

# Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung

Analyse Schwermetall-induzierter Stoffwechselwege in *Hordeum vulgare* L.

Florian Matthias Battke

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

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.sc.techn. (ETH Zürich) Urs Schmidhalter

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.rer.nat., Dr.rer.nat.habil. Gerhard Wenzel  
2. Univ.-Prof. Dr.sc.agr., Dr.rer.nat.habil. Jean Charles Munch

Die Dissertation wurde am 17. März 2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 23. Juni 2005 angenommen.



---

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| <b>1.</b>   | <b>Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| <u>1.1.</u> | <u>Schwermetalle in Ökosystemen</u>  | 2         |
| 1.1.1.      | Definition und Klassifizierung von Schwermetallen  | 2         |
| 1.1.2.      | Physiologische Bedeutung von Schwermetallen für Pflanzen                                     | 3         |
| 1.1.3.      | Ursachen der Schwermetall-Toxizität  | 4         |
| 1.1.4.      | Quellen und Standorte von Schwermetallakkumulationen   | 6         |
| 1.1.5.      | Bioverfügbarkeit von Schwermetallen  | 7         |
| <u>1.2.</u> | <u>Charakteristik ausgewählter Schwermetalle</u>   | 8         |
| 1.2.1.      | Quecksilber  | 8         |
| 1.2.2.      | Cadmium  | 12        |
| 1.2.3.      | Platin   | 14        |
| <u>1.3.</u> | <u>Stress bei Pflanzen und pflanzliche Resistenzmechanismen gegen Schwermetallexposition</u> | 17        |
| <u>1.4.</u> | <u>Quecksilber-Resistenz bei Bakterien</u>   | 19        |
| <u>1.5.</u> | <u>Quecksilberausgasung aus Pflanzenbeständen</u>  | 20        |
| <b>2.</b>   | <b>Material und Methoden</b>   | <b>21</b> |
| <u>2.1.</u> | <u>Pflanzenmaterial</u>  | 21        |
| <u>2.2.</u> | <u>Axenisierung der Karyopsen</u>  | 21        |
| <u>2.3.</u> | <u>Anzuchtmedium</u>   | 22        |
| 2.3.1.      | Schwermetallzusätze zum Anzuchtmedium  | 22        |

---

|              |  |    |
|--------------|--|----|
| <u>2.4.</u>  | <u>In-vitro-Kultur der Karyopsen</u>                                       | 23 |
| 2.4.1.       | Anzucht auf Agar   | 23 |
| 2.4.2.       | Azucht in Schwimmschicht-Hydrokultur                                       | 23 |
| <u>2.5.</u>  | <u>Anzuchtbedingungen</u>  | 26 |
| <u>2.6.</u>  | <u>Ermittlung der phytotoxischen Grenzkonzentration von Schwermetallen</u> | 27 |
| 2.6.1.       | Quecksilber und Cadmium  | 27 |
| 2.6.2.       | Bestimmung der Polyamingehalte in Gerste durch HPLC                        | 28 |
| 2.6.3.       | Platin   | 29 |
| <u>2.7.</u>  | <u>Anzucht von Pflanzenmaterial für molekularbiologische Versuche</u>      | 30 |
| <u>2.8.</u>  | <u>Anzucht von Pflanzen zur Proteomanalyse</u>                             | 31 |
| <u>2.9.</u>  | <u>Kulturversuche auf Bodenproben und auf Kultursubstrat</u>               | 31 |
| <u>2.10.</u> | <u>Bestimmung der Schwermetallgehalte in Pflanzen- und Bodenproben</u>     | 32 |
| <u>2.11.</u> | <u>Isolierung von RNA</u>  | 32 |
| <u>2.12.</u> | <u>Isolierung von mRNA</u>   | 33 |
| <u>2.13.</u> | <u>Subtraktive Suppressions-Hybridisierung</u>                             | 33 |
| 2.13.1.      | Herstellung der Driver- und Tester-cDNA                                    | 35 |
| 2.13.2.      | Hybridisierung   | 35 |
| 2.13.3.      | Suppressions-PCR   | 36 |
| <u>2.14.</u> | <u>Identifizierung differentiell exprimierter Gene</u>                     | 38 |
| 2.14.1.      | Transformation mit pGEM <sup>®</sup> -T-Vektor                             | 38 |
| 2.14.2.      | Isolierung einzelner Klone   | 39 |
| 2.14.3.      | Herstellung der Array-Membranen  | 40 |

---

|              |  |    |
|--------------|--|----|
| 2.14.4.      | Prähybridisierung der Array-Membranen                                | 42 |
| 2.14.5.      | Herstellung $^{33}\text{P}$ -markierter DNA-Sonden                   | 43 |
| 2.14.6.      | Hybridisierung der Array-Membranen                                   | 44 |
| 2.14.7.      | Autoradiographische Auswertung der Hybridisierung                    | 45 |
| 2.14.8.      | Identifizierung potentiell differentiell exprimierter Klone          | 45 |
| 2.14.9.      | Sequenzierung  | 46 |
| 2.14.10.     | Identifikation selektierter Klone                                    | 46 |
| 2.14.11.     | Beschreibung identifizierter Klone                                   | 46 |
| <u>2.15.</u> | <u>Mikroarray-Analysen</u>   | 47 |
| 2.15.1.      | Erstellung eines Mikroarrays mit PCR-Produkten                       | 47 |
| 2.15.2.      | Mikroarray-Hybridisierung  | 49 |
| 2.15.3.      | Auswertung der Mikroarray-Analysen                                   | 52 |
| <u>2.16.</u> | <u>Überprüfung der Array-Ergebnisse</u>                              | 52 |
| 2.16.1.      | cDNA-Synthese  | 52 |
| 2.16.2.      | cDNA-Quantifizierung   | 53 |
| 2.16.3.      | Primer-Design für PCR  | 53 |
| 2.16.4.      | Überprüfung der PCR-Primer   | 54 |
| 2.16.5.      | Real-Time-PCR  | 55 |
| <u>2.17.</u> | <u>Bestimmung der Phytoreduktion von <math>\text{Hg}^{2+}</math></u> | 56 |
| 2.17.1.      | Pflanzenanzucht für Ausgasungsversuche                               | 56 |
| 2.17.2.      | Messung von $\text{Hg}^0$ -Dampf im Gasstrom                         | 57 |
| 2.17.3.      | Ausgasungsversuche aus Gerstenpflanzen im gasdichten Kultursystem    | 58 |
| 2.17.4.      | Ausgasungsversuche mit Homogenaten und Reinsubstanzen                | 61 |
| <u>2.18.</u> | <u>Proteomanalyse</u>  | 62 |

---

|             |   |            |
|-------------|---|------------|
| <b>3.</b>   | <b>Ergebnisse</b>   | <b>63</b>  |
| <u>3.1.</u> | <u>Versuchsergebnisse mit der Gerstensorte Barke</u>                                      | 63         |
| 3.1.1.      | Quecksilberexposition   | 63         |
| 3.1.2.      | Cadmiumexposition   | 72         |
| 3.1.3.      | Platinexposition  | 78         |
| 3.1.4.      | Proteomanalyse  | 83         |
| 3.1.5.      | Vergleichender Überblick über die Ergebnisse  | 85         |
| 3.1.6.      | Phytoreduktion von Hg <sup>2+</sup>   | 87         |
| <u>3.2.</u> | <u>Versuchsergebnisse mit der Gerstensorte Scarlett</u>                                   | 91         |
| <u>3.3.</u> | <u>Versuchsergebnisse der Kulturversuche auf erdigen Substraten</u>                       | 95         |
| 3.3.1.      | Ergebnisse der Kultur auf schwermetallkontaminierter Bodenprobe                           | 95         |
| 3.3.2.      | Ergebnisse der Kultur auf quecksilberkontaminiertem Kultursubstrat                        | 98         |
| <u>3.4.</u> | <u>Versuchsergebnisse der RT-PCR Überprüfung</u>  | 103        |
| <b>4.</b>   | <b>Diskussion</b>   | <b>107</b> |
| <u>4.1</u>  | <u>Analyse der Schwermetall-induzierten Stoffwechselwege in der Gerstensorte Barke</u>    | 107        |
| 4.1.1.      | Quecksilberexposition   | 107        |
| 4.1.2.      | Cadmiumexposition   | 110        |
| 4.1.3.      | Platinexposition  | 113        |
| 4.1.4.      | Vergleichender Überblick der Genexpressionsanalysen                                       | 122        |
| 4.1.5.      | Phytoreduktion von Hg <sup>2+</sup>   | 126        |
| <u>4.2.</u> | <u>Analyse der Schwermetall-induzierten Stoffwechselwege in der Gerstensorte Scarlett</u> | 130        |

---

|      |  |            |
|------|--|------------|
| 4.3. | <u>Genexpressionsanalyse in der Gerstensorte Barke bei Wachstum auf erdigen Substraten mit Schwermetallkontamination</u> | 134        |
| 5.   | <b>Zusammenfassung</b>   | <b>138</b> |
| 6.   | <b>Literaturverzeichnis</b>  | <b>140</b> |
| 7.   | <b>Anhang</b>  |            |

---

|         |  |
|---------|--|
| AA      | Ascorbinsäure                                  |
| DC      | Decarboxylase                                  |
| DEPC    | Diethylpyrocarbonat                            |
| DH      | Dehydrogenase                                  |
| DHAA    | Dehydroascorbinsäure                           |
| DMSO    | Dimethylsulfoxid                               |
| DTT     | 1,4-Dithio-DL-threitol                         |
| FG      | Frischgewicht                                  |
| GSH     | Glutathion (reduziert)                         |
| GSSG    | Glutathion (oxidiert)                          |
| GST     | Glutathion-S-Transferase                       |
| IDI     | Eisenmangel induziertes Protein                |
| IPG     | Immobilisierter pH-Gradient                    |
| LB      | Luria-Bertani Medium                           |
| LHC     | Lichtsammel-Komplex                            |
| NCBI    | National Center for Biotechnology Information  |
| PAR     | Photosynthetisch aktive Strahlung              |
| PBS     | Phosphate Buffered Saline                      |
| PS      | Photosystem                                    |
| qRT-PCR | Quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion |
| SD      | Standardabweichung                             |
| SDS     | Natriumdodecylsulfat                           |
| SSH     | Subtraktive Suppressions-Hybridisierung        |
| TCA     | Trichloressigsäure                             |
| TS      | Trockensubstanz                                |



## 1. Einleitung

Abiotischer Stress kann das Wachstum und die Leistungsfähigkeit von Pflanzen erheblich beeinflussen. Wasserstress, extreme Temperaturen oder hohe Salzgehalte können dabei als Stressoren in Betracht kommen. Aber auch Schwermetallkontaminationen können starke Effekte bei Pflanzen auslösen.

Die Untersuchung von Effekten in Pflanzen, die von den unterschiedlichen Stressbedingungen ausgelöst werden, wird seit langer Zeit intensiv betrieben. In letzter Zeit kommt dabei den molekularbiologischen Methoden immer größere Bedeutung zu, nachdem auch biochemische Parameter und Reaktionswege einen wichtigen Beitrag zur Klärung stressassoziierter Phänomene liefern.

Schwermetalle sind ubiquitär in Ökosystemen zu finden. Zum einen sind Schwermetalle in pedogenen Mineralien enthalten, zum anderen führt die industrielle Produktion, die Landwirtschaft, die klinische Therapeutik, der Betrieb von Kraftfahrzeugen und der Verbrauch fossiler Energieträger zu anthropogen bedingten Schwermetall-Immissionen. Daraus resultieren lokal bisweilen stark erhöhte Schwermetallgehalte, die massiven Einfluß zum Beispiel auf die dort rezente Vegetation haben (Woolhouse, 1983). Auf landwirtschaftlich genutzten Böden als Basis einer ökonomisch und ökologisch verantwortbaren Nahrungsmittelproduktion kommt dem Gehalt und der Verteilung solcher Schwermetalle eine besonders große Bedeutung zu, aber auch in empfindlichen Ökosystemen sind durch Schwermetalle induzierte Effekte eine wichtige Einflußgröße.

Da einige Schwermetalle bereits in sehr geringen Konzentrationen toxisch auf Organismen wirken, ist es wichtig, die biologischen Auswirkungen einer solchen Schwermetallexposition zu untersuchen. Heidenreich et al. (2001) konnte zeigen, dass bei einer Langzeitexposition von  $\text{Hg}^{2+}$  in *Arabidopsis thaliana* Gene differentiell exprimiert werden. Die Identifizierung solcher differentiell exprimierter Gene nach einer Schwermetallbelastung ermöglicht dann den Einblick in Kaskaden der Stressverarbeitung, die auch von anderen Stressfaktoren beeinflusst und ausgelöst werden können. Da molekulare Langzeitwirkungen einer Schwermetallexposition auf landwirtschaftliche Nutzpflanzen bisher nicht beschrieben wurden, sollen die am Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* beschriebenen Effekte

vergleichend an der landbaulich wichtigen Kulturpflanze *Hordeum vulgare* untersucht werden, wobei neben Quecksilber auch die toxisch wirkenden Metalle Cadmium und Platin einbezogen werden. Parallel dazu sollen auch physiologische und biochemische Vorgänge, die in Zusammenhang mit der Schwermetallexposition und Schwermetalldetoxifikation stehen, untersucht werden, um weitere Hinweise auf das Reaktionsmuster der Pflanzen unter diesen Stressbedingungen zu erhalten.

## 1.1. Schwermetalle in Ökosystemen

### 1.1.1. Definition und Klassifizierung von Schwermetallen

Chemische Elemente, die in elementarer Form eine Dichte von mehr als  $5,0 \text{ g cm}^{-3}$  aufweisen, werden im Allgemeinen als Schwermetall bezeichnet. Diese Eigenschaft weisen unter anderem die Elemente Silber (Ag), Astat (At), Gold (Au), Wismut (Bi), **Cadmium (Cd)**, Kobalt (Co), Kupfer (Cu), Chrom (Cr), Eisen (Fe), **Quecksilber (Hg)**, Mangan (Mn), Molybdän (Mo), Nickel (Ni), Blei (Pb), **Platin (Pt)**, Antimon (Sb), Zinn (Sn), Titan (Ti), Thallium (Tl), Vanadium (V) Zink (Zn) und Zirkonium (Zr) auf. Aufgrund unterschiedlicher Affinitäten gegenüber Liganden beziehungsweise Bindungspartnern werden die Metalle nach Nieboer et al. (1980) in drei Klassen eingeteilt:

#### Klasse A:

Metalle mit hoher Affinität zu sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen wie Carboxyl- (-COOH) oder Hydroxyl- (-OH) Gruppen und einer Ligandenpräferenz von  $\text{O} > \text{N} > \text{S}$ . Hierzu gehören die Alkali- und Erdalkalimetalle sowie Aluminium (Al).

#### Klasse B:

Metalle mit hoher Affinität zu Sulfhydryl- (-SH) und Amino- (-NH<sub>2</sub>) Gruppen und einer Ligandenpräferenz  $\text{S} > \text{N} > \text{O}$ . Hierzu gehören Metalle wie Gold (Au), Silber (Ag), Kupfer (Cu) und Quecksilber (Hg).

Klasse C:

Metalle, die aufgrund ihres Bindungsaffinitätsprofils nicht eindeutig der Klasse A oder Klasse B zugeordnet werden können. Die Metalle besitzen jedoch in der Reihenfolge Mangan<Zink<Nickel<Eisen≅Kobalt<Cadmium<Kupfer<Blei zunehmend den Charakter der Metalle aus Klasse B.

### 1.1.2. Physiologische Bedeutung von Schwermetallen für Pflanzen

Einige Schwermetalle werden von Pflanzen als Mikronährelemente essentiell benötigt, wobei die pflanzenverfügbare Konzentration dieser Schwermetalle in der Bodenlösung entscheidend ist. Für alle Schwermetalle, also auch die als Mikronährelemente benötigten, gilt, dass die phytotoxische Grenzkonzentration in Pflanzen sehr niedrig liegt und sie bei einem Konzentrationsanstieg dementsprechend schnell erreicht wird (Amberger, 1996). Nachstehende Tabelle 1 gibt einen kurzen Überblick über eine Auswahl von als Mikronährelemente benötigten Schwermetallen und ihrer physiologischen Bedeutung (Bestandteil oder Aktivierung eines Enzyms etc.).

Tabelle 1: Für Pflanzen essentielle Schwermetalle und ihre physiologische Bedeutung.

| Schwermetall | Pflanzenverfügbare Form              | Physiologische Bedeutung (Beispiele) |
|--------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Eisen        | $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$  | Ferredoxin, Lipoxygenase             |
| Mangan       | $\text{Mn}^{2+}$                     | Phenylalaninammoniumlyase            |
| Zink         | $\text{Zn}^{2+}$ , $(\text{ZnOH}^+)$ | Superoxiddismutase                   |
| Kupfer       | $\text{Cu}^{2+}$                     | Plastocyanin                         |
| Molybdän     | $\text{MoO}_4^{2-}$                  | Nitratreduktase                      |

Andere Schwermetalle besitzen keine eindeutig nachgewiesene biochemische Funktion in lebenden Pflanzenzellen und wirken bereits in geringen Konzentrationen toxisch. Eine Verfügbarkeit dieser Schwermetalle in der Bodenlösung ist für die Pflanze nur nachteilig. Cadmium, Quecksilber und Platin gehören zu dieser Gruppe von Schwermetallen.

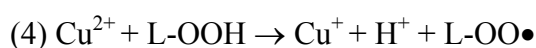
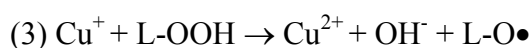
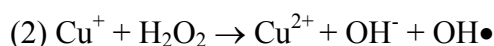
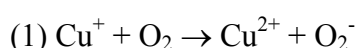
### 1.1.3. Ursachen der Schwermetall-Toxizität

Schwermetalle sind in der Lage, mit Biomembranen und Aminosäuren funktioneller oder struktureller Gruppen in Proteinen zu interagieren (Panda et al., 1992). Dies führt zu Veränderungen in der Funktionalität, die eine Beeinträchtigung der Aufrechterhaltung der Homöostase bedingen kann.

Phospholipide beziehungsweise integrale oder periphere Proteinstrukturen auf der Oberfläche einer Biomembran stellen geladene Gruppen dar, die mit Kationen (zum Beispiel  $\text{Ca}^{2+}$ ) assoziiert sind. Schwermetallionen können diese Ladungsstellen besetzen beziehungsweise andere Kationen aus diesen Positionen verdrängen und so Membraneigenschaften wie deren Fluidität und Integrität verändern (Ernst et al., 1996). Störungen der Membransysteme sind generell durch folgende Effekte gekennzeichnet (Elstner et al., 1996):

- a) Austritt von Ionen und kleinen Molekülen
- b) Elektrische Potentialänderung
- c) Lipidperoxidation
- d) Verlust essentieller SH-Gruppen
- e) Austritt von Enzymen des intermediären Metabolismus
- f) Braunfärbung durch oxidierende o-Chinone
- g) Verlust vitaler Funktionen

Auch können Biomembranen durch radikale Sauerstoffspezies (ROS) angegriffen werden und ihre Membran-Integrität verlieren. Quelle solcher ROS sind Reaktionen, an denen Metallionen beteiligt sind. In Betracht kommen die unten dargestellten Reaktionen: die Autoxidation (1), die Fentonreaktion (2), oder eine Promotion der Lipidperoxidation durch Interaktion mit Lipidhydroperoxiden (L-OOH) zu reaktiven Alkoxy- (3) oder Peroxy (4)-Radikalen (Ernst et al., 1996; Heidenreich, 1999).



Die so durch Schwermetalle induzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies könnte auch die Ursache für die teilweise Initiation einer pflanzlichen Pathogenabwehrantwort bei Schwermetallexposition sein.  $\text{HgCl}_2$  wurde als abiotischer Elicitor der Phenylalaninammoniumlyse (PAL) sowie der  $\beta$ -1,3-Glucanase und Chitinase identifiziert (Ohl et al., 1990; Nasser et al., 1990).

Schwermetalle können bei der Pflanze auch zu Abwehrreaktionen führen. So kann durch Bildung von Phytochelatinen der Gehalt an GSH (reduziertes Glutathion) in der Zelle verringert werden. Eine erhöhte Schwermetalltoleranz kann daher durch einen höheren Gehalt an GSH oder durch erhöhte Aktivität detoxifizierender beziehungsweise antioxidativer Enzyme wie Katalasen und Peroxidasen begründet sein (Zenk, 1996). Ein solcher Unterschied wurde zwischen Hg, Cd und Zn toleranten Varietäten bei *Chloris barbata* gefunden (Patra et al., 1994).

Aus Proteinen können metallische Kofaktoren durch Schwermetallionen verdrängt werden und so zum Beispiel die Aktivität und Spezifität eines Enzyms verändern. Auch können kompatible Gruppen (zum Beispiel  $-\text{SH}$ ) in Proteinen mit Schwermetallen Bindungen eingehen und so eine Funktionsänderung eintreten. Gerade Schwermetalle der Gruppe B wie Quecksilber und auch das sich ähnlich verhaltende Cadmium binden bevorzugt an Thiolgruppen, wie sie in vielen Polypeptiden entweder in freier Form oder als die Tertiär- und Quartärstruktur bestimmenden Disulfidbrücken existieren (Schäffner, 1998). Panda et al. (1992) konnte zeigen, dass die Bindung von Quecksilber an Thiolgruppen von Tubulin die Spindelfunktion beeinträchtigt. Die Inhibition von Aquaporinen durch vermutliche Bindung von  $\text{Hg}^{2+}$  an einen Cystein-Rest im Porus wurde von Schäffner (1998) beschrieben. Zhang et al. (1999) beschrieben die Absenkung der hydraulischen Leitfähigkeit in Wurzelgewebe von *Triticum aestivum* um 75% durch Inhibition von Wasserkanälen durch  $\text{HgCl}_2$ .

Einige weitere Beispiele durch Schwermetalle inhibierter Enzymsysteme sind in folgender Tabelle 2 gezeigt (Robinson et al., 1994).

Tabelle 2: Durch Schwermetalle inhibierte Enzymsysteme (nach Robinson et al., 1994).

| <b>Enzym</b>                   | <b>Spezies</b>                 | <b>Schwermetall</b> |
|--------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| δ-Aminolävulinat-Dehydrogenase | <i>Pennisetum typhoideum</i>   | Hg, Pb              |
| Protochlorophyllid-Reduktase   | <i>Hordeum vulgare</i>         | Cd                  |
| Hydrolytischer Komplex PSII    | <i>Lycopersicum esculentum</i> | Cd                  |
| NADPH-Oxidoreduktase           | <i>Euglena gracilis</i>        | Cd, Hg, Zn          |
| Rubisco                        | <i>Hordeum vulgare</i>         | Cd, Cu, Pb, Zn      |
| Carboanhydrase                 | <i>Glycine max</i>             | Cd                  |
| Succinat-Dehydrogenase         | <i>Nicotiana tabacum</i>       | Cd                  |

#### 1.1.4. Quellen und Standorte von Schwermetallakkumulationen

Weltweit existieren viele Regionen, in denen es zu natürlichen Schwermetallakkumulationen vornehmlich in der Pedosphäre kommt. Der sogenannte Kupfergürtel in Südafrika (Zambia) weist typische Kennzeichen hoher Schwermetallgehalte im Boden auf. Charakteristisch für diese Region ist eine artenarme, krautige Flora, die nur in Bereichen geringerer Bodenkontamination holzige Spezies, wenngleich nur in Krüppelformen, aufweist und in der hochstämmige Bäume fehlen. Neben der Schwermetall-assoziierten Selektion ist jedoch auch der Einfluss korrespondierender Faktoren wie sehr niedriger Boden-pH und geringe Wasser- und Nährsalzverfügbarkeit für die Zusammensetzung der rezenten Flora ausschlaggebend (Woolhouse, 1983). Auch Sukzessionsflächen auf vulkanischem Ausgangsmaterial weisen gelegentlich hohe Schwermetallgehalte auf. Auf Serpentin (einem Magnesium-Silikat mit Aluminium, Eisen und Nickel) vorkommende Pflanzengesellschaften weichen in ihrer Zusammensetzung deutlich von der Umgebung mit niedrigerem Schwermetallgehalt im Boden ab (Woolhouse, 1983).

Die seit Beginn der Industrialisierung expandierende Verwendung fossiler Energieträger (vor allem die Verbrennung von Kohle und Erdgas), der Abbau schwermetallhaltiger Mineralien und Erze im Bergbau, der Einsatz schwermetallhaltiger Produkte im Baugewerbe (zum Beispiel chromhaltige Holzschutzmittel oder zinkhaltige Legierungen für wasserableitende Außenbauteile an Gebäuden), der Zusatz organischer Bleiverbindungen als Additiv in Kraftstoffen, die Ausbringung von Mineraldüngern (zum Beispiel Rohphosphate mit Cadmium), Wirtschaftsdüngern (vor allem in Schweinemastbetrieben, die Kupfer als leistungssteigernden Futterzusatz einsetzen) und Sekundärrohstoffdüngern wie Klärschlamm

oder Bioabfallkomposten, der Einsatz schwermetallhaltiger Pestizide („Bordeaux-Brühe“ aus  $\text{CuSO}_4$ ) und Saatgut-Beizmittel (zum Beispiel das quecksilberhaltige Beizmittel Upsulen™ von Bayer), wie auch der Anfall schwermetallhaltiger Abfälle und Abwässer aus der industriellen Produktion bedingten und bedingen einen anthropogenen Eintrag von Schwermetallen in die Umwelt (Müller, 1999). Auch wenn durch die Verbesserungen in den Produktions- und Aufreinigungsprozessen, die Verdrängung schwermetallhaltiger Produkte durch andere, weniger umweltbelastende Substitute oder durch Änderung beziehungsweise Schaffung einschlägiger Rechtsvorschriften die anthropogene Immission von Schwermetallen rückläufig ist, ist die Problematik von Schwermetallkontaminationen nicht vernachlässigbar. Die hohe Persistenz der Schwermetalle bedingt eine zunehmende Akkumulation in Ökosystemen (Müller, 1999). Gerade der im Zuge der Agrarreform verstärkte Trend zu ökologischer Landwirtschaft mit vermehrtem Einsatz von Sekundärrohstoffdüngern und Wirtschaftsdüngern könnte für die Zukunft ein neues Problemfeld im Bereich der Schwermetallakkumulation sein.

#### 1.1.5. Bioverfügbarkeit von Schwermetallen

Die Bioverfügbarkeit von Schwermetallen hat entscheidende Bedeutung für deren Toxizität. Die Schwermetallaufnahme in Pflanzen unterliegt einer Beeinflussung durch Bodenfaktoren und Kulturmaßnahmen. Niedrige pH-Werte bei schlechtem Kalkungszustand der Böden, niedrige Tongehalte, geringe Menge organischer Substanz im Boden, eine Düngung mit physiologisch saurer wirkenden Düngemitteln ( $\text{NO}_3^-$ -haltige Dünger) oder eine schlechte Phosphatversorgung erhöhen die Bioverfügbarkeit von Schwermetallen und führen so zu gesteigerter Aufnahme von Schwermetallionen in die Pflanze. Nachstehende Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Zunahme der Mobilität verschiedener Metalle in Abhängigkeit von der Bodenreaktion (Müller, 1999).

Tabelle 3: pH-Abhängigkeit des Mobilitätsverhaltens verschiedener Schwermetalle in Böden (Müller, 1999).

| Metall                     | Mobilitätszunahme |
|----------------------------|-------------------|
|                            | unterhalb pH      |
| Cadmium                    | 6,5               |
| Mangan                     | 5,5               |
| Zink                       | 5,5               |
| Nickel                     | 5,5               |
| Cobalt                     | 5,5               |
| Aluminium                  | 4,5               |
| Kupfer                     | 4,5               |
| Chrom ( $\text{Cr}^{3+}$ ) | 4,5               |
| Blei                       | 4,0               |
| Quecksilber                | 4,0               |
| Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) | 3,5               |

## 1.2. Charakteristik ausgewählter Schwermetalle

### 1.2.1. Quecksilber

Quecksilber besitzt die für ein Metall ungewöhnliche Eigenschaft, bei Raumtemperatur in flüssigem Aggregatzustand vorzuliegen und einen hohen Dampfdruck auszubilden. Ein großer Teil des elementaren (metallischen) Quecksilbers liegt in der Umwelt gasförmig in der Atmosphäre vor. Diese Eigenschaft ist von außerordentlich großer Bedeutung für eine Reihe von Versuchsergebnissen, die im Rahmen dieser Arbeit ermittelt werden konnten. Nachstehende Tabelle 4 gibt einen kurzen Überblick über das physikochemische Eigenschaftsprofil dieses Schwermetalls.



Tabelle 4: Physikochemisches Eigenschaftsprofil von Quecksilber.

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Elementname:            | Quecksilber   |
| Symbol:                 | Hg  |
| Ordnungszahl:           | 80  |
| Relative Atommasse:     | 200,59 g/mol  |
| Atomradius:             | 160 pm  |
| Dichte:                 | 13,55 gcm <sup>-3</sup>   |
| Schmelzpunkt:           | 234,28 K  |
| Siedepunkt:             | 629,7 K   |
| Elektronenkonfiguration | [Xe] 4f <sup>14</sup> 5d <sup>10</sup> 6s <sup>2</sup>  |
| Elektronegativität:     | 2,00  |
| Acidität:               | Basisch   |
| Kristallstruktur:       | Rhombohedral  |
| Vaporisationsenergie:   | 59,30 kJ mol <sup>-1</sup>  |
| Fusionsenergie:         | 2,292 kJ mol <sup>-1</sup>  |
| Wärmekapazität:         | 0,140 Jg <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>  |
| Entdeckt:               | 1500 v. Chr.  |
| Häufigkeit:             | 0,05 ppm  |
| Stabile Isotope:        | Hg-196: 0,15%<br>Hg-198: 10,10%<br>Hg-199: 17,00%<br>Hg-200: 23,10%<br>Hg-201: 13,20%<br>Hg-202: 29,65% |

Quecksilber liegt als metallisches Quecksilber Hg<sup>0</sup>, als anorganische (zum Beispiel HgCl<sub>2</sub>) oder organische Quecksilberverbindung (zum Beispiel CH<sub>3</sub>Hg-R) vor. Alle drei Quecksilberspezies sind toxisch, wobei die Toxizität vom metallischen Quecksilber über anorganische zu organischen Quecksilberverbindungen hin zunimmt.

Quecksilber ist in Ökosystemen ubiquitär vertreten. In früheren Berechnungen wurde die Verdampfung von Hg<sup>0</sup> aus der Pedosphäre und der Hydrosphäre mit einem Anteil von 80% als Hauptquelle der Quecksilberemission betrachtet und der anthropogen bedingten Emission aus den oben angesprochenen Quellen lediglich ein Anteil von 20% zugemessen (Stein et al., 1996). Neuere Schätzungen hingegen sehen bis zu 50% der Emissionen als anthropogen

bedingt an (Leonard et al., 1998). Der gesamte Quecksilberfluss beträgt nach Berechnungen von Slemr et al. (1992)  $6000 \text{ t Hg a}^{-1}$ , wobei anthropogen bedingte Emissionen  $4,5 \text{ t Hg a}^{-1}$  ausmachen, was einem Anteil von 70% entsprechen würde. Die durchschnittliche Quecksilberkonzentration in der Troposphäre liegt bei 1 bis  $4 \text{ ng m}^{-3}$  mit steigender Tendenz (circa 1% bis 1,5% pro Jahr) (Suszcynsky et al., 1995). Die Pedosphäre enthält bis zu  $2 \text{ mg Hg kg}^{-1}$  (Nriagu, 1988), wobei 95% der Ackerflächen in der Krume unter  $0,2 \text{ mg Hg kg}^{-1}$  aufweisen (Müller, 1999). Allerdings können diese Werte auch deutlich erhöht sein, wie Befunde aus Ruderalflächen oder Böden aus der Umgebung von Industriebetrieben zeigen. In der Slowakei wurde von Banášová et al. (1993) im Umland einer Erzeschmelze eine Bodenbelastung von  $180 \text{ mg Hg kg}^{-1}$  gefunden.

Wie bereits oben angedeutet, ist auch die Landwirtschaft an einem kontinuierlichen Schwermetalleintrag in landwirtschaftlich genutzte Böden beteiligt. Quecksilbereinträge aus verschiedenen Eintragspfaden sind in nachstehender Tabelle 5 aufgelistet (Müller, 1999).

Tabelle 5: Landwirtschaftsspezifische Quecksilbereinträge in Deutschland (nach Müller, 1999).

| <b>Eintragspfad</b> | <b>mg ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup></b> |
|---------------------|--|
| Rindergülle 1GV     | 100                                      |
| Schweinegülle 1GV   | 30                                       |
| Mineraldünger       | 10                                       |
| Klärschlamm         | 1700                                     |
| Bioabfallkomposte   | 2000                                     |

Quecksilber unterliegt einer zyklischen Migration zwischen der Atmosphäre, Hydrosphäre und Pedosphäre. Große Bedeutung bei diesem Stoffkreislauf kommt dabei Ozon ( $\text{O}_3$ ), Hydrogenchlorid ( $\text{HCl}$ ) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) zu, die durch Oxidation des gasförmigen metallischen Quecksilbers  $\text{Hg}^0$  zu  $\text{Hg}^{2+}$  eine Quecksilberdeposition aus der Atmosphäre verursachen. Das so in die Pedosphäre und die Hydrosphäre eingetragene Quecksilber wird durch mikrobielle Tätigkeit entweder wieder zu  $\text{Hg}^0$  reduziert oder durch Methylierung zum hoch toxischen und wasserlöslichen  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  oder zum leicht flüchtigen  $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$  umgewandelt. Die große Gefahr dieser organischen Quecksilberverbindungen liegt darin, dass sie aufgrund lipophiler Eigenschaften leicht Biomembranen (zum Beispiel Phospholipidschichten) durchdringen können und so in Organismen extrem toxisch, vor allem

auf das Zentralnervensystem, wirken. Die Verbindungen können sich zudem in der Nahrungskette anreichern. Prominentes Beispiel für eine durch Methylquecksilber verursachte Massenintoxikation ist die Katastrophe von Minamata (Japan), bei der 1952 insgesamt 52 Menschen nach dem Verzehr von mit Methylquecksilber belastetem Fisch aus einem durch Industrieabwässer verunreinigten See starben (Strubelt, 1996). Aber auch andere Nahrungsmittel enthalten bisweilen beträchtliche Mengen an Quecksilber. Nachstehende Tabelle 6 gibt hierzu einen Überblick.

Tabelle 6: Quecksilbergehalte in Nahrungsmitteln (nach AID, 1990).

| <b>Nahrungsmittel</b>                       | <b>Quecksilbergehalt<br/>[mg kg<sup>-1</sup>]</b> |
|---|---|
| Rindfleisch                                 | 2   |
| Rinderleber                                 | 21  |
| Süßwasserfische                             | 271   |
| Seefische                                   | 196   |
| Hg-Problemfische (z.B. Heilbutt, Steinbutt) | 1070  |
| <b>Weizen</b>                               | <b>22</b>   |
| Kartoffeln                                  | 6   |
| Gemüse                                      | 47  |
| Obst  | 8   |
| Wein  | 1   |
| Trinkwasser                                 | 3   |

Quecksilber kann jedoch auch durch Bildung von schwerlöslichen anorganischen Komplexen wie HgS (Zinnober) oder HgSe (Tiemannit) immobilisiert werden und so aus dem zyklischen Quecksilberpool ausscheiden (Stein et al., 1996, Shanker et al., 1996), oder durch Komplexbildung mit Huminstoffen gebunden werden (Yin et al., 1996). Grundsätzlich überwiegt jedoch der Efflux von Quecksilber aus der Pedosphäre und der Hydrosphäre in die Atmosphäre (Stein et al., 1996).

Pflanzen sind aufgrund der bereits beschriebenen ubiquitären Verbreitung von Quecksilber permanent diesem Schwermetall exponiert. Die Aufnahme von durch Deposition aus der Atmosphäre auf Blätter gelangten Quecksilbers in die Pflanze wird als marginal eingeschätzt. Als Hauptaufnahmeweg wird bisher der „air-to-leaf“-Transfer atmosphärischen oder direkt aus dem Boden evaporierten Quecksilbers gesehen (De Temmerman, 1986).

Untersuchungen von Stein et al. (1996) haben gezeigt, dass über das Wurzelsystem anorganische und organische Quecksilberverbindungen aufgenommen werden können. Eine  $\text{Hg}^{2+}$  Exposition der Wurzeln führte bei Tabak zu reduziertem Wachstum (Suszcynky et al., 1995). Allgemein führt eine Quecksilber-Exposition bei höheren Pflanzen zu verringerter Photosynthese, Transpiration, Wasseraufnahme und Chlorophyll-Biosynthese (Godbold, 1991).

### 1.2.2. Cadmium

Cadmium ist wie Quecksilber ein seltenes Schwermetall. Anders als Quecksilber ist es jedoch nicht in speziellen Lagerstätten zu finden, sondern stets zusammen mit anderen Metallen. Der zu Zink isomorphe Charakter führt dazu, dass in Zinklagerstätten Cadmium als Begleitmetall enthalten ist. Das Vorkommen mit 0,1 bis 50 ppm (je nach Provenienz) in Rohphosphatlagerstätten zeigt, dass Cadmium weit verbreiteter Inhaltsstoff von Boden und Wasser war und ist. Nachstehende Tabelle 7 gibt einen Überblick über das physikochemische Eigenschaftsprofil von Cadmium.

Cadmium tritt in Verbindungen nahezu immer zweiwertig auf, wobei die meisten Verbindungen gut wasserlöslich sind. Hierzu gehören vor allem die Cadmiumsalze der Mineralsäuren.

Cadmium kommt natürlich im Boden als geogenes Spurenelement vor und ist dort in Mengen von 0,06 bis 1,1  $\text{mg kg}^{-1}$  vertreten (Alloway, 1995). Deutschland wird mit einem kalkulierten Mittel von 0,52  $\text{mg kg}^{-1}$  Cadmium im Boden von ERM (1998) als Beispielland für eine hohe Hintergrundkonzentration angeführt.

Tabelle 7: Physikochemisches Eigenschaftsprofil von Cadmium.

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Elementname:            | Cadmium   |
| Symbol:                 | Cd  |
| Ordnungszahl:           | 48  |
| Relative Atommasse:     | 112,411 g/mol   |
| Atomradius:             | 148,9pm   |
| Dichte:                 | 8,64 gcm <sup>-3</sup>  |
| Schmelzpunkt:           | 594,1 K   |
| Siedepunkt:             | 1038 K  |
| Elektronenkonfiguration | [Kr] 4d <sup>10</sup> 5s <sup>2</sup>   |
| Elektronegativität:     | 1,69  |
| Acidität:               | Basisch   |
| Kristallstruktur:       | Hexagonal   |
| Vaporisationsenergie:   | 99,87 kJ mol <sup>-1</sup>  |
| Fusionsenergie:         | 6,07 kJ mol <sup>-1</sup>   |
| Wärmekapazität:         | 0,232 Jg <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>  |
| Entdeckt:               | 1817 (Deutschland)  |
| Häufigkeit:             | 0,11 ppm  |
| Stabile Isotope:        | Cd-106: 1,25%<br>Cd-108: 0,89%<br>Cd-110: 12,51%<br>Cd-111: 12,22%<br>Cd-112: 24,13%<br>Cd-114: 28,72%<br>Cd-116: 7,47% |

Cadmium wird in der Umwelt meist als isomorpher Substituent von Zink- und Calcium-Verbindungen gefunden, oder, wie bereits beschrieben, als Begleitmetall in zum Beispiel Zinklagerstätten. Daher ist die Zinkproduktion auch Hauptlieferant für Cadmium, das bei der Aufreinigung des Zinks als Nebenprodukt anfällt. Technisch wird Cadmium hauptsächlich in der Elektroindustrie im Bereich der Batterie- und Akkumulatorenherstellung, als Stabilisator in der Kunststoffindustrie oder als Farbpigment in der Keramikindustrie eingesetzt. Der Cadmium-Einsatz in diesen Bereichen ist zwar nach Baumann et al. (1997) in den letzten Jahren rückläufig, dennoch sind immer noch große Mengen an Cadmium beispielsweise in Batterien enthalten und werden mehr oder weniger unkontrolliert und unumkehrbar in die

Umwelt eingetragen (UBA, 2000). Auch die Verbrennung fossiler Energieträger setzt Cadmium in die Atmosphäre frei. Wichtiger Eintragspfad für Cadmium in die Umwelt und vor allem in landwirtschaftlich genutzte Böden stellt die Ausbringung von Phosphatdüngern dar. In diesen Düngern ist Cadmium als isomorpher Substituent von Calcium enthalten, wobei die unterschiedliche Provenienz der Rohphosphate erhebliche Schwankungen der Cadmiumgehalte bedingen (Schütze et al., 2000). Diese können nach CEC-DG-(III)-AG Industry (1997) zwischen 30 mg (Russland, Südafrika, USA) und 460 mg (Senegal, Tunesien, Togo) Cadmium  $\text{kg}^{-1}$  reinem Phosphor im Phosphatdünger liegen. Der Gesamteintrag an Cadmium in landwirtschaftlich genutzte Böden über Mineral-, Wirtschafts- und Sekundärrohstoffdünger wird in einem Bericht der UMK-AMK-LABO-AG (2000) auf etwa 39 t  $\text{a}^{-1}$  beziffert. Der anthropogene Eintrag von Cadmium über Bulk-Depositionen in Deutschland wird von Schulte et al. (1996) in einem Bereich von 1 g  $\text{ha}^{-1}\text{a}^{-1}$  (ländliche Gebiete) und 5 g  $\text{ha}^{-1}\text{a}^{-1}$  (urbane Gebiete) angegeben. Die Studie der UMK-AMK-LABO-AG (2000) weist für Deutschland einen jährlichen Eintrag über die Luft von 69 t Cadmium aus (entspricht circa 4 g  $\text{ha}^{-1}\text{a}^{-1}$ ). Cadmium hat bereits in sehr geringen Konzentrationen Auswirkungen auf Pflanzen. Die niedrigste bisher ermittelte NOEC beträgt 1,57 mg  $\text{kg}^{-1}$  TM Boden. Dieser bezieht sich auf Wachstumsdepressionen für Sitkafichten (Curlik et al., 2000). Weitere Schwellenwerte werden für *Lactuca sativa* mit 3,2 mg Cadmium  $\text{kg}^{-1}$  TM Boden und für *Triticum aestivum* 3,5 mg Cadmium  $\text{kg}^{-1}$  TM Boden angegeben (Liebe, 1999).

### 1.2.3. Platin

Platin ist ein relativ weiches Schwermetall, das sehr hohe Duktilität aufweist. Nach Osmium und Iridium besitzt Platin die drittgrößte Dichte aller Elemente. Es gehört zu den Elementen mit dem niedrigsten Vorkommen in der Erdkruste. Das silberweiß glänzende Metall ist in der Lage, große Mengen an Wasserstoff und Sauerstoff zu absorbieren und diese dabei zu aktivieren. In dieser Eigenschaft begründet sich die Rolle Platins als potenter Katalysator. Platin ist darüber hinaus in der Lage, an Proteinkomplexe (zum Beispiel Alpha-Tubuline) zu binden. Aufgrund dieser Eigenschaft werden bestimmte Platinverbindungen verbreitet als Zytostatika in der Krebstherapie eingesetzt. Nachstehende Tabelle 8 gibt einen Überblick über das physikochemische Eigenschaftsprofil von Platin.

Tabelle 8: Physikochemisches Eigenschaftsprofil von Platin.

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Elementname:            | Platin  |
| Symbol:                 | Pt  |
| Ordnungszahl:           | 78  |
| Relative Atommasse:     | 195,078 g/mol   |
| Atomradius:             | 138,5pm   |
| Dichte:                 | 21,45 gcm <sup>-3</sup>   |
| Schmelzpunkt:           | 1768 °C   |
| Siedepunkt:             | 3825 °C   |
| Elektronenkonfiguration | [Xe]4f <sup>14</sup> 5d <sup>9</sup> 6s <sup>1</sup>  |
| Elektronegativität:     | 2,28  |
| Häufigkeit:             | 5 ppb   |
| Isotope:                | Pt-190: 0,01%<br>Pt-192: 0,79%<br>Pt-194: 32,9%<br>Pt-195: 33,8%<br>Pt-196: 25,3%<br>Pt-198: 7,2% |

In der Umwelt kommt Platin in einigen Platinmineralen wie Sperrylith und Geversit vor. Metallisches Platin tritt in der Regel zusammen mit anderen Platingruppen-Metallen gediegen auf. Es ist aufgrund seiner Seltenheit und seiner gegenüber Gold größeren Stabilität ein geschätztes Edelmetall in der Schmuckindustrie. Von diesen Produkten geht wohl kaum eine direkte Gefahr für die Umwelt aus. Durch den weit verbreiteten Einsatz von Platin als Katalysator-Material in den Abgaskatalysatoren von Kraftfahrzeugen kommt es jedoch zu einer erheblichen Freisetzung von Platin in die Umwelt (Zimmermann et al., 2004). Der heiße Abgasstrom wirkt abrasiv auf das Platin an der reaktiven Katalysatoroberfläche und erodiert das Platin, welches dann als Nanopartikel (Durchmesser 5-20 nm) zusammen mit dem Abgas in die Umwelt ausgeblasen wird. Dies geschieht besonders bei hohen Temperaturen (>+800°C) und bei hohen Abgasströmungsgeschwindigkeiten, wie sie bei Fahrten mit hohen Geschwindigkeiten (> 130 km/h) auftreten (Helmers et al., 1994). Messungen in der Nähe von Autobahnen lassen eine Emission von Platin aus Abgaskatalysatoren von bis zu 10000 kg a<sup>-1</sup> in Deutschland möglich erscheinen (Taylor et al., 1984). Neuere Daten gehen jedoch von einer Gesamtemission von 200 – 500 kg a<sup>-1</sup> in Deutschland aus (Lustig et al., 1997).

Neben dieser Emissionsquelle wird Platin in Rahmen der zytostatischen Krebstherapie in die Umwelt freigesetzt. Cisplatin und seine Homologen werden bei vielen Indikationen als Zytostatikum appliziert. Zum Beispiel über renale Elimination wird das Platin von den Patienten ausgeschieden und gelangt mit den Klinikabwässern (oder auch kommunalen Abwässern!) in die Umwelt.

Die nachstehende Tabelle 9 gibt einen Überblick über die Platinkonzentrationen in einigen biologischen und umweltrelevanten Proben (nach Lustig, 1997):

Tabelle 9: Platinkonzentrationen in verschiedenen Proben (nach Lustig, 1997).

| Probe                             | Platin-Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] |
|-----------------------------------|--|
| Boden, landwirtschaftlich genutzt | 1,12   |
| Boden, straßennah                 | 20,9   |
| Gras, ländliche Umgebung          | 0,1 – 0,3  |
| Gras, verkehrsnah Umgebung        | 0,8 – 3,0  |
| Atmosphärischer Staub             | 5-130  |
| Tunnelstaub                       | 60-250   |
| Klärschlamm, ländliche Umgebung   | 2-10   |
| Klärschlamm, städtisch            | <50  |
| Klärschlamm, großstädtisch        | 150  |

Studien haben gezeigt, dass Platin erhebliche toxische Effekte auf Organismen ausübt. Lustig (1997) beschrieb die Aufnahme und Verteilung von Platin aus dem Boden und Tunnelstaub in Pflanzen. Auch bei Pflanzen konnten starke Wachstumsdepressionen als Folge von Platinexposition beobachtet werden. Dabei wirken die emittierten Nanopartikel aufgrund ihrer geringen Größe ähnlich wie Ionen. Für Laborversuche werden daher häufig wasserlösliche Platinverbindungen als Modell eingesetzt.



### 1.3. Stress bei Pflanzen und pflanzliche Resistenzmechanismen gegen Schwermetall-exposition

Pflanzen unterliegen fortgesetzt Bedingungen, die ihnen „Stress“ bereiten. Stressauslöser bei Pflanzen kann man nach Elstner et al. (1996) in sieben Gruppen einordnen:

1. einergiereiche Strahlung (Röntgen, Gamma, UV, Radioaktivität)
2. sichtbares Licht (zu hohe und zu niedrige Intensitäten)
3. biologische Faktoren (Konkurrenz, Blüte, Fruchtreife, Infektionen, Parasiten)
4. mechanische Faktoren (Druck, Verbiß, Feuer, Wind)
5. chemische Faktoren (pH, Salze, **Schwermetalle**, Xenobiotika, Luftverunreinigungen)
6. Hydratur (Dürre, Überflutung)
7. Temperatur (Hitze, Kälte).

Pflanzen begegnen einer Schwermetall-exposition mit einer Vielzahl verschiedener Reaktionen. Diese Reaktionen umfassen zum Beispiel die Immobilisierung, Exklusion, Komplexierung und Kompartimentierung von Metallionen. Auch eine metabolische Adaption ist denkbar. Ihr wird jedoch im Vergleich mit den vorgenannten Strategien geringere Bedeutung zugemessen (Salt et al., 1995).

Robinson et al. (1994) konnte zeigen, dass eine Zinkexposition von Maispflanzen eine Erhöhung des Zinkgehalts in der Zellwand verursachte. Versuche mit *Agrostis tenuis* ergaben zudem, dass die Zink-Toleranz dieser Spezies mit der Kapazität der Zink-Akkumulation in der Zellwand korreliert. Die Exklusion von Schwermetallionen kann somit durch Fixierung an die Zellwandmatrix erfolgen und dadurch kann eine Schwermetallaufnahme von der Pflanze aktiv vermindert werden. Eine Analyse der Zellwandkomponenten ergab, dass Zink hauptsächlich mit Zellulose in der Zellwand assoziiert ist (Robinson et al., 1994). Eine weitere Möglichkeit der Exklusion von Metallionen wurde an *Triticum aestivum* untersucht. An Aluminium-sensitiven und Aluminium-toleranten Genotypen konnte gezeigt werden, dass die Exkretion von Malat aus dem Wurzelapex in der Rhizosphäre eine Chelatierung von  $Al^{3+}$  und damit eine Verminderung der Aluminiumaufnahme bewirkt. Ähnliche Ergebnisse wurden bei *Phaseolus vulgaris* und *Zea mays* gefunden.

Die metabolische Adaption an eine Schwermetallexposition ist wie bereits oben erwähnt im Allgemeinen vermutlich nur von geringer Bedeutung. Es gibt jedoch Beispiele, bei denen eine solche metabolische Adaption einen Selektionsvorteil darstellt. Robinson et al. (1994) fand bei metalltoleranten Ökotypen von *Anthoxanthum odoratum* höhere Inhibitionskonstanten für lösliche und zellwandgebundene saure Phosphatasen gegenüber  $Zn^{2+}$  als bei sensitiven Ökotypen.

Da viele Metallionen durch spezifische oder gruppenspezifische Carrier oder Kanäle in die Zellen aufgenommen werden, kann es bei einer Kompetition von nicht-essentiellen Schwermetallionen und essentiellen Metallionen um diese Transporter bei nicht ausreichender Spezifität der Transporter zu einer Aufnahme von nicht-essentiellen Schwermetallionen in die Zelle kommen. Dies erklärt die Befunde von Salt et al. (1995), die eine energieabhängige Akkumulation nicht-essentieller Schwermetalle gegen einen Konzentrationsgradienten zeigen. Allgemein muss die Konzentration von Metallionen in der Zelle reguliert werden. Hierzu müssen nicht-essentielle Schwermetallionen und überschüssige essentielle Metallionen aus dem Cytosol entfernt bzw. inaktiviert werden, um toxische Effekte zu vermeiden. Hierzu können diese Metallionen in der Pflanzenzelle komplexiert und in entsprechenden Kompartimenten gespeichert werden. Ernst (1996) konnte eine solche Komplexierung von  $Zn^{2+}$  durch organische Säuren und eine Speicherung dieser Komplexe in der Vakuole zeigen. Auch eine Sequestrierung von Schwermetallen in Trichomen wurde beschrieben (Salt et al., 1998).

Die Detoxifizierung durch Komplexierung kann zum Beispiel durch Metallothioneine erfolgen. Diese Metallothioneine werden nicht nur in Pflanzen, sondern auch in Säugern und Pilzen gefunden. Es handelt sich dabei um genkodierte Translationsprodukte, die reich an Cystein sind. Die Thiolgruppen im Cystein können über Mercaptidbindungen die Schwermetallionen binden und sie so detoxifizieren. In mono- und dikotylen Pflanzen konnten Metallothionein-ähnliche Gene gefunden werden (Robinson et al., 1993), wobei zum Beispiel in *Arabidopsis* mehrere Metallothionein-Genfamilien beschrieben wurden (Zhou et al., 1995).

Phytochelatine lassen sich durch ihren unterschiedlichen Aufbau von anderen Metallothioneinen abgrenzen (Robinson et al., 1993). Sie werden durch das Enzym Phytochelatin-Synthase aus reduziertem Glutathion (GSH) gebildet und sind verallgemeinert durch die Struktur  $(\gamma\text{-Glutamin-Cystein})_n\text{-Glycin}$  gekennzeichnet (Zenk et al., 1996). Die nachstehende Abbildung 1 zeigt einen Ausschnitt aus wichtigen Stoffwechselwegen, die an der Detoxifikation von Schwermetallionen beteiligt sind (aus Michal, 1999).

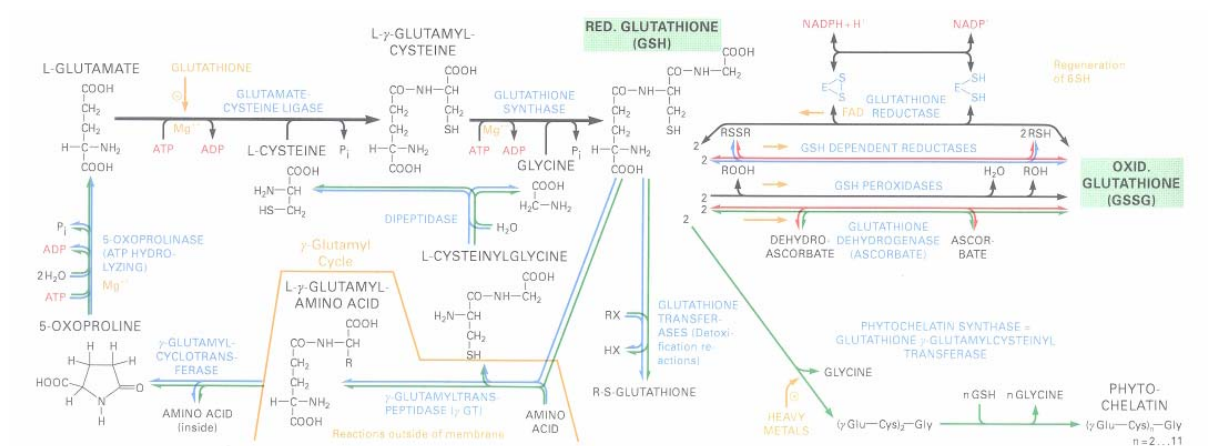


Abbildung 1: Wichtige Stoffwechselwege der Schwermetall-Detoxifikation.

#### 1.4. Quecksilber-Resistenz bei Bakterien

Bei verschiedenen Bakterien wird durch das mer-Operon eine Quecksilberresistenz ermöglicht. Durch mehrere Gene wird die Aufnahme von verschiedenen Hg-Spezies kontrolliert. Eine merA-codierte Quecksilber-Reduktase reduziert das aufgenommene Quecksilber schließlich zu  $\text{Hg}^0$  oder es wird durch die merB-codierte Organoquecksilber-Lyase detoxifiziert. Das  $\text{Hg}^0$  evaporiert aufgrund seiner physiko-chemischen Eigenschaften aus der Zelle (Silver, 1996).

Der bakterielle Mechanismus der Quecksilberdetoxifikation durch NADPH-abhängige Reduktion wurde durch Transformation auf *Arabidopsis* übertragen. Die Pflanzen enthielten ein modifiziertes merA-Gen und produzierten flüchtiges  $\text{Hg}^0$  (Rugh et al., 1996). Auch

transgene Pflanzen von *Populus* wurden hergestellt (Rugh et al., 1998), die  $\text{Hg}^0$  an die Umgebung ausgasen. Analog zu diesen Versuchen wurden auch transgene Pflanzen hergestellt, die die merB-codierte Organoquecksilber-Lyase exprimieren (Rugh et al., 1998). Diese Pflanzen sind in den USA kommerziell von der Fa. PhytoWorks Inc. zur Phytoremediation Quecksilber-kontaminierter Böden erhältlich.

### 1.5. Quecksilberausgasung aus Pflanzenbeständen

Wie bereits eingangs angedeutet, wird gasförmiges Quecksilber in der Atmosphäre als die treibende Kraft des globalen Quecksilberzyklus angesehen (Mason et al., 1994), wobei Pflanzen in der letzten Zeit mehr und mehr an Beachtung als Teil dieses Zyklus erhalten. Sie werden als Transfer- oder Speichersystem zur Phytoremediation diskutiert und bereits eingesetzt (vgl. 1.5.2.). Die Volatilisierung von  $\text{Hg}^0$  wird bisher hauptsächlich auf den Cotransport von Quecksilber mit dem Transpirationsstrom und auf Remobilisierung von Quecksilber aus Blattflächendepositionen zurückgeführt. Eine große Bedeutung hat hierbei die Evaporation von  $\text{Hg}^0$  aus Blättern hauptsächlich durch geöffnete Stomata. Untersuchungen von Leonard et al. (1998) gehen von einer Quecksilber-Evaporation über einem Waldbestand von circa  $250 \mu\text{g Hg m}^{-2}$  in einer sechsmonatigen Wachstumsperiode aus. Es konnte zudem an verschiedenen Sumpfpflanzen (zum Beispiel Rohrkolben) gezeigt werden, dass enorme Unterschiede zwischen Tag und Nacht bei den Ausgasungsraten bestehen (Lindberg et al., 2002; Kozuchowsky et al., 1978).

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Pflanzenmaterial

Als Versuchspflanze wurde *Hordeum vulgare* cv. Barke und *Hordeum vulgare* cv. Scarlett eingesetzt. Das Saatgut wurde von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Freising, erhalten.

Bei der verwendeten Gerstensorte Barke (BSA-Nr.: 1582) handelt es sich um eine begrante, zweizeilige Sommer- Braugerste, die 1996 von der Saatzucht Breun aus Libelle x Alexis gezüchtet wurde. Diese Sorte ist gegen Mehltau, Rhynchosporium und Zwergrost resistent.

Bei der Gerstensorte Scarlett (BSA-Nr.: 1543) handelt es sich ebenfalls um eine begrante, zweizeilige Sommer- Braugerste, die 1995 von der Saatzucht Breun aus (Amazone x Br.2730e) x Kym gezüchtet wurde. Diese Sorte ist gegen Netzflecken, nicht aber gegen Mehltau und Zwergrost resistent.

Die Sorte Barke wurde ausgewählt, da es sich um eine aktuell wichtige Gerstensorte handelt. Die Sorte Scarlett wurde aufgrund ihres zu Barke stark unterschiedlichen Resistenzprofils als zweite Sorte für vergleichende Versuche ausgewählt.

### 2.2. Axenisierung der Karyopsen

Um die Karyopsen zu axenisieren, wurden sie in einer axenischen Arbeitsumgebung (Flow Laboratories, Meckenheim, Deutschland) zunächst eine Minute in 70% Ethanol (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) inkubiert und anschließend eine Minute mit sterilem Aqua dest. gespült. Danach wurden die Karyopsen zweimal für jeweils fünf Minuten in 10% Natriumhypochlorid-Lösung (Sigma) mit Zusatz von 0,1% Triton X-100 (Sigma) inkubiert. Nach dieser Oberflächensterilisation wurden die Karyopsen zehnmal für jeweils eine Minute mit sterilem Aqua dest. gespült. Anschließend wurden die Karyopsen in sterilem Aqua dest. für 24 h bei Raumtemperatur vorgequollen.

### 2.3. Anzuchtmedium

Als Anzuchtmedium wurde

- i) eine Nährsalzlösungen nach Murashige und Skoog (1967) mit und ohne Zusatz von 1% Agar (USB, Cleveland, USA) eingesetzt, die aus dem kommerziell verfügbaren Murashige and Skoog Basal Medium (MS-Basal Medium) (Sigma) nach Herstellerangaben zubereitet wurde,
- ii) modifiziertes Hoagland's E Medium nach einer Formulierung von Acreman, Departement of Botany, University of Toronto, Canada, (<http://www.mobot.org/jwcross/duckweed/media.htm>), verwendet.

Entsprechend der Zielsetzung der Versuche wurde das Medium (ggf. nach dem Autoklavieren) mit weiteren Substanzen beaufschlagt.

#### 2.3.1. Schwermetallzusätze zum Anzuchtmedium

Um eine Quecksilber-, Cadmium- oder Platinkontamination des Anzuchtmediums zu erzielen, wurde dem autoklavierten Medium kurz vor dem Gießen des Agarbodens bei einer Temperatur von circa +55°C durch Hinzupipettieren einer 0,1M wässrigen Stammlösung von HgCl<sub>2</sub> bzw. Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O oder PtCl<sub>4</sub> (alle Sigma) das entsprechende Schwermetallsalz zugefügt. Für die Hydrokultur-Versuche mit flüssigem Medium wurde nach dem vollständigen Abkühlen des Mediums auf Raumtemperatur die entsprechende Menge der Schwermetallsalz-Stammlösung hinzupipettiert.

## 2.4. In-vitro-Kultur der Karyopsen

### 2.4.1. Anzucht auf Agar

Als Kulturgefäße wurden die aus transparentem Kunststoff gefertigten Pflanzenanzucht-Gefäße Phytatray II™ (Sigma) eingesetzt. In diese Gefäße wurden 100 ml des autoklavierte Anzuchtmediums gegossen und nach dessen Gelieren pro Gefäß 30-35 der wie oben beschrieben vorbehandelten Karyopsen (sechs Reihen à 5 Karyopsen) gleichmässig auf der Mediumoberfläche aufgebracht. Die Karyopsen wurden dazu mit einer Pinzette so in das Medium eingedrückt, dass sie etwa zur Hälfte im Medium eingebettet waren, um einen ausreichenden Kontakt mit dem Medium bei gleichzeitig genügender Luftversorgung zu gewährleisten.

### 2.4.2. Anzucht in Schwimmschicht-Hydrokultur

Für die molekularbiologischen und biochemischen Versuche war es notwendig, eine große Zahl an Pflanzenkulturen anzulegen, um die Anzucht der Behandlungsvarianten und Kontrollgruppen mit entsprechenden unabhängigen Wiederholungen durchzuführen. Hierfür wurde ein Kultursystem benötigt, das es ermöglichte, einfach und reproduzierbar ein gutes Pflanzenwachstum zu gewährleisten. Gleichzeitig musste sich das System inert gegenüber den eingesetzten Schwermetall-Zuschlägen verhalten und axenisch zu halten sein. Da die Untersuchungen neben dem Blattgewebe auch auf das Wurzelgewebe ausgedehnt wurden, war es zudem notwendig, die Pflanzen im Ganzen, das heißt, ohne Verletzung des Wurzelsystems, zu ernten. Dabei musste auch sichergestellt sein, dass am Wurzelsystem keine Reste des Anzuchtmediums zurückblieben. Dieses Anforderungsprofil konnte von einer Kultur auf Agar nicht erfüllt werden. Aber auch bis dato zu Verfügungen stehende Hydrokultursysteme wiesen Limitierungen auf, die sie für einen Einsatz zur Pflanzenanzucht für die geplanten Versuche nicht geeignet erscheinen ließen.

Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein neuartiges Hydrokultursystem entwickelt, das das dargestellte Anforderungsprofil erfüllt und dabei einfach, preiswert und in beliebigem Maßstab angewendet werden kann. Das zu diesem Zweck entwickelte

Hydrokultursystem basiert auf einem schwimmfähigen Kultursubstrat aus Polymer-Granulat, welches einen im Kulturmedium schwimmenden Substratkörper bildet (vgl. Abbildungen 2a und 2b). Dieses Substrat und das Kultursystem wurden patentiert (The Patent Office, London, 0325019.8 bzw. Patent Number GB2398562).

Das Schwimmschicht-Hydrokulturverfahren erlaubt die einfache, schnelle, preiswerte und effiziente Kultivierung von Pflanzen in wässrigen Kulturmedien mit Zuschlägen aller Art. Dieses Verfahren kann in allen geeigneten Gefäßen (Bechergläser, Schalen, Wannen etc.) eingesetzt werden, wobei je nach Bedarf beliebig große Kulturflächen angelegt werden können. Im Gegensatz zu üblichem Blähton-Granulat oder ähnlichen Hydrokultursubstraten können in diesem Verfahren auch „problematische“ Zuschläge wie Schwermetallionen appliziert werden, da das Polymergranulat nahezu inert ist und keine Immobilisierungen an die Granulatoberfläche stattfinden. Das Wachstum der Pflanzen und die Aufnahme von Schwermetallen in die Pflanze in der Schwimmschicht-Hydrokultur ist vergleichbar mit der Kultur auf Agar (Battke et al., 2003).

Als Polymer wird vorzugsweise Polypropylen (PP) oder high density Polyethylen (HD-PE) (Ultrapolymers, Augsburg, Deutschland) eingesetzt. Beide Polymere unterscheiden sich in ihren Spezifikationen bei der Bildung der schwimmenden Substratschicht nicht signifikant, Polypropylen kann aber im Gegensatz zum HD-Polyethylen autoklaviert werden.

Um Pflanzen mit diesem Verfahren zu kultivieren, wird zunächst eine Schicht PE-Granulat mit einer Dicke von circa vier Zentimetern im Kulturgefäß aufgeschüttet (die Schichtdicke und die Granulierung kann je nach Größe und Gewicht der Samen und der anwachsenden Pflanzen angepasst werden). Anschließend werden die axenisierten Samen (in diesem Fall die Gersten-Karyopsen) mit zum Beispiel etwa dem zehnfachen Volumen PE-Granulat gemischt. Diese Mischung wird nun gleichmäßig auf der bereits im Gefäß befindlichen PE-Granulat-Schicht verteilt. Die Aussaatstärke kann dabei leicht durch Veränderung des PE-Granulat-Anteils in der Samen-Granulat-Mischung variiert werden. Anschließend wird das gewünschte Flüssigmedium am Rand des Kulturgefäßes zugegossen. Zunächst füllt sich der Porenraum in der Granulatschicht mit dem Medium, bei weiterer Zugabe von Medium schwimmt die Schicht mit den Samen auf. Alternativ kann das Medium auch als erstes zum Polymergranulat gegossen und das Saatgut dann anschließend auf die Substratoberfläche ausgebracht werden.



In dieser schwimmenden Substratschicht wachsen nun die Pflanzen heran. Die Wurzeln finden in ihr genügend Halt für eine stabile Verankerung der Pflanzen. Bei längerer Kultur wachsen die Wurzeln aus der Schwimmschicht nach unten in das Flüssigmedium hinein. Das Flüssigmedium unter der Schwimmschicht versorgt die wachsenden Pflanzen zuverlässig mit Wasser und Nährsalzen. Durch das Volumen des zugegossenen Mediums kann die Höhe der unteren Flüssigphase variiert werden. Eine Belüftung des Mediums ist durch verschiedene Systeme möglich, in der Regel aber nicht notwendig (vgl. Abbildungen 2a und 2b).

Zur Ernte können die Pflanzen problemlos aus der Schwimmschicht herausgezogen und die gewünschten Pflanzenteile (zum Beispiel Wurzeln) unverletzt entnommen werden. Durch kurzes Spülen in Aqua dest. können Reste des Kulturmediums von den Wurzeln entfernt werden (Battke et al., 2003).

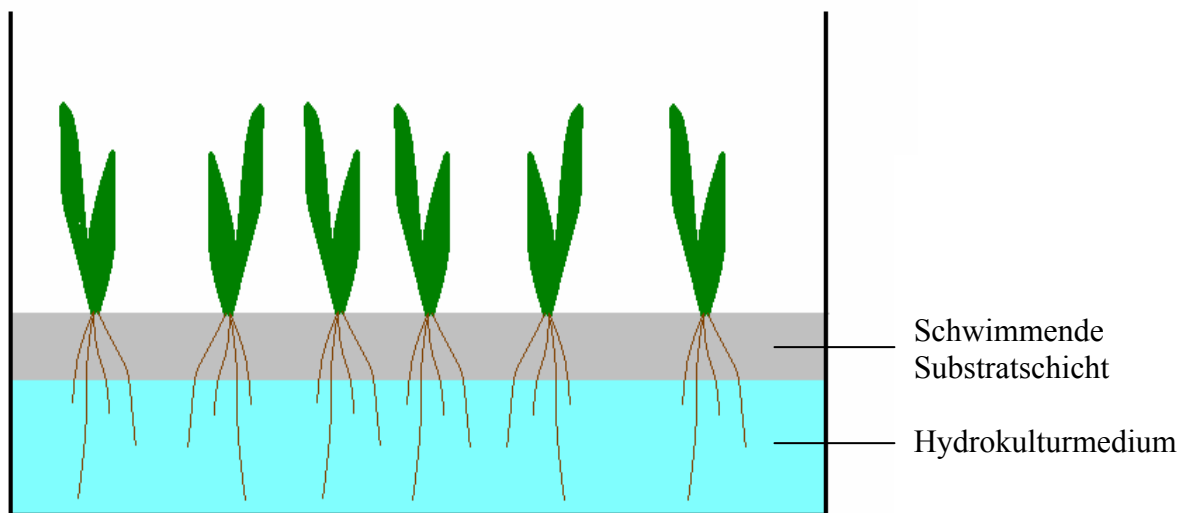


Abbildung 2a: Schematische Darstellung der Schwimmschicht Hydrokultur. Die Pflanzen wachsen in der schwimmenden Substratschicht aus Polypropylengranulat an und können zur Ernte einfach aus der Substratschicht herausgezogen werden.

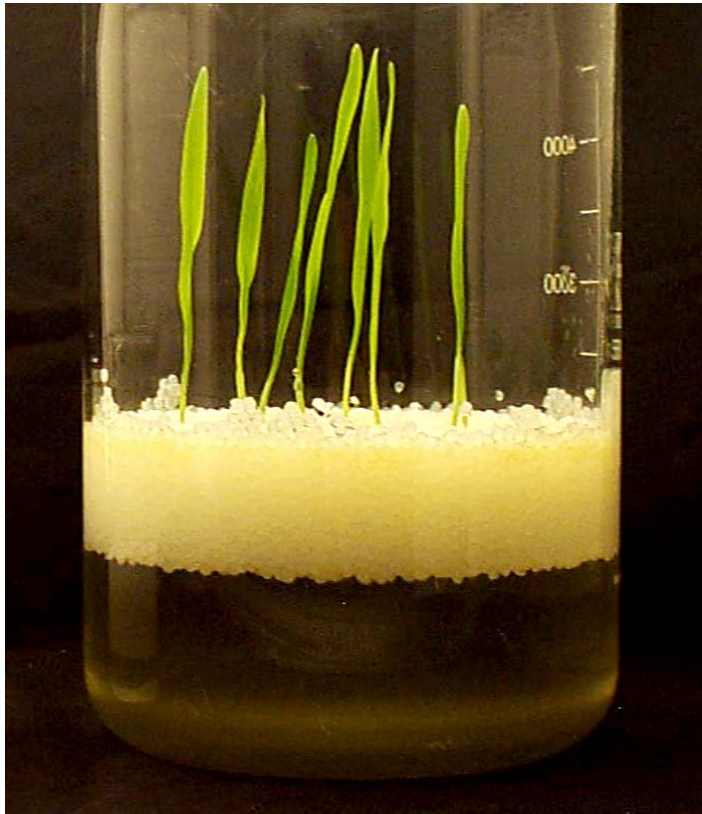


Abbildung 2b: Schwimmschicht Hydrokultur: Gerstenpflanzen werden vom schwimmenden Polypropylen-Granulat getragen und wachsen in dieser Substratschicht an.

### 2.5. Anzuchtbedingungen

Die Gerstenpflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen angezogen. Dazu wurden die Kulturgefäße in einer Klimakammer Typ VB 1014/S (Vötsch, Balingen, Deutschland) in einer randomisierten Anordnung aufgestellt. Folgende Anzuchtbedingungen wurden eingesetzt:

PAR :  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Temperatur :  $24^{\circ}\text{C}$  (Licht) /  $20^{\circ}\text{C}$  (Dunkel)

Lichtphase : 16 h

Dunkelphase : 8 h

## 2.6. Ermittlung der phytotoxischen Grenzkonzentration von Schwermetallen

### 2.6.1. Quecksilber und Cadmium

Um die phytotoxische Grenzkonzentration von Quecksilber und Cadmium beim Wachstum von *Hordeum vulgare* zu bestimmen, wurden verschiedene Quecksilber- und Cadmiumkonzentrationen im Anzuchtmedium eingestellt. Die Konzentrationen orientierten sich an in Ökosystemen vorkommenden Werten, wie sie auch von Heidenreich (1999) eingesetzt wurden. Der Versuchsplan ist in nachstehenden Tabellen 10 und 11 gezeigt. Jeder einzelne Versuch wurde parallel vier Mal wiederholt. Eine Bonitur des Wachstums und der Morphologie der Pflanzen wurde täglich durchgeführt.

Tabelle 10: Versuchsplan zur Ermittlung der phytotoxischen Grenzkonzentration von Quecksilber.

| Versuchsnummer | c(HgCl <sub>2</sub> )<br>[μM] |
|----------------|-------------------------------|
| A0             | 0                             |
| A1             | 2,5                           |
| A2             | 5,0                           |
| A3             | 10,0                          |
| A4             | 20,0                          |
| A5             | 30,0                          |
| A6             | 40,0                          |

Tabelle 11: Versuchsplan zur Ermittlung der phytotoxischen Grenzkonzentration von Cadmium.

| Versuchsnummer | c(Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O)<br>[μM] |
|----------------|---|
| B0             | 0   |
| B1             | 2,5   |
| B2             | 5,0   |
| B3             | 10,0  |
| B4             | 20,0  |
| B5             | 30,0  |
| B6             | 40,0  |
| B7             | 50,0  |
| B8             | 75,0  |
| B9             | 100,0   |

### 2.6.2. Bestimmung der Polyamingehalte in Gerste durch HPLC

Die Gehalte der Polyamine Putrescin, Spermin und Spermidin als Indikatoren einer Stressbelastung durch Cadmium wurden durch HPLC bestimmt. Hierzu wurden 100 mg in flüssigem Stickstoff homogenisiertes Pflanzenmaterial mit 1250 μl 5% (v/v) Perchlorsäure (Sigma) versetzt und 60 min inkubiert. Nach anschließendem Zentrifugieren wurde der Überstand abgenommen, erneut zentrifugiert und ein Aliquot von 15 μl zur Derivatisierung eingesetzt. Die Derivatisierung erfolgte durch Zugabe von 360 μl 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> (Sigma), 100 μl Aceton (Sigma) und 200 μl FMOC (Sigma) (0,1 mM) zu diesen 15 μl Überstand und anschließender Inkubation für zunächst 5 min bei Raumtemperatur und dann 10 min bei +50°C. Nach dem Abkühlen der Probe auf Eis wurden 300 μl Methanol zu Probe zugegeben und der gut gemischte Ansatz in ein HPLC-Probengefäß pipettiert.

Die HPLC-Anlage (Merck/Hitachi) mit dem Integrator D 2500, der Säule Spherisorb ODS II 5 μm Typ NC (Bischoff, Leonberg, Deutschland) und dem Detektor RF 551 (Shimadzu, Duisburg, Deutschland) wurde mit folgenden Parametern betrieben:

Probenvolumen: 40  $\mu$ l

Puffer A: Reinstwasser (Millipore, Eschborn, Deutschland), ultraschallentgast

Puffer B: Methanol (Merck), HPLC-Qualität, entgast

Flussrate: 1 ml / min

Laufpuffergradient:

0 – 30 Minuten : 80% - 100% B

30 – 37 Minuten: 100% B

37 – 42 Minuten: 100% - 80% B

42 – 45 Minuten: 80% B

Die Detektion erfolgte bei einer Extinktion von 260 nm und einer Emission von 313 nm. Die Ergebnisse wurden aus den Areas als nmol Polyamin / g FG berechnet.

### 2.6.3. Platin

Für Platin wurde ein vergleichbares Vorgehen wie bei Quecksilber und Cadmium zur Bestimmung der phytotoxischen Grenzkonzentration gewählt. Nach dem in nachstehender Tabelle 12 gezeigten Versuchsplan wurden Agarkulturen mit verschiedenen Platinkonzentrationen im Medium angelegt und das Wachstum und die Morphologie der Gerstenpflanzen in den verschiedenen Varianten täglich bonitiert. Jede Variante wurde parallel drei Mal wiederholt.

Tabelle 12: Versuchsplan zur Ermittlung der phytotoxischen Grenzkonzentration von Platin.

| Versuchsnummer | PtCl <sub>4</sub> [ $\mu$ M] |
|----------------|------------------------------|
| C0             | 0                            |
| C1             | 20                           |
| C2             | 40                           |
| C3             | 60                           |
| C4             | 80                           |
| C5             | 100                          |

### 2.7. Anzucht von Pflanzenmaterial für molekularbiologische Versuche

Um die molekularen Effekte einer Quecksilberexposition in Gerstenblättern durch molekularbiologische Methoden zu bestimmen, wurden ausgehend von den im ersten Versuch beobachteten Phänomenen Gerstenpflanzen *in vitro* auf Agar angezogen. Neben einer Kontrolle ohne HgCl<sub>2</sub>-Zusatz wurden Pflanzen auf Agar mit 40 μM HgCl<sub>2</sub> angezogen. Das darauf gewachsene Pflanzenmaterial (Blattgewebe) wurde im Alter von sechs Tagen geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Um genügend Pflanzenmaterial zu erhalten und individuelle Variationen einzelner Pflanzen zu eliminieren, wurden Pflanzen aus jeweils fünf Phytatray-Gefäßen geerntet und zu einem Pflanzenpool gemischt. Das gefrorene Pflanzenmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend bei -80°C als Kryokonserven aufbewahrt.

Zur Untersuchung der molekularen Effekte einer Quecksilberexposition in Gerstenwurzeln, in Folgeversuchen aber auch in Gerstenblättern, wurde Gerste im beschriebenen Schwimmschicht-Hydrokulturverfahren angezogen. Um genügend Pflanzenmaterial (Wurzelgewebe und/oder Blattgewebe) zu erhalten und Variationen einzelner Pflanzen zu eliminieren, wurden jeweils drei bis fünf identische Kulturen parallel angelegt. Nach der Ernte wurde das Wurzelgewebe sofort für ca. 5 Sekunden in Aqua dest. gespült und anschließend unverzüglich in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Blattgewebe wurde wie beschrieben behandelt und ebenfalls sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das gefrorene Pflanzenmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff gemörsert und als Kryokonserven bei -80°C aufbewahrt.

Zur Untersuchung der molekularen Effekte einer Cadmium- und Platinexposition in Gerstenpflanzen wurde analog zu den Anzuchtversuchen mit Quecksilber vorgegangen. Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche wurde eine Cadmiumnitrat-Konzentration von 40 μM und eine Platinchlorid-Konzentration von ebenfalls 40 μM in den Anzuchtmedien eingestellt. Diese Werte liegen im ökotoxikologisch sinnvollen Bereich und erlauben zudem einen Vergleich zwischen den einzelnen Schwermetallexpositionen.

### 2.8. Anzucht von Pflanzen zur Proteomanalyse

Um eine Proteomanalyse am IPK Gatersleben durchzuführen, wurden Gerstenpflanzen wie unter 2.7. beschrieben kultiviert und das erhaltene Pflanzenmaterial entsprechend zu Kryokonserven aufgearbeitet. Für die Proteomanalyse wurden jeweils drei Proben aus parallel angezogenen, unabhängigen Pflanzenpools zu Verfügung gestellt.

### 2.9. Kulturversuche auf Bodenproben und auf Kultursubstrat

Die vom Institut für Bödenökologie (IBÖ, GSF) erhaltenen Bodenproben wurden in Kunststoffeimer (Fa. Helit, Kierspe, Deutschland) gefüllt und gleichmäßig mit Leitungswasser befeuchtet. Anschließend wurde das Saatgut auf die Oberfläche ausgebracht und mit einer dünnen Schicht (5 mm) des entsprechenden Bodens abgedeckt. Die Eimer wurden im Gewächshaus bei ca. +12°C kultiviert.

Für Vorversuche wurde eine kleine Menge (200 g) des Bodens in Bechergläser gefüllt und einige Karyopsen der Gerstensaart darauf ausgelegt. Die Bechergläser wurden wie die In-vitro-Kulturen in einer Klimakammer kultiviert.

Um eine definierte Quecksilberexposition beim Wachstum von Gerstenpflanzen auf erdigen Substraten zu ermöglichen, wurde ein Standard-Kultursubstrat (Einheitserde<sup>®</sup> vom Einheitserde Werkverband, Sinntal-Jossa, Deutschland) mit 100 mg Quecksilber kg<sup>-1</sup> Substrat beaufschlagt. Hierzu wurde die berechnete Menge HgCl<sub>2</sub> in Wasser gelöst und das Substrat damit gleichmäßig durchfeuchtet. Das kontaminierte Substrat und unkontaminiertes Substrat für Kontrollversuche wurde analog dem Vorgehen bei den Versuchen mit der Bodenprobe in Kunststoffeimer gefüllt und Gerste darauf angesät. Die Kultur erfolgte im Gewächshaus bei ca. +12°C.

### 2.10. Bestimmung der Schwermetallgehalte in Pflanzen- und Bodenproben

Die Bestimmung der Schwermetallgehalte in Pflanzen- und Bodenproben wurde von der GSF-internen Arbeitsgruppe „Spurenelementanalytik und Speciation“ mit Herrn Peter Schramel mittels ICP-MS bzw. ICP-OES durchgeführt.

### 2.11. Isolierung von RNA

Aus je circa 100 mg des tiefgefrorenen Pflanzenmaterials wurde mit TRIZOL® (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) RNA isoliert. Die Isolation beruht auf einer Einschnitt-RNA-Extraktion mit einem einphasigen Extraktionspuffer aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, wie sie durch Chomczynski et al. (1987) beschrieben wurde. Nach zweimaliger Reinigung des wässrigen RNA-Extrakts mit Chloroform wurde die RNA mit kaltem iso-Propanol gefällt und durch Zentrifugation mit 13000 rpm in einer Unviersalkühlfuge Modell 32 (Hettich, Tuttlingen, Deutschland) pelletiert. Das so erhaltene RNA-Pellet wurde mit kaltem 70% Ethanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Das so gewonnene, trockene RNA-Pellet wurde in DEPC-Wasser resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Um ausreichend hohe RNA-Konzentrationen zu erhalten, wurden die RNA-Pellets mehrerer Reaktionsgefäße (1,5 ml) vereinigt. Die so präparierte RNA wurde einer qualitativen und quantitativen Kontrolle unterzogen. Durch photometrische Messung der  $\text{OD}_{260}$  mittels einem Photometer Modell 3100pro (Ultrospec, Cambirdge, UK) wurde der RNA-Gehalt in der Lösung bestimmt, wobei zudem durch die Messung der  $\text{OD}_{230}$  und der  $\text{OD}_{270}$  eine Aussage über die Reinheit und Qualität der RNA getroffen werden kann. Zur weiteren Kontrolle der RNA-Qualität wurde  $1\mu\text{g}$  RNA auf einem 1% Agarose-Gel aufgetragen und mit Ethidiumbromid (Sigma) angefärbt und dem Beladungspuffer zur visuellen Überwachung des Elektrophorese-Laufs zudem Bromphenolblau (Sigma) und Xylencyanolgrün (Sigma) zugesetzt. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel mittels eines UV-Transilluminators (Bachofer, Reutlingen, Deutschland) bei  $\lambda=302\text{ nm}$  visuell bewertet und ggf. fotografiert.



### 2.12. Isolierung von mRNA

Aus einem Aliquot der RNA-Lösung wurde mit dem Oligitex<sup>®</sup> mRNA MIDI Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) mRNA isoliert. Die Aufreinigung beruht auf der Bindung der poly-A-Sequenzen der mRNA über Wasserstoffbrückenbindung an oligo-T-beschichtete Partikel, wie sie Kuribayashi et al. (1988) beschrieb.

Zur Isolation der mRNA wurde die gesamt-RNA mit dem mitgelieferten Extraktionspuffer versetzt und zu diesem Ansatz die Latexsuspension hinzupipettiert. Nach kurzer Inkubation bei +70°C, die die Zerstörung der Sekundärstruktur der RNA bewirkt, wurde die Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei binden die poly-A-Sequenzen der mRNA an die oligo-T-Sequenzen auf der Oberfläche der Latexpartikel. Nach mehreren Waschschritten mit dem Waschpuffer wurde die an die Latexpartikel gebundene mRNA mit dem auf +70°C erhitzten Extraktionspuffer wieder gelöst. Aufgrund der relativ geringen mRNA-Konzentration im Eluent war es notwendig, dieses mit iso-Propanol zu versetzen und die mRNA mindestens über Nacht, gegebenenfalls auch bis zu 72 Stunden bei +4°C zu fällen. Nach dem Abzentrifugieren (14000 rpm, 30 Minuten bei +4°C) wurde das mRNA-Pellet mit kaltem 70% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Das getrocknete Pellet wurde sodann in sterilem Wasser resuspendiert und die so erhaltene mRNA wie für die Gesamt-RNA beschrieben qualitativ und quantitativ durch photometrische Bestimmung der OD<sub>260</sub>, OD<sub>230</sub>, OD<sub>270</sub> und durch Gelelektrophorese bewertet.

### 2.13. Subtraktive-Suppressions-Hybridisierung

Die isolierte mRNA diente als Ausgangsmaterial für die Subtraktive-Suppressions-Hybridisierung (SSH). Diese Vielschritt-Methode wurde mit dem PCR-Select<sup>™</sup> cDNA Subtraction Kit (BD Biosciences, Palo Alto, USA) durchgeführt. Das Experiment folgt dem in Abbildung 3 gezeigten Prinzip und beruht auf der selektiven Amplifikation von DNA-Molekülen, die in einer der beiden Proben vermehrt enthalten ist, wie sie Diatchenko et al. (1996 und 1999) beschrieb. Dadurch können Sequenzen angereichert werden, die in einem Organismus differentiell exprimiert werden.

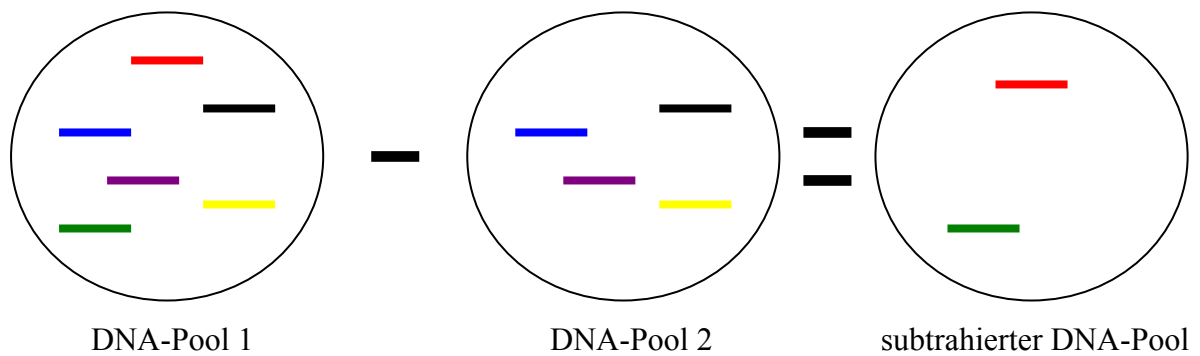


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Grundprinzips der Subtraktiven-Suppressions-Hybridisierung.

Das Vorgehen bei diesem Experiment ist in folgendem Versuchsschema (Abbildung 4) wiedergegeben, das die unten aufgeführte exakte Beschreibung der Versuchsdurchführung vereinfacht darstellt.

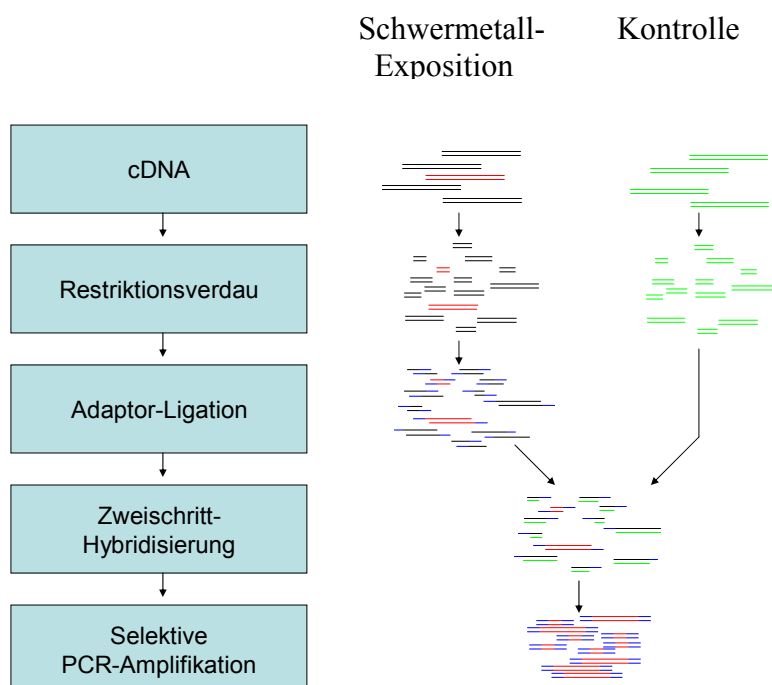


Abbildung 4: Übersicht über das Versuchsschema der Subtraktiven-Suppressions-Hybridisierung.

### 2.13.1. Herstellung der Driver- und Tester-cDNA

Zunächst wurde aus der mRNA eine cDNA-Erststrangsynthese durchgeführt, indem zu 2 µg der mRNA 1 µl cDNA-Syntheseprimer (BD Biosciences) zugegeben und der Ansatz kurz bei +70°C denaturiert wurde. Anschließend erfolgte der Zusatz von 5 µl Erststrang-Puffer, 1 µl dNTP-Mix, 1 µl Wasser und 1 µl AMV Reverse Transkriptase (alle BD Biosciences). Dieser Ansatz wurde zwei Stunden bei +42°C inkubiert. Daran schloss sich eine cDNA-Zweitstrangsynthese an, die durch Zugabe von 16 µl Zweitstrang-Puffer, 1,6 µl dNTP-Mix, 48,4 µl Wasser und 4,0 µl 20x Zweitstrang-Synthese Enzymcocktails und 2 µl T4 DNA-Polymerase (alle BD Biosciences) und einer Inkubation bei +16°C für 30 Minuten erzielt wurde. Die so erhaltene doppelsträngige cDNA wurde nun mit dem Restriktionsenzym Rsa I geschnitten. Bei der Durchführung dieses cDNA-Verdaus zeigte sich, dass die Standardbedingungen (15 Units Rsa I, +37°C, 1,5 h) nicht zu einem brauchbaren Ergebnis führen. Deshalb wurden die Reaktionsbedingungen entsprechend modifiziert und die cDNA mit 22 Units Rsa I bei +37°C für 3 h inkubiert. Aliquots der so erhaltenen cDNA-Fragmente wurden nun mit den im Kit enthaltenen Adaptoren ligiert, um die entsprechende Tester-DNA zu gewinnen. Ein Aliquot der cDNA wurde mit dem Adaptor 1 (1-1, 2-1, 3-1 etc.), ein weiteres Aliquot mit dem Adaptor 2R (1-2, 2-2, 3-2 etc.) ligiert. Dazu wurde die cDNA mit dem entsprechenden Adaptor, T4 Ligase und dem Ligations-Puffer versetzt. Als unsubtrahierte Tester-Kontrolle (1-c, 2-c, 3-c etc.) fungierte ein Gemisch aus jeweils 2 µl des Testeransatzes 1 und 2. Nach der Inkubation über Nacht bei +68°C war die Herstellung der beiden (mit jeweils einem der Adaptoren ligierten) Tester-cDNAs und der (mit beiden Adaptoren ligierten) unsubtrahierten Tester-Kontrolle beendet.

### 2.13.2. Hybridisierung

Nun erfolgte die Hybridisierung der Tester-cDNAs mit Aliquots der cDNA ohne Adaptorligation, die als Ausgangsmaterial für die Gewinnung der Driver-cDNA diente. Dazu wurde jeweils ein Aliquot der mit einem der Adaptoren ligierten Tester-cDNA mit der korrespondierenden Driver-cDNA (unligiertes Aliquot der komplementären cDNA) im Überschuß und in Anwesenheit des im Kit mitgelieferten Hybridisierungs-Puffers zunächst bei +98°C für 1,5 Minuten und anschließend bei +68°C für acht Stunden inkubiert. Nach

dieser ersten Hybridisierung wurden die beiden mit den unterschiedlichen Adaptoren ligierten Proben gemischt und frisch denaturierte Driver-cDNA hinzugefügt. Dadurch erfolgte die Anreicherung differenziell exprimierte Sequenzen und die Bildung neuer Hybridmoleküle mit unterschiedlichen Adaptoren an jedem Ende. Wichtig war dabei, dass die beiden mit unterschiedlichen Adaptoren ligierten Proben gleichzeitig mit dem denaturierten Driver gemischt wurden. Dazu erfolgte die Aufnahme der ersten Probe in eine Pipettenspitze, dann das Aufsaugen von etwas Luft als Trennblase und anschließend die Aufnahme des denaturierten Drivers. Diese beiden Tropfen wurden sodann zügig in die zweite Probe hinein ausgeblasen und durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren gemischt. Unverzüglich daran schloss sich die zweite Hybridisierung bei +68°C über Nacht an. Nach dieser Hybridisierung wurden die Reaktionsprodukte mit 200 µl des mitgelieferten Verdünnungspuffers verdünnt und erneut bei +68°C für sieben Minuten inkubiert.

### 2.13.3. Supressions-PCR

Diese verdünnte cDNA diente als Ausgangsmaterial für die nun folgenden PCR-Schritte. Bei der ersten PCR beschränkte sich die exponentielle Amplifikation auf ds-cDNAs mit unterschiedlichen Adaptoren an jedem Ende (mit anderer Adaptorkombination ligierte cDNAs unterliegen maximal linearer Amplifikation). In der zweiten PCR wurden dann diese differentiell exprimierten Sequenzen angereichert und der Hintergrund aus anderen cDNA-Fragmenten weiter reduziert.

Die erste PCR erforderte die Herstellung eines Master-Mix (Tabelle 13). Jeweils 1 µl der verdünnten cDNA aus der oben beschriebenen Hybridisierung und der verdünnten unsubtrahierten Tester-Kontrolle wurden mit einem Aliquot (24 µl) des Master-Mix versetzt und bei +75°C für 5 Minuten inkubiert, um den fehlenden Strang der Adaptoren einzufügen und damit Bindungsstellen für die PCR-Primer zu schaffen. Unmittelbar anschließend erfolgte dann die Inkubation des Ansatzes mit dem nachstehenden Zyklus-Programm.

Tabelle 13: Master Mix für die erste PCR (Mengenangaben pro Reaktion).

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| Steriles DEPC-H <sub>2</sub> O | 17,0µl |
| PCR-Reaktionspuffer            | 2,5µl  |
| MgCl <sub>2</sub> -Lösung      | 2,5µl  |
| dNTP-Mix (10mM)                | 0,5 µl |
| PCR Primer 1 (10µM)            | 1,0 µl |
| GoldStar Taq-Polymerase        | 0,5µl  |
| Σ                              | 24,0µl |

## Zyklusprogramm 1. PCR:

27 Zyklen:

|                |        |              |
|----------------|--------|--------------|
| Denaturierung: | + 94°C | 40 sec       |
| Annealing:     | + 66°C | 40 sec       |
| Extension :    | + 72°C | 1 min 45 sec |

An diese 1. PCR schloss sich eine zweite PCR an. In dieser erfolgte die Amplifikation mit zwei nested-PCR-Primern nach folgendem Zyklusprogramm. Da die Ergebnisse der ersten PCR stark variieren können, wurden bei der zweiten PCR zwischen 10 und 15 Zyklen durchgeführt. Die Kontrolle des jeweiligen DNA-Gehalts durch Gelelektrophorese ermöglichte die Wahl der Zykluszahl, bis eine ausreichende Konzentration für die Ligierung der PCR-Produkte in den Vektor erreicht, eine unnötige Erhöhung des Hintergrunds aufgrund überhöhter Amplifikation jedoch vermieden werden konnte. Zur Durchführung der zweiten PCR wurde ein Aliquot (3 µl) des Produkts aus der ersten PCR 1:10 mit sterilem DEPC-Wasser verdünnt und 1 µl dieses verdünnten Produkts mit 24 µl des in nachstehender Tabelle 14 beschriebenen Master Mix für die zweite PCR versetzt. Daraufhin erfolgte sofort die Inkubation mit dem nachstehend beschriebenen Zyklusprogramm.

Tabelle 14: Master Mix für die zweite PCR (Mengenangaben pro Reaktion).

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| Steriles DEPC-H <sub>2</sub> O | 16,0 µl |
| PCR-Reaktionspuffer            | 2,5 µl  |
| MgCl <sub>2</sub> -Lösung      | 2,5 µl  |
| dNTP-Mix (10mM)                | 0,5 µl  |
| Nested PCR Primer 1 (10µM)     | 1,0 µl  |
| Nested PCR Primer 2R (10µM)    | 1,0 µl  |
| GoldStar Taq-Polymerase        | 0,5 µl  |
| Σ                              | 24,0 µl |

## Zyklusprogramm 2. PCR:

10-15 Zyklen:

|                |        |              |
|----------------|--------|--------------|
| Denaturierung: | + 94°C | 40 sec       |
| Annealing:     | + 68°C | 40 sec       |
| Extension :    | + 72°C | 1 min 45 sec |

Diese zweiteilige PCR-Amplifikation wurde zweimal komplett (erste *und* zweite PCR) durchgeführt und die als geeignet betrachteten Aliquote der Produkte der zweiten PCR vereinigt. Dieses vereinigte PCR-Produkt diente als Ausgangsmaterial für die Insertion der amplifizierten cDNAs in den Vektor.

## 2.14. Identifizierung differentiell exprimierter Gene

2.14.1. Transformation mit pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor

Die PCR-Produkte wurden in den pGEM<sup>®</sup>-TVektor mit dem Easy Vector Kit inseriert (Promega, Mannheim, Deutschland). Die Ligation von Sequenzen in zirkuläre Vektoren basiert auf den Protokollen von Sambrook et al. (1989). Hierzu wurde, angelehnt an das Versuchs-Protokoll des Kits bzw. die erwähnten Protokolle aus der Literaturreferenz, die in

nachstehender Tabelle 15 beschriebenen Agenzien in 0,5 ml Eppendorff-Gefäßen kombiniert und bei +12°C über Nacht inkubiert, um ein Maximum an ligierten Vektoren zu erhalten.

Tabelle 15: Reaktionsmix für Transformationen (Mengenangaben pro Reaktion).

|                  |                |
|------------------|----------------|
| Ligations-Puffer | 5 µl           |
| pGEM-T Vektor    | 1 µl           |
| PCR Produkt      | 3,5 µl         |
| T4 DNA Ligase    | 1 µl           |
| <b>Σ</b>         | <b>10.5 µl</b> |

Anschließend erfolgte die Transformation dieser ligierten Vektoren in kompetente Bakterienzellen (*E. coli*) (Sambrook et al., 1989). 2 µl des Produkts aus der Ligation wurden mit 50 µl der kompetenten Zellen JM 109 High Efficiency Competent Cells (Promega) versetzt und vorsichtig gemischt. Nach der Inkubation für 20 Minuten auf Eis erfolgte dann anschließend für 45 bis 50 Sekunden bei einer Temperatur von exakt +42°C die Hitzeschock-Behandlung. Der Transformationsansatz wurde danach unverzüglich wieder für zwei Minuten auf Eis gekühlt und anschließend nach Hinzupipettieren von 950 µl sterilem SOC-Medium bei +37°C für 90 Minuten im Laborschüttler (New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) bebrütet.

#### 2.14.2. Isolierung einzelner Klone

Aliquots (100 µl) der so gewonnenen transformierten Bakteriensuspension wurden mit einem Drygalski-Spatel auf Agarplatten ausplattiert und die Nährböden bei +37°C für 16 bis 24 Stunden bebrütet. Als Selektivagar kam LB-Medium mit Ampicillin (25 µM) zum Einsatz. Die gewachsenen Kolonien waren Klone der transformierten Zellen. Sie wurden von der Agaroberfläche abgenommen und jeweils in eine Kavität einer Mikrotiterplatte eingimpft. In den Kavitäten wurde zuvor 100 µl LB-Glycerin-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) vorgelegt. Die Platten dienten nach einer Bebrütung für circa 15 Stunden bei +37°C als Dauerkultur zur Kryokonservierung bei -80°C.

## 2.14.3. Herstellung der Array-Membranen

Die Herstellung der Array-Membranen orientierte sich am Vorgehen von Sahr et al. (2005). Zur Herstellung der Array-Membranen erfolgte die Amplifikation der Inserts der einzelnen Klone durch PCR. 1 µl der Bakteriensuspension aus jeder Kavität der Dauerkultur wurden in die entsprechende Kavität (gleiche Position) einer PCR-Mikrotiterplatte (ABGene, Epsom, UK) überimpft und mit 99 µl des in Tabelle 16 beschriebenen PCR Master-Mix versetzt. Die Amplifikation erfolgte nach Variante A mit den nested PCR Primern 1 und 2R des SSH-Kits (Amplifikation über die Adaptoren) oder alternativ nach Variante B mit M13-Primern (Amplifikation des Vektors). Die PCR-Mikrotiterplatte wurde sodann bei +94°C für fünf Minuten prädenaturiert und anschließend mit folgendem Zyklusprogramm inkubiert.

Tabelle 16: Master Mix für die PCR zur Insert-Amplifikation (Mengenangaben pro Reaktion).

| <b>Variante</b>                | <b>A</b>       | <b>B</b>       |
|--------------------------------|----------------|----------------|
| Steriles DEPC-H <sub>2</sub> O | 70,8 µl        | 70,85 µl       |
| PCR-Reaktionspuffer            | 10,0 µl        | 10,0 µl        |
| MgCl <sub>2</sub> -Lösung      | 10,0 µl        | 10,0 µl        |
| dNTP-Mix (10mM)                | 2,0 µl         | 2,0 µl         |
| Nested PCR Primer 1 (10µM)     | 3,0 µl         |                |
| Nested PCR Primer 2R (10µM)    | 3,0 µl         |                |
| M13 Primer uni                 |                | 3,0 µl         |
| M13 Primer rev                 |                | 3,0 µl         |
| GoldStar Taq-Polymerase        | 0,15 µl        | 0,15 µl        |
| <b>Σ</b>                       | <b>99,0 µl</b> | <b>99,0 µl</b> |

Zyklusprogramm für Insert-Amplifikation:

38-40 Zyklen:

|                |        |   |
|----------------|--------|---|
| Denaturierung: | + 94°C | 1 min   |
| Annealing:     | + 68°C | 1 min (bei Verwendung der nested-Primer 1 und 2R) |
|                | +55°C  | 1 min (bei Verwendung der M13-Primer)             |
| Extension :    | + 72°C | 3 min   |



Nach dem letzten Zyklus wurden die Reaktionsansätze noch weitere sieben Minuten bei +72°C inkubiert und danach sofort auf +4°C abgekühlt.

Aus einigen randomisiert ausgewählten Kavitäten erfolgte die Entnahme eines Aliquots zur Überprüfung auf einem 2% Agarose-Gel (mit Ethidiumbromid), um eine erste Funktionskontrolle der PCR durchzuführen. Anschließend wurden jeweils 4 µl aus jeder Kavität entnommen, mit 2 µl Beladungspuffer versetzt und auf einem 2% Agarose-Gel (mit Ethidiumbromid) überprüft. Dadurch konnte das Ergebnis der PCR für jeden einzelnen Klon überprüft werden und ungeeignet erscheinende Klone (Doppelbande, „leerer“ Klon etc.) wurden eliminiert.

Die so gewonnenen PCR-Produkte wurden zur Aufreinigung in eine MANU-Filterplatte (Millipore) übertragen (wieder unter strikter Beibehaltung der Klon-Position auf der Platte). Durch Anlegen eines Vakuums an den Filterboden der Platte (Absaugwerkzeug von Millipore) erfolgte die Absaugung der Flüssigkeit aus den Kavitäten. Die PCR-Produkte verblieben in den Kavitäten und konnten in 35 µl Wasser resuspendiert werden. Die so aufbereitete DNA wurde nun aus den Kavitäten der Filterplatten in die entsprechenden Kavitäten einer neuen Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) überführt. Diese Mikrotiterplatte diente als DNA-Quelle für den MicroGrid-Spotter (Genomic Solution, Huntingdon, UK).

Aus den Mikrotiterplatten wurde mit dem Micro-Grid-Spotter DNA-Lösung entnommen und auf Hybond-Nylon-Membranen (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) aufgetragen. Die Auftragung der DNA-Lösung wurde zehnmal pro Spot wiederholt, um genügend DNA auf die Nylonmembran zu übertragen. Pro Kavität wurden jeweils zwei Spots angelegt und in definierter Art und Weise auf der Membran angeordnet. Jeweils 16 mögliche Spot-Positionen (4x4) waren zu einem Grid zusammengefasst. In einem solchen Grid waren die Spots aus Kavitäten mit gleicher Position auf den unterschiedlichen Quell-Mikrotiterplatten angeordnet. Das bedeutet, dass in einem Grid zum Beispiel alle A1-Spots der Platten 1 bis 7, im nächsten alle A2-Spots der Platten 1 bis 7 usw. zu finden sind. Da wie bereits beschrieben aus jeder Kavität zwei Spots aufgetragen wurden, ergaben sich 14 Spots. Zwei der möglichen 16 Spot-Positionen blieben somit frei und dienten der Orientierung im Grid.

Die Spots in jedem Grid waren nach dem gleichen Muster angeordnet. Ein Beispiel dieses Musters ist in Abbildung 5 dargestellt. Die jeweilige Ziffer bezeichnet die Nummer der Quellplatte.

|   |   |   |   |
|---|---|---|---|
| 1 | 5 | 2 | 4 |
| 3 |   | 7 | 6 |
| 2 | 4 |   | 3 |
| 1 | 6 | 5 | 7 |

Abbildung 5: Beispiel eines Spot-Musters im Grid. Die Ziffern bezeichnen die Nummer der Quellplatte.

Die so hergestellten Array-Membranen wurden nach vollständiger Trocknung bei Raumtemperatur in einem Stratalinker (Stratagene, La Jolla, USA) durch UV-Bestrahlung ( $E=120\text{mJ}$ ) mit der Nylonmembran vernetzt und anschließend denaturiert. Dazu erfolgte die Inkubation der Membranen zunächst fünf Minuten in einer wässrigen Lösung mit 1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH. Anschließend wurde sie für fünf Minuten in einer wässrigen Lösung mit 1,5 M NaCl und 0,5M Tris gewaschen und danach noch weitere fünf Minuten in 2x SSC inkubiert. Die so denaturierten DNA-Spots auf den Membranen wurden bei Raumtemperatur luftgetrocknet und dann nochmals durch UV-Bestrahlung ( $E=120\text{ mJ}$ ) mit der Nylonmembran vernetzt.

#### 2.14.4. Prähybridisierung der Array-Membranen

Vor der eigentlichen Hybridisierung mit den radioaktiv markierten DNA-Sonden erfolgte eine Prähybridisierung der Array-Membranen. Dazu wurde ein Prähybridisierungspuffer jeweils frisch hergestellt. Pro zu prähybridisierender Membran wurden die erforderlichen Substanzen in einem Falcon-Tube kombiniert (Tabelle 17) und bei  $+68^\circ\text{C}$  für zehn Minuten vorgewärmt.

Tabelle 17: Zusammensetzung des Prähybridisierungspuffers.

|                  |            |
|------------------|------------|
| 20x SSC          | 750 µl     |
| 100x Denhardts   | 150 µl     |
| 10% SDS          | 75 µl      |
| H <sub>2</sub> O | Ad 3000 µl |

Parallel dazu wurden pro Reaktion 30 µl Salmon Sperm-DNA-Lösung (10mg DNA / ml H<sub>2</sub>O) bei +96°C für zehn Minuten denaturiert und anschließend zwei Minuten auf Eis gekühlt. Diese denaturierte DNA-Lösung wurde dem vorgewärmten Prähybridisierungspuffer zugesetzt.

Die benötigten Membranen wurden jeweils mit der Oberseite (Seite mit den DNA-Spots) nach innen in ein Hybridisierungsröhrchen eingelegt und mit 3 ml des Prähybridisierungspuffers für fünf Stunden bei +68°C in einem Hybridisierungsofen (Uniequip, Martinsried, Deutschland) inkubiert.

#### 2.14.5. Herstellung <sup>33</sup>P-markierter DNA-Sonden

Als Ausgangsmaterial zur Herstellung <sup>33</sup>P-markierter DNA-Sonden dienten die cDNAs aus der Suppressions-PCR. Für die Markierungsreaktion kam <sup>33</sup>P-dATP (370 MBq ml<sup>-1</sup>) (Amersham Biosciences) zum Einsatz. Um unabhängige Wiederholungen durchzuführen, wurde die cDNA für jede Hybridisierung mit der unter 2.13.3 beschriebenen Suppressions-PCR (erste *und* zweite PCR) neu hergestellt. Zur Analyse differentiell exprimierter Gene wurde sowohl die subtrahierte als auch die unsubtrahierte cDNA benötigt. Die so erhaltenen PCR-Produkte konnten nun mit dem Random Priming DNA Labeling System (Invitrogen) radioaktiv markiert werden. Hierbei wurde analog den Darstellungen von Feinberg und Vogelstein (1983) vorgegangen.

20 µl des PCR-Produkts wurden zunächst für 10 Minuten bei +96°C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt und dann mit den in der folgenden Tabelle 18 genannten Substanzen versetzt.

Tabelle 18: Reaktionsmix für DNA-Labeling (Mengenangaben pro Reaktion).

|   |                  |
|---|------------------|
| $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{dATP}$ (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ) | 5 $\mu\text{l}$  |
| dCTP  | 2 $\mu\text{l}$  |
| dGTP  | 2 $\mu\text{l}$  |
| dTTP  | 2 $\mu\text{l}$  |
| Random Primers Buffer Mixture   | 15 $\mu\text{l}$ |
| Klenow Fragment   | 1 $\mu\text{l}$  |
| H <sub>2</sub> O  | 3 $\mu\text{l}$  |
| $\Sigma$  | 50 $\mu\text{l}$ |

Dieser Ansatz wurde nun für zwei Stunden bei +25°C inkubiert. Danach erfolgte die Aufreinigung der so radioaktiv markierten DNA über ein Micro-Spin-Säulchen 200 (Amersham Biosciences), in das die DNA überführt und bei 3000 rpm für 120 sec zentrifugiert wurde. Das Eluat enthielt nun die aufgereinigte markierte DNA. Bevor diese zur Hybridisierung eingesetzt werden konnte, erfolgte eine Bestimmung der Aktivität durch Flüssigkeits-Scintillation. Hierzu wurde ein 1  $\mu\text{l}$ - Aliquot mit 10 ml Enhancer Hydroluma (Baker, Groß-Gerau, Deutschland) versetzt und im Scintillator (Beckman, Fullerton, USA) vermessen. Aus der gemessenen Aktivität konnte sodann die für die Hybridisierung einzusetzende Menge an radioaktiv markierter DNA errechnet werden.

#### 2.14.6. Hybridisierung der Array-Membranen

Zur Identifikation differentiell exprimierter Gene wurden pro subtraktiver DNA-Bank vier Array-Membranen benötigt. Zwei Membranen wurden mit den subtrahierten DNAs, die anderen zwei mit den entsprechenden unsubtrahierten DNAs hybridisiert. Die prähybridisierten Array-Membranen wurden mit dem Prähybridisierungspuffer in den Hybridisierungsröhrchen belassen. Zur Hybridisierung jeder Array-Membran erfolgte jeweils nach Sahr et al. (2005) die Zugabe der gleichen Menge (bezogen auf die enthaltene Radioaktivität, ca.  $10^7$  Counts/min) der hergestellten radioaktiv markierten DNA zum Prähybridisierungspuffer. Die Hybridisierung erfolgt bei +68°C über Nacht. Nach der

Hybridisierung wurden die Membranen zweimal 20 Minuten mit 2xSSC, 0,5% SDS und anschließend zweimal 20 Minuten mit 0,2x SSC, 0,5% SDS gewaschen.

#### 2.14.7. Autoradiographische Auswertung der Hybridisierung

Die radioaktiv hybridisierten Membranen wurden bei Raumtemperatur auf Fuji BAS-IHIS-Bildplatten (Fuji-Europe, Düsseldorf, Deutschland) aufgelegt. Die Expositionsdauer betrug zwischen 6 und 48 Stunden. Nach Einlesen der Bildplatten mit dem IP-Scanner Fuji (Fuji) konnte die Intensität der einzelnen Spots mit der Auswertungs-Software ArrayVision™ 6.0 (InterFocus, Mering, Deutschland) bestimmt werden. Die Software vergleicht dazu die Intensitäten der Spots auf der mit vorwärts subtrahierter cDNA hybridisierten Membran mit den Intensitäten der korrespondierenden Spots auf der mit rückwärts subtrahierter cDNA hybridisierten Membran. Zudem führt die Software dabei Statistikprogramme aus, die neben einer Hintergrundkompensation auch die Normalisierung der Ergebnisse ermöglicht. Der Quotient aus den beiden so ermittelten Intensitäten ergab den Induktionswert, der zur Selektion potentiell differentiell exprimierter Gene benutzt wurde.

#### 2.14.8. Identifizierung potentiell differentiell exprimierter Klone

Die Hybridisierung der Array-Membranen wurde dreimal wiederholt. Nach autoradiographischer Auswertung der Hybridisierung erfolgte der Vergleich der erhaltenen Induktionswerte der einzelnen Klone. Wie unter 2.14.3. beschrieben, wurde jeder Klon zweimal auf die Array-Membran aufgetragen. Nach den drei unabhängigen Wiederholungen sind somit sechs Induktionswerte verfügbar. Wenn diese Induktionswerte einheitlich eine Signifikanzgrenze über- oder unterschritten, wurde der Klon als potentiell differentiell exprimiert betrachtet und selektiert.

### 2.14.9. Sequenzierung

Die in 2.14.8. selektierten Klone wurden von ihren Quellplatten in eine 96-deep-well-Platte mit LB-Medium (+100 mg Ampicillin/l) überimpft und bei +37°C für ca. 16 Stunden im Laborschüttler bebrütet. Die Sequenzierung erfolgte durch die Fa. Medigenomix (Martinsried, München). Für die Sequenzierung kam ein M13-Primer (forward) zum Einsatz.

### 2.14.10. Identifikation selektierter Klone

Die von der Fa. Medigenomix gelieferten Sequenzen wurden mit der NCBI-Datenbank verglichen, um das entsprechende Gen zu identifizieren. Hierzu war es notwendig, in der Rohsequenz die Teile der Sequenzen des Vektors und die Sequenzen der Adaptoren der SSH zu eliminieren und das tatsächliche Insert zu isolieren. Die Sequenz des isolierten Inserts wurde online über BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) zur Datenbankanalyse eingesetzt.

### 2.14.11. Beschreibung identifizierter Klone

Die wie in 2.14.10. beschriebenen identifizierten Klone wurden in eine Ergebnisliste aufgenommen. Für sie wurde jeweils der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung (n=6) ihrer in den Makroarray-Analysen beobachteten Induktionsfaktoren (s. 2.14.7.) berechnet und angegeben, wobei hierbei Induktionsfaktoren >1 eine Induktion und Induktionsfaktoren <1 eine Repression bedeuten. Zudem erfolgte die Angabe der Akzessionsnummer, des e-Wertes, der Spezies und der Homologie des Datenbanktreffers.

## 2.15. Mikroarray-Analysen

### 2.15.1. Erstellung eines Mikroarrays mit PCR-Produkten

Aus den aus Makroarray-Analysen bekannten und selektierten Klonen wurden durch PCR die Sequenzen der jeweiligen Gene amplifiziert. Hierzu wurde ein Aliquot der *E. coli*-Suspension (1  $\mu$ l) als Template in eine PCR-Multiwellplatte pipettiert und mit 99  $\mu$ l des in nachstehender Tabelle 19 beschriebenen PCR-Mastermixes versetzt.

Tabelle 19: PCR-Mastermix zur Erstellung eines Mikroarrays (Mengenangaben pro Reaktion).

|                                   |              |
|-----------------------------------|--------------|
| Steriles DEPC-H <sub>2</sub> O    | 16,0 $\mu$ l |
| PCR-Reaktionspuffer               | 2,5 $\mu$ l  |
| MgCl <sub>2</sub> -Lösung         | 2,5 $\mu$ l  |
| dNTP-Mix (10mM)                   | 0,5 $\mu$ l  |
| Nested PCR Primer 1 (10 $\mu$ M)  | 1,0 $\mu$ l  |
| Nested PCR Primer 2R (10 $\mu$ M) | 1,0 $\mu$ l  |
| GoldStar Taq-Polymerase           | 0,5 $\mu$ l  |
| $\Sigma$                          | 24,0 $\mu$ l |

Anschließend wurde eine PCR durchgeführt, bei der folgendes Zyklusprogramm eingesetzt wurde:

1. Initiationsdenaturierung: +95°C 60 sec
2. Denaturierung: +95°C 30 sec
3. Annealing: +66°C 45 sec
4. Extension: +72°C 90 sec

Die Schritte 2, 3 und 4 wurden 40mal wiederholt und von einem finalen Extensionsschritt bei +72°C für 10 Minuten abgeschlossen.

Nach gleichem Vorgehen erfolgte zudem auch die Amplifikation weiterer Klone aus anderen GSF-Projekten (ggf. mit anderen Primern, z.B. M13) und die Vorbereitung für die Verwendung auf dem Mikroarray, da der entwickelte Array auch in anderen Forschungsvorhaben eingesetzt werden sollte.

Ein Aliquot von 5 µl wurde auf ein 1% Agarosegel (mit Ethidiumbromid) aufgetragen und eine Gelelektrophorese durchgeführt, um den erfolgreichen Verlauf der PCR zu überprüfen.

Die so hergestellten und qualitativ überprüften PCR-Produkte wurden analog dem in 2.14.3. beschriebenen Vorgehen über Filterplatten aufgereinigt. Die gewonnenen PCR-Produkte wurden in MANU-Filterplatten (Millipore) übertragen. Durch Anlegen eines Vakuums an den Filterboden der Platte konnte die Flüssigkeit aus den Kavitäten abgesaugt werden. Die PCR-Produkte verblieben in den Kavitäten und wurden mit 100 µl Wasser resuspendiert und nochmals abgesaugt. Die so aufbereitete DNA wurde nun aus den Kavitäten der Filterplatten mit 50 µl Wasser eluiert und in die entsprechenden Kavitäten einer neuen Mikrotiterplatte (Nunc) überführt.

Die eluierten PCR-Produkte aus der Aufreinigung wurden in einer Platten-Vakuum-Trocknungszentrifuge eingedampft, anschließend in 10 µl Wasser aufgenommen und nach einem vorher festgelegten Schema in eine 384-Mikrotiterplatte (Nunc) überführt. In jede Kavität der 384-Platte wurden zudem 10 µl 2x Betain-Spottingpuffer (6x SSC und 3M Betain) hinzupipettiert und sorgfältig mit der DNA-Lösung gemischt. Die so vorbereitete Platte diente als Quellplatte für die Mikroarray-Produktion im Mikrogrid-Spotter.

Auf aldehydbeschichtete Glas-Objektträger (Genetix Deutschland, München, Deutschland) wurde mit dem MicroGrid-Spotter und einem 4-Nadel-Werkzeug aus sämtlichen Kavitäten jeweils 2 nl DNA-Spottingpuffer-Lösung aufgetragen. Pro Objektträger wurden zwei Wiederholungen nebeneinander aufgetragen.

Nach einer Trocknungsphase von zwei bis vier Tagen, während der die aufgetragene DNA an die Aldehydgruppen an der Glasoberfläche band, wurden die Objektträger durch Inkubieren in Natriumtetraborat-Lösung geblockt. Hierzu wurden die Objektträger zunächst zweimal für



je zwei Minuten in 0,1% SDS gewaschen und anschließend zweimal für je zwei Minuten in ddH<sub>2</sub>O gespült. In einer unmittelbar zuvor zubereiteten Lösung aus 0,75 g NaBH<sub>4</sub> (Sigma) in 200 ml PBS und 75 ml 100% Ethanol erfolgte sodann die Inkubation der Objektträger für fünf Minuten, um die freien Aldehydgruppen auf der Objektträgeroberseite zu reduzieren. Nach diesem Reduktionsschritt wurde der Objektträger für zwei Minuten in siedendes ddH<sub>2</sub>O getaucht, um die DNA zu denaturieren.

Die so geblockten und anschließend luftgetrockneten Objektträger wurden dann für die Hybridisierungsversuche mit CY-markierten DNA-Sonden eingesetzt.

### 2.15.2. Mikroarray-Hybridisierung

Die Mikroarray-Hybridisierung orientiert sich am Versuchsprotokoll von Hasseman (2001). Zunächst wurde aus dem entsprechenden Pflanzenmaterial wie unter 2.11. beschrieben RNA extrahiert und diese qualitativ und quantitativ bewertet. Jeweils 25 µg der RNA wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert und in einer Vakuum-Zentrifuge (Univapo 150H) (UniEquip) eingedampft. Das RNA-Pellet wurde anschließend wieder in 14,5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Zu dieser RNA-Lösung wurden 4 µl Oligo-dT-Primer (Promega) pipettiert und anschließend der Reaktionsansatz für 10 Minuten bei +70°C in einem Thermocycler inkubiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden dem Reaktionsansatz 6 µl 10x First Strand Buffer, 3 µl 0,1 M DTT, 0,6 µl 50x Aminoallyl-dNTP-Mix (Sigma) und 2,5 µl SuperScript II (Invitrogen) zugefügt. Zur cDNA-Synthese wurde der Ansatz dann über Nacht bei +42°C im Thermocycler inkubiert.

Restliche RNA in der synthetisierten cDNA wurde sodann durch Hinzupipettieren von 10 µl 1 M NaOH und 10 µl 0,5 M EDTA und 15 Minuten inkubieren bei +65°C hydrolysiert. Nach der Hydrolyse wurde der Reaktionsansatz durch Zugabe von 10 µl 1 M HCl neutralisiert.

Zum Aufreinigen der Reaktion mittels des PCR Purification Kits (Qiagen) wurden dem Reaktionsansatz 300 µl Puffer PB zugegeben. Nach gründlichem Mischen wurde der Ansatz auf ein PCR-Reinigungs-Säulchen aufgetragen und bei 13 000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Zum Waschen wurden anschließend zweimal jeweils 750 µl Phosphat-Waschpuffer auf die Säule aufgetragen und diese erneut zentrifugiert, wobei der Durchlauf jedes Mal verworfen wurde. Zum Eluieren der cDNA wurde zweimal jeweils 35 µl K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Elutionspuffer auf die Säulchen-Membran pipettiert, bei Raumtemperatur für fünf Minuten

inkubiert und anschließend bei 14 000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Die so erhaltenen 70 µl Eluat wurden sodann in einer Vakuum-Zentrifuge eingedampft.

Zur Bindung der Farbstoffe an die cDNA wurde in das Reaktionsgefäß mit der eingedampften cDNA 4,5 µl 0,1M Natriumcarbonat-Puffer hineinpipettiert und die cDNA darin gelöst. Anschließend wurden 4,5 µl des jeweiligen Farbstoffes CY3 oder CY5 (Amersham Biosciences), der nach Herstellerangaben in DMSO gelöst wurde, dem Reaktionsansatz zugefügt und dieser bei Raumtemperatur im Dunkeln für drei Stunden inkubiert.

Nach dem Binden des Farbstoffs wurde die cDNA von überschüssigem, nicht gebundenem Farbstoff gereinigt, indem dem Reaktionsansatz zunächst 35 µl 100 mM Natriumacetatpuffer mit pH 5,2 und 250 µl PB-Puffer zugegeben wurden. Der Reaktionsansatz wurde nun wieder auf ein PCR-Reinigungs-Säulchen aufgetragen und zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Zum Waschen wurden zweimal jeweils 750 µl Phosphat-Waschpuffer auf das Säulchen aufgetragen und dieses zentrifugiert, wobei der Durchlauf jedes Mal verworfen wurde. Zum Eluieren der gefärbten cDNA wurde zweimal jeweils 35 µl K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Elutionspuffer auf die Säulchen-Membran pipettiert, in Dunkelheit bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert und anschließend bei 14 000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Die so erhaltenen 70 µl Eluat enthielten die gefärbte cDNA aus einem Pflanzenmaterial. Um sie für eine vergleichende Array-Hybridisierung einzusetzen, wurden jeweils die zwei zu vergleichenden, unterschiedlich gefärbten cDNAs in einem Reaktionsgefäß gemischt (zum Beispiel cDNA aus Kontroll-Blattgewebe (CY3) mit cDNA aus mit Quecksilber behandeltem Blattgewebe(CY5)).

Bei den Mikroarray-Analysen wurde zusätzlich parallel ein Dye-Swap durchgeführt, um die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der Farbstoffe auszugleichen. Das heißt, es wurde ein zweiter Versuch parallel angesetzt, bei dem die cDNAs im Vergleich zum ersten Versuch jeweils mit dem anderen Farbstoff gefärbt wurden. Eine Mikroarray-Analyse bestand somit aus zwei parallelen Hybridisierungen mit jeweils zwei Wiederholungen pro Objektträger, wobei insgesamt vier cDNAs eingesetzt wurden.

Die so hergestellten und vereinigten cDNAs wurden in einer Vakuum-Zentrifuge eingedampft. In dieser Zeit wurde der Prähybridisierungspuffer (5x SSC, 0,1% SDS, 1% Rinder-Serumalbumin, sterilfiltriert) und der Hybridisierungssofen auf +42°C vorgewärmt. Die Objektträger wurden sodann prähybridisiert, in dem 50 µl Prähybridisierungspuffer auf die Objektträger pipettiert wurde und diese, dann mit Deckgläsern versehen, für 45 Minuten in Hybridisierungskammern (Biorad, München, Deutschland) im Hybridisierungssofen inkubiert wurden. Nach dem Prähybridisieren wurden die Objektträger in ddH<sub>2</sub>O gewaschen, um die Deckgläser und überschüssigen Prähybridisierungspuffer zu entfernen. Anschließend wurden die Objektträger in Isopropanol getaucht und bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Die eingedampften cDNAs wurden in 30 µl Hybridisierungspuffer (50% Formamid, 5x SSC und 0,1% SDS, sterilfiltriert) aufgenommen und für drei Minuten bei +95°C im Thermocycler denaturiert. Nach kurzem Abkühlen der Ansätze auf Eis wurden die Proben auf die Objektträger pipettiert. Die mit Deckgläsern versehenen Objektträger wurden dann in Hybridisierungskammern im Dunkeln über Nacht (16 bis 20 Stunden) im Hybridisierungssofen inkubiert.

Die hybridisierten Objektträger wurden anschließend aus den Hybridisierungskammern entnommen. Vor dem Scannen der Objektträger musste überschüssige, nicht gebundene cDNA entfernt werden. Hierzu wurden zwei Waschpuffer vorbereitet. Der Waschpuffer 1 (1x SSC, 0,1% SDS) wurde auf +42°C erwärmt. Darin wurden die Objektträger zwei Minuten gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger bei Raumtemperatur zweimal im Waschpuffer 2 (0,1x SSC, 0,1% SDS) einem zweiten und dritten Waschschrift für jeweils 2 Minuten unterzogen. Nach diesem Waschvorgang wurden die Objektträger in sterilem ddH<sub>2</sub>O mehrmals sorgfältig gespült, um das SSC und SDS vollständig zu entfernen. Die so vorbereiteten Objektträger wurden zum Trocknen bei 1000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert.

Die Objektträger wurden in einem FLA8000 Laser-Scanner (Fuji) bei 635 nm und 532 nm Wellenlänge gescannt.

### 2.15.3. Auswertung der Mikroarray-Analysen

Die Bilddateien der Mikroarrays wurden mit der Auswertungssoftware Advanced Image Data Analyzer 4.0 (AIDA) (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) ausgewertet. Der Vergleich der Fluoreszenzintensitäten eines Spots bei Laserscannung mit beiden unterschiedlichen Wellenlängen wurde als Zahlwert dargestellt. Aus den beobachteten Induktionsfaktoren wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und angegeben, wobei Werte  $>1$  eine Induktion, Werte  $<-1$  eine Repression des entsprechenden Gens bedeuten.

### 2.16. Überprüfung der Array-Ergebnisse

Die aus den Makroarray- und den Mikroarrayanalysen erhaltenen Ergebnisse wurden zusätzlich durch quantitative RT-PCR bestätigt. Hierzu erfolgte die cDNA-Synthese aus unabhängigen RNAs und die real-time RT-PCR nach dem im Folgenden beschriebenen Vorgehen.

#### 2.16.1. cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde aus entsprechenden Pflanzengewebe zunächst wie unter 2.11. beschrieben RNA isoliert und der photometrischen und visuellen Qualitätskontrolle unterzogen. Von einwandfreier RNA wurde anhand der photometrisch bestimmten Konzentration der wässrigen RNA-Lösung ein Aliquot entnommen, welches 5 µg RNA enthält. Diese 5 µg RNA wurden in einem Reaktionsgefäß mit 1 µl Oligo-dT-Primer bzw. 1 µl Random-Hexamer-Primer (Gibco, Eggenstein, Deutschland) vereinigt. Sodann erfolgte die Auffüllung des Reaktionsvolumens mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 12 µl. Dieser Reaktionsansatz wurde in einem Thermocycler für zehn Minuten auf +70°C erhitzt und anschließend eine Minute auf Eis gekühlt und daraufhin zum Reaktionsansatz 4 µl Reaktionspuffer, 1 µl dNTP-Mix, 2 µl DTT, 0,5 µl RNase-Inhibitor und bis zu 2,5 µl reverse Transcriptase (Superscript II bzw. Superscript III, Invitrogen) hinzupipettiert. Nach gründlichem Mischen und Zentrifugieren erfolgte die Inkubation des Reaktionsansatzes für 60 Minuten im

Thermocycler bei +42°C. Anschließend wurde die Temperatur für 15 Minuten auf +70°C erhöht und danach der Reaktionsansatz einige Minuten auf Eis gekühlt. Schließlich wurden zum Reaktionsansatz 1 µl RNase H (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und 5 µl RNase A (Fermentas) hinzupipettiert, um während einer anschließenden Inkubation für 20 Minuten bei +37°C die noch im Reaktionsansatz befindliche RNA abzubauen.

#### 2.16.2. cDNA-Quantifizierung

Die wie in 2.16.1. beschrieben synthetisierte cDNA wurde mit RiboGreen (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) quantifiziert. Hierzu wurde das RiboGreen-Reagenz nach Herstellerangaben 1:2000 mit TE verdünnt. Die zu quantifizierende cDNA wurde 1:100 mit TE verdünnt. 100 µl der verdünnten cDNA-Lösung wurden mit 100 µl frisch verdünntem RiboGreen versetzt und in eine schwarze Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend bei Raumtemperatur für 3 Minuten im Dunklen inkubiert. Danach wurde die Fluoreszenz der cDNA-Lösung in der Mikrotiterplatte mittels des Fluorimeters Fluostar (BLG, Offenburg, Deutschland) bei 480 nm Extinktion und 520 nm Emission gemessen. Die gemessenen Fluoreszenzen wurden durch die Auswertungssoftware EasyFit (BLG) auf einen zuvor eingemessenen Standard bezogen. Die Software lieferte als Bildschirmanzeige bzw. Ausdruck die cDNA-Konzentration in ng/µl. Jede cDNA-Quantifizierung wurde dreimal wiederholt und der Mittelwert der Messungen errechnet.

#### 2.16.3. Primer-Design für PCR

Für diverse PCR-Anwendungen wurden Primer entwickelt, deren Sequenz aus den Ergebnissen der Klon-Sequenzierung abgeleitet ist. Hierzu kam die Software Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) zur Verwendung. Für jedes identifizierte Insert wurde ein Primerpaar (forward und reverse) hergestellt, das entweder eine Amplifikation des gesamten Inserts oder eines Teils des Inserts ermöglichte. Die Länge der

Primer wurde so gewählt, dass sie möglichst günstig das technische Anforderungsprofil (z.B.  $\vartheta_m$  etc.) der PCR erfüllen.

#### 2.16.4. Überprüfung der PCR-Primer

Die tatsächliche Eignung der Primer für PCR-Anwendungen wurde durch PCR überprüft. Hierzu wurde ein cDNA-Template (1  $\mu$ l) mit einem 22  $\mu$ l Aliquot des in nachstehender Tabelle 20 gezeigten Standard-PCR-Mastermix und jeweils 1  $\mu$ l der nach Herstellerangaben in Aqua dest. gelösten Primer (forward und reverse) versetzt, woraus ein Endvolumen von 25  $\mu$ l resultierte. Der Reaktionsansatz wurde einem PCR-Zyklusprogramm mit 25 bis 30 Zyklen unterworfen. Das Zyklusprogramm orientierte sich dabei an den üblichen Standardwerten für Denaturierung (+95°C für 30 sec) und Extension (+72°C für 90 sec). Die Temperatur für das Primer-Annealing wurde entsprechend der spezifischen Schmelztemperatur der eingesetzten Primerpaare gewählt, meist lag sie im Bereich von +58°C bis +65°C. Diese Temperatur wurde für den Annealing-Schritt für 45 Sekunden gehalten.

Tabelle 20: Standard-PCR-Mastermix für die Überprüfung der PCR-Primer (Mengenangaben pro Reaktion).

|                                |              |
|--------------------------------|--------------|
| Steriles DEPC-H <sub>2</sub> O | 16,0 $\mu$ l |
| PCR-Reaktionspuffer            | 2,5 $\mu$ l  |
| MgCl <sub>2</sub> -Lösung      | 2,5 $\mu$ l  |
| dNTP-Mix (10mM)                | 0,5 $\mu$ l  |
| GoldStar Taq-Polymerase        | 0,5 $\mu$ l  |
| $\Sigma$                       | 22,0 $\mu$ l |

Nach der PCR wurde ein 5  $\mu$ l Aliquot des Reaktionsansatzes auf ein 1% Agarosegel (mit Ethidiumbromid) aufgetragen und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Anhand des im Transilluminator visuell bewerteten Gels konnte das Ergebnis der PCR bewertet werden. Ausschließlich PCR-Reaktionen, die auf dem Gel eine einzige distinkte Bande von zudem ausreichender Intensität zeigten, wurden positiv bewertet. Die bei diesen erfolgreichen PCR-Reaktionen eingesetzten Primer-Paare wurden bei den in der Test-PCR eingesetzten Bedingungen für spätere PCR-Anwendungen verwendet.

### 2.16.5. Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR wurde in einem TaqMan-Thermocycler (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurde cDNA als Template eingesetzt, die wie unter 2.16.1 und 2.16.2. beschrieben hergestellt und quantifiziert wurde. Um die unterschiedliche Abundanz entsprechender cDNA-Moleküle in Kontrolle und behandelte Variante zu bestimmen, wurden Realtime-PCR-Reaktionen mit cDNA-Templates aus Kontrollpflanzen und aus schwermetall-exponierten Pflanzen parallel im selben PCR-Lauf eingesetzt. Zudem wurde sowohl für die Kontroll-cDNA als auch für die cDNA aus den behandelten Pflanzen, entsprechend den Ergebnissen der cDNA-Quantifizierung, die gleiche Menge (1, 5 oder 10 ng) cDNA als Template für die Realtime-PCR-Reaktionen eingesetzt. Dieses cDNA-Template wurde pro Reaktion mit jeweils 1 µl des entsprechenden Primerpaares und 22 µl des einsatzfertig gelieferten Realtime-PCR-Mixes (SYBRGREEN, ABGene) versetzt und sorgfältig gemischt. Dieser Reaktionsansatz wurde sodann in die Kavität der Mikrotiter-Detektionsplatte (ABGene) pipettiert und diese mit einem transparenten Verschlussdeckel verschlossen. Jede Reaktion wurde zwei- oder dreimal parallel aufgetragen, die Ergebnisplots der Amplifikationskurven bestehen somit aus insgesamt vier bzw. sechs Einzelkurven (je zwei (drei) Kurven für Kontrolle und zwei (drei) für Behandlung). Zusätzlich wurden für jeden Lauf Reaktionen mit einem Reaktionsmix ohne cDNA-Template als NTC (negativ template control) mitgeführt. Darüber hinaus wurde über 18S-rRNA eine Normalisierung des cDNA-Templates überprüft. Das Zyklusprogramm wurde nach Herstellerangaben gewählt. Nach einmaligen Initiationsschritten bei zunächst +50°C für zwei Minuten und anschließend bei +95°C für zehn Minuten wurde der Zyklus mit Denaturierung (+95°C für 15 sec) und Extension (+72°C für 90 sec) fortgeführt. Die Annealing-Temperatur im Zyklusprogramm entsprach den in den Test-PCRs für die jeweiligen Primer als günstig festgestellten Temperaturen. Sie wurde für 45 Sekunden aufrechterhalten. Insgesamt wurden 40 Zyklen durchgeführt.

Die Auswertung der Realtime-PCR erfolgte qualitativ und quantitativ über die Ergebnisplots der Amplifikationskurven. Die relative Quantifizierung wurde nach dem von Pfaffl (2001) beschriebenen mathematischen Modell berechnet. Hierzu wurde nach nachstehender Formel der relative Expressionsquotient berechnet:

$$\textit{Expressionsquotient} = \frac{E_P^{\Delta Ct_P (\textit{MittelwertKontrolle} - \textit{MittelwertBehandlung})}}{E_R^{\Delta Ct_R (\textit{MittelwertKontrolle} - \textit{MittelwertBehandlung})}}$$

$E_P$ : Effizienz Probe

$E_R$ : Effizienz Referenz

$\Delta Ct_P$ : Differenz Ct-Werte Probe

$\Delta Ct_R$ : Differenz Ct-Werte Referenz

Die Berechnungen erfolgten mit dem Relative Expression Software Tool REST<sup>®</sup> Version 2.

## 2.17. Bestimmung der Phytoreduktion von $Hg^{2+}$

### 2.17.1. Pflanzenanzucht für Ausgasungsversuche

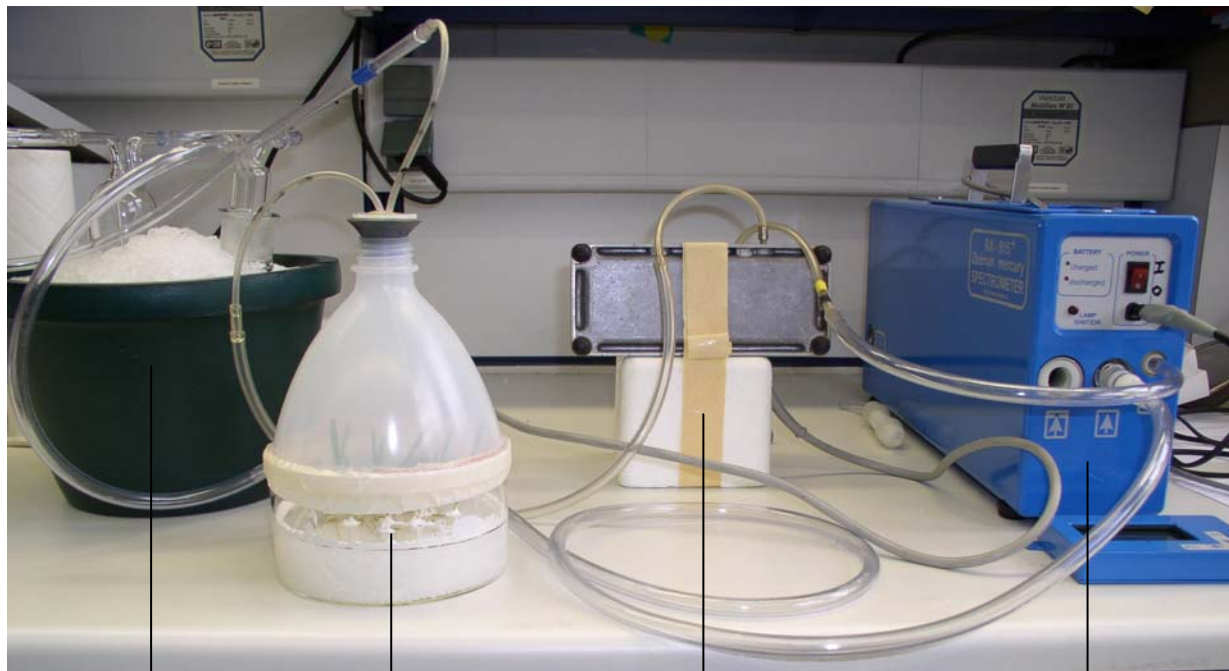
Gerstenpflanzen wurden wie in 2.4.2. beschrieben aus axenischem Saatgut mittels Schwimmschicht-Hydrokultur angezogen. In Vorversuchen zeigte sich, dass das Hydrokulturmedium nach Murashige & Skoog (Sigma) bereits eine direkte Reduktion des Quecksilbers bewirkt. Um irreführende Einträge reduzierten Quecksilbers direkt aus dem Medium zu eliminieren, wurde als Hydrokulturmedium modifiziertes Hoaglands E Medium (Acreman, Departement of Botany, University of Toronto (<http://www.mobot.org/jwcross/duckweed/media.htm>), in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt. Dieses zeigte kein nennenswertes Reduktionsverhalten gegenüber Quecksilber. Nach einer Kulturdauer von sechs Tagen wurden die Gerstenpflanzen für die weiteren Versuche dem Hydrokulturgefäß entnommen.



### 2.17.2. Messung von $\text{Hg}^0$ -Dampf im Gasstrom

Zur Bestimmung der Ausgasung von  $\text{Hg}^0$ -Dampf aus Pflanzen oder aus wässrigen Lösungen wurde ein Zeeman Atomabsorptions-Spektrometer (Modell RA-915, Lumex Co., St. Petersburg, Russland) eingesetzt. Das Gerät ist durch sehr hohe Empfindlichkeit und durch einen großen Messbereich (2-20000  $\text{ng/m}^3$ ) gekennzeichnet. Die Messwerte wurden online mit einer Aufzeichnungsrate von 1 Messwert/Sekunde von einem PC aufgezeichnet. Die Gasstromzirkulation während der Messung wurde durch eine externe Membran-Polwechsler-Pumpe aufrechterhalten und über ein manuelles Reduzierventil reguliert (Flussrate 5,8 bis 6,2 l/min). Vor dem Lumex RA-915 wurde eine Kühlfalle (Waschflaschen in Eis) in den Gasstrom eingeschaltet, um die relative Feuchtigkeit im Gasstrom abzusenken. Dies ist zur Vermeidung von Messfehlern aufgrund von Kondensation in der Messzelle des Geräts notwendig. Die  $\text{Hg}^0$ -Hintergrundkonzentration der Raumluft wurde als Basislinie für die Messungen festgelegt. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 6 gezeigt.

Je nach Zielsetzung der einzelnen Experimente (erwartete Höhe der Quecksilberausgasung) wurde entweder im offenen System (Ansaugung von Frischluft durch die Pumpe und Ausblasen der Abluft über Abluftkamin) oder im geschlossenen System (Rückführung der Abluft zur Pumpe) gearbeitet. Bei hohen Ausgasungsraten (Versuche mit Homogenaten bzw. Reinsubstanzen) musste im offenen System gearbeitet werden, um den Messbereich des Lumex RA-915 einzuhalten.



Kältefalle      Gasdichtes Kulturgefäß      Membranpumpe      Zeeman-AAS  
(mit Absaugglocke)

Abbildung 6: Versuchsaufbau zur Bestimmung der  $\text{Hg}^0$ -Ausgasung aus Gerstenpflanzen mittels Zeeman-AAS. Die Membranpumpe pumpt die Luft im geschlossenen System durch die Absaugglocke und das Zeeman-AAS, mit dem aus den Gerstenpflanzen evaporiertes  $\text{Hg}^0$  bestimmt wird.

### 2.17.3. Ausgasungsversuche aus Gerstenpflanzen im gasdichten Kultursystem

Die wie in 2.17.1. beschriebenen vorkultivierten Pflanzen wurden zur Bestimmung der Ausgasung von  $\text{Hg}^0$  in ein speziell zu diesem Zweck entwickeltes gasdichtes Kultursystem überführt. In einer Glasschale (Durchmesser 14 cm, Höhe 7,5 cm) wurde eine Schwimmschicht-Hydrokultur wie in 2.4.2. beschrieben angelegt, in die 16 Gerstenpflanzen eingebracht wurden. Als Hydrokulturmedium wurde das in 2.17.1. beschriebene Hoagland's E Medium mit einem Zuschlag von  $40 \mu\text{M HgCl}_2$  oder mit  $100 \mu\text{l}$  metallischem Quecksilber eingesetzt (vgl. Abbildungen 7 und 8). Für einen Versuchsvariante wurde statt der Hydrokultur sterile, gut durchfeuchtete Anzuchterde, die mit  $40 \mu\text{M HgCl}_2$  beaufschlagt war, eingefüllt und die Pflanzen in das erdige Substrat eingebettet.

Um direkte Diffusion von  $\text{Hg}^0$  aus dem Medium in den Luftraum zu verhindern, wurde der Wurzelraum (der Hydrokultursubstrat-Schwimmkörper mit dem Medium) gasdicht vom

Luftraum mit den Gerstenblättern getrennt. Hierzu wurde eine Polystyrol-Scheibe (Durchmesser 14 cm, Dicke 2,5 mm) in die Schale eingesetzt. Durch 16 gleichmäßig angeordnete Löcher in der Scheibe wurden die Gerstenpflanzen hindurchgeführt. Diese Löcher sowie der Spalt zwischen dem Rand der Polystyrol-Scheibe und der Glasschalens-Wand wurden sorgfältig mit Silikon-Dichtmasse (neutral vernetzend) abgedichtet.

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass für eine kurze Kulturdauer (einige Tage) die Pflanzen durch die Silikondichtmasse nicht in ihrer Vitalität beeinträchtigt wurden. Als Kontrollexperiment wurden identische Kulturschalen mit quecksilberhaltigem Medium angelegt. Diese Kontrollen wurden mit identischen Polystyrol-Scheiben (mit 16 Löchern) und mit der gleichen Silikondichtmasse abgedichtet (vgl. Abbildungen 7 und 8).

24 Stunden nach Anlage der gasdichten Kulturschalen mit den 16 Gerstenpflanzen bzw. der Kontrollen wurden die Messungen zur Ausgasung reduzierten Quecksilbers begonnen.

Hierzu wurde auf die Schalen eine glockenförmige Kunststoff-Haube (Oberteil einer PE-Enghalsflasche) aufgesetzt und diese gasdicht mit Isolierband auf der Schale befestigt. Durch den Hals der Kunststoff-Haube wurde zur Messung der  $\text{Hg}^0$ -Ausgasung ein Kautschukstopfen eingesetzt, durch den die Zu- und Abluft-Schläuche falschlufsticher geführt wurden (vgl. Abbildung 6). Unmittelbar vor Einsetzen des Stopfens wurde die Schale gründlich mit Raumluft gespült, um an den Oberflächen adsorbierte Quecksilberrückstände zu entfernen und eine Hintergrundkonzentration festzulegen. Die Messung begann unmittelbar nach Einsetzen des Kautschukstopfens und der damit beginnenden Zirkulation des Luftstroms zum Messgerät.

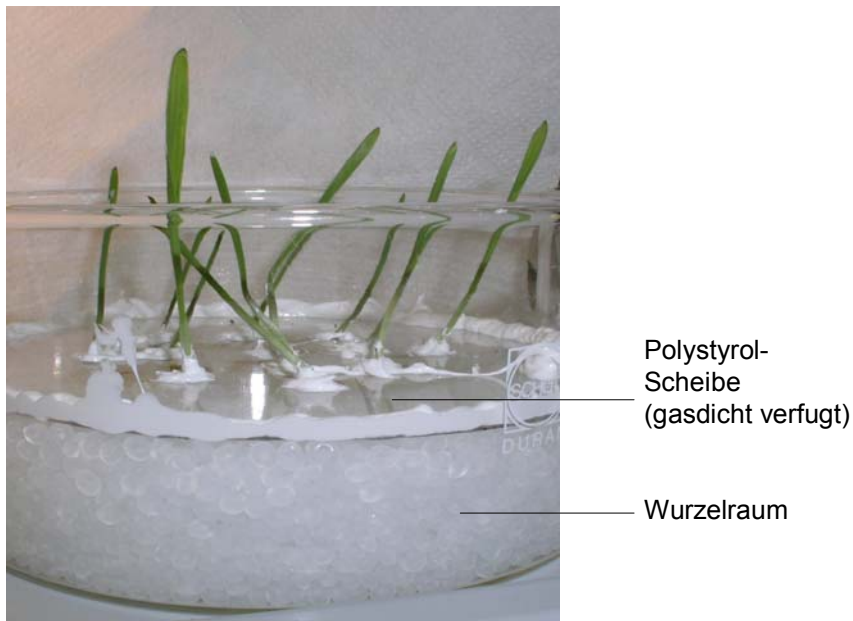


Abbildung 7: Gasdichtes Kulturgefäß für die Messung der  $\text{Hg}^0$ -Ausgasung aus Gerstenpflanzen. Der Wurzelraum (eine in mit Quecksilber kontaminiertem Medium schwimmende Substratschicht aus Polypropylengranulat) ist vom Blattraum durch eine gasdicht verfugte Polystyrol-Scheibe getrennt. Dadurch kann die eine direkte Ausgasung von  $\text{Hg}^0$  aus dem Medium geschlossen werden.

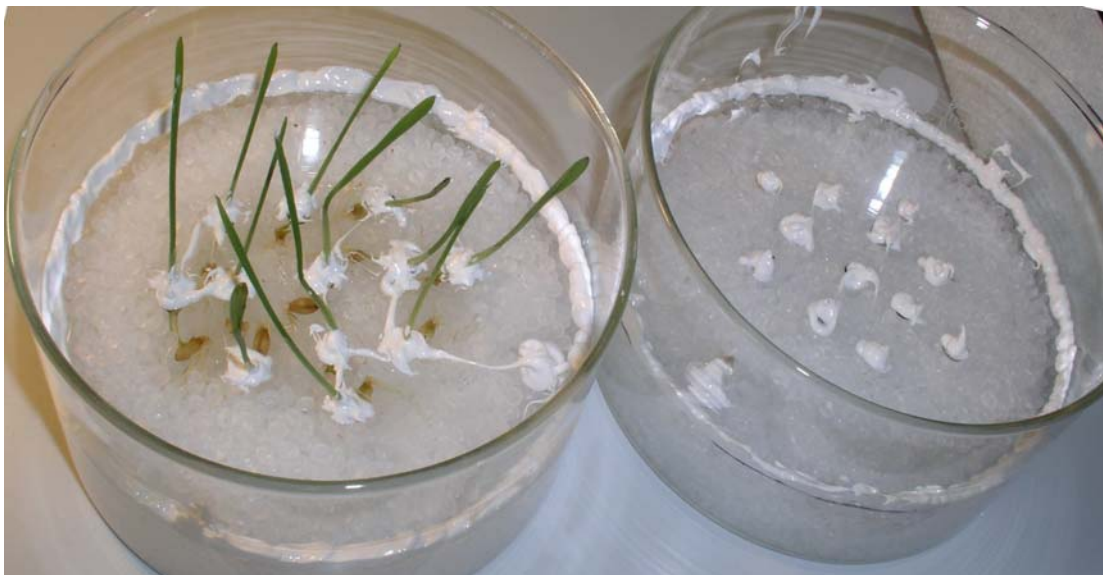


Abbildung 8: Gasdichte Kulturgefäße wie in Abbildung 7 gezeigt (links: mit Gerstenpflanzen; rechts: identisch aufgebautes Kontrollgefäß ohne Gerstenpflanzen).

#### 2.17.4. Ausgasungsversuche mit Homogenaten und Reinsubstanzen

Um die biochemischen Vorgänge bei der Phytoreduktion von  $\text{Hg}^{2+}$  zu  $\text{Hg}^0$  näher zu untersuchen, wurden auch Versuche zur Reduktion von  $\text{Hg}^{2+}$  durch Reinsubstanzen bzw. durch Pflanzengewebs-Homogenate durchgeführt. Hierzu wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau wie zur Bestimmung der Ausgasung von  $\text{Hg}^0$  aus lebenden Pflanzen verwendet. Statt der in 2.17.3. beschriebenen Kulturschale mit Kunststoff-Glocke wurde ein Dreihals-Rundkolben mit Glasschliff-Anschlüssen als Reaktionszelle verwendet. Durch den linken und rechten Hals wurde die Zu- bzw. Abluft geleitet, durch den mittleren Hals wurden die entsprechenden Substanzen zugefügt, wobei dieser Hals unmittelbar nach deren Zufügen während der Messung mit einem Glasschliff-Stopfen verschlossen wurde.

Im Kolben wurden 50 ml PBS mit  $\text{HgCl}_2$  vorgelegt. Für Versuche mit Pflanzengewebs-Homogenaten wurde eine  $\text{HgCl}_2$ -Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Bei Versuchen mit Reinsubstanzen wurde die Menge an  $\text{HgCl}_2$  auf 50 nM reduziert, um den Ausgasungs-Peak in beherrschbaren Grenzen zu halten. Der PBS-Puffer wurde mittels eines Rührfischs permanent perturbiert. Vor Zugabe der auf ihr reduktives Potential zu prüfenden Substanzen wurde die Einstellung einer stabilen  $\text{Hg}^0$ -Gleichgewichtskonzentration abgewartet und diese als Basislinie für die folgende Messung bestimmt.

##### Pflanzenhomogenate

Bei Erreichen einer stabilen Basislinie wurden dem Puffer 2 g Pflanzengewebs- Homogenat zugegeben. Dieses Homogenat wurde aus den wie unter 2.17.1. beschrieben angezogenen Gerstenpflanzen gewonnen, in dem entweder die entsprechenden Pflanzengewebe (z.B. Blätter) sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem Mörser fein vermahlen wurden, oder die Blätter zuvor autoklaviert (+121°C, 10 min) und anschließend in flüssigem Stickstoff gemörsert wurden. Die Homogenate wurde entweder tiefkalt als rieselfähiges Pulver oder als vorher in 5 ml PBS aufgeschwemmte Suspension zugefügt.

Für begleitende Versuche wurden Homogenate aus der Grünalge *Monostroma grevillei* nach gleichem Vorgehen hergestellt und zudosiert, um die Reduktion von Quecksilber durch Pflanzengewebshomogenate mit einer anderen Spezies zu bestätigen.

### Reinsubstanzen

Die untersuchten Reinsubstanzen  $\beta$ -NADPH (Tetra-Natriumsalz), reduziertes GSH und L-Ascorbinsäure (alle Sigma) wurden als Lösung in 500  $\mu$ l PBS zugefügt (jeweils 3 mg pro Versuch). Das übrige Vorgehen entsprach den Experimenten mit Pflanzengewebshomogenaten.

#### 2.18. Proteomanalyse

Blatt- und Wurzelgewebe aus der in 2.8. beschriebenen In-vitro-Kultur wurden für die Proteomanalyse durch 2-D-Gelelektrophorese in Zusammenarbeit mit dem IPK Gatersleben aufgearbeitet. Die Proteinextraktion aus Gewebehomogenat erfolgte über eine Fällung mit TCA-Aceton und anschließender Proteinlösung mit 8 M Harnstoff, 2 % CHAPS, 0,5 % IPG-Puffer und 20 mM DTT. Auf IPG-Streifen (Amersham) mit einem immobilisierten pH-Gradienten von 3-10 wurde der Proteinextrakt in der ersten Dimension aufgetrennt. Ein SDS-PAGE (Laemmli mit Sammelgel) wurde für die zweite Dimension eingesetzt. Nach Färbung der Gele mit kolloidalem Coomassie G250 und rechnergestützter Auswertung der Gelbilder wurden differentielle Proteinspots ausgestochen und mit MALDI-MS analysiert. Die Identifizierung der Proteinsequenzen erfolgte durch Mascot-Suche in NCBI und ipk-EST.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Versuchsergebnisse mit der Gerstensorte Barke

##### 3.1.1. Quecksilberexposition

Die *in vitro* auf Agar angezogenen Gerstenpflanzen wiesen deutliche durch  $\text{HgCl}_2$  verursachte Effekte auf. In Gefäßen mit  $40 \mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  im Medium zeigte sich eine deutliche Wachstumsdepression, die mit einer signifikant geringeren Bildung von Wurzelhaaren (an den in den Agar hineingewachsenen Wurzelteilen) und einer Erhöhung der Sekundärwurzelbildung einherging (vgl. Abbildungen 9-15). Für die weiterführenden molekularbiologischen Versuche wurde eine  $\text{HgCl}_2$ -Konzentration von  $40 \mu\text{M}$  gewählt.



Abbildung 9: Gerstenpflanzen mit verschiedenen  $\text{HgCl}_2$ -Konzentrationen im Medium nach 6 Tagen Wachstum. Ab  $30 \mu\text{M}$  ist eine Abnahme der Blattlängen zu beobachten.

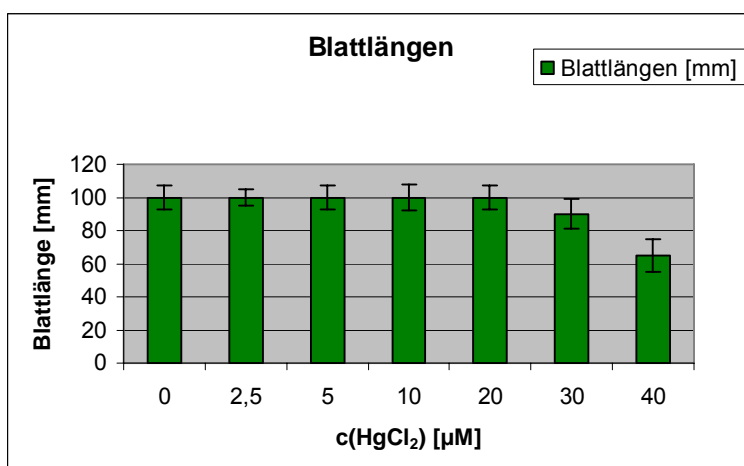


Abbildung 10: Blattlängen der Gersten nach 5 Tagen bei Wachstum auf Medien mit verschiedenen  $\text{HgCl}_2$ -Konzentrationen.

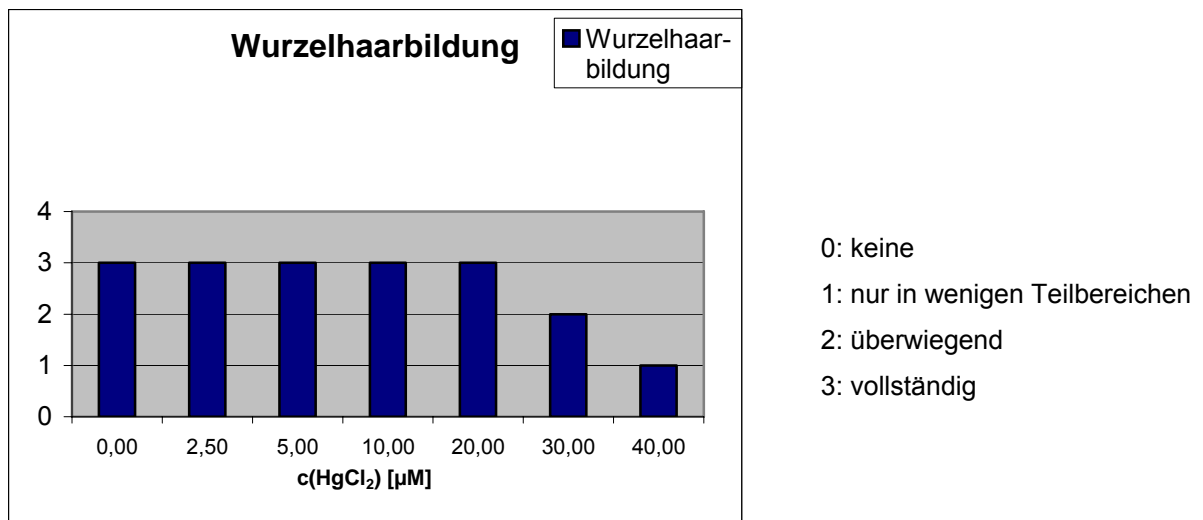


Abbildung 11: Wurzelhaarbildung der Gersten nach 5 Tagen bei Wachstum auf Medien mit verschiedenen HgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen.

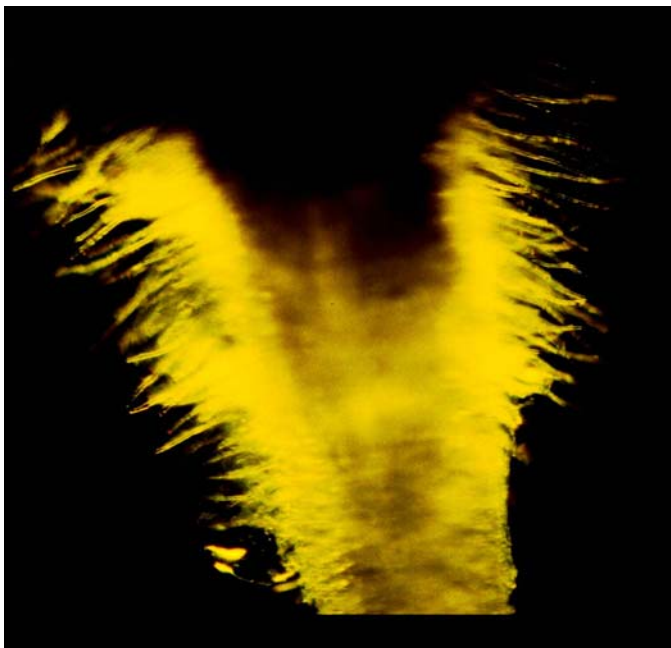


Abbildung 12: Ausgeprägte Wurzelhaarbildung bei Gerstenpflanzen aus Kontrollversuchen ohne Quecksilberexposition.



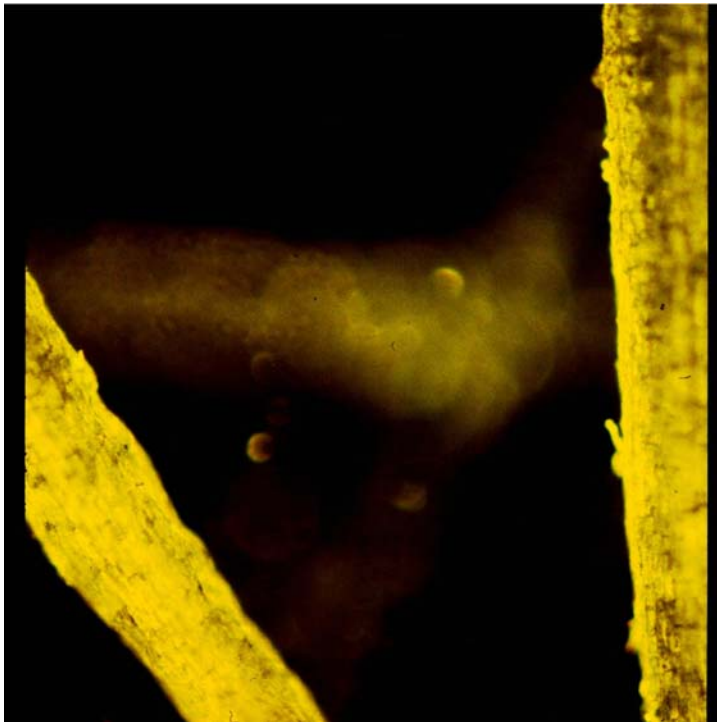


Abbildung 13: Fehlende Wurzelhaarbildung bei Versuchsgruppen mit 40µM HgCl<sub>2</sub> im Medium.



Abbildung 14: Gerstenwurzeln (11 Tage); oben: Wurzel aus 0 µM (Kontrolle), keine Sekundärwurzeln  
unten: Wurzel aus 40 µM HgCl<sub>2</sub>, zahlreiche Sekundärwurzeln

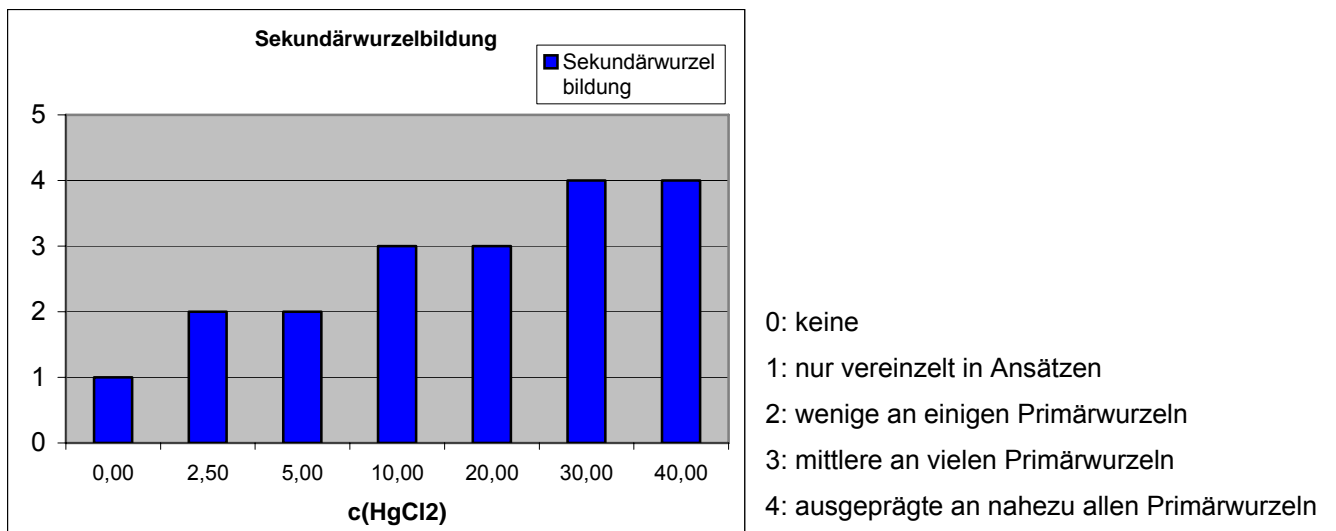


Abbildung 15: Sekundärwurzelbildung bei Gerstenpflanzen in Abhängigkeit von der Quecksilberkonzentration im Medium.

Die Spurenelementanalytik in geerntetem Pflanzenmaterial ergab, dass der Quecksilbergehalt in den Gerstenblättern mit der Quecksilberkonzentration im Agar positiv korreliert. Bis zu einer HgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 20 µM im Agar stieg der Gehalt in den Blättern nahezu linear an. Auch in den Wurzeln stieg die Konzentration an, allerdings war der Gesamtgehalt etwa um den Faktor 10 höher. Mit steigender Quecksilberkonzentration war zudem ein Anstieg des Trockensubstanzgehalts in den Blättern zu beobachten (vgl. Abbildungen 16, 17 und 18).

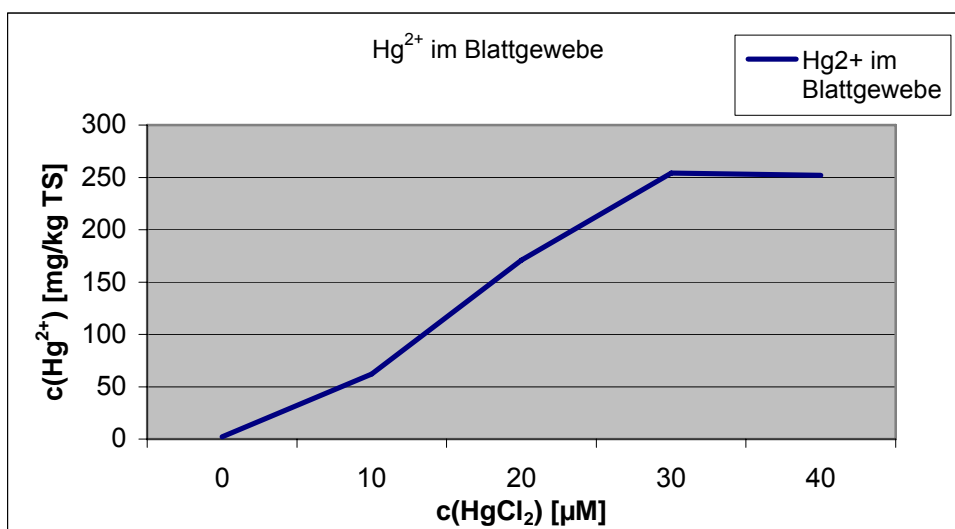


Abbildung 16: Zunehmende Konzentration von Hg<sup>2+</sup> im Blattgewebe bei Wachstum der Gerste auf Medien mit verschiedenen HgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen.

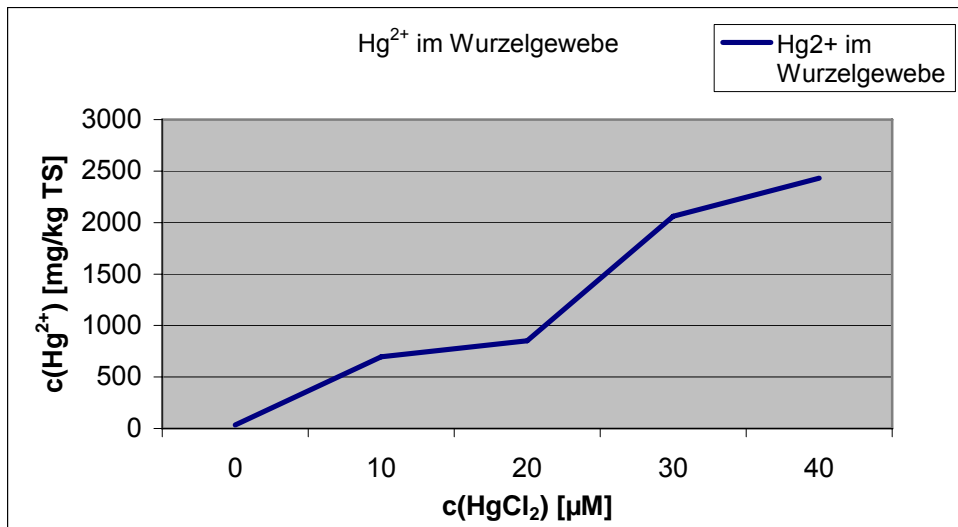


Abbildung 17: Zunehmende Konzentration von Hg<sup>2+</sup> im Wurzelgewebe bei Wachstum der Gerste auf Medien mit verschiedenen HgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen.

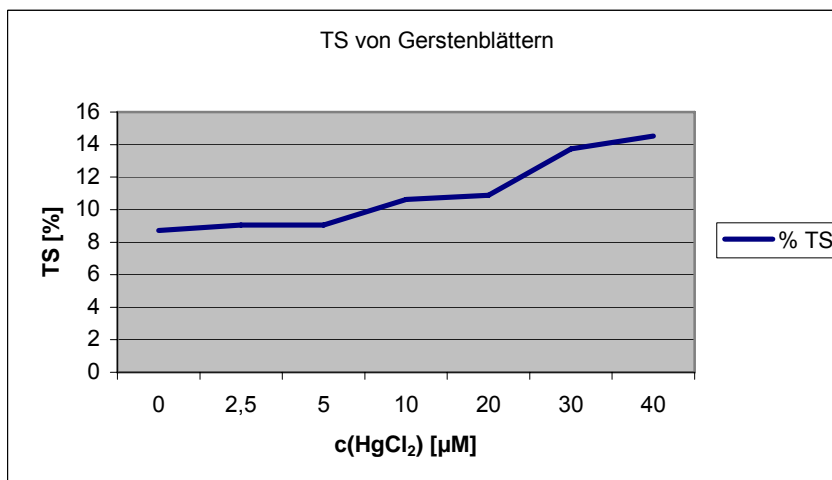
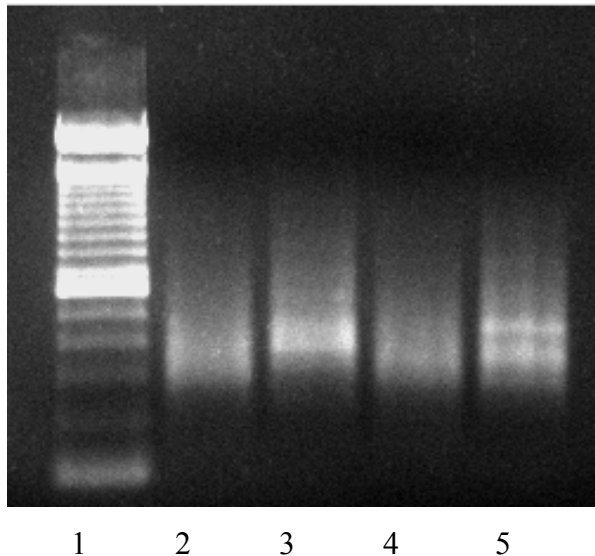


Abbildung 18: Zunehmender Trockensubstanzgehalt von Gerstenblättern bei Wachstum der Gerste auf Medien mit verschiedenen HgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen.

Aus Blattgewebe und Wurzelgewebe von Kontrollpflanzen und von auf mit 40  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  versetztem MS-Medium gewachsenen Pflanzen wurde sowohl eine vorwärts- als auch eine rückwärts-subtrahierte SSH durchgeführt (vgl. Abbildung 19). Aus der SSH wurden für Blattgewebe circa 700 und für Wurzelgewebe circa 500 Klone gewonnen, die in einem Makroarray weiter charakterisiert wurden.



Spur 1: DNA-Leiter 100bp  
Spur 2: cDNA subtrahiert (Kontrolle –  $\text{HgCl}_2$ )  
Spur 3: cDNA unsubtrahiert (Kontrolle)  
Spur 4: cDNA subtrahiert ( $\text{HgCl}_2$  – Kontrolle)  
Spur 5: cDNA unsubtrahiert ( $\text{HgCl}_2$ )

Abbildung 19: Typisches Bild subtrahierter und unsubtrahierter cDNA aus SSH-Versuchen.

Aus der autoradiographischen Auswertung der Hybridisierung konnten beim Vergleich der cDNA aus Blattgewebe von mit 40  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  behandelten Pflanzen mit cDNA aus Blattgewebe von unbehandelten Pflanzen 62 potentiell differentiell exprimierte Klone gefunden werden. Für die Versuche mit Wurzelgewebe konnten 57 potentiell differentiell exprimierte Klone gefunden werden. Abbildung 20 zeigt beispielhaft das Bild einer autoradiographischen Auswertung eines Makroarrays.

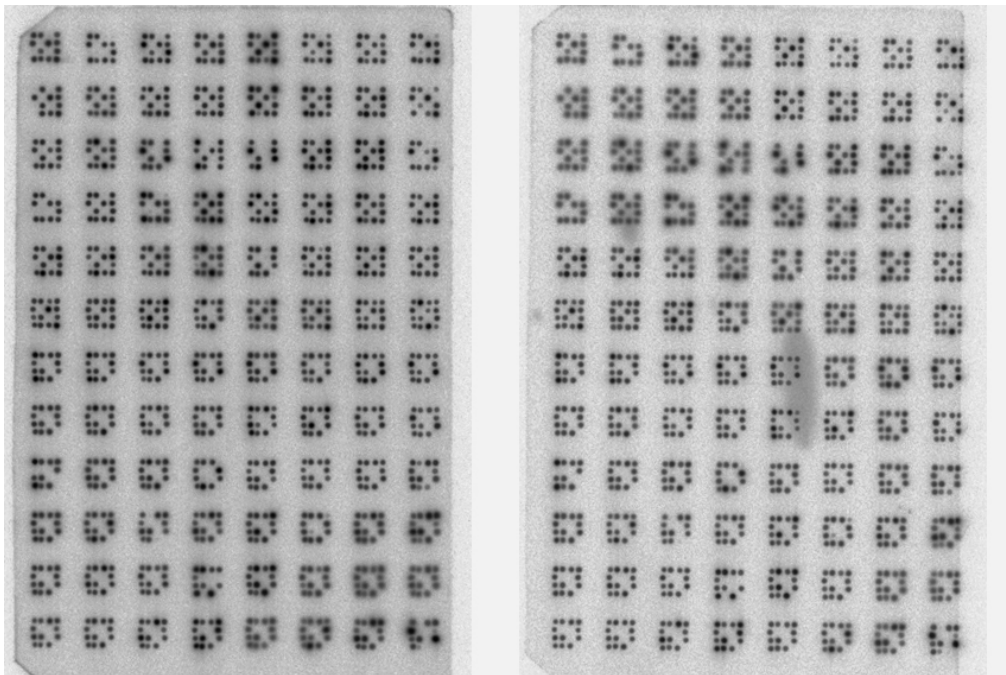


Abbildung 20: Beispiel einer autoradiographischen Auswertung eines Makroarrays.  
links: Hybridisierung mit Kontrolle  
rechts: Hybridisierung mit Behandlung  $\text{HgCl}_2$

Nach der Sequenzierung der Klone und anschließendem Vergleich der Sequenzen mit der NCBI-Datenbank konnten daraus für Blattgewebe 12 und für Wurzelgewebe 17 differentiell exprimierte Klone identifiziert werden, die Sequenzen der anderen Klone lieferten keine identifizierbaren Treffer beim Datenbankabgleich. Die nachstehenden Tabellen 21 und 22 geben einen Überblick über die identifizierten Klone.

Tabelle 21: Differenziell exprimierte Gene im Blattgewebe von Gerstenpflanzen bei Quecksilberexposition.

| Gen   | Ind.-Faktor | SD   | Spezies            | e-Wert     | Homologie      | Akzessionsnummer |
|---|-------------|------|--------------------|------------|----------------|------------------|
| Lipid-Transferprotein 7a2b                          | 1,53        | 0,33 | <i>H. vulgare</i>  | $4e^{-73}$ | 148/150 (99%)  | X96979           |
| LHC I Protein                                       | 1,43        | 0,32 | <i>H. vulgare</i>  | $3e^{-25}$ | 87/96 (90%)    | S688729          |
| PS I Antennen-Protein                               | 2,62        | 1,18 | <i>H. vulgare</i>  | $e^{-118}$ | 220/221 (99%)  | X884308          |
| Glutamin-abhängige Asparagin-Synthase               | 1,49        | 0,43 | <i>H. vulgare</i>  | $3e^{-68}$ | 167/167 (100%) | AF307145         |
| Ferredoxin NADPH Oxidoreductase                     | 1,43        | 0,38 | <i>T. aestivum</i> | $e^{-100}$ | 211/219 (96%)  | AJ457980         |
| Stärke-Synthetase                                   | 1,32        | 0,45 | <i>T. aestivum</i> | $1e^{-75}$ | 155/158 (98%)  | AJ292522         |
| RNase S-ähnliches Protein (Trockenstress induziert) | 1,51        | 0,16 | <i>H. vulgare</i>  | $3e^{-49}$ | 105/106 (99%)  | AY028422         |
| Triosephosphat-Translocator                         | 0,85        | 0,10 | <i>O. sativa</i>   | $2e^{-45}$ | 101/103 (98%)  | AY028422         |
| Carboanhydrase                                      | 0,68        | 0,32 | <i>H. vulgare</i>  | $7e^{-26}$ | 76/83 (91%)    | L36959           |
| Phytoen-Synthase                                    | 0,66        | 0,22 | <i>O. sativa</i>   | $9e^{-7}$  | 66/78 (84%)    | AY452768         |
| Hypothetisches Protein (Stress und Abwehr)          | 0,71        | 0,21 | <i>H. vulgare</i>  | $e^{-147}$ | 267/267 (100%) | AJ222779         |
| Putative Glutathion S-Transferase                   | 0,64        | 0,31 | <i>O. sativa</i>   | $9e^{-5}$  | 45/51 (88%)    | AY271620         |

SD: Standardabweichung (n=4-6)

Tabelle 22: Differenziell exprimierte Gene im Wurzelgewebe von Gerstenpflanzen bei Quecksilberexposition.

| Gen  | Ind.-Faktor | SD   | Spezies            | e-Wert      | Homologie     | Akzessionsnummer |
|--|-------------|------|--------------------|-------------|---------------|------------------|
| Enolase                                    | 1,38        | 0,26 | <i>O. sativa</i>   | $1e^{-117}$ | 261/276 (94%) | AY335488         |
| Elongationsfaktor Alpha 1                  | 1,38        | 0,15 | <i>H. vulgare</i>  | $e^{-113}$  | 245/257 (95%) | L11740           |
| Tonoplast-intrinsisches Protein 1          | 1,24        | 0,14 | <i>H. vulgare</i>  | $3e^{-27}$  | 73/76 (96%)   | AF254799         |
| Actin 1                                    | 1,31        | 0,14 | <i>A. nuda</i>     | $e^{-53}$   | 130/137 (94%) | AF234528         |
| Allenoxid-Cyclase (AOC)                    | 1,33        | 0,22 | <i>H. vulgare</i>  | $9e^{-95}$  | 180/181 (99%) | AJ308488         |
| Cytosolische Monodehydroascorbat Reductase | 1,33        | 0,18 | <i>O. sativum</i>  | $9e^{-61}$  | 166/181 (91%) | AK071558         |
| Kälte-induziertes Protein                  | 1,33        | 0,21 | <i>O. sativum</i>  | $6e^{-76}$  | 240/271 (88%) | AJ272394         |
| Glutathion-Peroxidase ähnliches Protein    | 1,52        | 0,36 | <i>H. vulgare</i>  | 0           | 349/350 (99%) | AJ238745         |
| Jasmonat-induziertes Protein               | 0,51        | 0,33 | <i>H. vulgare</i>  | $8e^{-73}$  | 147/149 (98%) | X98124           |
| Häm-Oxygenase 1                            | 0,64        | 0,42 | <i>O. sativum</i>  | $7e^{-62}$  | 189/211 (89%) | AK104955         |
| Sekretorisches Membran-Carrier Protein     | 0,86        | 0,15 | <i>O. sativum</i>  | $1e^{-50}$  | 176/200 (88%) | AF225922         |
| Peptidylprolyl Isomerase                   | 0,46        | 0,18 | <i>T. aestivum</i> | $1e^{-68}$  | 155/162 (95%) | YO7636           |
| Saures ribosomales Protein                 | 0,86        | 0,19 | <i>T. aestivum</i> | $2e^{-29}$  | 138/167 (82%) | AF475123         |
| Deoxymuginsäure Synthase 2                 | 0,75        | 0,22 | <i>H. vulgare</i>  | $1e^{-93}$  | 182/184 (98%) | AB063249         |
| Cysteinprotease                            | 0,66        | 0,29 | <i>H. vulgare</i>  | $9e^{-30}$  | 129/149 (86%) | AF134152         |
| IDI 2                                      | 0,88        | 0,08 | <i>H. vulgare</i>  | $e^{-170}$  | 368/393 (93%) | AB038775         |
| ras-assoziiertes GTP-bindendes Protein     | 0,82        | 1,67 | <i>O. sativa</i>   | $7e^{-21}$  | 120/142 (84%) | D13758           |

SD: Standardabweichung (n=4-6)

### 3.1.2. Cadmiumexposition

Analog zu den Versuchen mit einer Quecksilberexposition wurden Versuche mit Cadmium durchgeführt. Die *in vitro* auf Agar angezogenen Gerstenpflanzen wiesen nach 6 Tagen keine signifikanten morphologischen Veränderungen auf (vgl. Abbildung 21 und 22). Bei allen eingesetzten Cadmiumnitrat-Konzentrationen war das Blatt- und Wurzelwachstum gegenüber der Kontrolle nicht erkennbar verändert.

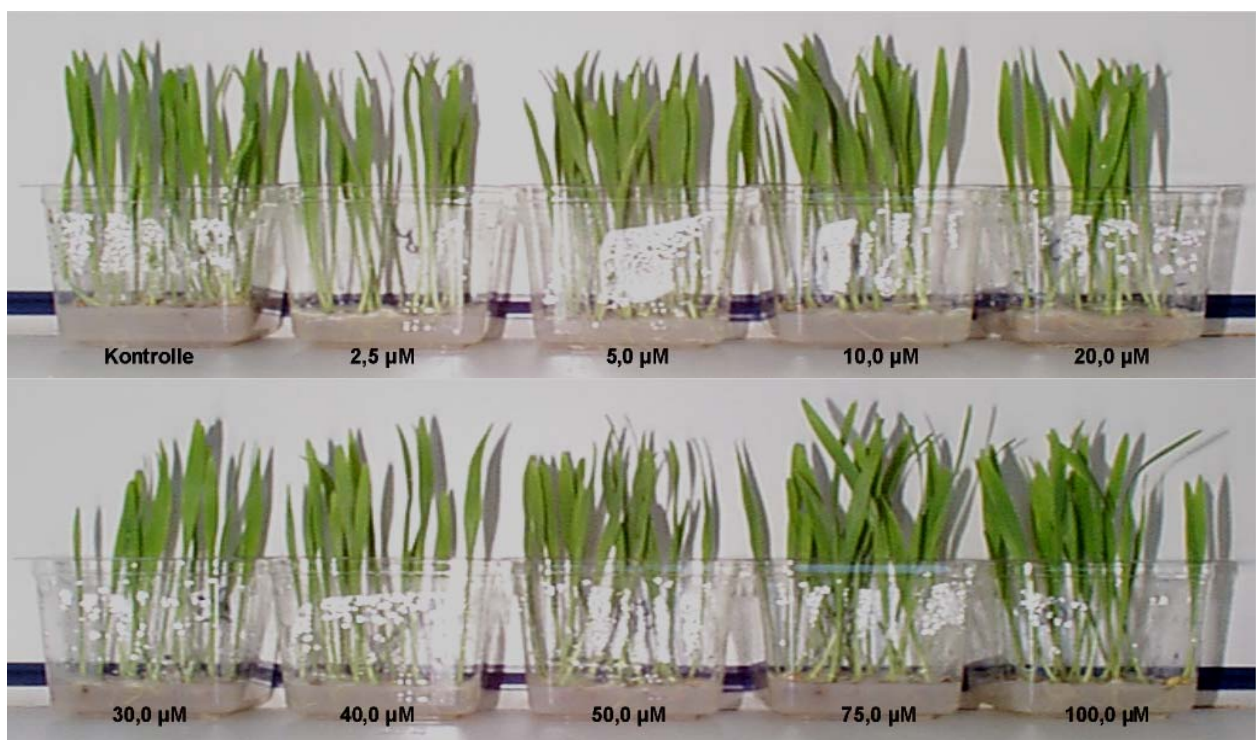


Abbildung 21: Gerstenpflanzen mit verschiedenen  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -Konzentrationen im Medium nach 6 Tagen Wachstum. Eine Beeinflussung des Blattwachstums durch die Cadmiumexposition ist nicht zu beobachten.



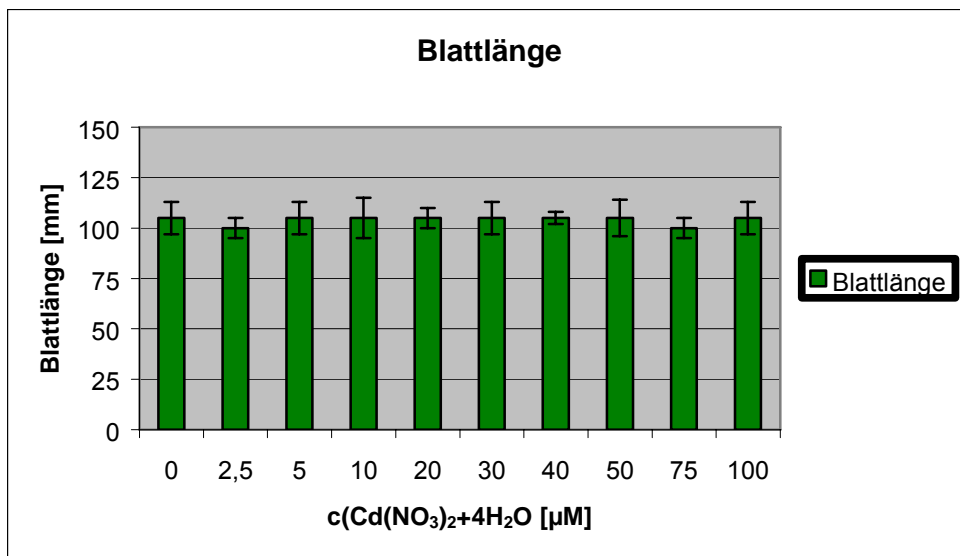


Abbildung 22: Blattlängen der Gersten nach 5 Tagen bei Wachstum auf Medien mit verschiedenen Cadmiumnitrat-Konzentrationen.

Für die weiterführenden molekularbiologischen Versuche wurde eine  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  gewählt. Dieser Wert lag im ökotoxikologisch sinnvollen Bereich und erlaubte zudem einen Vergleich zwischen den einzelnen Schwermetallexpositionen. Stresseffekte konnten bei dieser Konzentration über die Messung der Polyamingehalte nachgewiesen werden (vgl. Ergebnisse der Polyaminmessung unten).

Die Cadmiumgehalte im Blatt- und Wurzelgewebe wurden für unterschiedliche Cadmiumkonzentrationen im Medium bestimmt. Sie stiegen mit zunehmender Cadmiumkonzentration im Medium deutlich an, wobei der Cadmium-Gehalt in den Wurzeln etwa um den Faktor 60 höher lag als der Gehalt in den Blättern. Der Trockensubstanzgehalt der Blätter zeigte bei zunehmender Cadmiumkonzentration im Medium keinen eindeutigen Anstieg (vgl. Abbildungen 23, 24 und 25).

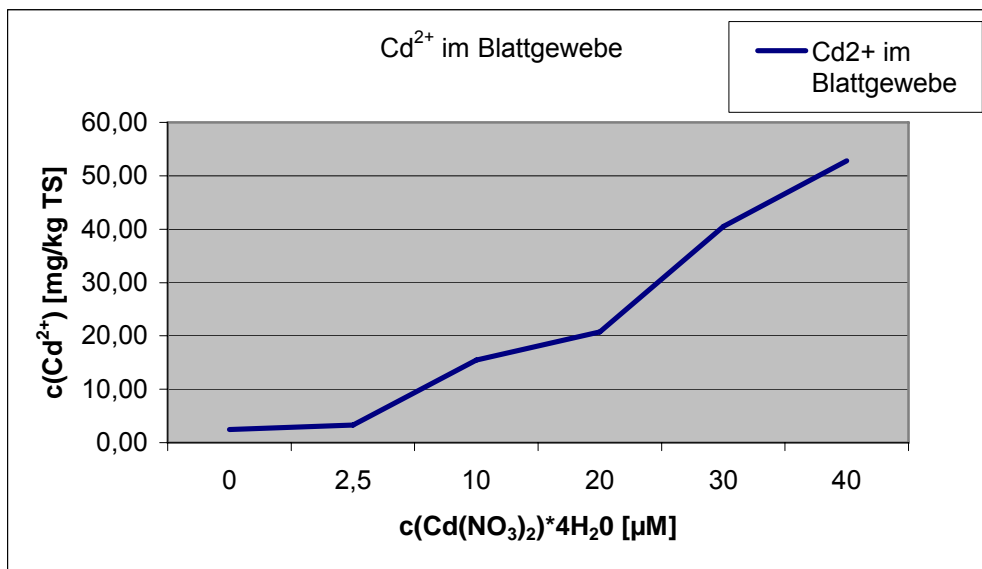


Abbildung 23: Zunehmende Konzentration von  $\text{Cd}^{2+}$  im Blattgewebe bei Wachstum der Gerste auf Medien mit verschiedenen Cadmiumnitrat-Konzentrationen.

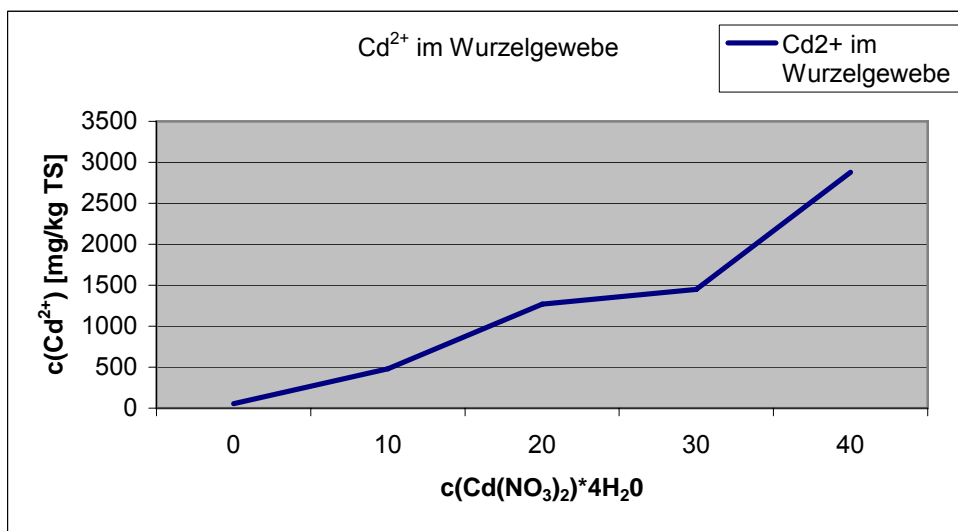


Abbildung 24: Zunehmende Konzentration von  $\text{Cd}^{2+}$  im Wurzelgewebe bei Wachstum der Gerste auf Medien mit verschiedenen Cadmiumnitrat-Konzentrationen.

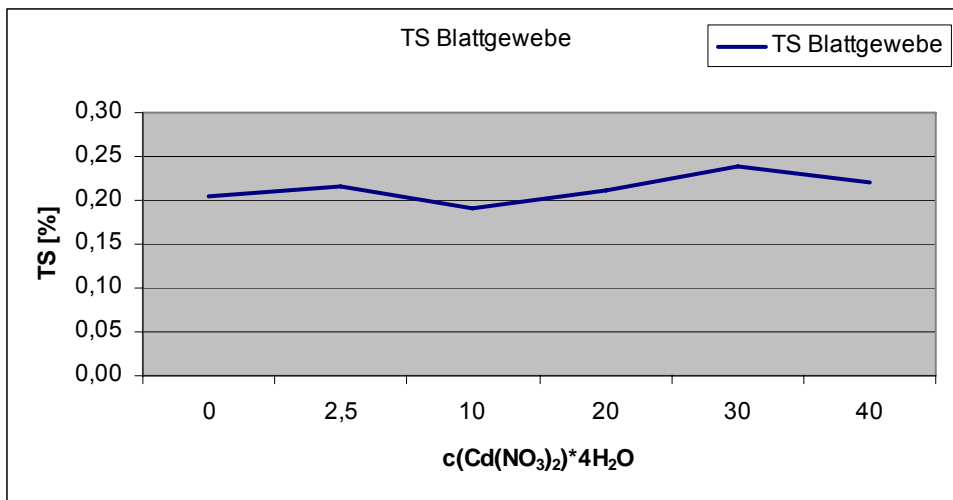


Abbildung 25: Trockensubstanzgehalt von Gerstenblättern bei Wachstum der Gerste auf Medien mit verschiedenen Cadmiumnitrat-Konzentrationen.

Um die Stresseffekte einer Cadmiumexposition zu bestimmen, wurden die Konzentrationen biogener Amine (Polyamine) als bekannte Stressindikatoren im Blattgewebe gemessen. Die Gehalte an Putrescin, Spermidin und Spermin waren in den mit Cadmium beaufschlagten Varianten gegenüber den Kontrollen deutlich erhöht (vgl. Tabelle 23).

Tabelle 23: Polyamingehalte im Blattgewebe von Gerstenpflanzen aus Kontrollgruppen und aus Versuchsgruppen mit Cadmiumexposition.

| Polyamine<br>[nmol/g FG] | Kontrolle | Cadmiumexposition<br>40 μM Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O |
|--------------------------|-----------|---|
| Putrescin                | 460       | 616   |
| Spermin                  | 72        | 85  |
| Spermidin                | 26        | 34  |

Aus Blattgewebe und Wurzelgewebe von Kontrollpflanzen und von auf mit 40μM Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O versetztem MS-Medium gewachsenen Pflanzen wurde jeweils sowohl eine vorwärts- als auch eine rückwärts-subtrahierte SSH durchgeführt. Mit der SSH wurden cDNA-Banken erstellt, aus welchen circa 700 Klone von Blattgewebe und circa 650 Klone von Wurzelgewebe gewonnen wurden. Bei der Charakterisierung dieser Klone in einem Makroarray konnten für Blattgewebe 135 und für Wurzelgewebe 55 potentiell differentiell exprimierte Klone gefunden werden. Nach Sequenzierung der gefundenen Klone konnten für

Blattgewebe 22, für Wurzelgewebe 15 Klone identifiziert werden. Die Sequenzen der restlichen Klone lieferten beim Datenbankabgleich keine identifizierbaren Ergebnisse. Die nachstehenden Tabellen 24 und 25 geben einen Überblick über die identifizierten Klone.

Tabelle 24: Differenziell exprimierte Gene im Blattgewebe von Gerstenpflanzen bei Cadmiumexposition.

| Gen   | Ind.-Faktor | SD   | Spezies              | e-Wert     | Homologie      | Akzessionsnummer |
|---|-------------|------|----------------------|------------|----------------|------------------|
| Thioredoxin   | 1,87        | 0,58 | <i>B. napus</i>      | $8e^{-5}$  | 49/56 (87%)    | AF160870         |
| Chlorophyllsynthase                                     | 1,26        | 0,13 | <i>H. vulgare</i>    | $e^{-149}$ | 317/333 (95%)  | AJ2777210        |
| $\beta$ -Glucosidase                                    | 1,40        | 0,30 | <i>H. vulgare</i>    | 9,4        | 19/19 (100%)   | L41869           |
| lhC Typ III LHC II CAB Protein                          | 1,55        | 0,76 | <i>H. vulgare</i>    | $e^{-119}$ | 227/228 (99%)  | X63197           |
| Chlorophyll a/b bindendes Protein WCAB                  | 1,25        | 0,28 | <i>T. aestivum</i>   | $e^{-38}$  | 118/128 (92%)  | U73218           |
| Chitinase   | 1,42        | 0,13 | <i>T. aestivum</i>   | $e^{-30}$  | 98/106 (92%)   | AB029935         |
| ADP-Glucose Pyrophosphatase                             | 1,14        | 0,35 | <i>H. vulgare</i>    | $3e^{-33}$ | 74/74 (100%)   | AJ291451         |
| Mg-Chelatase  | 1,17        | 0,18 | <i>H. vulgare</i>    | 3,2        | 19/19 (100%)   | AY039003         |
| UDP-Glucose: Sterol Glucosyltransferase                 | 1,12        | 0,12 | <i>A. sativa</i>     | $2e^{-88}$ | 308/352 (87%)  | Z83832           |
| Blattspezifisches Thionin                               | 1,31        | 0,26 | <i>H. vulgare</i>    | $e^{-164}$ | 304/307 (99%)  | M19048           |
| LHC II Typ I Protein                                    | 1,26        | 0,23 | <i>H. vulgare</i>    | $7e^{-48}$ | 152/168 (90%)  | X89023           |
| Krankheitsresistenz-ähnliches Protein Isolat 9050       | 1,20        | 0,09 | <i>O. sativa</i>     | $5e^{-43}$ | 121/131 (92%)  | AY224475         |
| $\gamma$ -Hydroxybutyratdehydrogenase ähnliches Protein | 1,24        | 0,24 | <i>O. sativa</i>     | 0,019      | 30/32 (93%)    | AY224558         |
| Acetohydroxybuttersäure-Synthase                        | 0,86        | 0,19 | <i>H. vulgare</i>    | 0,0        | 347/348 (99%)  | AF059600         |
| $\delta$ -24-Sterol Methyltransferase                   | 0,86        | 0,10 | <i>T. aestivum</i>   | $2e^{-17}$ | 67/73 (91%)    | U60754           |
| Sulfat-Transportprotein                                 | 0,82        | 0,10 | <i>S. stapfianus</i> | $6e^{-17}$ | 126/148 (85%)  | X96761           |
| Carboanhydrase  | 0,70        | 0,08 | <i>H. vulgare</i>    | $5e^{-93}$ | 175/175 (100%) | L36959           |
| RNase S-ähnliches Protein                               | 0,85        | 0,18 | <i>H. vulgare</i>    | $2e^{-44}$ | 93/93 (100%)   | AF182197         |
| Cytochrom c1  | 0,88        | 0,12 | <i>D. antarctica</i> | $e^{-124}$ | 344/380 ((90%) | AY090551         |
| Rubisco Aktivase  | 0,66        | 0,13 | <i>H. vulgare</i>    | $6e^{-96}$ | 190/192 (98%)  | M55447           |
| D-Untereinheit PSI                                      | 0,86        | 0,29 | <i>H. vulgare</i>    | $e^{-74}$  | 146/147 (99%)  | M98254           |
| ATP-abhängige CIP Protease                              | 0,86        | 0,08 | <i>O. sativa</i>     | $e^{-73}$  | 271/314 (86%)  | AY166599         |

SD: Standardabweichung (n=4-6)

Tabelle 25: Differentiell exprimierte Gene im Wurzelgewebe von Gerstenpflanzen bei Cadmiumexposition.

| Gen   | Ind.-Faktor | SD   | Spezies              | e-Wert     | Homologie     | Akzessionsnummer |
|---|-------------|------|----------------------|------------|---------------|------------------|
| SMC3 Protein  | 0,63        | 0,05 | <i>O. sativa</i>     | $e^{-66}$  | 182/199 (91%) | AJ535211         |
| Vakuolenmembran-H <sup>+</sup> transl. Ao-Pyrophosphatase | 0,53        | 0,15 | <i>H. vulgare</i>    | 0,0        | 720/722 (99%) | D13472           |
| Enolase   | 0,43        | 0,08 | <i>Z. mays</i>       | $4e^{-67}$ | 240/276 (86%) | X55981           |
| Knox3   | 0,50        | 0,05 | <i>H. vulgare</i>    | 9,4        | 19/19 (100%)  | X83581           |
| Glutathion-S-Transferase I UE                             | 0,66        | 0,13 | <i>H. vulgare</i>    | $3e^{-35}$ | 108/144 (94%) | AJ419775         |
| Aconitat-Hydratase  | 0,57        | 0,12 | <i>P. avium</i>      | $6e^{-16}$ | 113/134 (84%) | AY050485         |
| IAA 1 Protein   | 0,51        | 0,07 | <i>T. aestivum</i>   | $5e^{-43}$ | 133/140 (95%) | AJ575098         |
| Serin/Threonin Proteinkinase                              | 0,61        | 0,04 | <i>O. sativa</i>     | $5e^{-66}$ | 217/246 (88%) | AY156512         |
| Succinyl CoA-ligase                                       | 0,60        | 0,08 | <i>A. thaliana</i>   | $7e^{-6}$  | 41/45 (91%)   | AY114613         |
| Cytokininoxidase  | 0,51        | 0,34 | <i>A. thaliana</i>   | 1,1        | 20/20 (100%)  | BT000179         |
| GTP-bindendes Protein                                     | 0,51        | 0,31 | <i>S. pombe</i>      | 5,8        | 19/19 (100%)  | X52475           |
| Pyruvat-Kinase ähnliches Protein                          | 0,58        | 0,16 | <i>D. antarctica</i> | $6e^{-33}$ | 110/121 (90%) | AY090539         |
| 26S Proteasom regulierendes Protein                       | 0,65        | 0,11 | <i>O. sativa</i>     | $2e^{-97}$ | 319/363 (87%) | AB037149         |
| Thiolprotease Aleurain                                    | 0,61        | 0,10 | <i>H. vulgare</i>    | $e^{-57}$  | 122/124 (98%) | X05167           |
| Put. Cinnamylalkohol-DH                                   | 0,64        | 0,08 | <i>O. sativa</i>     | $6e^{-14}$ | 88/102 (86%)  | NM195328         |

SD: Standardabweichung (n=4-6)

### 3.1.3. Platinexposition

Analog zu den Versuchen mit Quecksilber- und Cadmiumexpositionen wurden Versuche mit Platin durchgeführt. Die *in vitro* auf Agar angezogenen Gerstenpflanzen wiesen nach 6 Tagen signifikante morphologische Veränderungen auf. Gerstenpflanzen aus Varianten mit Platinzusatz im Anzuchtmedium wiesen ab Konzentrationen von 40  $\mu\text{M}$  im Vergleich zur Kontrollvariante deutlich geringeres Wurzelwachstum und geringeres Blattlängenwachstum auf (vgl. Abbildung 26, 27 und 28). Die Aufnahme von Platin ins Wurzelgewebe war positiv mit dem Gehalt an Platin im Medium korreliert (vgl. Abbildung 30). Die Gehalte an Platin im Blattgewebe wiesen ein peakartiges Maximum bei ca. 60  $\mu\text{M}$   $\text{PtCl}_4$  im Medium auf (vgl. Abbildung 29).

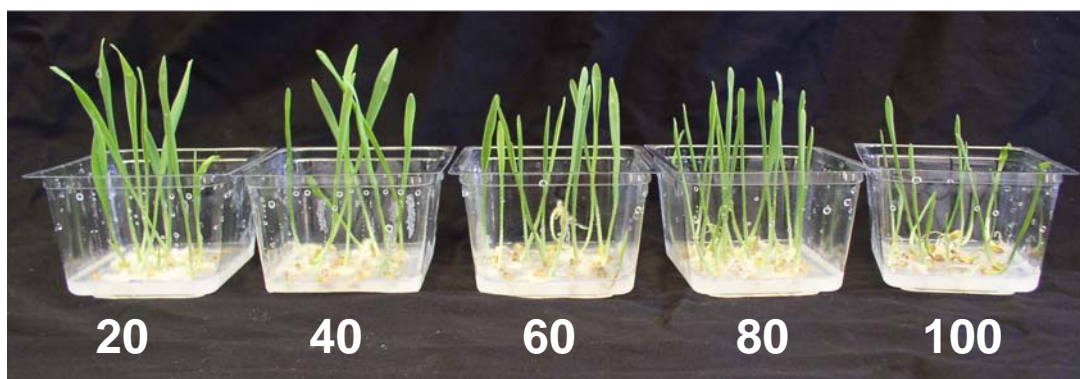


Abbildung 26: Gerstenpflanzen mit verschiedenen  $\text{PtCl}_4$ -Konzentrationen im Medium nach 6 Tagen Wachstum. Ab 40  $\mu\text{M}$  ist eine Abnahme der Blattlängen zu beobachten.

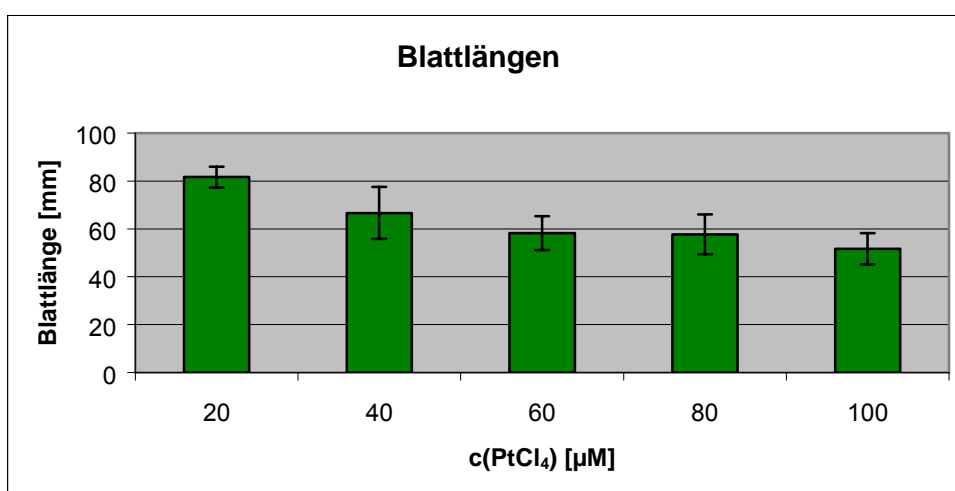


Abbildung 27: Blattlängen der Gersten nach 6 Tagen bei Wachstum auf Medien mit verschiedenen  $\text{PtCl}_4$ -Konzentrationen.

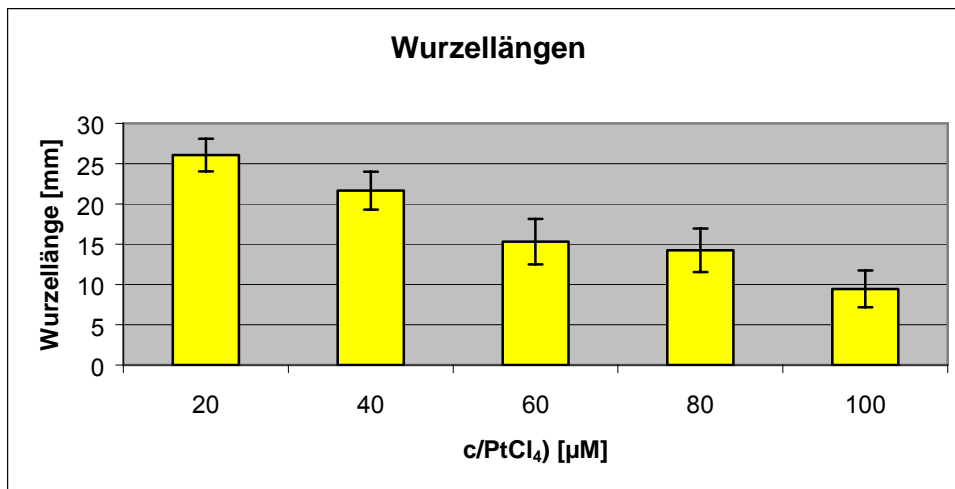


Abbildung 28: Wurzellängen der Gersten nach 6 Tagen bei Wachstum auf Medien mit verschiedenen PtCl<sub>4</sub>-Konzentrationen.

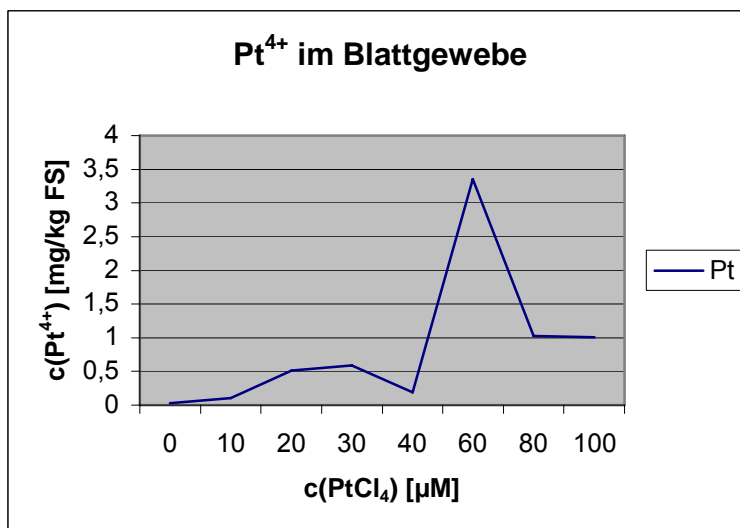


Abbildung 29: Konzentration von Pt<sup>4+</sup> im Blattgewebe bei Wachstum der Gerste auf Medien mit verschiedenen PtCl<sub>4</sub>-Konzentrationen.

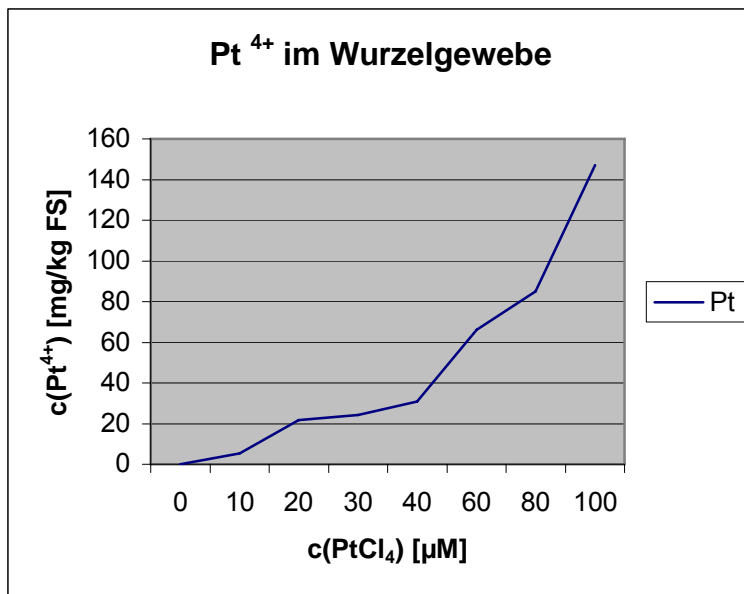


Abbildung 30: Konzentration von Pt<sup>4+</sup> im Wurzelgewebe bei Wachstum der Gerste auf Medien mit verschiedenen PtCl<sub>4</sub>-Konzentrationen.

Aus Blatt- und Wurzelgewebe wurde jeweils eine vorwärts- und eine rückwärts-subtrahierte cDNA durch SSH erstellt. Es konnten für Blatt- und Wurzelgewebe jeweils circa 700 Klone gewonnen werden, die durch die beschriebenen Makroarrayanalysen überprüft wurden. Dabei konnten für Blattgewebe 85 und für Wurzelgewebe 74 Klone als potentiell differentiell gefunden werden. Nach dem Datenbankvergleich konnten 22 Gene für Blattgewebe und 22 für Wurzelgewebe identifiziert werden. Die Sequenzen der anderen Klone lieferten keine identifizierbaren Treffer beim Datenbankabgleich. Die nachstehenden Tabellen 26 und 27 geben einen Überblick über die identifizierten Klone.



Tabelle 26: Differenziell exprimierte Gene im Blattgewebe von Gerstenpflanzen bei Platinexposition.

| Gen  | Ind.-Faktor | SD   | Spezies             | e-Wert     | Homologie      | Akzessionsnummer |
|--|-------------|------|---------------------|------------|----------------|------------------|
| Blatt-spez. Thionin                        | 2,10        | 0,69 | <i>H. vulgare</i>   | $e^{-165}$ | 306/309 (99%)  | X05587           |
| Alpha-Tubulin 3                            | 1,73        | 0,38 | <i>H. vulgare</i>   | 0,0        | 392/392 (100%) | AJ132399         |
| S-Adenosylmethionin-DC                     | 2,21        | 0,29 | <i>H. chilense</i>  | 0,0        | 579/605 (95%)  | X83881           |
| Humanes Tumor-ähnliches Protein            | 1,74        | 0,76 | <i>H. vulgare</i>   | $2e^{-92}$ | 177/178 (99%)  | AF454956         |
| Disulfidisomerase                          | 1,39        | 0,25 | <i>H. vulgare</i>   | 0,0        | 406/406 (100%) | L33252           |
| Elongationsfaktor 2                        | 1,21        | 0,19 | <i>T. aestivum</i>  | $e^{-103}$ | 238/253 (94%)  | AF005085         |
| Seneszenz-assoziierte Cystein-Protease     | 3,13        | 0,62 | <i>B. oleracea</i>  | 1,2        | 45/53 (84%)    | AF454956         |
| Glucose-6-Phosphat-DH                      | 1,38        | 0,19 | <i>T. aestivum</i>  | $2e^{-41}$ | 170/197 (86%)  | AB01141          |
| Lipid-Transfer-Protein 7a2b                | 1,34        | 0,09 | <i>P. miliaceum</i> | $e^{-73}$  | 206/227 (90%)  | D45076           |
| Aspartat Aminotransferase                  | 1,37        | 0,14 | <i>H. vulgare</i>   | $4e^{-6}$  | 29/29 (100)    | X96979           |
| Chlorophyll a7b bindendes Protein WCAB     | 0,44        | 0,30 | <i>T. aestivum</i>  | $e^{-141}$ | 308/325 (94%)  | U73218           |
| Elongationsfaktor 1-alpha                  | 0,64        | 0,16 | <i>H. vulgare</i>   | 0,0        | 464/469 (98%)  | Z50789           |
| Aquaporin                                  | 0,77        | 0,10 | <i>H. vulgare</i>   | $e^{-157}$ | 302/308 (98%)  | AB009308         |
| Unbekanntes Protein                        | 0,77        | 0,14 | <i>O. sativa</i>    | $e^{-161}$ | 500/570 (87%)  | AK110919         |
| Peroxisom Ascorbat-Peroxidase              | 0,70        | 0,10 | <i>H. vulgare</i>   | 0,0        | 595/595 (100%) | AB063117         |
| Putatives Protein (bci5-Gen)               | 0,49        | 0,23 | <i>H. vulgare</i>   | 0,0        | 423/424 (99%)  | AJ250661         |
| H2A Protein                                | 0,67        | 0,24 | <i>O. sativa</i>    | $e^{-28}$  | 112/127 (88%)  | NH196515         |
| LHC II Typ I Protein                       | 0,56        | 0,13 | <i>H. vulgare</i>   | $e^{-130}$ | 310/330 (93%)  | X89023           |
| PS I Antennen-Protein                      | 0,66        | 0,07 | <i>H. vulgare</i>   | $e^{-120}$ | 221/221 (100%) | X84308           |
| Glycin-DH                                  | 0,73        | 0,14 | <i>Triticum sp.</i> | $6e^{-74}$ | 164/171 (95%)  | AF024589         |
| Glycin-DC                                  | 0,54        | 0,05 | <i>T. aestivum</i>  | $e^{-106}$ | 219/225 (97%)  | AY123417         |
| S-Adenosyl-L-Homocystein Hydrolase (SH6.2) | 0,73        | 0,21 | <i>T. aestivum</i>  | 0,0        | 565/586 (96%)  | L11872           |

SD: Standardabweichung (n=4-6)

Tabelle 27: Differenziell exprimierte Gene im Wurzelgewebe von Gerstenpflanzen bei Platinexposition.

| Gen  | Ind.-Faktor | SD   | Spezies            | e-Wert     | Homologie      | Akzessionsnummer |
|--|-------------|------|--------------------|------------|----------------|------------------|
| Aspartat-Proteinase                                  | 2,41        | 0,90 | <i>H. vulgare</i>  | 6,6        | 19/19 (100%)   | X56136           |
| Chitin-induzierbares Gibberellin-responsives Protein | 1,74        | 0,64 | <i>O. sativa</i>   | $6e^{-4}$  | 38/42 (90%)    | AY062210         |
| Aminolävulinat-Dehydratase                           | 2,65        | 1,30 | <i>H. vulgare</i>  | 0,0        | 380/384 (98%)  | X92402           |
| Glycin-reiches RNA-bindendes Protein                 | 3,39        | 1,61 | <i>H. vulgare</i>  | $2e^{-18}$ | 64/68 (94%)    | Z48624           |
| Sulfolipid Synthase (SQD2)                           | 2,08        | 0,49 | <i>A. thaliana</i> | 0,014      | 120/152 (89%)  | AF454354         |
| Saccharose-Synthase                                  | 2,24        | 0,75 | <i>H. vulgare</i>  | $9e^{-63}$ | 124/124 (100%) | X66728           |
| Glutathion-S-Transferase GST                         | 2,28        | 0,71 | <i>Z. mays</i>     | $5e^{-41}$ | 136/152 (89%)  | AF244699         |
| HV1LRR1  | 1,81        | 0,19 | <i>H. vulgare</i>  | $e^{-153}$ | 307/316 (97%)  | AF108008         |
| LON2 Protease  | 1,98        | 0,50 | <i>Z. mays</i>     | $3e^{-72}$ | 198/217 (91%)  | U85495           |
| Vakuoläre Proton-ATPase                              | 0,39        | 0,35 | <i>H. vulgare</i>  | $e^{-155}$ | 282/283 (99%)  | U36939           |
| Germin-ähnliches Protein                             | 0,19        | 0,04 | <i>H. vulgare</i>  | 0,0        | 459/461 (99%)  | AF4939880        |
| IDI 2  | 0,19        | 0,09 | <i>H. vulgare</i>  | 0,0        | 558/565 (98%)  | AB038775         |
| Glykolytische Glyceraldehyd-3-phosphat DH            | 0,22        | 0,31 | <i>H. vulgare</i>  | 0,0        | 727/728 (99%)  | X60343           |
| S-Adenosylmethionin DC                               | 0,36        | 0,10 | <i>H. chilense</i> | 0,0        | 579/605 (99%)  | X83881           |
| Glutathion Peroxidase ähnliches Protein              | 0,21        | 0,05 | <i>H. vulgare</i>  | 0,0        | 350/350 (100%) | AJ238745         |
| Alanin-Aminotransferase                              | 0,29        | 0,14 | <i>H. vulgare</i>  | $e^{-169}$ | 304/304 (100%) | Z26322           |
| Alpha-Tubulin3                                       | 0,42        | 0,22 | <i>H. vulgare</i>  | 0,0        | 400/400 (100%) | AJ132399         |
| Phosphoglycerat-Mutase                               | 0,19        | 0,09 | <i>T. aestivum</i> | 0,0        | 437/455 (96%)  | AF475111         |
| IDI 1  | 0,14        | 0,03 | <i>H. vulgare</i>  | 0,0        | 445/445 (100%) | AB025597         |
| Peptidylprolyl cis-trans Isomerase                   | 0,19        | 0,06 | <i>T. aestivum</i> | $e^{-162}$ | 331/344 (96%)  | X86903           |
| Put. Protease Inhibitor (SD10)                       | 0,28        | 0,16 | <i>H. vulgare</i>  | $e^{-160}$ | 297/300 (99%)  | AY220738         |
| Aspartat Aminotransferase                            | 0,28        | 0,22 | <i>O. sativa</i>   | $7e^{-78}$ | 240/270 (88%)  | AB110193         |

SD: Standardabweichung (n=4-6)

### 3.1.4. Proteomanalyse

Bei der Proteomanalyse konnten für die Platinexposition von Gerstenpflanzen mehrere differentielle Proteinspots gefunden werden. In den Abbildungen 31 und 32 sind zwei Beispielgele gezeigt. Die Ergebnisse der Proteinsequenz-Analyse sind in den Tabellen 28 und 29 dargestellt. Für die Cadmium- und Quecksilberexposition konnten nur wenige Daten ermittelt werden. Eine Auswertung dieser Daten war nicht erfolgreich.

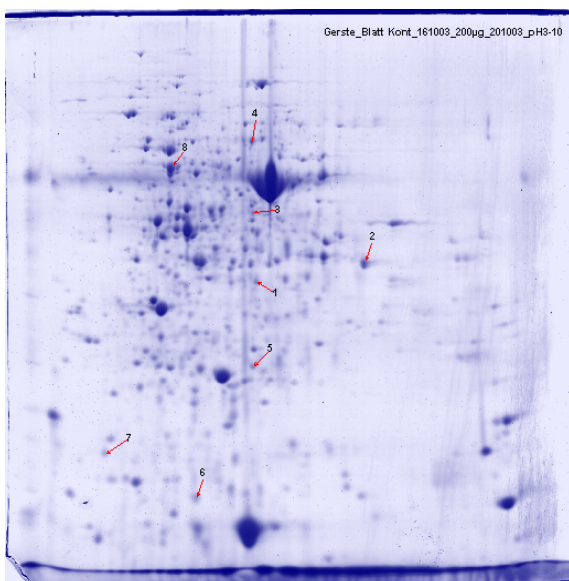


Abbildung 31: 2D-Gel: Proteine aus dem Gersten-Blattgewebe von Kontrollgruppen.

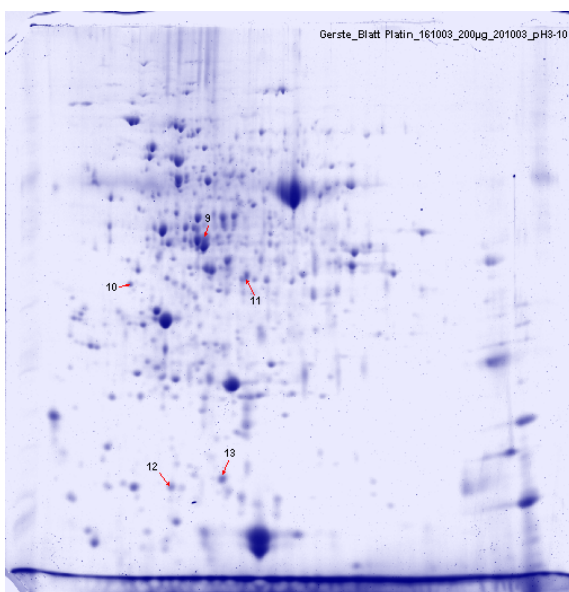


Abbildung 32: 2D-Gel: Proteine aus dem Gersten-Blattgewebe von Versuchsgruppen mit Platinexposition.

Tabelle 28: Ergebnisse der Proteomanalyse: Im Blattgewebe differentiell vorhandene Proteine bei Platinexposition der Gerstenpflanzen.

|                           |   |
|---------------------------|---|
| Blattgewebe<br>reprimiert | Ferredoxin-NADP(H) Oxidoreductase               |
|                           | Putative Aminotransferase AGD2                  |
|                           | Ferredoxin Nitrit-Reductase                     |
|                           | Rubisco Activase Isoform 1                      |
|                           | HG01J22r  |
|                           |   |
| Blattgewebe<br>induziert  | Rubisco Activase B Chloroplast precursor        |
|                           | Superoxid-Dismutase (Cu-Zn) 2                   |
|                           | 17 kDa Klasse I kleines Hitzeschock Protein     |
|                           | HV03N06r  |
|                           | 17kDa Klasse I kl. Hitzeschock Protein HF14H20r |

Tabelle 29: Ergebnisse der Proteomanalyse: Im Wurzelgewebe differentiell vorhandene Proteine bei Platinexposition der Gerstenpflanzen.

|                            |  |
|----------------------------|--|
| Wurzelgewebe<br>reprimiert | Glycin-reiches RNA-bindendes Protein, Nieder-<br>temperature responsiv |
|                            | HA05D15u   |
|                            |  |
| Wurzelgewebe<br>induziert  | Cytosolische Glyceraldehyd-3-phosphat<br>Dehydrogenase                 |
|                            | 17kDa Klasse I kleines Hitzeschock Protein                             |
|                            | Hitzeschock Protein 17.3   |
|                            | Protein-Kinase Familie HI02C18u  |
|                            | HB19F16r   |
|                            | HB26F20r   |

## 3.1.5. Vergleichender Überblick über die Ergebnisse

Einige ausgewählte differentiell exprimierte Gene der Gerstenpflanzen, die bei den verschiedenen Metallexpositionen gefunden wurden, sind in den folgenden Tabellen 30 und 31 als vergleichender Überblick über das Genexpressionsmuster in Gruppen zusammengefasst dargestellt (rot: induziert, grün: reprimiert).

Tabelle 30: Übersicht über differentiell exprimierter Gene im Blattgewebe bei verschiedenen Schwermetallexpositionen.

| Blatt   | Hg2+ | Cd2+ | Pt4+ |
|---|------|------|------|
| PS I Antennen-Protein                               | 2,12 |      | 0,64 |
| LHC I   | 1,36 |      |      |
| LHC II Typ I Protein                                |      | 1,23 | 0,53 |
| Chlorophyll a/b bindendes Protein                   |      | 1,2  | 0,27 |
| Chlorophyllsynthase                                 |      | 1,25 |      |
|   |      |      |      |
| Carboanhydrase                                      | 0,49 | 0,69 |      |
|   |      |      |      |
| Lipid-Transferprotein 7a2b (Cd-stimuliert)          | 1,47 |      | 2,04 |
| Chitinase   |      | 0,56 |      |
| RNase S-ähnliches Protein (Trockenstress induziert) | 1,5  | 0,81 |      |
| Aquaporin   | 1,35 |      | 0,76 |
|   |      |      |      |
| Thioredoxin   |      | 1,38 |      |
| Blattspezifisches Thionin                           |      | 1,27 | 1,89 |
|   |      |      |      |
| Alpha-Tubulin 3                                     |      |      | 1,66 |
| Seneszenz-assoziierte Cystein-Protease              |      |      | 3,04 |
| Humanes Tumor-ähnliches Protein H. vulgare          |      |      | 1,36 |

Tabelle 31: Übersicht über differentiell exprimierter Gene im Wurzelgewebe bei verschiedenen Schwermetallexpositionen.

| Wurzel                                      | Hg <sup>2+</sup> | Cd <sup>2+</sup> | Pt <sup>4+</sup> |
|---|------------------|------------------|------------------|
|   |                  |                  |                  |
| Peptidylprolyl Isomerase                    | 0,38             |                  | 0,19             |
| Cysteinprotease                             | 0,54             |                  |                  |
|   |                  |                  |                  |
| Glutathion-Peroxidase ähnliches Protein     | 1,46             |                  | 0,24             |
| Cytosolische Monodehydroascorbat Reductase  | 1,31             |                  |                  |
| Glutathion-S-Transferase GST 34             |                  |                  | 2,06             |
|   |                  |                  |                  |
| Actin 1                                     | 1,3              |                  |                  |
|   |                  |                  |                  |
| Aconitat-Hydratase                          |                  | 0,55             |                  |
| Glykolytische Glyceraldehyd-3-phosphat DH   |                  |                  | 0,03             |
| Sulfolipid-Synthase                         |                  |                  | 1,97             |
| Enolase                                     | 1,34             | 0,42             |                  |
|   |                  |                  |                  |
| IAA 1 Protein                               |                  | 0,5              |                  |
| Cytokininoxidase                            |                  | 0,27             |                  |
| Jasmonat-induziertes Protein                | 0,41             |                  |                  |
| Chitin-ind. Gibberellin-responsives Protein |                  |                  | 1,56             |
| Kälte-induziertes Protein                   | 1,3              |                  |                  |

3.1.6. Phytoreduktion von  $\text{Hg}^{2+}$ 

Bei einer Kontamination des Wachstumsmediums mit  $\text{HgCl}_2$  wurden große Mengen an  $\text{Hg}^0$  durch die Gerstenpflanzen in den die Blätter umgebenden Gasraum abgegeben (vgl. Abbildung 33). Sowohl in Hydrokultur als auch in Kultur auf sterilem Kultursubstrat konnte dieser Effekt beobachtet werden. Kontrollmessungen mit gasdicht versiegelten Kulturgefäßen ohne Gerstenpflanzen zeigten nur eine minimale  $\text{Hg}^0$ -Ausgasung.

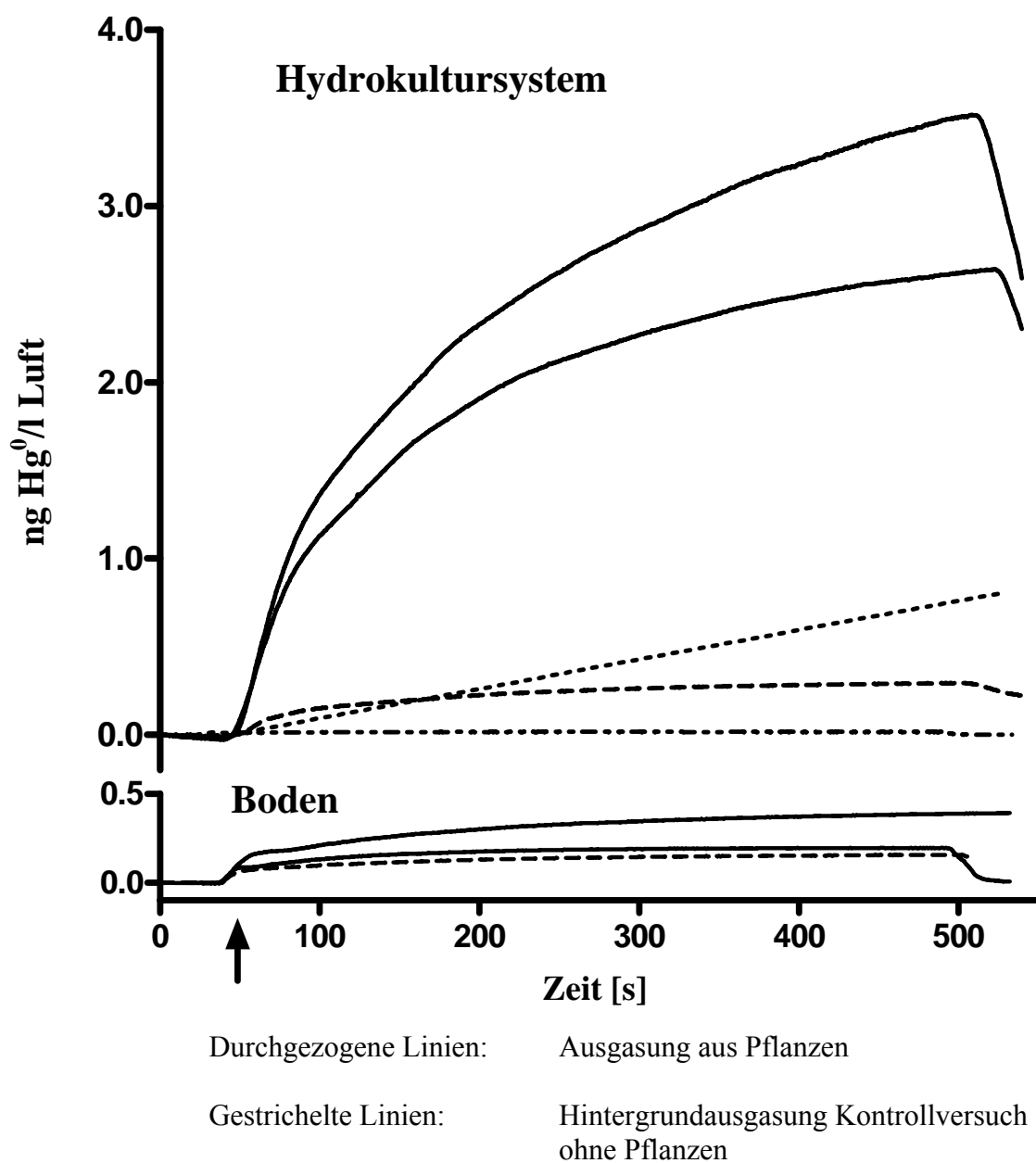


Abbildung 33:  $\text{Hg}^0$ -Ausgasung aus Gerstenpflanzen, gemessen mit Zeeman-AAS.

Um die reduktive Potenz von Pflanzengewebe zu überprüfen, wurden Blattgewebshomogenate in PBS-Puffer mit  $\text{HgCl}_2$  suspendiert und die  $\text{Hg}^0$ -Ausgasung gemessen. Homogenate von frischem Gerstenblattgewebe bewirkten eine Reduktion von  $\text{Hg}^{2+}$  zu  $\text{Hg}^0$  (vgl. Abbildung 34, Graph „Gerstenblatthomogenat“). Um mehr über die an dieser Reaktion beteiligten Systemen zu bestimmen, wurde der gleiche Versuch mit zuvor autoklaviertem Blattgewebe wiederholt. Das autoklavierte Blattgewebshomogenat war ebenfalls reduktiv wirksam, die Kinetik der Reduktion war sogar deutlich höher als bei frischen Blattgewebshomogenat (vgl. Abbildung 34, Graph „Gerstenblatthomogenat, autoklaviert“). Zusätzlich wurden auch Homogenate von *Monostroma grevillei* auf ihr reduktives Potential hin überprüft. Auch für dieses Algenhallus-Homogenat konnte eine reduktive Aktivität nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 34, Graph „Algenhomogenat“).

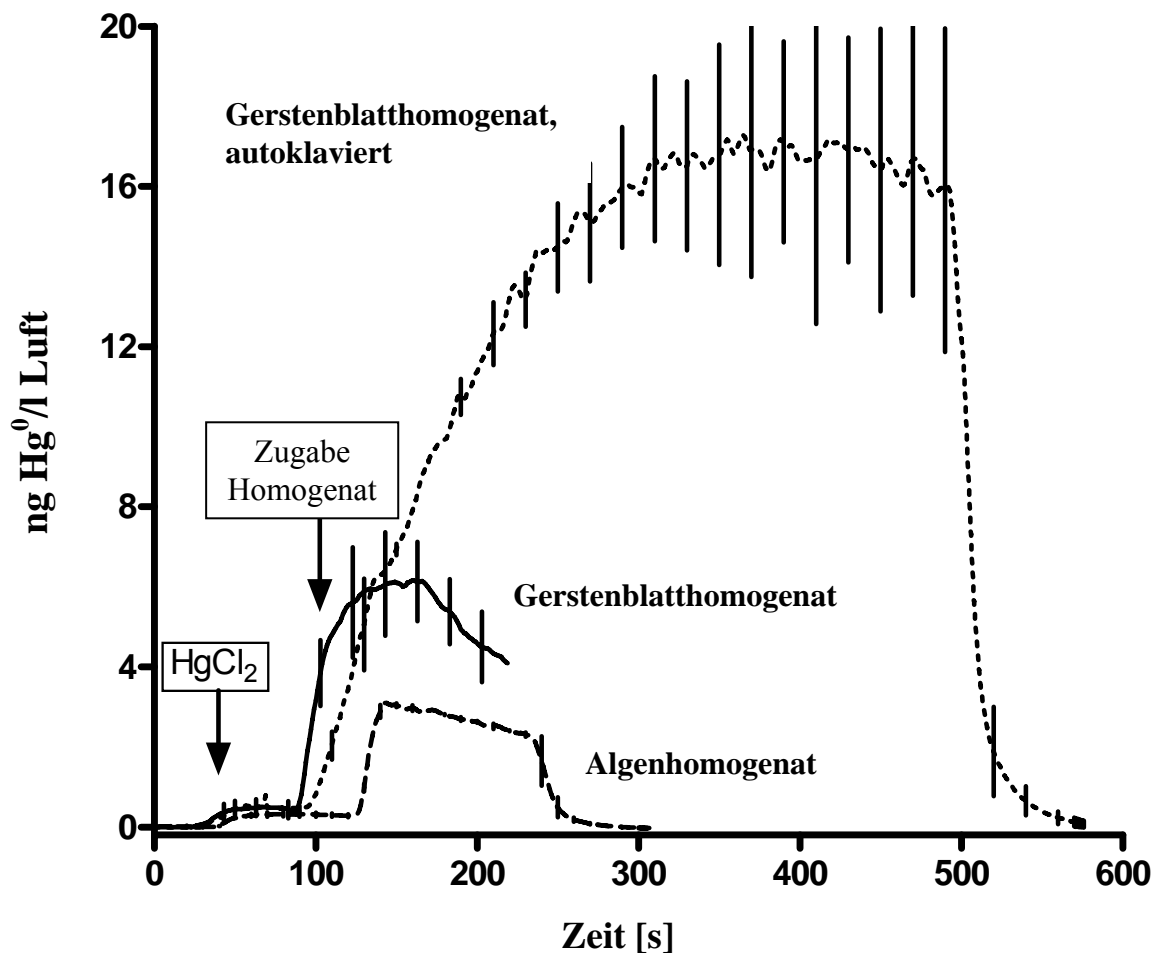


Abbildung 34: Reduktivität diverser Pflanzengewebshomogenate gegenüber  $\text{HgCl}_2$  bestimmt durch die Ausgasung von  $\text{Hg}^0$  aus dem Reaktionspuffer.



Nachdem die reduktive Aktivität von Gerstenblatthomogenaten eindeutig nachgewiesen werden konnte, wurde in Folgeversuchen die Abhängigkeit der Reduktion vom pH-Wert überprüft. Es wurde beobachtet, dass die Reduktion bei hohen pH-Werten am stärksten abläuft. Bei zunehmend saurem Milieu nimmt die reduktive Aktivität hingegen stark ab (vgl. Abbildung 35).

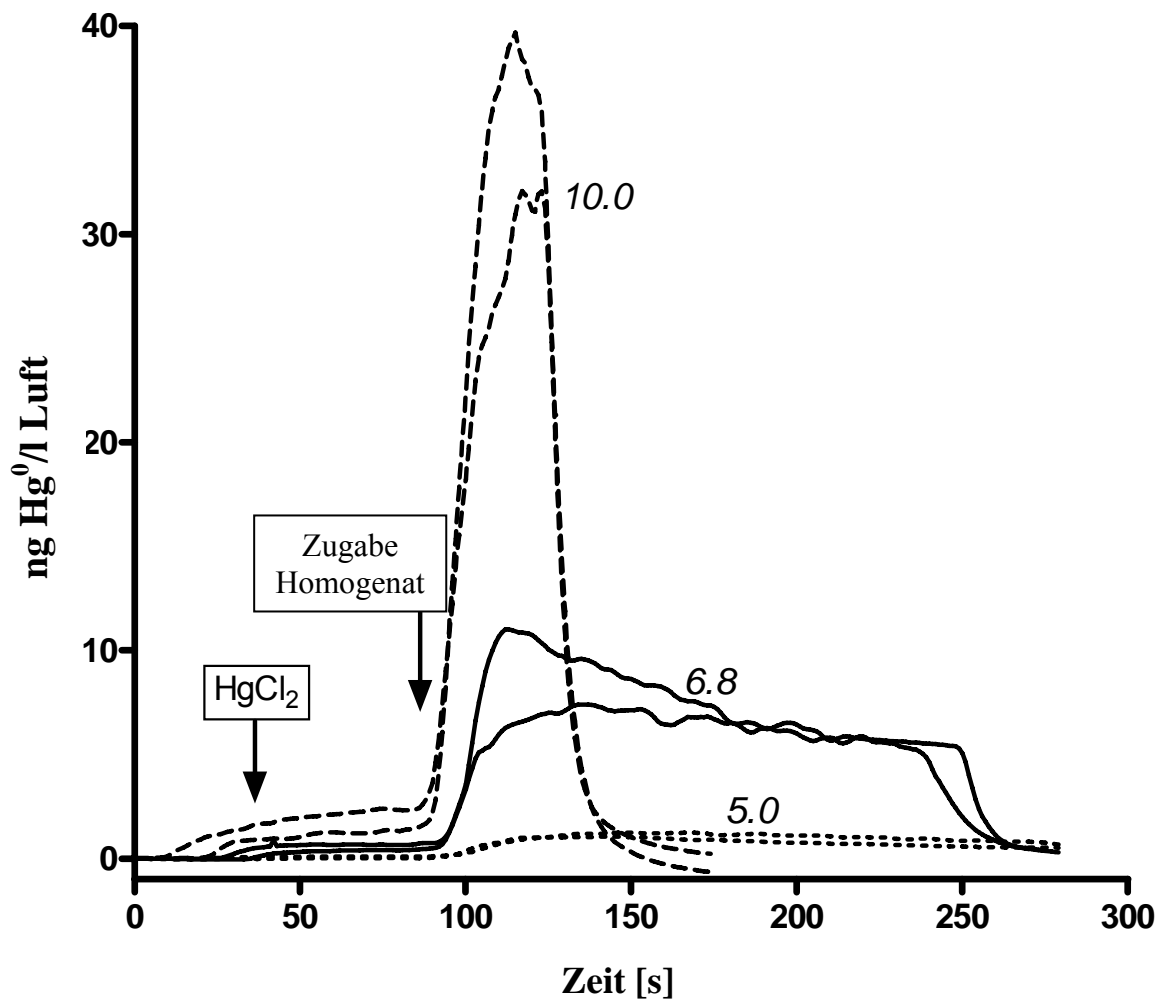


Abbildung 35: pH-Abhängigkeit der Reduktivität von Gerstenblatthomogenaten gegenüber  $\text{HgCl}_2$ . Die Beschriftung der Graphen gibt den jeweiligen pH-Wert an.

Nach den oben beschriebenen Versuchsergebnissen wurde versucht, die Substanz, die für die Reduktion verantwortlich ist, zu identifizieren. Aufgrund der Versuchsergebnisse mit autoklaviertem Blattgewebe konnte eine enzymatische Reduktion ausgeschlossen werden. Die Suche bezog sich deshalb auf thermostabile Substanzen mit bekannter reduktiver Aktivität. Reduziertes Glutathion (GSH) schied aus den Versuchen aus, da es zwar mit Quecksilber reagiert, dieses jedoch über stabile Mercaptidbindungen sofort bindet und eine Reduktion zu freiem, aus wässrigen Medien ausgasendem  $\text{Hg}^0$  nicht erfolgen kann. Zunächst wurde NADPH als mögliches Reduktionsmittel überprüft. Es wurde beobachtet, dass NADPH eine schwache, langsame Reduktion von  $\text{Hg}^{2+}$  zu  $\text{Hg}^0$  bewirkt (vgl. Abbildung 36). Die extrem schnelle und starke Reduktion, die durch die Blattgewebshomogenate bewirkt wurde, konnte damit jedoch nicht erklärt werden. Als weitere Substanz mit bekannt hohem reduktiven Potential, die zudem in Pflanzengewebe ubiquitär präsent ist, wurde L-Ascorbinsäure in die Versuche einbezogen. Dabei zeigte sich, dass Ascorbinsäure eine extrem rasche und starke Reduktion von  $\text{Hg}^{2+}$  zu  $\text{Hg}^0$  bewirkt, die dem Verhalten von Blattgewebshomogenaten entspricht. Auch die pH-Abhängigkeit der Reduktionskinetik von Ascorbinsäure stimmt exakt mit der Reduktionskinetik der Blatthomogenate überein (vgl. Abbildung 35 und 36).

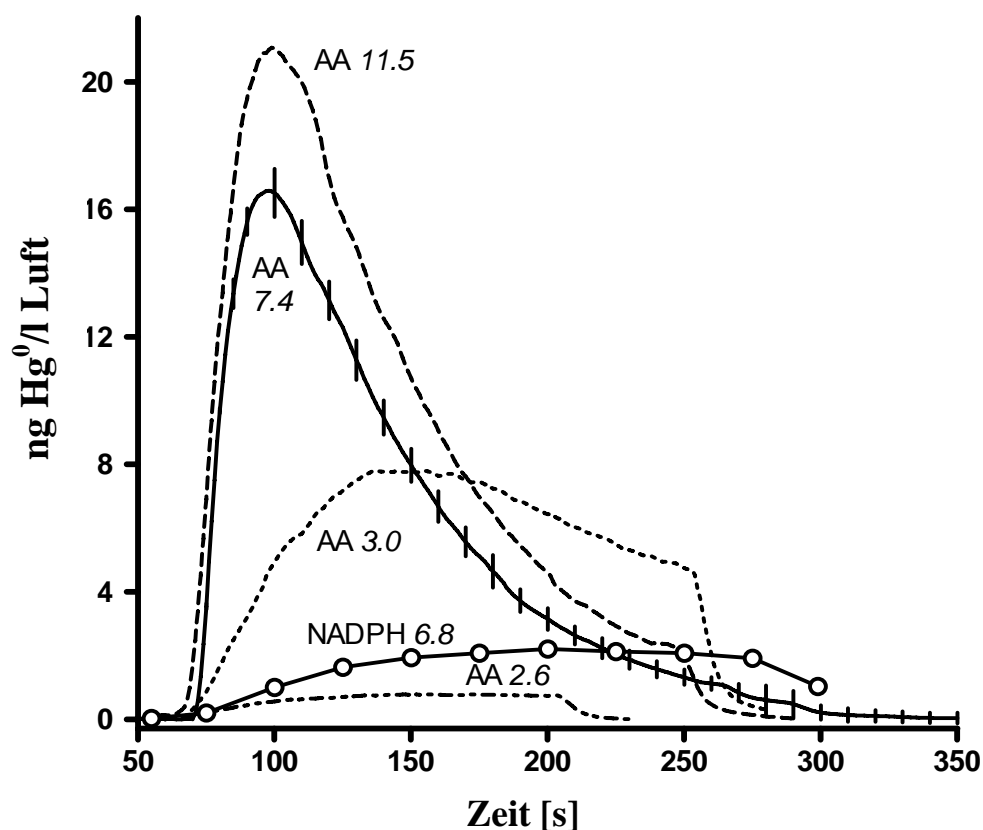


Abbildung 36: Vergleich der Reduktivität von Reinsubstanzen gegenüber  $\text{HgCl}_2$  (pH-abhängig).

## 3.2. Versuchsergebnisse mit der Gerstensorte Scarlett

Die vergleichenden Genexpressionsanalysen wurden analog der in-vitro Versuche mit der Gerstensorte Barke auch mit der Gerstensorte Scarlett durchgeführt. Die Blatt- und Wurzelgewebe von Pflanzen aus den Kontroll-Hydrokulturen und den Hydrokulturen mit Schwermetallzuschlag im Medium ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^2$ ,  $\text{Pt}^{4+}$ ) wurden als Probenmaterial für Mikroarrayanalysen eingesetzt. In den nachstehenden Tabellen 32-35 sind die Ergebnisse der Mikroarrayanalysen dargestellt. In den ersten beiden Tabellen 32 und 33 sind die Gene dargestellt, die schon in der Gerstensorte Barke bei entsprechender Schwermetallexposition differentiell exprimiert wurden, das heißt, es wurden zunächst nur die Gene überprüft, die aus den SSH-Banken der jeweiligen Schwermetallexposition bei Barke stammten.

Tabelle 32: Differentiell exprimierte Gene im Blattgewebe der Gerstensorte Scarlett bei verschiedenen Schwermetallexpositionen im Vergleich zur Gerstensorte Barke.

|     |   | Ind.-Faktor | SD   |
|-----|---|-------------|------|
| Hg: | Kein Ergebnis gefunden                            |             |      |
|     |   |             |      |
| Cd: | Blattspezifisches Thionin                         | 1,55        | 0,23 |
|     | Sulfat-Transportprotein                           | 1,62        | 0,30 |
|     |   |             |      |
|     | Chlorophyll a/b bindendes Protein WCAB            | -1,43       | 0,16 |
|     | d-24-Sterol Methyltransferase                     | -1,38       | 0,22 |
|     | Carboanhydrase                                    | -1,69       | 0,12 |
|     | lhbc Typ III LHC II CAB Protein                   | -1,86       | 0,71 |
|     | D-Untereinheit PSI                                | -1,47       | 0,24 |
|     | UDP-Glucose:Sterol Glucosyltransferase            | -1,35       | 0,24 |
|     | Krankheitsresistenz-ähnliches Protein Isolat 9050 | -1,40       | 0,17 |
|     |   |             |      |
| Pt: | Blattspezifisches Thionin                         | 1,82        | 0,33 |
|     | S-Adenosylmethionin-DC                            | 1,94        | 0,57 |
|     | Disulfidisomerase                                 | 1,30        | 0,11 |
|     | Humanes Tumor-ähnliches Protein                   | 1,77        | 0,25 |
|     |   |             |      |
|     | Alpha-Tubulin 3                                   | -1,36       | 0,21 |
|     | Elongationsfaktor 1-alpha                         | -1,35       | 0,04 |

SD: Standardabweichung (n=4)

Tabelle 33: Differentiell exprimierte Gene im Wurzelgewebe der Gerstensorte Scarlett bei verschiedenen Schwermetallexpositionen im Vergleich zur Gerstensorte Barke.

|     |                                    | Ind.-Faktor | SD   |
|-----|------------------------------------|-------------|------|
| Hg: | Kein zu Barke ähnliches Ergebnis   |             |      |
|     |                                    |             |      |
| Cd: | Succinyl-CoA Ligase                | 1,61        | 0,28 |
|     |                                    |             |      |
|     | Glutathion-S-Transferase I UE      | -1,58       | 0,21 |
|     | Thiolprotease Aleurain             | -1,51       | 0,20 |
|     |                                    |             |      |
| Pt: | S-Adenosylmethionin DC             | 4,36        | 3,12 |
|     |                                    |             |      |
|     | Germin-ähnliches Protein           | -2,02       | 0,20 |
|     | IDI 2                              | -1,58       | 0,64 |
|     | IDI 1                              | -1,58       | 0,64 |
|     | Phosphoglycerat-Mutase             | -1,49       | 0,31 |
|     | Peptidylprolyl cis-trans Isomerase | -1,21       | 0,18 |

SD: Standardabweichung (n=4)

Anschließend wurden alle anderen Gene auf dem Mikroarray ausgewertet, um weitere Unterschiede in der Genexpression in der Gerstensorte Scarlett bei Schwermetallexpositionen zu bestimmen. In den beiden folgenden Tabellen 34 und 35 sind diese Ergebnisse getrennt für Blatt- und Wurzelgewebe dargestellt.

Tabelle 34: Weitere differentiell exprimierte Gene im Blattgewebe der Gerstensorte Scarlett bei verschiedenen Schwermetallepositionen.

|     |   | Ind.-Faktor | SD   |
|-----|---|-------------|------|
| Hg: | Aminolävulinat Dehydratase                | -1,52       | 0,07 |
|     | Glutathion Peroxidase ähnliches Prto      | -3,25       | 5,15 |
|     | Lhb C Typ III LHC II CAB Protein          | -1,55       | 0,45 |
|     |   |             |      |
| Cd: | Alanin-Aminotransferase                   | 1,78        | 0,03 |
|     | Glykolytische Glyceraldehyd-3-phosphat DH | 1,84        | 0,11 |
|     | Humanes Tumor ähnliches Protein           | 1,70        | 0,24 |
|     | S-Adenosylmethionin DC                    | 1,37        | 0,22 |
|     |   |             |      |
|     | PS I Antennen-Protein                     | -1,62       | 0,30 |
|     | Glutamin-abhängige Asparagin-Synthase     | -1,13       | 1,47 |
|     | Glycin-DC                                 | -1,37       | 0,30 |
|     | Glycin-reiches RNA-bindendes Protein      | -1,70       | 0,06 |
|     |   |             |      |
| Pt: | Glykolytische Glyceraldehyd-3-phosphat DH | 1,53        | 0,11 |
|     | S-Adenosylmethionin DC                    | 1,94        | 0,57 |
|     |   |             |      |
|     | GST1                                      | -1,79       | 0,60 |

SD: Standardabweichung (n=4)

Tabelle 35: Weitere differentiell exprimierte Gene im Wurzelgewebe der Gerstensorte Scarlett bei verschiedenen Schwermetallepositionen.

|     |   | Ind.-Faktor | SD    |
|-----|---|-------------|-------|
| Hg: | Vakuolenmembran-H <sup>+</sup> transl. Ao Pyrophosphatase | 1,33        | 0,31  |
|     | Alpha-Tubulin 3   | 1,51        | 0,22  |
|     |   |             |       |
|     | Germin-ähnliches Protein                                  | -1,50       | 0,31  |
|     | S-Adenosylmethionin DC                                    | -1,67       | 0,55  |
|     | Seneszenz-assoziierte Cystein-Protease                    | -3,12       | 2,43  |
|     |   |             |       |
| Cd: | S-Adenosylmethionin DC                                    | 2,08        | 1,12  |
|     | Seneszenz-assoziierte Cystein-Protease                    | 1,29        | 0,22  |
|     | UDP-Glucose:Sterol Glucosyltransferase                    | 1,38        | 0,30  |
|     | Glycin-DC   | 1,34        | 0,22  |
|     | Glycin-DH   | 1,36        | 0,21  |
|     | Putatives Protein (bci5)                                  | 1,72        | 0,61  |
|     |   |             |       |
|     | Germin-ähnliches Protein                                  | -3,94       | 0,84  |
|     | IDI 1   | -1,42       | 0,29  |
|     | IDI2  | -1,47       | 0,17  |
|     | Phosphoglycerat-Mutase                                    | -1,84       | 0,71  |
|     | Put. Proteaseinhibitor (SD 10)                            | -1,75       | 0,17  |
|     | S-Adenosyl-L-Homocystein Hydrolase                        | -1,40       | 0,21  |
|     |   |             |       |
| Pt: | Blattspez. Thionin  | 7,88        | 2,60  |
|     | Chlorophyll a/b bindendes Protein                         | 5,22        | 0,50  |
|     | Ferredoxin NADPH Oxidoreductase                           | 1,45        | 0,42  |
|     | Glycin-DC   | 2,63        | 0,02  |
|     | Glycin-DH   | 1,55        | 0,188 |
|     | Krankheitsresistenz-ähnliches Protein Isolat 9050         | 7,65        | 0,73  |
|     | lhbc Typ III LHC II CAB Protein                           | 1,64        | 0,42  |
|     | LHC II TYP I Protein                                      | 3,79        | 0,58  |
|     | Putatives Protein (bci5)                                  | 3,41        | 1,10  |
|     | Seneszenz-assoziierte Cystein-Protease                    | 1,86        | 0,09  |
|     | Succiny-CoA Ligase  | 1,41        | 0,18  |
|     | Unbekanntes Protein                                       | 1,50        | 0,13  |
|     | UDP-Glucose:Sterol Glucosyltransferase                    | 1,52        | 0,27  |

Tabelle 35 (Fortsetzung): Weitere differentiell exprimierte Gene im Wurzelgewebe der Gerstensorte Scarlett bei verschiedenen Schwermetallepositionen.

|     |                                       | Ind.-Faktor | SD   |
|-----|---------------------------------------|-------------|------|
| Pt: | Glutamin-abhängige Asparagin-Synthase | -1,64       | 0,16 |
|     | Elongationsfaktor 1 alpha             | -1,43       | 0,14 |
|     | Thiolprotease-Aleurain                | -1,44       | 0,14 |
|     | S-Adenosyl-L-Homocystein Hydrolase    | -1,45       | 0,23 |
|     | Saures ribosomales Protein            | -1,32       | 0,12 |

SD: Standardabweichung (n=4)

### 3.3. Versuchsergebnisse der Kulturversuche auf Bodenproben bzw. erdigen Substraten

#### 3.3.1. Versuchsergebnisse der Kultur auf schwermetallkontaminierter Bodenprobe

Der Versuch mit einer kontaminierten Bodenprobe aus Marktredwitz im Vergleich mit einer Kontrollbodenprobe zeigte, dass die Gerstenpflanzen auf dem kontaminierten Boden in ihrer Entwicklung etwas hinter den Pflanzen auf dem Kontrollboden zurückblieben (vgl. Abbildung 37). Ein deutlich schlechteres Wurzelwachstum bei nahezu vollständiger Inhibierung der Wurzelhaarbildung auf dem kontaminierten Boden konnte ebenfalls beobachtet werden, wie in Abbildung 38 gut zu sehen ist.

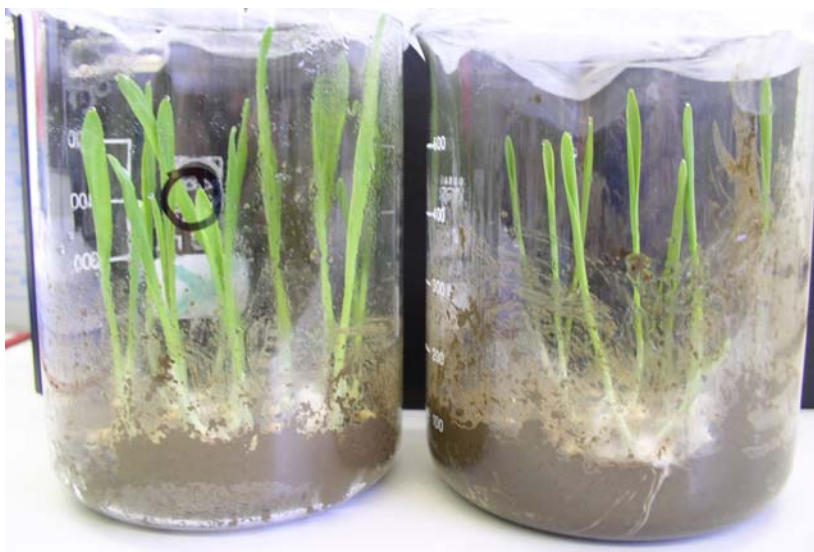


Abbildung 37: Vorversuche zur Kultur von Gerste auf Bodenproben.

Links: Kontrollboden; Rechts: Kontaminierter Boden mit verzögerter Pflanzenentwicklung.



Abbildung 37: Vorversuche zur Kultur von Gerste auf Bodenproben.

Links: Kontrollboden mit guter Wurzelentwicklung und Wurzelhaarbildung; Rechts: Kontaminierter Boden mit eingeschränkter Wurzelentwicklung und fehlenden Wurzelhaaren.

Eine Analyse der erhaltenen Bodenproben ergab die in folgender Tabelle 36 gezeigten Gesamt-Konzentrationen für ausgewählte Schwermetalle.

Tabelle 36: Gesamt-Schwermetallgehalte der Bodenproben aus Marktredwitz.

| Element     | "Kontroll-<br>Boden"<br>[mg/kg] | "Kontaminierter<br>Boden"<br>[mg/kg] |
|-------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| Arsen       | 9,6                             | 22                                   |
| Cadmium     | 1,8                             | 3,3                                  |
| Chrom       | 103,6                           | 170,8                                |
| Quecksilber | 14                              | 129,5                                |
| Blei        | 73,7                            | 231,9                                |
| Zink        | 138,2                           | 297,9                                |



Diese Analyse zeigte, dass der kontaminierte Boden eine erhebliche Menge an Quecksilber aufweist. Allerdings waren auch sehr hohe Gehalte an Arsen, Cadmium, Chrom, Blei und Zink in diesem Boden zu finden. Dies, und die Tatsache, dass auch der vom Institut für Bodenökologie (IBÖ) als Kontrollboden ausgewählte Boden hohe Gehalte an Quecksilber und den anderen Schwermetallen aufweist, ließ eine vergleichende Genexpressionsanalyse schwierig erscheinen. Die Genexpressionsanalyse mit Mikroarrays verlief nicht erfolgreich.

Nach einer Kulturdauer von zehn Tagen wurden Proben vom Blattgewebe genommen und auf ihren Schwermetallgehalt analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 37 gezeigt. Auffällig war, dass die meisten Schwermetallgehalte im Blattgewebe von Pflanzen, die auf dem geringer belasteten „Kontrollboden“ gewachsen sind, deutlich höher waren als die Gehalte im Blattgewebe von Pflanzen, die auf dem kontaminierten Boden gewachsen sind. Lediglich Arsen war im Blattgewebe der Pflanzen vom belasteten Boden deutlich mehr enthalten als in den Kontrollpflanzen. Das Wachstum der Gerstenpflanzen auf den Bodenproben wurde zu den Zeitpunkten der jeweiligen Probenahme für die molekularbiologischen Versuche bestimmt. In Abbildung 39 ist die Blattlängenentwicklung der beiden Pflanzenpopulationen gezeigt. Nach einer anfänglichen Wachstumsdepression der Pflanzen auf kontaminiertem Boden glichen sich die Blattlängen an. Ab ungefähr der zweiten Hälfte des Kulturversuchs konnte kein Unterschied im Wachstum mehr festgestellt werden.

Tabelle 37: Schwermetallgehalte im Blattgewebe der Gerste nach 10 Tagen Wachstum auf Kontroll-Boden bzw. belastetem Boden.

| Element     | "Kontroll-Boden"<br>[µg/kg FS] | "Belasteter Boden"<br>[µg/kg FS] |
|-------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Arsen       | 2,5                            | 7,2                              |
| Cadmium     | 29,3                           | 7,0                              |
| Chrom       | 638,5                          | 92,3                             |
| Quecksilber | 56,9                           | 10,4                             |
| Blei        | 52,6                           | 22,2                             |
| Zink        | 6,0                            | 4,3                              |

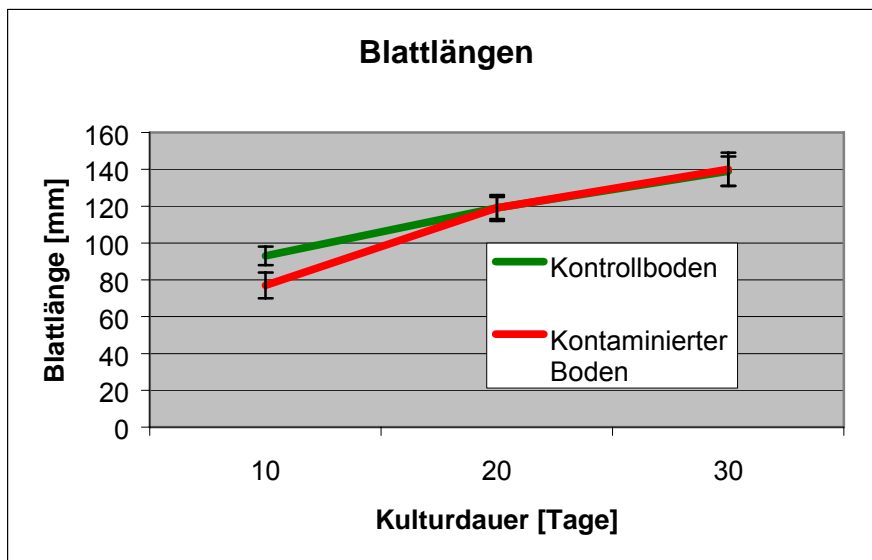


Abbildung 39: Blattlängen der Gerstenpflanzen an verschiedenen Zeitpunkten bei Wachstum auf Kontroll-Boden bzw. kontaminiertem Boden.

### 3.3.2. Versuchsergebnisse der Kultur auf quecksilberkontaminiertem Substrat

Aufgrund der Probleme mit den Böden aus Marktredwitz wurde parallel zu diesem Kooperationsprojekt ein zweiter Versuchsansatz mit definiert kontaminiertem Kultursubstrat angelegt.

Die Gerstenpflanzen zeigten, wie in Abbildung 40 und Tabelle 41 zu erkennen, bei Quecksilbergehalten von ca.  $100 \text{ mmol Hg}^{2+}/\text{kg}$  im Boden deutliche Wachstumsdepressionen über den gesamten Versuchszeitraum hinweg. Die Quecksilbergehalte im Blattgewebe lagen bei den Pflanzen auf kontaminiertem Substrat deutlich über denen der Kontrollpflanzen (vgl. Abbildung 42). Zudem konnte bei den Pflanzen, die auf dem quecksilberbelasteten Substrat gewachsen sind, eine nekrotische Blattläsion knapp unterhalb der Blattspitze an den ersten Blättern beobachtet werden (vgl. Abbildungen 43 und 44). Später entwickelte Blätter wiesen diese Läsion nicht mehr auf. Die Blattläsion konnte auch bei in-vitro kultivierten Pflanzen beobachtet werden und scheint typisch für eine Quecksilberexposition zu sein.



Abbildung 40: Kultur von Gerste auf erdigem Substrat. Links: mit Quecksilber kontaminiertes Substrat; Rechts: Kontrollversuch ohne Quecksilberbelastung des Substrats.

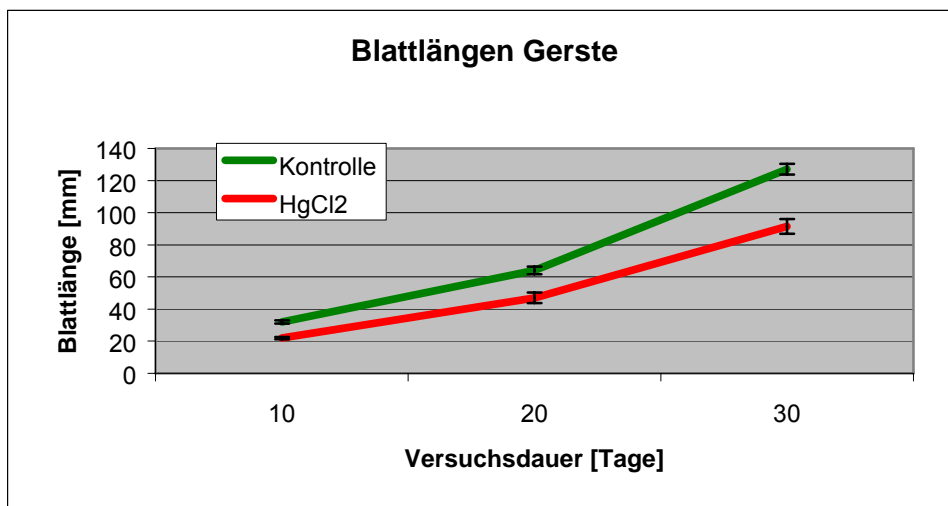


Abbildung 41: Blattlängen der Gerstenpflanzen zu verschiedenen Zeitpunkten bei Wachstum auf Kontroll-Substrat bzw. kontaminiertem Substrat.

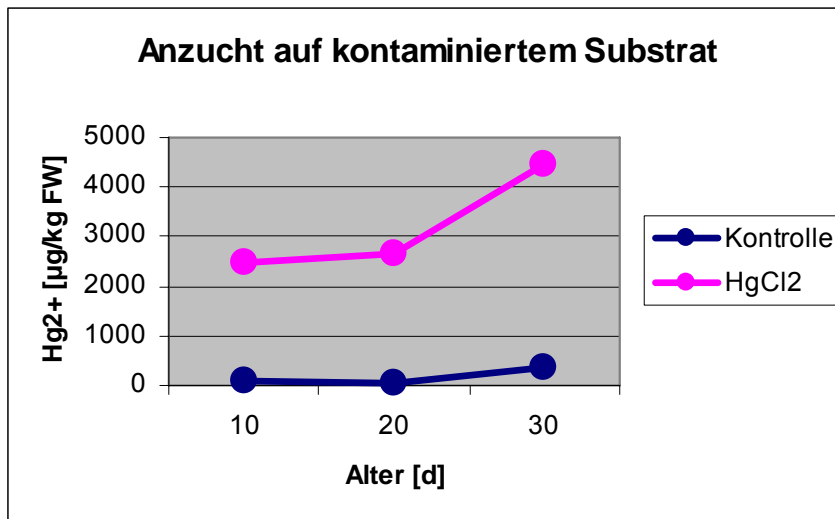


Abbildung 42: Quecksilbergehalte im Blattgewebe von Gerstenpflanzen zu verschiedenen Zeitpunkten bei Wachstum auf mit Quecksilber kontaminiertem Substrat bzw. auf Kontrollsubstrat.



Abbildung 43: Gerstenpflanzen, gewachsen auf Kontrollsubstrat.



Abbildung 44: Gerstenpflanzen, gewachsen auf mit Quecksilber kontaminiertem Substrat. Erkennbar sind typische von Quecksilber verursachte Blattläsionen im Bereich der Blattspitze.

Blattgewebe der Pflanzen wurde nach 9, 20 und 30 Tagen geerntet und als Probenmaterial für die vergleichende Genexpressionsanalyse mit Mikroarrays verwendet. Für die drei Erntezeitpunkte konnten verschiedene Gene als differentiell exprimiert bestimmt werden. Die Ergebnisse der Mikroarrayanalysen sind in den nachfolgenden Tabellen 38, 39 und 40 dargestellt.

Tabelle 38: Differentiell exprimierte Gene im Blattgewebe von 9 Tage auf Kontrollsubstrat bzw. kontaminiertem Substrat gewachsener Gerste.

| 9 Tage:                               | Ind.-Faktor | SD   |
|---------------------------------------|-------------|------|
|                                       |             |      |
| Blattspezifisches Thionin             | 2,90        | 0,79 |
| D-Untereinheit PS I                   | 1,36        | 0,22 |
| S-Adenosylmethionin DC                | 3,92        | 0,66 |
| LHC II Typ I Protein                  | 1,84        | 1,11 |
|                                       |             |      |
| Saures ribosomales Protein            | -1,79       | 0,74 |
| Seneszenz assoziierte Cysteinprotease | -1,72       | 0,29 |

SD: Standardabweichung (n=4)

Tabelle 39: Differentiell exprimierte Gene im Blattgewebe von 20 Tage auf Kontrollsubstrat bzw. kontaminiertem Substrat gewachsener Gerste.

| 20 Tage:                                     | Ind.-Faktor | SD    |
|--|-------------|-------|
|  |             |       |
| b-Glucosidase                                | 1,35        | 0,26  |
| Chlorophyll a/b bindendes Protein            | 2,07        | 0,61  |
| Triosephosphat-Translokator                  | 1,60        | 0,20  |
| UDP-Glucose:Sterol Glucosyltransferase       | 1,68        | 0,20  |
| Unbekanntes Protein                          | 1,94        | 0,06  |
| Putatives Protein (bci5-Gen)                 | 1,30        | 0,17  |
| Rubisco Aktivase                             | 1,42        | 0,38  |
| Glycin-DC                                    | 1,78        | 0,45  |
| Peroxisom Ascorbat-Peroxidase                | 1,54        | 0,21  |
| Hypothetisches Protein (Stress und Abwehr)   | 1,40        | 0,288 |
| Kälte induziertes Protein                    | 1,37        | 0,27  |
| Krankheitsresistenz-ähnliches Protein Isolat | 1,27        | 0,52  |
| Ihb C Typ III LHC II CAB Protein             | 1,43        | 0,43  |

Tabelle 39 (Fortsetzung): Differentiell exprimierte Gene im Blattgewebe von 20 Tage auf Kontrollsubstrat bzw. kontaminiertem Substrat gewachsener Gerste.

| 20 Tage:                                  | Ind.-Faktor | SD   |
|---|-------------|------|
|   |             |      |
| LHC II Typ I Protein                      | 1,84        | 0,48 |
|   |             |      |
| Blattspezifisches Thionin                 | -1,67       | 0,79 |
| Glykolytische Glyceraldehyd-3-phosphat DH | -1,32       | 0,09 |
| GST 1                                     | -1,38       | 0,15 |
| PAL                                       | -1,67       | 0,25 |
| Elongationsfaktor 1 alpha                 | -1,40       | 0,17 |
| Germin ähnliches Protein                  | -2,42       | 0,49 |
| Glutathion-Peroxidase ähnliches Protein   | -1,74       | 0,16 |
| Putative Glutathion-S-Transferase         | -1,61       | 0,09 |
| Alanin-Aminotransferase                   | -1,61       | 0,11 |
| Aquaporin                                 | -1,66       | 0,43 |
| Saures ribosomales Protein                | -1,50       | 0,29 |

SD: Standardabweichung (n=4)

Tabelle 40: Differentiell exprimierte Gene im Blattgewebe von 30 Tage auf Kontrollsubstrat bzw. kontaminiertem Substrat gewachsener Gerste.

| 30 Tage:                                     | Ind.-Faktor | SD   |
|--|-------------|------|
|  |             |      |
| Aquaporin                                    | 1,40        | 0,18 |
| b-Glucosidase                                | 1,45        | 0,18 |
| Chlorophyll a/b bindendes Protein            | 1,21        | 0,27 |
| Cysteinprotease                              | 1,62        | 0,27 |
| D-Untereinheit PS I                          | 1,38        | 0,12 |
| Elongationsfaktor 2                          | 1,27        | 0,13 |
| Glycin DC                                    | 1,32        | 0,12 |
| Glycin DH                                    | 1,46        | 0,15 |
| Knox3  | 1,60        | 0,31 |
| Krankheitsresistenz-ähnliches Protein Isolat | 1,34        | 0,40 |
| Ihb C Typ III LHC II CAB Protein             | 1,53        | 0,29 |
| LHC II Typ I Protein                         | 1,18        | 0,10 |
| Peroxisom Ascorbat-Peroxidase                | 1,29        | 0,21 |

Tabelle 40 (Fortsetzung): Differentiell exprimierte Gene im Blattgewebe von 30 Tage auf Kontrollsubstrat bzw. kontaminiertem Substrat gewachsener Gerste.

| 30 Tage:                                | Ind.-Faktor | SD   |
|---|-------------|------|
|   |             |      |
| Phytoen-Synthase                        | 1,57        | 0,01 |
| Thiolprotease Aleurain                  | 1,48        | 0,15 |
| UDP-Glucose:Sterol Glucosyltransferase  | 1,55        | 0,13 |
| Unbekanntes Protein                     | 1,52        | 0,02 |
|   |             |      |
| PAL                                     | -1,18       | 0,10 |
| Blattspezifisches Thionin               | -1,91       | 0,31 |
| Glutathion-Peroxidase ähnliches Protein | -1,48       | 0,21 |
| GST 34                                  | -1,48       | 0,06 |

SD: Standardabweichung (n=4)

#### 3.4. Versuchsergebnisse der RT-PCR Überprüfung

Mittels RT-PCR wurden ausgewählte Klone, die durch die Makroarray- und Mikroarrayanalysen als differentiell exprimiert identifiziert wurden, überprüft. Dabei konnte für die überprüften Gene ein dem Array entsprechendes Induktionsverhalten nachgewiesen und damit bestätigt werden. Schwache Induktionsfaktoren bei den Array-Analysen zeigten ebenfalls nur sehr schwache bis schwache Induktionen in der Realtime-PCR, größere Induktionsfaktoren konnten auch bei der Überprüfung durch die Realtime-PCR mit größeren Unterschieden im Ct-Wert bestätigt werden. Im Folgenden sind beispielhaft Ergebnisse der Realtime-PCR als Amplifikationskurven dargestellt, im Anschluß daran sind wichtige Ergebnisse der Realtime-PCR als tabellarische Übersicht zusammengefasst (Tabelle 41). Zum direkten Vergleich sind die in den Makroarray- oder Mikroarray-Analysen gefundenen Induktionsfaktoren jeweils mit angegeben. Zudem ist die nach Pfaffl (2001) berechnete relative Menge als Ergebnis der quantitativen Auswertung der qRT-PCR dargestellt. Die Ergebnisse der Array-Analysen stimmten mit den Ergebnissen der Realtime-PCR sehr gut überein. Die Reproduzierbarkeit der Realtime-PCR wurde zum einen durch technische Replikate pro Versuch und Template und zum anderen durch wiederholte PCR mit unabhängigen Templates demonstriert. Eine Auswahl an weiteren Amplifikationskurven der RT-PCR-Ergebnisse ist in den Abbildungen im Anhang gezeigt.



Aufgrund einer Systemumstellung liegen zwei verschiedenen Darstellungsvarianten der Amplifikationskurven vor. Dies ist jedoch für die Aussage der Versuchsergebnisse ohne Bedeutung.

Wurzel (Platinexposition): IDI 2

Induktionsfaktor Makroarray: 0,14

Berechnete relative Menge aus qRT-PCR:  $7,67 \cdot 10^{-5}$

C4 C5 C6: Kontrolle

D4 D5 D6: Behandlung  $40 \mu\text{M PtCl}_4$

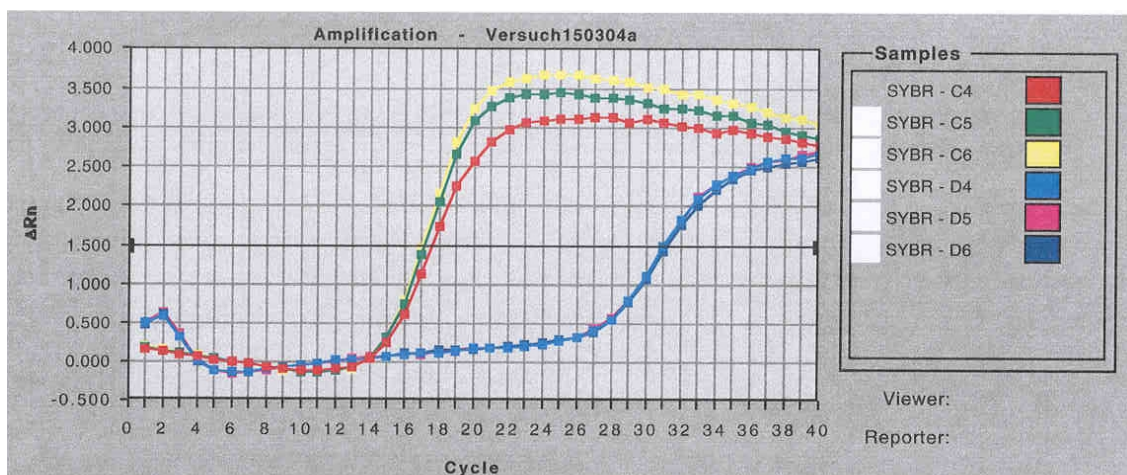


Abbildung 45: Amplifikationskurve IDI2.

Wurzel (Cadmiumexposition): Enolase

Induktionsfaktor Makroarray: 0,42

Berechnete relative Menge aus qRT-PCR: 0,17

E4 E5 E6: Kontrolle

F4 F5 F6: Behandlung  $40 \mu\text{M Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

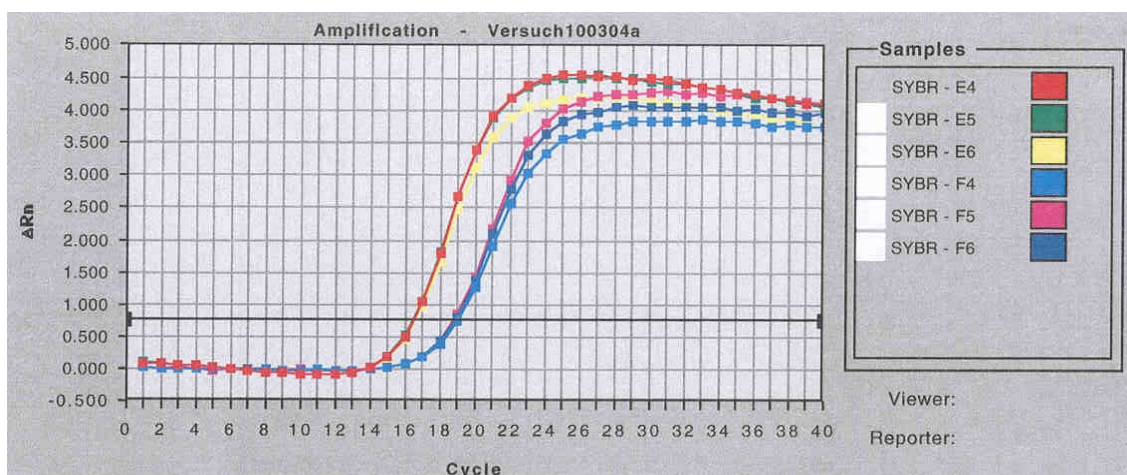


Abbildung 46: Amplifikationskurve Enolase.



Blatt (Quecksilberexposition): Jasmonat induziertes Protein

Induktionsfaktor Makroarray: 0,41

Berechnete relative Menge aus qRT-PCR: 0,29

E1 E2 E3: Kontrolle

F1 F2 F3: Behandlung 40 $\mu$ M HgCl<sub>2</sub>

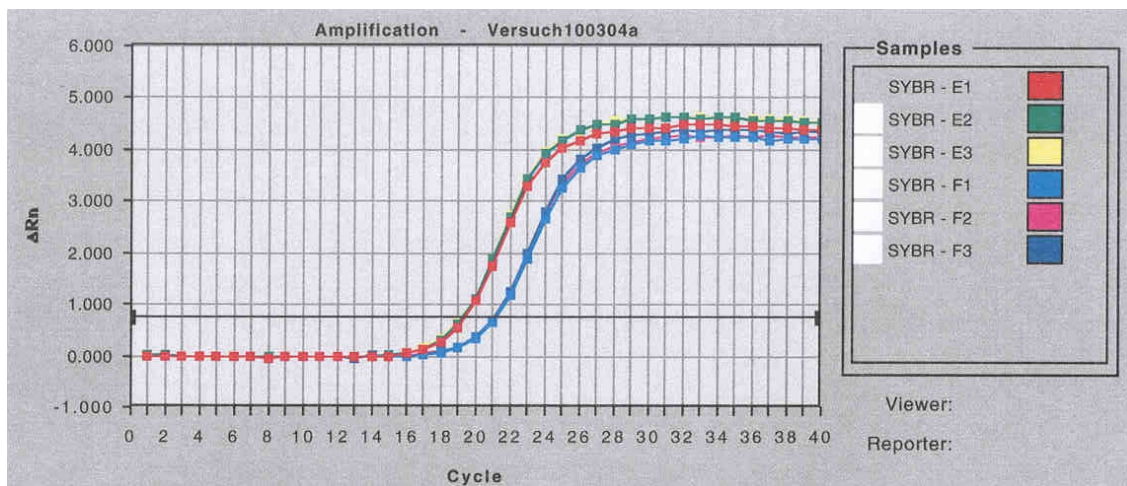


Abbildung 47: Amplifikationskurve Jasmonat induziertes Protein.

Blatt von Gerstenpflanzen, gewachsen auf Substrat (9 Tage): 18S-rRNA zur Normalisierung.

Beide Templates (Kontrolle und Quecksilberexposition) zeigen sehr ähnliche Amplifikationsgraphen.

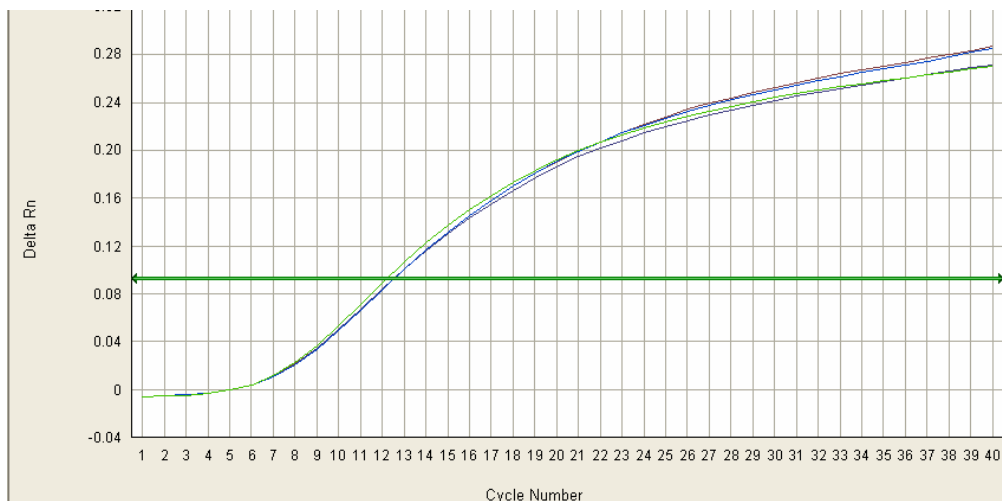


Abbildung 48: Amplifikationskurve 18S-rRNA.

Tabelle 41: Überblick über Ergebnisse der qRT-PCR im Vergleich mit Ergebnissen der Array-Analysen.

| Sorte    | Versuch<br>(Gewebe / Exposition) | Gen                          | Ergebnis<br>Array | Ergebnis<br>qRT-PCR  |
|----------|----------------------------------|------------------------------|-------------------|----------------------|
| Barke    | Wurzel / Platin                  | IDI 2                        | 0,14              | $7,67 \cdot 10^{-5}$ |
| Barke    | Wurzel / Platin                  | Chitin-ind. Protein          | 1,56              | 2,25                 |
| Barke    | Wurzel / Cadmium                 | Enolase                      | 0,42              | 0,17                 |
| Barke    | Wurzel / Cadmium                 | Cytokininoxidase             | 0,27              | 0,51                 |
| Barke    | Blatt / Cadmium                  | Thioredoxin                  | 1,38              | 2,14                 |
| Barke    | Blatt / Cadmium                  | Thioredoxin                  | 1,38              | 3,32                 |
| Barke    | Wurzel / Cadmium                 | Glutathion-S-<br>Transferase | 0,62              | 0,56                 |
| Barke    | Blatt / Platin                   | Thionin                      | 1,89              | 2,30                 |
| Barke    | Blatt / Quecksilber              | Carboanhydrase               | 0,49              | 0,65                 |
| Barke    | Blatt / Quecksilber              | Hypothetisches<br>Protein    | 0,65              | 0,53                 |
| Barke    | Blatt / Quecksilber              | Pepidylprolyl<br>Isomerase   | 0,38              | 0,56                 |
| Barke    | Blatt / Quecksilber              | Jasmonat-ind. Protein        | 0,41              | 0,29                 |
| Barke    | Blatt / Substrat 9 d             | Thionin                      | 2,9               | 10,56                |
| Barke    | Blatt / Substrat 20 d            | Thionin                      | -1,67             | 0,11                 |
| Barke    | Blatt / Substrat 9 d             | LHC II Typ I Protein         | 1,84              | 53,82                |
| Barke    | Blatt / Substrat 20 d            | Hypothetisches<br>Protein    | 1,40              | 1,80                 |
| Scarlett | Blatt / Cadmium                  | Carboanhydrase               | -1,69             | 0,27                 |
| Scarlett | Wurzel / Cadmium                 | IDI 2                        | -1,42             | 0,03                 |
| Scarlett | Wurzel / Platin                  | IDI 2                        | -1,58             | 0,07                 |

## 4. Diskussion

### 4.1 Analysen der Schwermetall-induzierten Stoffwechselwege in der Gerstensorte Barke

#### 4.1.1. Quecksilberexposition

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Quecksilberexposition Einfluss auf die Physiologie und Morphologie von Gerstenpflanzen hat. So ist die Bildung von Wurzelhaaren durch Quecksilber gehemmt, was eine massive Verringerung der Wurzeloberfläche und entsprechend geringere Aufnahmekapazität für Wasser und Nährsalze, bedingt. Gleichzeitig bilden die Gerstenpflanzen bei Quecksilberexposition verstärkt und frühzeitig Sekundärwurzeln aus. Dies kann als Versuch der Pflanze gesehen werden, die durch die verminderten beziehungsweise vollständig fehlenden Wurzelhaare bedingten Einschränkungen in der Nährsalz- und Wasseraufnahme zu kompensieren. Das verringerte Blattlängenwachstum und der höhere Trockensubstanzgehalt in quecksilberexponierten Pflanzen lässt jedoch vermuten, dass diese Kompensation nur teilweise gelingt. Neben der Aufnahme von Wasser und Nährsalzen kann auch der Wassertransport in der Pflanze beeinträchtigt sein. Diese Vermutung wird durch den Befund gestützt, dass ein durch Trockenstress induziertes RNase S-ähnliches Protein bei Quecksilberexposition in der Gerste induziert wird.

Die Gehalte an Quecksilber sind im Wurzelgewebe circa um den Faktor 10 höher als im Blattgewebe. Dies erscheint plausibel, da die Wurzeln direkt mit dem kontaminierten Medium in Kontakt stehen. Die Quecksilberionen können direkt ins Wurzelgewebe gelangen und müssen nicht mit dem Transpirationsstrom in den Blattapparat transportiert werden. Die hohe Bindungsaffinität von Quecksilberionen an viele organische Gruppen (v.a. Sulfhydrylgruppen) kann zudem dafür verantwortlich sein, dass die Ionen schon in der Wurzel beispielsweise an Proteinen immobilisiert werden und nicht mehr zum Weitertransport ins Blattgewebe gelangen können. Der höhere Gehalt im Wurzelgewebe kann zudem auch durch Quecksilberionen bedingt werden, die außen an der Wurzelcortex gebunden sind. Zwar wurden durch intensives Spülen der Wurzeln mit Wasser Reste des flüssigen Mediums entfernt, an die Wurzel gebundene Quecksilberionen konnten jedoch möglicherweise nicht vollständig entfernt werden.

Auf Transkriptionsebene konnten im Blattgewebe eine Reihe von Genen bestimmt werden, die bei Quecksilberexposition der Pflanzen differentiell exprimiert werden. Darunter befinden sich Gene, die als stressinduziert gelten, wie zum Beispiel das Lipid-Transferprotein 7a2b. Das Gen für dieses Protein wurde in Gerste bereits als Cadmium-induziert beschrieben (Hollenbach et al., 1997). Auch durch andere Stressoren (zum Beispiel bei einem Pathogenangriff) sind Lipid-Transferproteine häufig induziert.

Es ist bekannt, dass Quecksilberionen Einfluss auf die Photosynthese haben, indem sie neben anderen Effekten auch eine Chlorophyll-Bleichung verursachen. Eine damit einhergehende hellgrünere Färbung wurde von Van Assche et al. (1990) sowie Heidenreich (1999) beschrieben. Auch ist die Interaktion von Quecksilber mit anderen Komponenten der Photosynthese durch Wallnöfer et al. (1988) beschrieben worden. Eine Inhibierung der Aminolävulinat-Hydratase in *Pennisetum typhoideum* (Prasad et al., 1987) und der Protochlorophyllid-Reduktase in *Euglena gracilis* (De Filippis et al., 1981) belegt dieses Phänomen. Vor diesem Hintergrund ist die Induktion eines Gens für die Bildung eines Proteins des Light-Harvesting-Complexes I und eines Photosystem I Antennenproteins als Kompensation reduzierter photosynthetischer Leistungsfähigkeit in Folge der Quecksilberexposition zu sehen. Dieses Phänomen wurde durch Heidenreich (1999) auch bei *A. thaliana* beschrieben. Die NADPH-Oxidoreductase wird durch Cadmium, Zink und Quecksilber in *E. gracilis* und die Carboanhydrase durch Cadmium in *Glycine max* inhibiert (Robinson et al., 1994). Für beide Proteine konnte auch in Gerste eine Beeinflussung der für sie codierenden Gene beobachtet werden. Das Gen für die Ferredoxin NADPH-Oxidoreductase wurde durch Quecksilber induziert, das Gen für die Carboanhydrase reprimiert. Beide Gene stehen auch in Zusammenhang mit dem Energiestoffwechsel und sind vermutlich durch die Veränderung der Photosynthese-Systeme mit beeinflusst. Die Ferredoxin NADPH-Oxidoreductase ist durch Cadmium inhibiert (Grzyb et al., 2004), deswegen kann vermutet werden, dass es sich hierbei um die vermehrte Transkription des Gens als Kompensationsreaktion der Pflanze zur vermehrten Bildung dieses Proteins handeln könnte. Auch im Wurzelgewebe zeigte sich eine Beeinflussung des Genexpressionsmusters durch Quecksilberionen. Enzyme wie die Deoximuginsäure-Synthase und das Eisenmangel-induzierte Protein IDI2 werden von der Pflanze bei Eisenmangel vermehrt gebildet, um die Versorgung mit diesem essentiellen Schwermetallen zu verbessern (Yamaguchi et al., 2000).

Die Deoximuginsäure wird zum Beispiel ins Mucigel sezerniert, um in der Rhizosphäre Eisen zu chelatisieren und so für die Pflanze verfügbar zu machen (Tolay et al., 2001). Bei der Quecksilberexposition (zweiwertige Quecksilberionen) der Pflanzen erscheint es günstig, dass Systeme, die zu einer vermehrten Aufnahme und Verfügbarkeit von zweiwertigen (!) Metallionen wie  $\text{Fe}^{2+}$  führen sollen, reprimiert werden.

Andere Gene, wie die für ein Kälte-induziertes Protein, für die Allenoxid-Cyclase (AOC) oder für Actin 1, konnten als induziert bestätigt werden. Diese Gene codieren für Proteine, die typisch sind für eine Stress- und Abwehrantwort auf zahlreiche Einflussfaktoren. Die AOC ist mit der Synthese von Jasmonsäure assoziiert, die als wichtiges Pflanzenhormon bei Abwehrreaktionen bekannt ist (Maucher et al., 2004 und Stenzel et al., 2003). Actin 1 ist für die Bildung des Cytoskeletts verantwortlich und wird bei Stresseinwirkung häufig vermehrt gebildet, wobei es möglicherweise auch bei Trockenstress eine Rolle als Modulator der Wasserpermeabilität über Plasmodesmata spielt (Volobueva et al., 2001).

Zwei Gene, die für Proteine codieren, die an der Proteinbildung bzw. dem Proteinabbau beteiligt sind, konnten als reprimiert nachgewiesen werden. Die Peptidylprolyl-Isomerase ist an der Proteinfaltung beteiligt und häufig bei Stress-Situationen induziert (Kurek et al., 1999 und Romano et al., 2004), die Cysteinprotease ist in Vorgänge der Apoptose involviert. Auffällig ist, dass diese Protease die schwefelhaltige Aminosäure Cystein als Substrat umsetzt. Da Quecksilberionen, wie bereits mehrfach ausgeführt, Schwefelatome bzw. Thiogruppen in Aminosäuren über stabile Mercapitdbildungen in ihrer Funktionalität beeinträchtigen könne, liegt hier wohl eine direkte Beeinflussung durch Quecksilber vor.

Die Induktion des Gens für das Glutathion-Peroxidase ähnliche Protein ist Teil des typischen Entgiftungswegs von Schwermetallen. Über Mercapitidbindung werden Schwermetallionen an GSH gebunden und sind so nicht mehr (direkt) für toxische Reaktionen, wie zum Beispiel die Bindung an schwefelhaltige Aminosäuren oder die isomorphe Substitution anderer Metallionen (z.B. Zn) in prosthetischen Gruppen verfügbar. Zudem stellt dieses Enzym Protonen zum Beispiel für die Reduktion von Monodehydroascorbinsäure zu Ascorbinsäure bereit.

Parallel zu diesem System existiert ein Stoffwechselkomplex, der für die Aufrechterhaltung des reduktiven Potentials beziehungsweise für die Eliminierung von Radikalen, insbesondere von Sauerstoffradikalen bzw. reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu Verfügung steht. Dieses

System reduziert oxidativ wirkende Substanzen. Die hierzu benötigten Reduktionsäquivalente werden auch über NADPH/H<sup>+</sup> bereitgestellt, diverse Enzymreaktionen übertragen dann Protonen auf die reduktiven Verbindungen. Prominentes Beispiel einer solchen Verbindung ist die Ascorbinsäure. Diese Verbindung weist ein hohes reduktives Potential auf und ist nahezu ubiquitär in Pflanzen vertreten. In der oxidierten Form liegt sie als Monodehydroascorbinsäure vor. Um das reduktive Potential (wieder) zu erlangen, wird sie durch das Enzym Monodehydroascorbat-Reductase zur Ascorbinsäure reduziert, wobei die dafür benötigten Protonen von der oben bereits angesprochenen Glutathion Peroxidase bereitgestellt werden. Schwermetallionen sind, wie schon in der Einleitung dargestellt, in der Lage, zum Beispiel durch die Haber-Weiß-Reaktion die Bildung von Radikalen zu ermöglichen. Diesen Radikalen kann die Pflanzenzelle mit Ascorbinsäure begegnen, welche sie durch Reduktion detoxifiziert. Um die dabei selbst oxidierte Ascorbinsäure wieder zu regenerieren, wird wie bereits dargestellt die Monodehydroascorbat Reductase wirksam. Die bestätigte Induktion des Gens für dieses Enzym ist somit eine plausible Reaktion der Pflanzenzelle auf Quecksilberexposition.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch noch ein weiterer Mechanismus identifiziert werden, der die Detoxifizierung von Quecksilberionen ermöglicht und für die Induktion der cytosolischen Monodehydroascorbat Reductase verantwortlich sein kann. Dieser Mechanismus beruht auf der Reduktion von Hg<sup>2+</sup> zu Hg<sup>0</sup> durch Ascorbinsäure. Näheres hierzu ist unter 4.1.5. Phytoreduktion dargestellt.

#### 4.1.2. Cadmiumexposition

Die Versuche zu den Effekten einer Cadmiumexposition ergaben bei Cadmiumkonzentrationen im Anzuchtmedium, die in ökotoxikologisch und physiologisch sinnvollem Bereich liegen (bis 100 µM), keine morphologischen Veränderungen des Blatt- und Wurzelwachstums. Auch der Trockensubstanzgehalt der Blätter unterschied sich zwischen behandelten und unbehandelten Pflanzen nicht. Als grundlegende Stressindikatoren wurden daher die Gehalte der Polyamine Putrescin, Spermin und Spermidin bestimmt. Über die nachgewiesene Erhöhung der Konzentration dieser Substanzen in cadmiumexponierten Pflanzen konnten Stresseffekte zunächst grundsätzlich belegt werden.

Cadmium wird sowohl ins Wurzel- als auch ins Blattgewebe aufgenommen, wobei der Gehalt im Gewebe positiv mit dem Gehalt im Medium korreliert ist. Im Wurzelgewebe lag der Gehalt etwa um den Faktor 60 höher als im Blattgewebe, was, ähnlich den Beobachtungen bei Quecksilber, zum einen auf den direkten Kontakt der Wurzeln mit dem Schwermetall im Anzuchtmedium und zum anderen mit an der Wurzelexodermis anhaftenden Cadmiumionen zusammenhängen kann. Auch Cadmium bindet stark an Proteine und kann deswegen unter Umständen auch durch intensives Spülen nicht vollständig von den Wurzeln abgewaschen werden. Gleichzeitig kann Cadmium deswegen auch in der Wurzel immobilisiert werden und sein Transport in die Blätter einen entsprechend reduzierten Umfang aufweisen.

Im Blattgewebe zeigen diverse Gene eine Reaktion auf die Cadmiumexposition. Wie schon bei Quecksilber zeigt auch Cadmium als Schwermetall einen Einfluß auf den Energiestoffwechsel der Pflanzen, insbesondere durch Störung der Photosynthese. Die Gene für die Chlorophyllsynthese, ein Chlorophyll a/b bindendes Protein und für zwei Proteine aus dem LHC II sind durch Cadmium induziert, ebenso das Gen für die  $\beta$ -Glucosidase als zentrales Enzym des Energiemetabolismus. Aufgrund dieser Befunde kann abgeleitet werden, dass die Pflanze versucht, die reduzierte Leistungsfähigkeit ihres Energiestoffwechsels durch Erhöhung der Neusynthese entsprechender Verbindungen (teilweise) zu kompensieren. Gleichzeitig sind die Gene für die Carboanhydrase und das Cytochrom c1 reprimiert. Die negative Beeinflussung des Energiestoffwechsels verursacht anscheinend trotz der gerade beschriebenen Kompensationsversuche eine Verringerung des Umsatzes im Kohlenstoffmetabolismus bzw. in der Atmungskette, wodurch darin involvierte Enzyme in geringerem Umfang gebildet werden. Darüber hinaus ist die Carboanhydrase ein Enzym, das sechs Zinkatome trägt (Komarova et al., 1981), die durch Cadmium isomorph ersetzt werden können, was zu einem Funktionsverlust des Enzyms führt.

Desweiteren sind Gene durch Cadmiumexposition induziert, die für klassische Schwermetallentgiftungssysteme codieren. So ist das Gen für ein blattspezifisches Thionin und das Gen für Thioredoxin induziert. Diese Proteine sind in der Lage, die durch die hohe Affinität der Cadmiumionen zu Schwefelgruppen bedingte Toxizität zu verringern (Gelhay et al., 2005) und werden deshalb vermutlich vermehrt gebildet.

In diese Gruppe gehört auch das Glutathion, das über Mercaptidbindungen Schwermetalle detoxifiziert und Protonen für Reduktionsreaktionen bereitstellt. Eine Beeinflussung der

Expression von Genen, die mit der Synthese und dem Metabolismus dieser Verbindung assoziiert sind, konnte mit den durchgeführten Versuchen im Blattgewebe nicht nachgewiesen werden, im Wurzelgewebe sind solche Effekte jedoch beobachtet worden. Es ist jedoch zu vermuten, dass auch im Blattgewebe biochemische Interaktionen zwischen Cadmium und GSH existieren. Aufgrund der bekannten Eigenschaften von GSH kann davon ausgegangen werden, dass GSH bei der Detoxifizierung von Cadmium umgesetzt wird und entsprechend in verringertem Umfang als Protonendonator für andere Reaktionen zu Verfügung steht. Dies könnte erklären, warum das Gen für die  $\delta$ -24-Sterol Methyltransferase reprimiert wird, da dieses Enzym GSH als Substrat für die Ergosterolbiosynthese benötigt.

Cadmium greift wie beschrieben an vielen Stellen in den Schwefelstoffwechsel der Pflanze, beispielsweise durch Bindung an anorganische oder organische Schwefelverbindungen oder schwefelhaltige Gruppen ein. Diese Tatsache kann erklären, warum das Gen für ein Sulfat-Transportprotein durch Cadmiumexposition reprimiert wird. Möglicherweise steht in der Pflanze bei Anwesenheit von Cadmium weniger Schwefel bzw. Sulfat zu Verfügung, und aufgrund der geringeren Substratkonzentration wird die Biosynthese des Sulfat-Transportproteins nach unten reguliert.

Das Gen für ein Krankheitsresistenz-ähnliches Protein ist induziert, was auf das Auslösen von allgemeinen Abwehrreaktionen durch Cadmium schließen lässt. Allerdings ist das Gen für die Chitinase reprimiert. Dieses Protein wird normalerweise durch Pathogenangriff und häufig auch durch andere Stressoren aktiviert (Saito et al., 2003). Cadmium hat jedoch einen reprimierenden Einfluss auf die Expression des für dieses Enzym codierenden Gens. Dies könnte daran liegen, dass die Gerstenpflanzen das für den Stressor Cadmium eigentlich unspezifische Protein nicht bilden und nur andere allgemeine und vielleicht spezifischere Abwehrreaktionen einleiten. Es könnte aber auch sein, dass Cadmium in die Biosynthese und den Katabolismus dieses Proteins eingreift und es deshalb zu einer solchen Reaktion der Pflanzen kommt.

Im Wurzelgewebe sind ebenfalls eine Reihe von Genen differentiell exprimiert. So ist das Gen für ein GTP-bindendes Protein reprimiert. Es gibt Hinweise, dass dieses Protein als second-messenger in der Signalkettentransduktion in Sojazellen involviert und an der



Auslösung des „oxidative burst“ beteiligt ist (Legendre et al., 1992). Auch Gene, die für Proteine codieren, welche in Zusammenhang mit dem Metabolismus von Pflanzenhormonen und damit auch mit der Modulation der Stressantwort stehen, wie zum Beispiel das IAA 1 Protein und die Cytokininoxidase, wurden als reprimiert bestätigt. Ähnlich wie im Blattgewebe zeigen Gene für Proteine, die mit dem Energiestoffwechsel assoziiert sind, wie die Enolase, die Aconitat-Hydratase oder das Pyruvat-Kinase ähnliche Protein eine negative Regulation. Auch die Gene für die Glutathion-S-Transferase I Untereinheit und für das Thiolprotease Aleurain sind in ihrer Expression reduziert. In *N. tabacum* wurde bereits die Störung des Succinat-Stoffwechsels durch Cadmium beschrieben. Das Gen für die Succinyl-CoA Ligase ist im Wurzelgewebe von Gerste durch Cadmium reprimiert und könnte auf eine ähnliche Beeinflussung der Stoffwechselwege hindeuten.

Diese Beobachtungen lassen insgesamt darauf schließen, dass Cadmium im Wurzelgewebe massiven negativen Einfluss auf die Stoffwechselaktivität hat und viele metabolische Systeme deshalb herunterreguliert werden. Dies kann in der bereits mehrfach erwähnten hohen Affinität von Cadmium zu Schwefelverbindungen, durch isomorphen Ersatz von Zink in prosthetischen Gruppen oder durch Inhibierung von Proteinen durch Bindung an schwefelhaltige Aminosäuren begründet sein.

#### 4.1.3. Platinexposition

Eine Platinexposition verursacht bei Gerstenpflanzen überraschend starke Effekte auf morphologischer und physiologischer Ebene. So wurde beobachtet, dass bei Platinkonzentrationen ab ca. 40  $\mu\text{M}$  eine Verringerung des Blattlängenwachstums auftritt. Auch die Wurzelentwicklung wird durch Platin massiv gestört, insbesondere das Wurzellängenwachstum wird erheblich vermindert. Im Wurzelgewebe korreliert der Gehalt an Platin positiv mit dem Gehalt an Platin im Medium. Der Gehalt ist dabei, wie bei den anderen Schwermetallen auch, deutlich höher als im Blattgewebe. Allerdings zeigt sich im Blattgewebe keine direkte Korrelation mit der Platinkonzentration im Medium. Die Platingehalte im Blatt zeigen bei steigender Konzentration im Medium einen zweigipfeligen Anstieg. Nach einem Anstieg des Platingehalts im Blattgewebe auf etwa 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  TS bei 30  $\mu\text{M}$  Platin im Medium fällt der Gehalt bei 40  $\mu\text{M}$  Platin im Medium auf etwa die Hälfte ab. Bei weiter ansteigender Platinkonzentration im Medium steigt der Platingehalt im

Blattgewebe dann sprunghaft auf über 3000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  TS bei 60  $\mu\text{M}$  Platin im Medium an, um dann, bei noch höheren Konzentrationen, wieder deutlich auf ca. 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  TS bei Konzentrationen ab 80  $\mu\text{M}$  Platin im Medium abzufallen. Diese Beobachtung legt den Schluß nahe, dass Platin bei geringen Konzentrationen zunächst in die Pflanze über die Wurzel aufgenommen und dann ins Blattgewebe weitertransportiert wird. Steigt die Konzentration im Medium weiter an, werden vermutlich Systeme in der Pflanze aktiv, die einen Transport des Platins vermindern. Diese Systeme sind scheinbar so potent, dass sie die Platingehalte im Blattgewebe bei einer Mediumskonzentration von 40  $\mu\text{M}$  geringer halten können, als sie bei niedrigeren Mediumskonzentrationen zu finden sind, wo diese Systeme eventuell noch nicht aktiv sind. Steigt die Mediumskonzentration weiter an, können diese Systeme offensichtlich nicht mehr ausreichend für die Kontrolle des Platintransports ins Blattgewebe sorgen. Dies kann daran liegen, dass ihre Kapazität erschöpft ist, oder auch daran, dass die Toxizität des Platins einen Zusammenbruch dieser Systeme verursacht, was den sprunghaften Anstieg der Platingehalte im Blattgewebe bei 60  $\mu\text{M}$  Platin im Medium erklären kann. Bei noch höheren Mediumkonzentrationen scheint ein zweites System aktiv zu werden, welches dann die Platinaufnahme ins Blattgewebe kontrolliert. Dieses System ist bei den hohen Platinkonzentrationen von 80  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  im Medium in der Lage, die Platingehalte im Blattgewebe wieder deutlich niedriger bei ca. 1000  $\mu\text{g} / \text{kg}$  TS zu halten. Dies kann entweder auf die spezifische Induktion eines Systems, das die Metallionenaufnahme und deren Transport kontrolliert zurückzuführen sein, oder aber auf einen durch die Platintoxizität verursachten Funktionalitätsverlust von zum Beispiel Metall-Transportproteinen, die neben anderen Metallionen auch (unspezifisch) Platinionen transportieren. Die Genexpressionsanalysen wurden bei 40  $\mu\text{M}$  Platin im Medium durchgeführt, das entspricht der Konzentration, bei der die ersten deutlichen morphologischen Effekte zu beobachten sind und bei welcher der gerade diskutierte erste Rückgang der Platinkonzentration im Blattgewebe zu beobachten ist. Im Blatt- und Wurzelgewebe sind die durch Platin verursachten Effekte im Vergleich zu den durch die anderen Schwermetalle induzierten Effekte relativ stark. Eine Vielzahl von Genen konnte als differentiell exprimiert bestätigt werden, wobei die Induktionsfaktoren gleichzeitig häufig deutlich höhere Beträge als bei Quecksilber- und Cadmiumexposition zeigen. Diese Tendenz ist auch in der Proteomanalyse erkennbar. Nur für die Platinexposition konnten bisher im Blatt- und Wurzelgewebe Proteine mit unterschiedlich hohem Vorkommen nachgewiesen werden.

Im Blattgewebe wurden Gene induziert, die für Proteine der klassischen Entgiftungssysteme bzw. Stressantworten codieren, darunter die für ein blattspezifisches Thionin und das Lipid-Transferprotein 7a2b. Gleichzeitig wurden auch bei der Platinexposition Gene induziert, die in Zusammenhang mit dem Schwefelstoffwechsel, insbesondere mit der Proteinbiosynthese, stehen, wie zum Beispiel die Gene für die S-Adenosylmethionin-Decarboxylase, die Seneszenz-assoziierte Cysteinprotease und die Disulfidisomerase. Aus diesen Beobachtungen lässt sich ableiten, dass auch Platin massiv mit schwefelhaltigen Verbindungen, vor allem mit Aminosäuren, interagiert und darüber die Funktionalität der Proteinbildung und der Enzymaktivität beeinflusst. Anscheinend versucht die Pflanze durch Hochregulation entsprechender Gene diese Beeinflussung zu kompensieren und eventuell verlorene Funktionalitäten zu erhalten. Es wird diskutiert, dass die S-Adenosylmethionin-Synthase in Gerste an der Ausbildung einer Stresstoleranz beteiligt sein soll (Sule et al., 2004). Die gefundene Induktion der S-Adenosylmethionin-Decarboxylase könnte somit darauf hindeuten, dass das S-Adenosylmethionin auch bei Platinexposition eine Rolle bei Ausbildung einer Stresstoleranz spielt.

Auch der Energiestoffwechsel und die Photosynthese werden von Platin beeinflusst, jedoch zeigen sich Unterschiede zu den Effekten der anderen Schwermetallpositionen. Platin verursacht eine Repression von Genen, die für Proteine aus den Photosynthese-Systemen codieren. So konnten die Gene für ein Photosystem I Antennenprotein, ein Chlorophyll a/b bindendes Protein und ein Typ I Protein aus dem LHC II als negativ reguliert bestätigt werden. Platin scheint also die Leistungsfähigkeit der Photosynthese nicht in der Art zu beeinträchtigen, dass die Pflanze durch vermehrte Expression von Genen für Photosynthesekomponenten eine Kompensation versucht. Vielmehr scheint hier der bekannte Effekt der Photosynthesedepression durch abiotische Stressoren vorzuliegen. Auch die Induktion von Genen, die für Proteine aus dem Energiemetabolismus codieren, wie für die Glucose-6-phosphat Dehydrogenase, zeigt, dass der Energiestoffwechsel durch Platin anders beeinflusst wird als durch Quecksilber und Cadmium. Es wurde beobachtet, dass die Glucose-6-phosphat Dehydrogenase durch das Angebot metabolisierbarer Zucker oder eine hohe Nachfrage nach NADPH induziert wird (Hauschild et al., 2003). Anscheinend ist Platin für eine solche Erhöhung des Energiemetabolismus verantwortlich. Dies könnte in einem erhöhten Energiebedarf für die Detoxifikation des Platins oder aber auch in einer Inhibierung von Enzymsystemen, die in den Energiestoffwechsel involviert sind und deren Störung von

der Pflanze durch vermehrte Neusynthese von entsprechenden Proteinen kompensiert wird, begründet sein.

Die Tatsache, dass sowohl das Gen für die Glycin-Decarboxylase als auch das Gen für die Glycin-Dehydrogenase als reprimiert beobachtet werden konnte, zeigt, dass Platin in den Metabolismus der Aminosäuren, Polypeptide und Proteine eingreift. Taylor et al. (2002) konnte zudem zeigen, dass Umweltstress eine oxidative Schädigung von Mitochondrien in Pflanzen verursacht, was eine Inhibierung der Glycin-Decarboxylase bewirkt. Dies kann der Grund für die Platin-induzierte Repression dieses Gens sein. Eine besondere Bedeutung scheint auch der Einfluss von Platin auf die Aminosäuren bezüglich ihrer Aminogruppen zu haben. Das Gen für die Aspartat-Aminotransferase konnte als induziert beobachtet werden, die Beeinflussung einer Aminotransferase konnte auch auf Proteomebene bewiesen werden (vgl. Ergebnisse der Proteomanalyse und Diskussion der Proteomanalyse unten).

Interessant ist auch die Reprimierung des Gens für die Peroxisom Ascorbat-Peroxidase. Wie bereits bei der Diskussion der Ergebnisse der Quecksilberexposition angesprochen, ist Ascorbinsäure ein potentes Reduktionsmittel. Platin scheint Reaktionen zu katalysieren, die oxidativ wirkende Substanzen generieren. Diese könnten dann durch Ascorbinsäure detoxifiziert werden. Das Enzym Ascorbat-Peroxidase ist unter diesen Bedingungen sinnvollerweise weniger präsent, um nicht reduzierte Ascorbinsäure zu oxidieren und somit das Reduktionssystem zu schwächen.

Besonders interessant ist die Induktion des Gens für das Alpha-Tubulin 3, da Platin bekannt dafür ist, an dieses Protein zu binden und die Mitose darüber zu hemmen (Tulub et al., 2001). Deswegen werden Platinverbindungen als Cytostatikum in der Onkologie appliziert, wobei diese Chemotherapie eine Hauptquelle für Platinemissionen in die Umwelt über Klinikabwässer darstellt. In Gerste scheint die Bindung an Tubuline ähnlich zu sein und die Pflanze versucht anscheinend, durch erhöhte Transkription dieses Gens die negative Beeinflussung der Tubuline zu kompensieren.

Im Wurzelgewebe finden sich ebenfalls viele Effekte als Folge einer Platinexposition. So sind Gene reprimiert, die für Proteine der Metallionen-Aufnahme codieren. Hierzu gehören die Eisenmangel-induzierten Proteine IDI 1 und IDI 2, die beide durch außergewöhnlich starke

Repression auffallen. Diese ist sicher eine Reaktion der Pflanze auf die erhöhte Metallionen-Verfügbarkeit im Medium. Die Pflanze kann so anscheinend die Aufnahme von Metallionen verringern und damit toxische Platinionen zumindest teilweise exkludieren.

Auch klassische Entgiftungssysteme sind in der Wurzel von der Platinexposition beeinflusst. So ist das Gen für die Glutathion-S-Transferase GST 34 deutlich induziert, das Gen für ein Glutathion-Peroxidase ähnliches Protein ist reprimiert, was darauf hindeutet, dass Platinionen zumindest teilweise durch reduziertes Glutathion detoxifiziert werden und die Pflanze dazu vermehrt reduziertes GSH bereitstellt.

Im Bereich des Energiestoffwechsels zeigt sich, dass manche Gene für Proteine aus diesen metabolischen Systemen induziert sind, wie zum Beispiel die Saccharose-Synthase, andere hingegen eine überaus starke Repression erfahren, wie die glykolytische Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase oder die Phosphoglycerat-Mutase. Hier scheinen verschiedene Störungen im Substrat- aber auch Proteinmetabolismus vorzuliegen, wie auch die unten diskutierten Ergebnisse der Proteomanalyse zeigen.

Die bereits bei *Pennisetum typhoideum* nachgewiesene Störung der Aminolävulinat-Dehydrogenase durch Quecksilber und Blei findet in Gerste eine anscheinend analoge Beeinflussung durch Platin, in der das Gen für dieses Protein im Wurzelgewebe als induziert belegt werden konnte. Dies spricht für eine Kompensationsreaktion der Pflanze auf reduzierte Enzymfunktionalität.

Auch der Schwefelstoffwechsel in der Wurzel scheint durch Platin beeinflusst zu sein. Das Gen für die Sulfolipid-Synthase ist induziert, das für die S-Adenosylmethionin Decarboxylase ist reprimiert. Dies deutet darauf hin, dass der Metabolismus schwefelhaltiger Verbindungen massiv gestört ist und die Pflanze versucht, auf der einen Seite vermehrt schwefelhaltige Verbindungen zu synthetisieren, auf der anderen Seite aber auch Enzyme für den Aminosäuremetabolismus reprimiert, was in einem Mangel an suszeptiblen Substraten begründet sein kann. Aber auch die bereits erwähnte mögliche Einbindung des S-Adenosylmethionins in die Abwehrantwort von Pflanzen kann eine Ursache für die Beobachtungen sein.

Die Gene für die Aspartat-Aminotransferase und die Alanin-Aminotransferase sind beide stark reprimiert. Dies deutet auf einen erheblichen Einfluss des Platins bei der Aminosäure- und Proteinbiosynthese hin, wie auch die negative Regulation des Gens für die Peptidylprolyl cis-trans Isomerase zeigt. Auch ist vermutlich der Abbau von durch Platin geschädigten Proteinen verstärkt aktiv, da Gene für Enzyme wie die LON2 Protease oder die Aspartat-Proteinase induziert werden.

Platin scheint zudem unspezifische Abwehrantworten zu induzieren, wie die vermehrte Expression des Gens für ein Chitin-induzierbares Gibberellin-responsives Protein zeigt. Ein wichtiges Protein bei der Verarbeitung von Stresseinflüssen scheint auch das Germin-ähnliche Protein zu sein, das seine zunächst erkannte Bedeutung hauptsächlich in keimenden Samen zur Pathogenabwehr hat (Aubry et al., 2003 und Park et al., 2004). Das für dieses Protein codierende Gen wird durch Platin im Wurzelgewebe massiv reprimiert. Auch andere Stressoren wie erhöhte UV-Einstrahlung oder andere Schwermetallexpositionen führen zu einer Repression dieses Gens (persönliche Mitteilung von Christine Schäfer und Christine Götz, GSF, bzw. eigene Versuchsergebnisse). Ähnlich verhält sich auch das Gen für einen putativen Protease-Inhibitor, das durch Platin reprimiert wird. Auch dieses Gen ist bekannt dafür, bei anderen Stressfaktoren wie UV-Bestrahlung negativ reguliert zu werden (persönliche Mitteilung Christine Schäfer und Olaf Neuschäfer-Rube, GSF).

Erstaunlich ist die Repression des Gens für Alpha-Tubulin 3 durch Platin im Wurzelgewebe. Wie bereits für Blattgewebe diskutiert, ist Platin für seine Interaktion mit Tubulinen bekannt und führt zu einer nachgewiesenen Induktion des Gens im Blattgewebe. Die im Wurzelgewebe beobachtete stark negative Regulation zeigt, dass auch hier Platin einen erheblichen Einfluss auf dieses Protein und die damit verbundenen Zellstrukturen hat. Die Repression kann spezifisch zum Erntezeitpunkt bei der untersuchten Konzentration von 40µM Platin im Medium auftreten, oder durch eine Art Überkompensation oder eine bereits eingetretene Deregulation verursacht sein.

Die Proteomanalyse platinexponierter Pflanzen zeigte mehrere Proteine im Blatt- und Wurzelgewebe, die durch die Schwermetallapplikation reguliert werden. Darunter fand sich im Blattgewebe die Ferredoxin-NADPH Oxidoreductase, die durch Platin reprimiert wurde. Dieses Enzym ist an vielen metabolischen Vorgängen beteiligt und es wurde von Grzyb et al. (2004) gezeigt, dass Cadmium die Funktion des Proteins inhibiert. Ein ähnlicher Effekt scheint auch von Platin auszugehen. Die putative Aminotransferase AGD2 ist in Platin-

behandelten Pflanzen weniger präsent als in den Kontrollpflanzen. Von Song et al. (2004) wird ein AGD2-Protein in *A. thaliana* als wichtiger Faktor für die Synthese eines von Aminosäuren abgeleiteten Signalmoleküls diskutiert, das die Pflanzenentwicklung fördert und Abwehrreaktion unterdrückt. Vor diesem Hintergrund lässt sich die Verringerung dieses Proteins als Erhöhung der Abwehrreaktionen in der Pflanze deuten.

Die Ferredoxin Nitritreductase ist ebenfalls durch Platin reduziert. Pajuelo et al. (1995) beschrieb den Rückgang dieses Enzyms während der Dunkelphase und vermutete eine Proteindegradation als Ursache. Eventuell wird eine solche Proteindegradation auch von Platin bewirkt. Die Reprimierung der Rubisco Aktivase Isoform 1 scheint auf eine negative Beeinflussung der Photosynthese durch Platin hinzudeuten. Dies ist konform mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse, in der Platin ebenfalls Gene für Komponenten der Photosynthese-Systeme reprimiert. Dagegen wurde die Rubisco Aktivase B durch Platin induziert. Hier scheint eine spezifische Beeinflussung verschiedener Isoformen durch Platin vorzuliegen, zu deren Bewertung weitere Studien nötig sind. Durch Platinexposition wurde zudem die Kupfer-Zink Superoxid-Dismutase 2 induziert, was in einem erhöhten Bedarf an detoxifizierenden Systemen begründet sein dürfte. Dieses Enzym ist bei oxidativem Stress, wie er zum Beispiel auch durch Platin verursacht werden kann, häufig induziert.

Auch einige kleine Hitzeschock-Proteine wurden durch Platin im Blattgewebe von Gerstenpflanzen induziert. Hitzeschockproteine werden häufig als Antwort auf verschiedene Stressoren gebildet. Singer (Universität Karlsruhe, persönliche Mitteilung) konnte zeigen, dass Platin bei Dreikantmuscheln bereits in geringen Konzentrationen eine hohe Letalität bewirkt, wobei der Effekt von Platin die Wirkungen „klassischer“ Schwermetalle wie Cadmium und Blei deutlich übertrifft. Die Platinexposition induzierte in dieser Muschelart ebenfalls Hitzeschock-Proteine. Auch im Wurzelgewebe der Gerste konnten solche Proteine als induziert bestätigt werden, was ihre globale Bedeutung für die Stressantwort auf Platinexposition unterstreicht.

Im Wurzelgewebe konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass das Glycin-reiche RNA-bindende Protein durch Platin reprimiert wird. Naqvi et al. (1998) beobachtete, dass solche Proteine in frühen Stadien einer hypersensitiven Reaktion von Tabak auf eine TMV-Infektion reprimiert werden. Erst in späteren Stadien der Reaktion wurden diese Proteine induziert. Möglicherweise reagiert die Pflanze auf Platinstress ähnlich, nämlich zunächst mit einer

Repression dieses Proteins, um dann später seine Synthese zu induzieren. Dies könnte erklären, warum das Gen für dieses Protein im Wurzelgewebe durch Platin zum Erntezeitpunkt stark induziert wurde. Ähnlich verhält es sich mit der cytosolischen Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase, die im platinexponierten Wurzelgewebe in erhöhten Mengen gefunden wird, obwohl das Gen für dieses Protein massiv reprimiert wird. Dies kann primär ein Effekt von Produkthemmung der Transkription sein. Die Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase interagiert mit Tubulinen (Glaser et al., 2002) und könnte dadurch auch indirekt durch Platin beeinflusst werden. In den folgenden Abbildungen 49 und 50 sind die auf Proteomebene beobachteten Effekte der Platinexposition vergleichend mit den Ergebnissen auf Transkriptionsebene für Blatt- und Wurzelgewebe getrennt dargestellt.

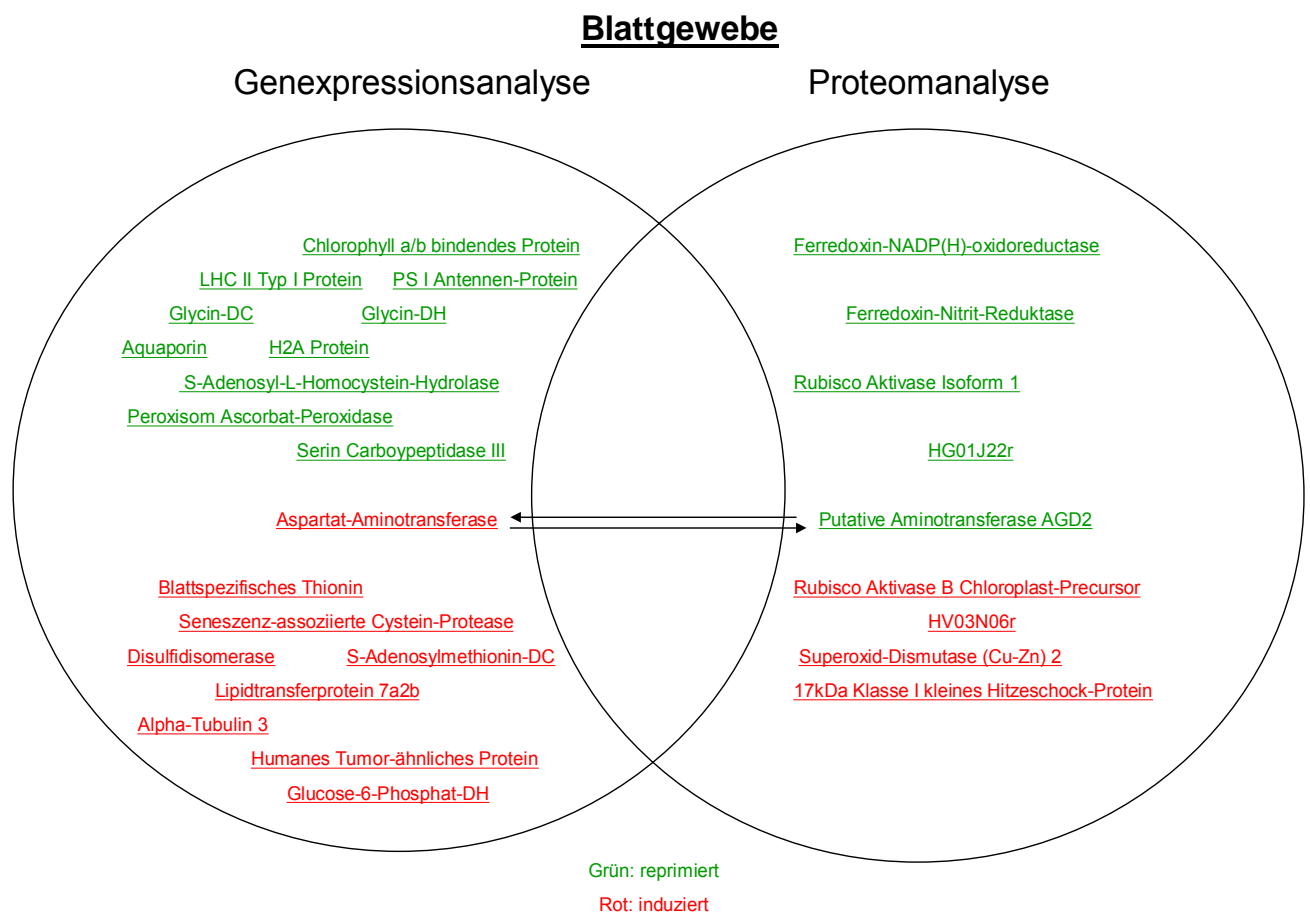


Abbildung 49: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Genexpressionsanalyse und Proteomanalyse im Blattgewebe von Gerste bei Platinexposition.



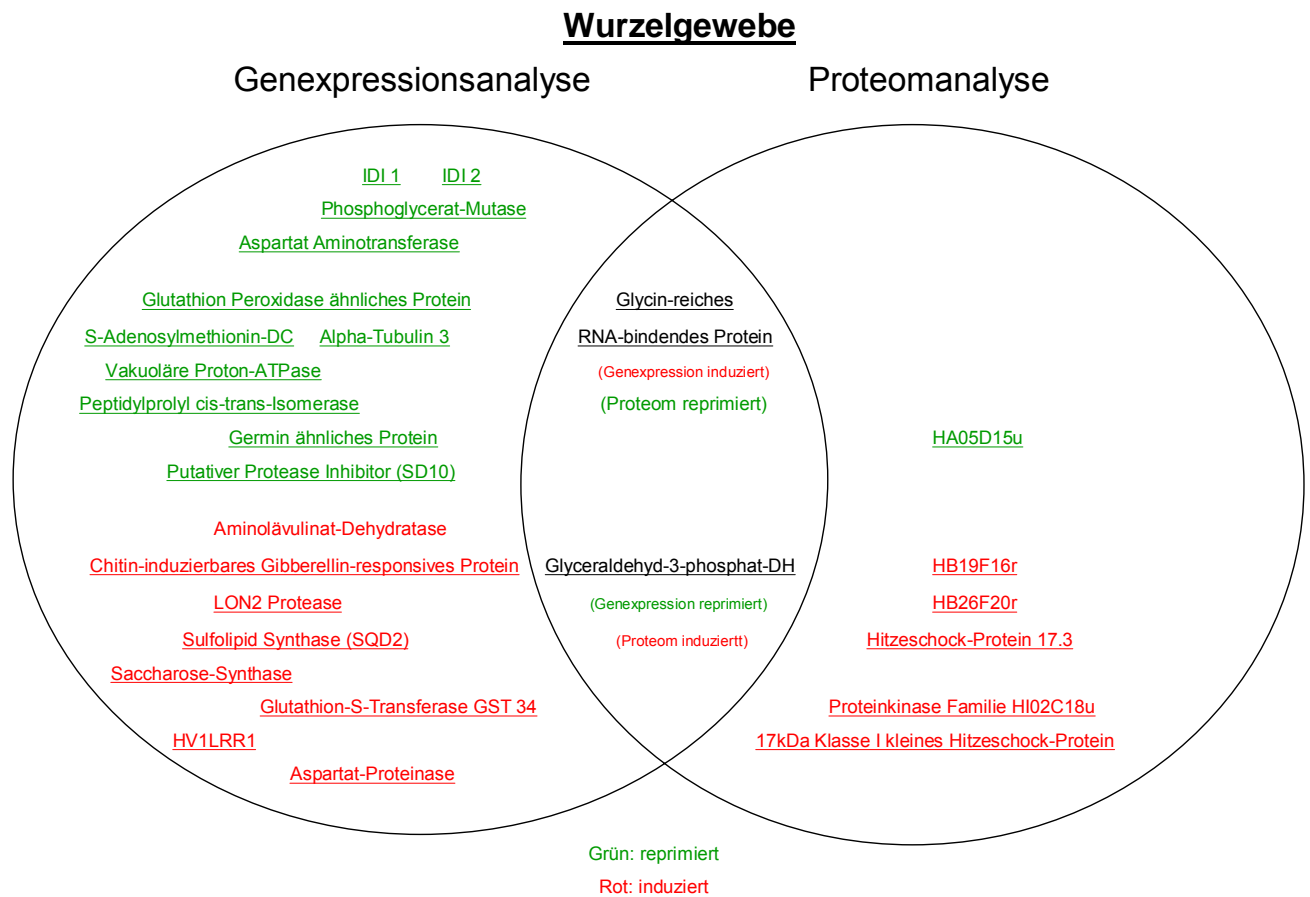


Abbildung 50: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Genexpressionsanalyse und Proteomanalyse im Wurzelgewebe von Gerste bei Platinexposition.

#### 4.1.4. Vergleichender Überblick der Genexpressionsanalysen

Durch qRT-PCR konnten die Ergebnisse der Makroarray-Analysen verifiziert werden. Anhand ausgewählter Gene wurde die Übereinstimmung der Arrayergebnisse mit den qRT-PCR-Ergebnissen demonstriert, wobei die Reproduzierbarkeit durch wiederholte Versuche mit unabhängigen Templates ebenso wie die Normalisierung der Daten über die Amplifikation des 18S ribosomalen Proteins in allen cDNAs nachgewiesen bzw. durchgeführt wurde. Die sehr gute Übereinstimmung der RT-PCR-Ergebnisse mit denen der Arrayanalysen erlaubt die Bewertung der Beobachtungen (vgl. Tabelle 41 und Abbildungen im Anhang).

Quecksilber hat von allen drei untersuchten Schwermetallexpositionen den geringsten Effekt auf die Stoffwechselwege in Gerste. Stressinduzierte Gene wie das Lipidtransferprotein 7a2b werden ebenso induziert wie Gene, die für Komponenten der Photosynthesesysteme codieren. Gene für Proteine aus dem Energiemetabolismus sind hingegen reprimiert. Bei Cadmiumexposition sind die Effekte ähnlich gelagert. Im Vergleich zu den anderen beiden Schwermetallexpositionen scheint Platin einen entgegengesetzten Einfluß auf die Photosynthese und den Energiestoffwechsel zu haben. War bei Cadmium und Quecksilber die Tendenz erkennbar, dass Gene für Komponenten der Photosynthese hochreguliert und Gene für Komponenten des Energiestoffwechsels herunterreguliert werden, ist dies bei Platin eher umgekehrt.

Beim Vergleich der Ergebnisse fällt auf, dass durch die unterscheidlichen Schwermetallexpositionen viele Gene in ihrer Expression beeinflusst werden. Die identifizierten Gene erlauben einen Überblick über wichtige an der Stress-Antwort beteiligte Stoffwechselwege und ihre Proteine. Unter diesen Proteinen sind solche zu finden, deren Transkriptions- bzw. Translationsprodukte

- reich an SH-Gruppen sind, die stark mit Schwermetallionen interagieren und häufig dabei ihre Funktionalität verlieren (zum Beispiel Carboanhydrase) oder am Metabolismus schwefelhaltiger Aminosäuren und Proteine beteiligt sind (Cysteinprotease, S-Adenosylmethionin-Decarboxylase),

- an klassischen Entgiftungssystemen (zum Beispiel Glutathion-S-Transferase, Thionine, Thioredoxin) oder an grundlegenden Prozessen des Energiemetabolismus und der Photosynthese (LHC I, Stärke-Synthetase, Aminolävulinat-Dehydratase, Chlorophyllsynthase, Chlorophyll a/b bindendes Protein) beteiligt sind,
- eine Induktion durch abiotische Stressoren wie Schwermetallionen erfahren (Lipid-Transferprotein 7a2b, Krankheitsresistenz ähnliches Protein, Actin 1),
- die Homöostase des Wasserhaushalts regulieren (Aquaporine) bzw. bei dessen Störungen involviert sind (Trockenstress- induziertes RNase-S ähnliches Protein),
- an der spezifischen Metallionen-Aufnahme beteiligt sind (IDI2, Deoxymugensäure Synthase),
- für die Metallexposition spezifische Angriffsstellen regulieren (Alpha-Tubulin 3),
- an Abwehrreaktionen gegen Pathogene beteiligt sind (Chitin-induzierbares Gibberellin-responsives Protein, Allenoxidcyclase),
- oder das reduktive Potential erhalten (Cytosolische Monodehydroascorbat Reductase, Glutathion Peroxidase).

Einige der als differentiell exprimiert indentifizierten Gene konnten bei unterschiedlichen Schwermetallexpositionen nachgewiesen werden. Bei anderen gelang der Nachweis nur bei einer bestimmten Schwermetallexposition. In den nachfolgenden Venn-Diagrammen (Abbildungen 51 und 52) sind die Gene zur besseren Übersicht für alle untersuchten Schwermetallexpositionen nochmals gemeinsam dargestellt.

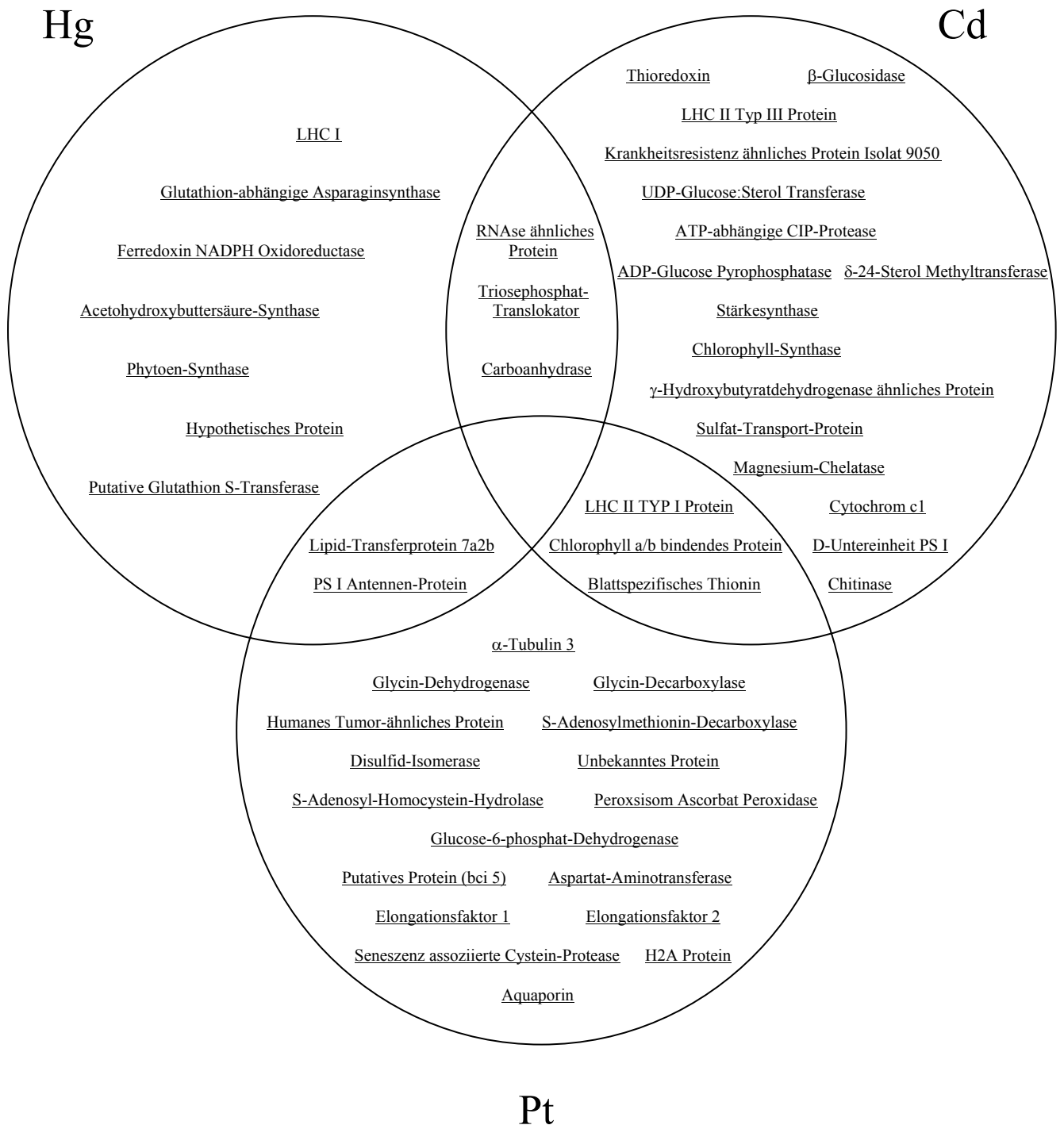
**Blattgewebe**

Abbildung 51: Venn-Diagramm: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse im Blattgewebe bei verschiedenen Schwermetallexpositionen.

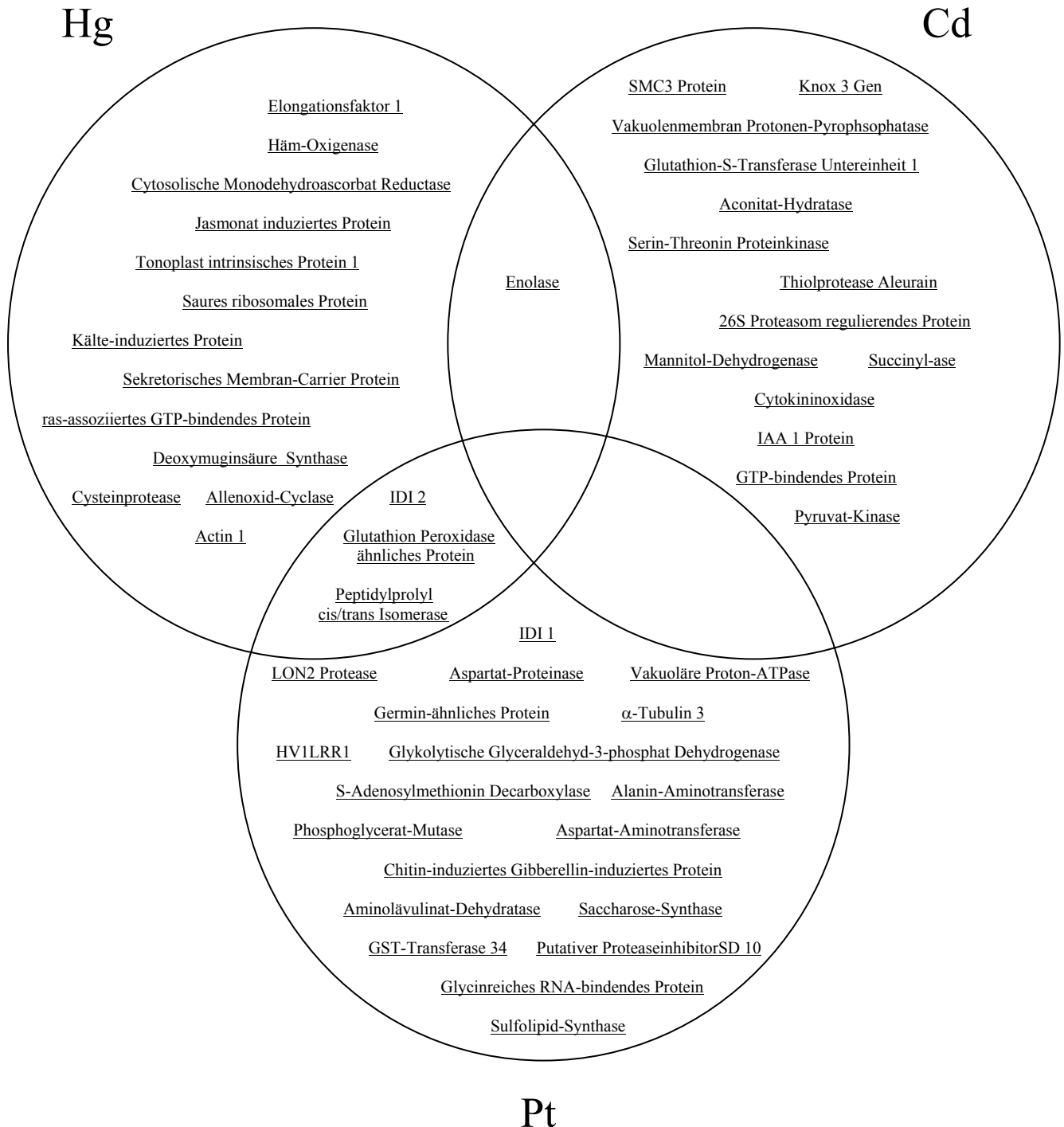
**Wurzelgewebe**

Abbildung 52: Venn-Diagramm: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse im Wurzelgewebe bei verschiedenen Schwermetallexpositionen.

#### 4.1.5. Phytoreduktion

Durch die Versuche zur Phytoreduktion von  $\text{Hg}^{2+}$  zu  $\text{Hg}^0$  konnte nachgewiesen werden, dass Pflanzen in der Lage sind,  $\text{Hg}^{2+}$  aus dem Boden bzw. aus dem Kulturmedium aufzunehmen und zu  $\text{Hg}^0$  zu reduzieren.  $\text{Hg}^0$  besitzt, wie bereits in der Einleitung beschrieben, besondere physiko-chemischen Eigenschaften. Es ist das einzige Metall, das bei Raumtemperatur flüssig ist und zudem einen hohen Dampfdruck ausbildet. Daher kann es schon bei normalen Umweltbedingungen gasförmig auftreten. Diese Eigenschaften sind von besonderer Bedeutung für den im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen und im Folgenden dargestellten Detoxifizierungsmechanismus für Quecksilber in Pflanzen.

Quecksilber liegt in der Atmosphäre zu mehr als 98% in gasförmigem Aggregatzustand mit einer Persistenz von etwa einem Jahr vor und wird als die treibende Kraft des globalen Quecksilberkreislaufs betrachtet (Mason et al., 1994; Lamborg et al., 2002; UNEP, 2002). Pflanzen wurden in letzter Zeit mehr und mehr in Zusammenhang mit diesem Quecksilberzyklus diskutiert, jedoch meist als Transfersystem oder als Speicher für Quecksilber bei der Phytoremediation. Die Volatilisierung von Quecksilber durch Pflanzen wurde bisher als Abdampfung von Quecksilber, das zuvor aus der Luft auf Blättern deponiert wurde, oder als Produkt des Kotransports von Quecksilber mit dem Transpirationsstrom gesehen (Kozuchowsky et al., 1978 und Lindberg et al., 2002) und könnte bis zu 70% der Gesamtemission an Quecksilber über Pflanzenbeständen ausmachen (Lin et al., 2004). Die von Lindberg et al. (2002) beobachtete Korrelation des Transpirationsstroms und der  $\text{Hg}^0$ -Emission wirft die Frage auf, ob es sich bei den aus dem Boden bzw. Wasser aufgenommenen Quecksilberspezies um elementares Quecksilber  $\text{Hg}^0$  oder um ionisches Quecksilber (zum Beispiel  $\text{Hg}^{2+}$ ) handelt. Es wurde davon ausgegangen, dass Quecksilberionen erst durch mikrobielle Tätigkeit zu elementarem Quecksilber reduziert wird, und anschließend durch die Wurzeln aufgenommen und mit dem Transpirationsstrom in die Blätter transportiert wird, von wo aus es durch die Stomata in die Umwelt verdunstet (O'Halloran, 1993; Sahlmann et al., 1984; Summers et al., 1989).

In den Experimenten zur Phytoreduktion von Quecksilber im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Pflanzen in der Lage sind,  $\text{Hg}^{2+}$  zu elementarem Quecksilber ( $\text{Hg}^0$ ) zu reduzieren. Im axenischen Kultur- und Mess-System konnte die signifikante Ausgasung von  $\text{Hg}^0$  aus Gerstenpflanzen beobachtet werden. Da das verwendete Kulturmedium keine

reduktive Aktivität zeigte und die Anwesenheit von Mikroorganismen ausgeschlossen werden konnte, mussten die Gerstenpflanzen für die Umsetzung der ins Medium zugesetzten  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Hg}^0$  verantwortlich sein. Ein ähnlicher Befund wurde in eingeschränktem Umfang für Algen bereits beschrieben (Ben-Bassat et al., 1977 und 1978), allerdings ohne dabei den zugrundeliegenden Mechanismus zu identifizieren. Auch Wilkinson et al. (1990) beschrieben eine Quecksilbervolatilisierung durch Algen, der Reaktionsmechanismus blieb aber auch hier unklar.

Mit den vorliegenden Experimenten konnte eindeutig der Mechanismus der Phyto-reduktion von Quecksilber geklärt werden. Gerstenblatthomogenate zeigen eine starke reduktive Aktivität gegenüber Quecksilber, die durch die Ausgasung von  $\text{Hg}^0$  aus mit Quecksilberionen ( $\text{Hg}^{2+}$ ) kontaminiertem PBS-Puffer nachgewiesen werden konnte. Diese Ausgasung konnte mit sehr geringer Varianz reproduziert werden und zeichnete sich durch eine extrem hohe Reaktionskinetik aus. Die reduktive Aktivität der Gerstenblatthomogenate kann auch beobachtet werden, wenn die Gerstenblätter zuvor autoklaviert werden. Die Aktivität erscheint sogar erheblich gesteigert, was an einem Aufbrechen der Zellstrukturen durch das Autoklavieren und einer damit einhergehenden verbesserten Verfügbarkeit der reduktiven Substanz erklärbar ist. Ein enzymatisches Reduktionssystem kann mit dieser thermischen Behandlung ausgeschlossen werden, da die für die starke Reduktion verantwortliche Substanz thermostabil sein muss. In weiteren Versuchen wurde beobachtet, dass die Reduktivität der Blatthomogenate vom pH-Wert abhängig ist. In zunehmend alkalischem Milieu läuft die Reaktion zunehmend schneller und effizienter ab, bei zunehmend saurem Milieu verschlechtert sich die reduktive Potenz bis zum vollständigen Verlust etwa bei pH 5,0.

Vor diesem Hintergrund wurde versucht, die Substanz zu identifizieren, die die beobachtete Reduktion von Quecksilberionen bewirkt. Der Zusatz von reduziertem Glutathion (GSH) bewirkt keine messbare Reduktion und Ausgasung von Quecksilber. Dies ist auch erklärlich, da das Quecksilber, wie bereits dargestellt, mit GSH stabile Mercaptid-Bindungen eingeht und entsprechend nicht als elementares Quecksilber volatilisiert werden kann. Eine weitere Substanz, die als omnipräsentes reduktives Agens in Pflanzen vorkommt, ist NADPH/ $\text{H}^+$ . Eine Überprüfung dieser Substanz ergab eine schwache, langsame Reduktion von Quecksilber, die jedoch die beobachtete schnelle Reaktionskinetik der mit den Blattgewebshomogenaten assoziierten Reduktion nicht erklären kann. Als nächste Substanz wurde Ascorbinsäure als bekanntes und ubiquitär verbreitetes Reduktionsmittel untersucht.

Mit dieser Reinsubstanz kann eine Quecksilberreduktion und Volatilisierung von  $\text{Hg}^0$  ausgelöst werden, die den Beobachtungen bei den Versuchen mit Blatthomogenaten entspricht. Es konnte gezeigt werden, dass die Quecksilberreduktion durch Ascorbinsäure eine identische Reaktionskinetik zeigt, insbesondere auch in Bezug auf die pH-Abhängigkeit. Da Ascorbinsäure zudem thermostabil bis  $+190^\circ\text{C}$  ist (Weast et al., 1966), kann diese Substanz als Reaktionspartner bei der Phytoreduktion von Quecksilber identifiziert werden. Dies wird auch durch Beobachtungen von Ben-Bassat et al. (1977) gestützt, die für die Phytoreduktion von Quecksilber durch Algen bereits eine nicht-enzymatische, wasserlösliche, hitzestabile und zuckerartige Substanz als Reduktionsmittel diskutierten. Der in 4.1.1. vorgestellte Befund, dass eine Quecksilberexposition im Wurzelgewebe die cytosolische Monodehydroascorbat Reductase induziert und gleichzeitig auch die Glutathion Peroxidase, welche die für die Monodehydroascorbinsäure-Reduktion notwendigen Protonen liefert, bestätigt zusätzlich diesen Mechanismus. Darüber hinaus kann dieser Mechanismus bei Betrachtung der Redoxpotentiale der beteiligten Substanzen weiter belegt werden. In nachfolgender Abbildung 53 sind (vereinfacht) die Redoxvorgänge und die beteiligten Redoxpotentiale dargestellt.

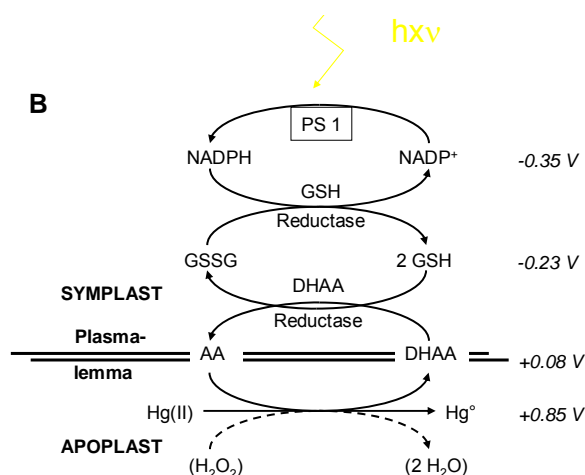


Abbildung 53: Vereinfachte Darstellung des Redoxsystems Ascorbinsäure/Quecksilber in Pflanzen.



Pflanzen verfügen somit durch Ascorbinsäure über ein potentes System, um Quecksilberionen zu detoxifizieren. Dieses System erlaubt es, bereits extrazellulär im Apoplasten einen großen Teil der toxischen Ionen zu reduzieren und sie zudem durch Ausgasung wieder in die Umwelt abzugeben. Dies ist für Pflanzen der ideale Reaktionsmechanismus, da sie zum einen Ascorbinsäure in großem Umfang als Reduktionsmittel für verschiedene andere reduktive Prozesse permanent synthetisieren und verfügbar halten, zum anderen können sie das elementare Quecksilber durch Stomata sogar ausscheiden. Damit ist das Quecksilber aus dem Organismus dauerhaft entfernt und nicht nur, wie zum Beispiel bei der Bindung an GSH und der Speicherung in der Vakuole, in ein Molekül zur mehr oder weniger sicheren Verwahrung eingebaut, wobei es sich aber immer noch im Organismus befindet und unter Umständen remobilisiert werden könnte. Die Detoxifizierung kann zum Teil bereits extrazellulär erfolgen, was besondere Vorteile für die Pflanzenzelle mit sich bringt, da sie mit diesen Quecksilberionen gar nicht erst in Kontakt kommt. Hierzu wird das in Abbildung 54 gezeigte Modell vorgeschlagen.

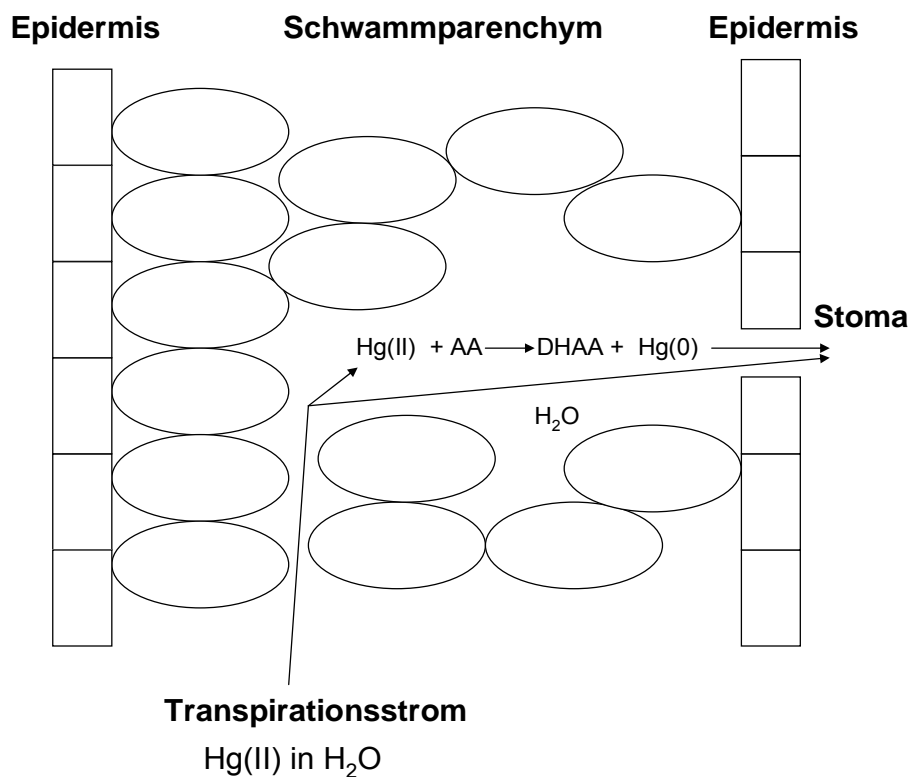


Abbildung 54: Modell der Phyto-Reduktion von  $\text{Hg}^{2+}$  zu  $\text{Hg}^0$  im Blatt.

Dies mag auch der Grund sein, warum die Quecksilberexposition der Gerstenpflanzen zwar einige nachgewiesene genetische und metabolische Effekte auslöst, diese jedoch im Vergleich nicht so umfangreich und stark ausfallen wie bei den anderen Schwermetallexpositionen mit Cadmium und Platin. Insbesondere auf Proteomebene konnten im Gegensatz zu Platin keine gesicherten Effekte nachgewiesen werden.

Bei Pflanzen ist die Existenz von mer-Genen zur Quecksilberdetoxifizierung im Gegensatz zu Bakterien, die ein mer-Operon besitzen, nicht bekannt. Es kann vor dem Hintergrund der diskutierten Beobachtungen spekuliert werden, ob es im Laufe der Evolution bei Pflanzen keine Notwendigkeit für die Etablierung solcher mer-Gene gab, da der vorgestellte Ascorbinsäure-Mechanismus viel einfacher mit sowieso vorhandenen Verbindungen die Detoxifizierung von anorganischem Quecksilber übernimmt und die Aufnahme von organischen Quecksilberverbindungen (zum Beispiel Methylquecksilber) für Pflanzen keine Rolle spielt.

#### 4.2. Analysen der Schwermetall-induzierten Stoffwechselwege in der Gerstensorte Scarlett

Die aus den SSH-Versuchen erhaltenen Klone wurden wie beschrieben für Mikroarray-Analysen eingesetzt, um mit dieser Methode die Genexpression bei Schwermetallexpositionen in der Gerstensorte Scarlett zu untersuchen.

Für eine Quecksilberexposition konnten bei der Gerstensorte Scarlett sowohl im Blatt- als auch im Wurzelgewebe keine Gene als differentiell exprimiert bestimmt werden, die auch in der Sorte Barke durch Quecksilber beeinflusst werden. Bei Überprüfung der anderen Gene auf dem Mikroarray konnten jedoch zahlreiche Quecksilber-induzierte Effekte beobachtet werden. So ist im Blattgewebe das Gen für die Aminolävulinat-Dehydratase und ein Protein aus dem LHC durch Quecksilber reprimiert. Dies könnte auf eine bereits oben diskutierte Störung der Photosynthese hinweisen. Im Wurzelgewebe wurde beobachtet, dass das Gen für das Germin-ähnliche Protein durch Quecksilberexposition wieder deutlich reprimiert wird, ebenso wie die Gene für die S-Adenosylmethionin Decarboxylase und die Seneszenz-assoziierte Cysteinprotease. Die S-Adenosylmethionin Decarboxylase wird bei der Gerstensorte Barke im Wurzelgewebe durch Platinexposition ebenfalls reprimiert. Dies

scheint also eine typische Reaktion von Gerste auf Schwermetallstress zu sein. Daneben ist das Gen für das Alpha-Tubulin 3 durch Quecksilber induziert, was auf eine Störung des Spindelfaserapparats durch Quecksilber hinweist.

Insgesamt sind die Effekte der Quecksilberexposition in der Gerstesorte Scarlett nicht sehr klar und umfangreich. Das kann zum einen daran liegen, dass diese Sorte anscheinend auf verschiedene Stressoren weniger stark reagiert als die Sorte Barke, die auch in anderen Experimenten zum Beispiel mit UV-Expositionen üblicherweise sehr stark auf Stress reagiert und deutliche Effekte in der Genexpression zeigt (persönliche Mitteilung Schäfer und Götz, GSF). Es kann jedoch auch vermutet werden, dass bei der im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Langzeitexposition der Gerste mit moderaten Quecksilberkonzentrationen der bereits beschriebene Effekt der Phytoreduktion für eine wirksame Detoxifikation des Quecksilbers sorgt und deswegen die molekularen Effekte auf Transkriptebene nicht sehr deutlich ausfallen.

Anders sieht es bei den Experimenten mit Cadmium aus. Hier konnten im Vergleich zu Quecksilber deutlich mehr Gene als differentiell exprimiert bestätigt werden. Darunter finden sich auch einige, die bereits in der Gerstensorte Barke durch eine Cadmiumexposition beeinflusst werden. Sowohl das Gen für die  $\delta$ -24-Sterol Methyltransferase, für die Carboanhydrase und für die D-Untereinheit des Photosystems I wird in der Sorte Scarlett durch Cadmium reprimiert, wie es auch in der Sorte Barke beobachtet werden kann. Genauso wird das Gen für ein blattspezifisches Thionin sowohl in der Sorte Barke als auch in der Sorte Scarlett als Cadmium-induziert bestätigt. Bei diesen Effekten in den Stoffwechselwegen scheint es sich um sehr grundlegende Antworten auf eine Cadmiumexposition zu handeln. Im Gegensatz hierzu wird in der Sorte Scarlett das Gen für das Chlorophyll a/b bindende Protein, für ein Typ III Protein aus dem LHC II und für ein Krankheitsresistenz-ähnliches Protein reprimiert, in der Sorte Barke wird durch Cadmium eine Induktion dieser Gene ausgelöst. Diese unterschiedliche Antwort der beiden Gerstensorten kann durch das bereits angesprochene unterschiedliche Reaktionsverhalten der beiden Sorten begründet sein.

Im Wurzelgewebe konnten die Gene für das Thiolprotease Aleurain und die Glutathion-S-Transferase I in der Sorte Scarlett wie in der Sorte Barke als durch Cadmium reprimiert bestätigt werden. Das Gen für die Succinyl-CoA Ligase wird in der Sorte Barke durch

Cadmium reprimiert, in Scarlett jedoch induziert. Auch im Wurzelgewebe lassen sich also Effekte finden, die von Cadmium in Gerste typischerweise ausgelöst werden, andere Gene reagieren jedoch sortenabhängig.

Bei der Analyse der anderen Gene auf dem Mikroarray konnten viele weitere Cadmium-induzierte Effekte in der Sorte Scarlett beobachtet werden. Die Gene für die Glycin-Decarboxylase und ein Photosystem I Antennenprotein werden in Scarlett-Blattgewebe durch Cadmium reprimiert, die Gene für die S-Adenosylmethionin Decarboxylase und das Humane Tumor ähnliche Protein induziert. In Barke können die gleichen Effekte im Blattgewebe durch Platin ausgelöst werden, was auch hier eine vergleichbare Reaktion der beiden Sorten auf die Schwermetallexposition belegt. Andere Gene werden jedoch auch sorten- bzw. gewebespezifisch reguliert, wie zum Beispiel das für ein Glycin-reiches RNA bindendes Protein, das im Blattgewebe von Scarlett durch Cadmium reprimiert, in Barke in der Wurzel durch Platin induziert wird.

Im Wurzelgewebe zeigt die Sorte Scarlett viele Reaktionen auf die Cadmiumexposition, die mit der Reaktion der Sorte Barke auf Schwermetallstress übereinstimmen. So sind bei der Cadmiumexposition die Gene für die Eisenmangel-induzierten Gene IDI 1 und IDI2, für das Germin-ähnliche Protein, für die Phosphoglycerat-Mutase, für den putativen Proteaseinhibitor und für die S-Adenosyl-L-Homocystein Hydrolase deutlich reprimiert, was so auch von Platin in der Sorte Barke verursacht wird. Neben weiteren Übereinstimmungen konnten auch bei diesem Experiment wieder Effekte beobachtet werden, die anscheinend sorten-, schwermetall- oder gewebespezifisch sind. Hierzu zählt die Beobachtung der Induktion der Gene für die Glycin-Decarboxylase und die Glycin-Dehydrogenase durch Cadmiumexposition in Wurzelgewebe der Sorte Scarlett. In der Sorte Barke kann bei einer Platinexposition die Reprimierung dieser beiden Gene im Blattgewebe nachgewiesen werden. Jedoch zeigt die Beeinflussung solcher Gene, dass sie in Zusammenhang mit der Abwehrantwort auf Schwermetallexposition stehen und entsprechend reguliert werden.

Auch für Platin konnten viele Gene in der Sorte Scarlett identifiziert werden, die auf diese Schwermetallexposition reagieren. Im Blattgewebe von Scarlett werden die Gene für ein blattspezifisches Thionin, für die S-Adenosylmethionin-Decarboxylase, für die Disulfidisomerase und für das Humane Tumor-ähnliche Protein induziert. Der identische

Effekt konnte auch im Blattgewebe von Barke bei Platinexposition beobachtet werden. Zudem wird der Elongationsfaktor 1 alpha durch Platin in Blattgewebe von Scarlett wie in Barke ebenfalls reprimiert. Lediglich das Alpha-Tubulin wird im Blattgewebe von Scarlett durch Platin reprimiert, in Barke zeigte sich eine Induktion. Dies scheint ein sortenspezifischer Effekt zu sein, jedoch kann auch aus diesem Ergebnis abgeleitet werden, dass Platin in Gerste mit den Tubulinen interagiert und entsprechende Effekte auslöst.

Im Wurzelgewebe von Scarlett konnten die Gene für das Germin-ähnliche Protein, für die beiden Eisenmangel-induzierten Proteine IDI 1 und IDI 2, für die Phosphoglycerat-Mutase und für die Peptidylprolyl cis-trans Isomerase als Platin-reprimiert, das Gen für die S-Adenosylmethionin-Decarboxylase als Platin-induziert bestätigt werden. Auch in der Sorte Barke sind diese Gene durch Platin im Wurzelgewebe reprimiert bzw. induziert. Dieser für beide Sorten identische Befund zeigt, dass diese Reaktion anscheinend eine typische Antwort der Gerste auf Platinexposition darstellt.

Bei der Untersuchung der anderen Gene auf dem Mikroarray konnten zudem weitere Beeinflussungen der Genregulation durch die Platinexposition in der Sorte Scarlett bestätigt werden, die im Folgenden näher diskutiert werden. Im Blattgewebe kann neben den bereits dargestellten Ergebnissen noch die Induktion des Gens für die Glykolytische Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase beobachtet werden, die im Wurzelgewebe von Barke durch Platin allerdings reprimiert wird. Dies kann eine sorten- aber wahrscheinlich auch eine gewebespezifische Reaktion sein, da das Gen, wie oben dargestellt, auch im Blattgewebe von Scarlett durch Cadmium induziert wird.

Weitere umfangreiche Effekte konnten im Wurzelgewebe beobachtet werden. Die Gene für den Elongationsfaktor 1 alpha, für die S-Adenosyl-L-Homocystein Hydrolase, für ein saures ribosomales Protein und für das Thiolprotease-Aleurain werden reprimiert. Diese Gene wurden durch andere Schwermetallexpositionen bzw. im Blattgewebe der Sorte Barke ebenfalls reprimiert. Auch induzierte Gene konnten im Wurzelgewebe von Scarlett bestätigt werden, die in Barke bei anderen Schwermetallexpositionen induziert werden. Dies sind zum Beispiel Gene für die Ferredoxin-NADPH Oxidoreductase, für ein Krankheitsresistenz-ähnliches Protein, für die Seneszenz-assoziierte Cysteinprotease und für die UDP-Glucose:Sterol Glucosyltransferase. Auch diese Gene scheinen in eine typische Stressantwort von Gerste auf verschiedene Schwermetallexpositionen involviert zu sein.

Andererseits konnten zum Beispiel die Gene für die Glycin-Decarboxylase und die Glycin-Dehydrogenase als Platin-induziert im Wurzelgewebe von Scarlett beobachtet werden. Der gleiche Effekt tritt wie bereits beschrieben auch durch Cadmiumexposition im Wurzelgewebe von Scarlett auf, im Blattgewebe von Barke wurden durch Platin diese Gene jedoch reprimiert. Der Einfluß der Schwermetalle scheint im Blattgewebe die Induktion dieser Gene zu bewirken, im Wurzelgewebe scheint eine Repression ausgelöst zu werden. Daher kann eine gewebsspezifische Regulation dieser Gene vermutet werden. Andere Gene wie die für die Succinyl-CoA Ligase oder für das putative Protein (bci5) zeigen in Scarlett eine Regulation, die der Regulation in Barke entgegengesetzt ist. Hier können wieder gewebes-, sorten- bzw. schwermetallspezifische Reaktionen als Ursache vermutet werden.

Im Wurzelgewebe der Sorte Scarlett konnte zudem durch Platinexposition die Induktion einer Gruppe von Genen beobachtet werden, die für Proteine aus den Photosynthese-Systemen codieren. Dies kann damit begründet sein, dass einige Proteine aus diesem Bereich im Wurzelgewebe andere Funktionen, zum Beispiel den Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies, wahrnehmen.

#### 4.3. Genexpressionsanalyse in der Gerstensorte Barke bei Wachstum auf erdigen Substraten mit Schwermetallkontamination

Die Kultur der Gerste auf den Bodenproben aus Marktredwitz ergab keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Zu Beginn des Wachstums zeigten die Pflanzen auf der kontaminierten Bodenprobe zunächst ein etwas geringeres Wachstum als die Pflanzen auf dem Kontrollboden. Dies verlor sich jedoch im Laufe des Versuchszeitraums, so dass ab etwa 20 Tagen keine Unterschiede in der Blattentwicklung mehr zu beobachten waren. Die Wurzelentwicklung war in der kontaminierten Bodenprobe deutlich schlechter als in der Kontroll-Bodenprobe. Dies deckt sich mit den Beobachtungen bei den In-vitro-Versuchen, bei denen die Gerste bei Quecksilberexposition ebenfalls eine massiv gestörte Wurzelentwicklung aufwies (s.o.). Allerdings musste festgestellt werden, dass der vom Projektpartner eigentlich als Modell für einen anthropogen mit Quecksilber belasteten Boden ausgewählte Boden aus Marktredwitz nicht nur eine erhebliche Quecksilberkontamination aufwies, sondern auch mit vielen anderen toxischen Metallen in erheblichen Mengen kontaminiert war. Dies ließ von vorneherein ein aussagekräftiges Versuchsergebnis fraglich

erscheinen, da, im Gegensatz zur eigentlichen Planung des Versuchs, nur ein nicht monokausaler Stress beobachtet werden konnte. Zudem wies die eigentlich als Kontrolle vorgesehene Bodenprobe auch erhebliche Quecksilberkonzentrationen auf. Die Analyse der Schwermetallgehalte im Blattgewebe der Gerste ergab, dass die auf dem Kontrollboden gewachsene Gerste bis auf die Gehalte an Arsen deutlich mehr Schwermetalle aufwies als die Gerste von der kontaminierten Bodenprobe. Dies kann daran liegen, dass durch die extreme Belastung der kontaminierten Bodenprobe das Wurzelsystem der Gerste möglicherweise so stark geschädigt wurde, dass sie nur noch wenige Ionen aufnehmen konnte. Zudem kann es sein, dass die Pflanzen aus dem eigentlich als Kontrollexperiment geplanten Kulturversuch durch die relativ hohe Quecksilberkonzentration in der dafür zu Verfügung stehenden Bodenprobe ebenfalls quecksilber-assoziierte Schäden aufweisen. Dies könnte zum Beispiel erklären, warum die Kontrollgerstenpflanzen ab etwa der Hälfte des Versuchs keinen Entwicklungsvorsprung mehr im Vergleich zu den schwermetallexponierten Pflanzen zeigen. Trotz dieser ungünstigen Voraussetzungen wurden die molekularbiologischen Versuche fortgeführt. Allerdings konnten, wie bereits vermutet, keine aussagekräftigen Ergebnisse ermittelt werden. Dies zeigt die Probleme, die schon bei der teilweisen Übertragung von Laborexperimenten in die Umwelt auftreten können. Aufgrund der diskutierten Probleme mit den Bodenproben aus Marktredwitz wurde ein Parallelexperiment mit definiert quecksilberkontaminiertem Kultursubstrat geplant. Die Gerstenpflanzen auf dem kontaminierten Substrat zeigten deutliche Wachstumsdepressionen über den gesamten Versuchszeitraum hinweg, wobei der Unterschied zwischen der exponierten Variante und der Kontrolle gegen Ende der Beobachtungsperiode eher größer wurde. Die Wachstumsdepression bei Quecksilberexposition konnte bereits im Laborversuch in Hydrokultur beobachtet werden und wird mit den Beobachtungen des Substratexperiments bestätigt. Auch die Quecksilberaufnahme ins Blattgewebe war bei der exponierten Variante deutlich höher als bei den Kontrollpflanzen und stieg im Verlauf des Beobachtungszeitraums stark an, was möglicherweise an der verstärkten Quecksilberaufnahme über das größer werdende Wurzelsystem und einer Akkumulation von Molekülen (zum Beispiel Proteinen) mit Quecksilberanbindung liegt.

Über den Kulturgefäßen mit den Gerstenpflanzen auf quecksilberkontaminiertem Kultursubstrat konnte zudem eine massive  $\text{Hg}^0$ -Ausgasung gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigt die bereits diskutierte Detoxifizierung des Quecksilbers durch Phytoreduktion.

Zudem konnten durch die molekularbiologischen Versuche eine Reihe von Genen bestätigt werden, die durch Quecksilber auch bei Kultur auf bodenähnlichem Kultursubstrat reguliert werden. Um auch erweiterte Aussagen über den Einfluss der Quecksilberexposition auf das Genexpressionsprofil in Gerste zu erhalten, wurde der Versuch zudem für drei Zeitpunkte wiederholt.

Nach neun Tagen konnte nachgewiesen werden, dass durch Quecksilber im Blattgewebe der Sorte Barke Gene beeinflusst werden, die in dieser Art und Weise auch bei Schwermetallexpositionen in Laborversuchen reguliert werden. Das Gen für das klassische Entgiftungsprotein Thionin wird im Substratversuch ebenso induziert wie die Gene für die D-Untereinheit des Photosystem I, für die S-Adenosylmethionin Decarboxylase und für ein LHC II Typ I Protein. Diese Versuchsergebnisse bestätigen die vorausgegangenen Beobachtungen, dass diese Proteine in die Detoxifizierung von Quecksilber bzw. in die Abwehrantwort auf die Schwermetallexposition involviert sind.

Nach 20 Tagen zeigen deutlich mehr Gene eine Regulation, was an der höheren Quecksilberaufnahme, der längeren Expositionszeit und an der späteren Entwicklungsphase liegen kann. Besonders wichtig erscheint die Induktion der Gene, die für Proteine der Photosynthesysteme codieren. Wie schon beim Erntezeitpunkt nach neun Tagen bzw. in den Versuchen *in vitro* zeigen die Gene für das Chlorophyll a/b bindende Protein, für ein LCH II Typ I und ein LHC II Typ III Protein deutliche Induktion. Aber auch andere Gene, die in den vorangegangenen Versuchen mit beiden Gerstensorten als schwermetall-reguliert bestätigt werden konnten, zeigen hier eine Beeinflussung. So sind die Gene für die Glycin-Decarboxylase, für ein Kälte-induziertes Protein, für die  $\beta$ -Glucosidase oder für die UDP-Glucose:Sterol Glucosyltransferase wieder induziert. Die Gene für das Germin-ähnliche Protein, für den Elongationsfaktor 1 alpha oder für ein saures ribosomales Protein sind wie in anderen Versuchen reprimiert, wobei das Gen für das saure ribosomale Protein bereits zum Versuchszeitpunkt neun Tage nach Aussaat als reprimiert bestätigt werden konnte. Interessant ist, dass das Gen für ein blattspezifisches Thionin zum Beobachtungszeitpunkt 20 Tage nach Aussaat negativ reguliert wird (wie auch zum Erntezeitpunkt nach 30 Tagen). Nach neun Tagen konnte es hingegen eindeutig als induziert bestätigt werden. Die Verifizierung durch RT-PCR konnte dieses Ergebnis belegen. Anscheinend wird zu Wachstumsbeginn die



Thioninsynthese hochreguliert, um dann mit fortschreitendem Lebensalter der Pflanzen wieder reduziert zu werden. Dies könnte mit der Akkumulation dieses Proteins und einer dadurch verursachten Produkthemmung der Transkription erklärbar sein. Es könnte aber auch sein, dass zu späteren Zeitpunkten andere Systeme (wie zum Beispiel die Phytoreduktion) die Detoxifizierung übernehmen und es deshalb zu einer Abnahme der Thioninbiosynthese kommt. Die Induktion des Gens für ein Stress- und Abwehr assoziiertes hypothetisches Protein mag als allgemeine Abwehrreaktion der Pflanzen einzustufen sein, ebenso die zu beobachtende Repression der Alanin-Aminotransferase, die auch durch Platin im Wurzelgewebe reprimiert wurde. Die Interaktion von Quecksilberionen mit Aquaporinen ist ein bekanntes Phänomen und wurde schon im Laborversuch beobachtet, bei dem im Blattgewebe durch Quecksilber das dafür codierende Gen induziert wurde. Beim Substratversuch zeigte sich beim Erntezeitpunkt 20 Tage nach Aussaat jedoch die Repression dieses Gens. Scheinbar war zu diesem Zeitpunkt die verstärkte Neusynthese dieses Proteins nicht notwendig bzw. nicht möglich. Zum nächsten Beobachtungszeitpunkt nach 30 Tagen war das Gen für das Aquaporin induziert, was darauf schließen lässt, dass zu diesem Zeitpunkt die Wasserversorgung bzw. die Wasserleitung durch vermehrte Neusynthese des Aquaporins wieder verbessert werden sollte.

Nach 30 Tagen konnte wie bereits dargestellt die Erhöhung der Transkription der Gene für ein Aquaporin und für die  $\beta$ -Glucosidase beobachtet werden. Das Gen für die  $\beta$ -Glucosidase wurde im Laborversuch auch durch Cadmium induziert und scheint für ein wichtiges Enzym bei der Detoxifizierung von Schwermetallen zu codieren. Die negative Regulation des Gens für ein blatspezifisches Thionin konnte zu diesem Zeitpunkt, wie bereits diskutiert, ebenfalls wieder beobachtet werden. Auch zu diesem späten Zeitpunkt zeigte sich eine Induktion von Genen, die für wichtige Proteine aus dem Photosyntheseapparat codieren und deren Induktion schon zu früheren Zeitpunkten und in Laborversuchen bestätigt werden konnte. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um einen Schlüsseffekt bei Quecksilberexposition der Pflanzen handelt. Die mehrfach als schwermetallinduziert beobachteten Gene für die Glycin-Decarboxylase und die Glycin-Dehydrogenase konnten auch hier wieder als induziert bestätigt werden. Demgegenüber konnte die mehrfach beobachtete Repression des Gens für das Glutathion-Peroxidase ähnliche Protein wieder nachgewiesen werden.

## 5. Zusammenfassung

Abiotischer Stress wie eine Schwermetallexposition kann das Wachstum und die Leistungsfähigkeit von Pflanzen erheblich beeinflussen. Da Schwermetalle ubiquitär in Ökosystemen zu finden sind, wurden die Auswirkungen von Schwermetallexpositionen (Versuchsreihen mit Cadmium, Quecksilber und Platin) auf Stoffwechselwege in der landbaulich wichtigen Nutzpflanze *Hordeum vulgare* L. (Kultivare Barke und Scarlett) vergleichend untersucht. Hierzu wurden in-vitro-Versuche mit einem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten neuartigen Hydrokultursystem durchgeführt. Dieses Schwimmschicht-Hydrokultursystem wurde patentiert (Patent Number GB2398562).

In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass Quecksilber und Platin bei Konzentrationen um 40  $\mu\text{M}$  im Kulturmedium massiven negativen Einfluss auf die Entwicklung des Blatt- und Wurzelapparats haben. So ist zum Beispiel das Blattlängen- und das Wurzelwachstum stark vermindert. Cadmium hingegen verursacht in diesem Konzentrationsbereich keine signifikanten Änderungen der Pflanzenmorphologie.

Auf molekularer Ebene zeigte sich, dass die Schwermetallexpositionen einen erheblichen Einfluss auf das Genexpressionsmuster der Pflanzen haben. Die Identifizierung der durch eine Schwermetallexposition differentiell exprimierten Klone erlaubte einen Überblick über wichtige an der Stress-Antwort beteiligte Gene. Unter ihnen sind solche zu finden, deren Transkriptions- bzw. Translationsprodukte

- reich an SH-Gruppen sind, die stark mit Schwermetallionen interagieren und häufig dabei ihre Funktionalität verlieren (zum Beispiel Carboanhydrase) oder am Metabolismus schwefelhaltiger Aminosäuren und Proteine beteiligt sind (Cysteinprotease, S-Adenosylmethionin-Decarboxylase),
- an klassischen Entgiftungssystemen (zum Beispiel Glutathion-S-Transferase, Thionine, Thioredoxin) oder an grundlegenden Prozessen des Energiemetabolismus und der Photosynthese (LHC I und II Proteine, Stärke-Synthetase, Aminolävulinat-Dehydratase, Chlorophyllsynthase, Chlorophyll a/b bindendes Protein) beteiligt sind,
- eine Induktion durch abiotische Stressoren wie Schwermetallionen erfahren (Lipid-Transferprotein 7a2b, Krankheitsresistenz ähnliches Protein, Actin 1),

- die Homöostase des Wasserhaushalts regulieren (Aquaporine) bzw. bei dessen Störungen involviert sind (Trockenstress- induziertes RNase-S ähnliches Protein),
- an der spezifischen Metallionen-Aufnahme beteiligt sind (Eisenmangel-induzierte Proteine IDI 1 und IDI 2),
- für die Metallexposition spezifische Angriffsstellen regulieren (Alpha-Tubulin 3),
- an Abwehrreaktionen gegen Pathogene beteiligt sind (Chitin-induzierbares Gibberellin-responsives Protein, Allenoxidcyclase),
- oder das reduktive Potential erhalten (Cytosolische Monodehydroascorbat Reduktase, Glutathion Peroxidase).

Dabei war auffällig, dass Platin besonders starke Effekte auf molekularer Ebene auslöste, die neben der veränderten Genexpression sogar auf Proteomebene nachweisbar waren, während Quecksilber nur vergleichsweise geringen Einfluss auf das Genexpressionsmuster hatte.

Dies kann daran liegen, dass ein im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls neu beschriebenes Entgiftungssystem für Quecksilber in Pflanzen existiert. Dieses Entgiftungssystem beruht auf der Reduktion von Quecksilberionen durch Ascorbinsäure zum wenig toxischen metallischen Quecksilber ( $\text{Hg}^0$ ), welches zudem aufgrund seiner besonderen physiko-chemischen Eigenschaften gasförmig aus der Pflanze evaporieren kann. Dieser Entgiftungsmechanismus stellt eine ideale Möglichkeit für Pflanzen dar, toxische Quecksilberionen sehr einfach und effektiv bereits im Apoplasten zu detoxifizieren und das Quecksilber aus dem Organismus zu entfernen.

In weiterführenden Versuchen mit Gerstenpflanzen, die auf einem mit Quecksilber kontaminierten erdigen Substrat angezogen wurden, konnten zu verschiedenen Erntezeitpunkten typische Effekte der Quecksilberexposition wie Wachstumsdepression und Veränderungen der Genexpression beobachtet werden, wobei ähnliche Reaktionsmuster wie bei den in-vitro-Versuchen nachgewiesen werden konnten.

## 6. Literaturverzeichnis

Teile der Arbeit wurden vorab publiziert.

**Acreman, J.** (Update Aug. 2001): <http://www.mobot.org/jwcross/duckweed/media.htm>

**AID** (1990): AID 35 Heft 1.

**Alloway, B.J.** (1995): Heavy metals in soil. London: Blackie.

**Amberger, A.** (1996): Pflanzenernährung. Stuttgart: Eugen Ullmer, UTB 846, 305-307.

**Aubry, C., Morere-Le Paven M.C., Chateigner-Boutin, A.L., Teulat-Merah, B., Ricoult, C., Peltier, D., Jalouzot, R., Limami, A.M.** (2003): A gene encoding a germin-like protein, identified by a cDNA-AFLP approach, is specifically expressed during germination of *Phaseolus vulgaris*. *Planta* 217: 466-475.

**Banásová, V., Holub, Z.** (1993): Response of *Coronilla varia* L populations to environmental pollution by mercury and other pollutants. *Biológia* 48: 403-406.

**Battke, F., Schramel, P., Ernst, D.** (2003): A Novel Method for In Vitro Culture of Plants: Cultivation of Barley in a Floating Hydroponic System. *Plant Mol. Biol. Rep.* 21: 405-409.

**Baumann, K., Muth, U.** (1997): Batterien - Daten und Fakten zum Umweltschutz. Berlin: Springer.

**Ben-Bassat, D., Mayer, A.M.** (1977): Reduction of mercury chloride by *Chlorella*: evidence for a reducing factor. *Physiol. Plant.* 40: 157-162.

**Ben-Bassat, D., Mayer, A.M.** (1978): Light-induced Hg volatilization and O<sub>2</sub> evolution in *Chlorella* and the effect of DCMU and methylamine. *Physiol. Plant.* 42: 33-38.

**CEC-DG-III-AG**, Commission of the European Communities Directorate General for Industry (1997): Cadmium in fertilizers, Oxford.

**Chomczynski, P., Sacchi, N.** (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 :156-159.

**Curlik, J., Sefcik, P., Viechova, Z.** (2000): Proceedings of UN/ECE ad hoc international expert group on effect-based critical limits for heavy metals. Bratislava: Soil Science and Conversation Research Institute Report.

**De Filippis, L.F., Hampp, R., Ziegler, H.** (1981): The effects of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on *Euglena*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 101: 37-47.

**De Temmerman, L.** (1986): Biological monitoring and accumulation of airborne mercury in vegetables. *Environ. Pollut. Series 41*: 139-151.

**Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., Siebert, P.D.** (1996) : Suppression subtractive hybridization : a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 6025-6030.

**Diatchenko, L., Lukyanov, S., Lau, Y.F., Siebert, P.D.** (1999): Suppression Subtractive Hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods in Enzymol.* 303: 349-380.

**Elstner, E. F., Oßwald, W., Schneider, I.** (1996): *Phytopathologie*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.

**ERM Environmental Resources Management** (1998): Assessment of the regional problems posed by the use of fertilizers containing cadmium within certain member states of the European Union. Report to DG III. London: Baber Smith.

**Ernst, W.H.O., Peterson, P.J.** (1996): Schwermetalle. In: Stress bei Pflanzen: Ökologie, Physiologie Biochemie, Molekularbiologie (Hrsg.: C. Brunold, A. Rügsegger, R. Brändle). Bern: Verlag Paul Haupt.

**Feinberg, A.P., Vogelstein, B.** (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.

**Gelhaye, E., Rouhier, N., Navrot, N., Jacquot, J.P.** (2005): The plant thioredoxin system. *Cell Mol. Life Sci.* 62: 24-35.

**Godbold, D.** (1991): Mercury-induced root damage in spruce seedlings. *Water, Air and Soil Pollut.* 56: 823-831.

**Grzyb, J., Waloszek, A., Latowski, D., Wieckowski, S.** (2004): Effect of cadmium on ferredoxin: NADP<sup>+</sup> oxidoreductase activity. *J. Inorg. Biochem.* 98: 1338-1346.

**Hassemann, J.** (2001): Aminoallyl Labeling of RNA for Microarrays / Microarray Labeled Probe Hybridization. The Institute for Genomic Research: Standard Operating Procedure M004 / M005.

**Hauschild, R., von Schaewen, A.** (2003): Differential regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzyme activities in potato. *Plant Physiol.* 133: 47-62.

**Heidenreich, B.** (1999): Transkriptionsänderungen von *Arabidopsis thaliana* bei Ozon- UV-B- und HgCl<sub>2</sub>-Behandlung. München: Dissertationsverlag NG.

**Heidenreich, B., Mayer, K., Sandermann, H., Ernst, D.** (2001): Mercury-induced genes in *Arabidopsis thaliana*: identification of induced genes upon long-term mercuric ion exposure. *Plant Cell Env.* 24: 1227-1234.

**Helmers, E., Mergel, N., Barchet, R.** (1994): *Umweltchem. Ökotox.* 6: 130-134.

**Hollenbach, B., Schreiber, L., Hartung, W., Dietz, K.J.** (1997): Cadmium leads to stimulated expression of the lipid transfer protein in barley: implications for the involvement of lipid transfer proteins in wax assembly. *Planta* 203: 9-19.

**Komarova, I., Doman, N.G.** (1981): Carboanhydrase from bean leaves. *Biokhimiia* 46: 1096-1101.

**Kozuchowsky, J., Johnson, D.L.** (1978): Gaseous emissions of mercury from an aquatic plant. *Nature* 274: 468-469.

**Kurek, I., Aviezer, K., Erel, N., Herman, E., Breiman, A.** (1999): The wheat peptidyl prolyl cis-trans-isomerase FKBP77 is heat induced and developmentally regulated. *Plant Physiol.* 119: 693-704.

**Kuribayashi, K., Hikata, M., Hiraoka, O., Miyamoto, C., Furuichi, Y.** (1988): A rapid and efficient purification of poly(A)-mRNA by oligo(dT)<sub>30</sub>-Latex. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 1998: 61-64.

**Lamborg, C.H., Fitzgerald, W.F., O'Donnell, J., Torgersen, T.** (2002): A non-steady compartmental model of global-scale mercury biogeochemistry with interhemispheric atmospheric gradients. *Geochim. Cosmochim. Acta* 66: 1105-1118.

**Legendre, L., Heinstejn, P.F., Low, P.S.** (1992): Evedence for participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured in soybean cells. *Biol. Chem.* 267: 20140-20147.

**Leonard, T.L., Taylor, G.E., Gustin, M.S., Fernandez, G.C.J.** (1998): Mercury and plants in contaminated soil: Uptake, partitioning and emission to the atmosphere. *Toxicol. Chem.* 17: 2063-2071.

**Liebe, F.** (1999): Spurenelemente in Böden und Pflanzen Nordrhein-Westfalens: Gehalte verschiedener chemischer Fraktionen in Böden und deren Beziehung zur Bodenreaktion und den Gehalten in Pflanzen. Bonn: Institut für Bodenkunde, Bonner bodenkundliche Abhandlungen 28.

**Lin, C.J., Lindberg, S.E., Yang, H., Ho, T.C., Chu, H.W.** (2004): Development of a prototype biogenic mercury emission processor in BEIS3 for comprehensive atmospheric mercury modeling. *RMZ-Materials and Geoenvironment* 51: 1649-1652.

**Lindberg, S.E., Dong, W., Meyers, T.** (2002): Transpiration of gaseous elemental mercury through vegetation in a subtropical wetland in Florida. *Atm. Env.* 36: 5207-5219.

**Lustig, S.** (1997): Platinum in the environment. Car-catalyst emitted platinum: transformation behaviour in soil and platinum accumulation in plants. München: Herbert Utz Verlag.

**Mason, R.P., Fitzgerald, W.F., Morel, F.M.** (1994): The biogeochemical cycling of elemental mercury: anthropogenic influences. *Geochim. Cosmochim. Acta* 58: 3191-3198.

**Maucher, H., Stenzel, I., Miersch, O., Stein, N., Prasad, M., Zierold, U., Schweizer, P., Dorer, C., Hause, B., Wasternack, C.** (2004): The allene oxide cyclase of barley (*Hordeum vulgare* L.)- cloning and organ-specific expression. *Phytochem.* 65: 801-811.

**Michal, G.** (Hrsg.) (1999): Biochemical Pathways – Biochemie Atlas. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.

**Müller, Ch.** (1999): Bodenschadstoffe. Lfl Landesanstalt für Landwirtschaft, Agrarökologie: IAB 1b.

**Murashige, T., Skoog, F.** (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 493-497.



**Naqvi, S.M., Park, K.S., Yi, S.Y., Lee, H.W., Bok, S.H., Choi, D.** (1998) : A glycine-rich RNA-binding protein gene is differentially expressed during acute hypersensitive response following Tobacco Mosaic Virus infection in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 37: 571-576.

**Nasser, W., De Tapia, M., Burkhard, G.** (1990): Maize pathogenesis-related proteins: characterization and cellular distribution of 1,3- $\beta$ -glucanases and chitinases induced by brome mosaic virus infection or mercuric chloride treatment. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 36: 1-14.

**Nieboer, E., Richardson, D.H.S.** (1980): The replacement of the nondescript term "heavy metal" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut.* 50: 139-161.

**Nriagu, J.O.** (1988): A silent epidemic of environmental metal poisoning? *Environ. Pollut.* 50: 139-161.

**O'Halloran, T.V.** (1993) : Transition metals in control of gene expression. *Science* 261: 715-725.

**Ohl, S., Hedrick, S.A., Chory, J., Lamb, C.J.** (1990): Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2: 837-848.

**Pajuelo, E., Pajuelo, P., Clemente M.T., Marquez, A.J.** (1995) : Regulation of the expression of ferredoxin-nitrite reductase in synchronous cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* 18: 72-78.

**Panda, K.K., Lenka, M., Panda, B.B.** (1992): Monitoring and assessment of mercury pollution in the vicinity of a chloralkali plant. II. Plant-availability, tissue-concentration and genotoxicity of mercury from agricultural soil contaminated with solid waste assessed in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environ. Pollut.* 76: 33-42.

**Park, C., An, J.M., Shin, Y.C., Kim, K.J., Lee, B.J., Paek, K.H.** (2004): Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection. *Planta* 219: 797-806.

**Patra, J., Lenka, M., Panda, B.B.** (1994): Tolerance and co-tolerance of the grass *Chloris barbata* Sw. to mercury, cadmium and zinc. *New Phytol.* 128: 165-171.

**Pfaffl, M.W.** (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 2002-2007.

**Prasad, D.D.K., Prasad, A.R.K.** (1987): Altered  $\delta$ -Aminolaevulinic acid metabolism by lead and mercury in germinating seedlings of Bajara (*Pennisetum typhoideum*). *J. Plant Physiol.* 127: 241-249.

**Robinson, N.J., Tommey, A.M., Kuske, C., Jackson, P.J.** (1993): Plant metallothioneins. *Biochem. J.* 295: 1-10.

**Robinson, N.J., Urwin, P.E., Robinson, P.J., Jackson, P.J.** (1994): Gene expression in relation to metal toxicity and tolerance. In *Stress-Induced Gene Expression in Plants* (A.S. Basra, ed.) Chur (Schweiz): Harwood Academic Publishers GmbH.

**Romano, P., Horton, P., Gray, J.E.** (2004): The Arabidopsis cyclophilin gene family. *Plant Physiol.* 134: 1268-1282.

**Rugh, C.L., Wilde, H.D., Stack, N.M., Thompson, D.M., Summers, A.O., Meagher, R.B.** (1996): Mercuric ion reduction and resistance in transgenic Arabidopsis thaliana plants expressing a modified bacterial merA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3182-3187.

**Rugh, C.L., Senecoff, J.F., Meagher, R.B., Merkle, S.A.** (1998): Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. *Nature Biotechnol.* 16: 925-928.

**Sahr, T., Voigt, G., Paretzke, H.G., Schramle, P., Ernst, D. (2005):** Caesium-affected gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* Online Early.

**Sahlmann, L., Lambeir, A.M., Lindskog, S., Dunford, H.B. (1984):** The reaction between NADPH and mercuric reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 259: 12403-12408.

**Saito, M., Mukai, Y., Komazaki, T., Oh, K.B., Nishizawa, Y., Tomiyama, M., Shibuya, N., Matsuoka, H. (2003):** Expression of rice Chitinase gene triggered by the direct injection of  $Ca^{2+}$ . *Biotechnol.* 105: 41-49.

**Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P.B.A., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I., Raskin, I. (1995):** Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Bio/Technol.* 13: 468-474.

**Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I. (1998):** Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 49: 643-668.

**Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989):** *Molecular cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

**Schäffner, A.R. (1998):** Aquaporin function, structure and expression: are there more surprises to surface in water relations? *Planta* 204: 131-139.

**Schulte, A., Balazs, A., Block, J., Gehrman, J. (1996):** Entwicklung der Niederschlagsdeposition von Schwermetallen in West-Deutschland: 1. Blei und Cadmium. *Z. f. Pflanzenern. Bodenk.* 159: 377-383.

**Shanker, K., Mishra, S., Srivastava, S., Srivastava, R. Dass, S., Prakash, S., Srivastava, M.M. (1996):** Study of Mercury-Selenium (Hg-Se) Interactions and their impact on Hg uptake by the Radish (*Raphanus sativus*) Plant. *Food and Chem. Tox.* 34: 883-886.

**Schütze, G., Becker, R., Dämmgen, U., Nagel, H.D., Schlutow, A., Weigel, H.J.** (2003): Risikoabschätzung der Cadmium-Belastung für Mensch und Umwelt infolge der Anwendung von cadmiumhaltigen Düngemitteln. Landbauforschung Völkenrode, Sonderdruck 53.

**Silver, S.** (1996): Bacterial resistances to toxic metal ions – a review. *Gene* 179: 9-19.

**Slemr, F., Langer, E.** (1992): Increase in global atmospheric concentrations of mercury inferred from measurements over the Atlantic Ocean. *Nature* 355: 434-437.

**Song, J.T., Lu, H., McDowell, J.M., Greenberg, J.T.** (2004) : A key role for ALD1 in activation of local and systemic defenses in Arabidopsis. *Plant J.* 40: 200-212.

**Stein, E.D., Cohen, Y., Winer, A.M.** (1996): Environmental Distribution and Transformation of Mercury Compounds. *Critical Rev. Environ. Sci. Technol.* 26 : 1-43.

**Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Kurz, T., Maucher, H., Weichert, H., Ziegler, J., Feussner, I., Wasternack, C.** (2003): Jasmonate biosynthesis and the allene oxid cyclase family of Arabidopsis thaliana. *Plant Mol. Biol.* 51: 895-911.

**Strubelt, O.** (1996): Gifte in Natur und Umwelt. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.

**Sule, A., Vanrobaeys, F., Hajos, G., Van Beeumen, J., Devreese, B.** (2004): Proteomic analysis of small heat shock protein isoforms in barley shoots. *Phytochem.* 65: 1853-1863.

**Summers, A.O., Barkay, T.** (1989): Metal resistance genes in the environment. In *Gene Transfer in the Environment*, (eds. S.B. Levy, R.V. Miller), 287-308. New York: McGraw-Hill.

**Suszcynsky, E.M., Shann, J.R.** (1995): Phytotoxicity and accumulation of mercury in tobacco subjected to different exposure routes. *Environ. Toxicol. Chem.* 14: 61-67.

**Taylor, K.C.** (1984): Automobile Catalytic Converters. Berlin: Springer Verlag.

**Tolay, I., Erenoglu, B., Romheld, V., Braun, H.J., Cakmak, I.** (2001): Phytosiderophore release in *Aegilopsis tauschii* and *Triticum* species under zinc and iron deficiencies. *J. Exp. Bot.* 52: 1093-1099.

**Tulub, A., Stefanov, V.E.** (2001): Cisplatin stops tubulin assembly into microtubules. A new insight into the mechanism of antitumor activity of platinum complexes. *Int. J. Biol. Macromol.* 14: 191-198.

**UBA Umwelt Bundesamt** (2000): Umweltqualitätsziele für gefährliche Stoffe in Gewässern: Internationaler Vergleich der Ableitungsmethoden. Berlin: Umweltbundesamt, Texte 24/00.

**UMK-AMK-LABO-AG** Umweltministerkonferenz-Agrarministerkonferenz-Länderarbeitsgemeinschaft Bodenschutz-Arbeitsgruppe (2000): Cadmiumanreicherung in Böden/Einheitliche Bewertung von Düngemitteln. Berichtsentwurf.

**UNEP** United Nations Environment Programme (2002): Global Mercury Assessment. UNEP Chemicals, Geneva.

**Volobueva, O., Kokhlova, L.P., Velikanov, G.A., Opanasiuk, O.A.** (2001): Actin-regulated water permeability of two transport channels of plasmodesmata in roots of winter wheat cultivars varying in drought resistance. *Tsitologija* 43: 477-482.

**Weast, R.C., Selby, S.M.** (Hrsg.) (1966): CRC-Handbook of Chemistry and Physics. Cleveland: Rubber Co.

**Wilkinson, S.C., Goulding, K.H., Robinson, P.K.** (1990): Mercury removal by immobilized algae in batch culture systems. *J. Appl. Phycol.* 2: 223-230.

**Woolhouse, H.W.** (1983): Toxicity and tolerance in the response of plants to metals. *Encyclopedia of Plant Physiol.* 12c: 245-300.

**Yamaguchi, H., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K., Mori, S.** (2000): Isolation and characterization of IDI2, a new Fe-deficiency-induced cDNA from barley roots, which encodes a protein related to the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B $\alpha$ ). *J. Exp. Bot.* 51: 2001-2007.

**Yin, Y., Allen, H.E., Li, Y., Huang, C.P., Sanders, P.F.** (1996): Heavy metals in the environment: Adsorption of mercury (II) by soil: Effects of pH, chloride and organic matter. *J. Environ. Qual.* 25: 837-844.

**Zenk, M.H.** (1996): Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene* 179: 21-30.

**Zhang, W. H., Tyerman, S. D.** (1999): Inhibition of water channels by HgCl<sub>2</sub> in intact wheat root cells. *Plant Physiol.* 120: 849-858.

**Zhou, J., Goldsbrough, P.B.** (1995): Structure, organisation and expression of the metallothionein gene family in Arabidopsis. *Mol. Gen. Genet.* 248: 318-328.

**Zimmermann, S., Sures, B.** (2004): Significance of platinum group metals emitted from automobile exhaust gas converters for the biosphere. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 11: 194-199.

## 7. Anhang

Primersequenzen:

Nested PCR-Primer 1: TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT

Nested PCR Primer 2R: AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT

PCR-Primer 1: CTAATACGACTCACTATAGGGC

Amplifikationskurven qRT-PCR:

Aufgrund einer Systemumstellung liegen zwei verschiedenen Darstellungsvarianten der Amplifikationskurven vor. Dies ist jedoch für die Aussage der Versuchsergebnisse ohne Bedeutung.

Wurzel (Platin): IDI 2

Induktionsfaktor Makroarray: 0,14

C4 C5 C6: Kontrolle

Berechnete relative Menge aus qRT-PCR:  $7,67 \cdot 10^{-5}$

D4 D5 D6: Behandlung  $40 \mu\text{M PtCl}_4$

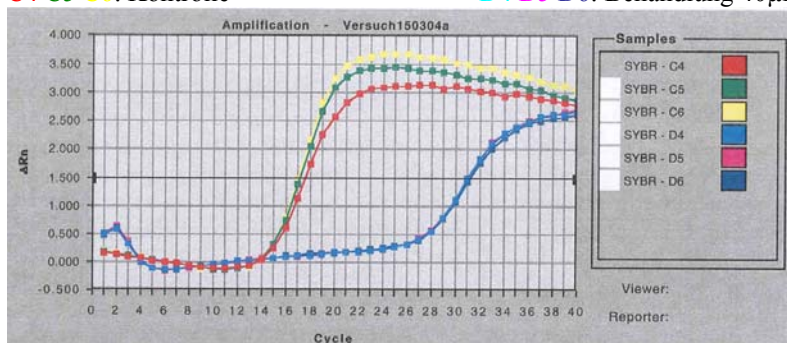


Abbildung A1: Amplifikationskurve IDI2

Wurzel (Platin): Chitin-induzierbares Gibberellin-responsives Protein

Induktionsfaktor Makroarray: 1,56

Berechnete relative Menge aus qRT-PCR: 2,25

A4 A5 A6: Kontrolle

B4 B5 B6: Behandlung 40 $\mu$ M PtCl<sub>4</sub>

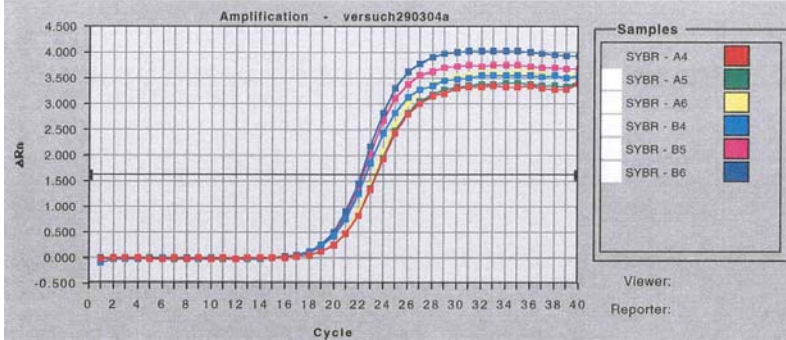


Abbildung A2: Amplifikationskurve Chitin-induzierbares Gibberellin-responsives Protein

Wurzel (Cadmium): Enolase

Induktionsfaktor Makroarray: 0,42

Berechnete relative Menge aus qRT-PCR: 0,17

E4 E5 E6: Kontrolle

F4 F5 F6: Behandlung 40 $\mu$ M Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O

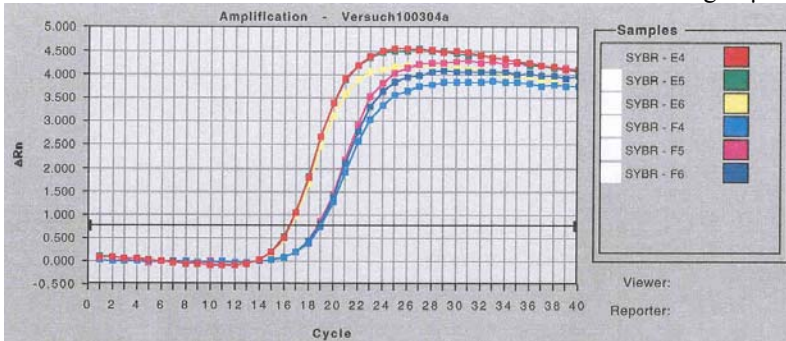


Abbildung A3: Amplifikationskurve Enolase

Wurzel (Cadmium): Cytokinin Oxidase

Induktionsfaktor Makroarray: 0,27

Berechnete relative Menge aus qRT-PCR: 0,51

G1 G2 G3: Kontrolle

H1 H2 H3: Behandlung 40 $\mu$ M Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O

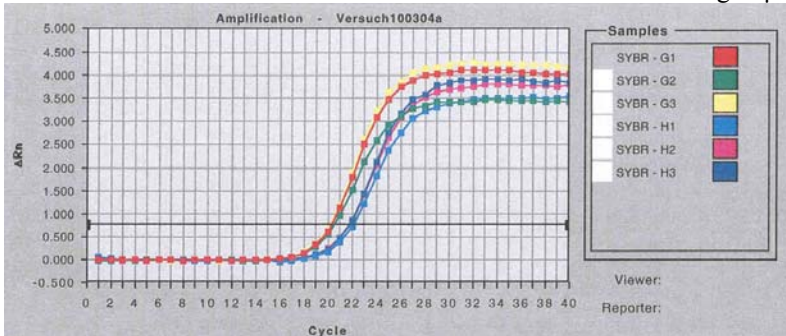


Abbildung A4: Amplifikationskurve Cytokinin Oxidase



Blatt (Cadmium): Thioredoxin

*Obere Amplifikationskurve:*

Induktionsfaktor Makroarray: 1,38

C1 C2 C3: Kontrolle

*Unter Amplifikationskurve:*

Induktionsfaktor Makroarray: 1,38

A4 A5 A6: Kontrolle

Berechnete relative Menge aus qRT-PCR: 2,14

D1 D2 D3: Behandlung 40 $\mu$ M Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O

Berechnete relative Menge aus qRT-PCR: 3,32

B4 B5 B6: Behandlung 40 $\mu$ M Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O

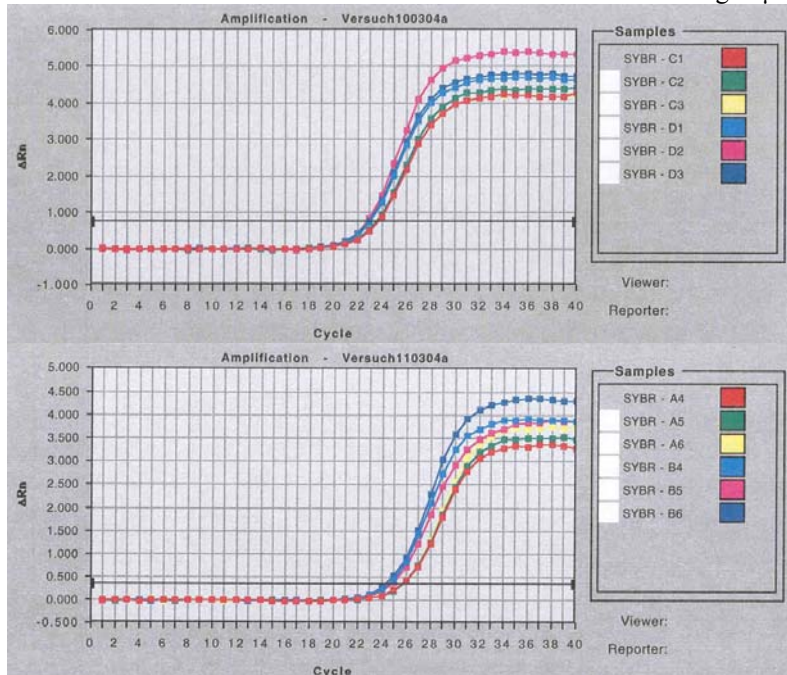


Abbildung A5: Amplifikationskurve Thioredoxin (2 unabhängige Wiederholungen)

Wurzel (Cadmium): Glutathion-S-Transferase

Induktionsfaktor Makroarray: 0,62

E4 E5 E6: Kontrolle

Berechnete relative Menge aus qRT-PCR: 0,56

F4 F5 F6: Behandlung 40 $\mu$ M Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O

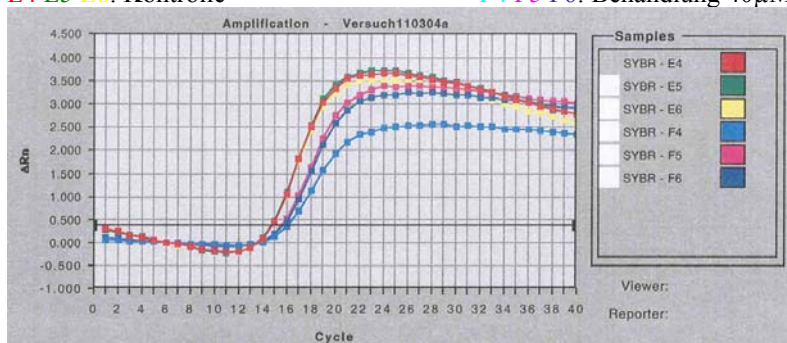


Abbildung A6: Amplifikationskurve Glutathion S-Transferase

Blatt (Platin): Thionin

Induktionsfaktor Makroarray: 1,89

Berechnete relative Menge aus qRT-PCR: 2,30

A1 A2 A3: Kontrolle

B1 B2 B3: Behandlung 40 $\mu$ M PtCl<sub>4</sub>

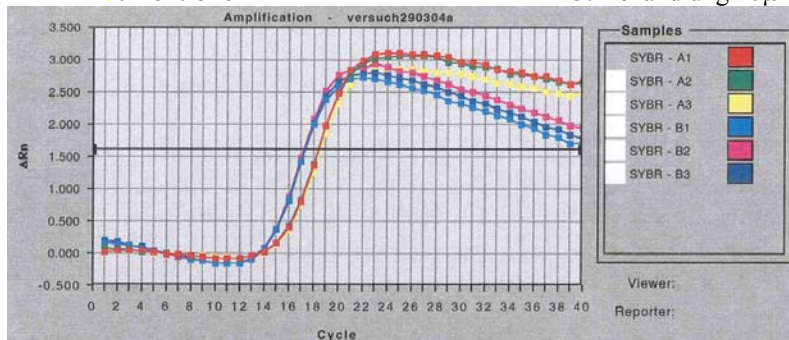


Abbildung A7: Amplifikationskurve Thionin

Blatt (Quecksilber): Carboanhydrase

Induktionsfaktor Makroarray: 0,49

Berechnete relative Menge aus qRT-PCR: 0,65

C1 C2 C3: Kontrolle

D1 D2 D3: Behandlung 40 $\mu$ M HgCl<sub>2</sub>

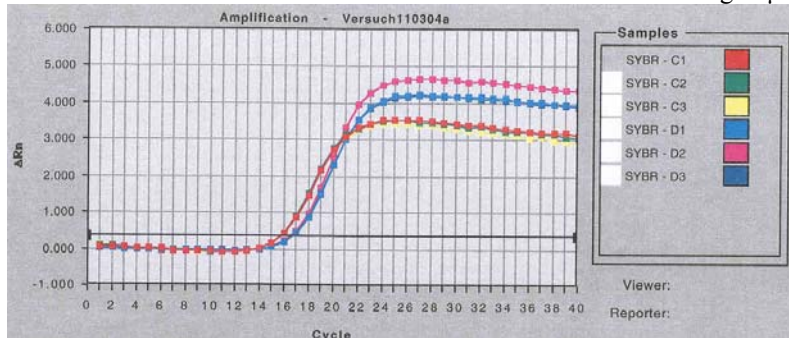


Abbildung A8: Amplifikationskurve Carboanhydrase

Blatt (Quecksilber): Hypothetisches Protein (Stress- und Abwehr induziert)

Induktionsfaktor Makroarray: 0,65

Berechnete relative Menge aus qRT-PCR: 0,53

E1 E2 E3: Kontrolle

F1 F2 F3: Behandlung 40 $\mu$ M HgCl<sub>2</sub>

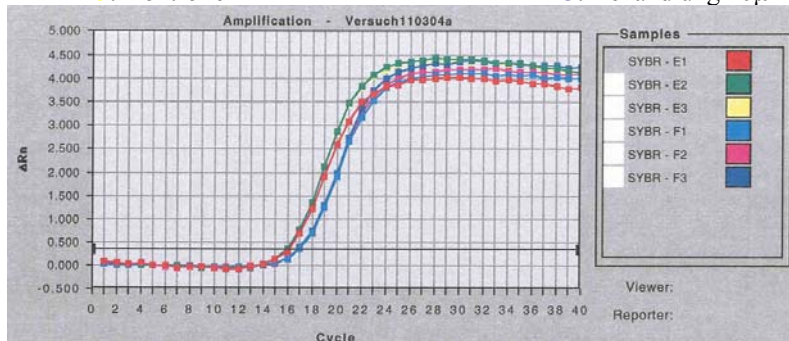


Abbildung A9: Amplifikationskurve Hypothetisches Protein (Stress- und Abwehr induziert)

Blatt (Quecksilber): Peptidylprolyl-Isomerase

Induktionsfaktor Makroarray: 0,38

Berechnete relative Menge aus qRT-PCR: 0,56

A1 A2 A3: Kontrolle

B1 B2 B3: Behandlung 40 $\mu$ M HgCl<sub>2</sub>

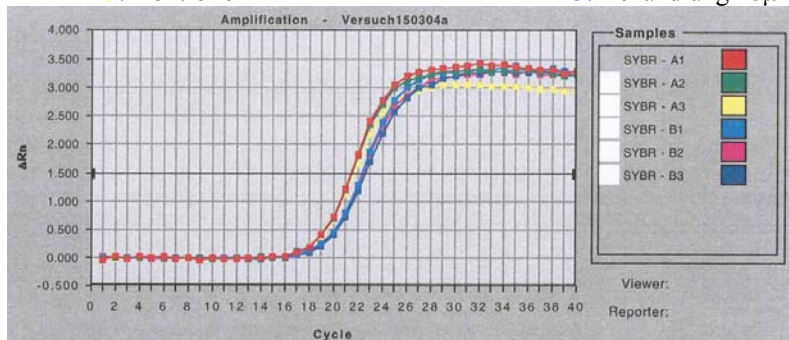


Abbildung A10: Amplifikationskurve Peptidylprolyl-Isomerase

Blatt (Quecksilber): Jasmonat induziertes Protein

Induktionsfaktor Makroarray: 0,41

Berechnete relative Menge aus qRT-PCR: 0,29

E1 E2 E3: Kontrolle

F1 F2 F3: Behandlung 40 $\mu$ M HgCl<sub>2</sub>

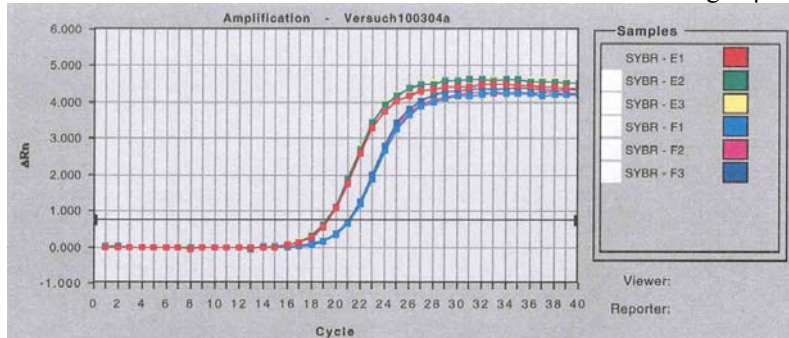


Abbildung A11: Amplifikationskurve Jasmonat induziertes Protein

Substrat (9 Tage): Blattspezifisches Thionin

Induktionsfaktor Mikroarray: 2,9

Berechnete relative Menge aus qRT-PCR: 10,56

Linke Graphen (blau-braun): Quecksilberkontaminiertes Substrat

Rechte Graphen (rot-blau-grün): Kontrollsubstrat

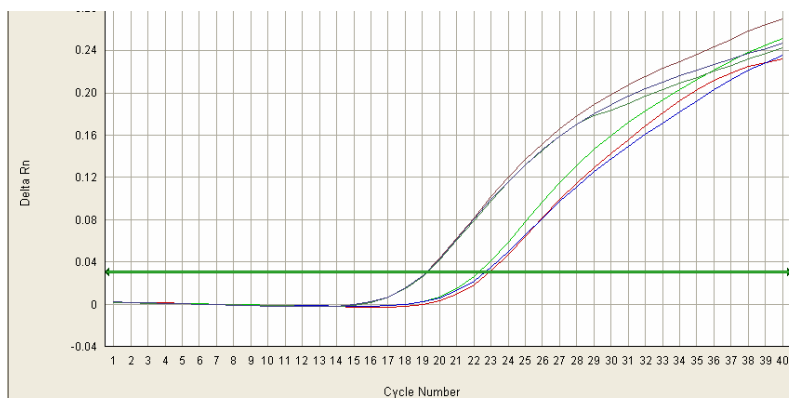


Abbildung A12: Amplifikationskurve Thionin

Substrat (20 Tage): Blattspezifisches Thionin

Induktionsfaktor Mikroarray: -1,67      Berechnete relative Menge aus qRT-PCR: 0,11

Linke Graphen (rot-blau-grün): Kontrollsubstrat

Rechte Graphen (blau-schwarz): Quecksilberkontaminiertes Substrat

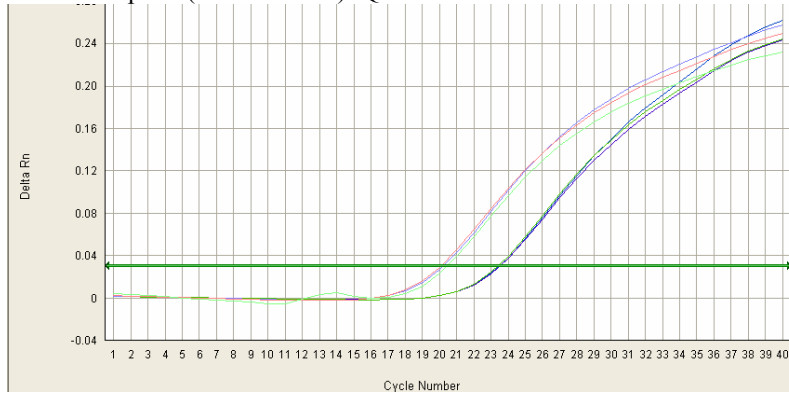


Abbildung A13: Amplifikationskurve Thionin

Substrat (9 Tage): LHC II Typ I Protein

Induktionsfaktor Mikroarray: 1,84      Berechnete relative Menge aus qRT-PCR: 53,82

Linke Graphen (blau-braun): Quecksilberkontaminiertes Substrat

Rechte Graphen (rot-grün): Kontrollsubstrat

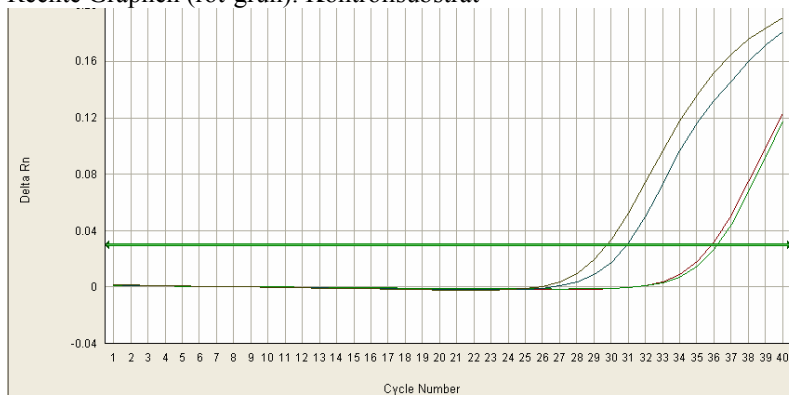


Abbildung A14: Amplifikationskurve LHC II Typ I Protein

Substrat (20 Tage): Hypothetisches Protein

Induktionsfaktor Mikroarray: 1,40      Berechnete relative Menge aus qRT-PCR: 1,80

Linke Graphen (blau-rot): Quecksilberkontaminiertes Substrat

Rechte Graphen (violett-hellblau): Kontrollsubstrat

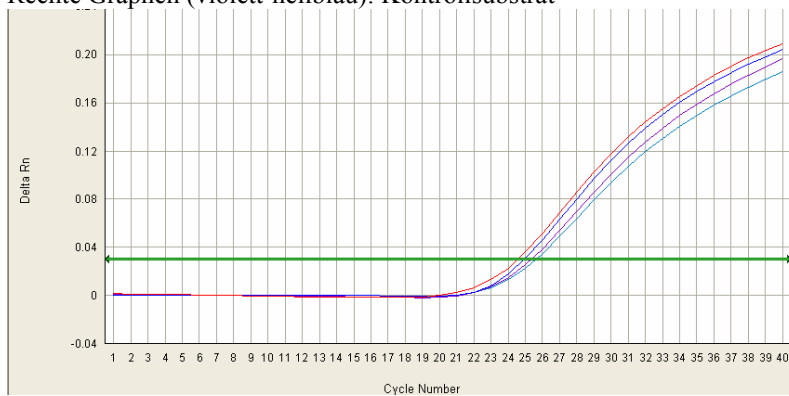


Abbildung A15: Amplifikationskurve Hypothetisches Protein

Scarlett Blatt (Cadmium): Carboanhydrase

Induktionsfaktor Mikroarray: -1,69      Berechnete relative Menge aus qRT-PCR: 0,27

Linke Graphen (grün-braun): Kontrolle

Rechte Graphen (violett-blau): Behandlung 40 $\mu$ M Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O

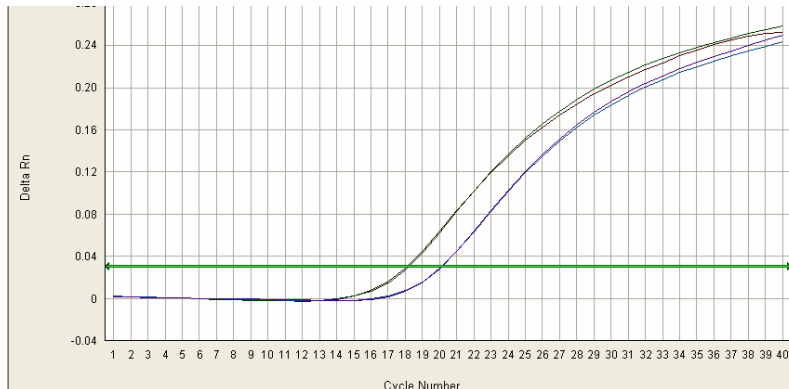


Abbildung A16: Amplifikationskurve Carboanhydrase

Scarlett Wurzel (Cadmium): IDI2

Induktionsfaktor Mikroarray: -1,42      Berechnete relative Menge aus qRT-PCR: 0,03

Linke Graphen (blau-violett): Kontrolle

Rechte Graphen (hellblau- hellviolett): Behandlung 40 $\mu$ M PtCl<sub>4</sub>

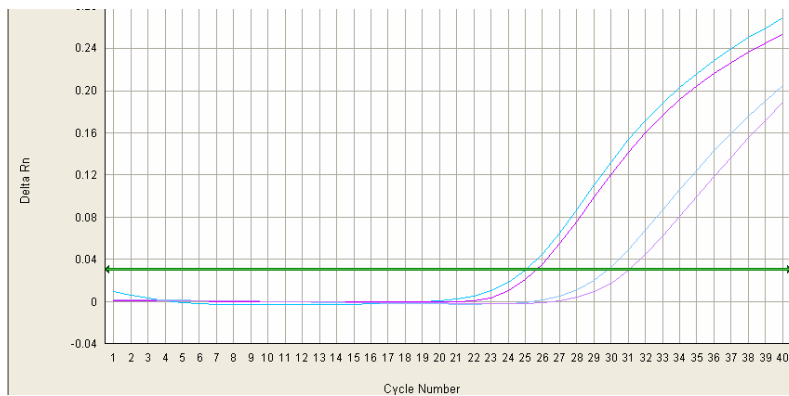


Abbildung A17: Amplifikationskurve IDI 2

Scarlett Wurzel (Platin): IDI2

Induktionsfaktor Mikroarray: -1,58      Berechnete relative Menge aus qRT-PCR: 0,07

Linke Graphen (blau-violett): Kontrolle

Rechte Graphen (violett-gelb): Behandlung 40 $\mu$ M PtCl<sub>4</sub>

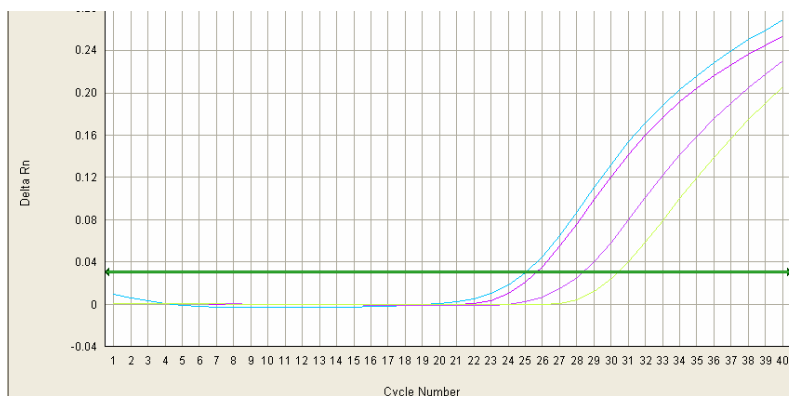


Abbildung A18: Amplifikationskurve IDI 2

Substrat (9 Tage): 18S-rRNA

Beide Templates zeigen sehr ähnliche Amplifikationsgraphen

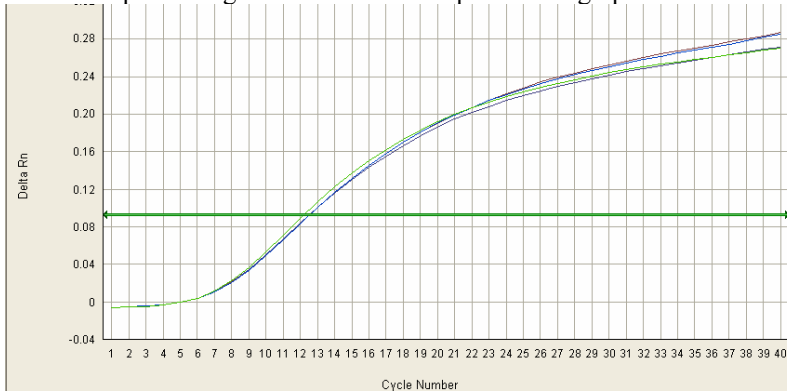


Abbildung A19: Amplifikationskurve 18S-rRNA

Substrat (20 Tage): 18S-rRNA

Beide Templates zeigen sehr ähnliche Amplifikationsgraphen

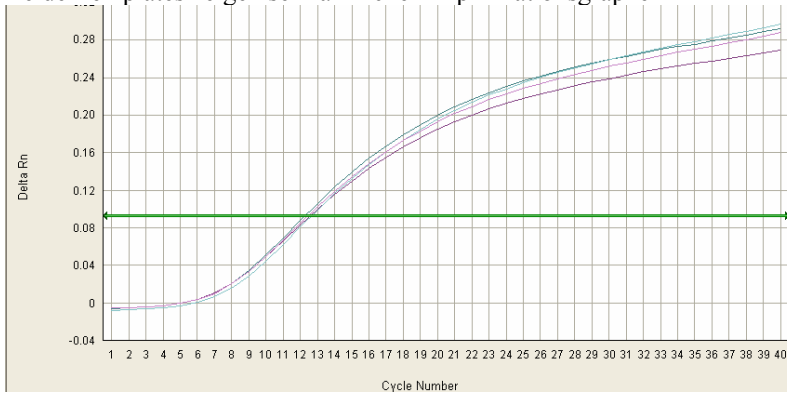


Abbildung A20: Amplifikationskurve 18S-rRNA

Scarlett Blatt (Quecksilber/Kontrolle): 18S-rRNA

Beide Templates zeigen sehr ähnliche Amplifikationsgraphen

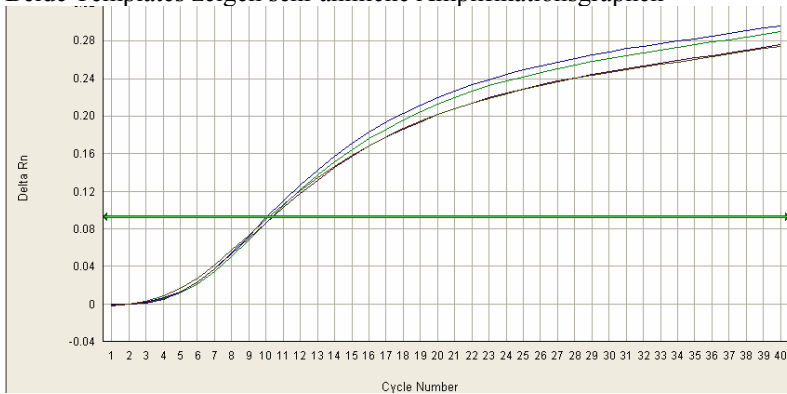


Abbildung A21: Amplifikationskurve 18S-rRNA



Scarlett Wurzel (Quecksilber/Kontrolle): 18S-rRNA  
Beide Templates zeigen sehr ähnliche Amplifikationsgraphen

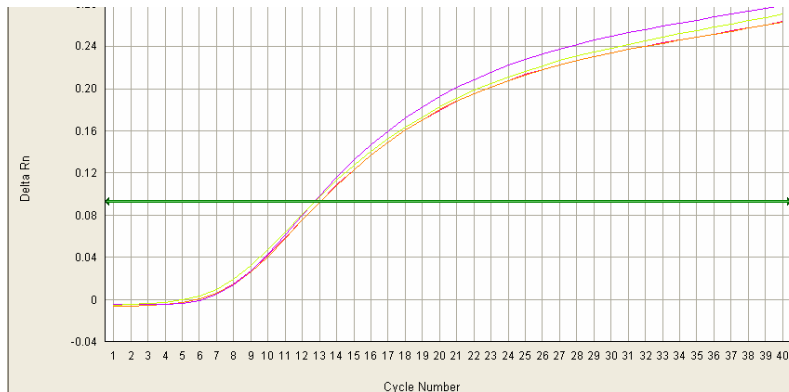


Abbildung A22: Amplifikationskurve 18S-rRNA

Scarlett und Barke; Blatt und Wurzel (verschiedene Behandlungen/Kontrollen):  
18S-rRNA  
Die Templates zeigen sehr ähnliche Amplifikationsgraphen  
Graphen unten: NTC

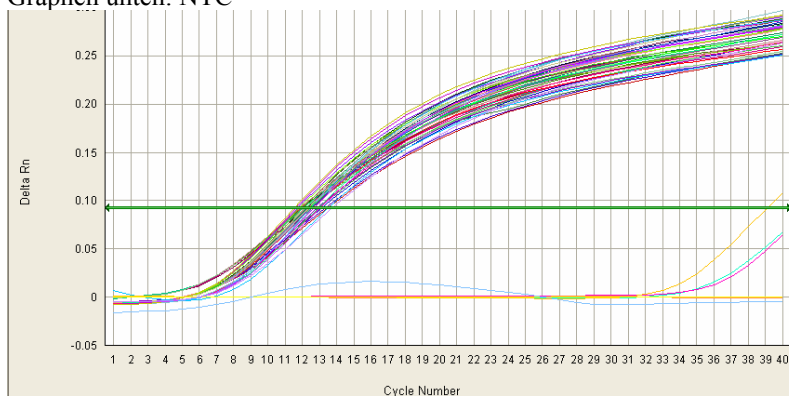


Abbildung A23: Amplifikationskurve 18S-rRNA und NTC bei diversen Templatepaaren





Mein herzlicher Dank gilt allen Personen, die am Gelingen der Arbeit direkt und indirekt beteiligt waren. Insbesondere möchte ich danken:

Herrn H. Sandermann, für die Möglichkeit, die Arbeit in seinem Institut anzufertigen,

Herrn D. Ernst, für die für mich optimale Betreuung der Arbeit und viele Anregungen und hilfreiche Ratschläge.

Herrn G. Wenzel, für die freundliche Bereitschaft, die Betreuung der Arbeit an der TU München sowie die administrativen Promotionsangelegenheiten zu übernehmen und als 1. Prüfer zu fungieren,

Herrn J. C. Munch, für die Bereitschaft, sich als 2. Prüfer zu Verfügung zu stellen,

Herrn U. Schmidhalter, für die Übernahme des Vorsitzes in der Prüfungskommission,

Herrn S. Halbach, für die Bereitstellung von Equipment, Zeit und Wissen, die die Quecksilbermessungen und die damit verbundenen Ergebnisse erst ermöglichten, sowie die vielen wichtigen Diskussionen und Ratschläge (zudem Hals- und Beinbruch!),

Herrn S. Kremb, für viele wertvolle Gespräche und Erfahrungen und das Huch!, sowie die fachliche und moralische Unterstützung an vielen Laboralltagen und unzählige lebensrettende Brezen und andere energiereiche Verbindungen,

Frau E. Bieber, für die bereitwillige Einweisung in Labormethoden und die jederzeit helfende Hand bei PC-Angelegenheiten,

Frau C. Schäfer, für die Bereitschaft, gemeinsam manchen Widrigkeiten der Array-Analysen ins Auge zu sehen und sie zu bewältigen, sowie die hilfsbereite Bereitstellung von zahlreichen Dingen, die das Laborleben schöner und einfacher machen,

Herrn O. Neuschäfer-Rube, für die Hilfe beim Umgang mit dem Mikro-Grid-Spotter,

Herrn M. Plessel, für die immer freundliche und ruhige Art und die Eigenschaft, selbst in heißen Phasen immer mit einem guten Rat, einer helfenden Hand oder einer helfenden Substanz bereit zu stehen,

Frau C. Knappe, für die freundliche Einweisung in die Geheimnisse des TaqMans,

Herrn B. Hauser, für die vorübergehende Bereitstellung von Anzuchträumen und die Bereitschaft, die Schwimmschicht-Hydrokultur in umfangreichen Laborversuchen zu testen,

Herrn T. Sahr, für viele Antworten auf viele Fragen zu Materialien und Methoden,

Herrn W. Heller, für sein unerschöpfliches Wissen und die Bereitschaft, dies auch mitzuteilen,

Herrn P. Schramel, für die Schwermetall-Analysen,

Herrn H. P. Mock, für die gute Zusammenarbeit bei der Proteomanalyse,

und meinen Eltern.



## LEBENS LAUF

### Persönliche Angaben:

Geburtsdatum: 24. Dezember 1977  
Geburtsort: München  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Eltern: Brigitte und Gerd Battke

### Bisherige Ausbildung:

1984 – 1988 Grundschule Unterhaching, Jahnstraße  
1988 – 1997 Gymnasium Unterhaching  
1998 – 2002 Studium der Agrarwissenschaften an der TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
2002 – 2005 Doktorand bei der GSF - Gesellschaft für Umwelt und Gesundheit, Institut für Biochemische Pflanzenpathologie, München-Neuherberg  
2002 – 2003 Studium der Rechtswissenschaften an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
2003 -2004 Fernstudium „Patentrecht für Ingenieure und Naturwissenschaftler“ am Fernstudieninstitut der Technischen Fachhochschule Berlin

### Weitere Tätigkeiten:

1997 – 1998 Zivildienst im Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der LMU  
2001 Studentischer wissenschaftlicher Mitarbeiter der Fraunhofer-Gesellschaft, Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung IVV, Freising  
Seit 2001 Bundesdelegierter des Bundesverbandes der Agraringenieure bei e.V.