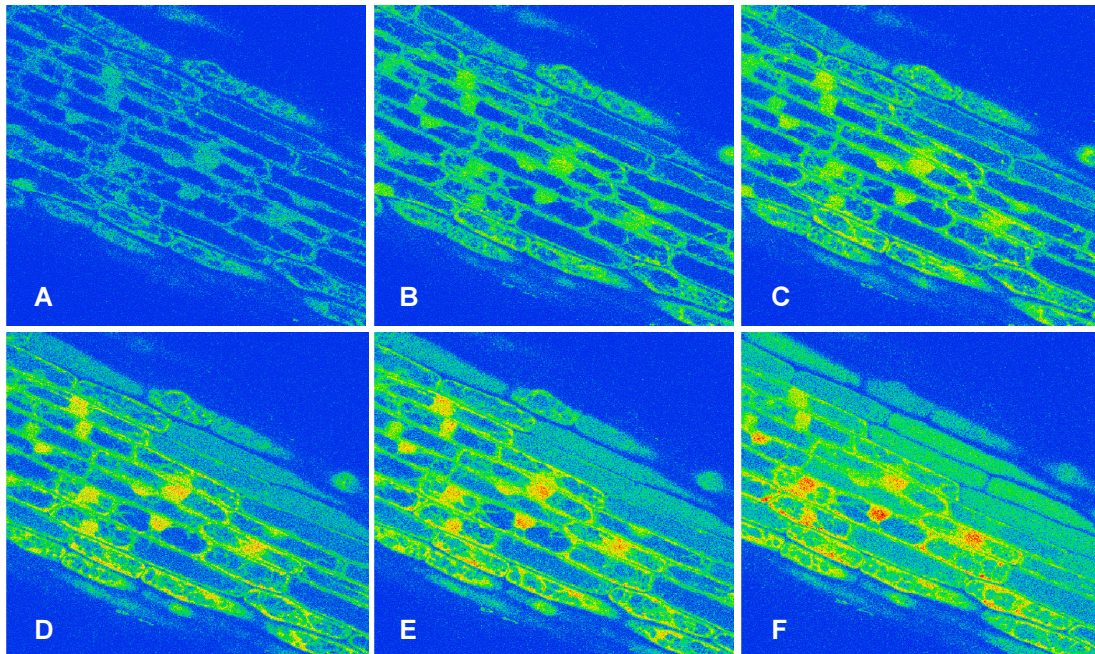


Abb. 18: LSM-Studie von 5 d alten Gerstenwurzeln nach Behandlung mit $50 \mu\text{mol}$ MCB im Zeitverlauf (A-E: Fluoreszenzmessung im 3 min Abstand, F: Fluoreszenz nach 30 min). Im äußeren Bereich der Wurzel ist nach einem raschen Anstieg der Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns bzw. des Cytosols, ein Transport des gebildeten GS-B in die Vakuole zu beobachten (aktiver Transport). In diesen Zellen ist sogar die Abnahme der Fluoreszenz in Zellkern und Cytosol zu beobachten.

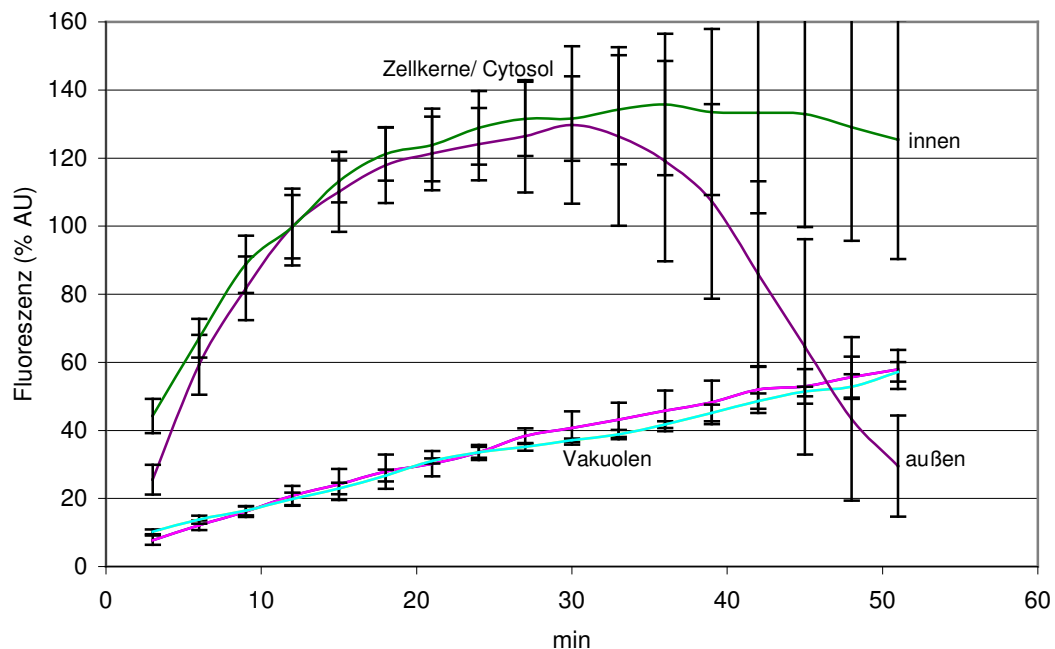


Abb. 19: Gegenüberstellung der Fluoreszenzentwicklung in Zellkernen mit Cytosol (oben) und Vakuolen (unten). Es wurden jeweils 5 Zellen pro Versuch ausgewertet (SEM). Die Fluoreszenzzunahme in den Vakuolen beschreibt die Aktivität des tonoplastenständigen ABC-Transporters (blau/rosa). Die deutlich stärkere Zunahme im Zellkern-Cytosol-Komplex ist auf die hohe Aktivität der MCB konjugierenden GST in diesem Bereich zurückzuführen. Die obere Kurve des Zellkern-Cytosol-Komplex (grün) zeigt die Fluoreszenzveränderung in einer inneren, die untere Kurve (rot), die Veränderung in einer äußeren Zellschicht.

Zum Vergleich der ermittelten *in vivo*-Enzymaktivitäten wurden 5 d alte Wurzelspitzen nach Standardprotokoll aufgearbeitet (Kap. II 3) und im Fluoreszenzphotometer die MCB vermittelte GST-Aktivität des Extraktes bestimmt. Die Bildung des Konjugats wurde 1 h bei verschiedenen pH-Werten (6,4; 7,5) verfolgt. Beide GST-Aktivitäten sind in Abb. 20 im Zeitverlauf gegeneinander dargestellt. In Tab. 8 sind zudem die ermittelten GST-Aktivitäten angegeben.

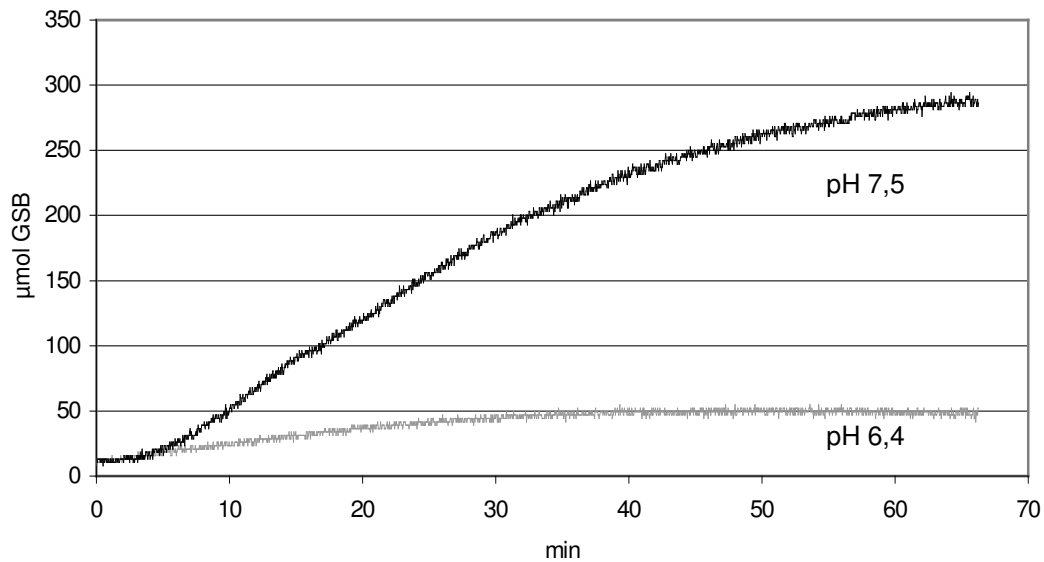


Abb. 20: Vergleich der MCB/GST-Aktivitäten in Wurzelspitzen der Gerste bei verschiedenen pH-Werten. Die GST-Aktivität bei pH 7,5 ist im Vergleich zu pH 6,4 deutlich erhöht.

Ein Vergleich der *in vivo* - mit den *in vitro* -Aktivitäten gestaltet sich schwierig, da sich beide Messungen auf unterschiedliche Bezugsgrößen und Außenbedingungen beziehen. Eine pH-Messung *in vivo* war nicht möglich. Es kann allerdings davon ausgegangen werden, dass der physiologische pH-Wert des Cytosols ca. 7,5 beträgt. Somit spiegelt die bei diesem pH-Wert *in vitro* gemessene Gesamtaktivität lediglich einen Teil der tatsächlichen GST-Aktivität (*in vivo*) wieder.

Tab. 8. Aus den in Abb. 19 und 20 dargestellten Fluoreszenzänderungen konnten mit Hilfe einer Eichkurve (Kap. II, 2.2) GST-Gesamtaktivitäten nach 30 min linearer Fluoreszenzzunahme berechnet werden. Der Anstieg der Fluoreszenz in der Vakuole erlaubte außerdem die Aktivitätsberechnung der tonoplastenständigen Glutathionkonjugatpumpe (ABC-Transporter).

GST-Gesamtaktivität <i>in vitro</i> (pH 7,5)	6,13 µmol GS-B /min
GST-Gesamtaktivität <i>in vitro</i> (pH 6,4)	1,43 µmol GS-B /min
GST-Gesamtaktivität <i>in vivo</i>	19,3 µmol GS-B/min
Transportrate des ABC-Transporters <i>in vivo</i>	5,56 µmol GS-B/min

Die Applikation von MBB an isolierten Vakuolen ist in Abb. 21 dargestellt. Hier ist ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten, da sich MBB unspezifisch an den vorhandenen SH-Gruppen bindet. Die Zunahme der Fluoreszenz lässt auf das Vorhandensein SH-haltiger Verbindungen schließen.

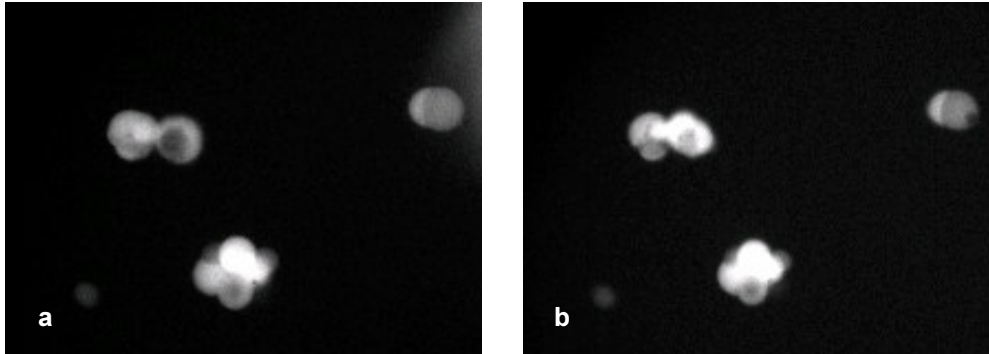


Abb. 21: Behandlung von isolierten Vakuolen mit 3 μ l MBB (50 μ M). Dargestellt sind Vakuolen unmittelbar nach der Applikation (a) und nach 14 min (b) (Zeiss-Axiovert 20-fach). Es ist ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten. Die Vakuolen wurden mit 380 nm angeregt, die Emission lag bei 510 nm.

Die Applikation des spezifischen GST-Indikators MCB führt hingegen zu keinem Fluoreszenzanstieg (ohne Abb.). Somit kann davon ausgegangen werden, dass sich am Tonoplasten und in der Vakuole keine MCB-spezifische GST-Aktivität und auch kein freies GSH befindet. Der Verlauf des Fluoreszenzanstieges nach MBB-Applikation ist in Abb. 22 im Vergleich zur MCB-Behandlung dargestellt.

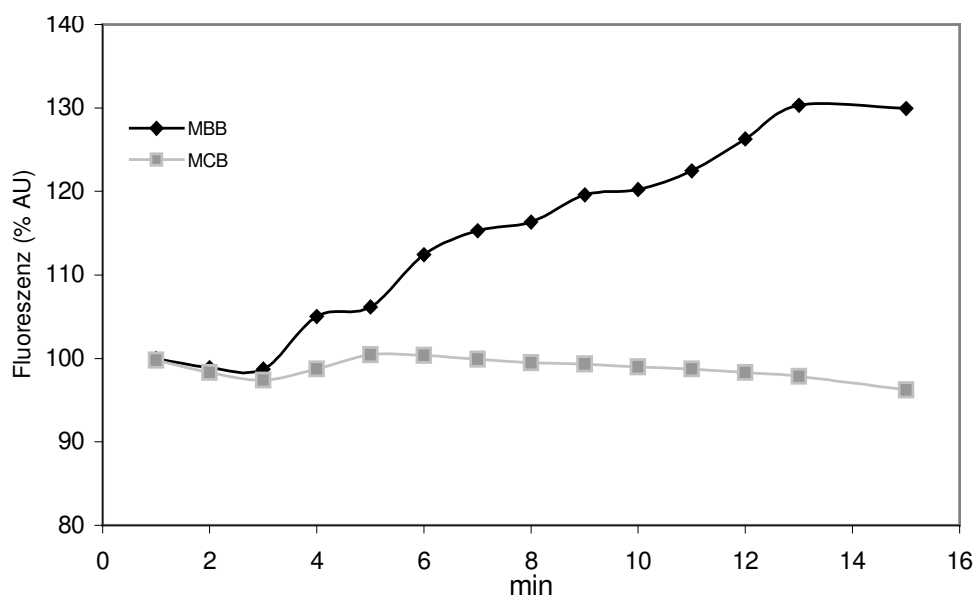


Abb. 22: Vergleich des Fluoreszenzanstieges nach Behandlung von isolierten Vakuolen mit 3 μ l MBB und MCB (je 50 μ mol).

Wie bereits erwähnt, ist die Markierung von GSH durch MCB sehr spezifisch, da 90 % der Fluoreszenz durch die SH-Gruppen des GSH hervorgerufen wird. Die restlichen 10 % der Fluoreszenz werden durch die Bindung von MCB an SH-Gruppen von Cystein und γ -Glutamylcystein erzeugt (MEYER *et al.* 2001). Somit beschreiben die in Tab. 9 dargestellten GS-B-Konzentrationen zu 90 % auch die GSH-Konzentration in den untersuchten Wurzel- und Zellkompartimenten. Die Inkubation von isolierten Vakuolen mit MCB bewirkte keinen Fluoreszenzanstieg und damit auch keine GS-B-Bildung.

Tab. 9. Ermittelte GSH-Konzentrationen in verschiedenen Gewebe- und Zellkompartimenten von 5 d alten Gerstenwurzeln. Die GSH-Konzentration entspricht ca. 90 % des GS-B-Gehaltes. Zur Konzentrationsbestimmung wurde unter definierten Bedingungen eine GS-B-Eichkurve verwendet (Kap. II 2.2).

Wurzel- und Zellkompartiment	ermittelte GSH μmol
apikales Meristem	> 900
Calyptra Zellen	360 - 540
Wurzelhaare	450 - 630
isolierte Vakuolen	nil
Cytosol	450 - 630
Zellkerne außen/ innen	135 – 180/720 - 900

1.3.1 Beeinflussung des tonoplastenständigen ABC-Transporters

Um einen Abtransport von GS-B in die Vakuole zu verhindern und damit die GST-Aktivität im Cytosol der Wurzel genauer bestimmen zu können, wurde die Glutathion S-Konjugat-Pumpe im Tonoplasten inhibiert. Dazu wurde vor der Messung die Gerstenwurzel für 30 min in 5 mM NaN_3 inkubiert und außerdem dem MCB eine gleiche Konzentration Na-Azid zugemischt. Die mikroskopische Bildfolge ist in Abb. 23 dargestellt. Hier wurde auch nach 20 min fast keine Fluoreszenzzunahme der Vakuole beobachtet, d.h. der Transport von GS-B in die Vakuole war unterbrochen. Gleichzeitig stieg die Fluoreszenz in den Zellkernen bis zum Schluss des Experimentes sichtbar an.

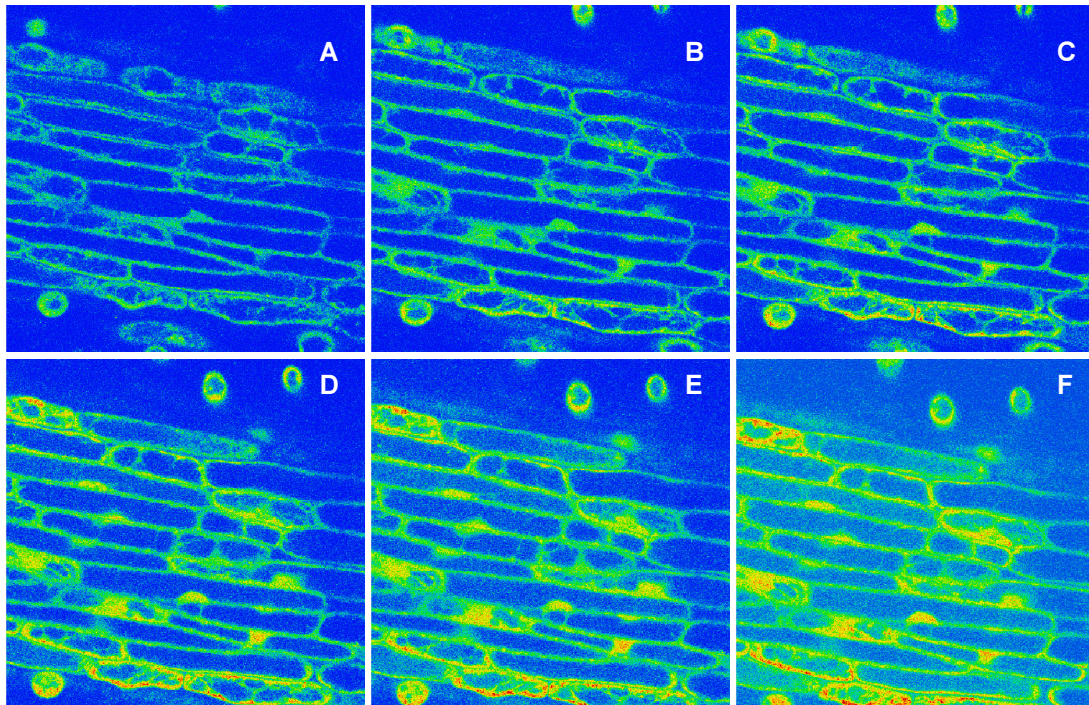


Abb. 23: Beeinflussung des ABC-Transporters mit Na-Azid (NaN_3): Cytologische Untersuchung von 5 d alten Gerstenwurzeln nach Behandlung mit $50 \mu\text{mol}$ MCB im Zeitverlauf (A-D: Fluoreszenzmessung im 3 min Abstand; E, F: nach 20 bzw. 30 min). Die Gerstenwurzel wurde vorher für 30 min mit 5 mM NaN_3 inkubiert und dem MCB eine gleiche Konzentration an Na-Azid zugemischt. Es ist ein Anstieg der Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns bzw. des Cytosols und damit die Akkumulation des gebildeten GS-B in diesen Kompartimenten zu beobachten. Erst nach ca. 20 min ist ein geringer Anstieg der Fluoreszenz und damit eine Diffusion in die Vakuole zu beobachten.

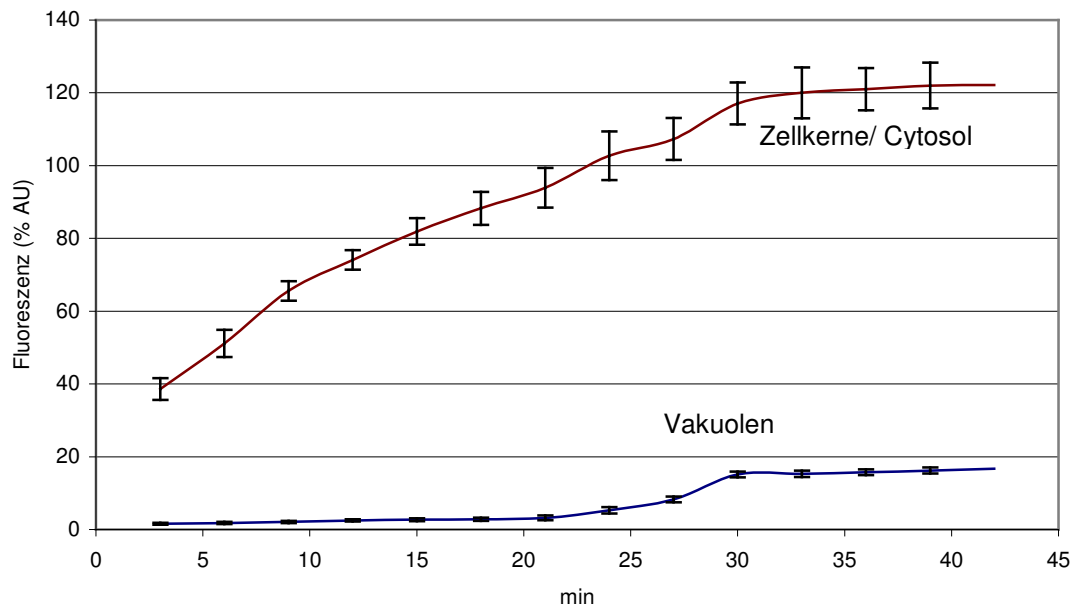


Abb. 24: Gegenüberstellung der Fluoreszenzentwicklung in Zellkernen (oben) und Vakuolen (unten) nach einer Beeinflussung des ABC-Transporters mit NaN_3 . Es wurden jeweils 5 Zellen pro Versuch ausgewertet (SEM). Die Fluoreszenzzunahme in den Zellkernen beschreibt die Aktivität der MCB-konjugierenden GST. Erst nach ca. 20 min gelangt offenbar diffusiv eine geringe Menge GS-B in die Vakuole.

In Abb. 24 ist die Fluoreszenzentwicklung in Zellkernen und Vakuolen gegeneinander aufgetragen. Die Fluoreszenz in den Zellkernen erreicht nach ca. 40 min ein Plateau, d.h. GS-B akkumuliert im Cytosol, bzw. im Zellkern. Erst nach ca. 20 min kommt es zu einem leichten Anstieg der Fluoreszenz in den Vakuolen, die jedoch ebenfalls auf einem Plateau stagniert. Es lässt sich somit feststellen, dass NaN_3 den Abtransport der GS-Konjugate in die Vakuole entscheidend einschränkt.

In weiteren Experimenten sollte die Frage beantwortet werden, ob eine Erhöhung der MCB-vermittelten GST- und Transporteraktivität durch den Einsatz eines Herbizid-Safeners induziert und mit dieser Methode visualisiert werden kann. Vorausgehende Arbeiten konnten die GST induzierende Wirkung von ausgewählten Herbizid-Safenern bereits *in vitro* zeigen (GAILLARD *et al.* 1994, SCHRÖDER UND PFLUGMACHER 1996, RIECHERS *et al.* 1997, DERIDDER *et al.* 2002).

Dazu wurden 5 d alte Gerstenwurzeln vorab für 24 h mit einer Cloquintocet-mexyl ($10 \mu\text{mol}$)-Lösung inkubiert. Die anschließenden Experimente sind in Abb. 25 dargestellt.

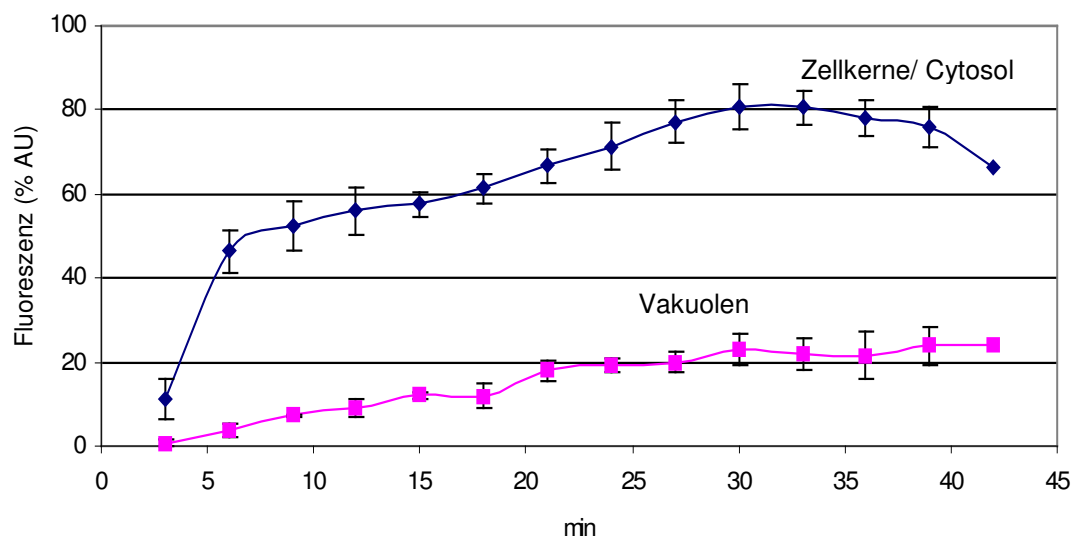


Abb. 25: Gegenüberstellung der Fluoreszenzentwicklung im Zellkern-Cytosol-Komplex (oben) und in Vakuolen (unten) nach Beeinflussung des ABC-Transporters mit dem Herbizid-Safener Cloquintocet-mexyl (Syngenta). Die Wurzeln wurden 24 h vor dem Experiment mit einer $10 \mu\text{mol}$ Lösung des Safeners inkubiert. Es wurden jeweils 5 Zellen pro Versuch ausgewertet (SEM).

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 18, 19) ist eine deutlich Abnahme der MCB-vermittelten GST- und Transportaktivität zu beobachten. Somit führte die Behandlung der Gerstenwurzel mit dem Herbizid-Safener Cloquintocet-mexyl nicht zu einer Stimulation des vakuolären ABC-Transporters und zu keiner erhöhten GST-Gesamtaktivität. Die in der

Literatur in Gerstenblättern beschriebene Induktion der GST-Aktivität lässt sich damit für das Modellsubstrat MCB *in vivo* nicht bestätigen. Die Ergebnisse der verschiedenen Induktionsversuche sind in Tab. 10 zusammengefasst.

Tab. 10: Gegenüberstellung der MCB vermittelten GST- und Transportaktivität nach Behandlung von 5 d alten Gerstenwurzeln mit NaN_3 und dem Herbizid-Safener Cloquintocet-mexyl. Die berechneten Werte beschreiben Gesamtaktivität *in vivo* für den Umsatz nach 10 min. STD < 10%.

GS-B/ $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$	NaN_3	Herbizid-Safener	Kontrolle
GST-Aktivität	39,8	34,2	46,4
ABC-Transporter	1,3	2,5	10,2

1.4 Glutathion-Biman-Konjugat: Applikation an Wurzelspitze und Basis

Während die bisherigen Messungen mit den reinen Substanzen MBB und MCB durchgeführt wurden, wurde in den folgenden Experimenten ein Glutathion-Biman-Konjugat (GS-B) eingesetzt. Auch hier sollten die Aufnahme und die Verteilung in der Gerstenwurzel untersucht werden. Die Schwierigkeit dieses Experimentes bestand darin, dass freies MCB das Messergebnis verfälschen würde. Deshalb wurde *in vitro* hergestelltes GS-B ($50 \mu\text{mol}$) durch Ausschütteln mit Dichlormethan von überschüssigem MCB gesäubert (Kap II 5). In Abb. 26 ist die Applikation von GS-B an der Spitze einer 5 d alten Gerstenwurzel dargestellt. Auch nach 10 min war kein Anstieg der Fluoreszenz in der Wurzelspitze zu beobachten. Es kam also zu keiner Aufnahme des Glutathion-Biman-Konjugats (GS-B).

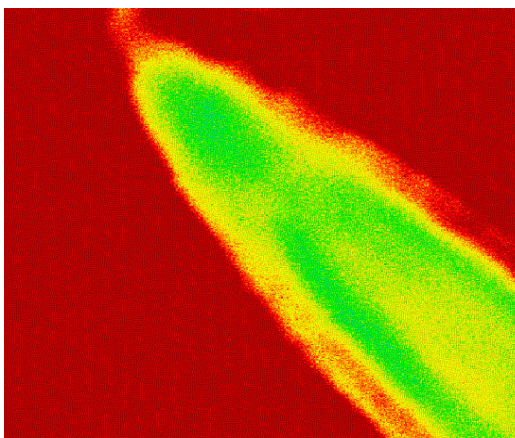


Abb. 26: LSM Aufnahme 10 min nach der Applikation von $3 \mu\text{l}$ GS-B ($50 \mu\text{mol}$) an der Spitze einer 5 d alten Gerstenwurzel (LSM 510 Zeiss, 20-fach, rainbow, Helligkeit 82, Kontrast 75). Der rote Bereich zeigt die Fluoreszenz des GS-B-Konjugates. Innerhalb der Wurzelspitze ist kein Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten, d.h. GS-B wird nicht aufgenommen.

Nach Applikation von GS-B an der Wurzelbasis ist lediglich eine geringe Verteilung innerhalb der Wurzel zu beobachten. In 30 μm Tiefe ist jedoch ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz im Zellwandbereich der Wurzeln zu beobachten (Abb. 27), was auf einen apoplastischen Transport hinweist.

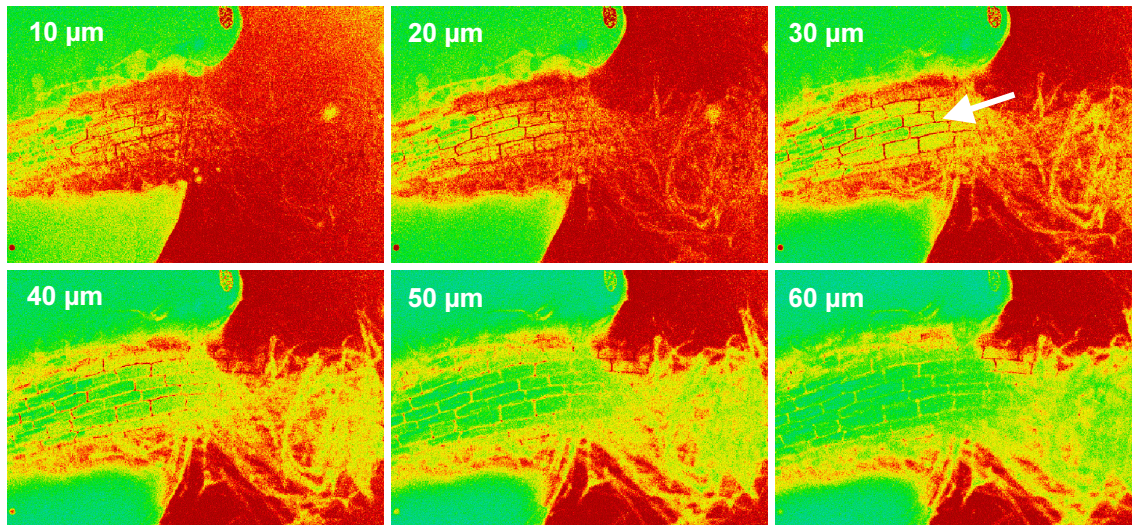


Abb. 27: LSM Aufnahme 10 min nach der Applikation von GS-B (50 μmol in Zuckerlsg.) an der Basis einer 5 d alten Gerstenwurzel (LSM 510 Zeiss, 20-fach, rainbow, Helligkeit 82, Kontrast 75). Dargestellt sind verschiedene tiefe Schichten (10 bis 60 μm). GS-B ist rot gefärbt. In 30 μm Tiefe ist eine deutliche Rotfärbung (Pfeil) der Zellwand zu beobachten, was auf einen apoplastischen Transport hindeutet.

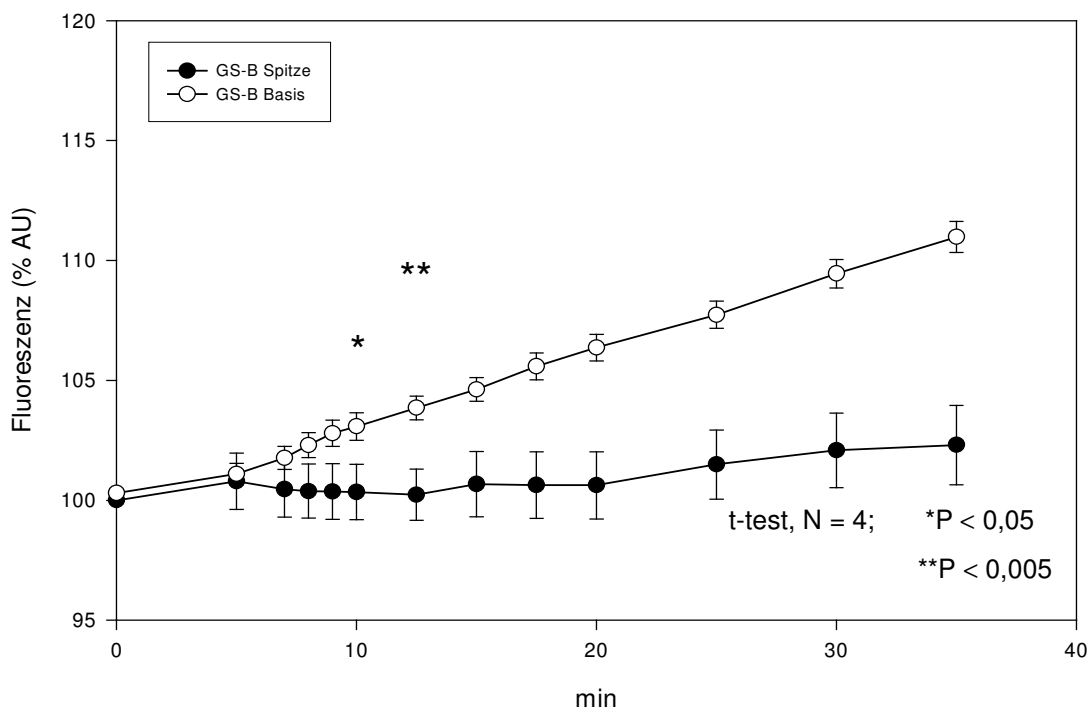


Abb. 28: Fluoreszenzanstieg der Wurzelspitze und Wurzelbasis nach Applikation von GS-B (GSH-Bimankonjugat) an 5 d alten Gerstenpflanzen über einen Messzeitraum von 35 min. Im basalen Ansatz wurde GS-B in einer phloemsaftüblichen Zuckerkonz. (0,1 M) gelöst. t-test (zweiseitig, unabhängig): * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$. Datenpunkte: $MV \pm SEM$, $N = 4$. Nach basaler Applikation ist ein fast linearer Anstieg von GS-B zu erkennen, während die Fluoreszenz an der Wurzelspitze auf dem Ausgangsniveau stagniert.

In Abb. 28 ist die Kinetik des Transportes von GS-B nach Applikation an der Wurzelspitze bzw. der Wurzelbasis gegeneinander aufgetragen. Bei GS-B-Zugabe an der Wurzelbasis wurde das Konjugat (3 μ l GS-B [50 μ mol]), gelöst in einer phloemsaftüblichen 0,1 M Zuckerlösung, appliziert.

Der Fluoreszenzverlauf nach Applikationen in beiden Experimenten war sehr verschieden. In der basalen Variante nahm die Fluoreszenz fast linear zu. Ohne nach 35 min eine Sättigung zu erreichen, änderte sich die Fluoreszenz nach der Spitzenapplikation mit GS-B nur sehr geringfügig. Schon nach 10 min unterschieden sich beide Aufnahmekinetiken signifikant voneinander (t-test: $P < 0,05$). Somit kann angenommen werden, dass GS-B in apikale Richtung transportiert wird und es damit nicht, im Vergleich zur MCB, zu einer Aufnahme von GS-B über die Wurzelspitze kommt. Der Transport von Glutathionkonjugaten in der Gerstenwurzel wäre somit eindeutig unidirektional.

2 Proteinchemische Untersuchungen

Die gängige Literatur beschreibt die pflanzliche Vakuole als Ort der finalen Speicherung von Glutathionkonjugaten und damit als Endpunkt im Entgiftungsstoffwechsel (COUPLAND 1991, KREUZ *et al.* 1996). Zahlreiche Metabolismusstudien weisen jedoch darauf hin, dass Glutathionkonjugate dort einem weiteren Abbau unterliegen (WOLF 1996, COLEMAN *et al.* 1997, SWANSON *et al.* 1998). Um die enzymatischen Mechanismen der Degradation von Thiokonjugaten genauer untersuchen zu können, sollte der Abbau von GS-DNB und γ GC-DNB zunächst im Rohextrakt und später in aufgereinigten Proteinfractionen untersucht und die verantwortlichen Enzyme charakterisiert werden.

2.1 Nachweis der Carboxypeptidase- und Dipeptidase- Aktivität

Sowohl Carboxypeptidase-(CP) als auch Dipeptidase-(DP)-Aktivität ließen sich nach der Inkubation mit GS-DNB bzw. γ GC-DNB bereits im Proteinextrakt nach der Ammoniumsulfatfällung nachweisen. Die Anwesenheit von Proteinase verringerte jedoch vor allem die DP-Aktivität, woraufhin verschiedene Proteinaseinhibitoren getestet wurden (CATELLANOS-SERRA und PAZ-LAGO 2002). In Tab. 11 sind verschiedene Enzymaktivitäten nach dem Einsatz von Proteinaseinhibitoren dargestellt.

Tab. 11: Ermittlung eines geeigneten Proteinaseinhibitors zur optimalen Aufarbeitung der CP- und DP-Aktivität. Die Extraktion erfolgte wie in Kap. II 3.1 beschrieben. Der Zusatz von 5 μ mol Pepstatin erhöhte die DP-Aktivität am deutlichsten im Vergleich zur Kontrolle, während die CP-Aktivität unter dem Zusatz von Harnstoff am höchsten war. Dargestellt sind Aktivitäten eines $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällten und Entsalzten PD10-Extraktes.

Peptidaseinhibitor	2 M Harnstoff	1 % DTT	5 μ mol Pepstatin	Kontrolle
CP-Aktivität (U)	0,013 \pm 0,002	0,009 \pm 0,002	0,010 \pm 0,002	0,005 \pm 0,001
DP-Aktivität (U)	0,013 \pm 0,002	0,004 \pm 0,002	0,04 \pm 0,01	0,008 \pm 0,001

Der Test ergab für beide Enzyme deutlich erhöhte Aktivitäten im PD10-Extrakt im Vergleich zu einer Kontrolleextraktion ohne Proteinaseinhibitoren. Da Pepstatin die CP-Aktivität verdoppelt und die DP-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle verfünffacht, wurde allen Aufarbeitungen 5 μ mol Pepstatin zugesetzt. In Abb. 29 sind die HPLC-Chromatogramme der Enzymumsätze dargestellt.

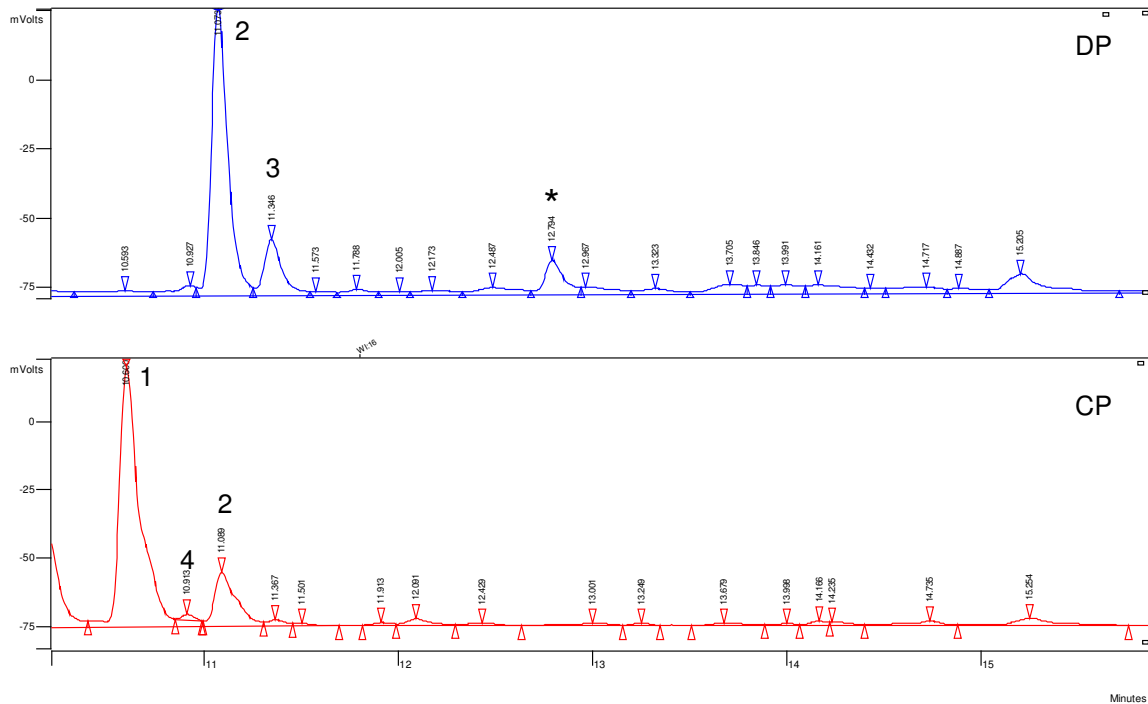


Abb.29: HPLC-Chromatogramme zum Nachweis der CP- und DP-Aktivität in entsalztem Proteinextrakt. Beide Ansätze wurden 12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im unteren Chromatogramm ist der Umsatz von GS-DNB (1) zu γ GC-DNB (2) und oben der Umsatz von γ GC-DNB (2) zu Cys-DNB (3) dargestellt. Beiden Proteinextraktionen wurde 5 μ mol Pepstatin als Proteinaseinhibitor zugesetzt. Zusätzlich konnte Peak 4 als Cysteinylglycin-DNB identifiziert werden.

2.1.1 Identifizierung der Reaktionsprodukte

Die Reaktionsprodukte wurden entweder mit Referenzsubstanzen oder *via* MS identifiziert. Referenzsubstanzen waren *in vitro* hergestellte Reaktionsprodukte, die dieselben Retentionszeiten aufwiesen. Bei dem angewendeten HPLC-Gradienten (Kap. II 6.1) waren die Distanzen zwischen den Peaks der DNB-Konjugate über alle Messungen vergleichbar und somit charakteristisch (Tab. 12).

Tab. 12: Charakteristische absolute und relative Retentionszeiten zwischen den untersuchten Produktpeaks. Die HPLC-Einstellungen sind in Kap. II 6.1 aufgeführt.

	GS-DNB	Cys-Gly-DNB	γ GC-DNB	Cys-DNB
absolute RT	10,5 \pm 0,3	10,8 \pm 0,3	11,0 \pm 0,3	11,3 \pm 0,3
relative RT zu GS-DNB		1,03 \pm 0,01	1,05 \pm 0,01	1,07 \pm 0,01

Außerdem wurde das HPLC-Produkt präparativ aufgefangen und im MS untersucht. Es wurden bei m/z 386 γ GC-NB-Moleküle und bei m/z 240 Cys-NB-Moleküle identifiziert (Abb. 30).

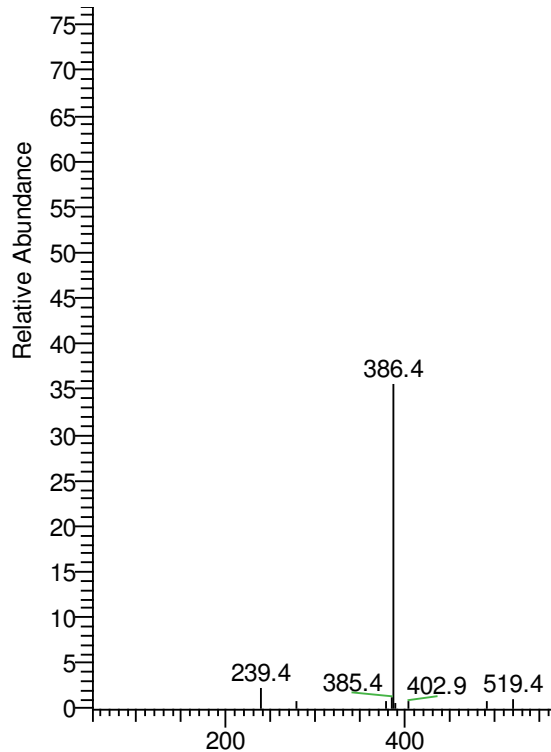


Abb. 30: Elektrospray Massenspektrum der präparierten HPLC-Produkte. Es wurden γ GC-NB bei m/z 386 und L-Cys-NB bei m/z 240 identifiziert. Während des Beschusses mit Elektronen fragmentierte eine NO_2 -Gruppe vom Benzolring des Ausgangsmoleküls (γ GC-DNB).

2.1.2 Zeitabhängigkeit der Reaktion

Der Beweis, dass es sich bei der Bildung dieser Reaktionsprodukte um eine enzymatische Reaktion handelt, sollte unter anderem über die Zeitabhängigkeit der Reaktion im Vergleich zur Inkubation ohne Zugabe eines Proteinextraktes geführt werden. Dabei musste die Reaktionszeit des Enzymansatzes lang genug sein, um auch bei geringem Substratumsatz noch ein Produkt detektieren zu können. Eine möglichst lange Reaktionszeit verbesserte zwar hierbei die Genauigkeit der Bestimmung, barg aber die Gefahr des Substratmangels bzw. einer Produkthemmung.

Die Standardansätze wurden unterschiedlich lange (1 h, 2 h, 4 h und 8 h) mit einer konstanten Enzym- und Substratmenge bei Raumtemperatur inkubiert. Die entstandenen Reaktionsprodukte wurden via HPLC (Kap. II 6.1) detektiert. Die Zeitabhängigkeiten für die Carboxy- und die Dipeptidase-Aktivität sind in Abb. 31 dargestellt.

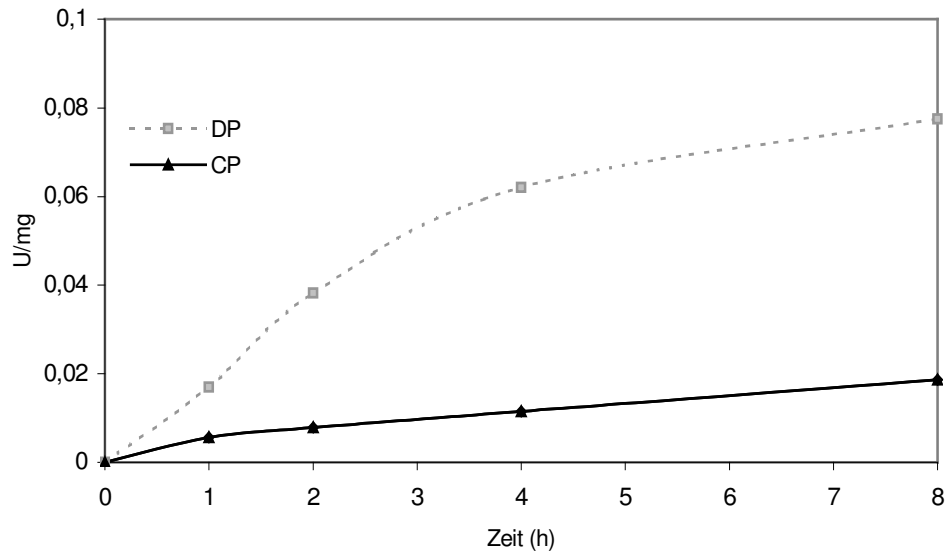


Abb. 31: Zeitabhängigkeit des Umsatzes von GS-DNB zu γ GC-DNB als Produkt der Carboxypeptidase-Aktivität (CP) und des Umsatzes von γ GC-DNB zu Cys-DNB als Produkt der Dipeptidase-Aktivität. Dargestellt sind spezifische Enzymaktivitäten eines ungereinigten Rohextraktes nach 1, 2, 4 und 8 h.

2.1.3 Substratabhängigkeit der Reaktion

Ein weiteres Merkmal einer enzymatischen Reaktion ist die Substratabhängigkeit. Dazu wurden Standardansätze mit unterschiedlichen Mengen (50 μ mol, 100 μ mol und 200 μ mol) eines Substrates, in diesem Fall GS-DNB und γ GC-DNB bei einer konstanten Proteinmenge für 12 h inkubiert.

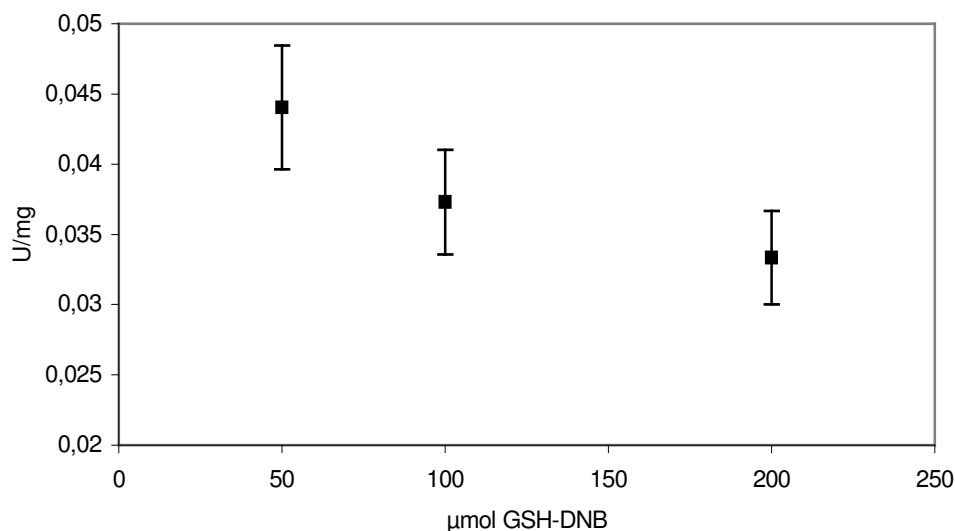


Abb. 32: Substratabhängigkeit der CP-Aktivität im PD10-Extrakt. Der Standardansatz (Kap. II 6) wurde mit einer konstanten Proteinmenge für 12 h inkubiert. Es wurden 50 μ mol, 100 μ mol und 200 μ mol GS-DNB eingesetzt. Es fällt auf, dass die CP-Aktivität mit zunehmender Substratmenge abnimmt.

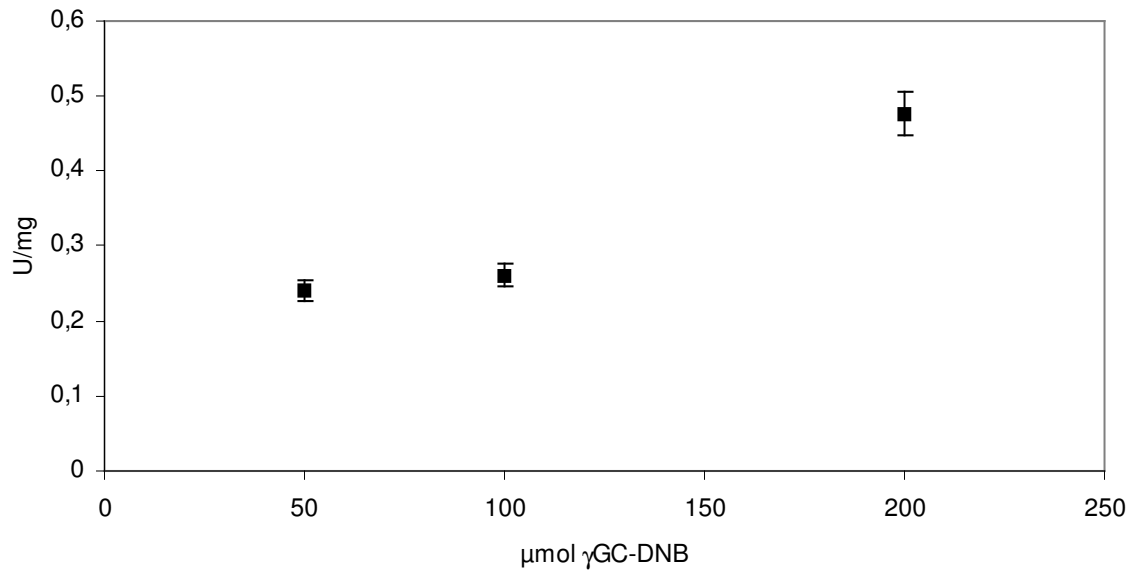


Abb. 33: Substratabhängigkeit der DP-Aktivität im PD10-Extrakt. Der Standardansatz (Kap. II 7.1) wurde mit einer konstanten Proteinmenge für 12 h inkubiert. Es wurden 50 µmol, 100 µmol und 200 µmol γGC-DNB eingesetzt.

In Abb. 32 ist eine deutliche Abnahme der CP-Aktivität bei ansteigender Substratkonzentration im PD10-Extrakt zu erkennen, was auf eine Produkthemmung hindeutet oder ein Indiz für weitere Abbaureaktionen ist, die durch die Anwesenheit zahlreicher anderer peptidolytischer Enzyme im PD-10-Extrakt katalysiert werden können.

Im Gegensatz dazu zeigte die DP eine deutliche Aktivitätszunahme nach Verdoppelung der Substratmenge von 100 auf 200 µmol γGC-DNB (Abb. 33). Beide Enzymaktivitäten verhalten sich somit in Bezug auf die angebotene Substratmenge gegenläufig. Dies weist darauf hin, dass es sich um unterschiedliche Enzyme handelt.

2.2 Enzymreinigung

Zur genaueren Bestimmung der Enzymaktivitäten war es notwendig, die Enzymaktivität anzureichern und anzureinigen. Da angenommen wurde, dass es sich bei beiden degradierenden Enzymen um vakuoläre Proteine handelt (WOLF *et al.* 1996), wurde dieser Reinigungsprozess im physiologisch sauren Milieu durchgeführt, wobei bereits die leicht positiv geladenen von den alkalischen Proteinen getrennt werden konnten. Damit stellte die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (Kap. II 3.1.1) bei pH 5 bis pH 5,5 im Aufarbeitungsprozess bereits eine erste Reinigung der Enzyme dar.

2.2.1 Reinigung der Carboxypeptidase

Im weiteren wurde versucht, die im entsalzten PD10-Extrakt enthaltende Carboxypeptidase-Aktivität (CP) über eine Affinitätschromatographie (Kap. II 4.2) bzw. eine Kationenaustauschchromatographie (Kap. II 4.1) aufzureinigen. Beim Kationenaustausch werden saure Proteine an der Matrix der stationären Phase zunächst gebunden und mit einem ansteigenden Salzgradienten eluiert und fraktioniert. In diesem Fall wurden sowohl eine FPLC mit einer High-S-Säule (BioRad) bei pH 5 als auch eine GSH abhängige Affinitätschromatographie mit demselben pH durchgeführt. Mit den gewonnenen Fraktionen wurden Enzymtests durchgeführt.

Es war deutlich zu sehen, dass die CP eine Affinität zu GSH aufweist, da sich die Aktivität fast 120-fach anreichern ließ. Offenbar beginnt die CP, an die Agarose gebundenes GSH abzubauen. Die Affinität der CP zu GSH war außerdem von Interesse, da normalerweise mit dieser Methode Glutathion S-Transferasen (GST) gereinigt werden, die bekanntlich eine sehr hohe Affinität zur GSH-Agarose aufweisen. Somit war diese Methode zusätzlich geeignet, auch ein dem Konjugationsprozess nachgeschaltetes Enzym (CP) zu reinigen. Das würde die Affinität der CP zum Produkt der GST abhängigen Reaktion erklären.

Mit dem Anstieg der GSH und NaCl Konzentration eluierte die CP in dieser Methode mit den Fraktionen 12 bis 14 bei einer GSH Konzentration von 2 mM und einem Salzgehalt von 0,15 M (1 M NaCl). Das gesamte Elutionsprofil der GSH abhängigen Affinitätschromatographie ist in Abb. 34 zusammengefasst.

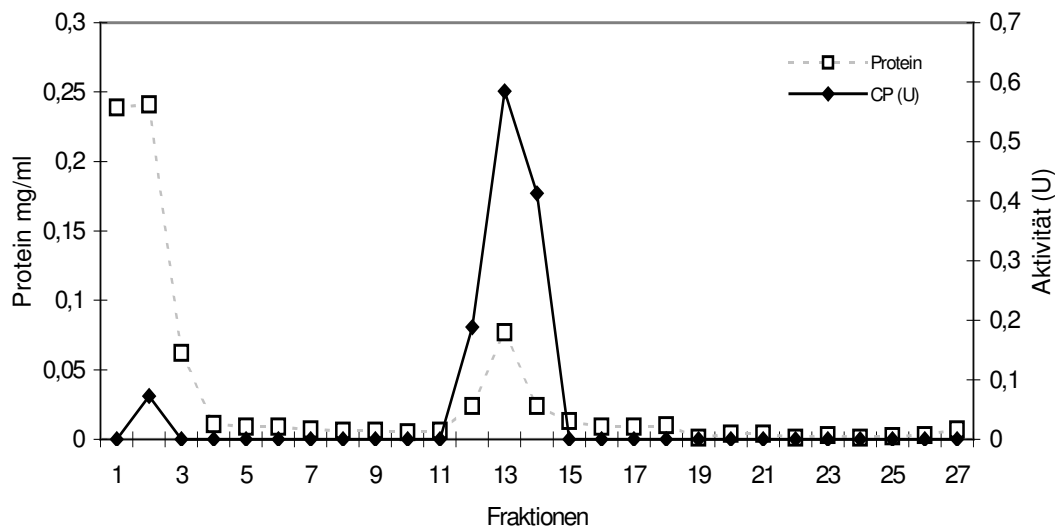


Abb.34: CP-Aktivität in einem Elutionsprofil einer GSH abhängigen Affinitätschromatographie: 1 ml eines Gerstenproteinextraktes (2,85 mg/ml) wurde nach Ammoniumsulfatfällung und Entsalzung (PD10-Säule) auf einer GSH-Agarose (Sigma) 1 h inkubiert. (Kap. II 4.2). Danach wurde das Protein in einem ansteigenden GSH- und Salzgradienten eluiert und fraktioniert. In den Fraktionen 12 bis 14 konnte mit einem Enzymtest eine deutliche CP-Aktivität gezeigt werden (2 mM GSH; 0,15 M NaCl).

Ein deutlich höherer Reinigungsfaktor ließ sich mit Hilfe der Kationenaustauschchromatographie erzielen. In Abb. 35 ist das Elutionsprofil der Kationenaustauschchromatographie dargestellt.

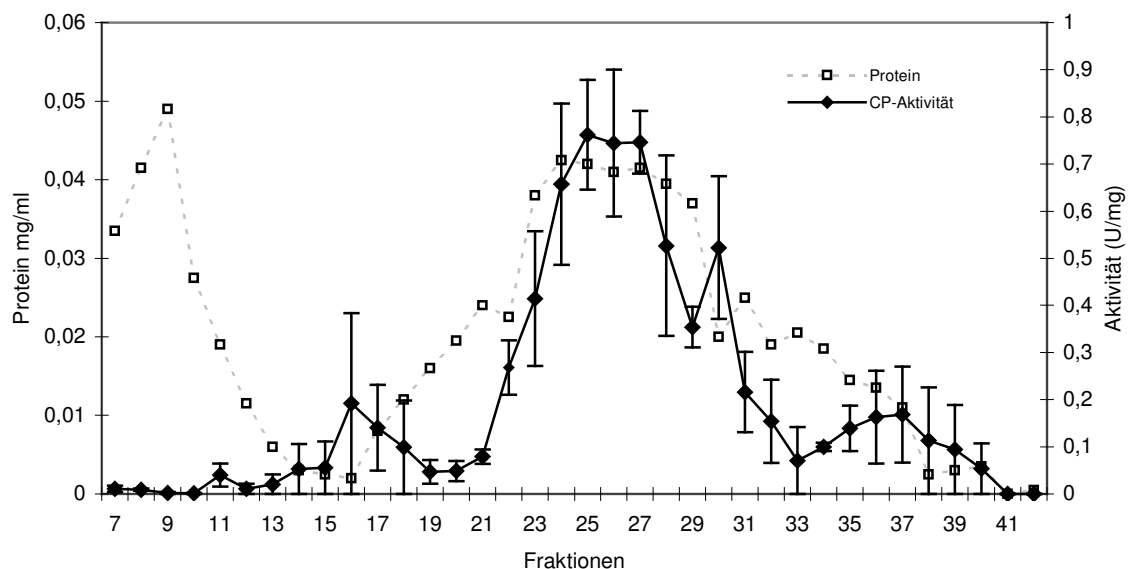


Abb. 35: CP-Aktivität in einem Elutionsprofil von zwei unabhängigen Kationenaustauschchromatographien: 3 ml zweier Gerstenproteinextrakte (2,85 mg/ml) wurden nach Ammoniumsulfatfällung und Entsalzung (PD10-Säule) auf eine High-S-Säule (BioRad) aufgetragen (Kap. II 4.1). In allen Fraktionen wurde die CP-Aktivität bestimmt. Die Aktivität der CP eluierte deutlich innerhalb des Proteinpeaks in den Fraktionen 24 bis 27, das entspricht einer Salzkonzentration von 35%.

Nach der Kationenaustauschchromatographie wurde eine deutliche Aktivität für den Umsatz von GS-DNB zu γ GC-DNB in den proteinreichen Fraktionen 24 bis 27 gemessen (0,35 M NaCl). Da die Inkubation eines γ GC-DNB-Konjugates mit diesen Fraktionen keinen Umsatz zeigte, kann von einer CP-Aktivität in diesen Fraktionen ausgegangen werden. Mit der eingesetzten Kationenaustauschsäule (High-S, BioRad) konnte die CP im Vergleich zum PD10-Extrakt sogar fast 160-fach angereichert werden; deshalb wurde für alle weiteren Arbeiten die CP-Aktivität mit dieser Methode angereichert. In Tab. 12 sind die verschiedenen Reinigungsschritte der chromatographischen Methoden und deren Effizienz aufgeführt.

Tab. 12: Übersicht über die Aufreinigung der Carboxypeptidaseaktivität aus 10 d alten Gerstenblättern. Nach jedem Reinigungsschritt wurden die Aktivität und der Proteingehalt bestimmt. Der jeweilige Reinigungsfaktor bezieht sich auf Protein- und Aktivitätsgehalt des PD10-Extraktes.

Reinigungs-schritt	Bradford (mg/ml)	Gesamtaktivität (μ mol/min)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Reinigungs-faktor
PD10-Extrakt	2,85	0,016	0,005	1
GSH Affinität	0,077	0,045	0,58	116
FPLC High-S	0,063	0,04	0,81	162

2.2.2 Reinigung der Dipeptidase

Gemäß der Arbeitshypothese wird der Dipeptidase (DP) eine Funktion in der weiteren Degradation des von der CP gebildeten γ GC-Konjugates zugeschrieben. Somit wäre anzunehmen, dass es sich bei diesem Enzym ebenfalls um überwiegend positiv geladenes vakuoläres Protein handeln könnte. Die Anwesenheit der DP-Aktivität im gefällten und entsalztem PD10-Extrakt deutete bereits darauf hin. Mit einer GSH abhängigen Affinitätschromatographie konnte in diesem Fall keine DP-Aktivität gebunden werden (ohne Abbildung). Somit kann davon ausgegangen werden, dass dieses Enzym nicht GSH-abhängig ist. Das ist ein weiterer Beweis, dass es sich bei CP und DP um unterschiedliche Enzyme handelt.

Erst nach der Kationenaustauschchromatographie, die unter denselben Bedingungen wie in Kap. III 4.1 durchgeführt wurde, war eine DP-Aktivität im Eluat messbar. Das Elutionsprofil der DP aus zwei unabhängigen Versuchen ist in Abb. 36 dargestellt.

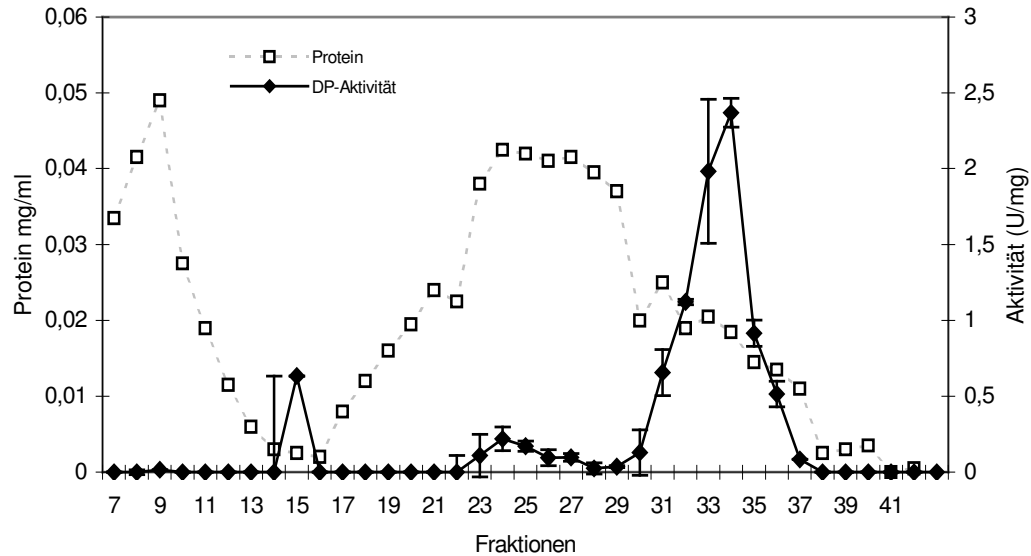


Abb. 36: DP-Aktivität in einem Elutionsprofil von zwei unabhängigen Kationenaustauschchromatographien: 3 ml eines Gerstenproteinextraktes (2,85 mg/ml) wurden nach Ammoniumsulfatfällung und Entsalzung (PD10-Säule) auf eine High-S-Säule (BioRad) aufgetragen (Kap.II 4.1). In den Fraktionen 31 bis 34 (55 % 1 M NaCl) war deutliche DP-Aktivität detektierbar.

In diesem Ansatz eluierte die DP-Aktivität außerhalb des großen Proteinpeaks in den Fraktionen 31 bis 34 in einem deutlichen Peak bei einer Salzkonzentration von 0,55 M NaCl. Aus Tab. 13 geht hervor, dass die Dipeptidase mit dieser Methode fast 50-fach angereinigt werden konnte. Die Inkubation eines GS-Konjugates mit diesen Fraktionen zeigte zwar nicht die Bildung eines γ GC-DNB-Peaks, es konnte jedoch die Entwicklung eines Cysteinyl-Glycin-Peaks beobachtet werden (Kap. III 2.2.3).

Tab. 13: Übersicht über die Aufreinigung der DP-Aktivität aus 10 d alten Gerstenblättern. In jedem Reinigungsschritt wurden die Aktivität und der Proteingehalt bestimmt. Der Reinigungsfaktor bezieht sich auf das PD10-Extrakt.

Reinigungs-schritt	Bradford (mg/ml)	Gesamtaktivität (μ mol/min)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Reinigungs-faktor
PD10-Extrakt	2,85	0,154	0,054	1
FPLC High-S	0,02	0,048	2,44	45

Zusätzlich zur Bildung des bekannten Cysteinyl-Peaks (3) mit RT 11,49 konnte die parallele Entstehung eines weiteren Peaks mit RT 9,82 (3a) beobachtet werden. Das HPLC-Chromatogramm, das diesen Umsatz zeigt, ist in Abb. 37 dargestellt. Hierbei könnte es sich um eine weitere Form eines Cysteinyl-DNB-Konjugates handeln, das bereits als N-Cysteinyl-Konjugat beschrieben worden ist (LAMOUREUX und RUSNESS 1980) und durch spontanes Rearrangement vom S-Cysteinyl- zum N-Cysteinyl-Konjugat bei saurem pH entsteht.

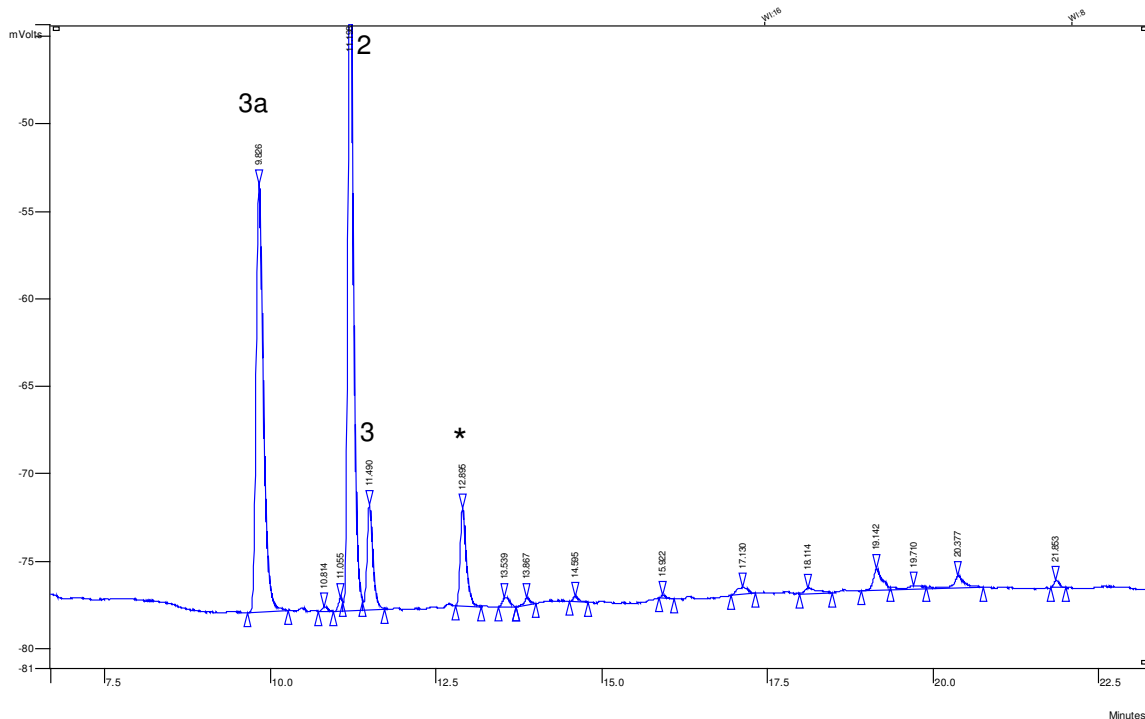


Abb. 37: HPLC-Chromatogramm 12 h nach Inkubation eines γ GC-DNB-Konjugates (2) mit Fraktion 33 der Kationenaustauschchromatographie (Abb. 36). Neben dem erwarteten Reaktionsproduktpeak (3), dem Cysteinyl-DNB (RT 11,49), entsteht parallel ein weiterer Peak (3a) bereits bei RT 9,82. Hierbei könnte es sich um eine weitere Form eines Cysteinyl-DNB-Konjugates handeln. * Verunreinigung (auch in Kontrolle).

Um die Bildungsraten beider Produkte vergleichen zu können, wurden für diese die Enzymaktivitäten berechnet. Dazu wurde die Eichreihe des Cysteinyl-DNB-Konjugates verwendet. Die Dynamik dieses Produktbildungsprozesses ist in Abb. 38 dargestellt. Es war eine deutliche Parallelität des Umsatzverhaltens beider Peaks zu beobachten.

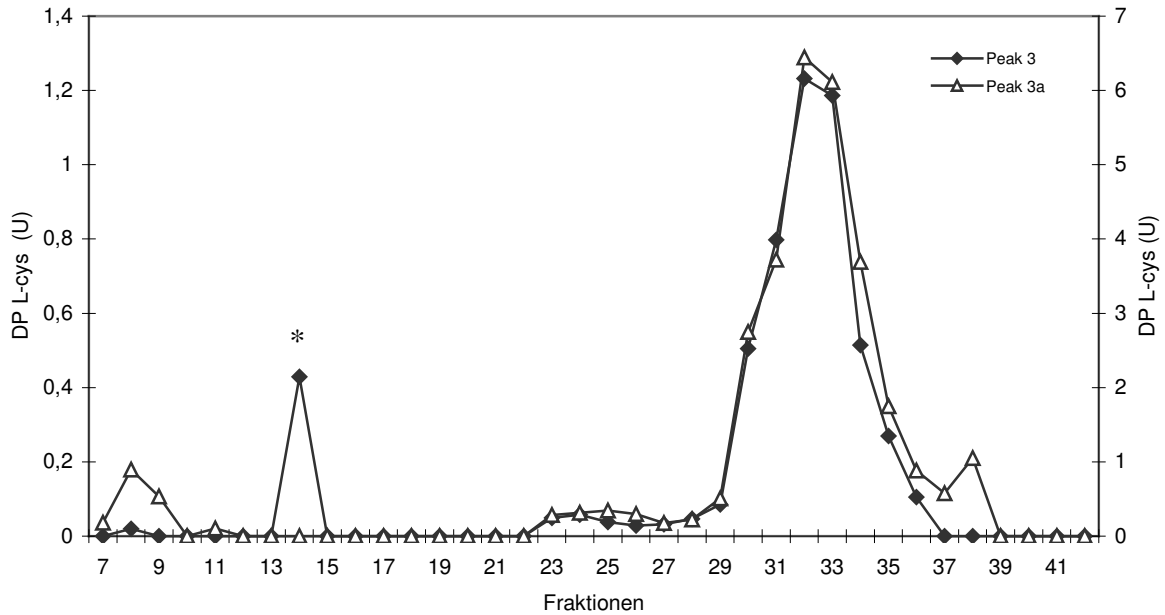


Abb. 38: Elutionsprofil einer Kationenaustauschchromatographie: Vergleich der Größenentwicklung der in Abb. 37 dargestellten Peaks (3, 3a). Zur Ermittlung des Umsatzes wurde die Eichreihe des Cysteinyl-DNB-Konjugates verwendet. Beide Enzymaktivitäten zeigen eine deutliche, fast deckungsgleiche Parallelität bei jedoch unterschiedlichen Gesamtumsätzen. * Wert diskriminiert.

2.2.3 Bildung eines Cysteinylglycin-DNB-Konjugates

Wie bereits in Kap. III 2.2.2 angemerkt, konnte in den Fraktionen 30 bis 34, in denen die Dipeptidaseaktivität detektiert wurde, zusätzlich ein sehr effektiver Umsatz von GS-DNB zu einem Cysteinylglycin-DNB-Konjugates *via* HPLC beobachtet werden (Abb. 39).

Das Elutionsprofil der Kationenaustauschchromatographie für den Umsatz von GS-DNB zu Cysteinylglycin-DNB-Konjugat ist in Abb. 40 dargestellt. Dieser, bislang für Pflanzen kaum beschriebene Umsatz könnte darauf hinweisen, dass die DP auch den Umsatz vom GS-DNB zum Cysteinylglycin-DNB katalysiert. Der in Abb. 39 dargestellte weitere Peak 4a eluierte parallel zum Cysteinylglycin-DNB, konnte jedoch mit Referenzsubstanzen bislang nicht identifiziert werden.

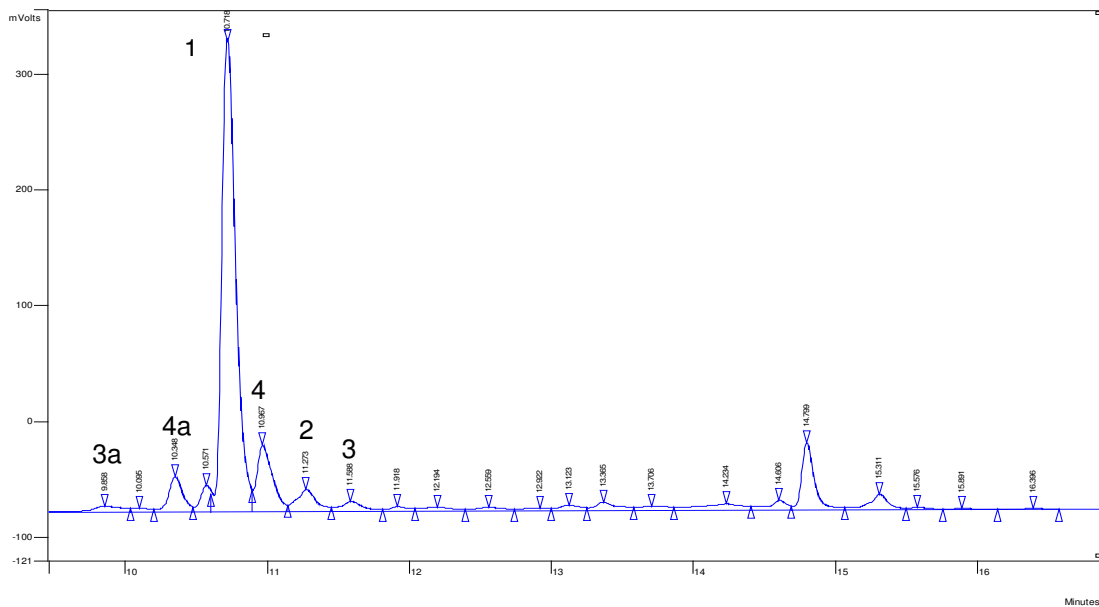


Abb. 39: HPLC-Chromatogramm 12 h nach Inkubation eines GS-DNB-Konjugates (1) mit Fraktion 33 der Kationenaustauschchromatographie (Abb. 38). Als Reaktionsproduktpeak konnte ein Cysteinylglycin-DNB-Konjugat detektiert werden (4). Parallel dazu formierte sich ein weiterer Peak (4a).

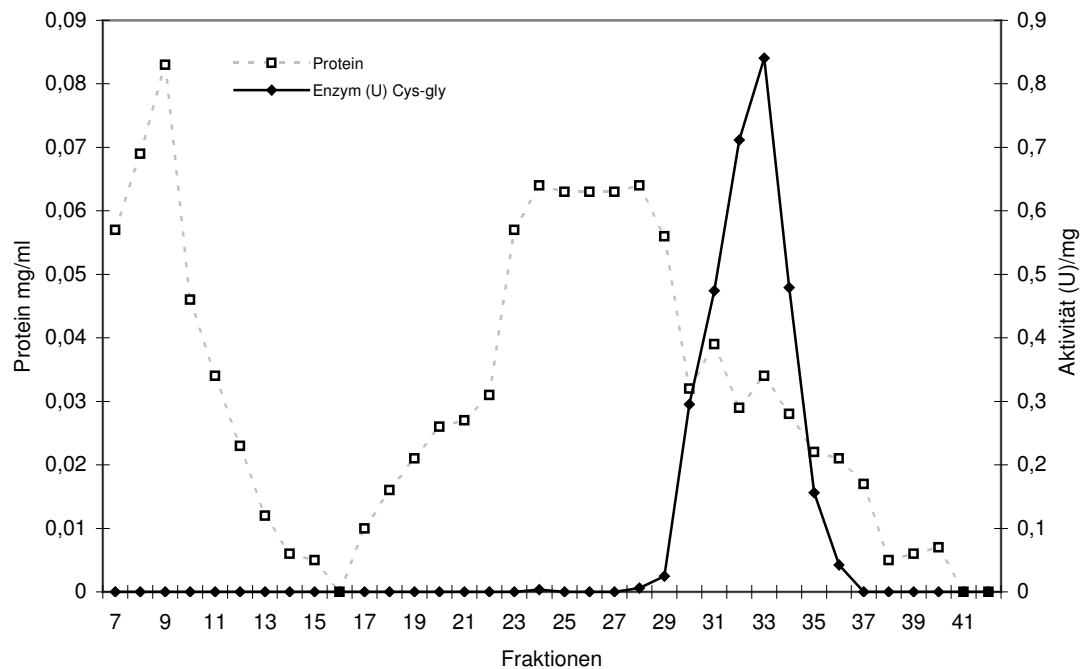


Abb. 40: Elutionsprofil der Kationenaustauschchromatographie: In den Fraktionen 30 bis 34 ist eine deutliche Aktivität zur Bildung eines Cysteinylglycin-DNB-Konjugates zu beobachten. Demnach könnte die DP auch den direkten Umsatz vom GS-DNB zum Cysteinylglycin-DNB-Konjugat katalysieren.

Zusätzlich wurde ein gekoppelter optischer Test zur Messung von Peptidaseaktivitäten eingesetzt, der auf einer Gelfärbemethode von LEWIS und HARRIS (1967) beruht. WOLF und WEISER (1976) konnten damit die Existenz einer zinkabhängigen Carboxypeptidase vom S-Typ in *Saccharomyces cerevisiae* zeigen. Dieser Test sollte ursprünglich als optischer Test die Messung der Carboxypeptidase-Aktivität beschleunigen und als Alternative zur Ermittlung der Aktivitätsbestimmung *via* HPLC etabliert werden. Das Elutionsprofil dieser Aktivitätsbestimmung ist in Abb. 41 dargestellt. Ein Vergleich mit Abb. 35 zeigte jedoch, dass diese Methode nicht geeignet war, die CP-Aktivitätsbestimmung bezüglich der Bildung von γ GC-DNB zu bestätigen. Es war mit dieser Methode aber möglich, in den FPLC-Fraktionen 33 bis 37 ebenfalls eine deutliche Leucin-Freisetzung und damit eine Enzymaktivität zu messen. Es könnte sich in diesem Fall um dieselbe Aktivität handeln, welches bereits den Umsatz des GS-DNB-Konjugates zum Cysteinylglycin-DNB katalysiert hat (Abb. 40).

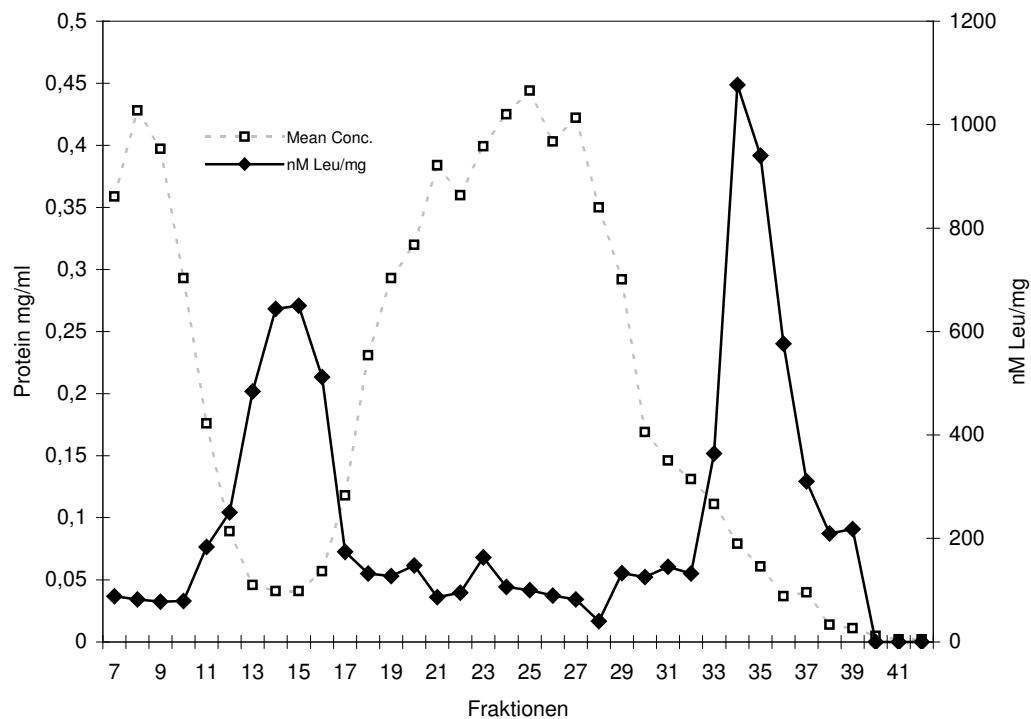
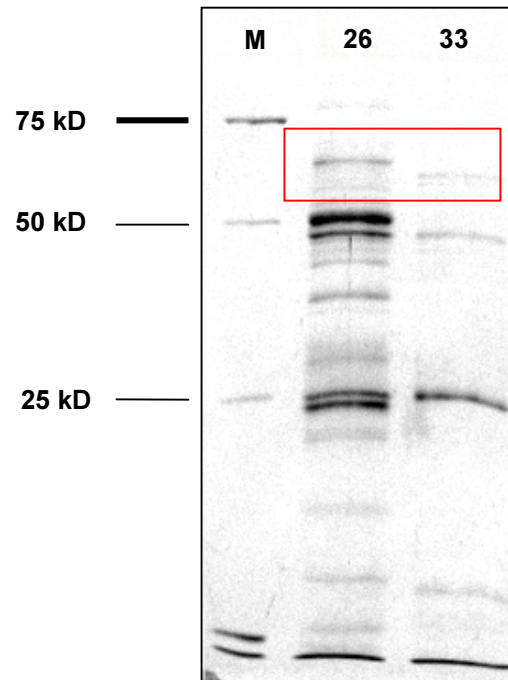


Abb. 41: Elutionsprofil einer Kationenaustauschchromatographie und Ermittlung der CP-Aktivität mittels eines optischen Tests. In den Fraktionen 33 bis 37 ist eine deutliche Aktivität zur Bildung von Leucin zu beobachten. In Anlehnung an Abb. 38 und 40 könnte dieser Umsatz auf eine peptidolytische Aktivität zurückzuführen sein.

2.3 Gelelektrophorese

Die in Kap. III 2.2 gereinigten Proteinfractionen 26 und 33, mit den jeweils höchsten Enzymaktivitäten, wurde im folgenden *via* SDS-Page (Kap. II 10.1) aufgetrennt und mit einem Größenstandard verglichen (Abb. 42).

Abb. 42: SDS-Page (Commassie-Färbung) der in Kap. III 2.2 gereinigten und entsalzten Proteinfractionen 26 und 33. Beide Proben entstammen einer Proteinextraktion von 10 d alten Gerstenpflanzen. In beiden Proben sind zwei deutlich übereinstimmende Banden bei 25 und 48 kD zu erkennen. Im Vergleich zu Probe 33 sind in Probe 26 Banden bei 23 und 50 kD vorhanden. Außerdem ist in Probe 33 bei ca. 60 kD eine Bande erkennbar, die in Probe 26 nicht vorhanden ist (Kasten). Dabei könnte es sich um die Proteinbande einer γ Glutamyltranspeptidase handeln, deren Aktivität in dieser Fraktion gemessen wurde. γ Glutamyltranspeptidasen haben ein Molekulargewicht von ca. 61,5 kD. Die deutlich höhere Anzahl an Proteinbanden in der Fraktion 26, ist auf die Elution dieser Fraktion in einem großen Proteinpeak zurückzuführen.



In beiden Proben sind zwei deutlich übereinstimmende Banden bei 25 und 48 kD zu erkennen. Im Vergleich zu Probe 33 sind in Probe 26 Banden bei 23 und 50 kD vorhanden. Da das Molekulargewicht von bekannten Carboxypeptidasen monokotyler Pflanzen ungefähr zwischen 47 und 50 kD liegt, könnte es sich bei der auffällig exprimierten Bande der 26er Fraktion um eine CP handeln. Außerdem ist in Probe 33 bei ca. 60 kD eine Bande erkennbar, die in Probe 26 nicht vorhanden ist. Da in dieser Fraktion die Aktivität einer γ Glutamyltranspeptidase vorliegt, könnte es sich in dieser Bande um dieses Protein handeln. Im Säugetier charakterisierte γ Glutamyltranspeptidasen haben ein durchschnittliches Molekulargewicht von 61,5 kD. Das Eluieren der Fraktion 33 in einer höheren Salzkonzentration weist überdies auf eine höhere Affinität zur verwendeten Säulenmatrix hin. Das erklärt zudem das sauberere Bandenmuster im Gel. Eine weitere Charakterisierung der Enzymmuster dieser beiden Fraktionen wurde mit der 2D-Gelelektrophorese durchgeführt.

Mit der 2D-Gelelektrophorese konnte nicht nur das Molekulargewicht, sondern auch der isoelektrische Punkt (IEP) der gereinigten Proteinfractionen bestimmt werden. Damit war es möglich, den in Abb. 42 erläuterten Polymorphismus genauer zu beschreiben (Abb. 43/44).

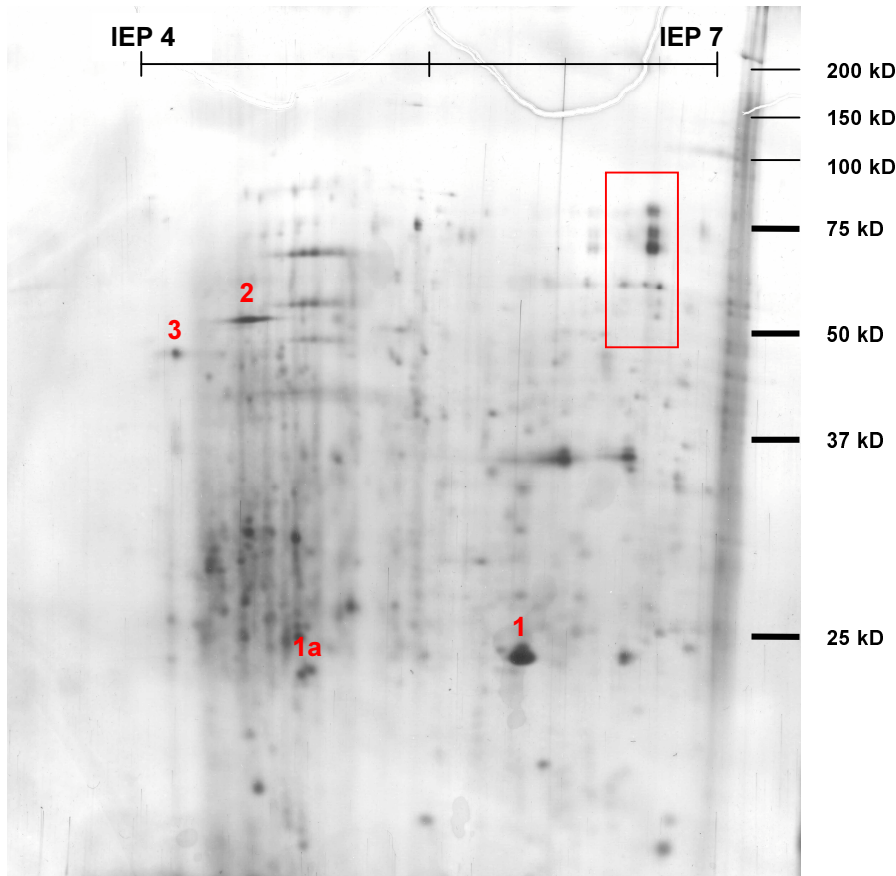


Abb. 43: 2D-Gelelektrophorese der gereinigten Proteinfraction 26 (Abb. 42). Knapp unterhalb von 25 kD ist im IEP 6 ein deutlicher Proteinspot (1) zu erkennen, der in Abb. 44 ebenfalls vorhanden ist. Es könnte sich dabei um den in Abb. 42 gezeigten Polymorphismus bei 25 kD handeln, da sich im niedrigen pH-Bereich ein weiterer Spot befindet (1a), der in Abb. 44 fehlt. Der in Abb. 42 dargestellte Polymorphismus bei 50 kD könnte sich aus den Spots (2) und (3) erklären. Da es sich bei den Enzymen vermutlich um vakuoläre Proteine handelt, werden die interessanten Spots eher im leicht sauren pH Bereich vermutet. Drei deutliche Spots 75 kD (roter Kasten) könnten einen weiteren in Abb. 42 dargestellter Polymorphismus (Kasten) erklären.

Im Abb. 43 ist knapp unterhalb von 25 kD ist im IEP 6 ein deutlicher Proteinspot (1) zu erkennen, der in Abb. 44 ebenfalls vorhanden ist. Es könnte sich dabei um den in Abb. 42 gezeigten Polymorphismus bei 25 kD handeln, da sich im saureren Bereich ein weiterer Spot befindet (1a), der in Abb. 44 fehlt. Der in Abb. 42 dargestellte Polymorphismus bei 50 kD könnte sich aus den Spots (2) und (3) erklären. Da es sich bei den Enzymen vermutlich um vakuoläre Proteine handelt, werden die interessanten Spots eher im leicht sauren pH Bereich vermutet.

Die Proteinfraction 33 ist in Abb. 44 als 2D-Gel dargestellt. Ein direkter Vergleich mit Abb. 43 bestätigt den bereits in Abb. 42 gezeigten Polymorphismus. Es ist deutlich zu erkennen, dass der oben beschriebene Spot 2 in Abb. 44 fehlt. Somit könnte dieser Spot auf die Existenz einer Carboxypeptidase hinweisen, deren Molekulargewicht sich in diesem Bereich befindet.

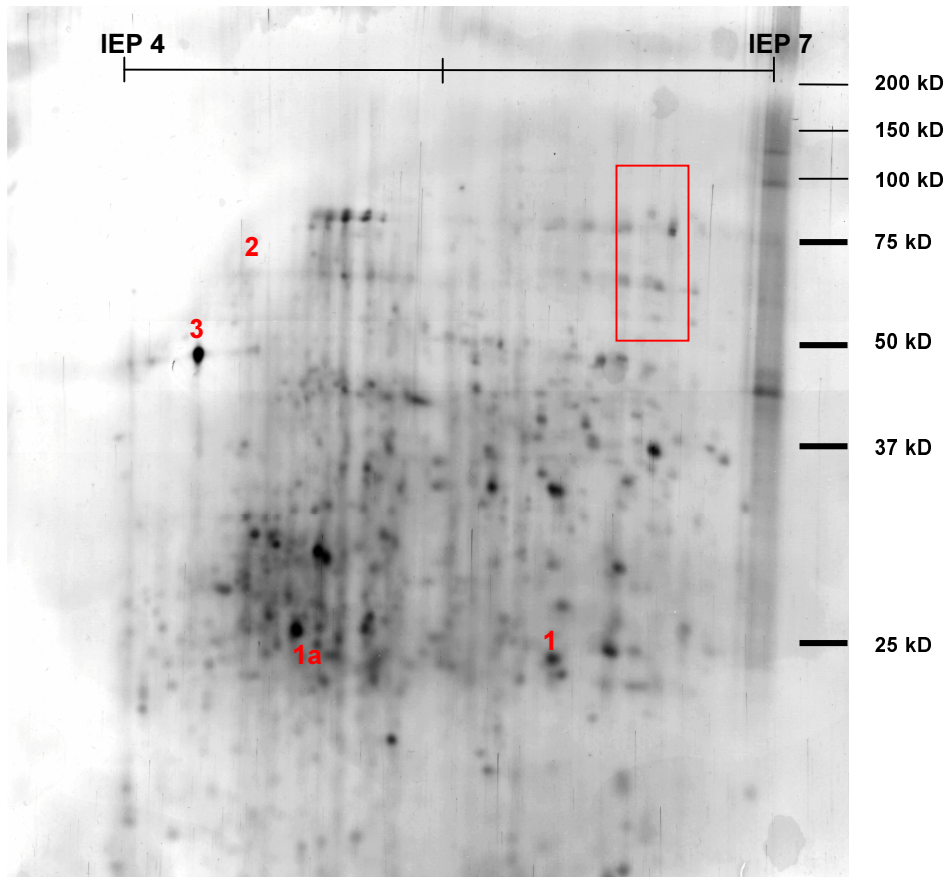


Abb. 44: 2D-Gelelektrophorese der gereinigten Proteinfraction 30 (Abb. 42). Knapp unterhalb von 25 kD ist im IEP 6 ein deutlicher Proteinspot (1) zu erkennen, der auch in Abb. 43 vorhanden ist. Da hier der Spot 1a fehlt könnte es sich dabei um den in Abb. 42 gezeigten Polymorphismus handeln. Der in Abb. 42 dargestellte Polymorphismus bei 50 kD könnte sich aus dem Fehlen von Spot 2 und der Anwesenheit von Spot 3 erklären. Da es sich bei den Enzymen vermutlich um vakuoläre Proteine handelt, wurden die relevanten Spots eher im pH-Bereich 4 bis 6 vermutet. Die in Abb. 43 dargestellten deutlichen Spots (Kasten) fehlen in dieser Fraktion und könnten auf den weiteren Polymorphismus in Abb. 42 (Kasten) hinweisen.

2.4 Lokalisierung und Charakterisierung von Enzymaktivitäten

Nachdem mit den vorigen Ergebnissen bereits die Existenz von GS-X degradierenden Enzymen in einem Gesamtextrakt belegt werden konnte, stellte sich nun die Frage nach der Charakterisierung und zellulären Lokalisierung dieser Enzyme. Eine genauere Kenntnis darüber würde den zellulären Fluss von entgifteten Schadstoffen und deren Abbau begreiflicher machen. Die Komplexität dieses Abbauprozesses zeigte sich in einem HPLC Chromatogramm nach der Inkubation eines GS-Konjugates mit einem entsalzten Gesamtextrakt (Abb. 45). Da sich in diesem Extrakt alle Enzymaktivitäten befanden, könnten die dort dargestellten Umsätze aus den Folgeprodukten der Aktivitäten entstanden sein. Ein weiteres Problem ergab sich daraus, dass sich nach der Kationenaustauschchromatographie z.B. in den Fraktionen 31 bis 34 immer noch verschiedene und zusammenhängende Enzymaktivitäten befanden. Dieses erschwerte vor allem auch die kinetische Charakterisierung dieser Enzymaktivitäten. Eine genauere Untersuchung erforderte also eine weitere Kompartimentierung in zelluläre Strukturen und damit eine funktionelle Zuordnung der Umsatzraten. Dafür wurden Protoplasten und Vakuolen aus 10 d alten Gerstenpflanzen isoliert und die Glutathionkonjugate mit dem Organelleninhalt und den Membranfraktionen inkubiert.

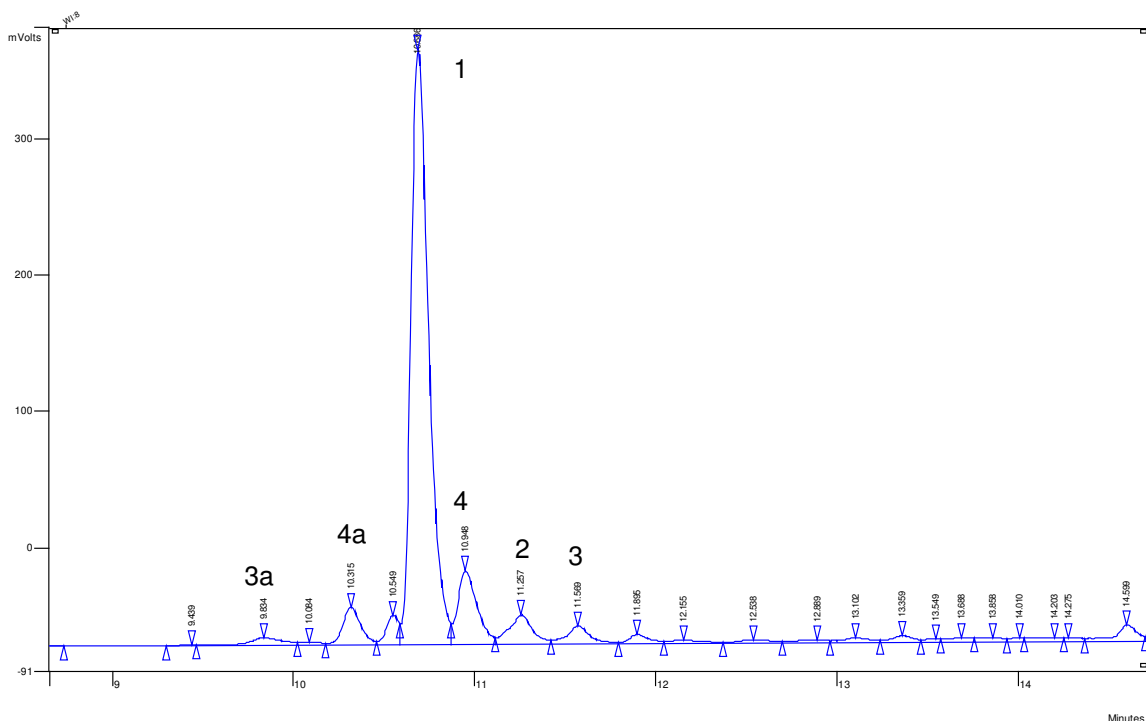


Abb. 45: HPLC-Chromatogramm nach der Inkubation eines GS-DNB-Konjugates mit einem entsalzten PD-10-Extrakt. Der Aufarbeitung wurde 5 μ mol des Proteinaseinhibitors Pepstatin A zugesetzt. In diesem Chromatogramm sind alle relevanten Enzymumsätze dargestellt. (1) GS-DNB, (2) γ GC-DNB, (3) Cysteinyl-DNB. Die Peaks 3a und 4a eluieren jeweils zeitgleich mit Peak 3 und 4.

2.4.1 Glutathion S-Transferase-Aktivität

2.4.1.1 Lokalisierung der Glutathion S-Transferase-Aktivität

Die Glutathion S-Transferase (GST)-Aktivität ist als Phase II Enzym maßgeblich an der Bildung von Glutathionkonjugaten beteiligt. Somit entscheidet sich mit der Aktivität dieses Enzyms die gesamte Detoxifizierungsleistung der nachfolgenden zellulären Abbaukaskade. Deshalb wurde zunächst die GST-Aktivität in Protoplasten und Vakuoplasten photometrisch bestimmt (Tab. 14).

Tab. 14: Übersicht über die GST-Aktivitäten in verschiedenen Zellkompartimenten von 10 d alten Gerstenpflanzen. Als Substrat wurde Chlordinitrobenzol (CDNB) verwendet. Für den Enzymtest wurden ca. 230.000 Protoplasten und 97.000 Vakuolen eingesetzt.

Zellkompartiment	Spezifische GST Aktivität U/mg	Gesamtaktivität U
Protoplasten	$12,98 \pm 7,53$	325 ± 188
Protoplasten (Membran)	nil	nil
Vakuoplasten	$2,75 \pm 0,29$	$1,26 \pm 0,13$
Vakuoplasten (Tonoplast)	$0,42 \pm 2,82$	$0,024 \pm 0,28$
Gesamtextrakt (PD10)	$2,45 \pm 1,91$	$6,38 \pm 4,99$

Aus Tab. 14 wird deutlich, dass sich in Protoplasten mit fast 13 U/mg eine fast dreimal so hohe GST-Aktivität befindet, wie in Vakuoplasten, die eine GST-Aktivität von 2,7 U/mg enthielten. Im Gegensatz dazu war in der Protoplastenmembran keine GST-Aktivität messbar, wohingegen sich im Tonoplasten noch eine Aktivität von 0,4 U/mg zeigen lässt. Offenbar hafteten dem Tonoplasten immer noch einige Cytoplasmafragmente an. Im Vergleich dazu wurde in einem Gesamtextrakt von 10 d alten Gerstenpflanzen eine spezifische GST-Aktivität von 2,45 U/mg detektiert.

2.4.2 Carboxypeptidase-Aktivität

2.4.2.1 Lokalisierung der Carboxypeptidase-Aktivität

Nachdem WOLF (1996) bereits über den Abbau von Glutathionkonjugaten zu γ Glutamylcysteinyl-Konjugaten die Existenz einer vakuolären Carboxypeptidase katalytisch beschreiben konnte, wurde im Folgenden die Carboxypeptidase zunächst in der Zelle lokalisiert. Zu diesem Zweck wurden Vakuolen aus Gerstenblättern isoliert und nach der Zentrifugation in eine Tonoplastenmembranfraktion (resuspendiertes Pellet) und in eine lösliche Fraktion, die den Vakuoleninhalt darstellt, aufgetrennt (Kap. II 8.5). Das GS-DNB-Konjugat wurde danach mit beiden Fraktionen für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Aktivitätsbestimmung *via* HPLC zeigte die Bildung eines γ Glutamylcysteinyl-DNB-Peaks nach Inkubation mit dem Vakuoleninhalt (Abb. 46).

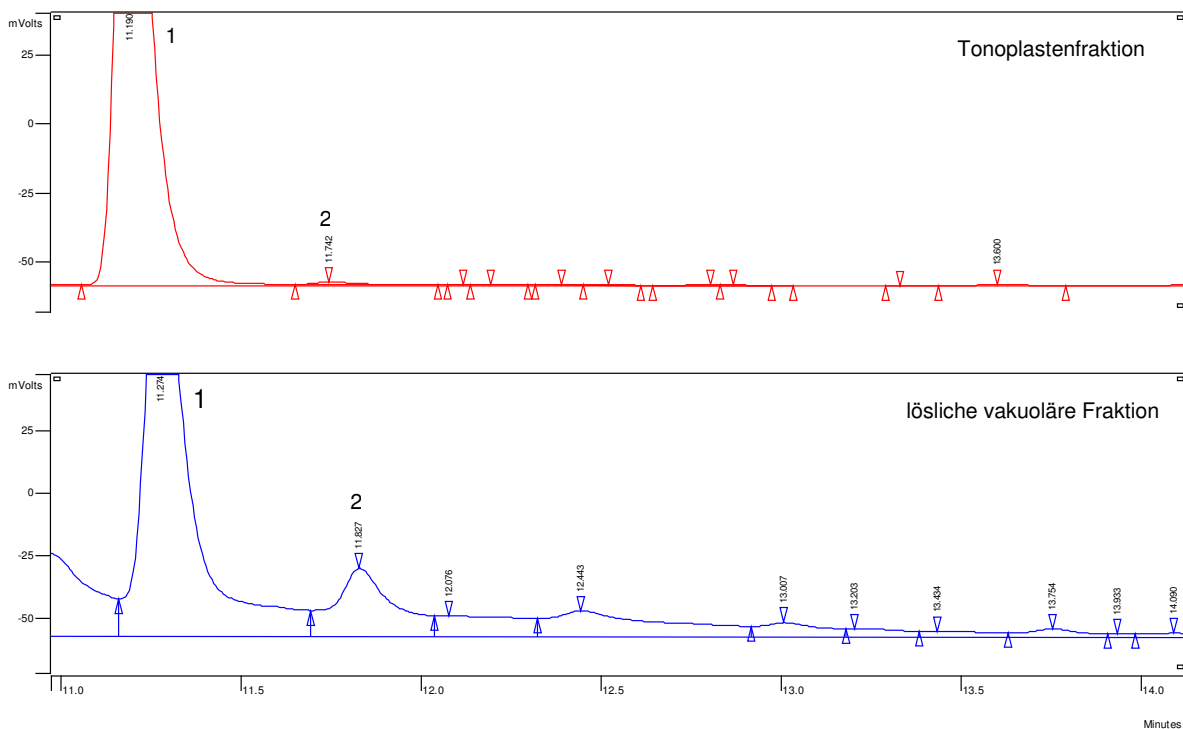


Abb. 46: Bestimmung der CP-Aktivität nach Inkubation eines GS-DNB-Konjugates (1) mit einer Tonoplastenfraktion, bzw. einer löslichen vakuolären Fraktion (2 h, Raumtemperatur). Das untere Chromatogramm zeigt eine CP-Aktivität nach Inkubation mit dem löslichen Vakuoleninhalt, wobei die Bildung eines γ Glutamylcysteinyl-DNB-Peaks (2) zu beobachten ist. Nach der Inkubation desselben Konjugates mit einer Tonoplastenfraktion konnte fast keine CP-Aktivität nachgewiesen werden.

In Tab. 15 sind die Umsatzraten für die Carboxypeptidase in Protoplasten und Vakuolen dargestellt. Die Fraktionierung der Zellkompartimente erfolgte nach Kap. II 8.5, die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach Umsatz pro Protein bzw. Organell. Bei diesen Berechnungen muss beachtet werden, dass für den Enzymtest ca. 230.000 Protoplasten und 97.000 Vakuolen eingesetzt wurden, die jedoch während der Zentrifugation fraktioniert wurden. Deshalb wurde hier auch die Proteinmenge bestimmt und eine spezifische Aktivität berechnet.

Tab. 15: CP-Aktivität in Protoplasten und Vakuolen von 10 d alten Gerstenpflanzen. Die Organellen wurden in eine lösliche und in eine Membranfraktion getrennt. Für den Enzymtest wurden ca. 230.000 Protoplasten und 97.000 Vakuolen in jeweils 80 µl eingesetzt.

Zellfraktion	Spezifische CP-Aktivität (U/mg)	Gesamtaktivität (U) pro 10 ⁵ Organellen
Protoplasten (lösl. Fraktion)	0,26 ± 0,17	0,06 ± 0,02
Protoplasten (Membran)	0,0014 ± 0,008	0,01 ± 0,002
Vakuolen (lösl. Fraktion)	0,61 ± 0,47	0,18 ± 0,18
Vakuolen (Tonoplast)	0,094 ± 0,045	0,01 ± 0,002

Die isolierten Mesophyllprotoplasten wiesen in der löslichen Fraktion eine enzymatische Aktivität für den Abbau von GS-DNB zum γ Glutamylcysteinyl-DNB-Konjugat und damit eine CP-Aktivität ($0,26 \pm 0,17$ U/mg). Im Vergleich dazu war aber die CP-Aktivität in der löslichen Fraktion isolierter Mesophyllvakuolen ($0,61 \pm 0,47$ U/mg) noch ca. 2,5-fach höher als in der löslichen Protoplastenfraktion. In der Protoplastenmembran befand sich den Untersuchungen zufolge nur eine sehr geringe CP-Aktivität ($0,0014 \pm 0,008$ U/mg). Im Gegensatz dazu fand sich in der Membran des Tonoplasten eine vergleichsweise hohe Aktivität ($0,094 \pm 0,045$ U/mg), die aber immer noch fast 6,5 mal niedriger war als die in der löslichen Vakuolenfraktion. Die Enzymaktivitäten in den Protoplastenfraktionen repräsentieren immer auch eine Teilaktivität der vakuolären Fraktion, sind jedoch zusammengenommen in den dargestellten spezifischen Aktivitäten stets sehr viel niedriger als die in der vakuolären Fraktion.

Dem zufolge wäre die Carboxypeptidase vorwiegend in der löslichen vakuolären Fraktion lokalisiert, was die Beobachtung von WOLF (1996) bestätigen würde. Außerdem konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass es sich bei der CP offensichtlich nicht um ein membranständiges Enzym handelt. Im weiteren wurden die Michaelis Konstante und Maximalgeschwindigkeit der CP-Aktivität bestimmt.

2.4.2.2 Charakterisierung der Carboxypeptidase-Aktivität

Im folgenden wurde die Michaelis-Konstante (K_M) für das eingesetzte Substrat bestimmt (Abb. 47). Dazu wurden die Enzymaktivitäten bei Substratkonzentration im Bereich von 10 bis 70 μM gemessen. Der K_M (92 μM) und die maximale Umsatzrate V_{\max} (3,1 U) wurden mit der Software EnzymKinetik (SigmaPlot 2001) ermittelt.

Die Güte der Verteilung (r^2) beträgt 0,97.

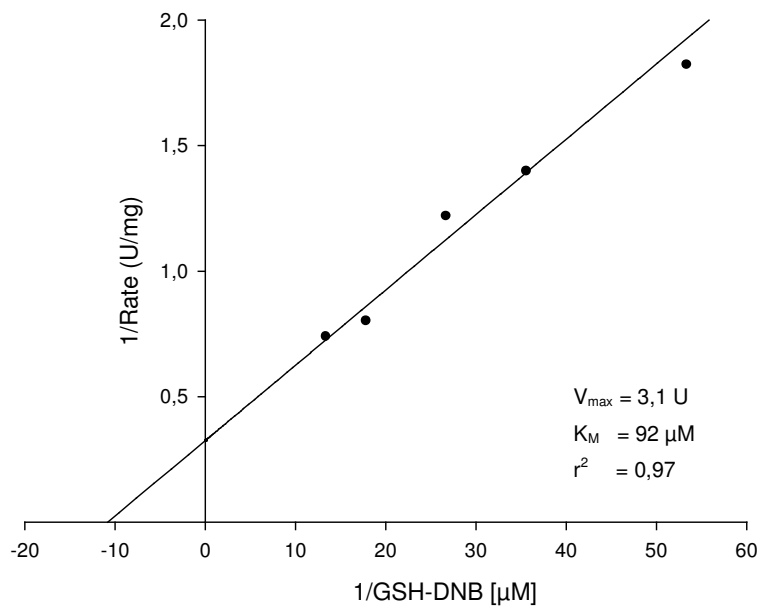


Abb. 47: Reaktionsgeschwindigkeit einer Carboxypeptidase (CP)-Aktivität aus isolierten Vakuolen. K_M -Wert und Maximalgeschwindigkeit (V_{\max}) sind graphisch nach LINEWEAVER und BURK (1934) dargestellt.

2.4.3 Dipeptidase-Aktivität

2.4.3.1 Lokalisierung der Dipeptidase-Aktivität

Zur Lokalisierung der Dipeptidase-Aktivität wurde wie in Kap. III 2.4.2.1 verfahren. Als Substrat wurde jedoch in diesem Fall γ Glutamylcysteinyl-DNB eingesetzt. Die Inkubationen zeigten aber nicht den erwarteten Umsatz zum bekannten Cysteinyl-DNB-Peak. Ferner wurde die bereits in Abb. 37 gezeigte Entstehung eines zweiten Cysteinyl-DNB-Peaks (3a) beobachtet. Hierbei könnte es sich um eine weitere Form eines Cysteinyl-DNB-Konjugates handeln, das bereits als N-Cysteinyl-Konjugat beschrieben worden ist (LAMOUREUX und RUSNESS 1980) und durch spontanes Rearrangement vom S-Cysteinyl- zum N-Cysteinyl-Konjugat bei saurem pH entsteht. Ein direkter Zusammenhang dieser beiden Peaks wurde in Abb. 38 gezeigt und deshalb wurde diesem Umsatz eine Dipeptidase-Aktivität zugeordnet.

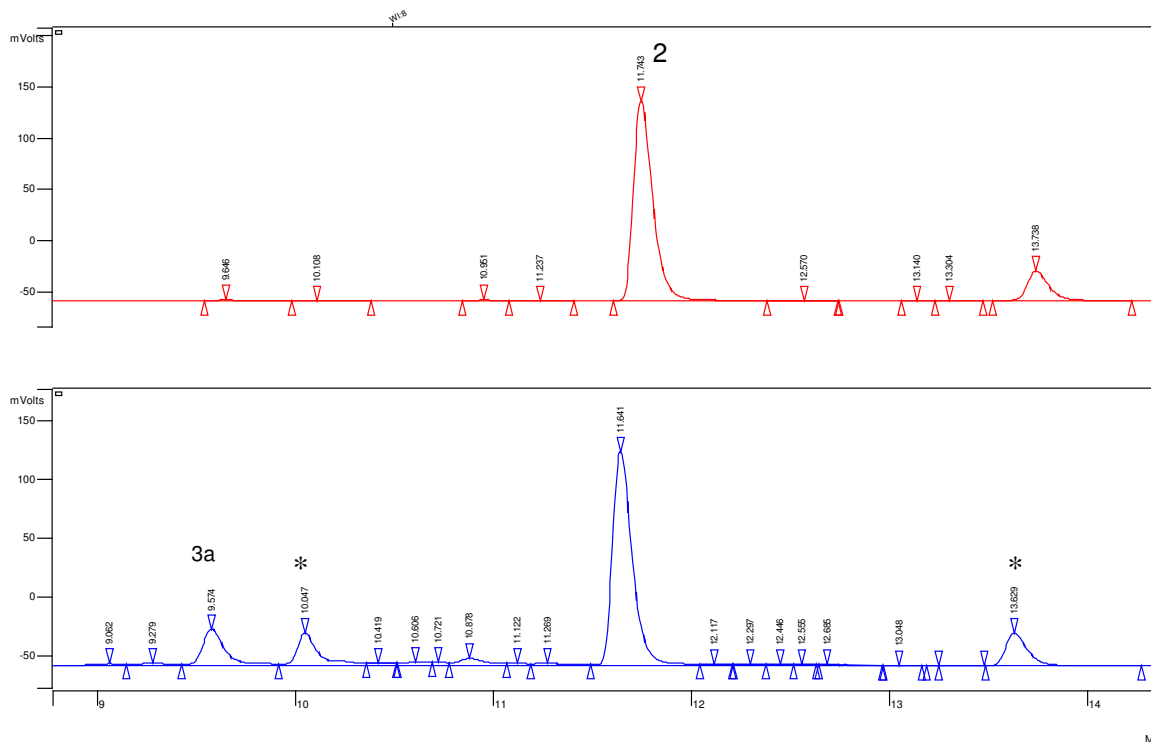


Abb. 48: Bestimmung der DP-Aktivität nach Inkubation eines γ Glutamylcysteinyl-DNB-Konjugates (2) mit einer Tonoplastenfraktion, bzw. einer löslichen vakuolären Fraktion (2 h, Raumtemperatur). Das untere Chromatogramm zeigt eine DP-Aktivität nach Inkubation mit dem löslichen Vakuoleninhalt, wobei die Bildung des bereits in Abb. 37 gezeigten zweiten Cysteinyl-DNB-Peaks (3a) bei RT 9,57 zu beobachten ist. Hierbei könnte es sich um die Isoform eines Cysteinyl-DNB-Konjugates handeln. Die Inkubation desselben Konjugates mit einer Tonoplastenfraktion ergab keinen Umsatz (oben). * Verunreinigung (auch in Kontrolle).

In Tab. 16 sind die Umsatzraten für die Dipeptidase-Aktivität (DP) in Protoplasten und Vakuolen dargestellt. Die Fraktionierung der Zellkompartimente erfolgte nach Kap. II 8.5, die Berechnung der Enzymaktivität wurde auf die Proteinmenge im Extrakt bzw. im Organell bezogen. Bei diesen Berechnungen muss beachtet werden, dass für den Enzymtest ca. 230.000 Protoplasten und 97.000 Vakuolen eingesetzt wurden, die jedoch während der Zentrifugation fraktioniert wurden. Deshalb wurde hier auch die Proteinmenge bestimmt und eine spezifische Aktivität berechnet.

Tab. 16: DP-Aktivität in Protoplasten und Vakuolen von 10 d alten Gerstenpflanzen. Die Organellen wurden jeweils in eine lösliche und in eine Membranfraktion getrennt. Für den Enzymtest wurden ca. 230.000 Protoplasten und 97.000 Vakuolen in jeweils 80 μ l eingesetzt.

Zellfraktion	Spezifische DP-Aktivität (U/mg)	Gesamtaktivität (U) pro 10^5 Organellen
Protoplasten (lösl. Fraktion)	$5,37 \pm 3,57$	$1,21 \pm 0,8$
Protoplasten (Membran)	$0,01 \pm 0,002$	$0,07 \pm 0,02$
Vakuolen (lösl. Fraktion)	$15,40 \pm 8,28$	$7,58 \pm 4,1$
Vakuolen (Tonoplast)	$0,76 \pm 0,42$	$0,07 \pm 0,02$

Die isolierten Mesophyllprotoplasten zeigten nach ihrer Kompartimentierung in der löslichen Fraktion eine enzymatische Aktivität für den Abbau vom γ Glutamylcysteinyl-DNB-Konjugat zum Cysteinyl-DNB-Konjugat und damit eine Dipeptidase-Aktivität ($5,37 \pm 3,57$ U/mg). Im Vergleich dazu war die DP-Aktivität in der löslichen Fraktion isolierter Mesophyllvakuolen ($15,40 \pm 8,28$ U/mg) noch ca. dreifach höher als in der löslichen Protoplastenfraktion. In der Protoplastenmembran befand sich dagegen nur eine sehr geringe DP-Aktivität ($0,01 \pm 0,002$ U/mg). Im Gegensatz dazu fand sich in der Membran des Tonoplasten eine wesentlich höhere Aktivität ($0,76 \pm 0,42$ U/mg), die aber fast zwanzigmal niedriger war als in der löslichen Vakuolenfraktion.

Demnach wäre die Dipeptidase (DP) vorwiegend in der löslichen vakuolären Fraktion lokalisiert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es sich bei der DP offensichtlich ebenfalls um ein 'nicht-membranständiges' Enzym handelt. Mit den deutlichen DP-Aktivitäten der löslichen vakuolären Fraktionen wurde im weiteren eine kinetische Charakterisierung der Umsatzrate vorgenommen.

2.4.3.2 Charakterisierung der Dipeptidase-Aktivität

In Abb. 49 ist die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration nach LINEWEAVER und BURK (1934) dargestellt. Dabei zeigt die DP-Aktivität eine maximale Umsatzrate (V_{\max}) von 60 U und einen K_M von 58 μM .

Die Güte der Verteilung (r^2) beträgt 0,89.

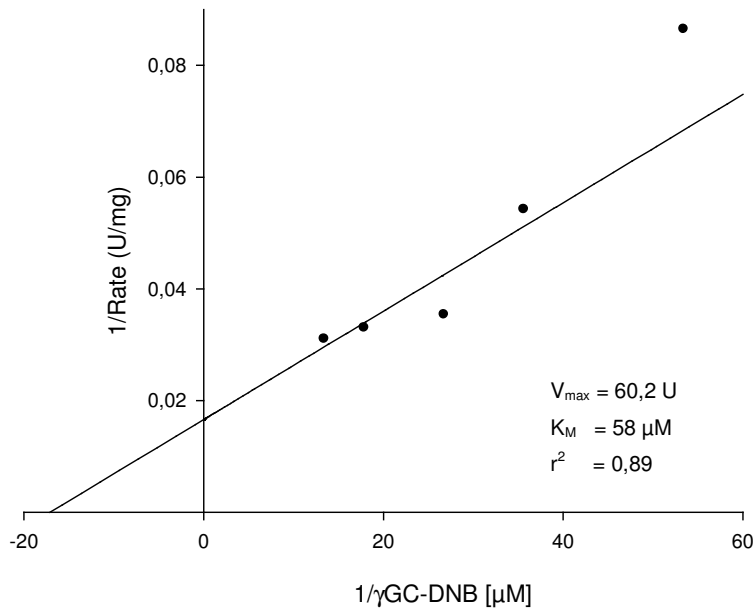


Abb. 49: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit einer Dipeptidase (DP)-Aktivität aus isolierten Vakuolen von der Substratkonzentration. K_M -Wert und Maximalgeschwindigkeit (V_{\max}) sind graphisch nach LINEWEAVER und BURK (1934) dargestellt.

IV Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Transport, der Kompartimentierung und dem Abbau von glutathionhaltigen Fremdstoffmetaboliten in Gerste (*Hordeum vulgare* L., var. Cherie). Sie ist daher in einen mikroskopischen und einen proteinchemischen Teil untergliedert.

Der Transport von Glutathionkonjugaten (GS-X) in Pflanzen, der in der Literatur bislang vernachlässigt wurde, konnte in dieser Arbeit erstmalig im intakten Gewebe von Gerstenwurzeln gezeigt werden. Dazu wurden mit Hilfe von Xenobiotika, die nach der Kopplung an Glutathion fluoreszierende GS-X bildeten, zahlreiche mikroskopische Experimente zum Transportverhalten dieser Fremdstoffmetaboliten durchgeführt. Im Zuge dieser Versuche ließen sich darüber hinaus Wurzelzonen darstellen, die eine besonders hohe Aktivität der Glutathion S-Transferase und damit eine hohe Entgiftungsleistung aufwiesen.

In den enzymologischen Experimenten sollten die bislang nur lückenhaft bekannten Schritte des vakuolären Abbaus von GS-X untersucht werden. Die bisherigen Untersuchungen mündeten lediglich in die Annahme, dass es nach dem Transport von GS-X in die Vakuole zur endgültigen Lagerung oder zu einer stufenweise Degradation der Metaboliten kommt. Mit der Carboxypeptidase, die das GS-X zu einem γ Glutamylcysteinylkonjugat (γ GC-X) umsetzt, war bislang lediglich ein einziges vakuoläres in den Abbau eingreifendes Enzym bekannt. In dieser Arbeit konnte daneben erstmals die Beteiligung eines zweiten vakuolären Enzyms am Abbau von GS-X in Pflanzen belegt werden.

Versucht man nun, die dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit unter dem in Kap. I 1 vorgestellten Dreiphasenmodell der Detoxifizierung zu subsumieren, so fällt auf, dass sowohl die Translokation als auch der Metabolismus von GS-Konjugaten der Phase-III-Reaktion zugeordnet sind. Diese Einordnung ist auch in der aktuellen Literatur strittig, sie wird jedoch im allgemeinen zugunsten der Schlüssigkeit des ursprünglichen Konzeptes (SHIMABUKURO 1976) zumeist beibehalten.

1 Aufnahme und interzellulärer Transport von Glutathionkonjugaten

Der interzelluläre Transport von GS-X ist eng mit dem Ort der GST katalysierten Konjugation des Xenobiotikum mit dem Tripeptid Glutathion verknüpft. Um die Lokalisierung dieser Entgiftungsreaktion aufzuklären, wurden in *in vivo* Studien 5 d alte Gerstenwurzeln mit den Xenobiotika Monobrombiman (MBB) und Monochlorbiman (MCB) behandelt. Beide Substanzen haben lipophile Eigenschaften, können Membranen durchdringen und fluoreszieren unmittelbar nach der Konjugation mit GSH (COLEMAN *et al.* 1997). Die Behandlung der Wurzelspitzen mit dem Xenobiotikum MBB, das unspezifisch an alle SH-Gruppen bindet, führte zu einer ca. 25-fach stärkeren Zunahme an Fluoreszenz, und verdeutlicht die hohe Reaktivität von MBB. Da MCB auch als spezifischer Indikator zur Bestimmung des Glutathiongehalts und einer MCB vermittelten GST-Aktivität eingesetzt wird (MEYER *et al.* 2001), wurde für weitere Arbeiten MCB eingesetzt. Ein visueller Vergleich der Fluoreszenzverteilung innerhalb der Wurzelspitze nach Applikation von MBB und MCB führt darüber hinaus noch zu einer anderen Erkenntnis: Während die MBB-Applikation zu einer homogenen Verteilung der Fluoreszenz in der Wurzelspitze führte (Abb. 13), wurde nach MCB-Applikation eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz in einzelnen Kompartimenten der Wurzelspitze sichtbar (Abb. 15b). Genauere Untersuchungen der Wurzelspitze mit dem LSM konnten zeigen (Abb. 17), dass direkt im Bereich der meristemalen Epidermis ein besonders stark fluoreszierender Zellsaum existierte. Offenbar sind dort besonders aktive Zellen vorhanden, die einen hohen GSH-Gehalt und eine hohe MCB-vermittelte GST-Aktivität aufweisen.

Die Induktion von GST in Wurzeln nach Herbizid- und Safener- Applikation ist vielfach beschrieben (EDWARDS und COLE 1996, DENG und HATZIOS 2002). Über den Wurzelbereich, in dem es zu verstärkten GST katalysierten Konjugationsprozessen kommt, ist hingegen wenig bekannt. So deckt sich jedoch die Beobachtung, dass der meristematische Bereich eine hohe GST-Aktivität aufweist, mit Ergebnissen zur Expression verschiedener Stressproteine in diesem Wurzelbereich. So konnte bereits die Expression von stressinduzierten GST-Genen im Wurzelmeristem von Tabakkeimlingen belegt werden (KLINEDINST *et al.* 2000). Darüber hinaus konnte für verschiedene Pflanzenspezies nach abiotischem Stress die Expression von Stressproteinen im Wurzelapex beobachten werden. PLA und Mitarbeiter (1998) konnten beispielsweise die Expression von *Heat-Shock*-Proteinen (HSP) und *Osmotic-like*-Proteinen (OLP) im Meristem der Wurzelspitze von Korkeichen nach Trockenstress zeigen. Ein

Vergleich verschiedener pflanzlicher Gewebezonen gestresster Pflanzen zeigt, dass vor allem in meristematischem Gewebe, das direkten Kontakt zu den Stressoren hat, Stressproteine induziert werden (YOUNG *et al.* 2001).

Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass es sich bei dem stark fluoreszierenden Zellsaum im Bereich des apikalen Meristems tatsächlich um eine *in vivo* Darstellung des Ortes der GST-vermittelten Glutathionkonjugation handelt.

Über den basipetalen Transport von Glutathionkonjugaten in Wurzeln ist bislang wenig bekannt. Es ist aber anzunehmen, dass sich GS-X im Langstreckentransport ähnlich wie Aminosäuren bzw. Glutathion verhält. Glutathion wird ebenso wie andere Peptide und Aminosäuren sowohl im Phloem als auch im Xylem systemisch transportiert (FOYER *et al.* 2001). Demnach könnten die in der Wurzel nach der Konjugation entstandenen Metaboliten mit dem Massenfluss zunächst in den Apoplasten gelangen und nach dem Passieren des Caspary-Streifens über den Zentralzylinder in das Xylem des Sprosses transportiert werden (BUSH 1999, TAIZ UND ZEIGER 1998). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Eine Akkumulation von GS-X in der Wurzel ist dabei ebenso ausgeschlossen wie die Anreicherung von GSH und GSSG, da die Akkumulation dieser Substanzen mit einer verminderten Aufnahme von reduziertem Glutathion und einer Reihe von Aminosäuren einhergeht (HERSCHBACH und RENNENBERG 1991, JAMAI *et al.* 1996). Die relativ hohe Geschwindigkeit des Abtransportes von GS-X aus der Wurzel und die deutliche Verlagerung der fluoreszierenden Substanzen in den Sproß unterstützen diese Beobachtung.

Bezüglich Verlauf und Intensität von Aufnahme und Fluoreszenzentwicklung ergab die direkte Applikation von Glutathion-Biman-Konjugaten (GS-B) ein grundsätzlich anderes Bild. Überraschenderweise konnte nämlich eine direkte Aufnahme von GS-B über die Wurzel nicht gezeigt werden. Damit scheint klar, dass nur solche Fremdstoffe transportiert werden können, die im apikalen Meristem der Wurzelspitze konjugiert werden. Einmal außerhalb der Wurzel befindliche Konjugate können nicht wieder in die Wurzel zurück gelangen.

Anders verhielt sich die Verlagerung von GS-B nach der Applikation an der Wurzelbasis. Es kam zu einem apikalen Transport, in dessen Verlauf die Fluoreszenz fast linear anstieg (Abb. 16). Die Linearität des Anstiegs könnte auf einen diffusiven Transport hinweisen, der aber im allgemeinen mit einer Transportgeschwindigkeit von nur wenigen Zentimetern pro Stunde beschrieben wird (MÜLLER 1986). Diese Transportform ist für den sog. 'Zell zu Zell'-

Transport beschrieben und findet über Plasmodesmata statt (LUCAS 1999). Die Induktion eines verstärkten symplastischen Transportes über Plasmodesmata unter Stress ist beschrieben worden (CLELAND *et al.* 1994). Voraussetzung dafür ist jedoch der Eintritt in den Symplasten, der z.B. für Aminosäuren als ein Zucker-/Aminosäure-Symport über H⁺-ATPasen in der Cytoplasmamembran geregelt wird (BUSH 1993). Um neben dem 'Zell zu Zell'-Transport auch den Phloemtransport anzustoßen und natürlichere Versuchsbedingungen zu simulieren, wurde GS-B in einer phloemsaftüblichen 0,1 M Zuckerlösung angeboten. Damit konnte sowohl ein symplastischer Transport von GS-B über Plasmodesmata als auch ein phloemabhängiger Transport belegt werden.

Weitere interessante Ergebnisse ergab die Verwendung des Laserscanningmikroskops. Mit dieser Methode konnte zudem ein Anstieg der Fluoreszenz im Apoplasten gezeigt werden (Abb. 27). Neuere Untersuchungen über Stickstoffverluste in Sommerweizen belegen, dass der überwiegende Teil des Stickstoffs in Form von Aminosäuren über Wurzeln in den Boden exsudiert wird (RROÇO *et al.* 2002). Es kommt dabei zunächst zu einer Verlagerung der Aminosäuren über das Phloem in die Wurzel (Langstreckentransport) und schließlich dort zu einer diffusiven Verlagerung in den Apoplasten und damit in den freien Wurzelraum (*free space*). Die erhöhte Fluoreszenz im Apoplasten könnte somit auch auf einen apoplastischen Transport von GS-B hinweisen, der neben einem symplastischen Transport von GS-X in die Wurzelspitze stattfindet. Daraus ergibt sich zwingend die Schlussfolgerung, dass es ähnlich zur Verlagerung von Aminosäuren auch zu einer Exsudation von GS-X über die Wurzel in den Boden kommen könnte. Eine anschließende Wiederaufnahme von GS-X über die Wurzel kann ausgeschlossen werden. Damit wäre der Transport von GS-X unidirektional und ein eleganter Weg der Pflanze, Metaboliten und Fremdstoffe zu exkretieren.

2 Intrazellulärer Transport von Glutathionkonjugaten

Da eine Akkumulation von Glutathionkonjugaten im Cytosol die enzymatische Konjugationsleistung erheblich verringert, ist es für die Pflanze nahezu essentiell, die Konjugate zu sequestrieren. So kommt es zu einer intrazellulären Deposition von GS-X in die Vakuole (ISHIKAWA 1992). MARTINOIA und Mitarbeiter (1993) lokalisieren für diesen Transportprozess eine spezifische ATP-abhängige GS-X-Pumpe im Tonoplasten (Kap. I 3.1).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Transportstudien konnten erstmalig die Transportleistung einer GS-X-Pumpe in lebenden Gerstenzellen darstellen. Eine ähnliche Charakterisierung der GS-X-Pumpe wurde bislang erst bei *Arabidopsis thaliana* durchgeführt (FRICKER und MEYER 2001). Ein Vergleich dieser beiden Studien zeigt, dass in Gerstenwurzeln die Transportaktivität mit $5,6 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$ GS-B etwa fünfmal niedriger ist als in Arabidopsiswurzeln. Somit war auch die maximale Fluoreszenz im Zellkern-Cytosol-Komplex in Arabidopsiswurzeln etwa dreimal so schnell erreicht wie in Gerstenpflanzen, was als Folge der höheren Transportleistung der GS-X-Pumpe zu werten ist.

Die höhere Transportleistung des Arabidopsis-Transporters könnte mit dem generell leistungsfähigeren Schwefelmetabolismus von *Brassica*-Arten zusammenhängen, die Schwefel in ihrem Sekundärmetabolismus unter anderem zu Glucosinolaten umsetzen und generell einen höheren Schwefelbedarf haben (MENGEL 1991). Auch die Verlagerung von oxidiertem Glutathion (GSSG) in die Vakuole, die der GS-X-Pumpe eine Hauptfunktion zugeschrieben wird (MARTINOIA *et al.* 1993), könnte die höhere Aktivität der GS-X-Pumpe erklären.

Mit diesem Experiment war es darüberhinaus möglich, die GS-Pumpe mittels der Applikation einer Na-Azid-Lösung zu blockieren. Azid ist als Inhibitor der funktionellen Kooperativität von vakuolären ATPasen (V-ATPase) bekannt und induzierte im vorliegenden Fall die Akkumulation von GS-B im Cytosol. Da die Bindung von MCB an GSH sehr spezifisch ist (COLEMAN *et al.* 1997, MEYER *et al.* 2001), war es damit möglich, eine quantitative *in vivo* Bestimmung des Glutathiongehaltes in verschiedenen Zellkompartimenten der Gerstenwurzel durchzuführen. Bislang ist eine solche *in vivo*-Messung lediglich in Arabidopsiswurzeln durchgeführt worden (MEYER *et al.* 2001). Dort wurde mit $2,9 \pm 0,3$ mM GSH ein etwa fünfmal höherer cytosolischer GSH-Gehalt als in Gerstenwurzeln bestimmt. Somit sind die dargestellten Beziehungen zwischen Transportaktivität und Glutathiongehalt in Gerste und Arabidopsis zueinander kongruent.

Die 24-stündige Inkubation der Gerstenwurzel mit dem Herbizidsafener Cloquintocet-mexyl zeigte eine ca. 30 prozentige Hemmung auf die GS-X-Pumpe und GST-Aktivität nach einer MCB-Behandlung. Dieses Ergebnis widerspricht der gängigen Literatur, in der die Co-Induktion von GST-Aktivität und GS-X-Pumpe in Experimenten mit isolierten Vakuolen gezeigt werden konnte (KREUZ *et al.* 1996). GAILLARD und Mitarbeiter (1994) konnten in isolierten Gerstenvakuolen aus Safener-behandelten Pflanzen die Transportaktivität für Metolachlor-Glutathionkonjugate um 80 % und die GST-Aktivität um 50% steigern und

postulierten in dem Zusammenspiel von GST und Transporter einen adaptiven Schutzmechanismus gegen xenobiotschen Stress. Ähnliche Beobachtungen wurden für die Expression von GST und MRP-Analoga auf Transkriptionsebene nach Safener-Behandlung in Weizen gemacht (THEODOULOU *et al.* 2003). Der Widerspruch zu den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen könnte auf verschiedene Umstände zurückzuführen sein: (1) Eine Bestimmung der Transportaktivität von GS-B ist bislang noch nicht *in vitro* durchgeführt worden. Die Spezifität der MCB-vermittelten Konjugation könnte auf ein anderes Transportverhalten von GS-B hinweisen. (2) Es wurden bislang noch keine *in vitro*-Transportstudien mit Safener-behandelten Wurzelvakuolen durchgeführt. In Wurzeln ist häufig eine niedrigere GST-Aktivität vorhanden als in Blättern (COLE *et al.* 1997, DAUBNER 2001). Da jedoch die GST-Aktivität in einem engen Zusammenhang zu der Transportleistung der GS-X-Pumpe steht (THEODOULOU *et al.* 2003), ist es möglich, dass in Wurzeln auch die Transporter-Aktivität geringer ist. Daher sind die Ergebnisse der Safener-Studien nicht miteinander vergleichbar.

3 Nachweis der vakuolären Enzymaktivitäten

Nachdem im vorigen Abschnitt bereits der inter- und intrazelluläre Transport von Glutathionkonjugaten in die Vakuole beschrieben worden ist, sollen nun die Ergebnisse der proteinchemischen Untersuchungen und der damit gewonnene Erkenntnisgewinn für die Degradation von GS-X diskutiert werden.

3.1 Nachweis der Carboxy- und Dipeptidase-Aktivität

In der Literatur wurde die Vakuole lange als Ort der finalen Speicherung von Glutathionkonjugaten (GS-X) angesehen (COUPLAND 1991, KREUZ *et al.* 1996). Nachdem LAMOUREUX und RUSNESS (1989) die Beteiligung von Peptidasen in der Degradation von GS-X postuliert hatten, konnten WOLF und Mitarbeiter (1996) zeigen, dass GS-X in der Vakuole tatsächlich einem weiteren Abbau unterliegen und charakterisierte eine Carboxypeptidase (CP), die die Umsetzung von GS-X (Tripeptid) zu einem γ Glutamylcysteinylkonjugat (γ GC-X, Dipeptid) katalysiert. Ein weiterer Umsatz des γ GC-X zu einem Cys-DNB konnte für die CP-Aktivität nicht beschrieben werden (WOLF *et al.* 1996). Da in Zellkulturen als freier

Metabolit immer ein Cysteinylkonjugat (Cys-DNB) nachgewiesen wurde (LAMUOREUX und RUSNESS 1980), wurde vermutet, dass es sich dabei um das Produkt einer Dipeptidase (DP)-Aktivität für die Umsetzung von γ GC-X handelt. Da die DP-Aktivität ebenfalls in der Vakuole vermutet wird, bot es sich deshalb an, auf der Suche nach peptidolytischen Enzymaktivitäten die von WOLF (1996) beschriebene Methode zur Bestimmung der vakuolären CP-Aktivität zu verwenden.

Deshalb wurden mit dem extrahierten Gesamtprotein Glutathion-Dinitrobenzol (GS-DNB) und γ Glutamylcysteinyl-Dinitrobenzol (γ GC-DNB) inkubiert und anschließend die einzelnen Metabolisierungsstufen auf der HPLC dargestellt (LAMOUREUX *et al.* 1993). Die Peaks der Reaktionsprodukte wurden mit Referenzstandards identifiziert und über Eichkurven quantifiziert. Dabei fiel auf, dass es beim Cys-DNB offensichtlich aufgrund des sauren pH nicht enzymatisch zu einem spontanen Rearrangement vom S-Cysteinyl- zum N-Cysteinyl-Konjugat kam, das bereits von LAMUOREUX und RUSNESS (1980) beschrieben werden konnte. In den Experimenten zeigte sich zum einen der für die CP-Aktivität erwartete Umsatz von GS-DNB zu γ GC-DNB und zum anderen der Umsatz von γ GC-DNB zu einem Cysteinyl-DNB, der auf die Anwesenheit einer Dipeptidase-Aktivität hindeutete. Weitere enzymatische Umsetzungsprozesse konnten nicht detektiert werden. Dass es sich bei diesen Umsätzen um eine enzymatische Reaktion handelt, wurde über die Zeit- und Substratabhängigkeit gezeigt. Während sich der Umsatz beider Enzymaktivitäten strikt zeitabhängig zeigte, nahm die CP-Aktivität bei der Erhöhung der Substratkonzentration im Gegensatz zur Dipeptidase ab. Dieses Phänomen könnte einerseits auf eine Produkthemmung der CP hinweisen (JÄNICKE 1984), andererseits aber auch auf die Anwesenheit eines zweiten Enzyms oder mehrerer Enzymaktivitäten im Inkubationsansatz (PD-10-Extrakt) zurückzuführen sein. Damit ist es mit der Methode von WOLF (1996) erstmalig gelungen, die enzymatische Degradation eines γ Glutamylcysteinyl-Konjugates zum Cysteinyl-Konjugat durch eine Dipeptidase (DP) analytisch darzustellen.

3.2 Reinigung der Carboxy- und Dipeptidase-Aktivität

Neuere Erkenntnisse über die Reinigung von Carboxy- und Dipeptidasen sind kaum vorhanden, und so wurde nach etablierten Methoden der Enzymreinigung verfahren. Zur partiellen Reinigung der Carboxy- und Dipeptidase-Aktivität wurde das Gerstengesamtprotein bei pH 5 extrahiert und das Proteinrohextrakt einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen (BREDDAM 1986). Die Fällungsschritte von 35 % bis 80 % Ammoniumsulfatkonzentration wurden in Anlehnung an WOLF und Mitarbeiter (1996) gewählt, die Ausbeute an CP-Aktivität war reproduzierbar. Da jedoch die DP-Aktivität zunächst sehr gering ausfiel, bzw. kaum detektierbar war, wurde dem Extraktionspuffer der Proteinaseinhibitor Pepstatin A zugesetzt. Hierbei stellte sich heraus, dass im Vergleich zu einer Kontrolle die CP-Aktivität verdoppelt und die DP-Aktivität sogar verfünffacht wurde. Pepstatin ist ein bekannter Inhibitor von Thiol-, Metallo- und Carboxyproteasen (SANCHEZ-FERNANDEZ *et al.* 2001, STUHLFELDER *et al.* 2002) und verhindert offensichtlich auch den Abbau peptidolytischer Enzyme.

Da im entsalzten PD-10-Extrakt beide Enzymaktivitäten vorlagen, sollte mit einer GSH-abhängigen Affinitätschromatographie versucht werden, die Enzymaktivitäten voneinander zu trennen. Erstaunlicherweise ließ sich mit dieser Methode die CP-Aktivität fast 120-fach anreinigen, wohingegen eine DP-Aktivität nicht im Eluat gemessen werden konnte. Dieses Experiment belegt damit deutlich die GSH-Abhängigkeit der CP-Aktivität, wohingegen die DP-Aktivität nicht GSH-abhängig zu sein scheint. Somit kann angenommen werden, dass die CP-Aktivität auch in ihrer natürlichen Funktion den Umsatz von Glutathion katalysiert und offenbar GSH und Glutathionkonjugate nicht unterscheidet. Dieses Ergebnis belegt frühere Arbeiten, in denen für Tabakzellkulturen die Degradation von GSH durch Carboxypeptidasen postuliert wurde (STEINKAMP und RENNENBERG 1985).

Da es sich bei der CP-Aktivität vorwiegend um eine vakuoläre Aktivität handelt (WOLF *et al.* 1996) und vakuoläre Enzyme im leicht sauren Milieu als kationisch vorliegen, wurde in Anlehnung an MIKOLA (1986) zur Reinigung beider Enzymaktivitäten die Kationenaustauschchromatographie in einem FPLC-System angewendet. Im Elutionsprofil ließen sich mit dieser Methode beide Aktivitäten deutlich voneinander trennen. Während die CP-Aktivität in einer Salzkonzentration von 0,35 M detektiert wurde, eluierte die DP-Aktivität bei einer Salzkonzentration von 0,55 M (NaCl). Da beide Enzymaktivitäten jeweils nur für ihre Konjugate detektierbar waren, konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, dass

es sich um zwei unterschiedliche Enzymaktivitäten handelt. Überraschenderweise konnte mit den FPLC-Fractionen, in denen sich die DP-Aktivität befand, ebenfalls der Umsatz eines GS-DNB zu einem Cysteinylglycin-DNB (CG-DNB) beobachtet werden. Die Inkubation von CG-DNB mit Fraktionen der CP- und DP-Aktivität führte dagegen zu keinem weiteren Umsatz. Damit hätte die DP-Aktivität zwei wichtige Funktionen: (1) Den Umsatz unter Abspaltung des γ Glutamyl-Rests vom γ Glutamylcysteinyl-DNB zum Cysteinyl-DNB. (2) Den Umsatz unter Abspaltung des γ Glutamyl-Rests vom GS-DNB zum Cysteinylglycin-DNB. Damit wird klar, dass sich die DP-Aktivität in der Pflanze offenbar auf die Abspaltung des γ Glutamyl-Rests vom Glutathion beschränkt. Diese Form der Enzymaktivität erinnert stark an eine γ Glutamyltranspeptidase-Aktivität, wie sie im tierischen GSH-Katabolismus beim Abbau von GSH zu Cysteinylglycin zu finden ist (MEISTER 1988). MARTIN und SOLVIN (2000) konnten in Tomaten eine γ Glutamyltranspeptidase mit einer hohen Affinität zu Glutathionkonjugaten identifizieren. Über Funktionen innerhalb des GSH-Metabolismus konnten beide Autoren keine Angaben machen. Es wäre aber denkbar, dass eine γ Glutamyltranspeptidase auch den Umsatz von GS-DNB zu CG-DNB katalysieren könnte und damit Untersuchungen, wonach der ausschließliche Abbau von GSH in Pflanzen über eine CP-Aktivität postuliert wird (STEINKAMP und RENNENBERG 1985), widerlegt werden könnten.

Die gereinigten Enzymaktivitäten zeigten, dass die DP-Aktivität bezüglich des Umsatzes zum Cysteinyl-DNB mit etwa 1,2 U/mg etwas höher war, als im Umsatz zum CG-DNB mit etwa 0,8 U/mg, was in etwa der Höhe der CP-Aktivität entsprach. Die Bestimmung der katalytischen Parameter mit K_M 58 μ M (DP-Aktivität) und 92 μ M (CP-Aktivität) ergaben, dass beide peptidolytischen Enzyme eine hohe Spezifität für die eingesetzten Substrate besitzen.

Ein Vergleich der Proteinmuster beider aufgereinigten Enzymfraktionen mittels SDS-PAGE zeigt für die CP-Aktivität eine deutliche Bande bei ca. 50 kD, dem durchschnittlichen Molekulargewicht von Carboxypeptidasen. WOLF und Mitarbeiter (1996) beschrieben die isolierte Carboxypeptidase als ein 56 kD großes monomeres Protein. Bei der DP-Aktivität ist eine deutliche Bande bei 25 kD zu sehen, ein Molekulargewicht für pflanzliche Dipeptidasen ist in der Literatur bislang nicht bekannt. Interessanterweise findet sich aber im Gel eine schwache Bande im Bereich von 61,5 kD, dem durchschnittlichen Molekulargewicht von γ Glutamyltranspeptidasen.

3.3 Lokalisierung der Carboxy- und Dipeptidase-Aktivität

Nachdem es WOLF und Mitarbeitern (1996) gelungen war, die CP-Aktivität in der Vakuole lokalisieren konnten, war es in dieser Arbeit möglich, neben der CP-Aktivität auch die DP-Aktivität mit dem Umsatz von γ GC-DNB zu Cys-DNB in der Vakuole zu lokalisieren. Durch die Fraktionierung der Vakuolen in eine lösliche und in eine membranständige Fraktion war zudem die Zuordnung beider Enzymaktivitäten zur löslichen vakuolären Fraktion möglich. Dabei muß beachtet werden, dass durch die Aufarbeitung evtl. Hemmstoffe freigeworden sind, die offenbar die CP-Aktivität bzw. die DP-Aktivität im Protoplasten um den Faktor 3 herabgesetzt haben. Dies würde die höhere Aktivität der Enzyme in den Vakuolenextrakten erklären.

Offenbar spielen Peptidasen im Stressmetabolismus von Pflanzen eine größere Rolle als bisher angenommen. Neben der von WOLF und Mitarbeitern (1996) beschriebenen CP ist die Expression einer vakuolären Serin-Carboxypeptidase vom Typ I im Mesophyll von verletzten Tomatenpflanzen dargestellt worden (MOURA *et al.* 2001). Interessanterweise wurde die CP mit Hilfe von Antikörpern ebenfalls frei im Lumen der Vakuole lokalisiert. Eine weitere Serin-CP vom Typ I konnte nach Kupferstress in Vakuolen vaskulärer Parenchymzellen detektiert werden (MEHTA *et al.* 1996). Über die Funktion der CP im Stressmetabolismus ist bislang wenig bekannt, es ist jedoch beschrieben worden, dass auch durch Stressoren erzeugte Sekundärmetabolite an GSH gebunden und in die Vakuole transportiert werden (KLEIN *et al.* 1998). Dort könnten GS-X metabolisiert werden. Die Funktion von Dipeptidasen im Stressmetabolismus von Pflanzen ist bislang in der Literatur nicht beschrieben und nur aus dem tierischen GSH-Metabolismus bekannt. Entsprechend konnten Dipeptidasen in Pflanzen bislang noch nicht charakterisiert werden. Die Anwesenheit einer Dipeptidase (DP) in der Vakuole stellt somit eine sinnvolle Ergänzung zur Carboxypeptidase beim Abbau von GSH-Metaboliten dar und schließt die Lücke in der Degradationskaskade zum Cysteinyl-Konjugat.

Erstaunlicherweise konnte bei der Inkubation von GS-DNB weder mit einer Protoplastenfraktion noch mit einer vakuolären Fraktion ein Umsatz zu einem CG-DNB detektiert werden. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass der in einer gereinigten Fraktion gezeigte Umsatz von GS-DNB zu CG-DNB entweder apoplastischer Art ist oder diese Aktivität während der Vakuolenisolierung verloren geht. Da jedoch die Bildung eines

Cys-DNB gezeigt werden konnte und damit eine DP-Aktivität vorlag, könnte es sich bei dem angereinigten Protein auch um eine γ Glutamyltranspeptidase (γ GT) handeln. γ Glutamyltranspeptidasen (EC 2.3.2.2) sind in Pflanzen bislang kaum untersucht und bilden im Genom von *Arabidopsis thaliana* lediglich eine multiple Gen-Familie. STOROZHENKO und Mitarbeiter (2002) konnten mit diesen Informationen γ GT in transgenen Tabakpflanzen exprimieren und mit Hilfe von Antikörpern eine membranständige und extrazelluläre γ GT charakterisieren. Über die Funktion der γ GT in Pflanzen machen die Autoren jedoch zu vage Angaben. Da die Konzentration von GSH im Apoplasten nur sehr gering ist, ist die dortige Degradation von GSH eher auszuschließen. Die Lokalisierung von γ GT im Tonoplasten der Vakuole von *Saccharomyces cerevisiae* würde im Metabolisierungsprozess von Glutathionkonjugaten plausibler erscheinen (PAYNE und PAYNE 1984), kann aber mit den hier vorliegenden Ergebnissen in Gerste nicht bestätigt werden. Somit könnte es sich in dem in dieser Arbeit gezeigten Umsatz um eine im Apoplasten lokalisierte γ GT-Aktivität handeln.

3.4 Schlussfolgerung für den Katabolismus von Glutathionkonjugaten

Durch die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse lassen sich einige bislang ungeklärte Prozesse bezüglich des Katabolismus von Glutathionkonjugaten (GS-X) erklären. Für das in Kap. I 2.1 dargestellte Schema über den Metabolismus von Glutathionkonjugaten (Abb. 3) ergibt sich jetzt ein modifiziertes Bild (Abb. 50):

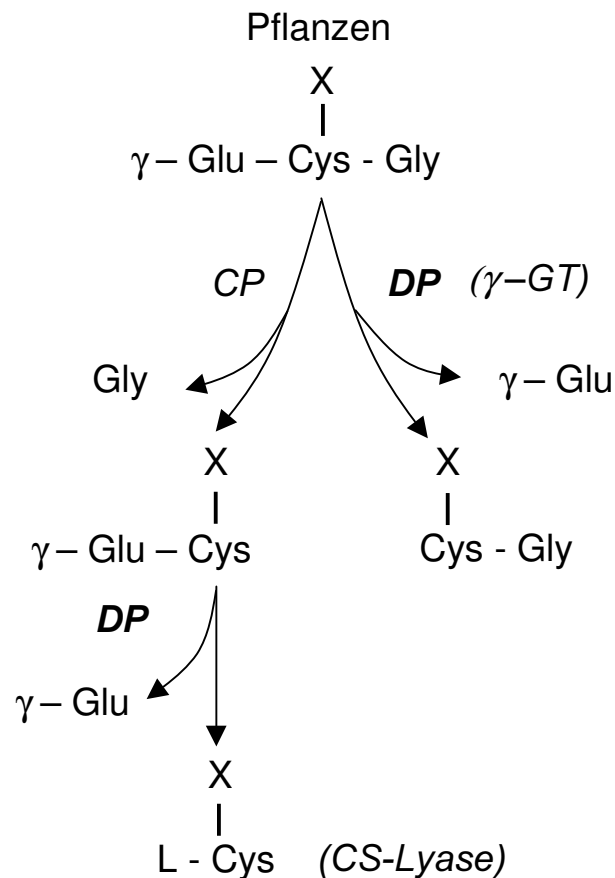


Abb. 50: Modifiziertes Schema zum Metabolismus von Glutathionkonjugaten in Pflanzen.

Glutathionkonjugate werden demnach durch zwei peptidolytische Enzyme katabolisiert. Die bereits bekannte vakuoläre Carboxypeptidase (CP) (WOLF *et al.* 1996) katalysiert unter der Abspaltung von Glycin die Umsetzung des Glutathionkonjugates (GS-X) zu einem γ -Glutamylcysteinylkonjugat (γ GC-X). Diese Enzymaktivität ist offensichtlich stark GSH-abhängig und katalysiert insofern ausschließlich den Abbau von Glutathionkonjugaten. Gleichzeitig wirkt eine vakuoläre Dipeptidase (DP) bzw. evtl. eine apoplastische γ -Glutamyltranspeptidase (γ GT)-Aktivität, die unter Abspaltung eines γ -Glutamyl-Rests die

Bildung eines Cysteinylglycin-Konjugates (CG-X) katalysiert. Dieses Konjugat ist mit den in dieser Arbeit isolierten Enzymaktivitäten nicht weiter abbaubar und würde damit einen vorläufigen katabolischen Endpunkt im Metabolismus von Glutathionkonjugaten darstellen.

Das verbleibende γ GC-X wird schließlich von der DP unter Freisetzung eines γ Glutamyl-Rests zu einem Cysteinyl-Konjugat umgesetzt. Da die Dipeptidase genau wie die aus dem tierischen Glutathionmetabolismus bekannte γ Glutamyltranspeptidase die Abspaltung eines γ Glutamyl-Rests katalysiert, sind beide Enzyme in einem engen funktionellen Zusammenhang zu sehen. Die Formierung des in dieser Arbeit beschriebenen Cysteinylglycin-Konjugates ist ein für die Pflanze neuer, aber aus dem tierischen System bekannter Katabolismus von Glutathionkonjugaten, der die co-evolutionäre Entwicklung beider Detoxifizierungsprozesse verdeutlicht.

Mit der Bildung des Cysteinyl-Konjugats öffnet sich in Tier und Pflanze ein neuer Stoffwechselweg. In der pflanzenphysiologischen Literatur ist die Spaltung des Cysteins im Cytosol beschrieben (MAZELIS 1975) und die nachfolgenden Umwandlungen zu S-Glycosiden, Methylierungen und Sulfoxidationen sind hinreichend belegt (LAMOUREUX *et al.* 1993, GROOT-WASSINK *et al.* 1994). Die so entstandenen Produkte gelten als Endpunkte des pflanzlichen Xenobiotika-Metabolismus. In der Pflanze ist ein weiterer Abbau des Fremdstoffs nicht mehr möglich und wohl auch nicht erforderlich, da die entstandenen Produkte exportiert werden und als gebundene Rückstände oder flüchtige Metaboliten keinen Kontakt mehr zu lebenden Zelle der Pflanze haben.

V Zusammenfassung

Mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen lassen sich wichtige Fragen im glutathionabhängigen Entgiftungsstoffwechsel von Pflanzen beantworten. In mikroskopischen Studien zum interzellulären Transport konnte erstmalig die Mobilität von Glutathionkonjugaten *in vivo* gezeigt werden. Danach werden Glutathionkonjugate in der Wurzel akropetal im Phloem und im Kurzstreckentransport innerhalb des Parenchyms über Plasmodesmata transportiert. Außerdem wurde eine Verlagerung der Konjugate in den Apoplasten beobachtet, wodurch eine Deposition von Glutathionkonjugaten im Boden wahrscheinlich wird. Da eine Wiederaufnahme von Glutathionkonjugaten in die Wurzel aus dem umgebenden Medium nicht gezeigt werden konnte, ist dieser Transport unidirektional. Gelangen Xenobiotika in die Wurzel, werden sie bevorzugt im apikalen Wurzelmeristem konjugiert, das offensichtlich als Ort der Konjugation angesehen werden kann. Nach der Konjugation werden die Konjugate über das Xylem in den Spross der Pflanze transportiert. In Studien zum intrazellulären Transport von Glutathionkonjugaten wurde erstmalig in Gerste die Aktivität eines tonoplastenständigen ABC-Transporters *in vivo* beschrieben. Darüber hinaus wurde der Glutathiongehalt in verschiedenen Kompartimenten der Gerstenwurzel gemessen.

In der Vakuole unterliegen Glutathionkonjugate zunächst einem stufenweisen Abbau bis zum Cysteinikonjugat. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Glutathionkonjugate durch zwei peptidolytische Enzyme katabolisiert werden. Für die an diesem Abbau bereits bekannte vakuoläre Carboxypeptidase, die unter der Abspaltung von Glycin die Umsetzung des Glutathionkonjugates zu einem γ Glutamylcysteinyl-Konjugat katalysiert, konnte eine starke Glutathionabhängigkeit demonstriert werden. Die natürliche Funktion dieses Enzyms liegt offenbar ursprünglich im Abbau von Glutathion. Das entstandene γ Glutamylcysteinyl-Konjugat wird im weiteren von einer bislang unbekannt vakuolären Dipeptidase unter Freisetzung eines γ Glutamyl-Rests zu einem Cysteinyl-Konjugat umgesetzt. Diese erstmalig beschriebene Dipeptidase katalysiert darüber hinaus, ähnlich einer aus dem tierischen System bekannten γ Glutamyltranspeptidase, die Abspaltung des γ Glutamyl-Rests vom Glutathionkonjugat und damit die Bildung eines für Pflanzen bislang unbekannt Cysteinylglycin-Konjugates. Die Anwesenheit einer Dipeptidase in der Vakuole stellt somit eine sinnvolle Ergänzung zur Carboxypeptidase beim Abbau von Glutathionkonjugaten dar und schließt die Lücke in der Degradationskaskade.

VI Summary

The present dissertation seeks to fill some important gaps in the glutathione-dependent detoxification process of plants. Cytological studies were performed to visualize the intercellular transport of glutathione conjugates (GS-X) in vivo. It was observed, that GS-X was translocated from the root base to the root tip via the phloem. The velocity and tissue distribution indicated that cell to cell transport (short distance) might be carried out via plasmodesmata within the root parenchyma. Furthermore a high mobility of GS-X within the root apoplast was observed which pointed to the excretion of GS-X into the soil and its subsequent deposition in the rhizoplane. An uptake of GS-X from the surrounding media into the root could not be shown under the conditions applied, hence the transport seems to be unidirectional. When xenobiotics are absorbed by roots, the conjugation with glutathione (GSH) takes place predominantly in the apical meristem of the root apex. Subsequently the conjugates are transported to the sprout via the xylem. Once having entered the cytosol of living cells, GS-X is transported with an ATP-dependent ABC-transporter into the vacuole crossing the tonoplast. The effectiveness of this GS-X pump and the cellular content of GSH were measured in living barley seedlings for the first time.

In the vacuole glutathione conjugates undergo a stepwise enzymatic degradation to cysteine conjugates. In this work the activity of two responsible enzymes was shown and their activity was localized in the vacuole. In the first step the a previously described carboxypeptidase (CP) forms a γ -glutamylcysteine conjugate by cleaving glycine from the glutathione moiety. For the CP activity a high GSH-affinity suggests its natural function in the catabolism of GSH. The γ -glutamylcysteine conjugate was metabolised in a second step to a corresponding cysteine-conjugate. This reaction is catalysed by a so far unknown vacuolar dipeptidase which cleaves the γ -glutamyl-residue from the dipeptidyl-conjugate. Surprisingly this enzyme is able to accept also a different dipeptide substrate type and is also cleaving the γ -glutamyl bound of the GS-X, by that forming a cysteinylglycine conjugate which is known from the animal metabolism of GS-X only. Thus the presence of the dipeptidase is a reasonable tool in the degradations cascade of glutathione conjugates. In the present dissertation it was possible to demonstrate the long range transport and extrusion of glutathione conjugates in plants. Furthermore, it became clear that glutathione conjugates undergo metabolic changes in the vacuole, leading to a cysteinyl-conjugate as a key metabolite. The corresponding dipeptidase enzyme was described for the first time ever.

VII Literaturverzeichnis

- AGROW 2002: European agchem market in decline. AGROW No. 391:8.
- ARMSTRONG R 1997: Structure, catalytic mechanism and evolution of the glutathione transferases. Chem. Res. Toxicol. 10:2-18.
- BARTHOLOMEW DM, VAN DYK DE, LAU SM, O'KEEFE DP, REA PA, VIITANEN PV 2002: Alternate energy-dependent pathways for the vacuolar uptake of glucose and glutathione conjugates. Plant Physiol. 130(3):1562-1572.
- BLAKE-KLAFF MA, COLEMAN JOD 1996: Detoxification of xenobiotics by plant cells: Characterisation of vacuolar amphiphilic organic anion transporters. Planta 200(6):426-431.
- BRADFORD MM 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
- BREDDAM K 1986: Serine carboxypeptidases. A review. Carlsberg Research Communications 51:83-128.
- BUSH DR 1993: Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44:513-542.
- BUSH DR 1999: Amino acid transport. In: Singh BK(Ed). Plant amino acids. Biochemistry and biotechnology. Dekker Inc. New York: 305-318.
- CASTELLANOS-SERRA L, PAZ-LAGO D 2002: Inhibition of unwanted proteolysis during sample preparation: Evaluation of its efficiency in challenge experiments. Electrophoresis 23:1745-1753.
- CLELAND RE, FUJIWARA T, LUCAS WJ 1994: Plasmodesmal-mediated cell-to-cell transport in wheat roots is modulated by anaerobic stress. Protoplasma 178(1-2):81-85.
- COCKER KM, MOSS SR, COLEMAN JOD 1999: Multiple mechanisms of resistance to fenoxaprop-p-ethyl in United Kingdom and other European populations of herbicide-resistant *Alopecurus myosuroides* (Black-Grass). Pest. Biochem. Physiol. 65(3):169-180.
- COLE DJ 1994: Detoxification and activation of agrochemicals in plants. Pest. Sci. 42:209-222.
- COLE DJ, CUMMINS I, HATTON PJ, DIXON D, EDWARDS R 1997: Glutathione transferases in crops and major weeds. In: Hatzios (Ed). Regulation of enzymatic systems detoxifying xenobiotics in plants. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht: 139-154.
- COLEMAN JOD, BLAKE-KALFF MMA, DAVIES TGE 1997: Detoxification of xenobiotics by plants: Chemical modification and vacuolar compartmentation. Trends Plant Sci. 2(4):144-151.

- COLEMAN JOD, RANDALL R, BLAKEKALFF, MMA 1997: Detoxification of xenobiotics in plant cells by glutathione conjugation and vacuolar compartmentalization: A fluorescent assay using monochlorobimane. *Plant Cell Environ.* 20(4):449-460.
- COUPLAND D 1991: The role of compartmentation of herbicides and their metabolites in resistance mechanisms. In: Caseley, Cussans, Atkin (Eds). *Herbicide resistance in weeds and crops.* Butterworth-Heinemann. Oxford: 263-278.
- DAUBNER D 2001: Evaluierung des Entgiftungspotentials für organische Schadstoffe von *Phragmites* ssp. in Pflanzenkläranlagen Europas. Diplomarbeit. FH Wiesbaden.
- DAVIN LB, LEWIS NG 1992: Phenylpropanoid metabolism: Biosynthesis of monolignols, lignans and neolignans, lignins and suberins. In: Stafford, Ibrahim (Eds). *Phenolic metabolism in plants.* Plenum. New York: 325-375.
- DENG F, HATZIOS KK 2002: Characterization and safener induction of multiple glutathione S-transferases in three genetic lines of rice. *Pest. Biochem. Physiol.* 72(1):24-39.
- DENISON MS, WHITLOCK JP 1995: Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *J. Biol. Chem.* 270:18175-18178.
- DeRIDDER BP, DIXON DP, BEUSMANN DJ, EDWARDS R, GOLDSBROUGH RB 2002: Induction of glutathione S-transferases in *Arabidopsis* by herbicide safeners. *Plant Physiol.* 130:1497-1505.
- DIESPERGER H, SANDERMANN H 1979: Soluble and microsomal glutathione S-transferase activities in pea seedlings (*Pisum sativum* L.). *Planta* 146:643-648.
- DIXON DP, CUMMINS I, COLE DJ, EDWARDS R 1998: Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1:258-266.
- DONALDSON RP, LUSTER DG 1991: Multiple forms of plant cytochromes P450. *Plant Physiol.* 96:669-674.
- DURST F, BENVENISTE I, LESOT A, SALAÜN JP, WERCK-REICHART D 1997: Induction of plant cytochrome P450. In: Hatzios (Ed). *Regulation of enzymatic systems detoxifying xenobiotics in plants.* Kluwer Academic Publisher. Dordrecht: 19-34.
- EDWARDS R, COLE DJ 1996: Glutathione transferases in wheat (*Triticum*) species with activity toward fenoxaprop-ethyl and other herbicides. *Pest. Biochem. Physiol.* 54(2):96-104.
- EDWARDS R, DIXON DP, WALBOT V 2000: Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* 5(5):193-198.
- FOYER CH 1997: Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis. In: Scandalios JG: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defences.* Cold Spring Harbor Laboratory Press: 587-621.
- FRICKER MD, MEYER AJ 2001: Confocal imaging of metabolism *in vivo*: Pitfalls and possibilities. *J. Exp. Bot.* 52:631-640.

- GAILLARD C, DUFAUD A, TOMMASINI R, KREUZ K, AMRHEIN N, MARTINIOIA E 1994: A herbicide antidote (safener) induces the activity of both the herbicide detoxifying enzyme and of a vacuolar transporter for the detoxified herbicide. *FEBS Lett.* 352:219-221.
- GÖTZBERGER C 1994: Vergleichende Untersuchungen zum Isoenzymmuster der Glutathion S-Transferase in verschiedenen Nadelbäumen. Diplomarbeit, Universität Ulm.
- GROOT-WASSINK JWD, REED DW, KOLENOVSKY AD 1994: Immunopurification and immunocharacterization of the glucosinolate biosynthetic enzyme thiohydroximate S-glucosyltransferase. *Plant Physiol.* 105:425-433.
- HABIG WH, PABST J, JAKOBY WB 1974: Glutathione-S-transferases: The first step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249:7130-7139.
- HAWES MC, GUNAWARDENA U, MIYASAKA S, ZHAO X 2000: The role of border cells in plant defence. *Trends Plant Sci.* 5:128-133.
- HERSCHBACH C 1992: Untersuchungen zur Bedeutung von Glutathion (GSH) für die 'inter-organ' Regulation der Sulfatversorgung an Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L.var.'Samsun'). Dissertation. FhG, IFU-Schriftenreihe, Bd. 13.
- HERSCHBACH C, RENNENBERG H 1991: Influence of glutathione (GSH) on sulfate influx, xylem loading and exudation in excised tobacco roots. *J. Exp. Bot.* 42:1021-1029.
- HIDAYAT I, PRESTON C 1997: Enhanced metabolism of fluazifop acid in a biotype of *Digitaria sanguinalis* resistant to the herbicide fluazifop-p-butyl. *Pest. Biochem Physiol.* 57(2):137-146.
- ISHIKAWA T 1992: The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem. Sci.* 17(11):463-468.
- ISHIKAWA T, SIES H 1984: Cardiac transport of glutathione disulfide and S-conjugate. Studies with isolated perfused rat heart during hydroperoxide metabolism. *J. Biol. Chem.* 259(6):3838-3843.
- ISHIKAWA T, ZE-SHENG LI, YU-PING LU, REA PA 1997: The GS-X pump in plant, yeast, and animal cells: Structure, function, and gene expression. *Bioscience Reports* 17:189-207.
- IUCHI S, KOBAYASHI M, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K 2000: A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase is involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. *Plant Physiol.* 123(2):553-562.
- JAENICKE L 1984: Einführung in die Praxis des Biochemikers, Universität Köln.
- JAMAI A, TOMMASINI R, MARTINOIA E, DELROT S 1996: Characterization of glutathione uptake in broad bean leaf protoplasts. *Plant Physiol.* 111(4):1145-1152.

- KLEIN M, MARTINOIA E, WEISSENBOCK G 1998: Directly energized uptake of beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) in plant vacuoles is strongly stimulated by glutathione conjugates. *J. Biol.Chem.* 273(1):262-270.
- KLINEDINST S, PASCUZZI P, REDMAN J, DESAI M, ARIAS J 2000: A xenobiotic-stress-activated transcription factor and its cognate target genes are preferentially expressed in root tip meristems. *Plant Mol. Biol.* 42(5):679-688.
- KOGA H, ZEYEN RJ, BUSHNELL WR, AHLSTRAND GG 1988: Hypersensitive cell death, autofluorescence, and insoluble silicon accumulation in barley leaf epidermal cells under attack by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Physiol. Mol. Plant Path.* 32:395-409.
- KREUZ K, TOMMASINI R, MARTINOIA E 1996: Old enzymes for a new job. *Plant Physiol.* 111:349-353.
- KUK YI, WU J, DERR JF, HATZIOS KK 1999: Mechanism of fenoxaprop resistance in an accession of smooth crabgrass (*Digitaria ischaemum*) *Pest. Biochem. Physiol.* 64(2):112-123.
- LAMOUREUX G, RUSNESS D 1980: In vitro metabolism of pentachloronitrobenzene to pentachloromethylthiobenzene by onion: Characterization of glutathione S-transferase, cysteine C-S lyase, and S-adenosylmethionine methyl transferase activities. *Pest. Biochem. Physiol.* 14:50-61.
- LAMOUREUX G, RUSNESS D 1983: Malonylcysteine conjugates as end-products of glutathione conjugate metabolism in plants. In: J Miyamoto (Ed). *human welfare and the environment. IUPAC Pesticide Chemistry.* Pergamon Press. Oxford: 295-300.
- LAMOUREUX GL, RUSNESS DG 1986: Tridiphane [2-(3,5-dichlorophenyl)-2-(2,2,2-trichloroethyl) oxirane], an atrazine synergist: Enzymatic conversion to a potent glutathione S-transferase inhibitor. *Pest. Biochem. Physiol.* 26:323-342.
- LAMOUREUX GL, RUSNESS DG 1989: The role of glutathione and glutathione S-transferase in pesticide metabolism, selectivity and mode of action in plants and insects. In: *Glutathione: Chemical, biochemical and medical aspects, series: Enzyme and Cofactors.* John Wiley and Sons, New York: 153-196.
- LAMOUREUX GL, RUSNESS DG, SCHRÖDER P 1993: Metabolism of a diphenylether herbicide to a volatile thioanisole and a polar sulfonic acid metabolite in spruce (*Picea*). *Pest. Biochem. Physiol.* 47:8-20.
- LAMOUREUX GL, SHIMABUKURO RH, FREAR DS 1991: Glutathione and Glucoside Conjugation in Herbicide Selectivity. In: Caseley, Cussans, Atkin (Eds). *Herbicide resistance in weeds and crops.* Butterworth-Heinemann. Oxford: 227-261.
- LANGEBARTELS C, HARMS H 1985: Analysis for non extractable bound residues of pentachlorophenole in plant cells using a cell wall fractionation procedure. *Ecotox. Environ. Safety* 10:268-279.
- LEWIS WHP, HARRIS H 1967: Human red cell peptidases. *Nature* 215:351-355.

- LI ZS, ALFENITO M, REA PA, WALBOT V, DIXON RA 1997: Vacuolar uptake of the phytoalexin medicarpin by the glutathione conjugate pump. *Phytochem.* 45(4):689-693.
- LI ZS, ZHEN RG, REA PA 1995a: 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene-elicited increase in vacuolar glutathione S-conjugate transport activity. *Plant Physiol.* 109(1):177-185.
- LI ZS, ZHAO Y, REA PA 1995b: Magnesium adenosine 5[prime]-triphosphate-energized transport of glutathione-S-conjugates by plant vacuolar membrane vesicles. *Plant Physiol.* 107(4):1257-1268.
- LINEWEAVER H, BURK D 1934: The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* 56:658-666.
- LINTON KJ, HIGGINS CF 1998: The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol. Microbiol.* 28(1):5-13.
- LOYALL L, UCHIDA K, BRAUN S, FURUYA M, FROHNMEYER H 2000: Glutathione and a UV-light induced glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures. *Plant Cell* 12:1939-1950.
- LU YP, LI ZS, DROZDOWICZ YM, HORTENSTEINER S, MARTINOIA E, REA PA 1998: *AtMRP2*, an *Arabidopsis* ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: Functional comparisons with *AtMRP1*. *Plant Cell* 10:267-282.
- LUCAS W 1999: Plasmodesmata and the cell-to-cell transport of proteins and nucleoprotein complexes. *J. Exp. Bot.* 50:979-987.
- MARRS KA 1996: The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 47:127-158.
- MARRS KA, ALFENITO MR, LLOYD AM, WALBOT V 1995: A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze2*. *Nature.* 375(6530):397-400.
- MARRS KA, WALBOT V 1997: Expression and RNA splicing of the maize glutathione S-transferase *Bronze2* gene is regulated by cadmium and other stresses. *Plant Physiol.* 113(1):93-102.
- MARTIN MN, SLOVIN JP 2000: Purified γ -glutamyl transpeptidases from tomato exhibit high affinity for glutathione and glutathione S-conjugates. *Plant Physiol.* 122(4):1417-1426.
- MARTINOIA E, GRILL E, TOMMASINI R, KREUZ K, AMRHEIN N 1993: ATP-dependent glutathione S-conjugate "export" pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364:247-249.

- MARTINOIA E, KLEIN M, GEISLER M, BOVET L, FORESTIER C, KOLUKISA OGLU Ü, MÜLLER-RÖBER B, SCHULZ B 2002: Multifunctionality of plant ABC transporters—more than just detoxifiers. *Planta* 214(3):345-355.
- MAUCH F, DUDLER R 1993: Differential induction of distinct glutathione-S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol.* 102:1193-1201.
- MAZELIS M, CREVELING RK 1975: Purification and properties of S-alkyl-L-cysteine lyase from seedlings of *Acacia farnesiana* Willd. *Biochem. J.* 147(3):485-491.
- McGONIGLE B, KEELER SJ, LAU SMC, KOEPPE MK, O'KEEFE DP 2000: A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. *Plant Physiol.* 124:1105-1120.
- MEHTA RA, WARMBARDT RD, MATTOO AK 1996: Tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. pik-red) leaf carboxypeptidase: Identification, N-terminal sequence, stress-regulation, and specific localization in the paraveinal mesophyll vacuoles. *Plant Cell Physiol.* 37(6):806-815.
- MEISTER A 1988: Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 263:17205-17208.
- MEISTER A, TATE S 1976: Glutathione and related γ -glutamyl compounds: Biosynthesis and utilization. *Annu. Rev. Biochem.* 45:559-604.
- MENGEL K 1991: Ernährung und Stoffwechsel der Pflanze. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- MEYER AJ, FRICKER MD 2002: Control of demand-driven biosynthesis of glutathione in green *Arabidopsis* suspension culture cells. *Plant Physiol.* 130(4):1927-1937.
- MEYER AJ, MAY MJ, FRICKER M 2001: Quantitative *in vivo* measurement of glutathione in *Arabidopsis* cells. *Plant J.* 27:67-78.
- MIKOLA L 1986: Acid carboxypeptidases in grains and leaves of wheat, *Triticum aestivum* L. *Plant Physiol.* 81:823-829.
- MORGENSTERN R, DEPIERRE JW, JÖRNVALL H 1985: Microsomal glutathione transferase. *J. Biol. Chem.* 260:13976-13983.
- MOURA DS, BERGEY DR, RYAN CA 2001: Characterization and localization of a wound-inducible type I serine-carboxypeptidase from leaves of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Planta* 212(2):222-230.
- MOZER T, TIEMEIER D, JAWORSKI E 1983: Purification and characterization of corn glutathione S-transferase. *Biochem.* 22:1068-1072.
- MÜLLER F 1986: Phytopharmakologie. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.

- MÜLLER M, MEIJER C, ZAMAN GJR, BORST P, SCHEPER RJ, MULDER NH, DE VRIES EGE, JANSEN PLM 1994: Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. PNAS 91:13033-13037.
- NEBENFUHR A 2002: Vesicle traffic in the endomembrane system: A tale of COPs, RABs and SNAREs. Curr. Opin. Plant. Biol. 5(6):507-512.
- NEUEFEIND T, HUBER R, REINEMER P, KNABLEIN J, PRADE L, MANN K, BIESELER B 1997: Cloning, sequencing, crystallization and X-ray structure of glutathione S-transferase-III from *Zea mays* var. mutin: A leading enzyme in detoxification of maize herbicides. J. Mol. Biol. 274(4):577-587.
- NOCK LP, MAZELIS M 1986: The C-S lyases of higher plants: Preparation and properties of homogeneous alliin lyase from garlic (*Allium sativum*). Arch. Biochem. Biophys. 249(1):27-33.
- NOCTOR G, FOYER CH 1998: Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. Annu. Rev. Plant Biol. 49(1):249-279.
- NULTSCH W 1991: Allgemeine Botanik. Thieme Verlag, Stuttgart.
- PADDOCK SW 1999: Confocal microscopy methods and protocols. 1st edition. Humana Press.
- PAYNE GM, PAYNE JW 1984: γ -Glutamyltransferase is not involved in the bulk uptake of amino acids, peptides or gamma-glutamyl-amino acids in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Biochem. J. 218(1):147-155.
- PLA M, HUGUET G, VERDAGUER D, PUIGDERRAJOLS P, LLOMPART B, NADAL A, MOLINAS M 1998: Stress proteins co-expressed in suberized and lignified cells and in apical meristems. Plant Science 139(1):49-57.
- REA PA 1999: MRP subfamily ABC transporters from plants and yeast. J. Exp. Bot. 50:895-913.
- RENTSCH D, MARTINOIA E 1991: Citrate transport into barley mesophyll vacuoles-comparison with malate-uptake activity. Planta 184:532-537.
- RIECHERS DE, IRZYK GP, JONES SS, FUERST EP 1997: Partial characterization of glutathione S-transferases from wheat (*Triticum spp.*) and purification of a safener-induced glutathione S-transferase from *Triticum tauschii*. Plant Physiol. 114(4):1461-1470.
- ROBINSON DG, HINZ G, HOLSTEIN SE 1998: The molecular characterization of transport vesicles. Plant Mol. Biol. 38(1-2):49-76.
- ROSSINI L, JEPSON I, GREENLAND AJ, GORLA MS 1996: Characterization of glutathione S-transferase isoforms in three maize inbred lines exhibiting differential sensitivity to alachlor. Plant Physiol. 112:1595-1600.

- ROXAS VP, SMITH RK, ALLEN ER, ALLEN RD 1997: Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Natur Biotech.* 15(10):988-991.
- RROÇO E, KOSEGARTEN H, MENGEL K 2002: Importance of plasmalemma H⁺-ATPase activity for N losses from intact roots of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Eur. J. Agronomy* 16(3):187-196.
- SANCHEZ-FERNANDEZ R, DAVIES TG, COLEMAN JO, REA PA 2001: The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *J. Biol. Chem.* 276(32):30231-30244.
- SANDERMANN H 1994: Higher plant metabolism of xenobiotics: The 'green liver' concept. *Pharmacokinetics* 4:225-241.
- SANDERMANN H, HAAS M, MESSNER B, PFLUGMACHER S, SCHRÖDER P, WETZEL A 1997: The role of glucosyl and malonyl conjugation in herbicide selectivity. In: Hatzios (Ed). *Regulation of enzymatic systems detoxifying xenobiotics in plants.* Kluwer Academic Publisher, Dordrecht: 211-231.
- SANDERMANN H, SCHMITT R, ECKEY H, BAUKNECHT T 1991: Plant biochemistry of xenobiotic: Properties of soybean O- and N-glucosyl and O- and N-malonyltransferases for chlorinated phenols and anilines. *Arch. Biochem. Biophys.* 287(2):341-350.
- SCHRÖDER P 1997: Fate of glutathione S-conjugates in plants. In: Hatzios (Ed). *KK: Regulation of enzymatic systems detoxifying xenobiotics in plants.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 233-244.
- SCHRÖDER P 2001: The role of glutathione and glutathione S-transferases in plant reaction and adaptation to xenobiotics. Significance of glutathione to plant adaptation to the environment. Grill D. Netherlands, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 155-183.
- SCHRÖDER P, BELFORD EJD 1996: Untersuchungen zur Aktivität von Glutathion-S-Transferasen in Nadeln von Fichten am Schulterberg-Nordostprofil und am Christlumprofil. In *Ökosystemare Studien im Kalkapin.* FBVA-Berichte 94:75-82.
- SCHRÖDER P, COLLINS C 2002: Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolism of organic xenobiotics in plants. *Int. J. Phytoremediation* 4(4):247-265.
- SCHRÖDER P, PFLUGMACHER 1996: Induction of glutathione S-transferase activity in norway spruce by xenobiotics and herbicide safeners. *Angew. Bot.* 70:97-100.
- SCHRÖDER P, SCHEER C, BELFORD EJD 2001: Metabolism of organic xenobiotics in plants: Conjugating enzymes and metabolic endpoints. *Minerva Biotec.* 13(2):85-91.
- SCHRÖDER P, STAMPFL A 1999: Visualization of glutathione conjugation and induction of glutathione S-transferases in onion (*Allium cepa* L.) epidermal tissue. *Z. Naturforsch.* 54C:1033-1041.
- SHARMA YK, DAVIS KR 1994: Ozone-induced expression of stress-related genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 105(4):1089-1096.

- SHIMABUKURO RH 1976: Glutathione conjugation of herbicides in plants and animals and its role in herbicidal selectivity. Asian-Pacific Weed Science Society: 183-186.
- STATON AL, MAZELIS M 1991: The C-S lyases of higher plants: homogeneous beta-cystathionase of spinach leaves. Arch. Biochem. Biophys. 290(1):46-50.
- STEINKAMP R, RENNENBERG H 1985: Degradation of glutathione in plant cells: evidence against the participation of a γ -glutamyltranspeptidase. Z. Naturforsch. 40c:29-33.
- STOROZHENKO S, BELLES-BOIX E, BABIYCHUK E, HEROUART D, DAVEY MW, SLOOTEN L, VAN MONTAGU M, INZE D, KUSHNIR S 2002: γ -glutamyl transpeptidase in transgenic tobacco plants. Cellular localization, processing, and biochemical properties. Plant Physiol. 128(3):1109-1119.
- STUHLFELDER C, LOTTSPREICH F, MUELLER MJ 2002: Purification and partial amino acid sequences of an esterase from tomato. Phytochem. 60(3):233-240.
- SWANSON SJ, BETHKE PC, JONES RL 1998: Barley aleurone cells contain two types of vacuoles: Characterization of lytic organelles by use of fluorescent probes. Plant Cell 10:685-698.
- SZE H, WARD JM, LAI S 1992: Vacuolar H⁽⁺⁾-translocating ATPases from plants: structure, function, and isoforms. J. Bioenerg. Biomembr. 24(4):371-381.
- TAIZ L, ZEIGER E 1998: Plant Physiology, 2. Ausgabe. Sinauer Associates. Sunderland, USA.
- THEODOULOU FL, CLARK IM, HE XL, PALLETT KE, COLE DJ, HALLAHAN DL 2003: Co-induction of glutathione S-transferases and multidrug resistance associated protein by xenobiotics in wheat. Pest. Manag. Sci. 59(2):202-214.
- TOMMASINI R, VOGT E, FROMENTEAU M, HORTENSTEINER S, MATILE P, AMRHEIN N, MARTINOIA E 1998: An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. Plant J. 13:773-780.
- WINK M 1997: Compartmentation of secondary metabolites and xenobiotics in plant vacuoles. In: Leigh, Sanders, Callow (Eds). The plant vacuole. Academic Press, San Diego, London: 141-169.
- WINTER H, ROBINSON DG, HELDT HW 1993: Subcellular volumes and metabolite concentrations in barley leaves. Planta 191:180-190.
- WOLF AE 1996: Untersuchungen zur Bildung, zum Transport und zum Metabolismus von Glutathion S-Konjugaten in *Hordeum vulgare* L. Dissertation, Universität Regensburg.
- WOLF AE, DIETZ KJ, SCHRÖDER P 1996: A carboxypeptidase degrades glutathione conjugates in the vacuoles of higher plants. FEBS Lett. 384:31-34.
- WOLF DH, WEISER U 1977: Studies on a carboxypeptidase Y mutant of yeast and evidence for a second carboxypeptidase activity. Eur. J. Biochem. 73:553-556.

WYNN C 1978: Struktur und Funktion von Enzymen. Studienbücher der Biologie. B.G. Teubner-Verlag. Stuttgart.

YOUNG TE, LING J, GEISLER-LEE CJ, TANGUAY RL, CALDWELL C, GALLIE DR 2001: Developmental and thermal regulation of the maize heat shock protein, *HSP101*. *Plant Physiol.* 127(3):777-791.

ZENK H 1996: Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene* 179:21-30.

ZUBER H, MATILE P 1968: Acid carboxypeptidases: Their occurrence in plants, intracellular distribution and possible function. *Z. Naturforsch.* 23(5):663-665.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Peter Schröder unter dessen Anleitung diese Arbeit entstanden ist, und der durch seine wertvollen Anregungen und Diskussionen zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jean Charles Munch für die Überlassung des Arbeitsplatzes am Institut für Bodenökologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg.

Herrn Andreas Stampfl, Institut für Toxikologie der GSF, danke ich für die freundliche und effektive Zusammenarbeit beim Mikroskopieren, das große Interesse an dieser Arbeit und die immer offene Tür.

Ein wichtiger Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen der EU-COST-Action 837 am Institute of Plant Science der Universität Oxford durchgeführt. Mein Dank gilt daher Dr. Mark Fricker und Dr. Julian Coleman für ihre stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Markus Klein, Institut für Pflanzenbiologie der Universität Zürich, für die Einführung in das Isolieren von Vakuolen.

Special thanks to my colleague and friend Msc. Ebenezer Belford for sharing office and lunch and for his moral support during the last three years.

Fr. Dr. Ursula Olazabal, Andreas Nuber, Silvia Andres und Sandra Russolt danke ich für die freundliche Unterstützung im Labor.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen der 'AG Schröder' für die familiäre Arbeitsatmosphäre. Namentlich erwähnen möchte ich: Dr. Beate Huber, Stefan Peis, Diana Daubner, Juliane Neustifter, Frauke Diekmann und Andrea Ziegltrum.

Nicht zuletzt bin ich meiner lieben Inka für ihre Geduld in den letzten Wochen dankbar.