

**Beiträge zur Multielement-Speziation
in pflanzlichen Lebensmitteln
durch off-line-Kopplung von
Gelpermeationschromatographie und
Massenspektrometrie
mit induktiv gekoppeltem Plasma**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer.nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Budi Muktiono

aus Semarang

Bonn 2006

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1.Referent: Professor Dr. K. Günther
2.Referent: Professorin Dr. G. M. König.

Meinem Bruder

Denn Lachen ist die Liebeserklärung an das Leben

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.....	1
1.1	Zur Bedeutung der Speziesanalytik.....	1
1.2	Gegenwärtiger Stand der Element-Speziation	7
1.3	Biologische Bedeutung von verschiedenen Elementen	15
1.4	Ziele der vorliegenden Arbeit	21
2	EXPERIMENTELLER TEIL.....	23
2.1	Probenvorbereitung	23
2.1.1	Erworbene Pflanzenproben	23
2.1.2	Züchtung der Modellpflanze	23
2.1.3	Cytosolgewinnung.....	24
2.1.4	Mikrowellenaufschlüsse.....	26
2.2	Auftrennung und Aufreinigung.....	27
2.2.1	Gelpermeationschromatographie	27
2.2.2	Spülung der Sephacrylsäule mit EDTA-Lösung.....	30
2.2.3	Native Gelelektrophorese.....	31
2.2.4	2D-Gelelektrophorese	35
2.2.5	Anreicherung.....	40
2.3	Bestimmung der Element	43
2.3.1	Elementdetektion mit ICP-QMS	43
2.3.2	Elementdetektion mit Graphitrohrfen-AAS	51
2.3.3	Proteinidentifizierung mit MALDI-TOF-MS	52
2.3.4	On-line-Service zur Proteinidentifizierung durch Datenbank-Abfrage	53
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	56
3.1	Verteilung der Elemente zwischen Cytosol und Pellet	57
3.1.1	Cytosolgewinnung aus Pflanzen	57
3.1.2	Die Zellaufschlussmethode (Ultra-Turrax)	58
3.1.3	Verteilung der Elemente in den Homogenaten auf Cytosol und Pellet.....	58
3.2	Elutionsverhalten der Spezies bei Gelpermeationschromatographie.....	61
3.2.1	Adsorption von freien Kationen.....	61
3.2.2	Elutionsverhalten der Spezies aus den Pflanzencytosolen.....	62

3.3	Multiement-Speziation in den Pflanzencytosolen durch GPC-ICP-MS off-line-Kopplung.....	65
3.3.1	Kalibration der Sephacrylsäule mit Proteinstandards	65
3.3.2	Darstellung und Interpretation der Spezies-Elutionsprofile in Bezug auf der jeweiligen Pflanze.....	67
3.3.3	Darstellung und Interpretation der Spezies-Elutionsprofile nach Elementgruppen.....	72
3.3.3.1	Alkali- /Erdalkali-Elemente.....	72
3.3.3.2	Andere Hauptgruppen-Elemente.....	76
3.3.3.3	Nebengruppen-Elemente.....	80
3.3.3.4	Elemente der Seltenen-Erden.....	85
3.3.4	Darstellung und Interpretation der Multiementsspektren	88
3.3.5	Diskussion	95
3.4	Untersuchung der HM-Cd-SP in Arabidopsis thaliana.....	98
3.4.1	Gelpermeationschromatographie der HM-Cd-Spezies	99
3.4.2	Bestimmung weiterer Elemente in der Fraktion der HM-Cd-SP.....	100
3.4.3	Behandlung der HM-Cd-SP mit Proteinase K	101
3.4.4	Anreicherung der HM-Cd-SP durch Ammoniumsulfatfällung.....	103
3.4.5	Proteintrennung mit nativer kontinuierlicher PAGE.....	105
3.4.6	Proteintrennung mit zweidimensionaler Gelelektrophorese	106
3.4.7	Trypsin-Verdau und anschließende MALDI-TOF-MS Untersuchung	109
3.4.8	Diskussion	111
4	ZUSAMMENFASSUNG	115
5	LITERATURVERZEICHNIS	118
6	ANHANG	126
6.1	Löslichkeitsverhalten der Elemente	126
6.1.1	Cytosolgewinnung aus den Pflanzenmaterialien.....	126
6.1.2	Extrahierbarkeit der Elemente durch Ultra-Turrax	126
6.2	Die GPC-Wiederfindungen der Elemente in den Pflanzencytosolen.....	130

6.3	Quantitative Spektren der Pflanzencytosole nach GPC-ICP-MS.....	133
6.3.1	Spezies in Eisbergsalatcytosol	134
6.3.2	Spezies in Endiviensalatcytosol	136
6.3.3	Spezies in Feldsalatcytosol.....	138
6.3.4	Spezies in Kopfsalatcytosol	140
6.3.5	Spezies in Gurkencytosol	142
6.3.6	Spezies in Paprikacytosol.....	144
6.3.7	Spezies in Tomatencytosol.....	146
6.3.8	Spezies in Kohlrabicytosol.....	148
6.3.9	Spezies in Möhrencytosol	150
6.3.10	Spezies in Arabidopsiscytosol.....	152
6.4	Zusammenstellung der Spezies nach ihrem gebundenen Element.....	154
6.5	MALDI-Ergebnisse	158
6.5.1	AS-43 Spot-1	160
6.5.2	AS-44 Spot-2.....	161
6.5.3	AS-46 Spot-3.....	162
6.5.4	AS-47 Spot-4.....	163
6.5.5	AS-48 Spot-5.....	164
6.5.6	AS-49 Spot-6.....	165
6.5.7	AS-61 Spot-7.....	166
6.5.8	AS-62 Spot-8.....	167
6.5.9	AS-63 Spot-9.....	168
6.5.10	AS-64 Spot-10.....	169
6.5.11	AS-65 Spot-11	170
6.5.12	AS-66 Spot-12.....	171
6.5.13	AS-67 Spot-13.....	172
6.5.14	AS-68 Spot-14.....	173
6.5.15	AS-69 Spot-15.....	174
6.5.16	AS-70 Spot-16.....	175
6.5.17	AS-75 Spot-17.....	176
6.5.18	AS-76 Spot-18.....	177
7	DANKSAGUNG.....	179

Abkürzungen

(2D-) PAGE	(Two-Dimensional) Polyacrylamide Gel Electrophoresis
AES	Atomic Emission Spectroscopy
cps	counts per seconds
CZE	Capillary Zone Electrophoresis
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-diamine-tetra-acetic acid
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry
ET-AAS	Electrothermal Atomic Absorption Spectroscopy
EXAFS	Extended X-Ray Absorption Fine Structure
FAB-MS	Fast Atomic Bombardment Mass Spectrometry
GF-AAS	Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy
GPC / SEC	Gel Permeation Chromatography / Size exclusion chromatography
HRMS	High-Resolution Mass Spectrometry
IAA	Jodacetamid
ICP-QMS	Inductively Coupled Plasma Quadrupole Mass Spectrometry
IEF	Isoelectric Focusing
IPG	Immobilized Phase Gel Electrophoresis
kDa	kilo Dalton (Molar Mass Unit)
Maldi-Tof-MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight – Mass Spectrometry
MDB	Metalloprotein Database and Browser
MIP(S)	Microwave Induced Plasma Source
MTs	Metallothioneine
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PCs	Phytochelatine
PE	Perkin Elmer
PGE	Platin Group Elements (Elemente der Platingruppe)
PIXE	Proton Induced X-Ray Emission
ppb.	part per billion (Concentration: $\mu\text{g/L}$ or $\mu\text{g/kg}$)
PSD	Post Source Decay
REE	Rare Earth Elements (Elemente der Seltenen-Erden)
RP-HPLC	Reversed-Phase High Pressure Liquide Chromatography
SIMS	Secondary-Ion Mass Spectrometry
s.p.	suprapur
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
TRXRF	Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectroscopy
TSRI	The Scripps Research Institute
Upm	Umdrehung pro Minute
WHO	World Health Organization

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1	Strukturmodelle für native Cd-Phytochelatin-Komplexe	4
Abbildung 1-2	Bedeutung von Elementspezies in verschiedenen Lebensbereichen	5
Abbildung 1-3	Die DNS-Bindungsstelle des Östrogenrezeptors.	6
Abbildung 1-4	Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Speziesanalytik	8
Abbildung 1-5	Mögliche Wechselwirkung zwischen essentiellen und toxischen Elementen, die ihre Aufnahme aus der Nahrung beeinflussen.	13
Abbildung 1-6	Die Pflanze Arabidopsis thaliana (Wildart Columbia)	14
Abbildung 1-7	Das Verhältnis von Ladung zu Radius (z/r) in Abhängigkeit von der Ionisationsenergie (I ₂) der doppelt geladenen Ionen (M zu M ²⁺) für einige Elemente.....	18
Abbildung 2-1	Die Untersuchung weiterer Oxidbildungsraten ausgewählter Elemente der Seltenen-Erden unter definierten Optimierungsbedingungen	50
Abbildung 2-2	Die Bildungsraten von CeO/Ce, BaO/Ba, und Ba ²⁺ /Ba bei täglichen Messkontrollen.	50
Abbildung 2-3	On-line-Abfrage-Formular zur Proteinidentifizierung	54
Abbildung 3-1	Die einzelnen Arbeitsschritte als Flussdiagramm zur Multielement- Speziesanalytik.....	56
Abbildung 3-2	Anteile der gewonnenen Cytosol in Gewichtsprozent von ursprünglichen Pflanzenmaterial.....	57
Abbildung 3-3	Verteilung von 15 Elementen auf Cytosol-Pellet-Fraktionen bei neun verschiedenen Pflanzen	59
Abbildung 3-4	Verteilung von Elementen der Seltenen-Erden auf Cytosol-Pellet- Fraktionen.....	60
Abbildung 3-5	Beispieldiagramm: Elutionsverhalten von Kupferspezies aus Feldsalatcytosol bei der GPC-Trennung	63
Abbildung 3-6	Elutionsprofil der Lithiumspezies aus Möhrencytosol.....	64
Abbildung 3-7	Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung bei der GPC	66
Abbildung 3-8	Wiederfindung der Elemente Rb, Co und Mg (in %) nach den einzelnen GPC-Trennungen	69
Abbildung 3-9	Untypische Elutionsprofile bestimmter Spezies während der GPC- Trennung	70

Abbildung 3-10 Elutionsprofile von Spezies aus der Gruppe der Alkali- /Erdalkalielemente.....	74
Abbildung 3-11 Elutionsprofile von Spezies der Hauptgruppenelemente	77
Abbildung 3-12 Weitere Elutionsprofile von Spezies der Hauptgruppenelemente.....	79
Abbildung 3-13 Elutionsprofile von Spezies der Nebengruppenelemente.....	81
Abbildung 3-14 Weitere Elutionsprofile von Spezies der Nebengruppenelemente	84
Abbildung 3-15 Elutionsprofile von Spezies aus der Elementgruppe der Seltenen-Erden.....	86
Abbildung 3-16 Die GPC-Spektren der Co-, Ni-, Cu- und Zn-Spezies mit ihren relativen Konzentrationen beim Elutionsvolumen von 413 mL.	89
Abbildung 3-17 Erkennbare Überlappungen der Elutionsprofile verschiedener Elemente aus Tomaten- und Feldsalatcytosol im Bereich der 40 kDa-Spezies	91
Abbildung 3-18 Erkennbare Überlappungen der Elutionsprofile verschiedener Elemente aus Möhren- und Arabidopsiscytosol im Bereich der 200 kDa-Spezies.....	91
Abbildung 3-19 Erkennbare Überlappungen der Elutionsprofile verschiedener Elemente im Massenbereich um die 300 kDa.	92
Abbildung 3-20 Erkennbare Überlappungen der Elutionsprofile verschiedener Elemente bei Elutionsvolumen um die 500 mL.	92
Abbildung 3-21 Erkennbare Überlappungen der Elutionsprofile verschiedener Elemente bei Elutionsvolumen um die 600 mL.	93
Abbildung 3-22 Arbeitsschritte zur Isolierung und Identifizierung der hochmolekularen Cd-Spezies aus dem Cytosol von Arabidopsis thaliana.....	98
Abbildung 3-23 Elutionsverhalten von Cd bei der GPC von von Arabidopsiscytosol.....	99
Abbildung 3-24 Elutionsverhalten von Cu, Fe und Ba bei der GPC von Arabidopsiscytosol	100
Abbildung 3-25 Vergleich der GPC-Spektren des Elements Cadmium vor und nach der Behandlung des Cytosols mit dem Enzym Proteinase K	101
Abbildung 3-26 Elutionsverhalten von Cu, Fe und Ba bei der GPC von Arabidopsiscytosol nach Behandlung mit Proteinase K	102
Abbildung 3-27 Elutionsverhalten der Cd-Spezies bei verschiedenen Sättigungskonzentrationen des Ammoniumsulfats.	103
Abbildung 3-28 Qualitative Darstellung der Ba-, Fe- und Cu-Konzentrationen in den GPC-Fractionen bei der Ammoniumsulfatfraktionierung.	104
Abbildung 3-29 Cd-Konzentrationen in den PAGE-Fractionen nach der PAGE-Trennung der GPC-Fraktion der HM-Cd-SP.....	105
Abbildung 3-30 Untersuchung des Aufreinigungseffekts der nativen kontinuierlichen Gelelektrophorese.....	106

Abbildung 3-31 2D-SDS-PAGE der Cd-Proteine von Arabidopsis nach verschiedenen Aufreinigungen.....	107
Abbildung 3-32 Die Auswahl der zum Trypsinverdau herangezogenen Proteinspots.....	109
Abbildung 3-33 Aminosäuresequenz der postulierten hochmolekularen Cd-Spezies	114
Abbildung 6-1 GPC-Elutionsprofile von verschiedenen Spezies in Eisbergsalatcytosol ...	134
Abbildung 6-2 GPC-Elutionsprofile weiterer Spezies in Eisbergsalatcytosol	135
Abbildung 6-3 GPC-Elutionsprofile von verschiedenen Spezies in Endiviensalatcytosol .	136
Abbildung 6-4 GPC-Elutionsprofile weiterer Spezies in Endiviensalatcytosol	137
Abbildung 6-5 GPC-Elutionsprofile von verschiedenen Spezies in Feldsalatcytosol.....	138
Abbildung 6-6 GPC-Elutionsprofile weiterer Spezies in Feldsalatcytosol	139
Abbildung 6-7 GPC-Elutionsprofile von verschiedenen Spezies in Kopfsalatcytosol	140
Abbildung 6-8 GPC-Elutionsprofile weiterer Spezies in Kopfsalatcytosol	141
Abbildung 6-9 GPC-Elutionsprofile von verschiedenen Spezies in Gurkencytosol.....	142
Abbildung 6-10 GPC-Elutionsprofile weiterer Spezies in Gurkencytosol.....	143
Abbildung 6-11 GPC-Elutionsprofile von verschiedenen Spezies in Paprikacytosol.....	144
Abbildung 6-12 GPC-Elutionsprofile weiterer Spezies in Paprikacytosol.....	145
Abbildung 6-13 GPC-Elutionsprofile von verschiedenen Spezies in Tomatencytosol.....	146
Abbildung 6-14 GPC-Elutionsprofile weiterer Spezies in Tomatencytosol.....	147
Abbildung 6-15 GPC-Elutionsprofile von verschiedenen Spezies in Kohlrabicytosol.....	148
Abbildung 6-16 GPC-Elutionsprofile weiterer Spezies in Kohlrabicytosol	149
Abbildung 6-17 GPC-Elutionsprofile von verschiedenen Spezies in Möhrencytosol	150
Abbildung 6-18 GPC-Elutionsprofile weiterer Spezies in Möhrencytosol	151
Abbildung 6-19 GPC-Elutionsprofile von verschiedenen Spezies in Arabidopsiscytosol....	152
Abbildung 6-20 GPC-Elutionsprofile weiterer Spezies in Arabidopsiscytosol	153
Abbildung 6-21 MALDI-TOF-MS-Spektren von Peptid-Spot Nr.1 bis 18 vom 2D-SDS- PAGE	160

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1	Allgemein eingesetzte Auftrennungstechniken in der Speziesanalytik.	9
Tabelle 1-2	Techniken zur Elementdetektion in der Speziesanalytik	11
Tabelle 1-3	Techniken zur Speziesidentifizierung.	12
Tabelle 1-4	Einige essentielle Eigenschaften der Ultrapurenelemente.....	16
Tabelle 1-5	Wirkung von Elementüberschüssen in Menschen und Tieren	20
Tabelle 1-6	Klinische Mangelsymptome von Spurenelementen.....	20
Tabelle 2-1	Auswahl an Lebensmitteln zur Cytosolherstellung.....	23
Tabelle 2-2	Aufschlussprogramm des Mikrowellensystems.....	26
Tabelle 2-3	Parameter der Gelpermeationschromatographie	28
Tabelle 2-4	Proteinstandards zur Kalibration der Sephacryls400HR.....	29
Tabelle 2-5	Periphere Geräte der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
Tabelle 2-6	Die bei der 2D-SDS-Gelelektrophorese eingesetzten Chemikalien.....	36
Tabelle 2-7	Elektrische Spannungen bei Rehydratation und Trennung der IPG-Gele.....	37
Tabelle 2-8	Laufparameter der 2.Dimension für die Precast-Gele.....	39
Tabelle 2-9	Eingesetzte Produkte der Millipore GmbH zur Ultrafiltration.....	41
Tabelle 2-10	Konzentration von Ammoniumsulfat - % Sättigung bei 0°C.....	42
Tabelle 2-11	Beschreibung der ICP-QMS ELAN6100	43
Tabelle 2-12	Gemessene Isotopmasse und deren Dwell-Time	45
Tabelle 2-13	Vier Korrekturfaktoren zur Gd-Messung auf der Istotop 158.....	48
Tabelle 2-14	Instrumentbeschreibung der ET-AAS SIMA6000	51
Tabelle 2-15	Temperaturprogramm zur Cadmiumbestimmung mit der ET-AAS	51
Tabelle 2-16	Voyager – MALDI-TOF-MS	52
Tabelle 3-1	Elemente, bei den die Konzentrationen in den GPC-Fraktionen qualitative Peaks zeigten, aber bei deren quantitativer Auswertung der Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze lagen.....	64
Tabelle 3-2	Elutionsvolumina der Standardproteine bei der GPC	66
Tabelle 3-3	Liste der quantitativ auswertbaren Ergebnisse bei den Multielementmessungen von den GPC-Fraktionen der Pflanzencytosole	68
Tabelle 3-4	Die Zusammenfassung der Spezies nach ihrer Größe.....	94
Tabelle 3-5	Abschätzung der Molekulargewichte der Cadmiumspezies in Arabidopsiscytosol	99
Tabelle 3-7	Konzentrationen von Cu, Fe und Ba in der Peakmaximafraktion der HM-Cd-SP.....	100

Tabelle 3-8	Ergebnisse von 12 untersuchten Proteinspots nach der On-line-Datenbankanalyse.....	110
Tabelle 6-1	Die gewonnenen Cytosolmenge, bezogen auf das Frischgewicht der aufbereiteten Pflanzenproben.....	126
Tabelle 6-2	Die Verteilung als prozentualen Wiederfindungen der untersuchten Elemente in den Pellets und Cytosolen	127
Tabelle 6-3	Die Wiederfindungen der Elemente nach der Trennung der Pflanzencytosole durch GPC-Sephacryl S400HR.....	130
Tabelle 6-4	Die Elutionsvolumen der Peakmaximen der einzelnen Elementspezies in den GPC-Fraktionen.	154
Tabelle 6-5	Trypsin-InGel-Verdau und erhaltene Massenfragmente.....	158

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1.1 Zur Bedeutung der Speziesanalytik

Zahlreiche Metalle spielen bei biologischen Metabolismen eine zentrale Rolle. Wichtige Lebensprozesse können erst dann einwandfrei funktionieren, wenn notwendige Metalle in ausreichender Menge und geeigneter Form zur Verfügung stehen. Als Beispiele sind hier die Funktionen von Eisen in Hämoglobin, Magnesium in Chloroplasten, Zink in Insulin, Kobalt in Vitamin-B₁₂ zu nennen. Aber auch bei anderen Elementen wie Molybdän, Mangan, Kupfer, Chrom und Selen ist die Essentialität inzwischen unbestritten.

Neben Trinkwasser stellen die pflanzlichen Lebensmittel eine primäre Quelle für Spuren- und Mengenelemente dar, durch die zahlreiche Metalle in die menschliche Nahrungskette gelangen. Die Aufnahme bestimmter Metalle in physiologisch relevanten Mengen ist für Lebewesen von essentieller Bedeutung. Werden diese Elemente in unzureichenden Mengen (Unterversorgung) oder im Überschuss (Übersorgung) mit der Nahrung aufgenommen, so kann dies zu einer massiven Störung von Stoffwechselprozessen oder zu Vergiftungen mit letalem Ausgang führen. Daher ist es von großer Bedeutung, dass die Erkenntnisse über die Bioverfügbarkeit von Elementen stetig verbessert und vertieft werden. Nur dadurch kann eine präzisere Abschätzung des vorhandenen Bedarfs und der tatsächlichen Aufnahme von bestimmten Metallen bei biologischen Prozessen erfolgen (Merian, 1991).

Zu einer allgemeinen Eigenschaft der Organismen gehört es, einige Elemente aus der Umwelt selektiv zu akkumulieren, und andere abzuweisen (Clemens, 2002). Dabei ist eine strenge Steuerung und Regulierung der Akkumulation von aufgenommenen Metallen sowohl auf der zellulären als auch auf den höheren Ebenen von Geweben und Organen lebensnotwendig. Diese koordinierten Funktionen zu Aufnahme-, Transport- und Speicherprozessen sind erforderlich, um in verschiedenen Geweben und Kompartimenten Metallkonzentrationen innerhalb ihrer physiologischen Grenzen aufrecht zu halten (Homöostase). Zusätzlich müssen Organismen - aufgrund einer mangelhaften oder fehlerhaften bzw. ganz fehlenden Steuerung in der Aufnahme und Akkumulation - häufig eine Exposition an unerwünschten Elementen oder Elementkonzentrationen bewältigen.

Viele Wissenschaftler versuchen, immer tiefere Einblicke in diese Prozesse zu gewinnen. Umfangreiche Untersuchungen wurden durchgeführt, um in einer möglichst repräsentativen Auswahl von pflanzlichen Lebensmitteln gesunde und schädliche Faktoren zu unterscheiden. Aber viele Ansätze, die am Anfang durch ihre Einfachheit und Zuverlässigkeit von großem Interesse waren - z.B. ein Monitoring der Elementkonzentrationen in Pflanzen - geraten

langsam immer mehr in den Hintergrund. Derartige Verfahren dienen lediglich der Bestimmung der Gesamtgehalte an bestimmten Metallen in den entnommenen Pflanzenteilen.

Für die Bioverfügbarkeit und die Aufnahme der Metalle ist die Kenntnis der Bindungsform von zentraler Bedeutung. Hier sind zahlreiche chemische Spezies mit unterschiedlichen Funktionen und Eigenschaften involviert. Aus diesem Grund ist daher die Information über den Gesamtgehalt des Metalls in Pflanzenteilen zum Verständnis der Bioverfügbarkeit, des Metabolismus oder der Toxizität eines Elementes ungeeignet und in manchen Fällen sogar irreführend (z.B. die Toxizität von Arsen, dessen Gehalt in verschiedenen Fischen bestimmt wurde, kann leicht überschätzt werden. Das Arsenobetain - die Haupt-Arsen-Spezies in Fisch - wird z.B. als nicht toxisch beschrieben (Sanz-Medel, 1998)).

Darüber hinaus können sich vorhandene Metalle durchaus in ihrer Bioverfügbarkeit, ihrem Metabolismus und ihrer Toxizität gegenseitig beeinflussen. Sogar gegenseitige Entgiftungsprozesse sind möglich (z.B. die Toxizität von Arsen, Quecksilber oder Cadmium wird bei Vorliegen von Selen-Verbindungen dramatisch gemindert (Sasakura, 1998, Frisk, 2002)). Aufgrund dessen hat sich das Interesse der Wissenschaft im Laufe der Zeit immer mehr in Richtung der Metallbindungsformen verlagert.

Definition „chemische Spezies“

Bei dem Begriff „chemische Spezies“ handelt es sich vorwiegend um chemische Elemente in spezifischen Formen, die z.B. als Ionen in verschiedenen Oxidationszuständen, oder als Isotopenkompositionen, oder in Komplexen bzw. anderen molekularen Strukturen gebunden, vorliegen können (Szpunar, 2002). Die Untersuchung dieser Bindungsformen wird dann als „Speziesanalytik“ bzw. „Element-Speziation“ bezeichnet. Der Begriff ist seit dem Jahr 2000 offiziell durch die IUPAC festgelegt als „Prozess zur Erzielung eines Beweises für die atomare und molekulare Struktur eines Analyten“ (Templeton, 2000).

Eine andere praktische Formulierung zum Verständnis dieses Begriffs hat Caroli wie folgt vorgeschlagen: „Identifizierung und Quantifizierung der Gefahrenpotentiale für die menschliche Gesundheit und die Umwelt durch die verschiedenen Formen, in denen ein anorganischer Analyt vorkommen kann“ (Caroli, 1995). Die Untersuchung schließt also die Bindungsformen der Elemente bei diversen biologischen Prozessen ein. Denn Elemente können, sobald sie durch organische Moleküle komplexiert werden, eine völlig andere biologische Wirksamkeit als ihre freien ionischen Formen aufweisen.

Beispiele von Elementspezies

Eine wichtige Gruppe von Liganden zur Metallbindung sind cysteinreiche Peptide und Proteine. In den Pflanzensystemen gelten die Polypeptide „Phytochelatine“ (PC) als die aktuell am besten untersuchten Metallspezies (Leopold, 1999). Sie werden enzymatisch in den Pflanzenzellen durch PC-Synthase synthetisiert (Cobbett 1999), induziert durch erhöhte Stressbelastung in Form eines Überschusses an Schwermetallen in Zellcytosolen (Cd, Zn, Pb, Hg, Cu etc.). Im Wesentlichen zeigt ihre Struktur das Grundgerüst $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ mit $n = 2$ bis 11, wobei verschiedene PC-Isoformen mit anderen carboxyterminalen Aminosäuren anstelle von Glycin inzwischen bekannt sind (Zenk, 1996; Schmöger, 2000). Ihre wichtigste Funktion besteht also darin, durch Komplexierung der überschüssigen Metallionen und anschließenden Abtransport in die Vakuole die Zelle zu entgiften. Viele Aspekte bei der Entgiftung von Schwermetallen durch Phytochelatine sind mittlerweile geklärt, einige bleiben noch ungelöst. Weitere Rollen bei der Homöostasis von Metallen und im Fe/S-Metabolismus werden ebenfalls diskutiert. So werden Phytochelatine auch als Reaktion auf Cu^{2+} und Zn^{2+} gebildet und werden ein zellulärer Zwischenspeicher für diese Ionen. Enzyme, die diese Metalle als Cofaktoren brauchen, konnten durch Phytochelatin-Komplexe mit Cu^{2+} und Zn^{2+} reaktiviert werden (Grill et al., 1989; Zenk, 1996; Sanita di Toppi, 1999; Lippard, 1994).

Für die Bindung von Cd an Phytochelatine wurden von Strasdeit et al. (1992) anhand von EXAFS-Messungen an isolierten Phytochelatin-Cd-Komplexen verschiedene Modelle vorgeschlagen, deren Struktur in Abhängigkeit von der Kettenlänge der Peptide variiert (Abbildung 1-1). Auf zellulärer Ebene konnte nicht nur gezeigt werden, dass bis zu 97 % des löslichen Cadmiums an Phytochelatine gebunden waren, sondern auch dass metall-sensitive Enzyme Cadmium in 10facher bis 1000facher Konzentration tolerierten, wenn es an Phytochelatine gebunden war (Zenk 1996). Ein kausaler Nachweis, dass die Phytochelatine der zentrale Schwermetallentgiftungsmechanismus bei Pflanzen sind, kommt aus der Analyse von Mutanten. Arabidopsis-Mutanten, die keine Phytochelatine produzierten (*cad1*), konnten schon auf $0,6 \mu\text{M Cd}^{2+}$ nicht mehr wachsen, eine Konzentration, die dem Wildtyp überhaupt nicht schadete (Schmöger, 2000).

Phytochelatine konnten bisher in allen untersuchten höheren Pflanzen (Bryophyta, Pteridophyta und Spermatophyta) nachgewiesen werden (Grill, 1989). Nach zahlreichen Studien wurden bisher keine Gen-Homologe zur PC-Synthase in Organismen wie *S. cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, Maus oder Mensch gefunden. Sie konnten jedoch in Organismen wie die Nematoden *Caenorhabditis elegans*, *C. briggsae* und in der Bakterienart *Dictyostelium discoideum* gefunden werden (Clemens, 2001; Cobbett, 2002 und Vatamaniuk, 2001). Ihre Präsenz wird also mit dem Lebensraum der Organismen in Boden bzw. Wasser in Verbindung gebracht.

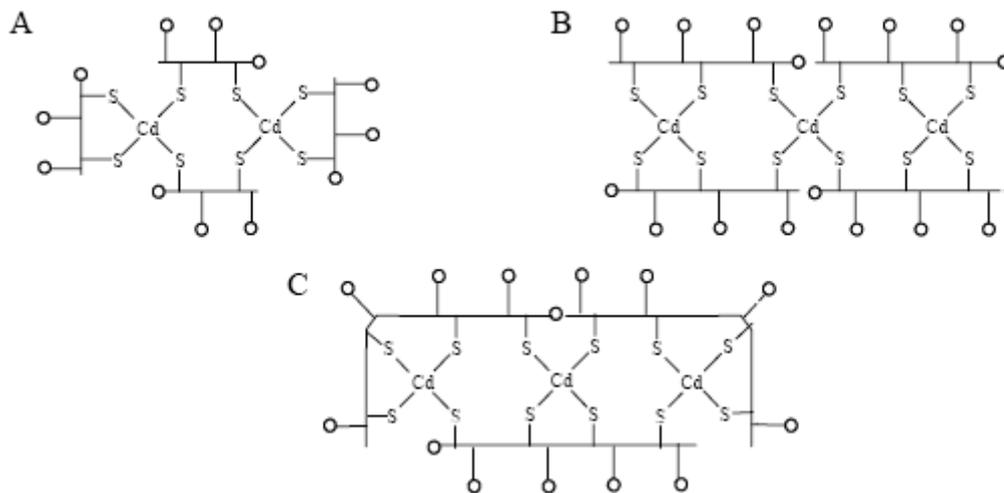


Abbildung 1-1 Strukturmodelle für native Cd-Phytochelatin-Komplexe
A: [Cd₂(PC₂)₄], B: [Cd₃(PC₃)₄] und C: [Cd₃(PC₄)₃]
 (nach STRASDEIT, 1992)

Weitere cysteinreiche Metallbindungsproteine sind Metallothioneine (MT), die anders als die PCs ribosomal synthetisiert werden (Nordberg, 1998; Robinson 1993). Sie wurden zwar anfänglich nur in tierischen Organismen gefunden, in Pflanzen aber wurden inzwischen ebenfalls viele für Metallothionein ähnliche Proteine codierende DNA-Sequenzen und homologe Proteine entdeckt. Drei Hauptklassen von Metallothioneinen werden dabei unterschieden: MT-I mit einer hohen Homologie zu Säugetier-Metallothioneinen; MT-II haben ähnlich wie MT-I viele Cysteine, aber ihre Verteilung ist nicht homolog dazu; MT-III ist dann eine der vielen Bezeichnungen für die oben genannten Phytochelatine (Robinson, 1993; Cobbett, 2002). Beispiele dazu sind Weizen Ec-MT-II-Protein (Kawashima, 1992), MT-I/II in Arabidopsis (Murphy, 1997) und in Vicia faba (Foley, 1997), MT-I in Festuca rubra (Ma, 2002) und viele Weitere. Seither wurden mindestens 58 entsprechende Gene in höheren Pflanzen beschrieben (Rauser, 1999).

Welche Funktionen Metallothioneine in Pflanzen haben (MT-I und II), ist nach wie vor unklar. Die geringe Menge der Metallothioneine, die gereinigt werden konnten (0,0001 bis 0,0007 % des Gesamtproteins; Murphy, 1997) lässt jedoch vermuten, dass der Anteil der MTs an der Schwermetall-Entgiftung und -Homöostase in Pflanzen eher eine geringere Rolle als die PCs spielt. Weitere Beispiele zu Elementspezies in verschiedenen Lebensbereichen zeigt die Abbildung 1-2.

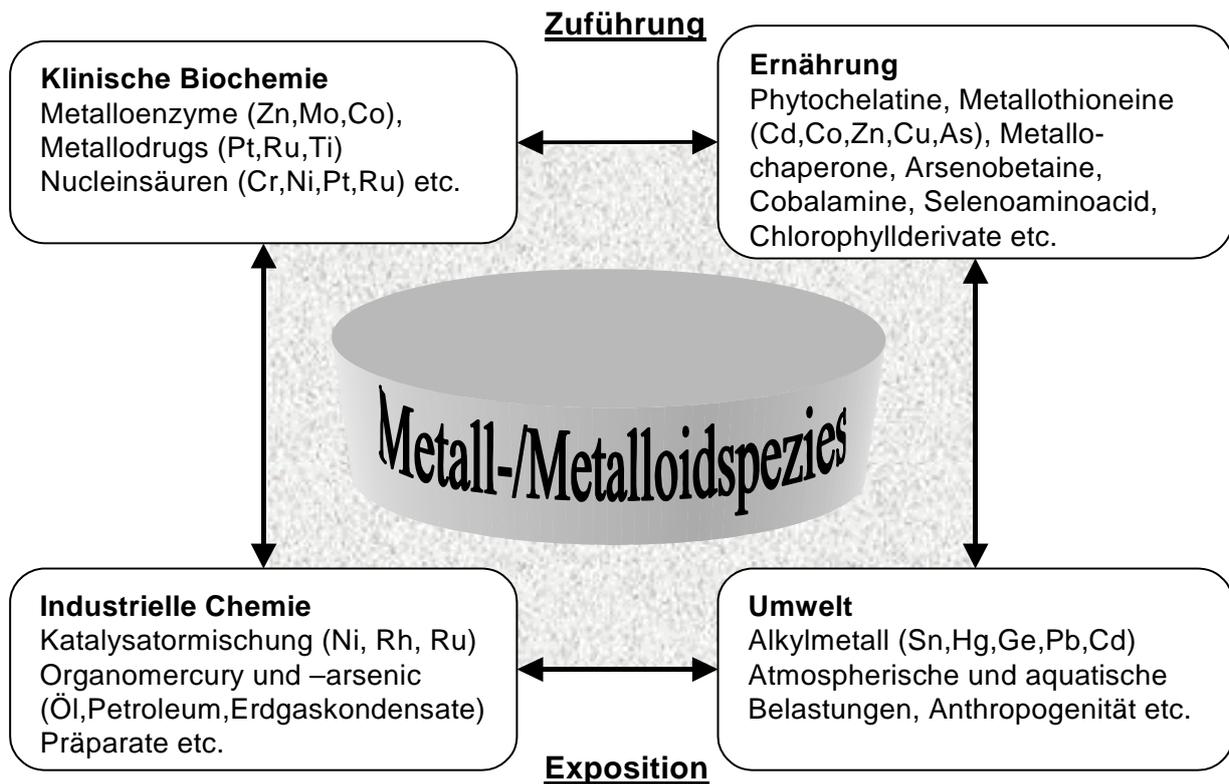


Abbildung 1-2 Bedeutung von Elementspezies in verschiedenen Lebensbereichen

Speziation in der „Postgenomic Ära“

Metalle stehen mit den Makrobestandteilen der Zelle in verschiedenen Wechselbeziehungen (z.B. als Aktivzentrum in den Enzymen, Strukturträger der Polypeptide und Polysaccharide, Signalträger bei zellulären Reaktionen, Spezies mit katalytischer Funktion sowie als Protein-Inhibitoren, etc). Um die durch diesen Entwicklungstrend gewonnene Datenflut zu verwalten, wurde parallel dazu eine große Anzahl an bioinformatischen Webservern und Biodatenbanken on-line in Betrieb genommen, die nun ständig aktualisiert werden. Der Wissenschaft stehen also stets verbesserte Werkzeuge zur Verfügung, um mit den stetig wachsenden Protein- und Gendatenbanken einfacher, übersichtlicher und effektiver arbeiten zu können (s. Kapitel 1.2).

Erstaunlich ist, dass nur sehr wenige von all diesen Ressourcen speziell der Untersuchung über die Interaktionen zwischen den Metallen und Proteinen gewidmet werden (Degtyarenko, 2000). Eine der wenigen Datenbanken, die sich mit dieser Problematik beschäftigt, ist „PROMISE“, die die strukturellen und funktionellen Informationen von Metalloproteinen erfasst und die Metalleigenschaften selbst dabei besonders gewichtet. Die Proteine werden auf Basis der gebundenen Metall-Cofaktoren kategorisiert. Unglücklicherweise wurde der Service für diese Seite aufgegeben, so dass die Datenbank seit 2002 nicht mehr aktualisiert wurde

(Bertini, 2003). Eine zweite relevante Datenbank ist die „Metalloprotein Database and Browser“ (MDB), die von „The Scripps Research Institute“ (TSRI) on-line angeboten wird (Castagnetto, 2002). Die Datenbank liefert quantitative Informationen über geometrische Parameter von metallbindenden Stellen in Proteinstrukturen, die aus der „Protein Data Bank“ (PDB) erhältlich sind. Weitere Internetadressen der Datenbanken sind in Kapitel 6 – Anhang zu entnehmen.

Die Datenbanken liefern bereits die größte Menge an Informationen über metallbindende Proteine sowie Sequenzanalogue bzw. –übereinstimmungen, die im Internet zugänglich sind. Spezifisch validierte computergestützte Applikationen für die Suche nach metallbindenden Sequenzen in den Gendatenbanken sind gegenwärtig noch sehr lückenhaft. Aber deren Entwicklung wird ausschlaggebend sein, um die Erfolge bei Genomprojekten nutzbringend für die bioanorganische Chemie einsetzen zu können. Die Biodatenbanken erlauben es den Wissenschaftlern, nicht nur bisher unbekannte Metalloproteine im Rahmen von experimentellen Studien zu identifizieren, sondern ermöglichen auch die Entwicklung weiterreichender Anwendungen mit Hilfe anderer effektiver Methoden, wie z.B. dem ‚molecular modelling‘.

Die Modellierung auf molekularer Ebene erweist sich als extrem leistungsstarke Applikation, um aus der Struktur eines Moleküls mögliche Funktionen einer bestimmten Spezies herleiten zu können (Vgl. Abbildung 1-3). Dies trifft auch im Fall der Metalloproteine zu (Martini-Renom, 2000; Bertini, 2002 und 2003).

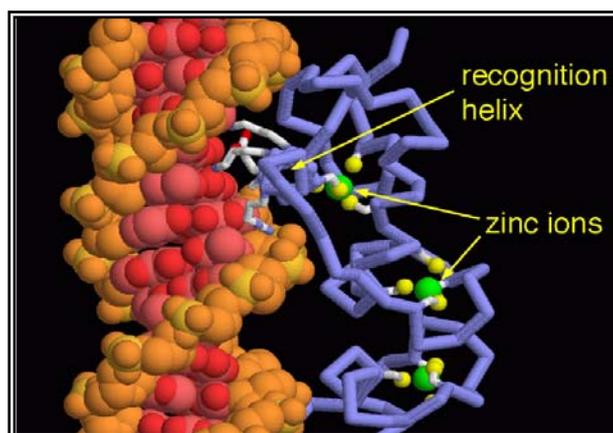


Abbildung 1-3 Die DNS-Bindungsstelle des Östrogenrezeptors.

Eintrag in PDB als „1hcq“: Jedes Zink-Ion (grün) ist umgeben von vier Cystein-Aminosäuren (gelb) und verleiht dem Rezeptor eine starre und feste Struktur.

1.2 Gegenwärtiger Stand der Element-Speziation

Bis zum Ende des 20. Jahrhunderts war die Speziesanalytik eine der sich am schnellsten entwickelnden Disziplinen der analytischen Chemie (Zoorob, 1998). Vom wissenschaftlichen Standpunkt aus gesehen, können die Aktivitäten auf dem Gebiet der Speziesanalytik in drei Arbeitsbereiche unterteilt werden (Lobinski, 1999):

- Die Entwicklung und Erprobung neuer analytischer Techniken, um die einzelnen Spezies in einer Probe zu untersuchen.
- Die Identifikation und Aufklärung unbekannter Spezies in meist biologischen Materialien eines lebenden Organismus.
- Die Anwendung von gewonnenen Erkenntnissen zum besseren Verständnis von Transformationsmechanismen der Spurenelemente in biologischen Systemen.

Die wesentlichen Herausforderungen der analytischen Arbeiten mit komplexen Spezies bzw. Spezies größerer molekularer Strukturen sind in diesem Zusammenhang unter anderem:

- Die Labilität der Spezies, dass der untersuchte Analyt ein Artefakt ist.
- Die sehr geringen Konzentrationen der Elemente, die die Nutzung extrem empfindlicher Detektoren erfordern (z.B. teilweise bis 1 ng/L).
- Die Matrixprobleme, d.h. die verschiedensten komplexen Matrices erschweren die Bestimmung der sehr niedrigen Spezieskonzentrationen in den Proben ohne vorherige Matrixabtrennung (Sanz-Medel, 1998).

Nicht invasive Verfahren

Um die oben genannten Probleme zu lösen, sind verschiedene Methoden entwickelt worden. Grundsätzlich kann man zwischen nicht invasiven und invasiven Verfahren unterscheiden. Bei nicht invasiven Verfahren - oder „direkter“ Speziation - erfolgen keine chemischen Eingriffe in das System. Somit stellt diese Methode durch die *'in situ'* – Bestimmung der Spezies in den gegebenen Matrices prinzipiell ein ideales Verfahren der Speziation dar (Sanz-Medel, 1998). Es ist jedoch nur in speziellen Fällen anwendbar und besitzt oft keine ausreichenden Nachweisgrenzen. Die Technik findet Anwendung bei einigen speziellen spektroskopischen Verfahren oder bei elektroanalytischen Prozessen (Mota, 1996), z.B. bei der Bestimmung von Al^{3+} und F^- in Teeaufgüssen durch NMR-Spektroskopie, oder von Ca^{2+} und Mg^{2+} im Serum (Wang, 1988). Ein weiteres Beispiel für nicht invasive Verfahren ist der moderne optische Biosensor basierend auf UV-VIS-Spektroskopie mit speziellem Faseroptik-Sensor für die Untersuchung von Kaliumspezies im Serum (Diazgarcia, 1994). Doch

funktionieren diese Methoden überwiegend nur in Modelllösungen, während sie beim Einsatz in realen biologischen Proben noch sehr viele Probleme mit sich bringen (Sanz-Medel, 1998).

Invasive Verfahren

Bei den invasiven Verfahren besteht durch chemische Eingriffe wie Vorbehandlung, Reagenzienzusatz und/oder Trennungsgänge grundsätzlich die Gefahr einer Veränderung der Speziesgleichgewichte. Sie sind meistens universell anwendbar und sehr nachweisstark, so dass sie z. B. bei der Element-Speziation in realen Lebensmittelproben Anwendung finden. Die meisten Entwicklungen der letzten Jahre konzentrieren sich auf Verfahren zur Abtrennung der zu untersuchenden Spezies von störenden Matrixbestandteilen. Zahlreiche Möglichkeiten wurden getestet, um angemessene Trenntechniken mit Hochleistungsdetektoren zu koppeln.

Der erste Schritt in der Probenvorbereitung ist oft ein invasives Verfahren, wobei die festen Lebensmittelproben einem Zellaufschluss unterworfen werden („Initialschritt der Elementspeziesanalytik“). Danach erfolgt die Abtrennung der unlöslichen Bestandteile. Zur Isolierung und Aufreinigung der löslichen Inhaltstoffe werden chromatographische und/oder elektrophoretische Methoden eingesetzt (s. Abbildung 1-4).

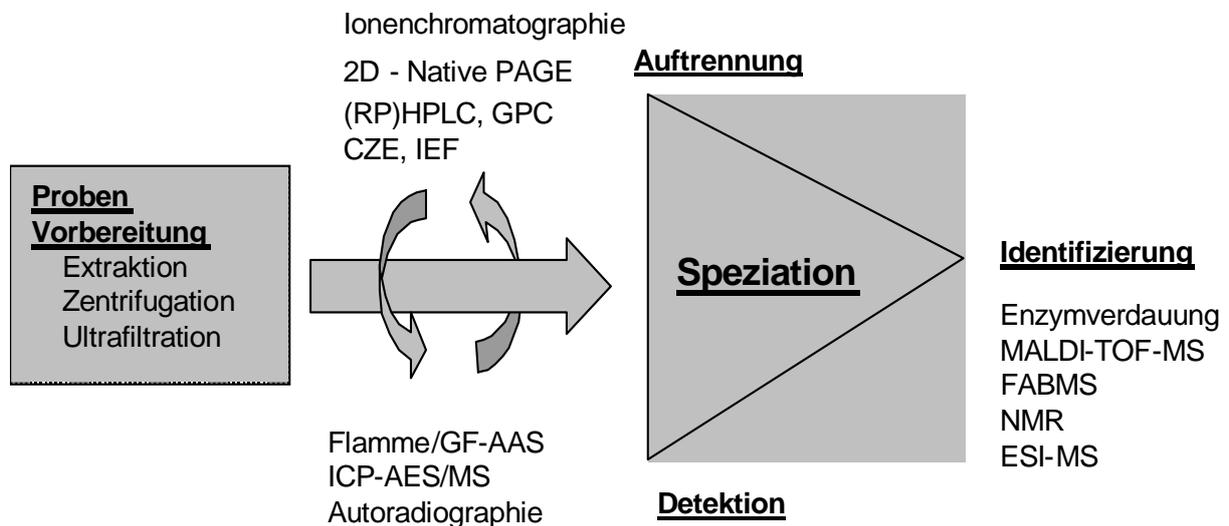


Abbildung 1-4 Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Speziesanalytik

In den resultierenden Fraktionen, Extrakten oder Spots können die Elementkonzentrationen durch Ein- oder Multielementdetektionsverfahren off-line oder on-line bestimmt werden. Gekoppelt an die Auftrennungsverfahren werden z.B. Flammen-AAS, Graphitrohrfen-AAS (GF-AAS), Hydrid-AAS, Mikrowelleninduziertes-Plasma-AES (MIP-AES) oder ICP-AES/MS zur Elementdetektion in den Proben herangezogen. Als praktisches Beispiel wurde eine an die GC gekoppelte MIP-AES für flüchtige Spezies konzipiert. Ebenso wurde die Hydrid-AAS mit der HPLC für die Arsen- und Quecksilberanalytik kombiniert (Das, 1996). Die weitgehend isolierten Analyten lassen sich letztendlich auf verschiedene Weisen charakterisieren. Während sich die niedermolekularen Spezies oft direkt untersuchen lassen - zum Teil mit Hilfe von Vergleichsstandard - bietet sich bei den hochmolekularen Spezies eine enzymatische bzw. massenspektrometrische Fragmentierung zu ihrer Identifizierung an.

Auftrennung

Für die analytisch-chemische Speziation sind die Kopplungen von Flüssigchromatographie mit Atomspektroskopie bzw. Massenspektrometrie gegenwärtig die vielversprechendsten Methoden, weil die meisten Spezies in biologischen Proben geladen, polar und nicht flüchtig sind, so dass sie eher für eine Trennung mittels LC anstatt mittels GC geeignet sind (Hill, 1993). Die Anwendungsmöglichkeiten verschiedener Separationstechniken sind in Tabelle 1-1 zusammengestellt, wobei die kursiv dargestellten Methoden in der vorliegenden Studie verwendet wurden.

Tabelle 1-1 Allgemein eingesetzte Auftrennungstechniken in der Speziesanalytik (Sanz-Medel, 1998).

Nicht-chromatographische Methoden		
Methode	Prinzip	Illustrative Beispiele
Extraktion	Löslichkeit	Proteinextraktion in biologischem Puffer
Zentrifugation	Partikeldichte	Fraktionierte Zentrifugation von Zellorganellen
Membranfiltration	Partikelgröße	Filtration von Pflanzenexudaten (0,45µm Poren)
Ultrafiltration	Molekülgröße	<i>Cut-off</i> Proteintrennung (Millipore)
Elektrophorese	Elektrische Mobilität	<i>CZE, PAGE, IPG, 2D-SDS</i> in der Proteinanalytik
Dialyse	Molekülgröße	Klinische Untersuchungen in Blut, Urin, usw.

Forts. Tab.1-1

Chromatographische Methoden

(GC) Gas-Chromatographie	Polarität	Flüchtige Organometallspezies wie Methyl-Hg
(LC) Flüssig-Chromatographie	Polarität, Molekülgröße, Ionenaffinität, Adsorption etc.	(RP)HPLC, GPC/SEC, Ionenchromatographie etc.

Als Trennmethode bei der Element-Speziation – besonders bei instabilen und empfindlichen hochmolekularen Spezies – ist ein Einsatz der Gelpermeationschromatographie von großem Vorteil. Bei diesem Verfahren können pH-Wert und Ionenstärke des Eluenten in einem weiten Bereich gewählt werden. Außerdem sind die durch das Gelmaterial verursachten Wechselwirkungen mit den Inhaltstoffen der Probe sehr gering und nach einem chromatographischen Lauf ist sofort eine ungefähre Angabe der Molekulargewichte der eluierten Spezies möglich. Die native kontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) liefert ebenfalls eine schonende Trennung nach dem isoelektrischen Punkt der einzelnen Proteine in einer Probe. Sie ist daher als zweiter Reinigungsschritt für die Isolierung von Metalloproteinen aus komplexen Gemischen gut geeignet.

Eine weitere Technik unter den elektrophoretischen Methoden – die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE) – gilt als sehr leistungsstark und wird in der Protein-Analytik („Proteomics“) sehr häufig eingesetzt. Sie trennt in der ersten Dimension nach dem isoelektrischen Punkt einer Substanz und in der zweiten nach deren Molekülgröße. Die Methode vermag im Gegensatz zu den o.g. Trennverfahren über tausend Proteinspots in einem Einzellauf zu trennen. Allerdings kann man die 2D-PAGE bedingt durch ihre denaturierenden Eigenschaften (Einsatz von SDS-Detergens) nicht unbegrenzt zur Untersuchung aller Proteine einsetzen. Ein weiterer Vorteil der Methode ist jedoch, dass über die Ergebnisse im Rahmen des so genannten „proteomic mapping“ bereits zahlreiche on-line-Datenbanken im Internet konzipiert sind, die kontinuierlich vervollständigt werden.

Methoden zur Elementdetektion

Zur Elementdetektion bei den Kopplungstechniken hat sich die ICP-MS in den letzten Jahren etabliert. Wegen der niedrigen Detektionsgrenzen (wenige ng/L für bestimmte Elemente), der Möglichkeit zur Multielementbestimmung sowie der Isotopenverdünnungsanalyse und der Erweiterbarkeit des Systems mit peripheren Geräten, wie z.B. der Reaktionszelle, dem Sektorfelddetektor, dem Multikollektor, der hoch auflösenden Massenspektrometrie (HR-

ICP-MS) etc. ist sie für eine Multielement-Speziation in pflanzlichen Lebensmitteln besonders gut geeignet. Während die HPLC-ICP-MS-Kopplung eine Standardmethode geworden ist, wird die Kopplung von ICP-MS mit vorausgehender Kapillarelektrophorese gegenwärtig intensiv erforscht und optimiert, um äußerst geringe Probenmengen (wenige pL) auf deren Konzentrationen an diversen Spezies in ausgewählten Matrices untersuchen zu können (Barnes, 1998; Michalke, 1998).

In der vorliegenden Arbeit stand die Optimierung eines Analysenverfahrens durch off-line-Kopplungstechnik im Vordergrund. Zur Multielementbestimmung erfolgte die Kopplung der Quadrupol-ICP-MS off-line an die Gelpermeationschromatographie. Da die Graphitrohrföfen-AAS im Vergleich zu ICP-QMS einen sparsameren Probenverbrauch hat, wurde die GF-AAS ebenfalls zur Cadmiumdetektion herangezogen.

Tabelle 1-2 Techniken zur Elementdetektion in der Speziesanalytik (Sturgeon, 2000)

Prinzip	Techniken
Optische Absorption	Flammen- , <i>ET-AAS</i> , Hydrid/Kaltdampftechnik
Optische Emission	ICP-AES, MIP-AES
Massenspektrometrie	<i>ICP-MS</i> (- <i>QMS</i> , - <i>HRMS</i> , <i>SIMS</i> etc.)
Röntgenspektroskopie	TRXRF, PIXE, EXAFS

Methoden zur Identifizierung der Spezies

Während die NMR-Technik häufig zur Überprüfung von bekannten Analyten bei verschiedenen Präparatherstellungen eingesetzt wird, werden die massenspektrometrischen Methoden zunehmend in der Speziesanalytik herangezogen, um unbekannte Moleküle zu charakterisieren und zahlreiche Analyten über ihre ermittelten Fragmente zu identifizieren. Die Möglichkeit der Fragmentierung bei den massenspektrometrischen Methoden wird dabei vielfältig entwickelt und genutzt. Viele neue Techniken wurden optimiert und möglichst spezifisch eingesetzt, wie z.B. PSD (Post Source Decay) oder CAF (Chemical Assisted Fragmentation) bei der MALDI-TOF-MS, spezifische MS-Detektion und -sequenzierung von phosphorylierten Peptiden, „Glycoproteomics“, usw.

Als elegante Variante zur massenspektrometrischen Fragmentierung bei der Identifizierung der Spezies bietet sich ein Enzymverdau im Anschluss an die denaturierende 2D-PAGE als weiterer Analyseschritt an. Spezifische „Enzymscheren“ (Trypsin, Endoproteinasen, V8, CNBr etc.) spalten die isolierten Proteine an definierten Aminosäureabschnitten, wobei spezifische Fingerprints typischer Massenfragmente entstehen, die eine Identifizierung der Analyten mit hoher Genauigkeit ermöglichen.

Tabelle 1-3 Techniken zur Speziesidentifizierung.

Techniken	Spezifikationen
MALDI-TOF-MS	Off-line, schonend für labile und nicht flüchtige hochmolekulare Analyten
ESI-MS	Leistungsstark, da häufig eine Kopplung mit LC erfolgt
FAB-MS	Sehr präzise
FT-ICR	Sehr genaue Massenbestimmung möglich
NMR	Nicht invasive Methode, doch weniger nachweisstark

Weitere Informationen zu Internetdatenbanken über „Proteomics“ können unter mehreren Internetadressen sehr ausführlich erhalten werden. Sie beinhalten verschiedene Datenbanken wie DNA- und Proteinsequenzen, 3D-Strukturen, verschiedene Expressionsumrechnungen, Nomenklaturen, „Mapping“ der 2D-PAGE, computergenerierte Modellproteine etc. Folgende Adressen erwiesen sich bei solchen Arbeiten als sehr hilfreich:

ProteoMetrics, LLC : <http://prowl.rockefeller.edu/>
 NCBI (National Center for Biotechnology Information) : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
 ExPASy Molecular Biology Server : <http://us.expasy.org/>
 EMBL (European Molecular Biology Laboratory) : <http://www.embl-heidelberg.de>
 UCSF Mass Spectrometry Facility : <http://prospector.ucsf.edu/>

Die Seiten bieten leistungsstarke Suchalgorithmen zur Identifizierung der Peptide/Proteine, oder um deren Analoge und Homologe in bekannten Sequenzen innerhalb von Vernetzungen zahlreicher Datenbanken zu finden und zu vergleichen. (s. <http://srs.embl-heidelberg.de:8000/srs5bin/cgi-bin/wgetz?-fun+pageliblist+-color+yellowWeave>). Hat man erst die Information über die Proteine, kann man die Translation zur DNA berechnen lassen oder umgekehrt.

Die Notwendigkeit der Multielement-Speziation

Die Verfügbarkeit von Metallen in Pflanzen wird außer von den Bindungsformen auch von der Anwesenheit weiterer Metalle stark beeinflusst. Deshalb sind zur umfassenden ernährungsphysiologischen Beurteilung eines Metalls in einer bestimmten Lebensmittelmatrix - neben einer Bestimmung der Bindungsform des betreffenden Metalls - auch Informationen über Gehalte und Bindungszustände anderer Metalle notwendig. Diese komplexen Zusammenhänge erfordern eine Multielement-Speziation, die besonders bei Lebensmitteln äußerst wichtig sind.

Als Beispiel sind in Abbildung 1-5 mögliche Wechselwirkungen zwischen den Elementen, die ihre Aufnahme gegenseitig beeinflussen, dargestellt. Danach wird z.B. die Zinkaufnahme direkt durch Cadmium, Calcium, Arsen, Chrom, Nickel, Mangan, Kobalt, Eisen, Blei und Kupfer beeinflusst. Aufgrund dieser Zusammenhänge ist die Multielement-Speziesanalytik in Lebensmitteln ein äußerst wichtiger Teil der lebensmittelchemischen und -analytischen Forschung.

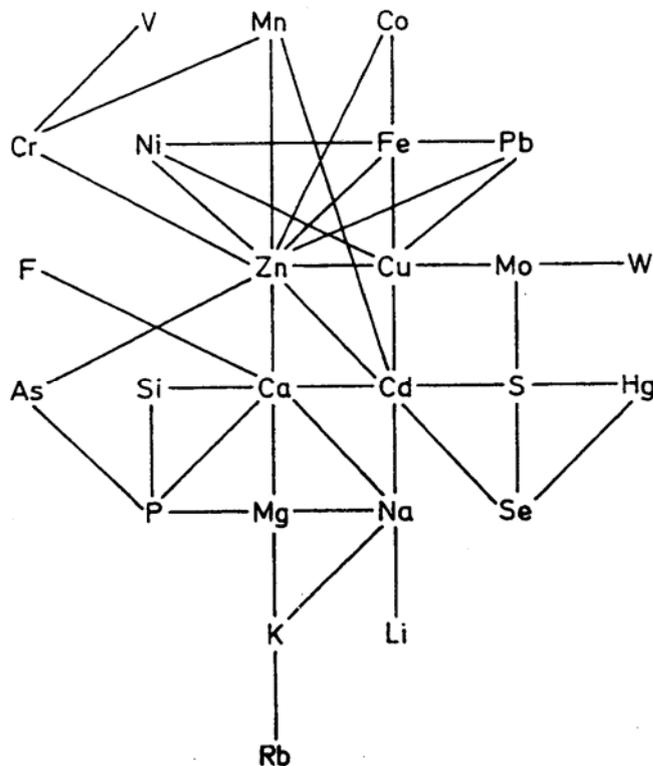


Abbildung 1-5 Mögliche Wechselwirkung zwischen essentiellen und toxischen Elementen, die ihre Aufnahme aus der Nahrung beeinflussen.

(Durch Linien verbundene Elemente beeinflussen sich gegenseitig; Pfannhauser, 1988).

Die Verwendung von Modellpflanzen in der Speziationsanalytik

Ende des Jahres 2000 wurde in der weiten Öffentlichkeit über die erste Pflanze berichtet, deren Genom vollständig aufgeklärt worden war. Es handelte sich dabei um den kleinen Kreuzblütler *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand), der als unscheinbares Wildkraut weit verbreitet ist. In erster Linie sind zwar die Erbanlagen wichtiger Kulturpflanzen wie Reis, Mais, Weizen, Kartoffeln oder andere Gewächse besonders interessant, man versprach sich aber von dem Ackerschmalwand, deren Genom so klein ist wie kein anderes bekanntes Erbgut von Pflanzen (125Mb), vergleichsweise einfachere Einblicke in die elementare Steuerung pflanzlicher Metabolismen gewinnen zu können.



Abbildung 1-6 Die Pflanze *Arabidopsis thaliana* (Wildart Columbia)

Da im Rahmen der Speziesanalytik meist unbekannte Bindungsformen analysiert werden und außer bei zwei höheren Pflanzen (*Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa*, Ende 2001) bei vielen untersuchten Organismen die Gensequenzen gegenwärtig noch nicht vollständig entschlüsselt sind, wurde in verschiedenen Arbeiten häufig die Pflanze *Arabidopsis thaliana* als Modellpflanze herangezogen (Abbildung 1-6). Sie ist klein, bietet eine einfache Handhabung in der Züchtung und hat einen kurzen Generationszyklus (Zeit von der Aussaat bis zur Ernte beträgt ca. 6 Wochen). Das Genom ist vergleichsweise sehr klein und besteht nur aus 5 Chromosomen. Handelte es sich bei den in dieser Arbeit analysierten Metallbindungsformen in den Pflanzenproben um Proteine, können dann bei Übereinstimmung des Bindungsverhaltens mit der Modellpflanze die modernen Proteomic Methoden als erster Untersuchungsansatz herangezogen werden, um die Spezies über ihre bereits registrierten Proteine zu identifizieren.

1.3 Biologische Bedeutung von verschiedenen Elementen

Klassifikation von Elementen

Ausgehend von ihrem Vorkommen in der oberen Erdkruste können die Elemente in zwei Gruppen aufgeteilt werden: die relativ häufigen Mengenelemente (H, C, N, O, F, Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Fe) und die Spurenelemente (Li, B, Be sowie alle anderen Elemente im Periodensystem). Von den Elementen mit einem hohen Vorkommen weisen die salzbildenden, leichteren Elemente nur eine geringe oder gar keine katalytische Aktivität auf (Na, Mg, K, Ca), während Fe als redoxaktives Metall sowie die Nichtmetallelemente (H, C, N, O, F, Si, P, S, Cl) kinetisch stabile organische Moleküle bilden können (Silva, 2001).

Im chemischen Sprachgebrauch hat sich, basierend auf ihren Konzentrationen in biologischen Proben, der Begriff ‚Spurenelement‘ für Konzentrationen von $<100\mu\text{g/g}$ ($<0,01\%$) eingebürgert. Dagegen findet der Begriff ‚Ultraspurenelement‘ mit einem Konzentrationsbereich von $<0,01\mu\text{g/g}$ noch keine allgemeine Akzeptanz (Krachler, 1997). In der Ernährungswissenschaft wird allerdings für die Begriffe ein anderes Verständnis abgeleitet, wodurch deren Aufnahme bzw. Mindestbedarf pro Tag und/oder Körpergewicht mit Hilfe von Labortests geschätzt werden (z.B. der aktuelle Bedarf an Mangan liegt etwa bei 1mg/Tag für einen Erwachsenen (Vgl. Tabelle 1-4, Nielsen, 1998)).

Eine andere Klassifizierung der Elemente erfolgt nach deren Essentialität. Ein Element wird als essentiell für den Organismus und für die Aufrechterhaltung seiner Gesundheit angesehen, wenn sich in Diätuntersuchungen mit einer Mangelversorgung für ein bestimmtes Element ein messbares Defizit in Wachstum und Vitalität von Mensch, Tier oder Pflanze beobachten lässt (WHO, 1973). Essentiell für die Menschen sind z.B. 9 Nichtmetall-Elemente H, C, N, O, F, S, P, S, Cl, aus denen der erwachsene menschliche Körper bis zu 98% besteht, und die Metallelemente Na, K, Mg, Ca, Fe (bis zu 1,98% des Körpers) (Kiefer, 1991). Für die anderen Spurenelemente wurden bis 1984 zu u.a. Cr, Mo und Se weitere 15 Elemente mit essentiellen Charakter vorgeschlagen (s. Tabelle 1-4; Nielsen, 1998). Die Gruppe nicht essentieller bzw. toxischer Elemente beinhaltet alle anderen Spurenelemente (Tl, Hg, U usw.), für die bisher kein Nachweis von essentiellen Wirkungen erbracht wurde (keine Defiziterscheinung bei Diätuntersuchungen, lediglich Schädigung/Störung bei Verabreichung kleinster Mengen). Jedoch kann die Liste der essentiellen Elemente nie als endgültig angesehen werden.

Das Verständnis für die Elementaufnahme mittels selektiver Transportmechanismen in biologischen Systemen führt zur Klassifizierung nach Koordinationskomplexen von Elementen (Nieboer-Richardson, 1980; Silva, 2001). Die Metalle sind in Klasse A

Tabelle 1-4 Einige essentielle Eigenschaften der Spurenelemente (Nielsen, 1998)

	Nachweis für die Essentialität	Aufnahme ohne Mangelsymptome (/kg KG*)	Tagesaufnahme (Absolutmenge, 24h)	Mögliche biologische Rolle
Al	Mäßig; Mangelsymptome für 2 Spezies werden berichtet	160 µg/kg (Ziege)	2-10 mg	Enzymaktivator
As	Stark; Mangelsymptome für mehrere Spezies werden berichtet; es existieren Enzyme für Arsenmetabolisierung; epidemiologische Studien weisen auf nützliche oder essentielle Wirkungen im Menschen hin	<25 µg/kg (Huhn) <35 µg/kg (Ziege) <30 µg/kg (Ratte)	2-60 µg	Methioninmetabolismus, involviert in labilem Methylmetabolismus; Regulation der Genexpression
B	Stark; Mangelsymptome für mehrere Spezies werden berichtet inklusive Mensch; essentiell für Pflanzen, beeinflusst Enzymaktionen in vitro	<0.3 mg/kg (Huhn) 0.25-0.35 mg /Tag (Mensch) <0.3 mg/kg (Ratte)	0.5-3.5 mg	Zellmembranfunktion oder -stabilität, Beeinflussung von Hormonsignal und Transmembranbewegung von Kationen und Anionen
Br	Begrenzt; nichtspezifische Mangelsymptome für 1 Spezies werden berichtet; evtl Ersatz für Essentiellelemente	0.8 mg/kg (Ziege)	2-8 mg	Elektrolytgleichgewicht
Cd	Begrenzt; Wachstumsunterdrückung als Hauptmangelsymptome werden berichtet	<5 µg/kg (Ziege) <4 µg/kg (Ratte)	10-20 µg	Involviert in Metallothioneinmetabolismus
Cr	Stark; Mangelsymptome für mehrere Spezies berichtet inklusive Mensch; epidemiologische und ergänzende Studien zeigen nützliche oder essentielle Funktionen	<20 µg/Tag (Mensch) <100 µg/kg (Ratte)	25-50 µg	Involviert bei der Verstärkung der Insulinwirkung im Glukosemetabolismus
Ge	Begrenzt; Mangelsymptome werden nur für 1 Spezies berichtet, hat einige nützliche pharmakologische Wirkung	0.7 mg/kg (Ratte)	0.4-3.4 mg	Rolle bei dem Immunsystem

*KG : Körpergewicht

(Fortsetzung Tabelle 1-4 Essentielle Eigenschaften der Spurenelemente)

	Nachweis für Essentialität	Aufnahme	Tages- aufnahme	Mögliche biologische Rolle
F	Begrenzt; Wachstumsunterdrückung als Hauptmangelsymptom wird berichtet	<0.3 mg/kg (Ziege) <0.45mg/kg (Ratte)	0.3-0.6 mg	Rolle in biologischer Mineralisation
Pb	Mäßig, aber kontroverse Diskussionen; Mangelsymptome für 2 Spezies werden berichtet	<32 µg/kg (Schwein) <45 µg/kg (Ratte)	15-100 µg	Rolle in Eisenabsorption und/oder -ausnutzung
Li	Mäßig; Mangelsymptome für 2 Spezies werden berichtet; epidemiologischer Beweis von nützlichen, essentiellen Funktionen	<1.5 mg/kg (Ziege) <15 µg/kg (Ratte)	200-600 µg	Regulation von einigen Funktionen des Endokrinsystems
Ni	Stark; Mangelsymptome für mehrere Spezies werden berichtet; funktionelle Rolle (hauptsächlich essentielle Komponente von spezifischen Enzymen) existiert für Nickel in niederen Lebensformen; aktiviert zahlreiche Enzyme in vitro	<100 µg/kg (Ziege) <20 µg/kg (Ratte)	70-260 µg	Cofaktor oder strukturelle Komponente in spezifischen Metalloenzymen; Rolle im Folsäuremetabolismus
Rb	Begrenzt; nichtspezifische Mangelsymptome nur für 1 Spezies werden berichtet	180 µg/kg (Ziege)	1-5 mg	Rolle ähnlich wie Kalium; neurophysiologische Funktion
Si	Stark; Mangelsymptome für 2 Spezies werden berichtet; funktionelle Rolle existiert in niederen Lebensformen; nützliche Wirkung bei hoher Aufnahme unter bestimmten Konditionen	<2.0 mg/kg (Huhn) <4.5 mg/kg (Ratte)	20-50 mg	Strukturelle Rolle in einigen Mucopolysaccharide/Kollagen; Rolle in der Initiation von Verkalkung und in Kollagenbildung
Sn	Begrenzt; nichtspezifische Mangelsymptome nur für 1 Spezies bekannt	<20 µg/kg (Ratte)	1-40 mg	Rolle in einigen Redoxreaktionen
V	Stark; Mangelsymptome für mind. 3 Spezies berichtet; funktionelle Rolle (essentiell für Enzymaktivität) in niederen Lebensformen	<10 µg/kg (Ziege) <2 µg/kg (Ratte)	10-30 µg	Niedere Lebensformen enthalten Haloperoxidase, die Vanadium benötigt für Aktivität; ähnliche Rolle könnte in höheren Lebensformen existieren

(sauerstoffbindend, „hard“), Klasse B (stickstoff-/schwefelbindend, „soft“) und ‚Borderline‘ (‚intermediate‘) eingeteilt. Die Metalle der Klasse A, wie Ca und Mg, besitzen eine harte Elektronenschale, während die ‚Borderline‘-Metalle, z.B. Zn, Cu, Fe oft in biologischen Systemen als Katalysator fungieren. In der Klasse B-Metalle mit einer weichen Elektronenschale sind die meisten toxischen Elemente zu finden. Die Zunahme der Toxizität in Klasse B kann durch die Steigerung der Affinität von Metallen in Bezug auf Amino-, Imino-, und Sulfhydrylgruppen in organischen Molekülen erklärt werden. Diese Gruppen bilden in den meisten Fällen das aktive Zentrum von zahlreichen Enzymen. Eine graphische Darstellung von z/r (Ladung/Radius) gegen I_2 (Ionisierungsenergie der doppelt geladenen Ionen) zeigt eine Unterteilung der Metalle entsprechend der genannten Klassifizierung (Abbildung 1-7; Silva, 2001).

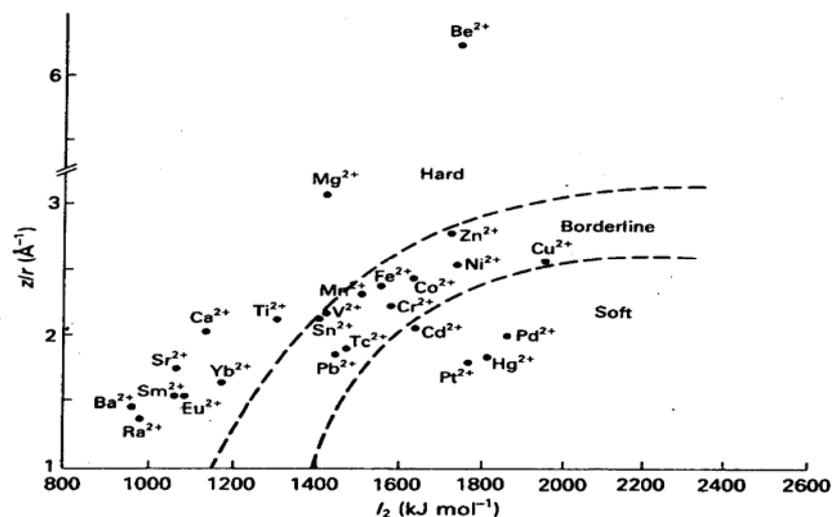


Abbildung 1-7 Das Verhältnis von Ladung zu Radius (z/r) in Abhängigkeit von der Ionisationsenergie (I_2) der doppelt geladenen Ionen (M zu M^{2+}) für einige Elemente.

Biochemische Rolle von verschiedenen Elementen

Biologische Flüssigkeiten enthalten neben der Hauptkomponente Wasser Elektrolyte (Na, Mg, K, Ca, etc.), Proteine, Enzyme und andere Verbindungen. Na^+ und K^+ sind im Allgemeinen die Kationen der Wahl, wenn es um den Transport von elektrischen Ladungen in biologischen Systemen geht, weil sie in ausreichendem Maße verfügbar sind und sich kaum an organische Moleküle binden. Ca und Mg erfüllen andere Funktionen, z.B. als Elemente der Wahl für biochemischen Schalter und Auslöser, weil sie sich mit entsprechend hoher Stärke an organische Moleküle binden, wobei sie keine Veränderung ihres chemischen Zustands erleiden. Die schwereren Elemente (außer Fe) können wegen ihres viel geringeren Vorkommens in Organismen nur als Spurenkomponenten interagieren. Gebunden an Proteine

sind sie dann in der Lage, katalytische Funktionen in den Enzymen zu übernehmen, Reaktionen zu beschleunigen oder wichtige Funktionen zu blockieren (Silva, 2001).

Natürliche Selektion über einen langen Zeitraum führte zu einer optimalen Ausnutzung der verfügbaren Metalle. Die Regulationsmechanismen zur Aufrechterhaltung der Homöostasis in biologischen Systemen bewirken, dass geringfügige Konzentrationsänderungen im Rahmen der physiologischen Grenzen durch Eintrag von anthropogenen Metallverbindungen in kurzen sowie in längeren zeitlichen Perioden reguliert werden. Aber eine plötzlich auftretende signifikante Konzentrationsänderung und deren Wirkungen im Organismus - ausgehend von anhaltend chronischer Aufnahme der Metalle in Überdosis – kann trotz Adaptionsvermögen nicht abgewehrt werden und führt meistens zu einer nachhaltigen Störung von biochemischen Prozessen.

Die Tabelle 1-4 zeigt beispielsweise die gewonnenen Teilerkenntnisse über die essentiellen Spurenelemente, welche putative biochemische Rolle sie spielen und in welcher Tagesaufnahme sie für die Menschen von Bedeutung sein könnten (Nielsen, 1998). Die Tabelle 1-5 zeigt anschließend einige beobachtete Wirkungen bei einem signifikanten Aufnahmeüberschuss von bestimmten als toxisch geltenden Elementen. Denn nicht nur solche Metalle, die „fremd“ im System sind, können toxische Wirkungen haben, sondern auch solche, die essentiell sind, wenn sie in zu hoher Konzentration vorliegen. Tabelle 1-6 zeigt im Gegensatz dazu die beobachtbaren Mangelsymptome bei Diätuntersuchungen durch einige Elemente, die im Mangel vorliegen.

Die letzten Entwicklungen der ernährungswissenschaftlichen und medizinisch-klinischen Forschungen zeigen jedoch, dass die absolute Toxizität bestimmter Elemente, nie als endgültig angesehen werden kann (Nielsen, 1998). So wurden nach und nach in die Liste der essentiellen Spurenelemente neue Elemente hinzugefügt, die vorher als ausschließlich giftig galten. Nicht außer Acht zu lassen ist dabei, dass die Qualität der experimentellen Nachweise zur Beurteilung der Essentialität in der Ernährung häufig in einem sehr breiten Spektrum variiert, so dass es oft eine gewisse Zeit dauert, bis die Essentialität eines Elements ihre Anerkennung findet.

Tabelle 1-5 Wirkung von Elementüberschüssen in Menschen und Tieren (Silva, 2001).

Element	Wirkung der überschüssigen Aufnahme	Beobachtung
Al	Enzephalopathien und Alzheimer Krankheit	Interaktion mit Phosphaten, Quervernetzung der Proteine
Hg	Schädigung des zentralen Nervensystems; neuropsychiatrische Fehlsteuerungen	Methyl-Hg-Verbindungen sind fettlöslich
Cd	Reduktion der effektiven Filtrationkapazität von Glomeruli (Renaltoxizität)	Blockiert Sulfhydrylgruppe in Enzymen und verdrängt Zn aus seinen Bindungsstellen; stimuliert Metallothioneinsynthese und interferiert in Cu^{2+} und Zn^{2+} Metabolismen
Pb	Bleivergiftung; Verletzung des peripheren Nervensystems; Störung der Hämsynthese und Beeinträchtigung der Nierenfunktionen	Pb^{2+} ersetzt Ca^{2+} mit Verlust der funktionellen (und strukturellen) Integrität, ersetzt Zn^{2+} in δ -Aminolaevalinsäuredehydratase, reagiert mit Sulfhydrylgruppe
Tl	Giftig für das Nervensystem, Transport in die Zelle durch K^+ -Kanäle	Tl^+ ist K^+ ähnlich, bindet aber stärker, inklusive an N- und S-Liganden

Tabelle 1-6 Klinische Mangelsymptome von Spurenelementen (Silva, 2001).

Element	Mangelsymptome
Co	Anämie, Anorexia, Wachstumsunterdrückung
Cr	Reduziert Glucosetoleranz, erhöht Serumfett, Hornhauttrübung
Cu	Funktionsstörung in der Pigmentierung, hemmt das Wachstum, Anämie bei Kindern Funktionsstörung in der Struktur der Arterienwand, Menkes-Wilson-Krankheit
Fe	Anämie, allgemeine Schwächung
I	Kropf, Kretinismus
Mn	Funktionsstörung bei der Spermatogenese, Knochenabnormalität, reduziert Serumcholesterol
Mo	Wachstumsunterdrückung, defekte Keratinierung
Se	Muskeldystrophie, Kardiomyopathie, kardiovaskuläre Krankheit
Zn	Appetitlosigkeit, beeinträchtigt Wundheilung, hemmt das Wachstum, Hypogonadismus, Skelettanomalität, Acrodermatitis Enteropathica, Unterdrückung der Immunantwort

1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Studie sollten an erster Stelle grundlegende, einheitliche und umfassende Untersuchungen zur Multielement-Speziation in einer handelsüblichen Lebensmittelgruppe durchgeführt werden. Für die Untersuchungen wurde dazu im Wesentlichen die Gruppe der frisch verzehrbaren Gemüsepflanzen ausgewählt, denn diese Lebensmittel besitzen aufgrund der Verzehrsmenge einen bedeutenden Anteil bei der Ernährung des Menschen. Bis auf wenige Ausnahmen sind aus dieser Gruppe von Lebensmitteln bisher nur vereinzelt Gemüseproben untersucht worden (s. Tabelle 2-1 – Kapitel 2.1.1 zur Pflanzenauswahl).

Untersucht werden sollen in dieser Studie folgende 42 Elemente:

1	Li (Lithium)	15	Cd (Cadmium)	29	Tb (Terbium)
2	Be (Beryllium)	16	Ba (Barium)	30	Dy (Dysprosium)
3	B (Bor)	17	Pb (Blei)	31	Ho (Holmium)
4	Mg (Magnesium)	18	Tl (Thalium)	32	Er (Erbium)
5	Al (Aluminium)	19	Bi (Bismuth)	33	Yb (Ytterbium)
6	Ca (Calcium)	20	U (Uran)	34	Tm (Thulium)
7	Mn (Mangan)	21	Y (Yttrium)	35	Lu (Lutetium)
8	Fe (Eisen)	22	La (Lanthan)	36	Sb (Antimon)
9	Co (Cobalt)	23	Ce (Cer)	37	Sn (Zinn)
10	Ni (Nickel)	24	Pr (Praseodym)	38	Mo (Molybdän)
11	Cu (Kupfer)	25	Nd (Neodym)	39	Ga (Gallium)
12	Zn (Zink)	26	Sm (Samarium)	40	Ru (Ruthenium)
13	Rb (Rubidium)	27	Eu (Europium)	41	Se (Selen)
14	Sr (Strontium)	28	Gd (Gadolinium)	42	Rh (Rhodium)

Weitere Elemente, die im Multielementstandard für die ICP-MS-Messung auch enthalten sind, finden aufgrund von massenspektrometrischen Chlor-Interferenzen, die sich aus dem eingesetzten Puffer herleiten, keine Berücksichtigung: V, Cr, As. Die folgenden Elemente sind durch mehrfache Interferenzstörungen bei der ICP-MS-Messungen nur bei gut übereinstimmenden Quantifizierungen in den Wiederholungen ausgewertet worden: Fe, Sn, Sb, Se, Mo, Ga, Ru und Rh (weiter s. Kapitel 2.3.1).

Im zweiten Teil der Arbeit sollte versucht werden, hochmolekulare Cadmiumspezies (Molmasse ca. 200 kDa) weiter zu identifizieren und zu charakterisieren. Anhand der Untersuchungsergebnisse aus vorangegangenen Arbeiten (Kemenji, 1992; Günther, 1995; Ji, 1997) war bereits bekannt, dass Cadmium in den dort untersuchten Lebensmitteln überwiegend als hochmolekulare Spezies in Pflanzen vorliegt. In den Untersuchungen der o.g.

Arbeiten wurde festgestellt, dass es sich bei den hochmolekularen Cadmiumspezies um Proteine handelt. Die gefundenen Spezies besaßen nur eine geringe UV-Absorption bei 280nm und zeigten bei den untersuchten Cytosolen ein ähnliches Elutionsverhalten in der GPC. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die hochmolekularen Cadmiumspezies in diesen Pflanzen eine ähnliche Struktur besitzen.

Als Modellpflanze wurde zu dieser Studie *Arabidopsis thaliana* eingesetzt. Um die bestehende Konzentrationsproblematik, bedingt durch Verdünnungseffekte bei der Probenvorbereitung und der anschließenden Auftrennung des Cytosols an einer GPC (Vgl. Kapitel 1.2), zu verringern, sollte bei der Anzucht von *Arabidopsis* eine künstliche Kontamination mit einer Cadmiumchloridlösung vorgenommen werden. Die gewonnenen *Arabidopsis*cytosole wurden der gleichen GPC-Trennmethode wie die anderen Lebensmittelcytosole unterworfen. Im Cytosol dieser Modellpflanze soll also untersucht werden, ob sich im Vergleich zu pflanzlichen Lebensmitteln ebenfalls ähnliches Bindungsverhalten des Cadmiums beobachten lässt und ob dabei hochmolekulare Cd-Bindungsformen vorliegen. Sollte dies der Fall sein und den Cadmiumbindungsformen proteinogene Eigenschaften zugeschrieben werden, sollten dann verschiedene Methoden der Proteinchemie und der modernen Proteomics herangezogen werden, um die Spezies zu isolieren und näher zu charakterisieren.

2 EXPERIMENTELLER TEIL

2.1 Probenvorbereitung

2.1.1 Erworbene Pflanzenproben

Es wurden handelsübliche Lebensmittel aus dem Einzelhandel untersucht. Als Pflanzenmaterial wurden verschiedene **frisch verzehrbare pflanzliche Lebensmittel** ausgesucht. Die Lebensmittel stammen aus verschiedenen Pflanzenfamilien. Sie wurden in handelsüblichen Verkaufsstellen erworben und innerhalb weniger als 24 Stunden nach dem Kauf zur Gewinnung des Cytosols verarbeitet.

Tabelle 2-1 Auswahl an Lebensmitteln zur Cytosolherstellung

Pflanze	Botanische Name	Untersuchungsgut
Eisbergsalat	- <i>Lactuca sativa</i> L. var. capitata "Globe"	Blätter
Endiviensalat	- <i>Cichorium endivia</i> L.	Blätter
Feldsalat	- <i>Valerianella carinata</i> L.	Blätter
Kopfsalat	- <i>Lactuca sativa</i> L. var. capitata	Blätter
Kohlrabi	- <i>Brassica napus</i> L. var. rapifera	Knolle
Möhren	- <i>Daucus carotta</i> L.	Wurzelknolle
Gurke	- <i>Cucurbita pepo</i> L.	Frucht
Paprika	- <i>Capsicum annuum</i> L.	Frucht
Tomate	- <i>Lycopersicon esculentum</i> L.	Frucht

2.1.2 Züchtung der Modellpflanze

Der Wildtyp (var. Columbia) von *Arabidopsis* wurde als Modellpflanze in dieser Arbeit verwendet. Die Samen standen aufgrund einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Juniorprofessorin Dr. Janzik (Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre, ICG-III Phytosphäre – Forschungszentrum Jülich GmbH) zur Verfügung.

Zur Aussaat wurden die winzigen Samen des Ackerschmalwandes zusammen mit Sand in einem 1,5mL Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und über genügendes Torfkultursubstrat in einen etwas größeren Blumentopf (500 mL) gestreut. Das Kulturgefäß wurde in eine größere Wanne mit ca. 1 cm hoch stehendem Wasser gestellt.

Ein Plastikdeckel mit ausreichend Luftlöchern wurde auf die Wanne gesetzt, um die Innenfeuchtigkeit zu erhalten. Die Wanne wurde dann ca. zweieinhalb Wochen in den Brutschrank gestellt (ca. 150 Pflanzen wurden erwartet).

Es folgte die Vereinzelnung der Pflanzenkeimlinge in Multitopfpaletten mit je ca. 80-100 cm³ Erdvolumen. Die Multitopfpaletten wurden weitere dreieinhalb Wochen in den Brutschrank gestellt. Die Abtrennung der Blütenteile gehörte auch zur Pflege, um die Pflanzen im Bestand zu erhalten, damit sie nach der Blütenbildung nicht absterben.

Etwa vier Wochen darauf wurde die erste Kontaminierung mit Cadmiumchloridlösung (Konzentration s. unten) vorgenommen. Es erfolgte die Zugabe der Lösung mit Hilfe einer Pasteurpipette jeweils direkt am wurzelnahen Bereich von jeweils 2 mL Lösung. Die Kontaminierung wurde drei Mal mit Abstand von je drei Tagen durchgeführt.

Die Ernte und Vorbereitung der Pflanzen erfolgte zwei Tage nach der letzten Kontaminierung. Die Wurzeln wurden abgeschnitten und die oberirdischen Pflanzenteile zu einem Homogenat weiterverarbeitet.

Saat	:	<i>Arabidopsis thaliana</i> var. <i>Columbia</i>
Erde	:	normale Blumenerde
Topfvolumen	:	Multitopfpaletten @ 100mL
Anzucht	:	Brutschrank mit Tageslichtbeleuchtung
Bewässerung	:	normales Trinkwasser
Kontaminationslösung	:	Cadmiumchloridlösung
Herstellung	:	0,75 mg/mL CdCl ₂ .H ₂ O in Leitungswasser

2.1.3 Cytosolgewinnung

Die essbaren Teile der erworbenen Pflanzenproben bzw. der oberirdische Teil der angezüchteten *Arabidopsis* wurden von den restlichen Pflanzenteilen abgetrennt. Zunächst wurden sie mit Leitungswasser und anschließend mit bidest. H₂O mehrmals gründlich gewaschen. Von jeder Pflanze wurde eine Menge von ca. 100 g Abtropfgewicht gewonnen und für die Weiterverarbeitung eingesetzt.

Ein Kontakt der Pflanzenproben mit metallischen Gegenständen wurde möglichst vermieden. Hierzu wurden die Pflanzenproben mit einer geeigneten Glasscherbe auf einer Glasplatte vorzerkleinert und dann in einer Porzellanschale weitgehend zu Mus verarbeitet. Diese Notwendigkeit bestand, da nur kleine Stücke in die feine Messerspalte des Ultra-Turrax eindringen können. Speziell die Pflanzenproben mit etwas härteren Schalen bzw. festeren Markbestandteilen, wie bei Paprika oder Möhren, ließen sich leider nicht vollständig mit einer

Glasscherbe vorzerkleinern. Auch bei der Verarbeitung von Arabidopsis hat es Probleme bei der Vorbereitung und Homogenisierung gegeben, da viele der Stängel- und Sprosssteile die Zerkleinerung fast unzerkleinert überstanden.

Homogenisierung und Probenentnahme der Homogenate

Die zerkleinerten Proben wurden im Gewichtsverhältnis von 1:2 mit auf +5°C vorgekühltem, gründlich entgastem Tris-HCl-Puffer (20 mmol/L, pH 8, 1 mmol/L NaN₃) versetzt und unter Eiskühlung mit dem Ultra-Turrax insgesamt 5 min. homogenisiert. Mit anfänglichem Anlauf von 1000 U/min wurde die Drehzahl des Ultra-Turrax auf bis zu 4000 U/min erhöht. Durch Pausen während der Homogenisation wurde ein stärkeres Erwärmen und allzu starkes Schäumen der Proben vermieden. Die Reinigung des Ultra-Turrax erfolgte durch einen Leerlauf in bidest.H₂O. Bei dieser Art der Probenvorbereitung, dem sogenannten „initial speciation step“ wurden Spezies aus den Pflanzen in Lösung überführt, wobei das Ziel war, möglichst wenig chemische Veränderungen der Spezies zu erhalten.

Danach wurde das Homogenat mit Hilfe eines Glasrohres (Innendurchmesser: 6 mm) bei laufendem Ultra-Turrax entnommen, um die Suspension während der Entnahme homogen zu halten. Sofort wurde es in ein gereinigtes (Säuberungsaufschluss mit HNO₃ sp.) Teflon-Aufschlussgefäß eingeführt und eingewogen (Mikrowellenaufschlusseinheit). Die so entnommenen Homogenatproben wurden anschließend vor der Multielementbestimmung einem Mikrowellenaufschluss unterworfen.

Das restliche Homogenat wurde bei 45000 g für 60 min. bei 4°C zentrifugiert. Die überstehende Cytosolphase wurde mit Pasteurpipetten vorsichtig abgesaugt und in einem sauberen Becherglas gesammelt. Die gesamte Cytosolphase wurde nach dem Wiegen zur Reinigung von Pelletresten, die versehentlich mit abgesaugt wurden, nochmals 20 min. unter identischer Zentrifugeneinstellung zentrifugiert und nach analoger Probenentnahme dem Säureaufschluss unterzogen. Die restlichen optisch klaren Cytosole (Überstände) wurden in 10 mL Polypropylen-Reaktionsröhrchen zu ca. 7 mL Portionen abgefüllt, verschlossen und sofort in den Tiefkühlbehälter über flüssigem Stickstoff eingelagert, um einen weiteren Abbau der Inhaltstoffe zu unterbinden. Die Pellets wurden unmittelbar nach der letzten Zentrifugation gewogen und ebenfalls dem Mikrowellenaufschluss unterzogen. Zur Untersuchung der Elementverteilungen wurde eine Multielementbestimmung mit den Homogenaten, Pellets und Cytosolen durchgeführt.

2.1.4 Mikrowellenaufschlüsse

Mikrowellenaufschluss	:	Fa. MLS Laborsystem
Aufschlusssäure	:	konz. HNO ₃ sp (65%)
Interner Standard	:	Indium (In-Endkonzentration 10µg/L)
Probeneinwaage	:	1-6 g
Endvolumen	:	25 mL

In den Teflongefäßen für die Mikrowellenaufschlusseinheit wurden die aufzuschließenden Proben (Pflanzenhomogenate, Cytosole und Pellets) eingewogen. Die Einwaagen der Homogenate und Cytosole betragen jeweils ca. 4 - 6 g, die der Pellets ca. 0,5 - 1 g, abhängig davon wie stark wasserhaltig die ursprüngliche Pflanzenprobe war. Nach der Probeneinwaage wurde in die jeweiligen Aufschlussgefäße 5 mL HNO₃ sp hinzugegeben.

Parallel zu den Probenaufschlüssen wurde ein Blindaufschluss durchgeführt, wobei in dem Aufschlussgefäß nur die zugegebene Menge an HNO₃ sp enthalten war (Aufschlussprogramm siehe Tabelle 2-2). Nach dem Aufschluss wurden die abgekühlten Teflongefäße vorsichtig geöffnet und der Inhalt quantitativ mit sauberen Pasteurpipetten in einen Messkolben überführt. Zur Vorbereitung für die spätere Multielementbestimmung mit dem ICP-QMS wurde in die Messkolben der interne Standard zugegeben. Die Messung konnte somit direkt aus dem Kolben ohne weiteres Abnehmen oder Umfüllen erfolgen. Die Multielementbestimmungen der Aufschlüsse wurden möglichst an demselben Tag des Aufschlusses durchgeführt.

Tabelle 2-2 Aufschlussprogramm des Mikrowellensystems

Programm	Eingestellte Bedingungen
Heizphase	35 min., Raumtemperatur → 200 °C (Gradient)
Haltephase	25 min., 200 °C
Abkühlphase	Ventilation, 1 h
Power	550 W

Um in den verwendeten Messkolben mögliche Verunreinigungen mit Metallionen zu minimieren (25 mL Messkolben als Vorlage), wurden sie über Nacht mit viertelkonz. HNO₃ sp inkubiert und anschließend mehrmals mit bidest.H₂O gründlich gespült. Eine mit HNO₃ sp angesäuerte Indiumlösung wurde als interner Standard so zugegeben, dass die Indium-Endkonzentration in den Messkolben 10µg/L betrug. Die Teflongefäße wurden jeweils vor und nach dem Einsatz einem Säuberungsaufschluss unterworfen. Dazu wurden in die Gefäße

jeweils 10 mL halbkonz. Salpetersäure gefüllt und anschließend ein Säuberungsaufschluss nach dem oben beschriebenen Programm (mit verkürzter Haltezeit) durchgeführt. Nach Beendigung des Aufschlusses wurde die Säure verworfen und die Gefäße gründlich mit bidest. H₂O gespült.

2.2 Auftrennung und Aufreinigung

2.2.1 Gelpermeationschromatographie

Als eine von zahlreichen biochemischen Auftrennungsmethoden kommt in dieser Arbeit die Gelpermeationschromatographie (GPC) zum Einsatz. Der Vorteil hierbei ist die schonende Behandlung der Probenanalyten, bei der die Trennung der Inhaltstoffe nach Molekülgröße erfolgt, ohne dass es zu einem denaturierenden Eingriff kommt. Die Verteilung von Elementen in den erhaltenen GPC-Fraktionen liefert erste Hinweise für mögliche Elementbindungsformen im Cytosol. Im Anschluß bietet sich eine native PAGE-Trennung als weiteren Aufreinigungsschritt für bestimmte Elemente an. Die Nachteile der GPC sind zum einen, dass sie keine weitere Information liefert, außer dem ungefähren Molekulargewicht der Analyten (nach entsprechender Eichung), und zum anderen kann das Säulenmaterial nach etwa 60-70 Läufen mit Komponenten von realen biologischen Proben überfrachtet sein, so dass neues Säulenmaterial erforderlich ist. Wegen der niedrigen Trennleistung und der schlechten Auflösung bei dieser Methode werden zusätzlich zu diesem präparativen Analysenschritt häufig weitere Aufreinigungsverfahren herangezogen.

Stationäre Phase : **gepackte Sephacryl-S400HR**

Sephacryl ist ein quervernetztes Polymer aus Allyldextran und N,N'-Methylenbis-acrylamid. Die Struktur von Sephacryl gewährleistet eine starre Konformation mit definierter Porengröße der Perlen. Zur Trennung und Aufreinigung der gewonnenen Pflanzeninhaltsstoffe wird Sephacryl S-400 HR (High Resolution) verwendet. Im aufgeschlammten Zustand beträgt der Durchmesser bei diesem Sephacrylmaterial S-400-HR zwischen 25 – 75 µm (oder etwa 50µm im Durchschnitt). Die Trennleistung für diese Sephacryl S-400-HR wird vom Hersteller (Pharmacia Biotech) mit 2×10^4 bis 8×10^6 g/mol beziffert (Gelfiltration Manual, Pharmacia Biotech).

Mobile Phase: **Tris-HCl-Puffer**

Reagenzien: Tris, HCl sp 36%, NaN₃, bidest.H₂O

Herstellung: Lösung mit 20mM Tris mit 10mM NaN₃

Mit HCl sp auf pH 8.0 eingestellt (entgast)

Der Einsatz von Natriumazid diente zur Unterdrückung einer möglichen mikrobiellen Aktivität in dem gepackten Säulensystem (Günther, 2000).

Trennsystem und Trennbedingungen bei der Gelpermeationschromatographie

Das gesamte Trennsystem der Gelpermeationschromatographie bestand aus:

- einem Puffervorrat
- Gel-Chromatographie-Säule mit gepacktem Sephacrylmaterial
- Hauptsteuergerät zur Steuerung der Pumpe und des Fraktionierers
- einer peristaltischen Pumpe (12000 Varioperpex, Fa. LKB)
- einen Einkanal UV-Detektor (UV-1, Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) am Säulenende
- einem automatischen Fraktionssammler (2112 Redirac, Fa. LKB)
- einem temperierbaren Kühlschrank

Die peristaltische Pumpe mit einstellbarer Flussrate diente zum Puffertransport vom Puffervorrat zu der Säule. Der UV-Detektor und der Schreiber dienten zur Messung und Aufzeichnung der UV-Absorption des Eluats bei 254nm. Der Fraktionssammler sammelte automatisch die einzelnen Fraktionen in 10 mL - Polypropylenröhrchen. Das gesamte Trennsystem (außer dem Schreiber) wurde in einem auf +5°C temperierten Kühlschrank aufgebaut. Die verwendeten Pufferlösungen wurden im Wasserstrahlvakuum mit Hilfe eines Ultraschallbades sorgfältig entgast und auf Kühlschranktemperatur vorgekühlt. Die Parameter der Gelpermeationschromatographie sind wie folgt:

Tabelle 2-3 Parameter der Gelpermeationschromatographie

Parameter	Einstellungen
Säulenaufbau	: Länge 800mm; Durchmesser 30mm
Glasfritte	: 4er
Säulenmaterial	: Sephacryl S400 HR
Gelvolumen	: 500 mL (aufgeschlammter Zustand)
Puffer	: Tris-HCL/NaN ₃ [20mmol/L ; 1 mM] pH 8,0
Temperierung	: +5°C
Flussrate	: 0,23mL/min bzw. 0,69mL/min
Fraktionierung	: 95 Fraktionen ; a´ 9 mL
Vorlauf	: 125 mL
Hauptlauf	: 855 mL
Nachlauf	: Mind. 500mL (inkl. EDTA-Spüllösungen)
Aufzeichnung	: 0,07cm/min

Probenaliquot : 5 mL Cytosol
Probennachspülung : 2 x 5mL Tris-HCl-Puffer

Kalibrierung des GPC-Materials Sephacryl S-400-HR

Die fertig gepackte Säule wurde nach einer Äquilibration des Gels mit dem High-Molecular-Weight Gel Filtration Calibration Kit (Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Schweden) kalibriert. Durch die Kalibration erhielt man eine Abschätzung der ungefähren Molekulargewichte der globulären Proteine in den gesammelten Fraktionen. In dieser Arbeit wurde dem gesamten Kalibrierbereich der Säule von 670.000 – 160.000 g/mol (670 – 160 kDa) benötigt. Im Kalibrationskit befanden sich zusätzlich zu den hochmolekularen Proteinstandards auch verschiedene niedermolekulare globuläre Proteine:

Tabelle 2-4 Proteinstandards zur Kalibration der Sephacryls400HR

Standardproteine (Molekulargewicht)	
Ovalbumin	(43000 g/mol)
Aldolase	(158000 g/mol)
Catalane	(232000 g/mol)
Ferritin	(440000 g/mol)
Thyroglobulin	(669000 g/mol)

Die erhaltene Eichgeraden der Säule S-400 HR wird in Kapitel 3 – Ergebnisse dargestellt.

Die Regressionsgleichung der Eichkurve lautete wie folgt:

$$\text{Kurve : } \log \text{ MW} = - 0,0097 \text{ Ve} + 8,619 \quad (280 \text{ mL} \leq \text{Ve} \leq 410 \text{ mL})$$

Ve : das GPC-Elutionsvolumen

Die eluierten Proteine werden durch einen UV-Detektor (254 nm) erfasst.

Probenvorbehandlung und Probenaufgabe

Die Cytosolprobe wurde kurz vor der Probenaufgabe bei Raumtemperatur aufgetaut. Als die Probe flüssig aber noch kalt war, wurde sie schnell durchmischt, und 5 mL der Probenlösung für die Probenaufgabe mit Hilfe einer Polyethylenspritze auf die Oberfläche des Säulengels getropft. Zuvor saugte man den Pufferüberstand in der Säule mit einer sauberen Spritze ab. Nachdem das Probenaliquot in das Gelbett eingesickert war, wurde zwei Mal mit je 5mL Tris-HCL-Puffer nachgespült und danach der Pufferüberstand der Säule erneut aufgefüllt. Sofort wurde die Säulenöffnung oben mit dem Stopfen luftdicht verschlossen.

Der gesamte Ablauf von der Probenaufgabe bis zur 95.GPC-Fraktion benötigte im Idealfall etwa 65 Stunden. Der Säulenäquilibrierung und -reinigung konnte mit einer etwas höheren Flussrate betrieben werden, wobei ca. 600-700 mL Elutionsnachlauf wegen noch sehr spät eluierender Inhaltstoffe (z.B. Strontium-Spezies) eingehalten werden sollte, um Interferenzen mit den Inhaltstoffen im nächsten Probenlauf zu vermeiden.

Die GPC-Untersuchung einer Pflanzenart wurde als eine Messreihe (je 4-5 Läufe hintereinander) durchgeführt, bevor mit der Auftrennung des Cytosols einer anderen Pflanze fortgefahren wurde. Vor einer Untersuchungsreihe wurde die Säule mindestens einmal mit dem zu untersuchenden Cytosol gespült.

2.2.2 Spülung der Sephacrylsäule mit EDTA-Lösung

Ein Nachteil der o.g. Gelfiltrationschromatographie ist, dass neben der chromatographischen Eigenschaft des als stationärer Phase eingesetzten Sephacryls sich bei der GPC-Trennung das Ionenaustauschvermögen des Materials bei niedrigen Ionenkonzentrationen (wenige $\mu\text{g/L}$) bemerkbar machen kann (Evans, 1979; Gardiner, 1980; Johnson, 1980; Martin, 1988). Bei einem entsprechend ionenfreiem Milieu im Sephacrylmaterial und zugleich freien, ungebundenen Ionen in mobiler Phase werden die Ionen bei der Trennung bis zur Sättigung des Sephacryls zurückgehalten. Dadurch lässt sich ein Defizit in der Elementwiederfindung gegenüber der vor der Trennung aufgetragenen Ionenmenge nachweisen.

Sind diese Ionen bereits adsorbiert worden, können sie allein durch einen Waschvorgang mit Puffer nicht mehr desorbiert werden. Ein stark ionenbindendes Chelatreagenz ist notwendig, um das gepackte Sephacrylmaterial von diesen Ionen wieder zu befreien. Ohne diesen Spülvorgang akkumulieren diese Ionen in dem Sephacrylmaterial. Bei der nächsten Trennung von Proben, die ionenfreie Bindungsformen enthalten, würde ein verfälschtes Ergebnis durch die erhöhte Elementwiederfindung erhalten werden und evtl. könnten sogar Elementbindungsformen vermutet werden, die eigentlich nicht in dem Pflanzencytosol enthalten sind. Ein starkes Chelatreagenz, das nahezu alle Metallionen bindet - insbesondere die Schwermetalle - ist EDTA (s. Kapitel 3.2.1). Aus dem o.g. Grund wurden folgende Spülvorgänge durchgeführt:

- nach dem Packen und Äquilibrieren von neuem Sephacrylmaterial, um Ursprungskontaminationen vollständig zu entfernen.
- zwischen zwei Trennungen, um die zurückgehaltenen Ionen zu entfernen.

Salz: $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sp

EDTA-Lösung: 5 mM in Tris-HCl-Puffer (s. Kapitel 2.2.1)

Zu diesem Zweck wurde die EDTA-Lösung wie die Cytosolprobe auf die Säule aufgetragen. Eine verbesserte Kontrolle lieferte eine zweifache EDTA-Auftragung mit einem Pufferleerlauf von ca. 40 mL zwischen diesen beiden Applikationen. Ein fehlendes zweites Signal des zu bestimmenden Elements war dabei ein Hinweis für die Sauberkeit des Systems (Vgl. Mestek, 2002; Koplik, 2002).

2.2.3 Native Gelelektrophorese

Die “Modell 491 Prep Cell“ - Elektrophoresekammer (US Patent Nr. 4,877,510) mit peripheren Instrumenten der Firma Bio-Rad wurde, bedingt durch die Möglichkeit, Proben im präparativen Maßstab unter nativen Bedingungen aufzureinigen, zur Proteinisolierung herangezogen. Nach der vorausgehenden Cytosoltrennung an einer GPC und anschließender spektrometrischer Multielementbestimmung wurden gezielt die Fraktionen, die bestimmte Spezies enthielten (mit oder ohne Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration) mit dieser Methode weiter aufgereinigt. In dieser Arbeit wurden die GPC-Fraktionen der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, in denen die hochmolekulare Cadmiumspezies gefunden wurden, mit dieser Methode weiter untersucht. Das gesamte Trennsystem der PAGE besteht aus folgenden Komponenten:

- obere und untere Pufferkammer
- Kühlfinger
- Gelgießstand und Gelsäule
- Elutionskammer
- peripheren Geräten
- Laborschreiber (Rec-2)
- Fraktionssammler
(2112 Redirac, Fa. LKB)
- temperierbaren Kühlschranks

Obere und untere Pufferkammer: Die obere Pufferkammer wird durch eine Wand in zwei Teilkammern getrennt, die innere Kammer mit der Kathode (obere Elektrophoresekammer; der obere Elektrophoresepuffer steht als Flüssigkeitssäule zwischen Kühlfinger und Gelsäule auf dem Gelbett) und die äußere Kammer mit dem Elutionspuffer (Eluentvorratskammer). Die untere Pufferkammer bildet eine stabile Basis für die Zelleinheit. Sie umfasst die Anode und enthält den unteren Elektrophoresepuffer. Bei kontinuierlichen PAGE-Systemen ist der Elektrophoresepuffer in der oberen und unteren Elektrodenkammer sowie im Gel identisch.

Kühlfinger: Der Kühlfinger erfüllt mehrere Funktionen. Durch ihn wird die beim elektrophoretischen Prozess entstehende Wärme mit Hilfe eines internen Kühlkreislaufs abgeführt. Durch den Betrieb der Rezirkulationspumpe fließt permanent Pufferlösung (unterer Elektrophoresepuffer) durch den Kühlfinger, um einen Temperaturengleich im Gel sicherzustellen. Das zylindrische Gel ist zwischen Gelsäule und Kühlfinger eingebettet. Die zu trennende Probe wird mit Hilfe einer Spritze durch eine Einführhülse zwischen Gelsäule und Kühlfinger vorsichtig auf das Gel geschichtet.

Gelsäule und Gelgießstand: Die Gelsäule besteht aus einem zylindrischen Glasrohr (28mm i.D.) und ist verbunden mit einer Befestigungsvorrichtung, die als Auflagefläche für die obere Pufferkammer dient. An ihrem Fuß befindet sich die kannelierte Dichtung der Elutionskammer. Die Gelsäule ist mit einer Skala versehen, um die Höhe des Gelbettes reproduzieren zu können. Die Gelpolymerisation erfolgt bei Raumtemperatur zwischen Kühlfinger und Gelsäule, die auf dem Gießstand mit dem Elutionskammerdeckel fixiert wird. Ein Metallnippel befindet sich im Mittelpunkt des Gießstandes, um eine Verstopfung des Elutionskanals beim Gelgießen zu verhindern.

Elutionskammer: Folgende Komponenten gehören zur Elutionskammer: Elutionskammerbasis, Dichtungsring, Stützfritte, Dialysemembran, Elutionsfritte, Dichtung (kanneliert) und der Elutionskammerdeckel mit 4 Befestigungsschrauben. Während des Betriebs der peristaltischen Pumpe fließt Eluent aus der Vorratskammer durch eine Schlauchverbindung in die Elutionskammer bzw. in die saugfähige Elutionsfritte (PE). Der gleichmäßige Fluss von Eluent in die Elutionsfritte wird durch die besondere Form der kannelierten Dichtung gewährleistet. Der Eluent durchströmt die Fritte, eluiert an der Gelbasis kontinuierlich durch Elektrophorese fraktionierte Probenmoleküle und wird dabei radial zum Mittelpunkt der Kammer gezogen, wo er in den Elutionskanal aufsteigt. Unter der Elutionsfritte liegt eine Dialysemembran mit einem Ausschlussmolekulargewicht von 6 kDa an, die das Abwandern von Molekülen mit höheren Molekulargewichten in die Stützfritte verhindern soll.

Tabelle 2-5 Periphere Geräte der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Gleichspannungsquelle PowerPAC 1000 (Bio Rad)	Leistung : 1-250 W (5W konstant; 3h) Spannung : 1-1000V Stromfluß : 80 A
Peristaltische Pumpe Model EP-1 Econo Pump (Bio Rad) Programm der Controllerfunktion	Fraktionsgröße : 5,0mL Eluentflußrate : 1,0mL/min Fraktionanzahl : 80 Vorlaufvolumen : 80mL
Fraktionssammler Modell 2110 (Bio Rad)	1-80 Fraktionen, Programmierung der Zeit und Tropfenanzahl (hier : 5min), Steuerung des Fraktionssammlers über die peristaltische Pumpe
UV-Detektor Pharmacia-LKB Uvicord SII	Range AU : 0,05 Wellenlänge : 280nm Time constant : 2
Recorder Pharmacia LKB Rec 102 Buffer Recirculation Pump (Bio Rad)	Range : 10mV Chart Speed : 2mm/min Pump Dial Setting : 70 Flussrate : 95mL/min

Reagenzien und Materialien: Glycerin, 40% Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid, Ammoniumpersulfat, *N,N,N,N*-Tetramethylen-ethylen-diamin, Isopropanol; Dithiothreitol (1,4-Dithio-DL-threitol); HNO₃ sp; NH₄HCO₃ pa; Chelating Resin (Iminodiessigsäure); Tris-HCl-Puffer: 20 mmol/L Tris, 1mmol/L NaN₃ pH 10 (Pufferreagenzien s. Kapitel 2.2.1); Reinstwasser aus einem Millipore-System.

Elektrophoresepuffer: Ein ähnlicher Puffer wie bei der GPC (1:10 Verdünnung der Stammlösung: 200mM TrisHCl; 1mM NaN₃) wurde verwendet. Der hierbei höhere pH-Wert von 10 bat während der Haupttrennung eine stärkere Trennkraft für die zu trennenden negativ geladenen Proteinmoleküle bei der Wanderung zur Anode. Die Ionenstärke des Puffers war so geartet, dass die Elektrolytkonzentration im Gel zur Stromleitung ausreichte und somit die Verbreiterung der Proteinbanden (niedrigere Auflösung) verhindert wurde, da die Proteine sonst die Hauptmenge des Stroms hätten leiten müssen.

Vernetzungsgrad des Polyacrylamids: Die Gelstruktur und die damit verbundene Porengröße (Vernetzungsgrad) entscheidet darüber, ob und wie schnell ein Molekül bestimmter Größe und Ladung durch das Gel wandert. Das Gel ist ein Vinyl-Polymerisationsprodukt von Acrylsäureamid und einem Vernetzer (meistens N,N-Methylenbisacrylsäureamid). Das %T-Optimum der Model 491 PrepCell für große Moleküle (> 150 kDa) liegt unter 5% (Gang, 1997). Da es sich bei den Cadmiumspezies wahrscheinlich um hochmolekulare Proteine (ca. 200 kDa nach der GPC) handelt, wurde die Konzentration der Gesamtmonomeren im Gel auf 4% (w/v) festgelegt. Dadurch ist gewährleistet, dass hochmolekulare Proteine nicht zurückgehalten werden. Der Quervernetzer beträgt 2,67% (w/w) des gesamten Monomerenanteils.

Gelbetthöhe: Durch Variieren der Gelbetthöhe konnte die Auflösung zwischen zwei Proteinen verbessert werden. Hohe Gelbetthöhe kann allerdings zu Proteinbandendiffusion führen und somit die Migrationszeiten verlängern. Eine Gelbetthöhe von 4 cm wurde nach Vorversuchen für ausreichend gehalten.

Gelherstellung: Das herzustellende Gelvolumen betrug 40 ml (4% T Gesamtmonomerenanteil). 4 mL Acrylamid/Bis-Stammlösung (40%, [g/100 ml], Acrylamid/Bis = 37,5:1), 4 ml Tris-HCl Puffer-Stammlösung (200 mmol/L Tris; pH 10,0; 10 mmol/L NaN₃) und 32 ml Wasser wurden gemischt und im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex RK 102) entgast. Danach erfolgte die Zugabe von 20 µL TEMED und 200 µL APS-Lösung (10%ig). Mit Hilfe eines Magnetrührers wurde die Lösung kurz homogenisiert. Der Raum zwischen Gelsäule und Kühlfinger wurde auf 4 cm Gelbetthöhe aufgefüllt. Durch leichtes Klopfen des Gießstands gegen den Labortisch beseitigte man beim Gießen entstandene kleine Luftblasen. Um einen luftdichten Abschluss und eine waagerechte Geloberfläche zu erhalten, überschichtete man die Gellösung mit 3 ml Isopropanol, das nach zweistündiger Polymerisation mit Hilfe einer Spritze vorsichtig entfernt wurde. Die Geloberfläche wurde danach mit 4 ml Elektrophoresepuffer (Puffer-Stammlösung, Verdünnung 1:10) überschichtet. Die vollständige Polymerisation erfolgte über einen Zeitraum von 69 Stunden bei Raumtemperatur. Der benötigte Elektrophoresepuffer (ca. 4 L), sowie die in Elektrophoresepuffer gelagerte Stützfritte, die Elutionsfritte und die Dialysemembran wurden über Nacht bei 4°C gekühlt.

Proteinreinigung mittels nativer kontinuierlicher PAGE

Eine ausführliche Beschreibung des Auf- und Abbaus der Apparaturen können der Betriebsanweisung des Herstellers bzw. einer vorangegangenen Arbeit (Gang, 1997) entnommen werden. Folgende Abläufe entsprechen dem allgemeinen Verlauf einer PAGE-Trennung:

- **Vorlauf/Äquilibrierungsphase:**

Sie hatte die Funktion, das Gesamtsystem bei 4 °C zu äquilibrieren. Dafür wurde über eine Zeitspanne von 80 min. (ohne Probe) der elektrophoretische Vorlauf durchgeführt. Anschließend zeigt der empfindlich eingestellte Schreiber eine stabile Basislinie. Pumpe, Schreiber und Gleichspannungsquelle wurden nach Probenaufgabe gleichzeitig gestartet. Vor Beginn der Vorlaufphase waren Pumpe, Gleichspannungsquelle, UV-Detektor und Schreiber auf die in Tabelle 2-5 aufgeführten Parameter einzustellen. Die Pumpe war vor der Inbetriebnahme zu kalibrieren. Die Lampe im UV-Detektor sollte einen Tag vor dem ersten Lauf eingeschaltet werden.

- **Probenaufgabe mit Verdichtung durch Glycerinzugabe:**

Um zu verhindern, dass die Probe sich mit dem oberen Elektrophoresepuffer vermischte, wurde eine möglichst hohe Verdichtung der Probenmischung angestrebt. Pro elektrophoretischen Lauf vermischte man die Proben aus der GPC-Fraktion mit 300 µL Glycerin und lagerte sie bei 4°C bis zur Probenaufgabe.

- **Elektrophoretischer Lauf:**

Nach 75 min. des Vorlaufs wurde die angelegte Spannung für 5 min. unterbrochen. Alle anderen Geräte liefen normal weiter. Mit Hilfe einer vorgekühlten Spritze und einer ca. 10 cm langen elastischen Kunststoffkanüle, die am Spritzenende aufgeschraubt wurde, schob man die Kanüle durch die vorgesehene Einführhülse. Einige Millimeter über dem Gelbett unterschichtete man die Probe vorsichtig durch langsames und gleichmäßiges Drücken des Stempels. Man verschloss danach wieder die Elektrophoresekammer. Zeigte die Peristaltische Pumpe an, dass die Vorlaufphase beendet war (nach 80 min.), legte man die Gleichspannung an den Elektroden der Prep Cell wieder an. Der Fraktionssammler wurde gleichzeitig durch das Einschalten der peristaltischen Pumpe aktiviert. Die in der Probe befindlichen Proteine wurden nach Ladung getrennt. Eine PAGE-Fraktion entsprach einem Elutionsvolumen von 5 mL.

2.2.4 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese ist eine der leistungsstärksten Analysenmethoden für komplexe Proteinmischungen aus biologischen Proben. Die Technik trennt die Proteine aufgrund von zwei unabhängigen Eigenschaften in zwei getrennten Schritten auf: die erste Dimension (IEF, isoelektrische Fokussierung) trennt die Proteine nach deren isoelektrischen Punkten (pI) und die zweite Dimension (SDS-PAGE) nach deren Molekulargewicht. Die Methode ist in der Lage, über tausend Proteinspots in einem Einzellauf zu trennen. Diese Bedingungen basieren aber auf einem denaturierenden Prinzip, d.h. durch den Einsatz von Detergentien, Reduktionsmitteln (z.B. Dithiothreitol) und evtl. einer Alkylierung der S-Gruppe (z.B. durch Jodacetamid) werden die sekundären, tertiären und quartären Strukturen aufgehoben, um eine hohe Peptidauflösung durch eine stabile SDS-Mycellenbildung zu erzielen.

Die Mannigfaltigkeit, wie diese Analysenmethoden eingesetzt und kombiniert werden können, ist so umfangreich, dass hier nur die in dieser Arbeit erarbeitete Methode erläutert werden soll. Mehr Informationen zu den Techniken und Hintergründen der Methode liefern die Herstellerliteraturen und zahlreiche Referenzbücher (Pharmacia Biotech; Görg, 2000). Anstatt selbst hergestellter Gele wurden hier vorkonditionierte Fertiggele eingesetzt. Folgende Apparaturen, Reagenzien und Methoden wurden verwendet (Schaffer, 2001):

Apparaturen:**Amersham Pharmacia Biotech**

Hardware 1.Dimension:

Ettan IPGphor Isoelectric focusing Unit
Probenschiffchen 18cm aus Aluminiumoxid

Hardware 2.Dimension:

Flatbed Multiphor II ExcelGel
Power Supply EPS 350I XL
MultiTemp III Thermostatic Circulator**Precast-PAGE-Gele:****Amersham Pharmacia Biotech**

IPGgelstreifen:

Immobiline DryStrip pH 3-10L, pH 4-7L, 18cm

ExcelGel:

ExcelGel XL12-14 Gradient (24x18)
ExcelGel 2D Homogeneous 12,5 (24x11)

ExcelGel-SDS-Pufferstreifen:

Anode:

0,45M Tris/Acetat, pH 6,6, 4g/L SDS, 0,05g/L OrangeG

Kathode:

0,08M Tris, pH 7,1 , 6g/L SDS, 0,80 M Tricine

Proteinstandard:**BioRad**2D-SDS-PAGE Proteinstandard (pI- und MW-Marker)
Enzym Trypsin (Promega)**Tabelle 2-6 Die bei der 2D-SDS-Gelelektrophorese eingesetzten Chemikalien**

Pharmacia	Merck	
Harnstoff	Glyzerine	Methanol
CHAPS	BromophenolBlue	Acetonitril
Coomasie Blue G250	Glycine	HCl sp
Dithiothreitol (DTT)	Ammoniumsulfat	Trifluoressigsäure (TFA)
Pharmalyte 3-10	SDS	o-Phosphorsäure
IPG Cover Fluid	Tris-Salz	
Iodacetamid (IAA)	Ammoniumhydrogencarbonat	

Probenvorbereitung:

Die durch 2D-Gelelektrophorese zu trennenden Proteine müssen in ausreichender Menge enthalten sein, damit sie bei der späteren Färbung (hier Coomassie Blue) sichtbar gemacht werden können (0,2-0,5 µg je Komponente, bzw. 1-10 µg insgesamt). Aufgrund der geringen Probenmenge, die für die Methode erforderlich ist, müssen die meisten aufbereiteten Proteinproben mit verschiedenen Methoden aufkonzentriert werden (s. Flussdiagramm in Kapitel 3.4). Die mittels chromatographischer und elektrophoretischer Aufreinigung sowie durch Ultrafiltration aufkonzentrierter Probe konnte direkt für die 1.Dimension eingesetzt werden.

1.Dimension:

Als Rehydratationslösung für die IPG-Trockengele hatte sich folgender Puffer bewährt: In wässriger Lösung wurden Harnstoff (9M), CHAPS als ein nichtionisches Detergens (2,5%), Pharmalyt 3-10 als IPG-Puffer (1%) hergestellt. Zur Aufbewahrung werden von dem Puffer je 750 µL in Eppendorf-Probengefäße portioniert und bei -18°C gelagert. Zum Rehydratisieren versetzte man jedes Gefäß nach dem Auftauen mit ca. 2,2 mg DTT, wobei die Lösung meist etwa für 2 Proben ausreichte.

Für den elektrophoretischen Verlauf der 1.Dimension wurden folgende Schritte durchgeführt:

- Die angereicherte Probenlösung wurde auf ca. 350 µL mit Rehydratationslösung in einem Eppendorfprobengefäß aufgefüllt und für mindestens 20 min. geschüttelt.
- Nach Entfernung des Schaums durch leichtes Zentrifugieren, verteilte man die Lösung gleichmäßig auf einem Probenschiffchen, so dass keine Luftblasen entstanden.
- Mit IPG-Streifen (Gelseite auf die Flüssigkeit gerichtet) bedeckte man die Oberfläche mit ca. 1,5mL Coverfluid, um Verdunstungen zu vermeiden.
- Die Rehydratation und der elektrophoretische Lauf wurden wie in Tabelle 2-7 beschrieben durchgeführt.
- Die zu Ende gelaufenen Gele wurden entweder direkt für die 2.Dimension weiterverarbeitet oder bei -18°C in einer Petrischale für 2-3 Tage bis zur Verarbeitung aufbewahrt.

Tabelle 2-7 Elektrische Spannungen bei Rehydratation und Trennung der IPG-Gele

	Angelegte Spannung	Typ	Zeit
Step 1	30 V	Haltend	6 std.
Step 2	60 V	Haltend	6 std.
Step 3	200 V	Haltend	1 std.

Step 4	500 V	Haltend	1 std.
Step 5	2000 V	Haltend	1 std.
Step 6	→ 8000 V	Gradient	30 min.
Step 7	8000 V	Haltend	ca. 35 std.

2.Dimension:

Die Gelstreifen aus der 1.Dimension waren vor der Weiterverarbeitung für die 2. Dimension umzupuffern. Dazu wurden das nichtionische CHAPS-Detergens durch SDS umäquibriert und der pH-Wert durch Tris-HCl-Puffer auf 8,8 eingestellt. Dabei wurden die nach ihrem pI-Wert fixierten Proteine durch DTT und IAA weiter reduziert und stabilisiert. Als Umäquibrierungspuffer der IPG-Gele für die 2. Dimension wurde folgender Puffer hergestellt:

In Reinstwasser wurde Tris-Salz gelöst (50 mM; der pH mit HCl auf 8,8 eingestellt), weiterhin kamen Harnstoff (36 % w/w), SDS (2 % w/w), Glycerol 87 % (35 % v/v) und ein paar Körnchen Bromphenolblau hinzu. Zur Aufbewahrung wurden jeweils 10 mL Pufferlösung in PE-Röhrchen portioniert und bei -18°C gelagert. Zum Umäquibrieren wurden 2 Röhrchen Pufferlösung aufgetaut. In der ersten Lösung löste man 100 mg DTT und in der zweiten 250 mg IAA. Darin konnten mehrere Gelstreifen gleichzeitig umäquibriert werden.

Zum elektrophoretischen Verlauf der 2.Dimension wurden folgende Schritte durchgeführt:

- Die Gelstreifen aus den 1. Dimensionen wurden im ersten Umäquibrierungspuffer und danach im zweiten für je mindestens 15 min. leicht geschwenkt.
- Die Kühlplatte war luftblasenfrei auf 14°C zu temperieren.
- Um die bei der Trennung entstehende Wärme abzuführen, wurde zwischen Kühlplatte und Gelträgerfolie ca. 1 mL Cover Fluid gleichmäßig luftblasenfrei aufgetragen.
- Auf die Ränder der Gelplatte wurden die Anoden- und Kathodengestreifen platziert, dann wurden die umgepufferten IPG-Streifen knapp über den Kathodengestreifen gelegt.
- Neben den IPG-Streifen wurde genügend MW-Marker aufgetragen (ca. 15 μL).
- Nach dem Auflegen der Elektrodendrähte auf den Pufferstreifen wurde der Stromkreis geschlossen und die Trennung gestartet (Programmablauf s. Tabelle 2-8). Damit das Gel während des Laufes nicht austrocknete, war auf genügend Wasser in den Fächern zu achten.
- Vor dem Hauptlauf, wenn die Proteine nach dem Vorlauf ins Gel gewandert waren, wurden der IPG-Streifen und die Auftragsschiffchen der MW-Marker entfernt.
- Das fertige Gel wurde entweder archiviert oder zwecks Enzymverdau weiterverarbeitet.

Tabelle 2-8 **Laufparameter der 2.Dimension für die Precast-Gele**

Einstellungen	Vorlauf	Hauptlauf
Laufzeit	45 min.	80 min. (24x11 Gel) 160 min. (24x18 Gel)
Stromstärke	20mA pro Gel	40mA pro Gel
Spannung	100 V	800 V
Leistung	50 W	50 W

Färbung:

Die Silberfärbungstechnik ist trotz ihrer geringeren Detektionsgrenzen hier weniger geeignet, da es zu einer irreversiblen Bindung mit den Proteinen kommen kann, was zu falschen Aussagen bei einer Massenfragmentbestimmung von Proteinen durch MALDI-TOF-MS führen würde. Im Gegensatz dazu lässt sich ‚Coomasie Blue‘ wieder gut aus den Proteinen auswaschen. Als Färbungsreagenz für die Gele wurde folgende Lösung vorbereitet:

In wässriger Lösung wurde eine Lösung von Ammoniumsulfat (12,5% w/w) und o-Phosphorsäure (3% w/w) hergestellt. Zur Färbung wurde ca. 160 mL des Reagenzes mit 40 mL Methanol gemischt (Menge entsprechend bis zur vollständigen Bedeckung des Gels).

Zur Gelfärbung nach dem elektrophoretischen Lauf wurden folgende Schritte durchgeführt:

- Die fertigen Gele wurden mit Methanol/Ethanol entfettet (CoverFluid auf Trägerfolie).
- Ca. 1 Std. wurden sie in Färbungsreagenz geschwenkt.
- Anschließend wurde Coomasie Blue zugegeben (100 mg/100 mL Färbelösung, gelöst in ca. 1 mL Wasser) und mindestens über Nacht geschwenkt

Archivierung:

Wurden die fertig entwickelten Gele nicht zur Verdauung weiter verarbeitet, mussten sie mit feuchtigkeitsbindenden Mitteln archiviert werden. Eine 30%ige Glycerollösung reichte aus, um die Fertiggele vor der Austrocknung zu bewahren. Dazu wurden die Gele für ca. 2 Std. in die Lösung gelegt und anschließend für ca. 3 Std. an der Luft getrocknet.

Proteinverdauung:

Aus der bereits entwickelten Polyacrylamid-Gelplatte wurden die Proteinspots weiter für den folgenden Verdau mit dem Enzym Trypsin aufgearbeitet, um spezifische Peptidfragmente zu erhalten. Der jeweilige Proteinspot wurde mit Hilfe der vorbereiteten Plastikspitzen

ausgeschnitten und in je ein 1,5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die einzelnen Reaktionsgefäße wurden wie folgt behandelt:

1. 500 μ L Reinstwasser wurde zugegeben.
2. Ca. 15 min. wurde bei Raumtemperatur leicht geschüttelt.
3. Die überstehende Flüssigkeit wurde mit Hilfe einer μ L-Pipette vollständig entfernt.
4. Schritte 1 bis 3 wurden wiederholt.
5. 500 μ L 30 % (v/v) Acetonitril in 0,1 M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ -Lösung wurde zugegeben.
6. Ca. 10 min. wurde bei Raumtemperatur leicht geschüttelt.
7. Die überstehende Flüssigkeit wurde mit Hilfe einer μ L-Pipette vollständig entfernt.
8. Schritte 5 bis 7 wurden wiederholt.
9. Die Gelstückchen mit Flüssigkeitsüberstand wurden im SpeedVac getrocknet.
10. Zur Verdauung wurde jedes Gelstückchen mit 2 μ L 3mM Tris-HCl, pH 8,8 + Trypsin (10 ng/ μ L Endkonzentration) rehydratisiert.
11. Die Proben wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.
12. Zu den Reaktionsgefäßen wurden je 6 μ L Reinstwasser zugegeben und dann für etwa 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert.
13. Zu den Reaktionsgefäßen wurden 5 μ L 30 % (v/v) Acetonitril mit 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure zugegeben und für etwa 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert.
14. Der Flüssigkeitsüberstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte dann die Lagerung bei -20°C bis zur MALDI-TOF-Messung.

2.2.5 Anreicherung

Eines der größten Probleme des präparativen Teils der Arbeit war die geringe Konzentration an Inhaltstoffen in den Proben, die man in mehrstufigen Aufreinigungsschritten immer wieder zurückgewinnen musste. Vom analytischen Gesichtspunkt aus erweisen sich solche Anreicherungsschritte zur Bestimmung der Spurenelemente zwar als Nachteil, da sich durch wiederholten Kontakt mit anderen Gegenständen Kontaminationen einschleichen können. Andererseits erwiesen sich die Anreicherungsschritte jedoch für die präparative Arbeit als unverzichtbar.

Ultrafiltration

Die Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration (basierend auf sog. physikalischer ‚Cut-Off-Fraktionierung‘) gehört bei den biochemischen Arbeiten zu den elegantesten Techniken. Der Vorteil dabei ist die schnelle und einfache Handhabung. Außerdem kommt es dabei kaum zur Denaturierung der instabilen Zellinhaltsstoffe, wie es bei einigen Anreicherungsmethoden durch Präzipitation häufig der Fall ist. Sie kann vor und / oder nach der chromatographischen bzw. elektrophoretischen Trennung eingesetzt werden, um Inhaltstoffe für anschließende

analytische Schritte aufzukonzentrieren. Das *Centriprep* kit hatte hier den Vorteil, dass sich eine größere Menge an Probe aufkonzentrieren ließ. So konnten z.B. das ursprüngliche Cytosol oder die vereinten GPC / PAGE-Fraktionen aufkonzentriert werden, während das *Microcon* kit eher für eine Kleinmenge bei der Strukturanalyse mit MALDI-MS geeignet war.

Tabelle 2-9 **Eingesetzte Produkte der Millipore GmbH zur Ultrafiltration**

Produkte MilliporeGmbH	Max. Probenvolumen	Zentrifugalbeschleunigung
Microcon YM-10, 30, 50	500 µL / Lauf	max. 14000 x g
Centriprep YM-10	12-15 mL / Lauf	max. 3000 x g

Außerdem verstopfen die *Centriprep*-Membranporen im Vergleich zu *Microcon*-Produkten weniger stark, da die Filtrationsrichtung der Zentrifugalkraft entgegengerichtet ist. Durch mehrmaliges Abdekantieren des Filtrats aus dem *Centriprep* sowie durch Nachfüllen der Lösungen ließen sich sogar größere Lösungsmengen aufkonzentrieren als es für die o.g. Soll-Volumen der Fall ist.

Ammoniumsulfatfällung („Aussalzen“)

Die Proteinanreicherung durch Ammoniumsulfatfällung lässt sich nur als präparative Methode einsetzen. In Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen tendieren die Proteine zu aggregieren und fallen aus der Lösung aus, während potentielle Begleitsubstanzen wie Zucker, Nukleinsäuren oder weitere sekundäre Zellprodukte in Lösung bleiben. Allerdings bleiben ein Teil der Proteine trotz Ammoniumsulfatsättigung gelöst, so dass die Methode nur geeignet ist, wenn keine Totalausbeute der Proteine erwünscht ist. Aufgrund dieser Eigenschaft lässt sich die Methode neben dem Anreicherungs-zweck auch zur Prefraktionierung einsetzen, in dem die Salzkonzentration stufenweise erhöht wird. Das bei der Fällung mitgerissene Ammoniumsulfat kann anschließend entweder durch Gelpermeationschromatographie (Kapitel 2.2.1) oder durch Ultrafiltration (s.o.) entfernt werden. Das aus der Pflanzenextraktion erhaltene Cytosol diente als Ausgangsmaterial für die Prefraktionierung, da in einer Voruntersuchung festgestellt werden konnte, dass die darin gelösten Proteine in genügend hoher Konzentration vorlagen.

Präzipitation

Entsprechende $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ p.a. wurde langsam unter Rühren in die auf 0°C gekühlte Cytosollösung zugegeben. Nach erneutem 20-minütigem Rühren wurde die Suspension für 20 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und für die nächste Fraktionierung entsprechend weiterverarbeitet. Das gefällte Pellet - gelöst in frischem Puffer – konnte weiter untersucht oder aufbewahrt werden. Eine Fraktionierung durch Erhöhung des Salzgehaltes um eine 20%ige Sättigung im Vergleich zur vorliegenden Konzentration wurde standardmäßig durchgeführt (Tabelle 2-10 zeigt die zuzugebende Ammoniumsulfatmenge in 100 mL Lösung bei 0°C ; eine feinere Stufung in 5%-igen Schritten ist ebenfalls möglich und z.B. unter Dawson et al., 1969, beschrieben).

Tabelle 2-10 Konzentration von Ammoniumsulfat (g/100mL Lösung) - % Sättigung bei 0°C

Sättigung	0-20%	20-40%	40-60%	60-80%	80-100%
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [g]	10,6	11,3	12,0	12,9	13,9

2.3 Bestimmung der Elemente

2.3.1 Elementdetektion mit ICP-QMS

Besonders aufgrund der Fähigkeit zur Multielementmessung und infolge der empfindlichen Detektionsbereiche wird die ICP-QMS häufig auf verschiedenen Gebieten der Speziaanalytik verwendet. Durch ihre Robustheit lässt sie sich auch bei der großen Vielfalt an möglichen Probenmatrices bei den verschiedensten Anwendungen einsetzen. Die folgende Ausstattung stand als ICP-Quadrupolmassenspektrometer zur Verfügung:

Tabelle 2-11 Beschreibung der ICP-QMS ELAN6100

Instrumente	Hersteller	Beschreibung
ICP-QMS	Perkin-Elmer (PE)	ELAN6100
Konen	Perkin-Elmer (PE)	Ni-Sampler und –Skimmer
Zerstäuber	Perkin-Elmer (PE)	Ryton™ Cross-Flow Nebulizer
Peristaltische Pumpe	Gilson	Pump Model 312
Kühlsystem	Neslab	CFT75 mit Coolsolution
Controller	Perkin-Elmer (PE)	PE FIAS 200
Autosampler	Perkin-Elmer (PE)	PE AS90b (106 Proben)
Detektor	Perkin-Elmer (PE)	Dual (Pulse- & Analog Detektor)
Computersystem	Dell	Dell-System NT4.0
Steuerungssoftware	Perkin-Elmer (PE)	ELAN6100 ver. 2.2.3
Auswertungsprogramm	MS-Corporation	Microsoft Excel 2000

Materialien und Reagenzien: HCl sp , HNO₃ sp (Merck), Argon (99,996%)

Standardlösungen (Perkin-Elmer):

M-6 : Multielementstandardlösung MerckVI

REE : Multielementstandardlösung PE-REE (á 10mg/L in HNO₃-Matrix)

PGE : Multielementstandardlösung PE-PGE (á 10mg/L in HCl-Matrix)

Interne Standard Indium (1000 mg/L in HNO₃-Matrix)

Optimierlösungen (Fa. Promochem) :

Einzelelementlösungen á 1000µg/L (Li, Mg, Cu, Rh, Ba, Ce, Pb, U)

Ein Quadrupol-Massenspektrometer hat aufgrund seines geringen Auflösungsvermögens von etwa einer Atommasseeinheit (amu) nur begrenzte Möglichkeiten, Multielementmessungen durchzuführen; insbesondere bei Niedermolekularisotopen, deren zu messende Masse eine Interferenz mit einem Massenunterschied kleiner als 1 amu zeigte. Bei Monoisotopen wird die Messung dadurch erschwert, dass man keine Möglichkeit hat, bei Alternativ-Massen Signale zu messen, wie es sonst bei den Multiisotopelementen der Fall ist.

Methodenentwicklung

Aus den Referenzlösungen stehen folgende Elemente zur Auswahl:

M6	:	Li, Be, B, Mg, Al, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, Cd, Ba, Pb, Tl, Bi, U, Se, Ga, Mo, Na, K, As, Cr, V, Ag, Te
REE	:	Sc, Y, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Th
PGE	:	Ru, Rh, Pd, Sn, Sb, Te, Hf, Ir, Pt, Au

Folgende Überlegungen liegen der Auswahl der zu messenden Isotope zugrunde:

- Möglichst häufiges Vorkommen (biologische Ultrapurenelemente).
- Möglichst wenig Interferenzen (Isobare Interferenzen sind durch die Software direkt korrigierbar. Die größere Rolle spielen also die molekularen Interferenzen.).
- Das zu messende Isotop ist in der Referenzstandardlösung enthalten.
- Reproduzierbare Ergebnisse bei Standardkalibrationen.

Die folgenden Elemente wurden durch mehrfache Interferenzstörungen bei den ICP-MS-Messungen nur bei gut identischen wiederholten Quantifizierungen ausgewertet:

B	:	wegen möglicher Kontamination aus Glasmaterialien
Al	:	wegen Aluminiumoxidmaterial (Plasmainjektor in Plasma-Torch)
Fe, Co, Ni, Sr	:	wegen Argon- und/oder Calciumoxidinterferenzen
Se, Sn, Sb	:	wegen ihrer ungenügender Extrahierbarkeit aus der Probenlösung
Allgem. REE	:	wegen Oxidinterferenzen untereinander
Bi	:	wegen des starken Memoryeffekts in Messsystemen
Ga	:	wegen Bariuminterferenzen

Folgende Elemente wurden daraufhin aus der Versuchsreihe herausgenommen:

Ag, Te, Sc, Th, Sc,	
Pd, Hf, Ir, Pt, Au	: wegen ständiger Unreproduzierbarkeit bei Standardmessungen
Na, K	: wegen zu hohen Konzentrationen in den Probenlösungen
As, Cr, V	: wegen zu hohen Chlor-Interferenzen aus dem Tris-HCl-Puffer

Eingestellte Instrumentenparameter im Betriebszustand:

Kühlung	:	10-28°C mit 1,7 L/min (245-420kPa)
Betriebsvakuum	:	erzielt durch 2 Turbomolekularpumpen, ca. 2×10^{-5} Torr

B.	Element	MW	Dwell Time [ms]		Element	MW	Dwell Time [ms]
1	B	11	20	5	Ru	101	25
2	Al	27	30	6	Rh	103	25
3	Fe	57	30	7	Sn	118	30
4	Se	82	30	8	Sb	121	30

Indium als Interner Standard

Die unterschiedlichen Mengen an Elementen in der Lösung (aus der Probe bzw. Matrix) erzeugte bei der Ionisierung verschiedene Ionendichten im Plasma. Das bedeutete, dass die gleiche Konzentration eines bestimmten Elements bei der Ionenextraktion aus dem Plasma durch eine übermäßige Präsenz anderer Elemente unterdrückt würde. Um eine repräsentative Quantifizierung zu gewährleisten, musste somit stets ein gleich dosierter interner Standard der Probelösung zugegeben werden. Zur Multielementbestimmung der biologischen Proben mit ICP-QMS wird allgemein ein seltenes Element als interner Standard verwendet, das in den Proben kaum vorkommt. Die Wahl traf dabei auf Indium, das in den o.g. Multielementstandardlösungen nicht enthalten war (Perkin Elmer, ELAN 6100-Manual). Als Endkonzentration des internen Indiumstandards haben sich bei den meisten Messungen 10 µg/L als ausreichend erwiesen. Es trat ein genügend hohes Countsignal für Indium auf, das kaum von dem sehr geringen Eigensignal aus der Probenmatrix gestört wurde.

- Interner Standard : 10 µg/L In in ~ 0,8 % HNO₃ s.p. als Endkonzentration
in der zu messenden Probenlösung
- Messung : In-Isotop bei 115 mit isobarer Korrektur durch Sn-115
Dwell-Time von 20 ms (Signalcount bei ca. 60.000-70.000 cps)

Externe Multielementkalibration

Bei dem hohen Probendurchsatz (Messung der GPC- und PAGE-Fraktionen) und den geringen Fraktionsmengen war eine externe Kalibration die Methode der Wahl. Es hatte sich bei der Multielementkalibration bewährt, eine Stammlösung aus den 3 Merck- / Perkin-Elmer-Multielementstandardlösungen herzustellen, die nach vier bis fünf Tagen meist verbraucht war. Daraus wurde zu jeder Tagesmessung eine frische Standardreihe von 4 bis 5 unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt. Da das Dualdetektorsystem des ELAN 6100 eine lineare Kalibration über 8 Größenordnungen ermöglichte, wurde Zehnerpotenzkonzentration als Verdünnungsreihe verwendet, um die breiten Bereiche der Spezieskonzentrationen möglichst abdecken zu können (die einzelnen Elementkonzentrationen sind den gelieferten Zertifikaten der Standardreferenzen zu entnehmen).

Stammlösung	: 1 mL Merck-VI, 100µL REE, 100µL PGE ~ 10 mL HNO ₃ sp auf 100mL
Standardsreihe (je enthält 10ppb In)	: S1 ohne Stammlösung (als Kalibrationsblank) S2 1:10000 der Stammlösung S3 1:1000 der Stammlösung S4 1:100 der Stammlösung S5 1:10 der Stammlösung
Regression	: Linear Through Zero

Interferenzkorrekturen

Aufgrund zahlreicher Oxidinterferenzen lag die Komplexität der Optimierungsarbeit größtenteils in der Methodenprogrammierung. Die Interferenzen sind zum einen auf die zugesetzten Reagenzien, wie z.B. der Aufschlusssäure und/oder dem Tris-HCl-Puffer, und zum anderen auf die Inhaltstoffe in der Probe selbst zurückzuführen. Um die interferierenden Isotope quantitativ messen zu können, wurden verschiedene Interferenzuntersuchungen vor der Messung der Elementkonzentrationen durchgeführt. Folgende Elemente mit einem allgemein bekannten, störenden Interferenzverhalten wurden untersucht:

- (i) Nicht-Metall-Elemente: C, N, Cl, P, S
- (ii) Metall-Elemente: Ca, Ba, die Elemente der Seltenen-Erden

Aufgrund der variierenden und hohen Elementkonzentrationen (Gruppe (i)) aus der Matrix waren die Korrekturen zur Interferenzeliminierung sehr aufwendig. Um die Arbeit der Multielement-Speziation effizient zu halten, wurde deshalb auf die Messung solcher Isotope verzichtet, die durch die o.g. Nicht-Metall-Elemente stark interferiert wurden (vgl. Methodenentwicklung Seite 44). Die Korrekturarbeiten wurden dann auf die Isotope beschränkt, die nur durch die Oxide der Metall-Elemente (Gruppe (ii)) interferiert wurden. Algebraische Korrekturen wurden bei folgenden Isotopen vorgenommen:

Fe-57	: CaO-Korrektur	Gd-158	: DyO-, NdO-, CeO-Korrektur
Co-59	: CaO-Korrektur	Tb-159	: NdO-Korrektur
Ni-60	: CaO-Korrektur	Dy-163	: SmO-Korrektur
Ga-69	: BaO-Korrektur	Ho-165	: SmO-Korrektur
Sr-88	: CaO-Korrektur	Er-166	: NdO-, SmO-Korrektur
Nd-142	: CeO-Korrektur	Tm-169	: EuO-Korrektur
Sm-152	: GdO-, BaO-Korrektur	Yb-172	: GdO-Korrektur
Eu-153	: BaO-Korrektur	Lu-175	: TbO-Korrektur

Während die isobaren Interferenzen direkt von der Software korrigiert wurden, musste man die Korrekturfaktoren der Oxidinterferenzen experimentell bestimmen. Tabelle 2-13 zeigt ein Rechenbeispiel zur Interferenzkorrektur für das Gd-Isotop (Messung des Isotops 158). Dazu wurden Untersuchungen von Dy-, Ce-, und Pr-Oxid durchgeführt. Eine Liste der interferierenden Metalloxide ist in der Datenbank der Instrument-Control-Software aufgeführt. Da die Vorkommen der genannten störenden Metalloxide (Wert a in der Formel) sowie die der interferierenden Isotope (Wert b in der Formel) aus der Datenbank ebenfalls bekannt sind, ließen sich die Korrekturfaktoren nach Feststellung der Oxidbildungsrate wie folgt berechnen (PerkinElmer, ELAN6100-Manual):

$$\text{Interferenzcounts auf Masse 158 (durch CeO)} = \frac{\text{Abundance CeO-158 (a)}}{\text{Abundance Ce-140 (b)}} \times \text{Oxidbildungsrate}$$

Tabelle 2-13 Vier Korrekturfaktoren zur Gd-Messung auf der Istotop 158 (eine isobare Interferenz durch Isotop Dy-158 und drei Molekülinterferenzen durch Oxide der Ce, Pr, Nd).

(Die Oxidraten wurden experimentell bestimmt, während die Element-/Isotopvorkommen a und b aus der Instrument-Datenbank bereits angegeben waren).

Interferenz des Gd158 durch	Abundance (a)	Oxidrate	Ausgewählte Isotop zur Korrektur	Abundance (b)	Korrekturfaktor
Dy	0,1		Dy-163	24,9	- 0.004016 * Dy 163
CeO	11,2238	3,10%	Ce-140	88,48	- 0.003932 * Ce 140
PrO	0,037	2%	Pr-141	100	- 0.000007 * Pr 141
NdO	27,0447	2,10%	Nd-142	27,13	- 0.021671 * Nd 142

Analog zu dem Beispiel wurden für die Messung der o.g. Elemente die Oxidbildungsraten der interferierenden Metalloxide experimentell bestimmt. Die berechneten Korrekturfaktoren wurden in die Methoden eingetragen. Die vom Hersteller gelieferte Datenbank (eingebaut in der Applikation-Steuerungssoftware der ELAN6100 vs.2.2.3) diente dabei als Datenquelle für die Isotopverhältnissen der ausgewählten Elemente sowie deren einzelnen Oxidvorkommen.

Um zu vermeiden, dass die Korrekturarbeiten für alle interferierenden Isotope an jedem Messtag stets neu durchgeführt werden musste, wurde ein Leitelement ausgesucht, das zur Überprüfung der Oxidbildungsrate herangezogen werden konnte. Unter der Isotopliste stellte

das Cer das meist oxidbildende Element dar. Deshalb wurden die Instrumentenparameter so eingestellt, dass bei den Messungen die Oxidbildungsrate des Cers die 3%-Marke nicht überstieg. Dabei betragen die Oxidbildungsraten anderer Elemente ebenfalls weniger als 3%. Darüber hinaus zeigten sie in höheren Konzentrationbereichen konstante Werte. Abbildung 2-1 stellt die Oxidbildungsverhalten einiger Elemente der Seltenen-Erden dar, die sich in steigenden Konzentrationen bei verschiedenen Isotopmassen nahezu konstant verhielten (s. die gemessenen Isotope von GdO-174/176 und DyO-179/180).

Eine zusammenfassende Grafik (Abbildung 2-2) zeigt die in den täglichen Optimierungen erzielte Oxidbildungsrate und die Bildungsrate der doppelgeladenen Ionen im Zeitraum von einem Jahr. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, verhielten sich die Oxidbildungsraten anderer Elemente auch in größeren Zeitraum nahezu konstant, da stets mit fest eingestellten Bedingungen gearbeitet wurde (optimierte CeO-Bildungsrate $\leq 3\%$). Auch die Bildungsrate der Ba²⁺-Ionen von $0,09\% \pm 0,04\%$ (im Jahresdurchschnitt) zeigte sich nahezu konstant (s. Graphik), da die Bildung der doppelgeladenen Ionen unmittelbar von denselben Optimierungsparametern abhängig war.

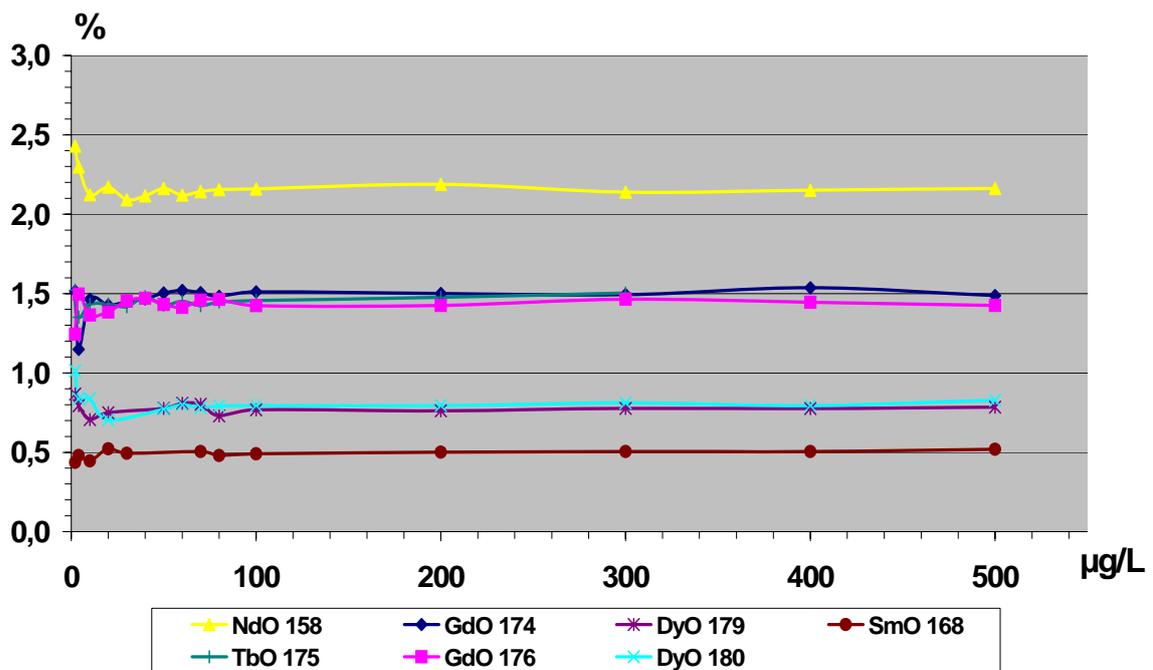


Abbildung 2-1 Die Untersuchung weiterer Oxidbildungsraten ausgewählter Elemente der Seltenen-Erden unter definierten Optimierungsbedingungen
(In der Darstellung sind die prozentualen Verhältnisse der Signalcounts jeweils zwischen den Oxiden und ihren oxidfreien Isotopen abgebildet)

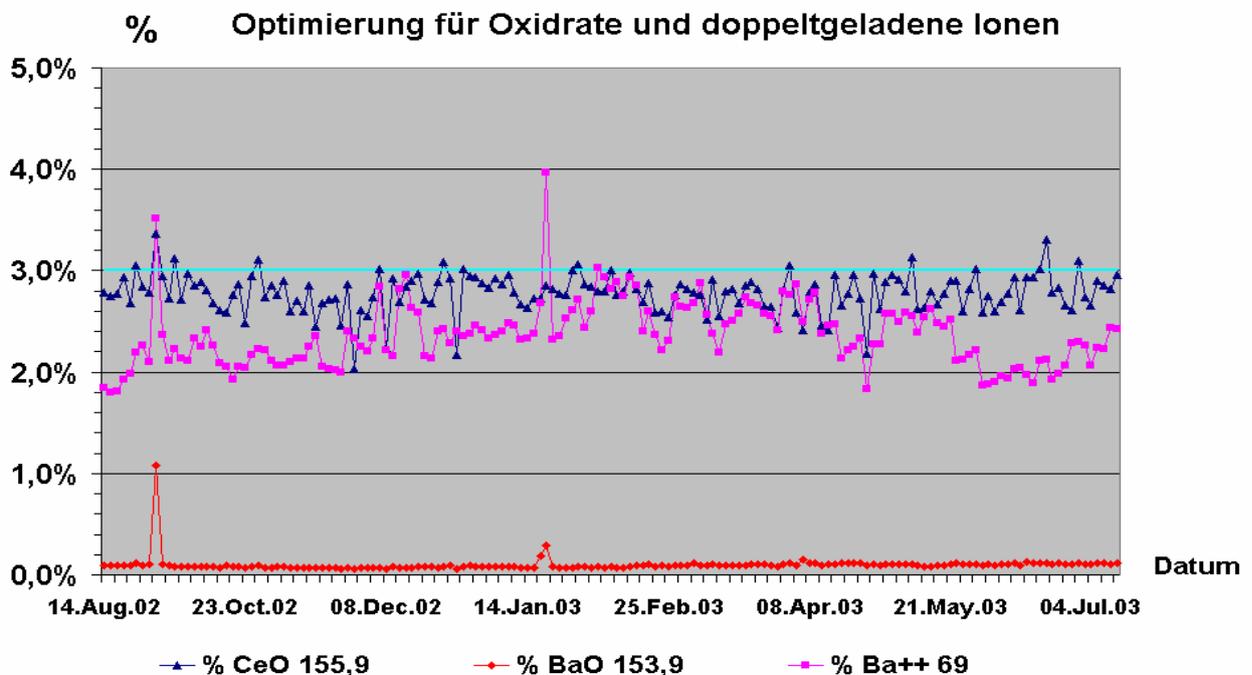


Abbildung 2-2 Die Bildungsrate von CeO/Ce, BaO/Ba, und Ba²⁺/Ba bei täglichen Messkontrollen.
(Jeweils nach Optimierung des Argon-Nebulizer und der Auto-Linsen-Spannung. Die 3%-Markerlinie diente als Orientierung).

2.3.2 Elementdetektion mit Graphitrohrfen-AAS

Die Cadmiumbestimmung mittels elektrothermaler Atomspektrometrie (ET-AAS) kam wegen ihres sparsamen Probenverbrauches zum Einsatz. Die Methode wurde bei der Identifizierungsarbeit der Cadmiumspezies in Arabidopsiszytosol herangezogen (Kapitel 3.4). Die in die verschiedenen Fraktionen aufgetrennten Inhaltstoffe sollten nach der Entnahme für die Cd-Bestimmung zum überwiegenden Anteil für präparative Zwecke weiterverwendet werden. Den Fraktionen aus der GPC-Trennung bzw. aus der nativen PAGE wurden kleine Mengen für die Untersuchung entnommen und deren Cd-Gehalt nach einer externen Elementkalibration bestimmt. Als Matrixmodifier zur Cadmiumbestimmung kommen gemäß den Herstellerangaben Palladium und Magnesiumnitrat zum Einsatz (Perkin Elmer, SIMA6000-Manual).

Weitere Reagenzien und Parameter zur Messung sind im Folgenden aufgeführt:

Standard	:	ICP Cd-Standard (Promochem, 1000µg/L)
Matrix Modifier	:	[15µg Pd ³⁺ + 10 µg Mg(NO ₃) ₂] / 20 µL
Probenvolumen	:	á 20 µL (Proben und Modifier)
Auswertung	:	Peakfläche
Säure	:	HNO ₃ sp (Merck)
Kalibration	:	Linear Through Zero

Tabelle 2-14 Instrumentbeschreibung der ET-AAS SIMA6000

Instrumente	Hersteller	Beschreibung
ET-AAS	Perkin-Elmer (PE)	SIMA6000
Graphitrohrchen	Perkin-Elmer (PE)	Unbeschichtete L'vov Plattform
Cd-Lampe	Perkin-Elmer (PE)	Hohlkathodenlampe, 7mA
Steuerungssoftware	Perkin-Elmer (PE)	AA WinLab Analyst Vers.2.50
Probengefäß	Perkin-Elmer (PE)	PE-Einweg Sampler

Tabelle 2-15 Temperaturprogramm zur Cadmiumbestimmung mit der ET-AAS

Stufe	1	2	3	4	5	6	7
Temp.(°C)	90	120	400	800	1700	2500	20
Rampe (s)	1	1	40	10	0	1	1
Haltezeit (s)	20	20	10	20	4	5	5

2.3.3 Proteinidentifizierung mit MALDI-TOF-MS

Die Besonderheit der MALDI-TOF-MS (Matrix unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie) liegt in der schonenden Ionisation der nichtflüchtigen, thermisch labilen organischen Verbindungen, wobei es sich meist um hochmolekulare Biomoleküle handelt. Die makromolekularen Analyten sind auf einem metallischen Träger in einer festen niedermolekularen organischen Matrixverbindung eingebettet. Bei einer Bestrahlung der Proben mit UV-Laser verdampfen die Matrixsubstanzen explosionsartig und reißen die Analyten unter schonender Ionisation mit. Die entstehenden Ionen sind meist einfach geladen und lassen sich durch verschiedene, physikalische Trennverfahren auftrennen und dienen durch ihre spezifischen Fingerprintfragmente zur Charakterisierung der Makromoleküle wie z.B. die Proteine, Polysaccharide, Peptide oder Nukleinsäuren. Das einfachste Massentrennverfahren stellt die TOF-MS dar (Time of Flight), wobei die entstehenden Ionen entsprechend ihrer Massen in den Massenanalysator unterschiedlich beschleunigt werden, und dadurch mit unterschiedlicher Geschwindigkeit bzw. mit unterschiedlicher Verweilzeit in der Vakuumtrennstrecke im Detektor registriert werden.

Tabelle 2-16 Voyager – MALDI-TOF-MS

Instrumente	Beschreibung
MALDI-TOF-MS	Applied Bioscience
Probenträger	SCOUT-Multiprobe Inlet
Laser	Laser wie dieser: N ₂ -Laser (337 nm, 3 ns Pulsbreite)
Steuerungssoftware	Voyager Control Panel vers.5.0

Weitere Reagenzien und Messbedingungen sind wie folgt:

- Beschleunigungsspannung: 20 kV Voyager DE-STR
- Reflectron-Spannung: Mirror to Accelerating Voltage Ratio 1.12
- Time delay: 100 ns
- Filterspannung (grid voltage): 65 %
- Proteinstandard: Sequazym Peptid Standard Kit
(Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland)
- Matrixreagenz: α -Cyano-4-hydroxy-cinnamid acid
Gesättigt in 50% (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) TFA

Probenvorbereitung :

5 μ L Proteinlösung wurde mit 5 μ L Matrixreagenz gemischt. Zur Messung wurde 1 μ L der Lösung auf dem Metalltarget aufgetragen und nach Trocknung in die Vakuumröhre eingeführt (dried droplet method).

2.3.4 On-line-Service zur Proteinidentifizierung durch Datenbank-Abfrage

Zur Auswertung der erhaltenen Peptidfingerprints wurden zwei Suchalgorithmen parallel herangezogen. Die auf MALDI-TOF-MS-Applikation spezialisierten Suchprogramme sind unter anderen auf den Websites der beiden folgenden Universitäten zugänglich (Abbildung 2-3):

- Die Rockefeller-Universität (PROWL, ProFound) :
http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe
- Die SanFrancisco-Universität (UCSF, MS-Fit)
<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>

Durch variable Menüwahl ließen sich verschiedene mögliche Optionen eingeben, unter denen die erhaltenen MALDI-TOF-MS Massenfragmente gemessen wurden. Die festeingestellten Parameter wurden unter anderen wie folgt eingegeben:

- | | |
|---|---|
| ❖ zur Verdauung eingesetztes Enzym: | Trypsin (Modified Trypsin) |
| ❖ Reagenz zur Reduktion der Disulfid-Bindung: | Iodacetamid (ProFound)
Carbamidomethylation (MS-Fit) |
| ❖ untersuchte Spezies des Organismus: | Arabidopsis thaliana. |
| ❖ Gesuchtes Molekulargewicht und pI der Proteine: | Alle |
| ❖ Ionenart der Peptidmasse: | Monoisotop (MH ⁺) |

Weitere Parameter wurden variiert, um zufriedenstellende Trefferergebnisse zu erzielen:

- | | |
|---|---------------------|
| ❖ Massentoleranz: | 50 bis 100 ppm |
| ❖ Mindestanzahl des übersprungenen Peptidverdaus: | 0 bzw. 1 |
| ❖ Mindestanzahl der zutreffenden Peptidfragmente: | > 4 |
| ❖ Kombination von Kandidaten: | Single protein only |

In die on-line-Datenbank-Abfrage wurden die Massenfragmente eingegeben und die möglichen Proteinkandidaten wurden nach einer Vergleichssuche mit Prozentwahrscheinlichkeiten aufgelistet, abhängig davon wie viele Übereinstimmungen der in Datenbank eingetragenen Sequenzen mit denen in das Formular eingegebenen Spektren vorlagen. Von einer guten Zuordnung der Proteine kann man ausgehen, wenn neben der Übereinstimmung der Ergebnisse bei verschiedenen eingestellten Parameter jeweils eine angezeigte Trefferwahrscheinlichkeit des Kandidats mit mindestens einer vierstelligen Zahl (>1000; Mowse-Score, MS-Fit) bzw. > 50% (ProFound) vorgeschlagen wird (Mündliche Überlieferung, Niebisch-IBT1-FZ Jülich). Darüber hinaus ist ein Verweis direkt zu den in den Datenbanken eingetragenen Informationen über die Proteine immer unter den aufgeführten Analyseergebnissen angegeben.

MS-Fit (by [Peter Baker](#) and [Karl Clauser](#)) [Instructions](#)

A peptide mass fingerprinting tool from the [UCSF Mass Spectrometry Facility](#) that tries to fit a user's mass spectrometry data to a protein database and thus suggest the identity of the user's protein. The MS input data should be generated by analyzing the peptides produced from a user's protein.

ProteinProspector Home	MS-Tag	MS-Seq	MS-Pattern	MS-Bridge	MS-Fit at UCSF (San Francisco)
MS-Digest	MS-Product	MS-Comp	DB-Stat	MS-Homology	MS-Isotope

Database: DNA Frame translation:
 Search Hits: From: Filename:
 Output Type: Save Hits to file: Filename:
 Accession Numbers:

Digest:
 Max. # of missed cleavages:
 Cys modified by:
 N term: C term:

Species:
 Species Codes:
 MW of Protein: (from Da to Da) All
 Protein pI: (from to) All

Names:

Start Search

Maximum Reported Hits:
 Sample ID (comment):
 Sort By:
 Min. # peptides required to match:
 Report MOWSE Scores: Pfactor:
 Chem Score: Met Ox Factor:

Possible Modifications Mode (default)

 User Defined Modification 1:

OR

Homology Mode (select any mode but identity)
 Search mode:
 Min. # matches with NO AA substitutions:

Instrument:
 Peptide masses are:
 Mass Tolerance: +/- ppm
 Systematic Error:

Contaminant Masses:

Data Format:

Display Graphs:

Data Paste Area

```

676.3718
825.4571
1017.5370
1026.5964
1040.6121
1105.4550
1196.7132
1218.5796
1243.5887
1255.6538
1260.5928
1266.6281
1276.5836
1288.6094
1305.6310
1388.6975
    
```

Abbildung 2-3 On-line-Abfrage-Formular zur Proteinidentifizierung

Quelle: MS-Fit, SanFrancisco-Universität (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>)

(Fortsetzung Abb. 2-3 On-line Abfrage-Formular zur Proteinidentifizierung)

ProFound - Peptide Mapping [Short Form] Version 4.10.5
The Rockefeller University Edition

General	Digestion
Sample ID: <input type="text" value="Spot-1"/>	Allow maximum: <input type="text" value="1"/> missed cleavages
Database: <input type="text" value="NCBI nr (2005/05/01)"/>	Enzyme: <input type="text" value="Trypsin"/>
Taxonomic Category: <input type="text" value="Arabidopsis thaliana"/>	For user-defined cleavage, please click here .
Search for: <input type="text" value="single protein only"/>	Modifications
Protein Mass: <input type="text" value="0"/> - <input type="text" value="3000"/> kDa	Complete Modification(s)
Protein pI: <input type="text" value="0"/> - <input type="text" value="14"/>	<input type="text" value="Unmodified"/>
Report Top: <input type="text" value="10"/> Candidates	<input type="text" value="4-vinyl-pyridine (Cys)"/>
Questions? Please write to ProFound	<input type="text" value="Acrylamide (Cys)"/>
What's new about ProFound?	<input type="text" value="Iodoacetamide (Cys)"/>
	<input type="text" value="Iodoacetic acid (Cys)"/>
	Partial Modification <input type="checkbox"/> Methionine oxidation
	For more partial modifications, please click here .
Masses	
Average Masses:	Monoisotopic Masses:
<input type="text"/>	<input type="text" value="2086.000856"/>
	<input type="text" value="2102.908406"/>
	<input type="text" value="2107.954215"/>
	<input type="text" value="2125.956338"/>
Mass tolerance for average data: +/- <input type="text" value="1"/>	Mass tolerance for monoisotopic data: +/- <input type="text" value="0.3"/>
Tolerance unit: <input checked="" type="radio"/> Da <input type="radio"/> % <input type="radio"/> ppm	Charge state: <input type="radio"/> M <input checked="" type="radio"/> MH+
<input type="button" value="Identify Protein"/>	<input type="button" value="Extra Settings"/>
<input type="button" value="Example"/>	<input type="button" value="Reset Form"/>

Quelle : Prowl / ProFound, Rockefeller Universität

(http://prowl.rockefeller.edu/profound_bin/WebProFound.exe)

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Im Folgenden wird zunächst veranschaulicht, wie sich die Extrahierbarkeit der untersuchten Elemente aus den verschiedenen Pflanzenmaterialien verhielt (Cytosol/Pellet-Verteilung). Es folgen die Elementanalysen der Cytosole nach der chromatographischen Trennung sowie die Probleme, die auf Adsorptionseffekte an dem GPC-Säulenmaterial zurückzuführen waren. Anschließend wird auf den Identifizierungsversuch der hochmolekularen Cadmium-bindungsformen im Cytosol der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* eingegangen. Die Abbildung 3-1 zeigt den Arbeitsverlauf als Flussdiagramm.

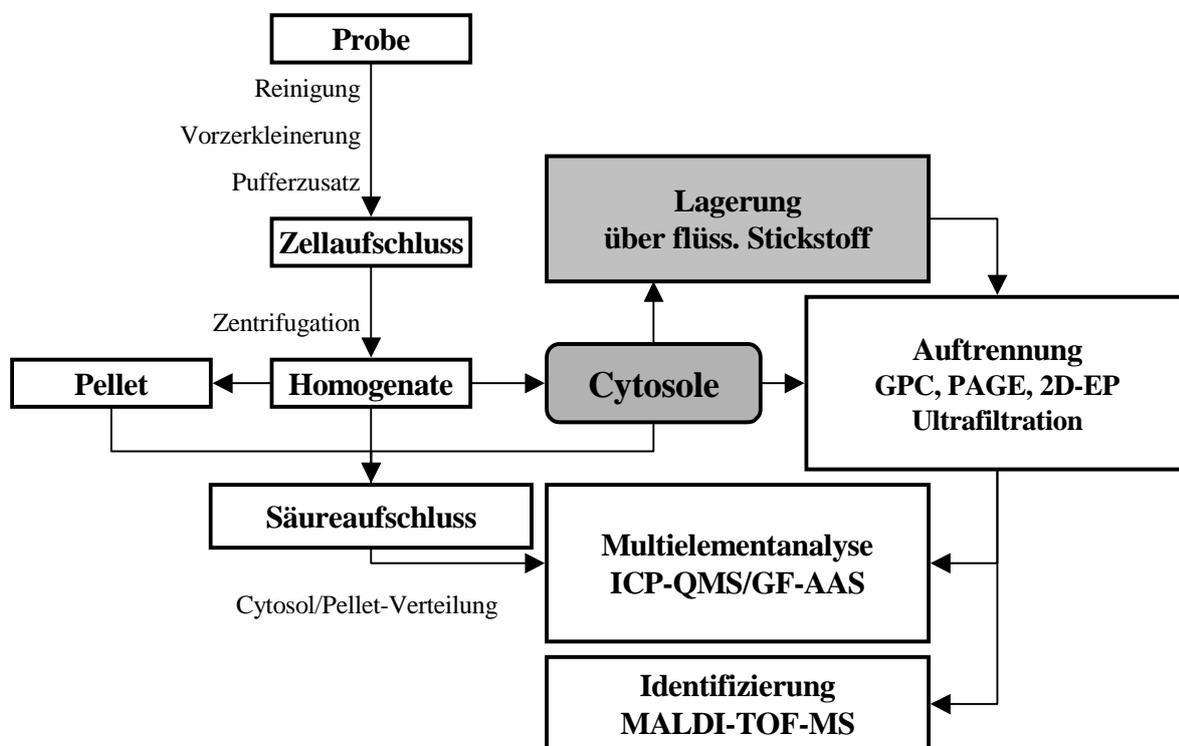


Abbildung 3-1 Die einzelnen Arbeitsschritte als Flussdiagramm zur Multielement-Speziesanalytik.

Da die Multielementuntersuchung in den gewonnenen Pflanzencytosolen durch Kopplung der GPC-Sephacryl-S400-HR mit der Quadrupol-ICP-MS eine sehr große Datenmenge lieferte, sind die ausführlichen Einzelergebnisse im Kapitel 6 - Anhang als Nachschlagewerk gesondert aufgeführt, während in diesem Kapitel die ausgewerteten Ergebnisse in möglichst übergreifenden Zusammenhängen diskutiert werden.

3.1 Verteilung der Elemente zwischen Cytosol und Pellet

Der entscheidende Schritt, durch invasive Methoden die Bindungsformen von Elementen in festen Lebensmitteln zu bestimmen, liegt darin, einen möglichst großen Anteil der zu spezifizierenden Elemente in Lösung zu bringen, damit sie nachfolgenden Untersuchungen durch Trennmethode wie z.B. Chromatographie oder Elektrophorese überhaupt zugänglich sind. Dieser als Initialschritt der Speziesanalyse bezeichnete Vorgang ist ein äußerst wichtiger Teil einer Element-Speziation, da sich hier grundsätzlich zeigt, welcher prozentuale Anteil eines Elementes bei der betreffenden Matrix durch klassische Methoden näher charakterisiert werden kann. In dieser Studie bestand der Initialschritt in einer Behandlung des Pflanzenmaterials mit einem elektrischen Dispergiergerät (Ultra-Turrax) in Pufferlösung (liquid-sharing) mit nachfolgender Zentrifugation der Homogenate (Günther, 1995).

3.1.1 Cytosolgewinnung aus Pflanzen

Bei der Cytosolherstellung durch vorausgehende Zerkleinerung mit einer Glasscherbe und anschließendem Ultra-Turrax-Zellaufschluss konnten aus den untersuchten Pflanzenproben verschieden hohe Ausbeuten von Cytosolen gewonnen werden. Das Versetzen des ursprünglichen Gesamtmaterials mit Tris-HCl-Puffer (1:3-Verhältnis) vor dem Zellaufschluss führte somit zu unterschiedlichen Verdünnungen bei den jeweiligen Pflanzencytosolen. Die Abbildung 3-2 veranschaulicht verschiedene Verdünnungseffekte im prozentualen Vergleich zwischen dem eigentlichen Pflanzenextrakt und dem Anteil unter Berücksichtigung des Pufferzusatzes (Ausführliche Werte: s. Kapitel 6.1.1 - Anhang).

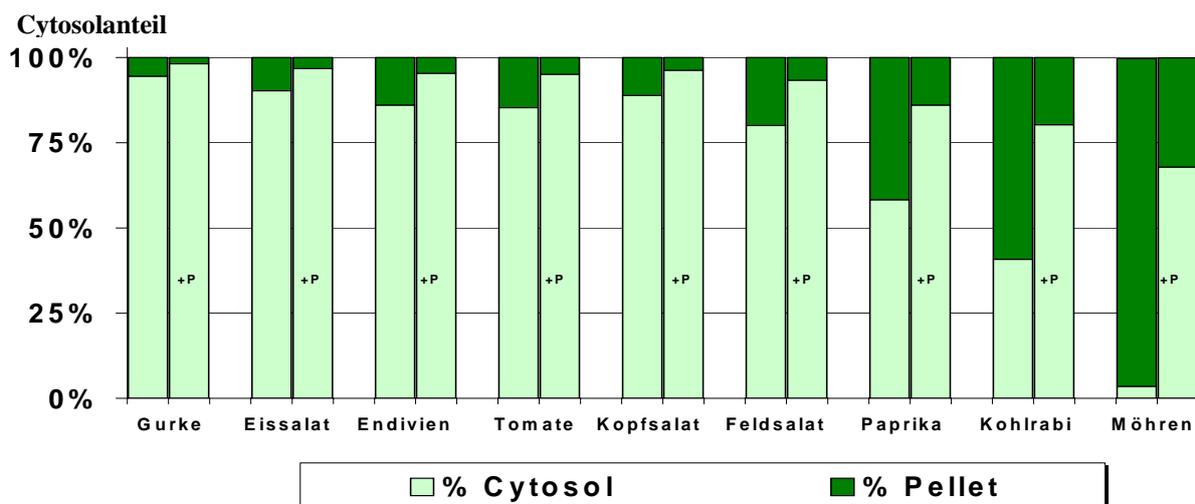


Abbildung 3-2 Anteile der gewonnenen Cytosol in Gewichtsprozent von ursprünglichen Pflanzenmaterial (Linker Balken: ohne Pufferzusatz, rechter Balken: mit Pufferzusatz)

So lag der Verdünnungsfaktor in den wasserreichen Lebensmitteln durch den Pufferzusatz (z.B. bei Gurke und Salate mit 80-90% wässrigem Extraktanteil) im Verhältnis zu den Anfangskonzentrationen nahezu bei drei, während er bei Kohlrabi schon bei sechs und bei Möhren sogar bei fünfzig lag. Bei einigen Proben mit härterer Zellstruktur ließen sich nämlich keine vergleichbaren Ausbeuten an löslichen Extrakten wie bei den wasserreichen Pflanzen mit weicher Zellstruktur erzielen. Eine zu starke Verdünnung konnte in diesem Fall dazu führen, dass die Konzentrationen der zu messenden Elemente unter die Bestimmungsgrenze des Säure-Puffer-Blindwertes sanken.

3.1.2 Die Zellaufschlussmethode (Ultra-Turrax)

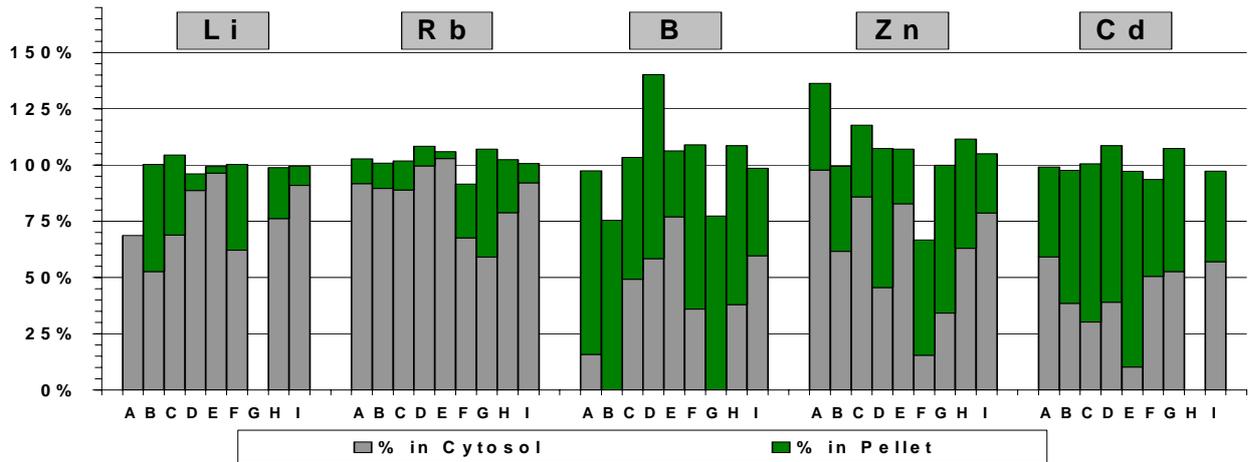
Zuerst wurde der Kontaminationseffekt bei der Ultra-Turrax-Behandlung untersucht. Dafür wurden bei der Herstellung von Kohlrabicytosol die Elemente vor und nach der Turrax-Behandlung mit der ICP-QMS untersucht. Die Mittelwerte aus der Mehrfachbestimmung der Elemente zeigen bis auf wenige Ausnahmen zufriedenstellende Wiederfindungsraten (90-120%). Diese Ausreißer sind wiederum auf vereinzelte Kontaminationen zurückzuführen, die in den weiteren Untersuchungen nicht erneut vorkamen.

Aufgrund der einfachen und schnellen Handhabung der Zellaufschlussmethode (Ultra-Turrax) für eine umfassende Studie mit sehr vielen Pflanzen, sowie tolerierbaren Blindwerten verglichen mit anderen Methoden (z.B. Verreiben mit Quarzsand nach Gefriertrocknung) ist das elektrische Dispergiergerät für die vorliegenden Zwecke die Methode der Wahl. Zur Untersuchung der Extrahierbarkeit der Elemente (Cytosol/Pellet-Verteilung) wurden die Pflanzenproben nach einem Zusatz der doppelten Menge an Trispuffer einheitlich mit dem Ultra-Turrax dispergiert. Die entstehenden Homogenate, sowie deren Cytosole und Pellets wurden nach einem Säureaufschluss einer Multielementanalyse mit ICP-QMS unterzogen.

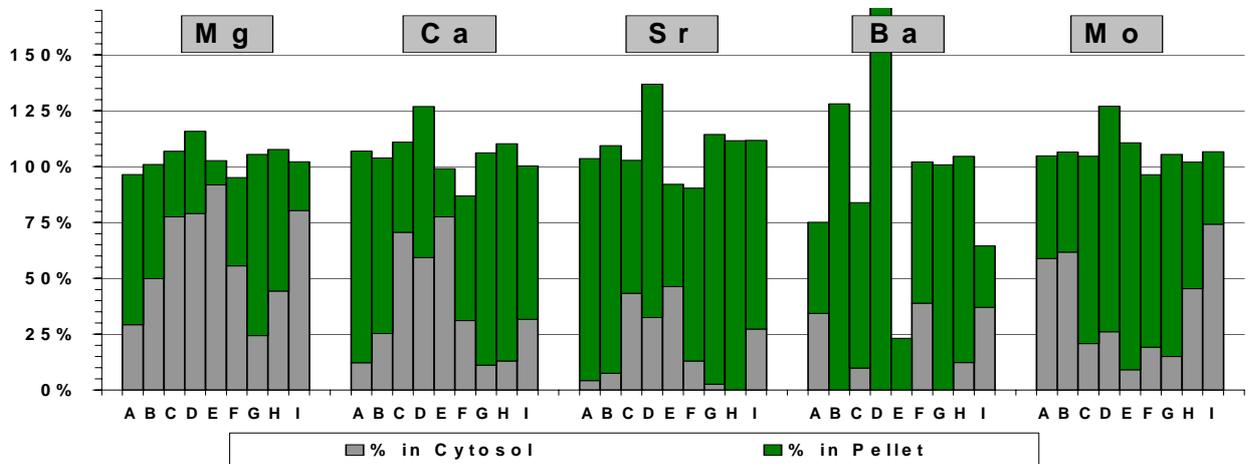
3.1.3 Verteilung der Elemente in den Homogenaten auf Cytosol und Pellet

Die Abbildung 3-3 zeigt eine Übersicht der prozentualen Anteile an messbaren Elementen, jeweils zusammengesetzt aus dem Anteil, der nach der Zentrifugation des Probenhomogenats in den löslichen Cytosolanteil überführt wurde (unterer Balken) und dem Anteil, der gebunden in dem unlöslichen Pelletanteil zurückgeblieben ist (oberer Balken).

WDF



WDF



WDF

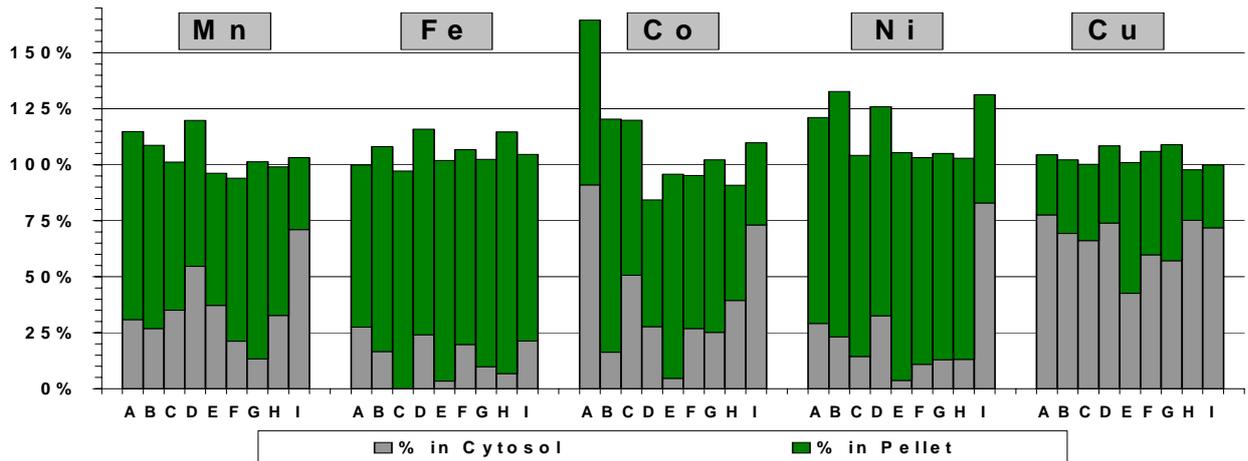


Abbildung 3-3 Verteilung von 15 Elementen auf Cytosol-Pellet-Fractionen bei 9 verschiedenen Pflanzen

(Die gemessene Konzentration im Homogenat wurde zu 100% gesetzt). WDF: Wiederfindung der Elemente. Grauer Balken (unten) : % im Cytosol, Grüner Balken (oben) : % im Pellet; A: Eisbergsalat, B: Endiviensalat, C: Feldsalat, D: Kopfsalat, E: Kohlrabi, F: Gurke, G: Möhren, H: Paprika, I: Tomate

Über 50% Cytosolanteil wurde bei Li, Rb, Zn, Mg und Cu in allen Proben gefunden, über 35% bei B, Cd, Ca, Mn, Co und Mo, zwischen 25-35% bei Fe, Ni, Ba, Sr. Bei vielen anderen Elementen konnten entweder nur vereinzelte Werte erfasst werden (Vgl. Abbildung 3-4) oder die Konzentrationen lagen unter dem Säureblindwert (nicht dargestellt). Für jeden Wert wurde jeweils eine dreifache Bestimmung durchgeführt. Die Standardabweichungen wurden aus Übersichtlichkeitsgründen in Abbildung 3.3 bzw. 3.4 nicht dargestellt, sind aber in Kapitel 6.1.2 –Anhang zu finden.

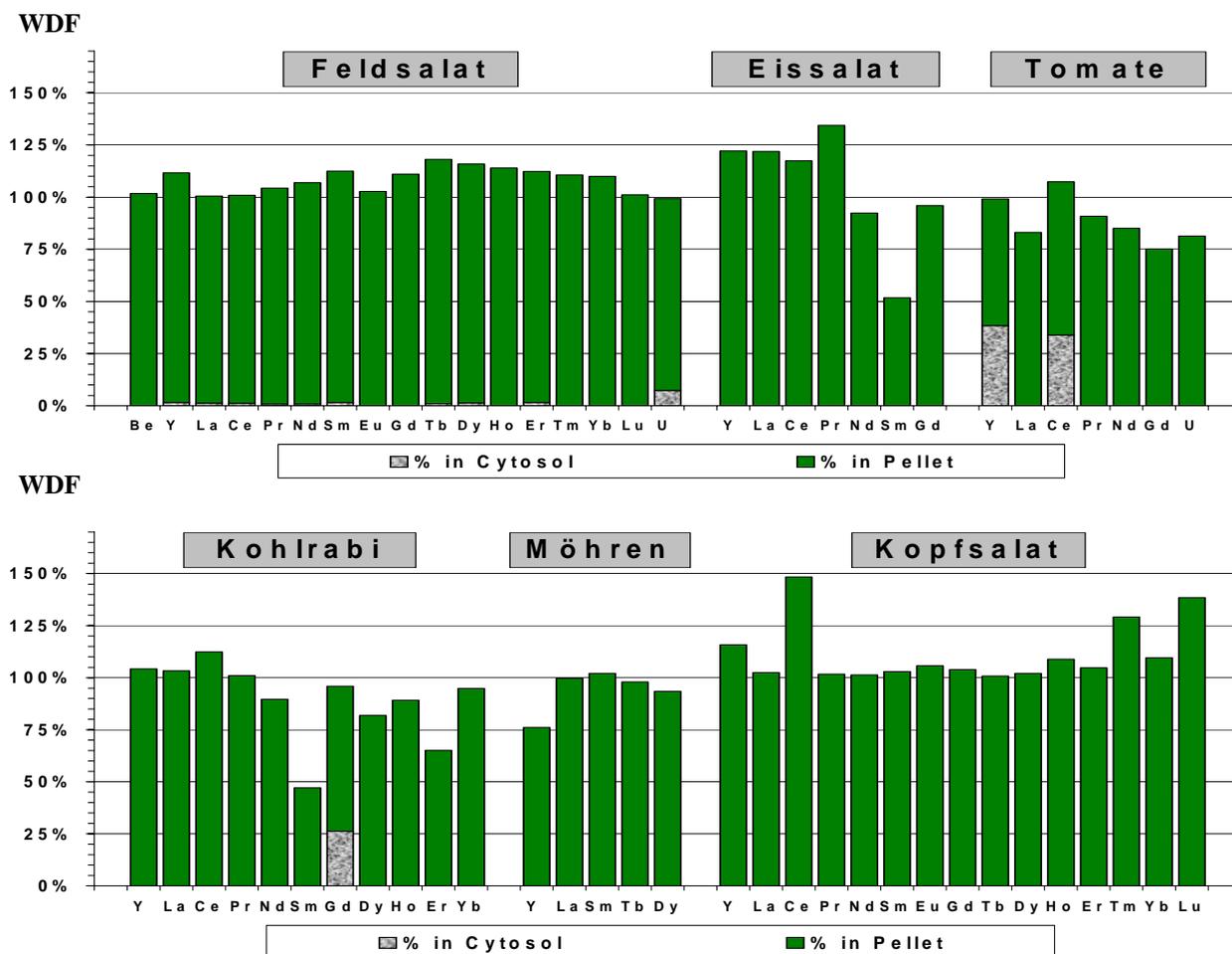


Abbildung 3-4 Verteilung von Elementen der Seltenen-Erden auf Cytosol-Pellet-Fractionen

Die gemessene Konzentration im Homogenat wurde zu 100% gesetzt. WDF: Element-Wiederfindung. Grauer Balken (unten) : % im Cytosol, Grüner Balken (oben) : % im Pellet

Eine äußerst geringe Cytosolbürtigkeit zeigten die Elemente der Seltenen-Erden bei allen Pflanzen. Hier waren die größten Anteile dieser Elemente an Pelletbestandteile gebunden (Abbildung 3-4). In Endiviensalat, Paprika und Gurken wurden kaum messbare Konzentrationen der Elemente der Seltenen-Erden gefunden. Deshalb sind sie in der Abbildung nicht enthalten. Die Verteilung der restlichen Elemente wurde aufgrund der

Übersichtlichkeit hier nicht graphisch dargestellt. Eine ausführliche Auflistung einschließlich des prozentualen Pelletanteils, der Homogenate und ihrer jeweiligen Standardabweichung ist in Kapitel 6.1.2 - Anhang aufgeführt.

3.2 Elutionsverhalten der Spezies bei Gelpermeationschromatographie

3.2.1 Adsorption von freien Kationen

Ein bekannter Effekt bei der GPC ist, dass sich bei niedrigen Ionenkonzentrationen die Ionenaustauscheigenschaft des Säulenmaterials (Sephacryl) neben der Filtrationseigenschaft bei der Trennung bemerkbar macht. Sind in der Cytosolprobe bzw. mobilen Phase freie und/oder schwach gebundene Ionen enthalten, werden sie beim Durchlauf durch das saubere ionenarme Sephacrylmaterial bis zur Säulensättigung zurückgehalten. Sind diese Ionen dann adsorbiert, können sie allein durch einen Waschvorgang mit Puffer nicht mehr freigespült werden. Ein stark ionenbindendes bzw. chelatierendes Reagenz ist hier notwendig, um das gepackte Sephacrylmaterial von den zurückgehaltenen Ionen wieder zu befreien.

Das Reagenz EDTA bildet stabile Komplexe und eluiert zahlreiche Kationen mit mehrfacher Ionenladung. Ein Durchlauf der EDTA-Lösung durch das gepackte Sephacryl entfernte die Kontaminationen in der Säule, deren Komplexe aufgrund ähnlicher Struktur nahezu alle in denselben Fraktionen detektiert wurden. Meistens waren 5 mL an 5 mM EDTA-Lösung ausreichend, um das Säulensystem zwischen zwei Cytosoltrennungen von den Kationen zu befreien. Die Multielementuntersuchungen der GPC-Fraktionen bei den Reinigungsversuchen mit EDTA zeigten, dass außer Li, Rb, B, Se, Mo und Sb alle anderen untersuchten Elemente einen Komplex mit EDTA bildeten und sich aus dem Säulensystem entfernen ließen. Im Allgemeinen ähneln sich ihre Elutionsprofile (EDTA-Komplexe der Lanthanoide, Erdalkali- und Übergangsmetalle), während die in der Säule nicht akkumulierten Elemente keine bzw. andere Elutionsprofile zeigten (Li, Rb). Eine hohe Kontamination in der Säule wurde nach zahlreichen Trennungen ohne Reinigung mit EDTA z.B. durch Co- und Zn-Ionen beobachtet, die erst nach mindestens 6 EDTA-Spülungen herausgewaschen worden war. Viele Elemente zeigten erst nach sorgfältiger EDTA-Spülung auswertbare Wiederfindungen. Sie sind für die weiteren Multielement-Speziationen also unverzichtbar.

3.2.2 Elutionsverhalten der Spezies aus den Pflanzencytosolen

Jedes Experiment mit der GPC wurde dreifach wiederholt und die Konzentrationen in den einzelnen Fraktionen quantitativ bestimmt. Die Kontaminationen ließen sich dabei gut erkennen, da sie als Peakausreißer auftauchten, die in den anderen Läufen nicht erschienen. Außerdem bildeten die Werte solcher Kontaminationen fast nie symmetrische Peakformen, wie sie bei anderen chromatographischen Peaks typisch waren, da sie immer aus einer bzw. zwei kontaminierten Einzelfraktionen entstammten. Sie wurden bei der Auswertung dann korrigiert bzw. herausgenommen.

Für die Messung wurde als Blindwert der Puffervorlauf genommen, der vor der Elution des ersten Analyten (V_0) gesammelt wurde. Bei der Festlegung der Bestimmungsgrenze wurde zu der gemessenen Konzentration dieses Blindwertes die achtfache Standardabweichung der mindestens fünffachen Messungen hinzugerechnet, da die übliche Berechnung mit der sechsfachen Standardabweichung das starke Driften der Basislinie nur unzufriedenstellend korrigierte. Dies war insbesondere in den geringen Konzentrationen der Elemente der Seltenen-Erden der Fall. In der Auswertung wurden nur die Konzentrationen quantitativ berücksichtigt, die höher waren als die Bestimmungsgrenze (Summe der Konzentrationen des Blindwertes (BW) addiert mit deren achtfacher Standardabweichung ($8 \times SD$)). Andere Konzentrationen galten folglich als nicht bestimmbar bzw. wurden in der Abbildung als Null gesetzt.

Die graphische Darstellung des GPC-Elutionsverhaltens der Spezies soll hier anhand eines Beispiels von Kupfer-Spezies aus Feldsalatcytosol veranschaulicht werden. Dabei wurden die gemessenen Kupfer-Konzentrationen der GPC-Fraktionen in einem Diagramm aufgetragen (Abbildung 3-5). Die Ungenauigkeit der GPC als eine Niederdruck-Flüssig-Chromatographie zeigte sich darin, dass das Peakmaximum sich bei drei GPC-Läufen in Folge unter identischen Bedingungen um ein bis zwei Fraktionen (Elutionsvolumen von 9-18mL) verschoben hatte. Dieses Verhalten verstärkte sich immer mehr bei höherem Elutionsvolumen, so dass es bei der Abschätzung der Spezies-Molekulargewichte und ihrer Gruppierung berücksichtigt werden musste.

Eine weitere Folge der Konzentrationsberechnung unter Berücksichtigung der achtfachen Standardabweichung des Blindwertes war, dass einige Elemente zu niedrige Konzentrationen (kleiner als die Bestimmungsgrenze) hatten und aus der Auswertung herausgenommen werden mussten. Die Darstellung der GPC-Elutionsprofile der Lithiumspezies aus Möhrencytosol veranschaulicht beispielhaft diese Auswirkung (s. Abbildung 3-6: drei GPC-Läufe in Folge mit Möhrencytosol).

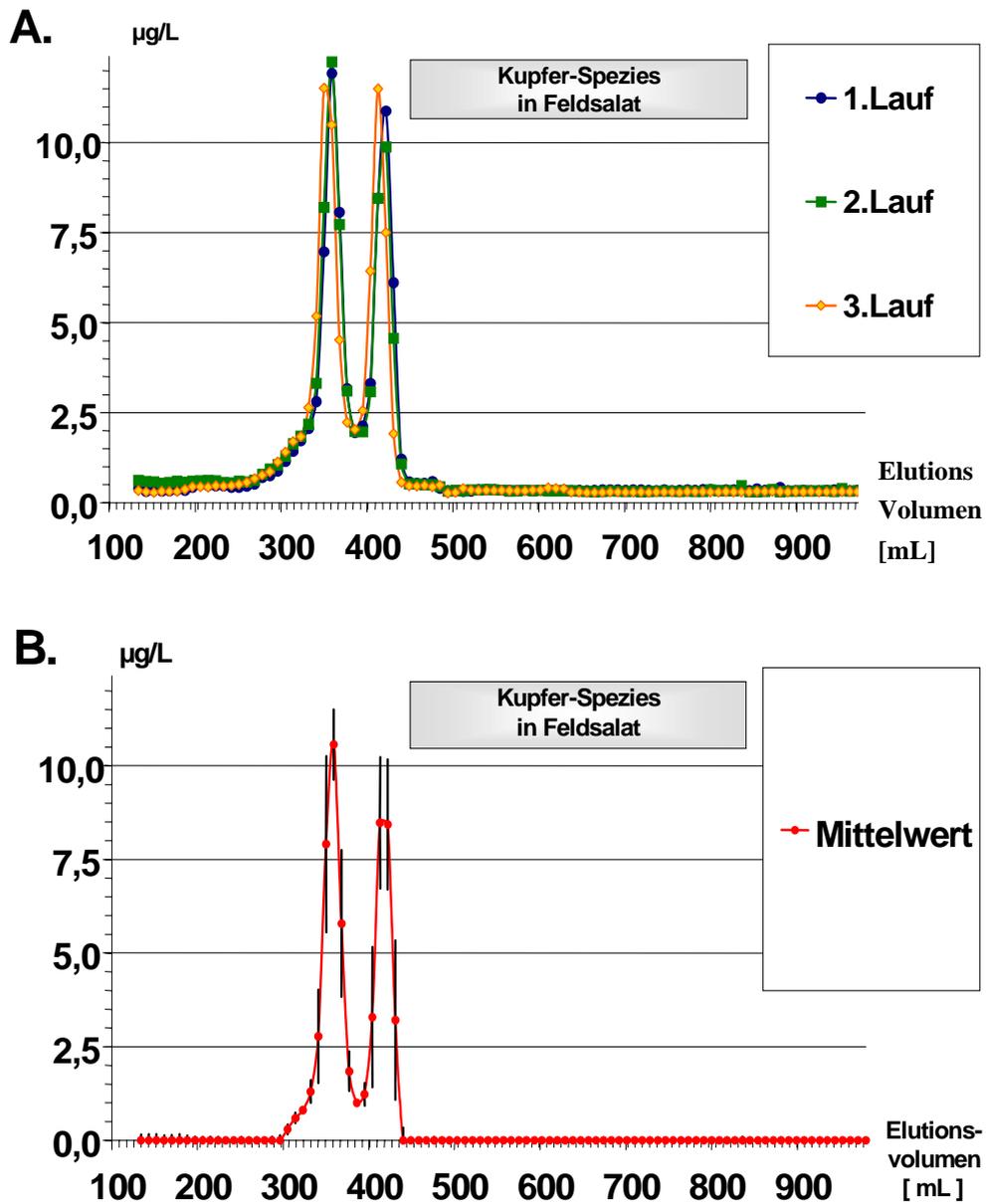


Abbildung 3-5 Beispieldiagramm: Elutionsverhalten von Kupferspezies aus Feldsalatcytosol bei der GPC-Trennung

Abb.A: Drei GPC-Läufe und Cu-Konzentrationen in den Fraktionen bei gleichen Bedingungen; Abb.B: Darstellung der Mittelwerte und Blindwertkorrektur

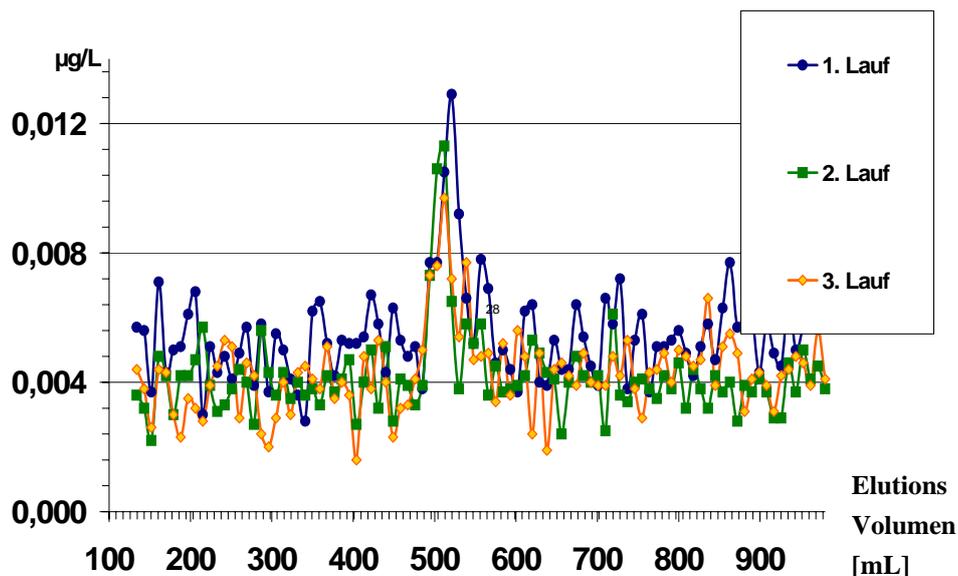


Abbildung 3-6 Elutionsprofil der Lithiumspezies aus Möhrencytosol.

(Die Berechnung des Blindwertes und der 8-fachen Standardabweichung ergab eine Bestimmungsgrenze von $0,013\mu\text{g/L}$, so dass die Ergebnisse aus der Liste der quantitativen Auswertung herausfielen, ein qualitativer Peak ist jedoch erkennbar)

In der Tabelle 3-1 sind die Elemente aufgeführt, die unter Berücksichtigung ihrer Bestimmungsgrenze und nach Abzug des Blindwertes nicht mehr zu den quantitativ auswertbaren GPC-Ergebnissen hinzugezählt werden konnten, obwohl in den gemessenen Rohdaten qualitative Elutionspeaks erkennbar waren.

Tabelle 3-1 Elemente, bei denen die Konzentrationen in den GPC-Fractionen qualitative Peaks zeigten, aber bei denen eine quantitative Auswertung nicht möglich war, da die Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze lagen

-
- (i) Eisbergsalat : Sn, Sb, Rh, U
 - (ii) Endiviensalat : Ba, Tl
 - (iii) Feldsalat : Tl
 - (iv) Kopfsalat : Sr, Mo
 - (v) Kohlrabi : Pb
 - (vi) Möhren : Li, Er, Yb
 - (vii) Tomate : Se
 - (viii) Gurke : Pb, Sn
 - (ix) Arabidopsis : Rh
-

3.3 Multielement-Speziation in den Pflanzencytosolen durch GPC-ICP-MS off-line-Kopplung

Die Multielement-Speziation durch off-Line-Kopplung der GPC und ICP-MS stand im Mittelpunkt der Arbeit. Dadurch konnten erste Anhaltspunkte über Anzahl und Größe der jeweiligen Elementspezies gewonnen werden. Eine große Herausforderung bei der angewandten off-line-Kopplung der GPC mit der ICP-MS war die Handhabung der gewaltigen Datenmengen, insbesondere aus den ICP-MS Messungen. In dieser Arbeit konnte die intensive Auswertung durch den Einsatz einer VBA-Programmierung (Microsoft-Office-Professional Vers.2000) bewältigt werden. Die quantitativen GPC-ICP-QMS-Messungen wurden für jedes Pflanzencytosol mindestens dreimal durchgeführt, wobei für jede Messreihe (ein GPC-Trennungslauf) die Konzentrationen von 35 verschiedenen Isotopen in jeder Fraktion bestimmt wurden. Die erhaltenen Einzelkonzentrationen wurden in einer Datenbank eingetragen, die in diesem Abschnitt nach einer Gesamtauswertung als Mittelwertspektren dargestellt werden.

Um bei der Darstellung der vielen Ergebnissen die Übersicht zu behalten, wurden zwei Arten der Gruppierung vorgenommen. Die erste stellte eine Übersicht über die aufgefundenen GPC-Elutionsprofile der Spezies dar, gruppiert nach den einzelnen Pflanzenproben (s. Kapitel 3.3.2). In der zweiten Gruppierung wurden die aufgefundenen Elutionsprofile von Spezies aus den verschiedenen Pflanzenproben nach dem jeweiligen Element zusammengestellt, um ausführlicher ihr Elutionsverhalten diskutieren zu können (s. Kapitel 3.3.3). Im Anschluss daran erfolgte eine gruppenübergreifende Auswertung der GPC-Spektren, die aufgrund ihrer Ähnlichkeiten in den Elutionsprofilen besonders auffielen (s. Kapitel 3.3.4).

3.3.1 Kalibration der Sephacrylsäule mit Proteinstandards

Die Kalibration des Sephacrylmaterials wurde mit globulären Proteinstandards durchgeführt. Dadurch wurde eine ungefähre Molekulargewichtsbestimmung der zu trennenden Analyten möglich. Die realen Inhaltsstoffe könnten unter Umständen ein anderes Verhalten aufweisen, aber auch eine ungefähre Abschätzung ihrer Molekülgrößen lieferte bereits entscheidende Kenntnisse für die weiteren Methodenoptimierungen, z.B. bei der Auswahl der Ultrafiltrationseinheiten bzw. der Porengröße der Membranfritte bei der nativen PAGE-Gelelektrophorese. Die Regressionsgleichung der Elutionsvolumina aus der unten abgebildeten Kalibration lautet:

$$\log MW = -0,0097 V_e + 8,619 \quad (280 \text{ mL} < V_e < 410 \text{ mL}; \text{ s. Abbildung 3-7})$$

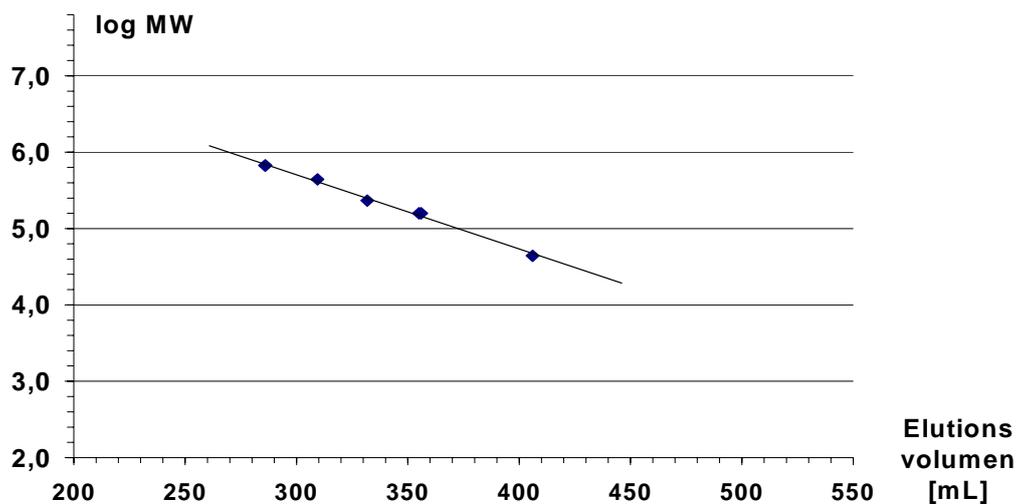


Abbildung 3-7 Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung bei der GPC

Tabelle 3-2 Elutionsvolumina der Standardproteine bei der GPC

Standardprotein	Molekulargewicht (g/mol)	Elutionsvolumen (mL)
Thyroglobulin	669000	286
Ferritin	440000	309
Catalase	232000	332
Aldolase	158000	356
Ovalbumin	43000	407

Zur Molekulargewichtsabschätzung der Spezies wurde das Elutionsvolumen berücksichtigt, bei dem die Höchstkonzentration im Spektrum zu finden war. Da die Elutionsvolumina der Proteine beim GPC-Lauf eine logarithmische Funktion der Molekulargewichte darstellt, muss bei der Abschätzung des Molekulargewichtes in den höheren Massenbereichen mit einer größeren Ungenauigkeit gerechnet werden. Bei einer möglichen Fraktionsverschiebung (+/- 9 mL Elutionsvolumen) bei einem Massenbereich um die 200 kDa musste z.B. bereits mit einem breiteren Bereich der Molekülgröße von 165 bis 250 kDa gerechnet werden. Eine untere Abgrenzung der angegebenen Trennleistung von 20 kDa (Kapitel 2.2.1) ergab sich durch die Berechnung der Regressionsgleichung bis über dem kalibrierten Massenbereich hinaus ein theoretisches Elutionsvolumen von ca. 445 mL. Bei den noch später eluierten Peaks konnten weitere Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial also nicht ausgeschlossen werden.

3.3.2 Darstellung und Interpretation der Spezies-Elutionsprofile in Bezug auf die jeweilige Pflanze

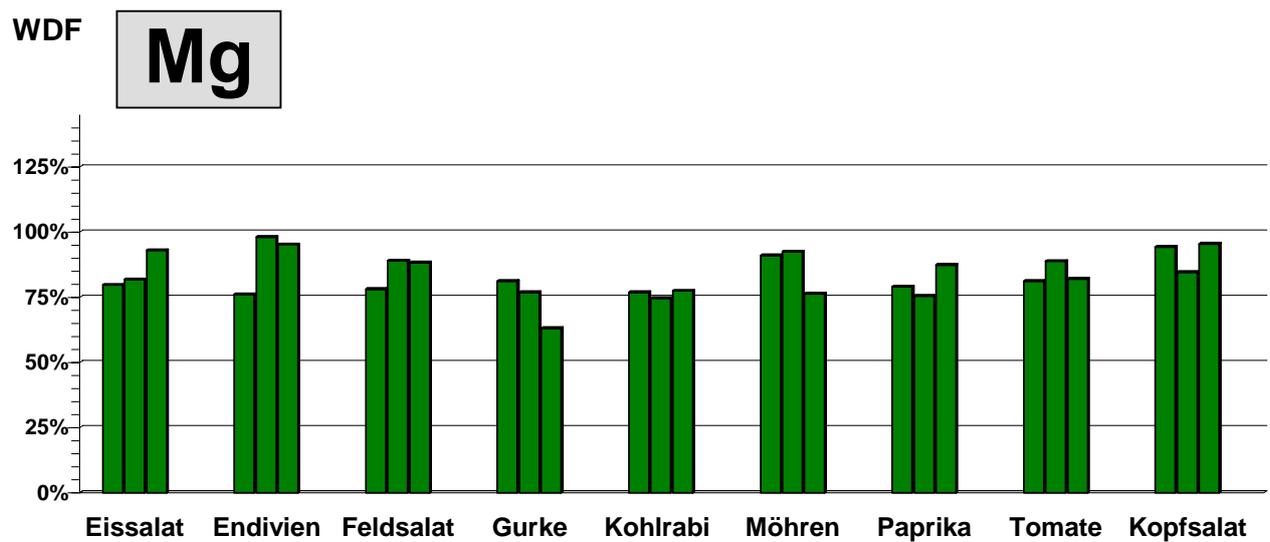
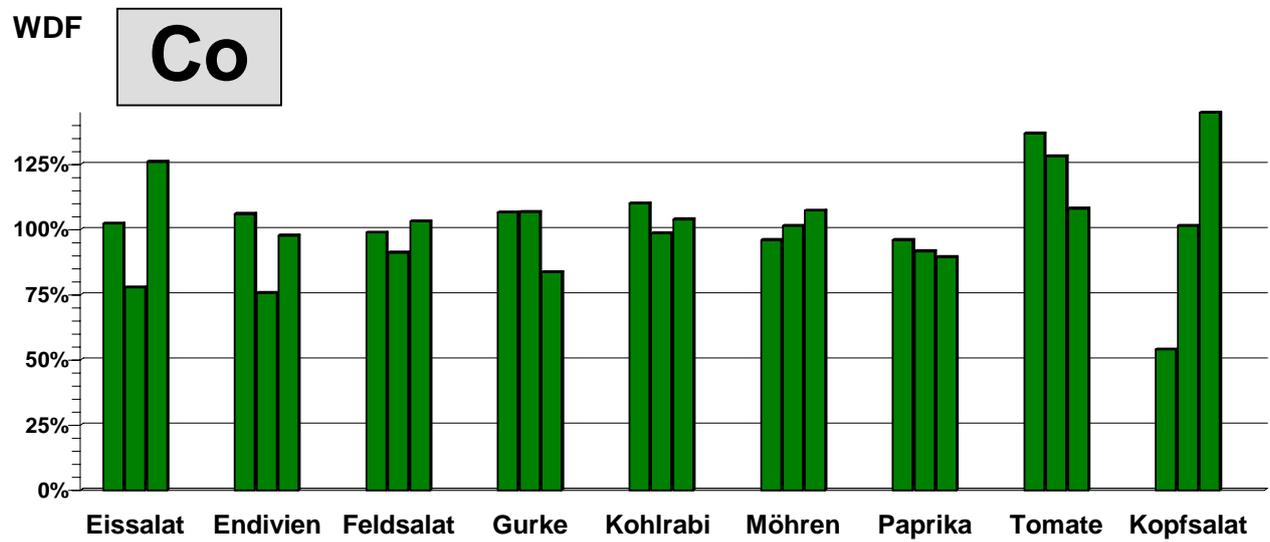
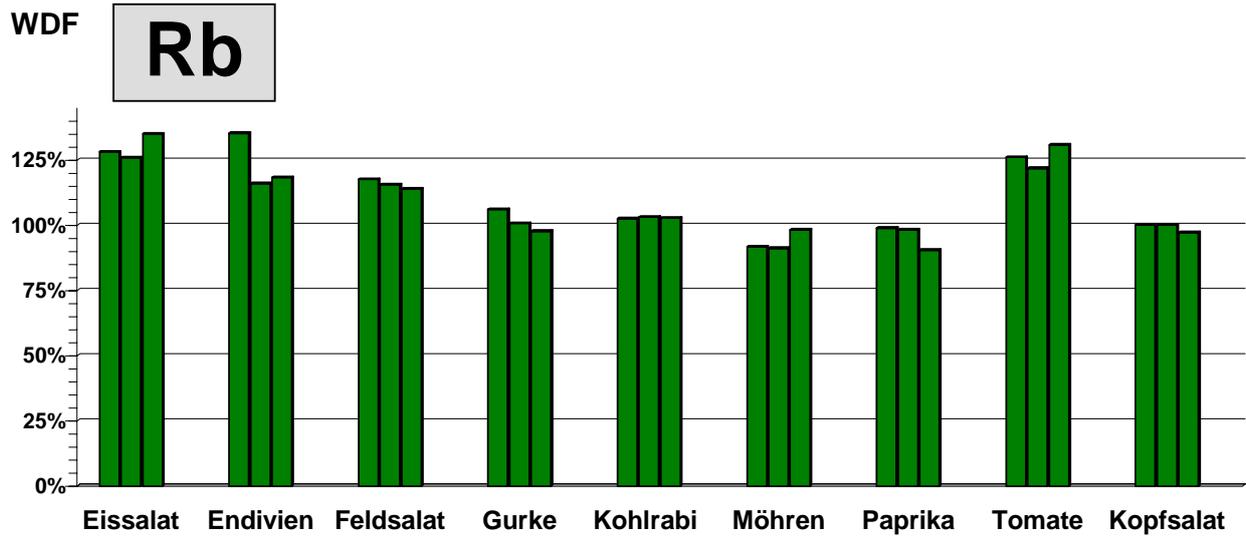
In diesem Abschnitt werden die quantifizierten Elemente nach den einzelnen Pflanzenproben zusammengestellt, deren Konzentrationen in den Messungen mittels off-line-Kopplung GPC-ICP/QMS quantitativ erfasst wurden. Von der aufgestellten Elementliste (s. Kapitel 2.3.1) wurden 33 Elemente detektiert, die in den untersuchten Pflanzenproben unterschiedlich auftraten. Als Übersicht werden sie in Tabelle 3-3 aufgelistet, wobei Elemente mit quantitativ auswertbaren GPC-Spektren mit einem „+“ gekennzeichnet sind. Zu ihrer graphischen Darstellung werden die GPC-Spektren unabhängig von ihrem Elutionsprofil jeweils nach ihren Peak-höchstkonzentration gruppiert, das heißt die Elementspektren mit nah beieinander liegenden Höchstkonzentrationen werden graphisch gemeinsam dargestellt. Dies machte Sinn, weil erstens die gemessenen Konzentrationen der verschiedenen untersuchten Elemente eine erhebliche Streuung von mehreren Größenordnungen aufwiesen, und zweitens im Hinblick darauf, eine ineffiziente Darstellung als Einzelelementspektren aus allen Pflanzenproben zu vermeiden. Aufgrund der großen Anzahl an Abbildungen werden sie insgesamt als ein Nachschlagewerk im Kapitel 6.3 - Anhang umfassend aufgeführt.

Eine zusammenfassende Ergebnistabelle über die Elementwiederfindungen in den GPC-Trennungen ist im Kapitel 6.2 - Anhang abgelegt. Abbildung 3-8 zeigt anhand der Elemente Rb, Mg und Co Beispiele zu Wiederfindungen nach der einzelnen GPC-Trennung. Elemente, in deren GPC-Spektren vereinzelte Peaks aufgefunden wurden, sind in die Liste aufgenommen worden, wenn die Wiederfindung größer als 1% war. Um die große Datenmenge an Einzelergebnissen einzugrenzen, wurden nicht alle Ergebnisse der gemessenen Elemente aus der Parameterliste (Elementtabelle in Kapitel 1.4) in die Ergebnistabelle aufgenommen. Stattdessen wurden nur die Ergebnisse der Elemente aus der Positivliste (Tabelle 3-3) aufgeführt, die bei der Messreihe auswertbare Konzentrationen gezeigt hatten.

Bei manchen Elementen wurden trotz gereinigter Säule noch erhöhte Wiederfindungen gemessen (z.B. Al-Spezies bei Kopfsalat, Paprika und Tomate; Y-Spezies bei Möhren, Tomate und Feldsalat). Sie sind in den meisten Fällen auf die niedrigen Gesamtkonzentrationen im Cytosol zurückzuführen, so dass während des GPC-Laufs eine deutlich messbare Menge durch die nicht besetzten Bindungsstoffe mitgerissen werden konnte. Im Gegenteil dazu zeigten einige Elemente häufig einen Wiederfindungsverlust (Kapitel 6.2 – Anhang). Entweder lagen diese Elemente als freie Ionen im Cytosol vor, die beim Durchlauf durch ionenarmes Sephacrylmateriale adsorbiert wurden, oder die Bindungsaffinität der Ionen an das Säulenmaterial ist deutlich stärker als die an der Spezies bzw. Bindungsform, so dass sie aus ihren Spezies-Komplexen herausgerissen wurden. In beiden Fällen wurden die Ionen in der Säule zurückgehalten.

Tabelle 3-3 Liste der quantitativ auswertbaren Ergebnisse bei den Multielementmessungen von den GPC-Fractionen der Pflanzencytosole (+: quantitativ auswertbar und Spektren in Kapitel 6.3 Anhang dargestellt)

		Eisbergalat	Endiviensalat	Feldsalat	Kopfsalat	Gurke	Paprika	Tomate	Kohlrabi	Möhren	Arabidopsis
1	Li	+	+	+	+	+	+	+	+		+
2	Rb	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	Mg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Ca		+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Sr	+	+	+		+	+	+	+	+	+
6	Ba	+		+	+	+	+	+	+	+	+
7	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	Al			+	+		+	+		+	+
9	Ga						+	+	+	+	
10	Tl	+			+	+	+	+	+	+	+
11	Pb		+	+				+			+
12	Se			+						+	
13	Mo	+	+	+		+	+		+	+	+
14	Sn		+	+	+		+	+	+	+	+
15	Sb		+	+	+	+		+	+	+	
16	Rh						+	+	+	+	
17	Mn	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	Fe	+		+	+	+	+	+	+	+	+
19	Co	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	Ni	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	Cu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	Zn	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	Cd	+	+	+	+		+	+	+	+	+
24	Y		+	+				+		+	+
25	La								+	+	
26	Ce								+	+	
27	Dy										+
28	Ho										+
29	Er			+							+
30	Yb			+							+
31	Tm			+							+
32	Lu			+							+
33	U		+	+	+		+	+	+	+	+
	Σ	15	18	26	18	16	21	23	23	25	27



(WDF = Wiederfindung)

Abbildung 3-8 Wiederfindung der Elemente Rb, Co und Mg (in %) nach den einzelnen GPC-Trennungen

Unter den aufgeführten 33 Elementen, die im Cytosol gebunden vorliegen können, war zu beobachten, dass in allen untersuchten Pflanzen die Peak-Höchstkonzentrationen stets aus denselben Elementen zusammengesetzt waren. Mit geringer Abweichung wurden mindestens 8 Elemente in abnehmender Konzentration häufig in folgender Reihenfolge wiedergefunden: Mg, Ca, Zn, Fe, B, Rb, Cu, Mn. Die 8 Elemente bildeten also die Hauptmenge der Elemente, die im Cytosol an ihre Bindungsstoffe gebundenen sind. Jedoch wurden einige ihrer Peaks aufgrund einer sehr späten Elution teils unvollständig detektiert (teilweise außerhalb des Elutionsvolumen von 980 mL). Das späte Elutionsverhalten einiger dieser Spezies wurde hier nicht weiter untersucht.

Darüber hinaus wurden auch andere untypische Peakformen in der GPC beobachtet, die nicht die erwarteten chromatographischen Verteilungsformen aufwiesen (zum Vergleich der typischen Verteilung siehe die Rb-Spezies in Abbildung 3-9). Das abweichende Elutionsverhalten deutete auf verschiedene potentielle Wechselwirkungen zwischen dem Sephacrylmateriale und den Ionen bzw. der vorliegenden Spezies hin.

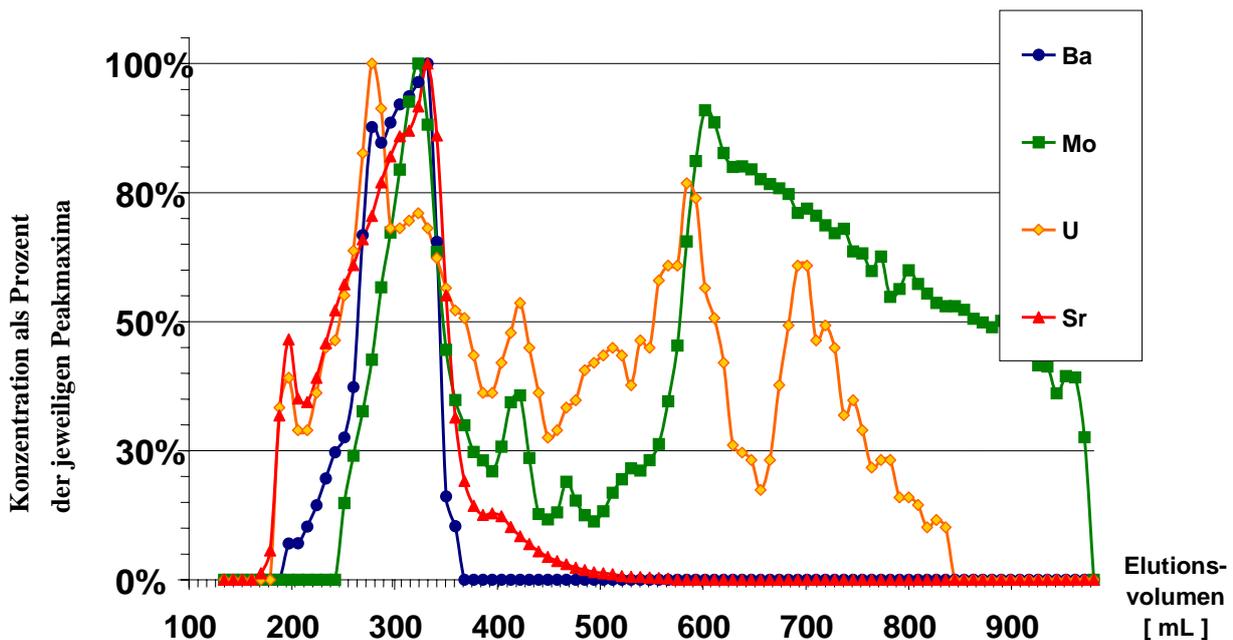


Abbildung 3-9 Untypische Elutionsprofile bestimmter Spezies während der GPC-Trennung (y-Achse in relativer Konzentration zu der dazugehörenden Höchstkonzentration)

So wurde beispielsweise nicht nur ein übermäßiger Fronting-Effekt, z.B. am vorderen Peakbereich der Sr-Spezies in Tomatencytosol und der Ba-Spezies in Eisbergsalatcytosol, gefunden, sondern auch Tailing-Effekt, z.B. am hinteren Peakbereich der Mo-Spezies in Endiviansalatcytosol. Die in der Abbildung 3-9 gezeigte U-Spezies aus dem Feldsalatcytosol war besonders auffällig. Möglicherweise war dieser Verlauf auf eine unregelmäßige Verschleppung der Ionen durch zahlreiche unbekannte Inhaltsstoffe zurückzuführen. Dieses Verhalten kann bei einem Element von Pflanze zu Pflanze verschieden auftauchen und ist dann wahrscheinlich auf die arteigenen Inhaltsstoffe zurückzuführen.

In der weiteren Betrachtung ließen sich nach der Zusammenlegung der GPC-Spektren aufgrund vergleichbarer Höchstkonzentrationen kaum direkte Zusammenhänge zwischen den Spezies innerhalb eines Pflanzencytosols erkennen. Auch weitere interessante Aspekte über das o.g. abweichende Verhalten einiger Elemente konnte erst nach einem Spektrenvergleich der einzelnen Spezies in verschiedenen Pflanzen diskutiert werden (Kapitel 3.3). Dabei werden die graphischen Darstellungen der GPC-Spektren in ihren relativen Konzentrationen jeweils bezogen auf die Höchstkonzentration wiedergegeben, um die unübersichtliche Konzentrationsstreuung zu verringern.

3.3.3 Darstellung und Interpretation der Spezies-Elutionsprofile nach Elementgruppen

Aus der Vielfalt der im vorigen Abschnitt gezeigten GPC-Spektren wird hier eine weitere Übersicht gezeigt, in der die Spektren für das jeweilige Element nach Pflanzenproben übergreifend dargestellt werden (zur Auswahl der Spektren dienen die in der Tabelle 3-3 als Positivliste aufgeführten Elemente). Die Normalisierung der Konzentrationen (relative Konzentrationen bezogen auf die Höchstkonzentration) ermöglicht einen optisch besseren Vergleich der GPC-Elutionsprofile. Dabei wurde jedes Element in zwei bis drei Abbildungen dargestellt, um die Dichte der übereinander liegenden Punkte zu reduzieren. Eine Zusammenfassung der aufgefundenen Spezies ist im Kapitel 6.4 – Anhang zu finden, wobei die Abschätzung ihrer Molekülgröße nur für die im kalibrierten Massenbereich aufgefundenen Spezies erfolgte.

3.3.3.1 Alkali- /Erdalkali-Elemente

Li und Rb: Ein auffälliges Elutionsverhalten der Li- und Rb-Spezies wurde bei der Trennung beobachtet. Bei allen Proben wurde stets ein identischer Einzelpeak aufgefunden, der außerhalb des kalibrierten Massenbereiches eluierte. Die Rb-Spezies wurde etwa 25 mL früher als die Li-Spezies detektiert. Die Peakmaxima variierten zwar um ein bis zwei Fraktionen, jedoch ähneln sich ihre Elutionsprofile. Eine Abschätzung der Molekülgröße nach der Berechnung mit der Regressionsgleichung (s. Abbildung 3-10) über dem kalibrierten Bereich hinaus ergab eine Größe unterhalb der angegebenen Trennleistung des Sephacrylmaterials (<20 kDa). Da aus den Voruntersuchungen bekannt ist, dass das Sephacryl keine besondere Wechselwirkung mit Li- und Rb-Ionen eingeht, und in den GPC-Spektren keine weitere Li- und Rb-Peaks gefunden wurden, liegt es nahe, dass bei dem vergleichbaren Verhalten in allen Cytosolen diese Spezies als freie Ionen vorliegen (Abbildung 3-10).

Mg: Mit einer Ausnahme (Mg-Spezies des Tomatencytosols) wurde auch bei Mg in allen Proben ein identischer Einzelpeak außerhalb des kalibrierten Massenbereiches detektiert. In dem Tomatencytosol wurden mindestens zwei Spezies aufgefunden: eine Spezies bei ca. 34 kDa und eine weitere Spezies, bei der eine Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial zu vermuten ist, da sie mit einer sehr breiten Peakverteilung außerhalb des kalibrierten Bereiches eluierte. Auch eine weitere Wechselwirkung der Mg-Spezies in Feldsalatcytosol ist aufgrund des Fronting-Effektes vor dem Peakmaximum nicht auszuschließen. Dass die Mg-Spezies in verschiedenen untersuchten Pflanzenmaterialien (Blätter, Früchte, Wurzelknollen) dasselbe Elutionsverhalten zeigten, deutete auf ein systemisches Vorliegen der betreffenden Spezies sogar in verschiedenen Pflanzen hin (Abbildung 3-10).

Ca: Ein Einzelpeak der Ca-Spezies mit einem unterschiedlich späten Elutionsvolumen wurde häufig in den Proben aufgefunden (verschiedene Salatpflanzen, Kohlrabi, Tomate und Gurke). Bei der hier sehr spät eluierten Spezies kann es sich nicht um freie Ca-Ionen handeln, da die im Cytosol frei enthaltenen Ca-Ionen während des Trennungslaufes aufgrund der Adsorption an dem Sephacrylmateriale vom Säulenmaterial zurückgehalten werden. Vielmehr kann es sich hier um verschiedene kleine Ca-Spezies handeln, die aufgrund ihrer geringen Molekülgröße nicht mehr nach ihrer Größe getrennt werden können. An ihren unterschiedlich späten Peakmaxima lässt es sich erkennen, wie sie jeweils artspezifisch mit dem Sephacrylseitengruppen interagieren. Desweiteren wurden in Paprikacytosol eine weitere Ca-Spezies aufgefunden (Peakmaximum bei 440 mL). Wie ihre Mg-Spezies weicht ebenfalls die Ca-Spezies des Tomatencytosols von anderen Pflanzen ab. Mindestens zwei weitere Spezies sind in dem Spektrum zu sehen: eine in dem niederen Massenbereich mit geschätzter Molekülgröße von 50 kDa, und eine bei hoher Masse (>500kDa), deren genauere Zuordnung nicht möglich ist, da der Peak nur ein undeutliches Maximum zeigt (Abbildung 3-10).

Sr: Bei den Salatpflanzen bilden die Spezies im hochmolekularen (> 100 kDa) und im niedermolekularen Bereich (<20 kDa) den Hauptanteil der Sr-Spezies (Abbildung 3-10). Ein kleiner Anteil wurde bei Eisbergsalat, Gurke, Paprika und Kohlrabi bei einem Elutionsvolumen von ca. 600 mL detektiert. Bei vier Pflanzen (Gurke, Möhre, Paprika und Kohlrabi) wurden ähnliche Peaks von extrem hochmolekularen Sr-Spezies mit Peak-Tailing bei Elutionsvolumina um die 200 mL detektiert (> 250 kDa). Weitere auffällige Spezies wurden in mindestens sieben Pflanzen bei Elutionsvolumen um 340 mL aufgefunden (Molekülgröße ca. 200 kDa). Während fünf Pflanzen davon eine ideale chromatographische Peakform (Normalverteilung) zeigten, trat bei Tomate und Eisbergsalat die Peak-Fronting auf.

Ba: Ähnliche Elutionsprofile wie bei den Sr-Spezies zeigten die Ba-Spezies jeweils in denselben Pflanzenproben. Es wurden auch bei mindestens acht Pflanzen die 200 kDa Spezies wiedergefunden, die hier häufig die Hauptmengen der Ba-Spezies bildeten. Auch dieselben Tailing-Effekte wurden bei Tomate und Eisbergsalat beobachtet. Ebenfalls im extrem hohen Massenbereich (Elutionsvolumen 200 mL bei Gurke, Möhren, Paprika und Kohlrabi) wurden nahezu ähnliche Elutionsverhalten aufgefunden. Zusätzlich wurden weitere Spezies detektiert: eine Ba-Spezies bei Kohlrabi im sehr hohen Massenbereich (Elutionsvolumen bei 270 mL); vereinzelte Spezies verschiedentlich bei Elutionsvolumen 300, 400, 500 und 600 mL in Arabidopsiscytosol, sowie Spezies bei 500 und 600 mL Elutionsvolumen bei Gurke, Möhren, Paprika und Kohlrabi (Abbildung 3-10). Nach ihren Elutionsprofilen ist ein ähnliches chemisches Verhalten in den biologischen Reaktionen für die beiden Elemente wahrscheinlich.

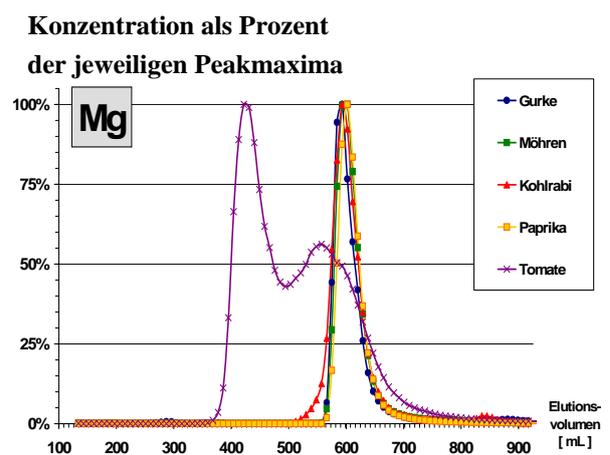
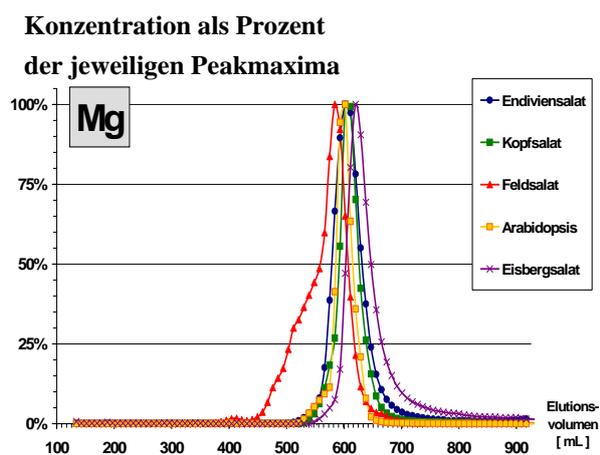
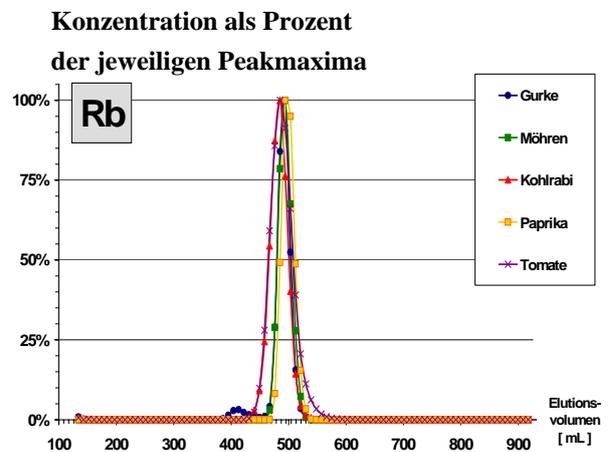
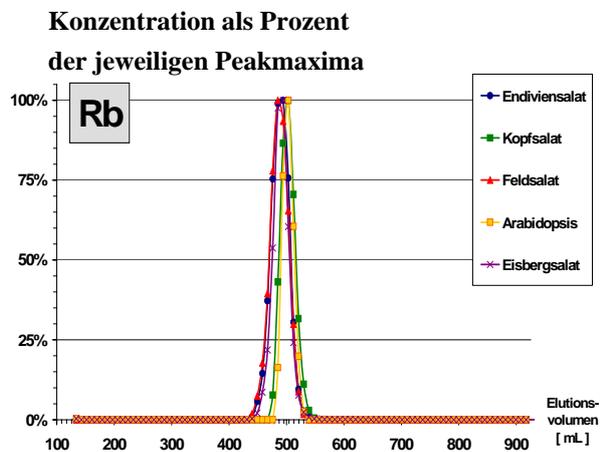
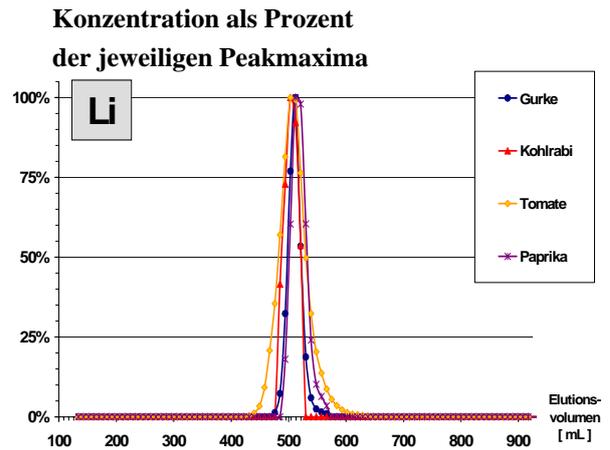
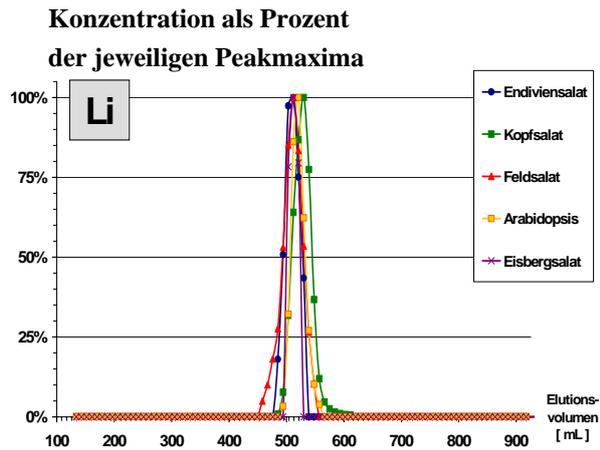
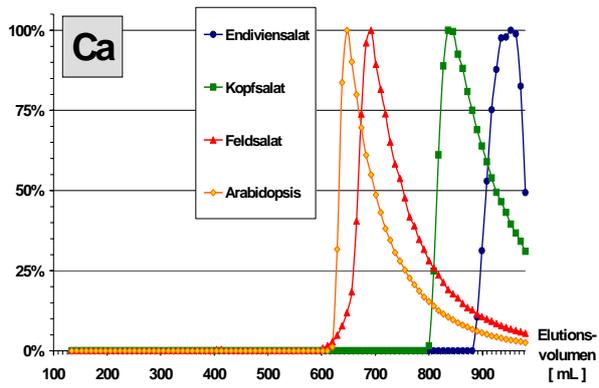
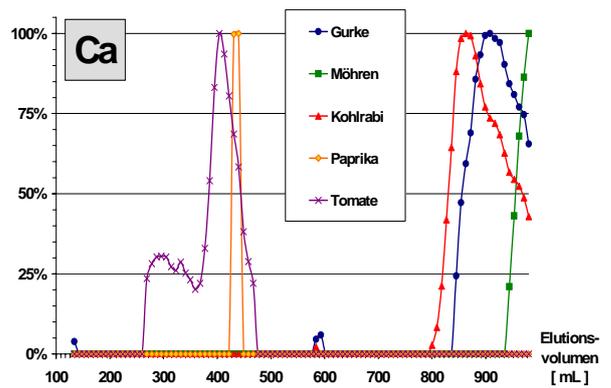


Abbildung 3-10 Elutionsprofile von Spezies aus der Gruppe der Alkali-/Erdalkalielemente

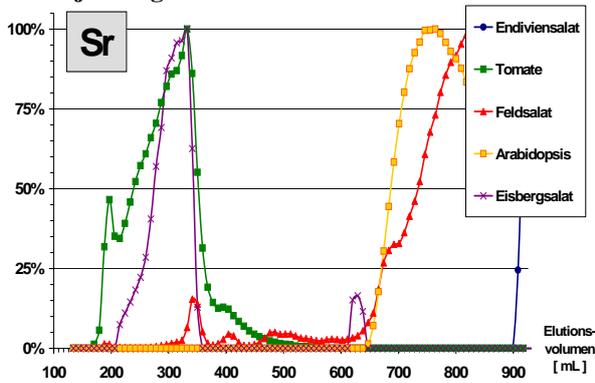
Konzentration als Prozent der jeweiligen Peakmaxima



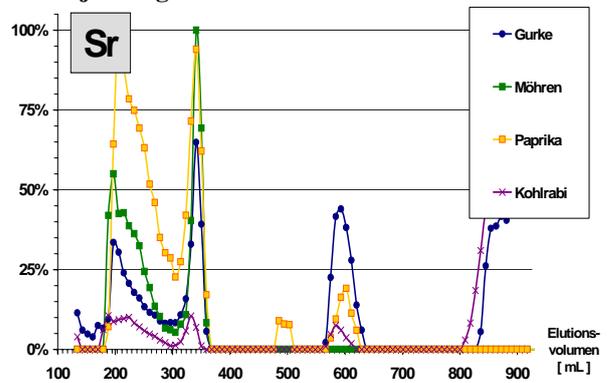
Konzentration als Prozent der jeweiligen Peakmaxima



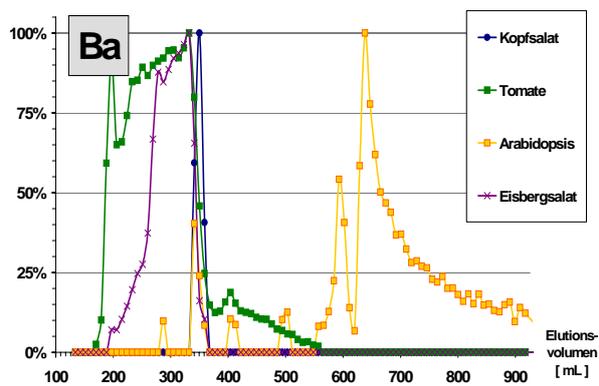
Konzentration als Prozent der jeweiligen Peakmaxima



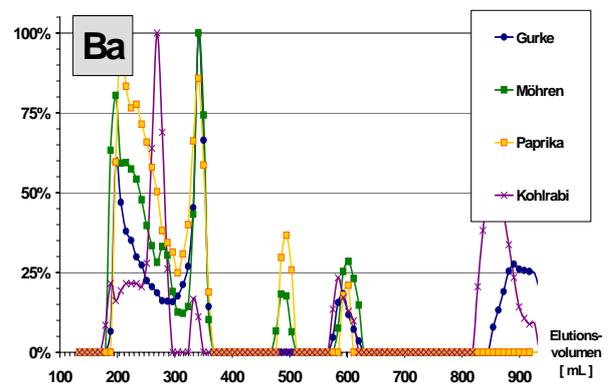
Konzentration als Prozent der jeweiligen Peakmaxima



Konzentration als Prozent der jeweiligen Peakmaxima



Konzentration als Prozent der jeweiligen Peakmaxima



Forts. Abbildung 3.10 Elutionsprofile von Spezies aus der Gruppe der Alkali-/Erdalkalimetalle

3.3.3.2 Andere Hauptgruppen-Elemente

B: Mindestens eine B-Spezies wurde bei allen untersuchten Pflanzencytosolen aufgefunden. Mit einer Verschiebung um eine Fraktion (± 9 mL) wurde mit Ausnahme von Kohlrabi und Möhren (Wurzelknollen) bei allen Pflanzen ein Peak mit Elutionsvolumen von 476 mL detektiert. Eine zweite Spezies ist jeweils in Feldsalat-, Paprika- und Arabidopsiscytosol zu erkennen. Angenommen, es handelte sich bei den allgemeinen B-Peaks um B-Salze, bedeutet dies, dass mindestens in diesen drei genannten Pflanzencytosolen jeweils ein B-Bindungsstoff vorliegt (Abbildung 3-11).

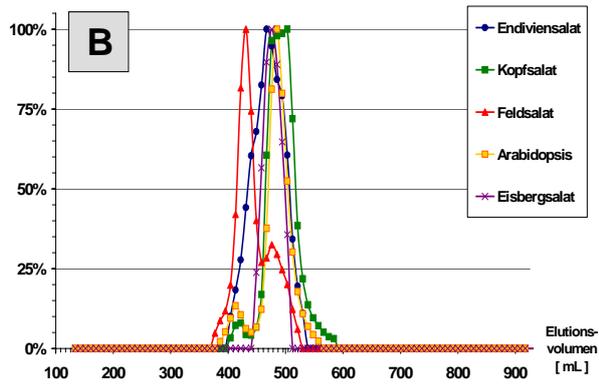
Al: Al-Spezies wurden ganz ausgeprägt bei mindestens 6 Pflanzen detektiert (Abbildung 3-11). Die Spezies mit 404 mL Peakmaximum (geschätzte Molekülgröße ca. 50 kDa) sind in Paprika-, Arabidopsis-, Feldsalat-, Kopfsalat- und Tomatencytosol mit identischem Profil eluiert worden. Sehr auffällig hingegen sind die Peaks beim Möhrencytosol, die auf mindestens drei verschiedene Al-Spezies hindeuten. Sie wurden bei 188 mL, 368 mL (ca. 112 kDa), und 593 mL eluiert. Das Paprikacytosol zeigte ebenfalls bei Elutionsvolumen 593 mL eine zweite Al-Spezies.

Se: In sehr geringer Menge wurden Se-Spezies nur in Feldsalat- und Möhrencytosol aufgefunden (Abbildung 3-11). Mit Elutionsvolumen von 560 und 580 mL befanden sie sich außerhalb des vorgegebenen Trennbereiches des Sephacryls. Anscheinend ist die direkte Methode GPC-Sephacryl-ICP-MS für die Untersuchung der Se-Spezies weniger gut geeignet. Vielmehr wird eine Hydridmethode zur Ionenerzeugung der Se-Speziationsanalytik eingesetzt.

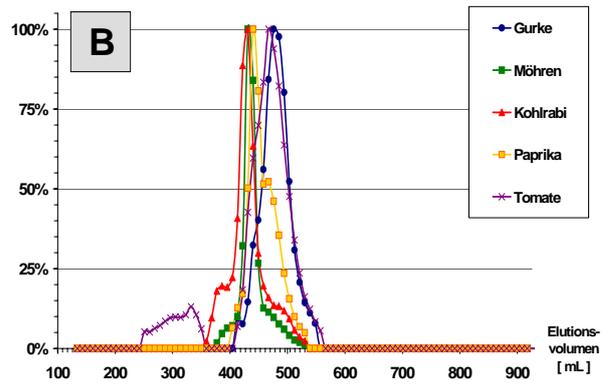
Ga: In den untersuchten Blättercytosolen wurden keine Ga-Spezies gefunden (Abbildung 3-11). Jedoch in Früchten- und Knollencytosolen (mit Ausnahme von Gurkencytosol) sind quantitativ Ga-Spezies gemessen worden (Möhren-, Paprika-, Kohlrabi- und Tomatencytosol). Ihre Spezies zeigten in ihren GPC-Spektren ein identisches Elutionsverhalten mit Peakmaximen bei 413 mL (geschätzte Molekülgröße von 35 - 40 kDa).

Pb: Alle detektierten Pb-Spezies in dieser Arbeit traten als Einzelpeak auf und wurden meist in den Blattcytosolen gemessen. Jedoch wurde ein identischer Einzelpeak ebenfalls in Tomatencytosol entdeckt (Abbildung 3-11). Die geschätzte Molekülgröße lag bei 40 - 50 kDa (Elutionsvolumen 404 bzw. 413 mL). Die Pb-Konzentrationen in den Fraktionen waren sehr gering, so dass nach der Basislinienkorrektur der Peak quantitativ nur aus 3 Fraktionen bestand. Dies entsprach dem Elutionsverhalten der seltenen Elemente wie Sb oder La.

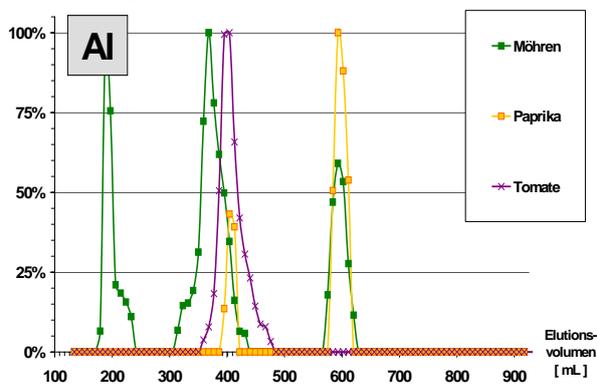
Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



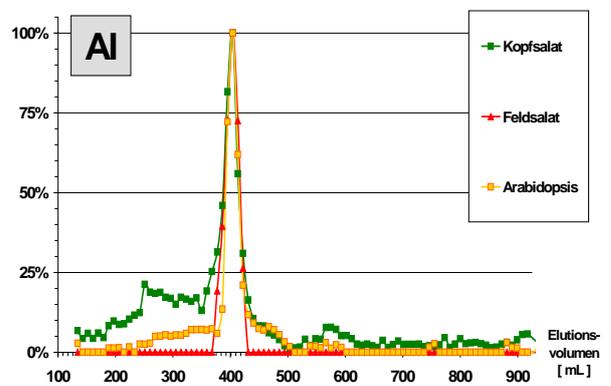
Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima

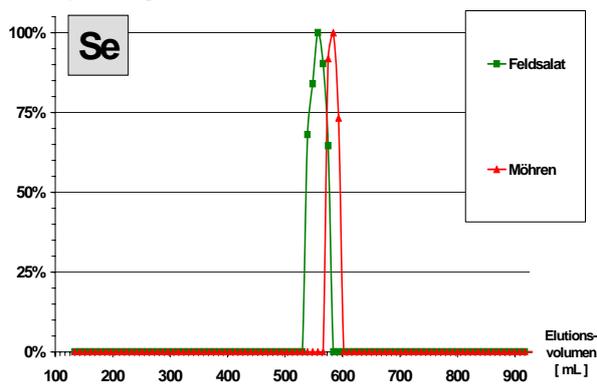
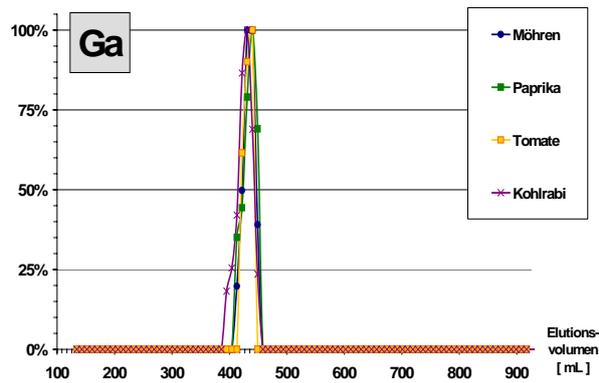
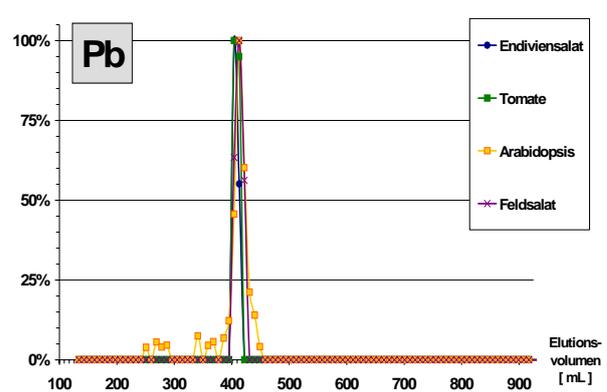


Abbildung 3-11 Elutionsprofile von Spezies der Hauptgruppenelemente

**Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima**



**Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima**

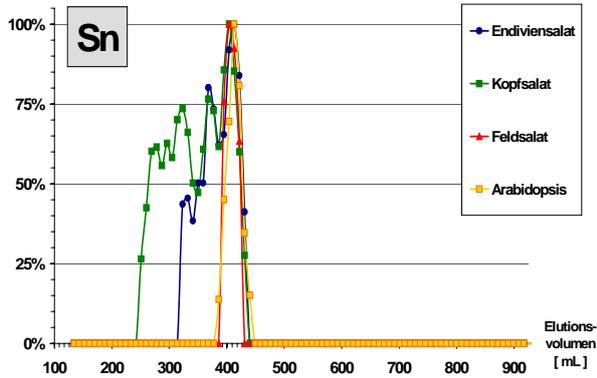


Forts. Abbildung 3.11 Elutionsprofile von Spezies der Hauptgruppenelemente

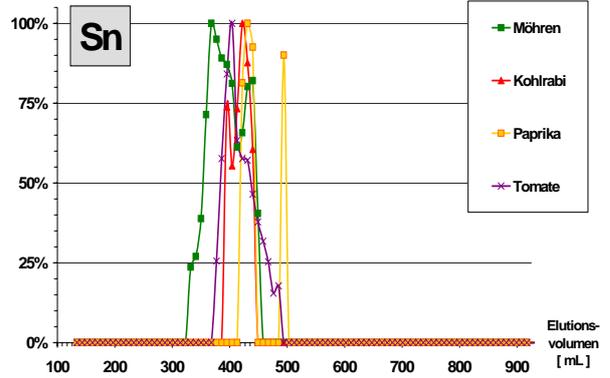
Sn und Sb : Nahezu bei allen Pflanzenproben wurden Sn-Spezies aufgefunden. Erneut waren die Peaks bei Elutionsvolumina von etwa 413 mL und bildete die am häufigsten gefundene Sn-Spezies in den Cytosolen (Ausnahme: Gurke und Eisbergsalat). Eine Peakform mit Rauschen zeigten die Sn-Spezies in Endiviensalat und Kopfsalat. Sie waren auf die niedrigen Sn-Konzentrationen in den GPC-Fractionen zurückzuführen. Undeutlich zu erkennen war, ob der Peak in Tomatencytosol aus mehreren Peaks zusammengesetzt worden ist. Ein weiterer zweiter Peak war im Spektrum von Möhren, Paprika und Kohlrabi zu finden. Auch Sb-Spezies wurden nahezu bei allen Pflanzenproben gefunden (Ausnahme: Arabidopsis und Tomate). Hier bildete die Spezies um das Elutionsvolumen 413 mL den Hauptbestandteil der Sb-Spezies. Einzige weitere Sb-Spezies erschien im Gurkencytosol bei einer Molekülgröße von etwa 300 kDa, die auf weitere hochmolekulare Sb-Spezies hinwies (Abbildung 3-12).

Tl: Die gemessenen Tl-Spektren (Abbildung 3-12) wiesen fast immer auf kleinere Tl-Spezies hin. Sie zeigten stets die unerwünschte Wechselwirkung mit dem Sephacryl und eluieren verschieden spät am Ende des Elutionsbereichs. Einzig bei Möhren und Paprika wurden weitere Tl-Spezies bei früheren Elutionsvolumina gefunden (beide 485 mL). Es stellt sich die Frage, ob in den Arabidopsis- und Feldsalatcytosol auch Tl-Spezies enthalten sind, die erst außerhalb der gesammelten Fraktionen eluieren würden.

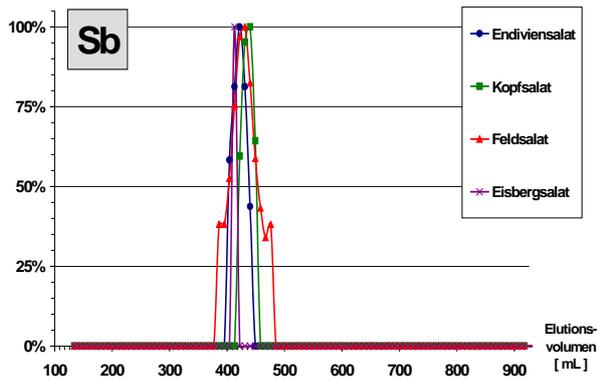
Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



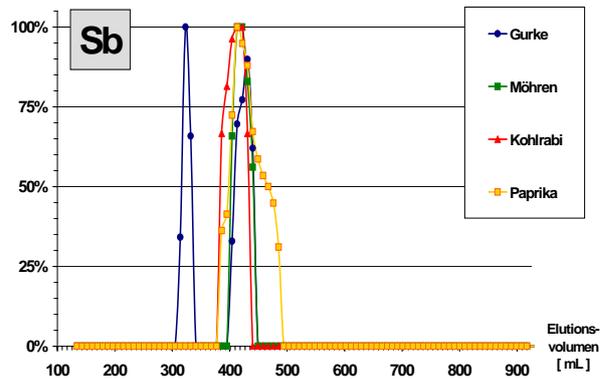
Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



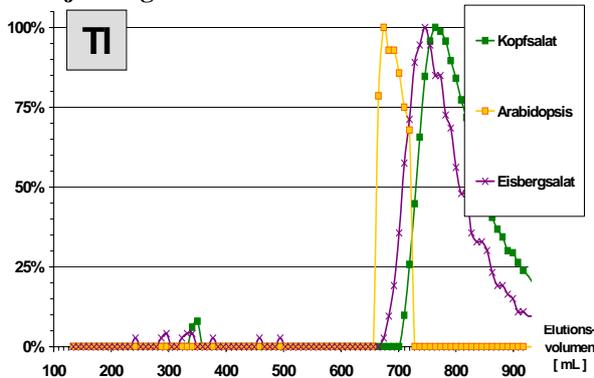
Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima

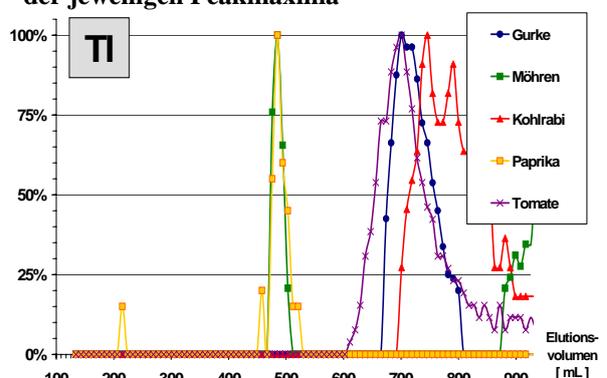


Abbildung 3-12

Weitere Elutionsprofile von Spezies der Hauptgruppenelemente

3.3.3.3 Nebengruppen-Elemente

Mn: Die Mn-Spektren hatten die meisten Speziespeaks von allen mit der GPC aufgetrennten Cytosolen (Abbildung 3-13). Bei allen Pflanzen wurde mehr als eine Spezies wiedergefunden und außer bei Tomate darunter stets welche, die aufgrund ihrer Interaktion mit dem Sephacryl aus der Säule erst spät eluieren. Mn-Spezies bei ca. 40-50 kDa zeigten mindestens sechs Pflanzen, sie bildeten sogar bei Tomate und Kohlrabi den Hauptbestandteil der Mn-Spezies. Im hochmolekularen Bereich haben Möhren und Eisbergsalat Peaks von Mn-Spezies gezeigt, während im extrem hochmolekularen Bereich schwache Peaks der Spezies nur noch bei Möhren und Gurke registriert wurden.

Fe: Die quantitative Zuordnung der Fe-Speziespeaks wurde dadurch erschwert, dass die Hintergrundkonzentration des Eisens in der mobilen Phase (Tris-HCl-Puffer) mit ca. 25 µg/L verglichen mit der Konzentrationen der Peakmaxima um die 50 µg/L sehr hoch war. Die aufgefundenen Fe-Spezies in den Endiviensalat-, Gurken-, Paprika- und Tomatencytosolen sind also nur mit Vorbehalt zu betrachten; in den restlichen Pflanzen konnten jedoch die Peaks quantifiziert werden. Eine hochmolekulare Fe-Spezies um die 200 kDa (Elutionsvolumen 341 mL) wurde in Feldsalat-, Arabidopsis-, Kopfsalat- und Paprikacytosol detektiert (Abbildung 3-13). Zwei sehr ausgeprägten Fe-Spezies wurden in Möhrencytosol beobachtet. Bei der einen handelt es sich um eine niedermolekulare Fe-Spezies um die 75 kDa. Der andere Fe-Peak zeigte eine extrem hochmolekulare Fe-Spezies (> 600 kDa), die ebenfalls in weiteren vier Pflanzen zu sehen war (Eisbergsalat, Arabidopsis, Kopfsalat und Kohlrabi).

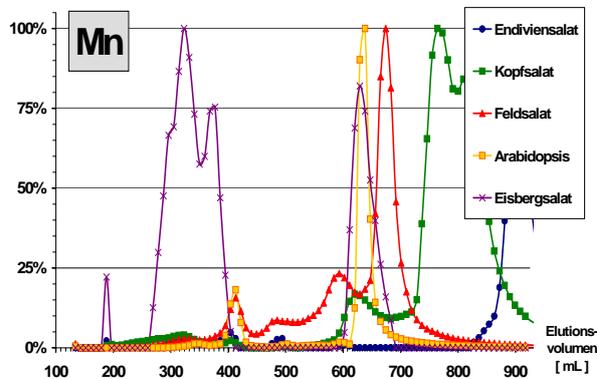
Co: Die Co-Spezies in den vorliegenden Spektren konnten wie bei allen nachfolgenden Untersuchungen der Nebengruppenelemente aufgrund der hohen Konzentrationen sehr gut quantifiziert werden. Es wurde in den Voruntersuchungen zwar festgestellt, dass die in den Cytosolen enthaltenen Bindungsstoffe eine sehr hohe Affinität zu den Co-Ionen haben (extrem erhöhte Co-Wiederfindungen bei allen Pflanzen), aber dieser Adsorptionseffekt konnte durch EDTA-Zwischenreinigung verhindert werden. Auch die cytosoleigenen Co-Ionen wurden anscheinend durch dieselbe Spezies gebunden, da diese bei den erhöhten Co-Konzentrationen bei allen Spektren stets auf denselben Peak zurückgeführt werden konnten. Es handelte sich hier um die Spezies bei Elutionsvolumen 413 mL (Molekülgröße etwa 40 kDa), die in vorausgehenden Speziesspektren insbesondere bei hochtoxischen Elementen bereits häufig aufgetaucht war. Sie bildete bei allen untersuchten Pflanzen die Hauptmenge der Co-Spezies. Eine zweite Spezies mit kleinerer Molekülgröße in geringerer Menge (Elutionsvolumen 476 mL) wurden bei sechs weiteren Pflanzen beobachtet. Einzig der Kopfsalat zeigte eine dritte Co-Spezies im hochmolekularen Bereich um die 112 kDa (Abbildung 3-13).

Ni: Auch die Ni-Spezies um das Elutionsvolumen 413 mL bildete bei allen Pflanzen die Hauptmenge der aufgefundenen Ni-Spezies (Abbildung 3-13). Optisch etwas undeutlicher zu erkennen, waren die weiteren Spezies in Möhren, Gurke und Kopfsalat. Auch das erhöhte Wiederfindungsverhalten von Nickel bei der GPC ähnelte im Allgemeinen dem des Cobalts. Auch hier konnten durch EDTA-Reinigung die Ni-eigenen Spezies in den Cytosolen gut wiedergefunden werden.

Cu: In den gesamten Spektren konnte Kupfer stets gut quantifiziert werden (hohe Konzentrationen gegenüber den Blindwerten). Mit Ausnahme von Tomatencytosol wurden in allen Proben immer zwei Cu-Spezies detektiert. Der niedermolekulare Peak stellte wiederum die bekannte 40 – 50 kDa – Spezies dar, die sich in vorherigen Spektren bereits als sehr ausgeprägter Bestandteil der Spezies gezeigt hatte. In verschiedener Intensität wurde eine zweite Cu-Spezies mit Molekülgröße von etwa 135 kDa aufgefunden. In nahezu gleicher Präsenz erschienen die beiden Cu-Spezies in Arabidopsis-, Kopfsalat- und Gurkencytosol (Abbildung 3-13), während die hochmolekularen Cu-Spezies in den restlichen Pflanzen in geringerer Menge vorkamen.

Zn: In sehr hohen Konzentrationen kamen die Zn-Spezies in allen Pflanzenproben als ein einziger Peak vor ($\gg 100 \mu\text{g/L}$). Auch hier machte sich die Präsenz der 40 – 50 kDa- Spezies erneut bemerkbar (Abbildung 3-13). Ob eine zweite Zn-Spezies im hochmolekularen Bereich bei Möhren und Paprika einen eigenständigen Peak darstellt, ist nur sehr undeutlich zu erkennen. Wie die vorausgehenden Darstellungen ist 40 kDa –Spezies genauso verantwortlich für die häufig vorliegende Erhöhung der Zn-Wiederfindung. Das ubiquitäre Zn-Vorkommen und seine hohen Konzentrationen in den verwendeten Systemen führte dazu, dass trotz ständiger EDTA-Reinigung die Zn-Kontaminationen nie restlos entfernt werden konnten.

**Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima**



**Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima**

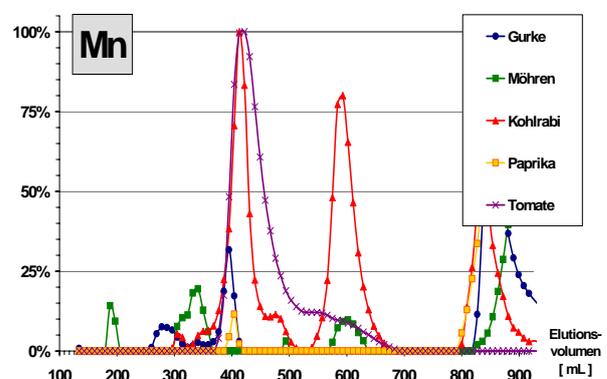
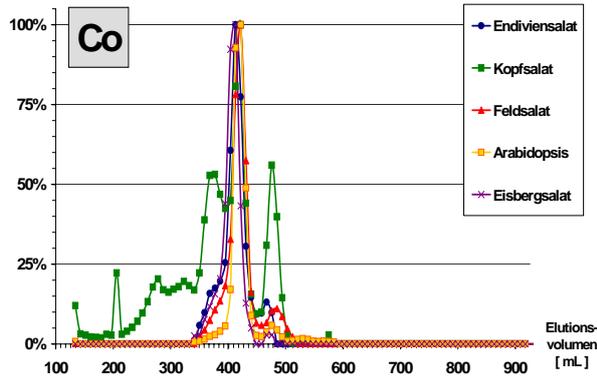
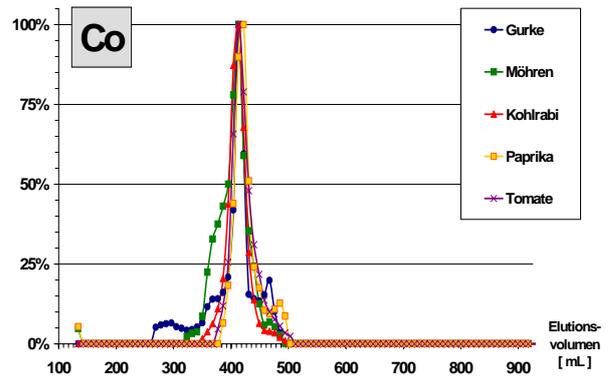


Abbildung 3-13 Elutionsprofile von Spezies der Nebengruppenelemente

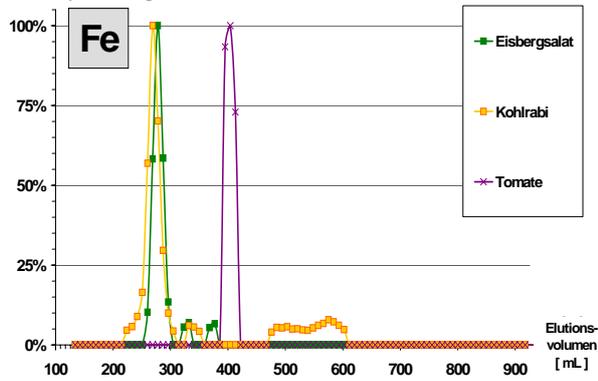
Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



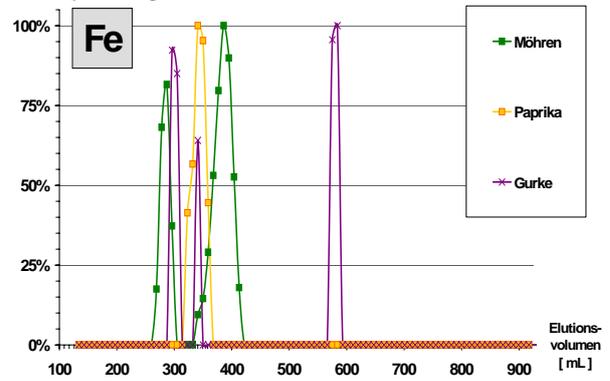
Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



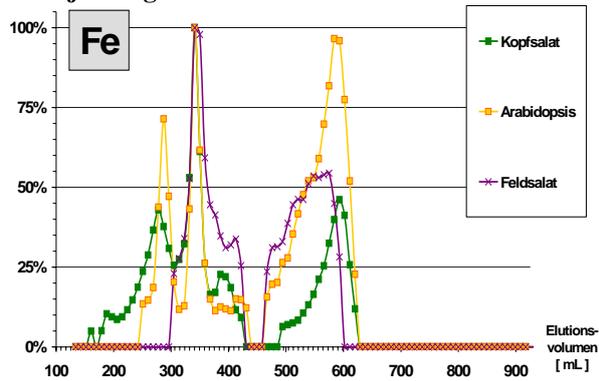
Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima

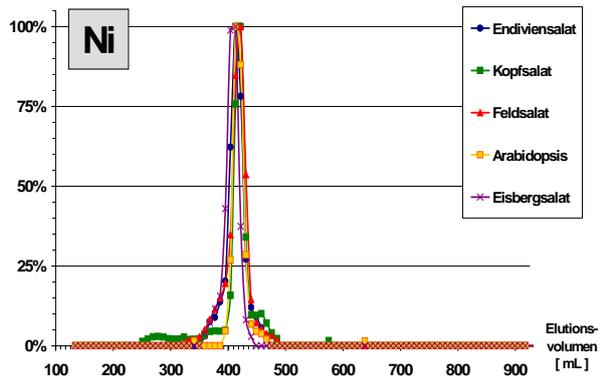


Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima

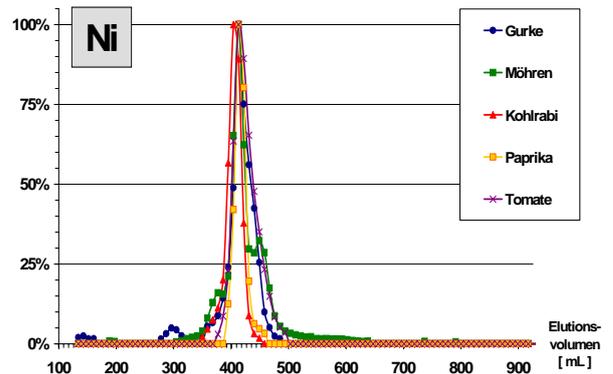


Forts. der Abbildung 3.13 Elutionsprofile von Spezies der Nebengruppenelemente

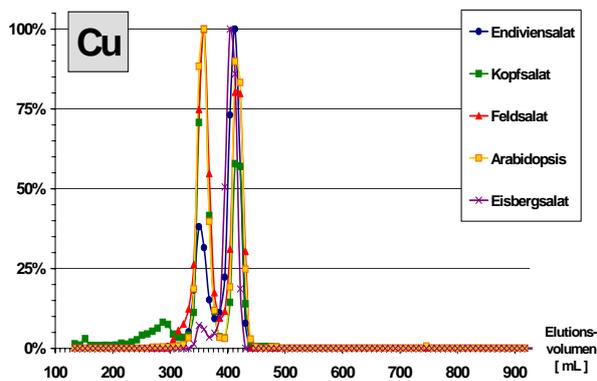
Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



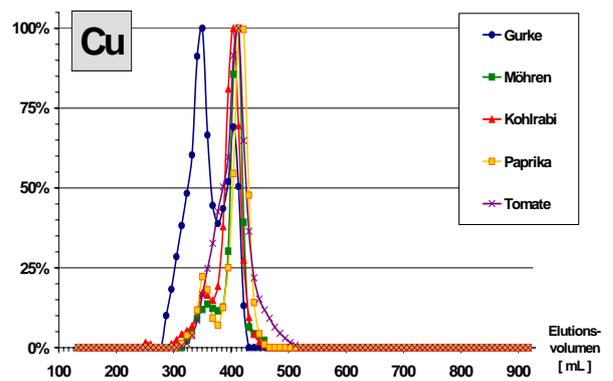
Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



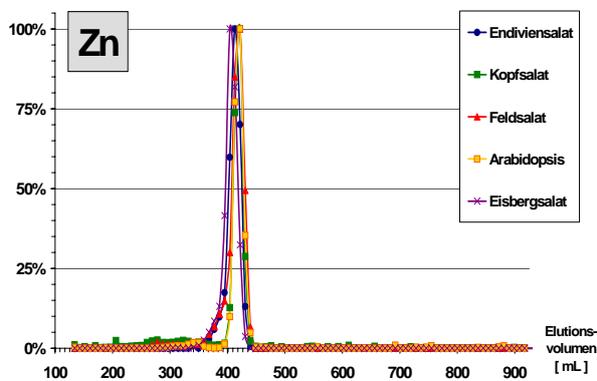
Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



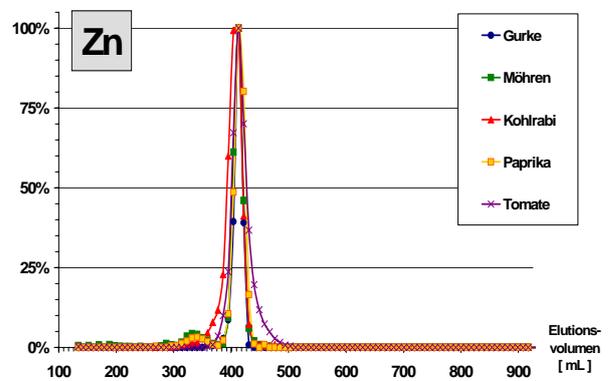
Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima

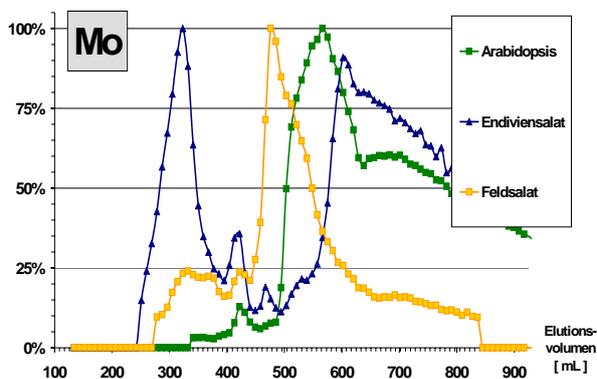


Forts. der Abbildung 3.13 Elutionsprofile von Spezies der Nebengruppen-elemente

Mo: Eine sehr starke Wechselwirkung mit dem Sephacryl wurde bei allen detektierten Mo-Spezies festgestellt, mit Ausnahme der Tomate, bei der keine Mo-Spezies nachgewiesen werden konnte. Alle Spektren beinhalten Peaks mit sehr ausgeprägtem Tailing-Effekt bis weit außerhalb des Elutionsvolumen (>980mL), die gänzlich die Hauptmengen an Mo-Spezies bildeten. Wie bei Eisen hat die Mo-Hintergrundkonzentration die quantitative Auswertung der Spektren erschwert. Auch hier zeigt sich die 40 kDa - Spezies bei mindestens sieben Pflanzen erneut in untergeordneter Rolle. Hochmolekulare Spezies wurden eindeutig in Möhren, Kopfsalat und Endiviensalat erkannt (Abbildung 3-14).

Cd: Cd-Spezies wurden in allen Proben entdeckt (Abbildung 3-14), auch wenn zum Teil aufgrund der Verdünnung bei der Cytosolherstellung nur qualitative Peaks erkennbar waren (z.B. bei Gurkencytosol). Keine Wechselwirkung mit Sephacryl wurde bei den vorkommenen Cd-Spezies beobachtet. Die kleinste Molekülgröße der Cd-Bindungsstoffe stellte erneut die 40 kDa-Spezies dar (Kohlrabi, Paprika, Endiviensalat, Arabidopsis und Feldsalat). Die Hauptbestandteile der Cd-Spezies bildete jedoch die hochmolekulare Spezies um die 200-300 kDa bei mindestens sieben Pflanzen, insbesondere bei den untersuchten Blattsalaten. Auch extrem hochmolekulare Cd-Spezies wurden bei den Blattsalaten entdeckt (Molekülgröße >500 kDa).

Konzentration als Prozent der jeweiligen Peakmaxima



Konzentration als Prozent der jeweiligen Peakmaxima

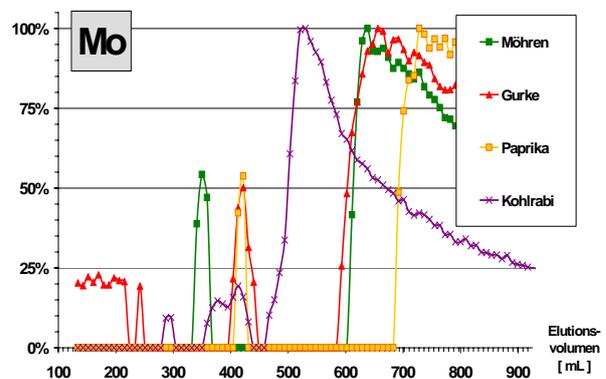
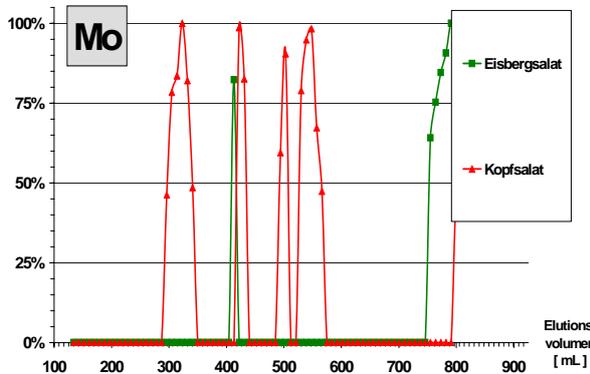
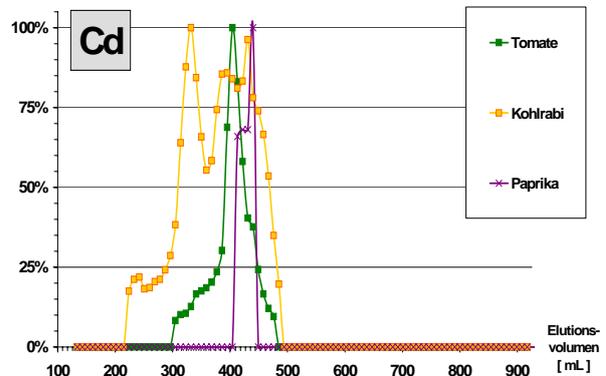


Abbildung 3-14 Weitere Elutionsprofile von Spezies der Nebengruppen-elemente

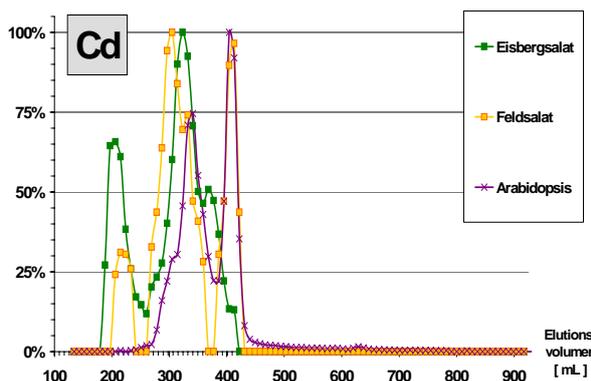
**Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima**



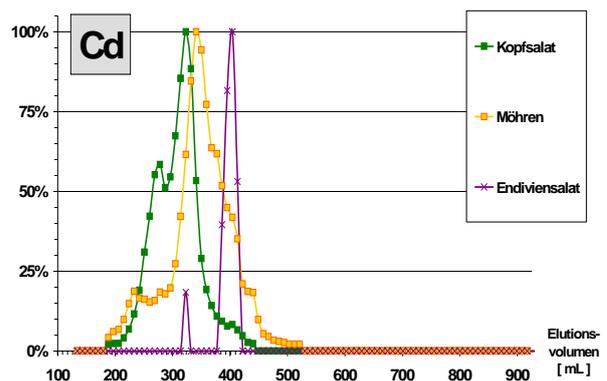
**Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima**



**Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima**



**Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima**



Fortsetzung der Abbildung 3-14 Weitere Elutionsprofile von Spezies der Nebengruppenelemente

3.3.3.4 Elemente der Seltenen-Erden

Y: Im Allgemeinen war die quantitative Erfassung der Peaks der Elemente der Seltenen-Erden aufgrund ihrer niedrigen Konzentration nur sehr schwer möglich. Desöfteren waren ihre Signal-Rausch-Verhältnisse sehr ungünstig, so dass eine Blindwertkorrektur mit achtfacher Standardabweichung notwendig war, um das Grundrauschen herauszufiltern. Dabei verblieben oft nur qualitative Peaks in den Spektren, die in diesem Abschnitt nicht berücksichtigt wurden. Das Yttrium, das trotz EDTA-Reinigung oft extrem erhöht wiedergefunden wurde, hatte möglicherweise eine hohe Affinität zu den im Cytosol enthaltenen Bindungsstoffen. Ihre GPC-Spektren sind folglich nur mit Vorbehalt zu betrachten, da die aufgefundenen Y-Spezies eher die potentiellen Inhaltsstoffe darstellen, die

in der Lage sind, freie Y-Ionen während der GPC-Trennung zu binden. Die Peaks der 50-75 kDa Spezies traten hierbei am häufigsten auf (Abbildung 3-15).

Rh: Keine Rh-Spezies wurde in den Blätterpflanzen aufgefunden. Im Gegenteil dazu erschien ein identischer Rh-Peak mit demselben Elutionsverhalten in den restlichen Pflanzenproben (Abbildung 3-15). Mit Konzentration von 1 ng/L oder kleiner waren sie sehr niedrig. Zur Rh-Bestimmung konnten die Peaks aber aufgrund sehr gut reproduzierbarer Messungen und der noch tieferen Pufferblindwerte quantitativ erfasst werden. Es handelte sich bei den Spezies wieder um die 40 kDa Spezies, die in dieser Elementgruppe häufig wiedergefunden wurde.

U: Ebenfalls in allen detektierten U-Spezies erschienen die Peaks nahezu wie Rauschen, was darauf hindeutete, dass das Uran in vielen Arten durch die Bindungsstoffe unspezifisch mitgerissen werden kann. In wenigen Pflanzen zeigte lediglich die 40 kDa Spezies einen typischen chromatographischen Elutionspeak (Abbildung 3-15).

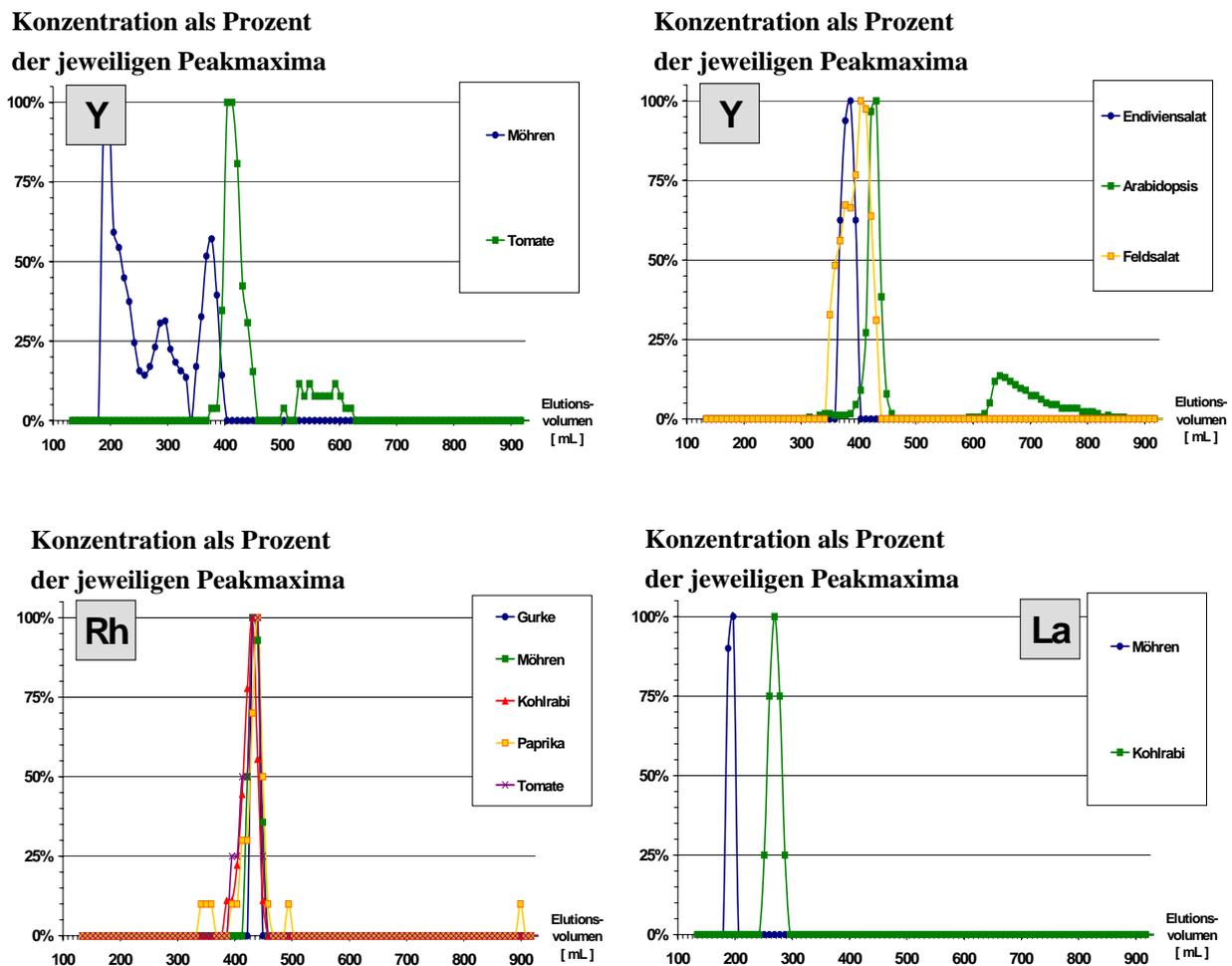
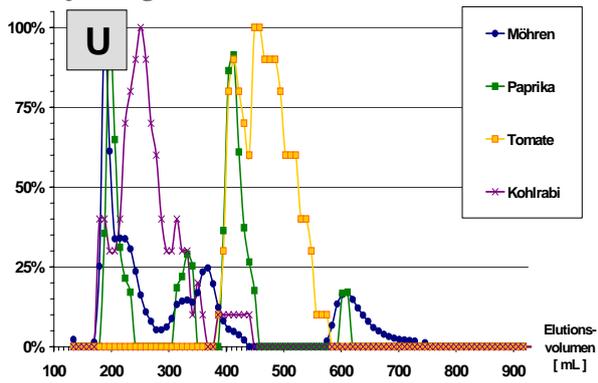
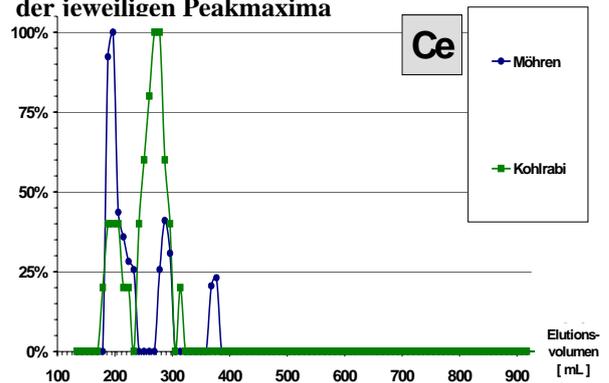


Abbildung 3-15 Elutionsprofile von Spezies aus der Elementgruppe der Seltenen-Erden

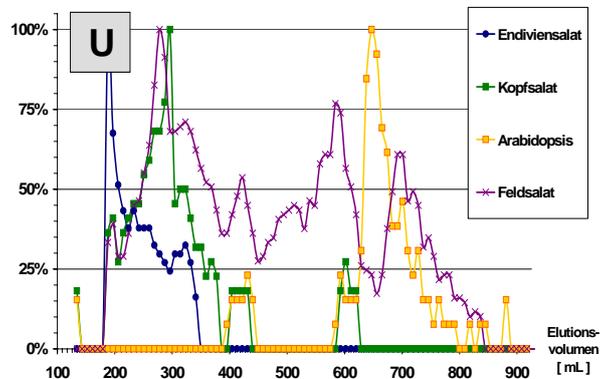
**Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima**



**Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima**



**Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima**



Forts. Abbildung 3.15 GPC-Spektren weiterer Elemente der Seltenen-Erden

La und Ce : Nur in Kohlrabi- und Möhrencytosol konnten La- und Ce-Spezies quantitativ erfasst werden. Im Allgemeinen erschienen sie in ihren Spektren nur als unregelmäßiges Rauschen im extrem hochmolekularen Massenbereich, das nicht als Speziespeak quantitativ zugeordnet werden konnte. Auch in den beiden genannten Pflanzen wurden die La- und Ce-Peaks im Elutionsvolumen von 270 und 195 mL aufgezeichnet (Abbildung 3-15).

Weitere Elemente der Seltenen-Erden :

Die Elemente Dy, Ho, Er, Yb, Tm, Lu wurden lediglich in Arabidopsis- und Feldsalatcytosol quantitativ gemessen. Graphische Darstellungen dieser Elemente wurden in diesem Abschnitt nicht zusätzlich wiedergegeben, da sie bereits im Kapitel 6.3.3 (Feldsalat) und Kapitel 6.3.10 (Arabidopsis) in ihrer absoluten Konzentration dargestellt worden sind. Die häufig erwähnten 30-50 kDa-Spezies bildeten die einzige Speziesgruppe, die diese Elemente der Seltenen-Erden banden. Wenn es sich hierbei letztendlich um eine homologe Speziesgruppe gehandelt hat, dann muss ihre Bindungskapazität sehr hoch und ihre Bindungsvermögen zu den Elementen relativ unspezifisch sein.

3.3.4 Darstellung und Interpretation der Multielementspektren

In den ausführlichen Darstellungen der beiden vorausgegangenen Abschnitte konnten einige vergleichbare Elutionsverhalten zwischen den Spezies betrachtet werden. Erst nach der Normalisierung in ihre relativen Konzentrationen wurden die Unterschiede und Gemeinsamkeiten sichtbar. Da die GPC-Methode die Analyten nach ihrer Größe trennt, kann es sich bei einem Peak um eine und dieselbe Spezies handeln. Deshalb war zu erwarten, dass die Spezies mehrere evtl. konkurrierende Elemente binden können und dass sich die Peaks von gebundenen und freien Elementen innerhalb eines Trennungslaufs überlappen werden.

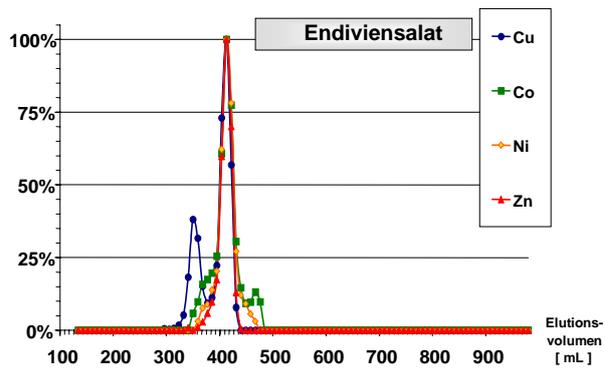
Da die Retentionszeiten von Speziespeaks in zahlreichen verschiedenen Trennungsläufen geringfügig variierten, wurden Elutionsverschiebungen von einer bis zwei Fraktionen von ± 9 mL teilweise berücksichtigt und die Schätzung mit unterschiedlicher Ungenauigkeit berechnet (s. Kapitel 3.3.1). Die Trennleistung des Sephacryls (Auflösung) nahm mit steigender Molekülgröße der Analyten schnell ab, so dass hier nur wenig Speziesgruppe diskutiert wird. Die Zusammenstellung erfolgte nach abgeschätzten Molekülgrößen der Spezies, bei denen eine Überlappung der Peaks direkt erkennbar war.

Gruppe 1 : Spezies im Massenbereich um 40 kDa

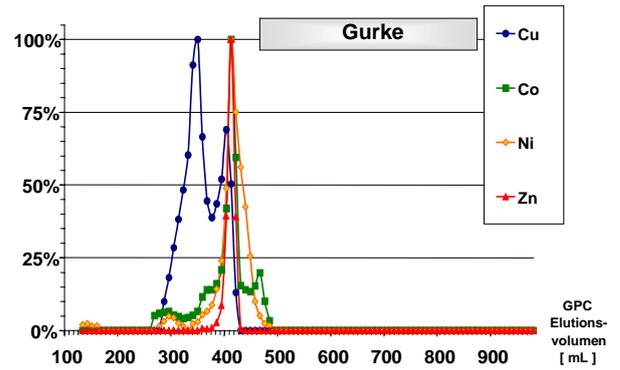
Die erste Gruppe stellt die niedermolekulare Speziesgruppe bei Elutionsvolumen (V_e) um 413 mL ($404 < V_e < 422$ mL; bzw. Molekülgröße zw. 35-50 kDa) dar. Die größte Anzahl an aufgefundenen Elementen im kalibrierten Massenbereich war an diese Speziesgruppe gebunden. Es ist wahrscheinlich, dass die Cytosole sehr viele Bindungsstoffe dieser Kategorie enthalten, die in der Lage sind, größere Mengen an Elementen bzw. sogar andere fremde Elemente zu binden. Darunter hebt sich Kobalt, Nickel, Kupfer und Zink ab, die in dieser Speziesgruppe in allen Pflanzen stets wiedergefunden wurden. Ihre Spektren sind in Abbildung 3-16 zusammengefasst, wobei die Überlappung der Peaks darin sehr gut erkennbar ist.

Die anderen Elemente der Nebengruppe (Mn, Cd und Rh), die schwereren Elemente der Hauptgruppen (Pb, Sn, Sb) sowie die Elemente der Seltenen-Erden zeigten ebenfalls höhere Affinität zu dieser Spezies. Da sie nur sporadisch erschienen, wurde ihr Elutionsverhalten hier nur anhand weniger Elemente veranschaulicht (Abbildung 3-17).

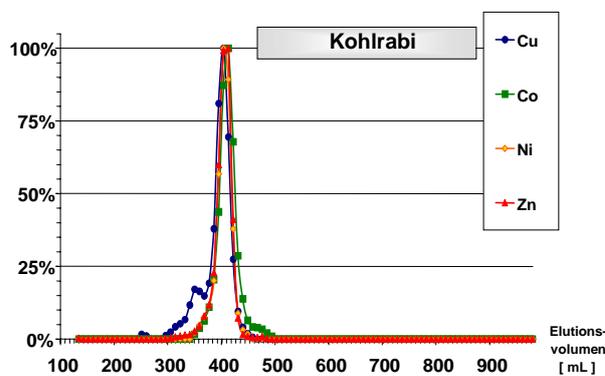
Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



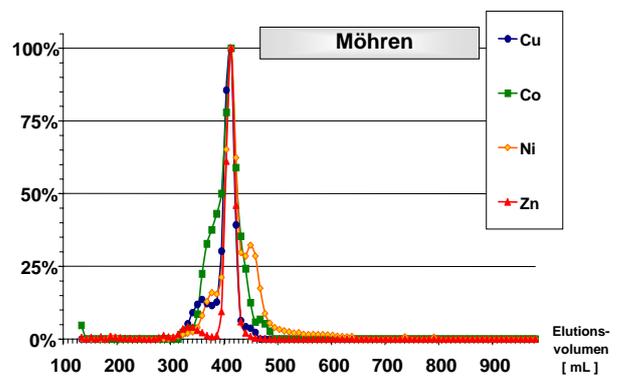
Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



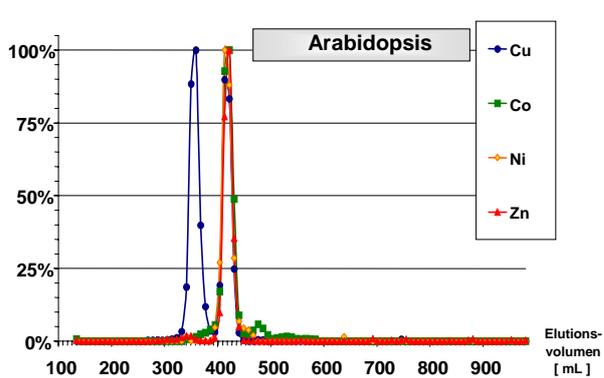
Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima

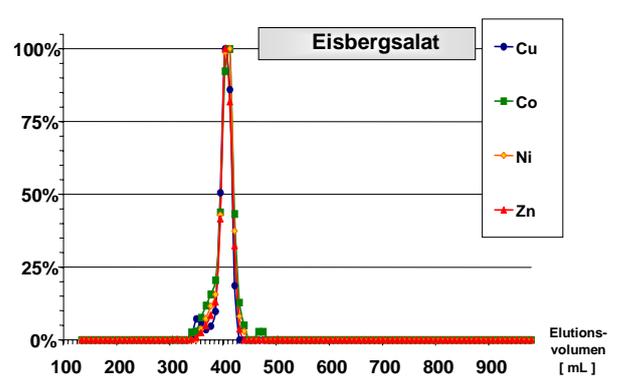
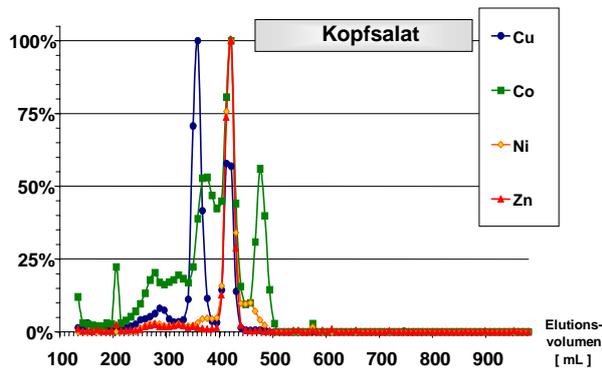
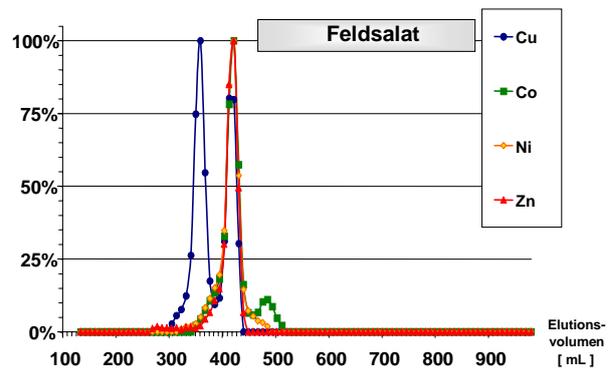


Abbildung 3-16 Die GPC-Spektren der Co-, Ni-, Cu- und Zn-Spezies mit ihren relativen Konzentrationen beim Elutionsvolumen von 413 mL.

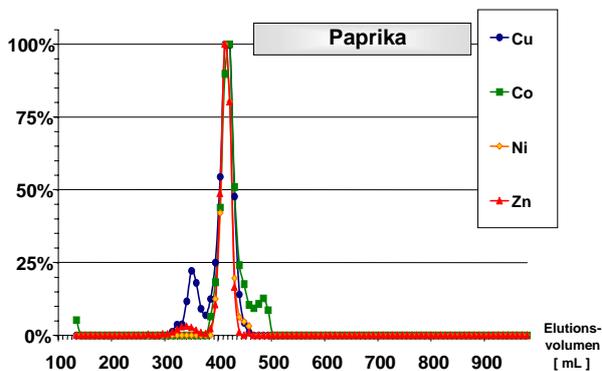
Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



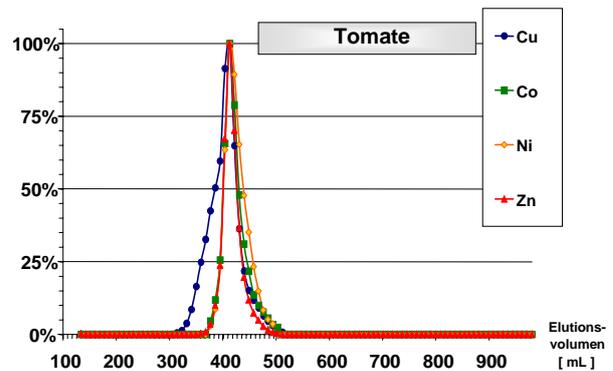
Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima

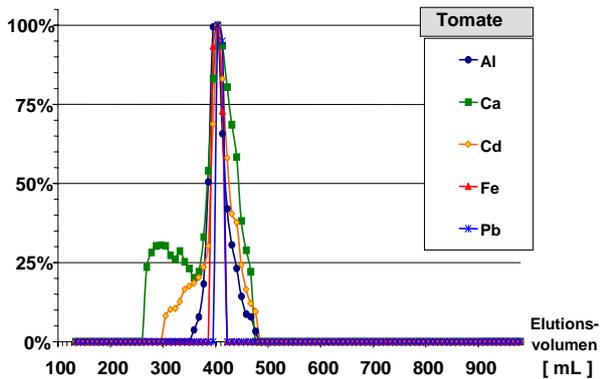


Forts. Abbildung 3.16 Die GPC-Spektren der Co-, Ni-, Cu- und Zn-Spezies in ihren relativen Konzentrationen bei Elutionsvolumen 413 mL (Molekülgröße ca. 40 kDa)

Gruppe 2 : Spezies im Massenbereich um 140 kDa

Das einzige Element, das in allen Pflanzenproben an diese Speziesgruppe gebunden vorkam, war das Kupfer mit Elutionsvolumen (V_e) um die 360 mL ($350 < V_e < 368$ mL; bzw. Molekülgröße zw. 110-165 kDa). Alle Spezies zeigten einen identischen Peak, obwohl sie aus verschiedenen Pflanzenteilen und verschiedenen Pflanzenarten stammten. Weitere Spezies wurden nur vereinzelt aufgefunden wie z.B. die Cd-Spezies in Eisbergsalat, die Al- und Sn-Spezies in Möhren sowie die Co-Spezies in Kopfsalat (Abbildungen nicht gezeigt).

Konzentration als Prozent
der jeweiligen Peakmaxima



Konzentration als Prozent
der jeweiligen 40 kDa Peaks

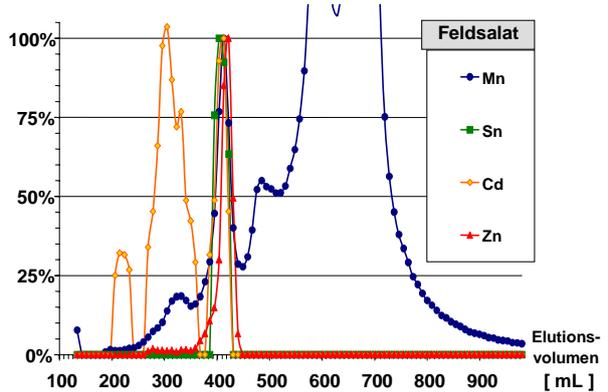
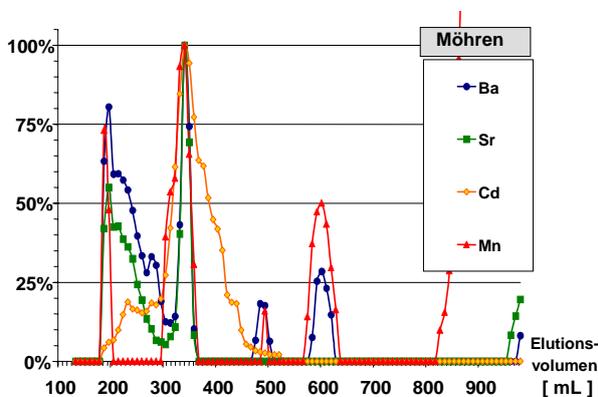


Abbildung 3-17 Erkennbare Überlappungen der Elutionsprofile verschiedener Elemente aus Tomaten- und Feldsalatcytosol im Bereich der 40 kDa-Spezies

Gruppe 3 : Spezies im Massenbereich um 200 kDa

Ein breiterer Massenbereich wurde in der Speziesgruppe von 200 kDa berücksichtigt (Elutionsvolumen (V_e) um die 340 mL ($330 < V_e < 350$ mL; bzw. Molekülgröße zw. 165-250 kDa). Insbesondere vier Elemente (Ba, Sr, Cd und Fe) wurden, gebunden an diese Speziesgruppe, entdeckt. Dabei wurde die vorliegende Ba-Spezies häufig von der Sr-Spezies begleitet. Als weitere Elemente bildeten die 200 kDa Fe- und Cd-Spezies in etwa drei bis vier Pflanzenproben die Hauptmenge der Gesamteisen- bzw. Gesamtcadmiumspezies. Gefunden wurde auch eine Mn-Spezies in Möhren. Als Beispiel sind die 200 kDa Spezies aus Möhren- und Arabidopsiscytosol in Abbildung 3-18 dargestellt.

Konzentration als Prozent
der jeweiligen 200 kDa Peak



Konzentration als Prozent
der jeweiligen 200 kDa Peak

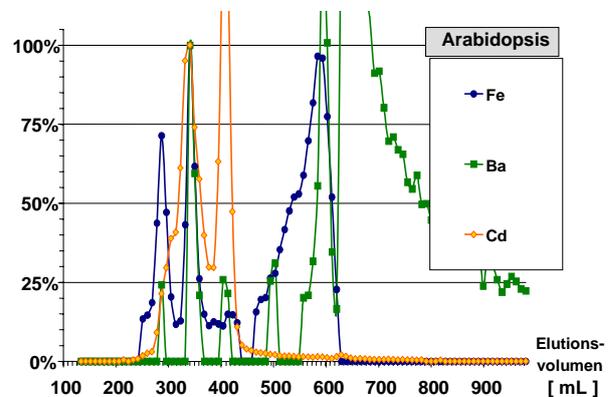


Abbildung 3-18 Erkennbare Überlappungen der Elutionsprofile verschiedener Elemente aus Mören- und Arabidopsiscytosol im Bereich der 200 kDa-Spezies

Gruppe 4 : Spezies im Massenbereich über 300 kDa

Zuordnungen der Peaks in einem so breiten Massenbereich waren nur sehr schwer möglich. Noch erkennbar sind einige Peaks der Cd-Spezies um die 300 kDa (Elutionsvolumen um 320 mL), die mit Mn- oder Mo-Spezies überlappen (Abbildung 3-19).

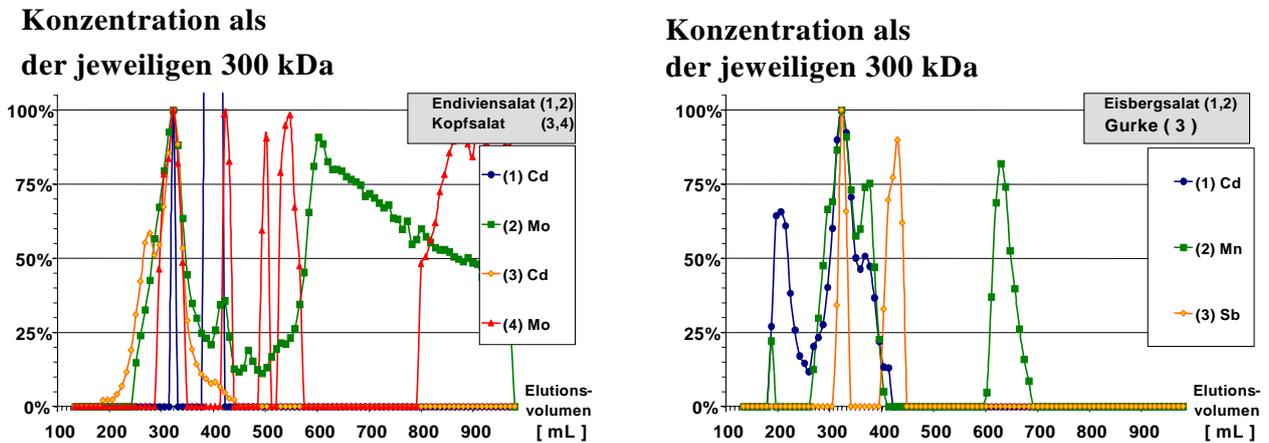


Abbildung 3-19 Erkennbare Überlappungen der Elutionsprofile verschiedener Elemente im Massenbereich um die 300 kDa.

Gruppe 5 : Spezies bei Elutionsvolumen um 500 mL

In dieser ersten der beiden Speziesgruppen außerhalb des kalibrierten Massenbereiches wurden fünf Spezies detektiert: Li, Rb, Ba, Sr und Tl. Während die Li-Spezies bei keiner Pflanzenprobe Überlappung mit den anderen genannten Speziespeaks zeigten, wurde insbesondere bei Paprika und Möhren eine gute Übereinstimmung der restlichen vier Spezies beobachtet (s. Abbildung 3-20).

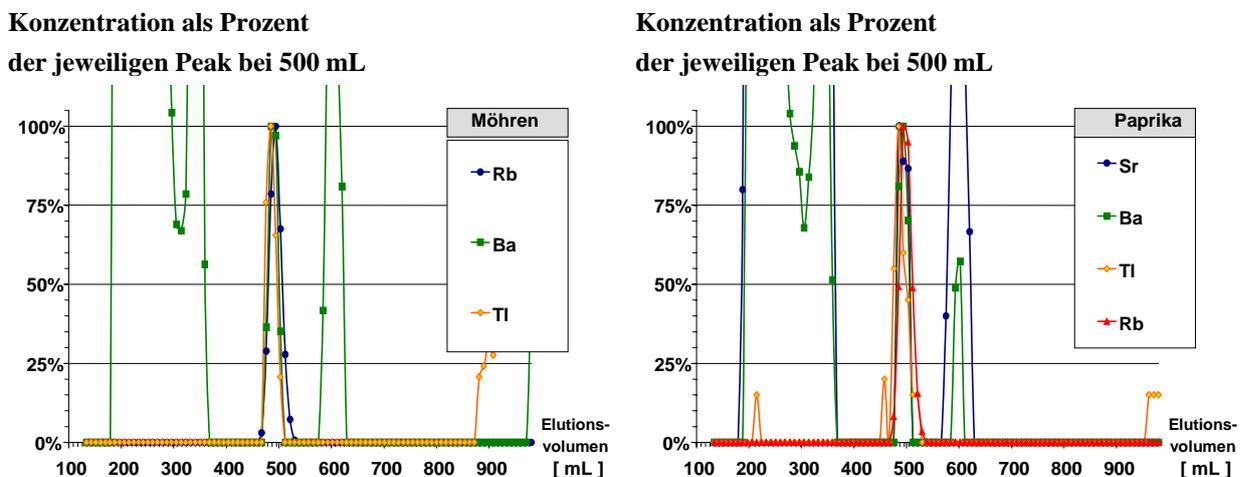


Abbildung 3-20 Erkennbare Überlappungen der Elutionsprofile verschiedener Elemente bei Elutionsvolumen um die 500 mL.

Gruppe 6 : Spezies bei Elutionsvolumen um 600 mL

Mit Ausnahme von Tomate erschien in dieser Gruppe die Magnesiumspezies als Einzelpeak in allen Pflanzencytosolen. Im Elutionsbereich um 600 mL wurde die Überlappung einiger Spezies der Erdalkalielemente (Mg, Ca, Ba und Sr) mit weiteren zwei Spezies (Al und Mn) beobachtet, die in den Blattsalaten nicht vorkamen. Bei Gurke wurde eine Peaküberlappung mit allen Erdalkalielementen gefunden (Mg, Ca, Ba und Sr). Bei Kohlrabi, Paprika und Möhren kamen bei diesen Spezies noch vereinzelt Al- und Mn-Spezies vor (Abbildung 3-21).

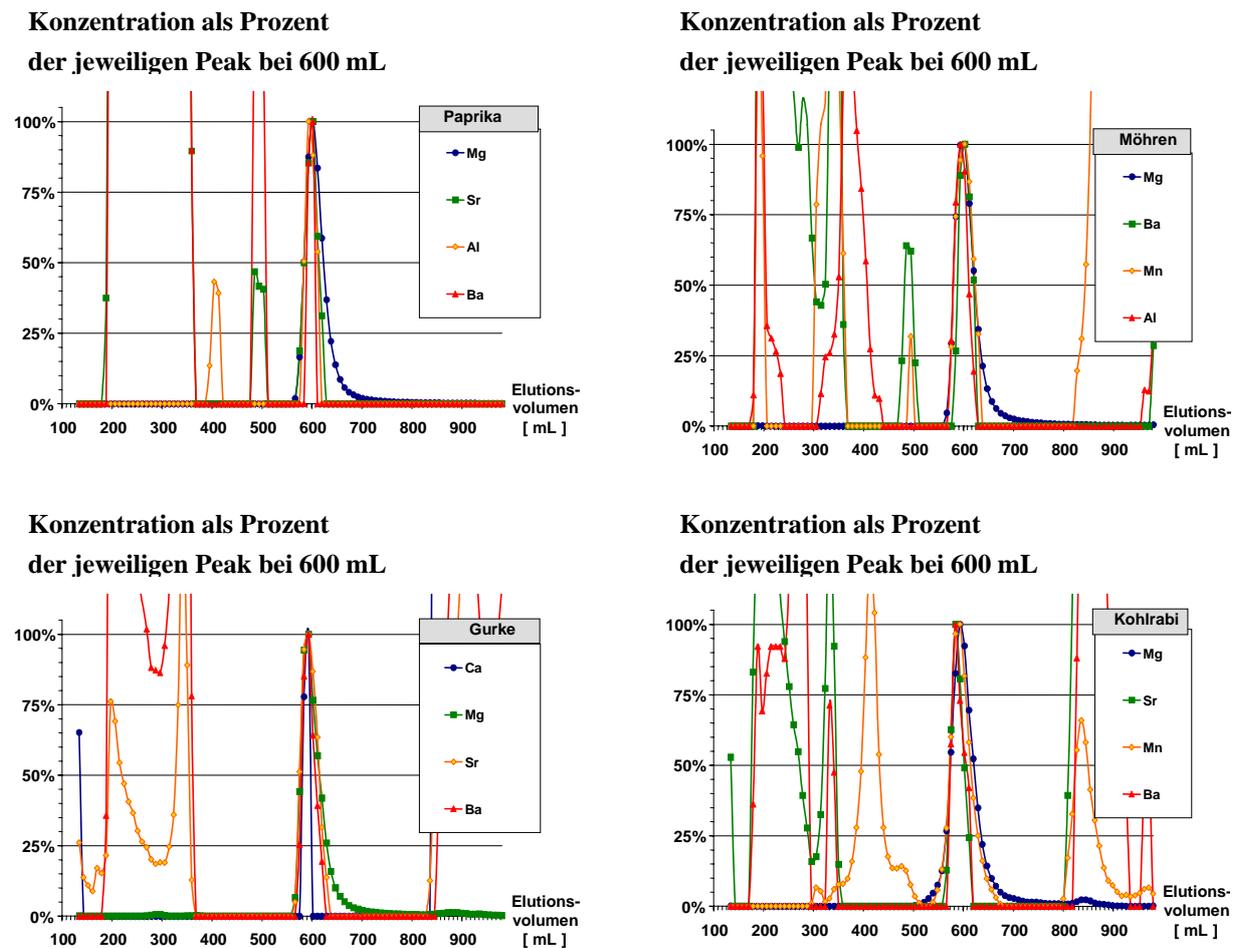


Abbildung 3-21 Erkennbare Überlappungen der Elutionsprofile verschiedener Elemente bei Elutionsvolumen um die 600 mL.

Eine übersichtliche Zusammenfassung der o.g. Speziesgruppen zeigt die Tabelle 3-4. Es gibt noch weitere quantitativ gefundene Spezies, die in der Tabelle nicht aufgenommen wurden, da sie keine erkennbaren Übereinstimmungen mit anderen gezeigt hatten. Daher wurde auf Darstellung und Diskussion dieser Elemente verzichtet.

Zur Überprüfung der hier herausgefundenen Zusammenhänge ließen sich weitere Methoden einsetzen, z.B. durch die Auswahl anderer GPC-Säulenmaterialien oder anderer Chromatographiemethoden. Auch eine Anzucht des Pflanzenmaterials unter standardisierten Anbaubedingungen würde eine zusätzliche Absicherung liefern. Ebenfalls ist es unumgänglich, zur Identifizierung auf verschiedene Analysemethoden zurückzugreifen (vgl. Kapitel 3.4), da es bei einer so großen Vielfalt von möglichen Spezies häufig an erhältlichen Standardsubstanzen mangelt.

Tabelle 3-4 Die Zusammenfassung der Spezies nach ihrer Größe

(A: Blattsalate und Arabidopsis; B: Restliche Pflanzen)

A.	Gruppe	Eissalat	Endivien	Feldsalat	Kopfsalat	Arabidopsis
	1	Co-Ni-Cu-Zn-Sb	Co-Ni-Cu-Zn-Mn-Sn-Sb-Cd-Pb	Co-Ni-Cu-Zn-Mn-Sn-Sb-Cd-Pb-B-Al-Sr-Y-Er-Yb-Tm-Lu	Co-Ni-Cu-Zn-Al	Co-Ni-Cu-Zn-Ba-Al-Cd-Pb-Mn-Sn-Y-Dy-Ho-Er-Yb-Tm-Lu
	2	Cu	Cu	Cu	Cu	Cu
	3	Ba-Sr		Sr-Fe-Cd	Ba-Fe	Ba-Fe-Cd
	4	Mn-Cd	Mo-Cd		Mo-Cd	
	5	Li Rb	Li Rb	Li Rb	Li Rb	Li Rb-Ba
	6	Mg	Mg	Mg	Mg	Mg-Ba
B.	Gruppe	Gurke	Paprika	Tomate	Kohlrabi	Möhren
	1	Co-Ni-Cu-Zn-Rh	Co-Ni-Cu-Zn-Al-Mn-Sn	Co-Ni-Cu-Zn	Co-Ni-Cu-Zn-Mn-Sn-Sb-B-Ga-Cd-Rh-Cd-Rh	Co-Ni-Cu-Zn-Ga-Sb-Rh
	2	Cu	Cu	Cu	Cu	Cu-Al
	3	Ba-Sr-Sb	Ba-Sr-Fe	Ba-Sr	Ba-Sr-Cd	Ba-Sr-Mn-Cd
	4	Sb				
	5	Li Rb	Li Rb-Ba-Sr-Tl	Li Rb	Li Rb	Li Rb-Ba-Tl
	6	Mg-Ca-Ba-Sr	Mg-Sr-Al-Ba		Mg-Sr-Mn-Ba	Mg-Al-Mn-Ba

3.3.5 Diskussion

In den Abschnitten 3.1 bis 3.3 wurden verschiedene Aspekte der Multielement-Speziation gezeigt, bei der die off-line-Kopplung der Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) mit der ICP-QMS zum Einsatz kam. Sie stellt bis heute eine häufig eingesetzte Analysemethode zur Speziationsanalytik in Pflanzen dar (Sojabohnen: Koplik, 2002; Fingerova, 1999; Stone, 1990; Tee: Odegard, 1997; Radieschen: Matsunaga 1996; Zuckerrüben, Bambus: Matsunaga, 1997; Wein: Szpunar, 1998; Gräser: Klueppel, 1998, Jakubowski, 1998; Pflanzen allgemein: Szpunar, 1999). Von einer allgemein umfassenden Methode zur Multielement-Speziation in pflanzlichen Lebensmitteln ist die in dieser Arbeit eingesetzte Methode jedoch noch weit entfernt. Denn sowohl die ICP-QMS zur Elementdetektion als auch die GPC-Sephacryl-S400HR zur Auftrennung der Elementbindungsformen beinhalten jeweils Schwierigkeiten, die gegenwärtig erst durch Kombination mit weiteren Techniken gelöst werden können (Szpunar, 2000).

Das größte Problem des Quadrupolsystems der ICP-QMS ist das niedrige Auflösungsvermögen der Isotope ($> 0,7$ amu) und die dadurch verursachten Interferenzen (Montes-Bayon, 1999). Viele der Molekülinterferenzen konnten erst nach einer aufwendigen Voruntersuchung mit Empfindlichkeitsverlusten der zu messenden Elemente korrigiert werden (Co, Ni, Sr, Ba, Ga, Fe, einige der Elemente der Seltenen-Erden (Kapitel 2.3.1)). Viele Elemente konnten durch hohe Blindwerte nach verschiedenen Interferenzkorrekturen häufig nicht mehr quantitativ erfasst werden (Se, Fe, Ga, Sn, einige der Elemente der Seltenen-Erden). Zusätzlich konnte bei Monoisotopen aufgrund der Isotopenüberlagerungen kein Alternativisotop ausgewählt werden (wie z.B. Cu-63 und Cu-65). Auf die Messung einiger Elemente musste aufgrund zu hoher Matrixstörung sogar komplett verzichtet werden (As, Cr, V, Sc, Pd). Durch den Einsatz weiterer Techniken wie z.B. der hochauflösenden Massenspektrometrie oder von Reaktionszellen könnten diese Probleme umgangen werden. Noch sind diese aber mit einem sehr hohen Kostenfaktor verbunden (Ferrarello, 2000).

Auch bei der Gel-Permeations-Chromatographie müssen für eine quantitative Erfassung generell Kompromisse eingegangen werden. Ein „Spiking“ mit externen Standardionen als Hilfe zur Verifizierung der Wiederfindung ist nicht immer empfehlenswert, da eine selektive Steigerung der Metallkonzentration aufgrund des möglichen freien Metallbindungsvermögens bestimmter Proteine eintreten kann (Reinecke, 1990). Außerdem kann eine Zugabe von Metallsalzen die Bildung verschiedener Modifikationen der spezifischen Metallspezies verursachen. Eine Konzentrationsminderung der in der mobilen Phase zugegebenen Metallionen wurde z.B. bei Trennungen von Proteinen mit freiem Metallbindungsvermögen beobachtet (Reinecke, 1990).

Bekannt ist auch die unspezifische Bindung von Metallionen oder Proteinen an die stationäre Phase der GPC (vgl. Martin, 1988; Evans, 1979; Johnson, 1980). Die Vorschläge sie zu minimieren, sind u.a. eine Reduktion der aktiven Seitengruppen, z.B. durch NaBH_4 , oder eine kontinuierliche Sättigung mit ausgewählten Ionen (Methylation der Bindungsnische: Sunaga, 1988). Während eine Reinigung, z.B. durch EDTA, zur Entfernung der Kontaminationen (zurückgehaltenen Ionen) gut geeignet ist (Vgl. Koplík, 2002), hat sich eine Zugabe von EDTA zur mobilen Phase in den Vorversuchen als ungeeignet erwiesen. Eine Zerstörung der schwachen Komplexe und Degradation der Metallsignale wurde von Crews et al., 1989 festgestellt. Ein zu stark verdünnter Puffer ist auch aufgrund steigender Wechselwirkungen der niedermolekularen Bindungsformen mit dem Gelmaterial nicht geeignet. Der Zusatz an Metallionen in den Puffer als Prävention vor einer Dissoziation der Metallspezies führt hingegen zur Bildung neuer Elementkomplexe mit Spezies von höherer Bindungskapazität (Vgl. Reinecke, 1990).

Über die Wechselwirkungen des Sephacryls mit Ionen wurde von Ji, 1997 und Günther, 2000 nicht berichtet, in der die Elemente Cd und Zn ebenfalls per GPC-Sephacryl untersucht wurden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die vorhandenen Bindungsformen sowie die von ihnen zu bindenden Ionen in den Cytosolen in vergleichbarer Molmenge vorlagen. Dasselbe Verhalten wurde in dieser Arbeit z.B. bei Zn in Möhrencytosol oder Cu in Endiviensalatcytosol beobachtet, wo sich durch einen Spülvorgang mit EDTA-Lösung die Elementwiederfindungen nicht verändert hatten (vgl. Tabelle 3-3 und Kapitel 6.2 - Anhang); d.h. es wurde weder die Bildung neuer Zn- bzw. Cu-Spezieskomplexe durch noch freie metallbindende Spezies (erhöhte Elementwiederfindung nach der GPC) noch eine Adsorption der im Cytosol enthaltenen Zn- bzw. Cu-Ionen an das Sephacryl (Verlust an Elementwiederfindung nach der GPC) beobachtet.

Über das Vorhandensein von niedermolekularen Spezies in den Pflanzenzellen, z.B. für die Spezies Co, Ni, Cu, Pb, Zn, Ba, Sr wurde berichtet, wobei für die Spezies eine Molekülgröße zwischen 5 – 15 kDa abgeschätzt wurde (Odegard, 1997; Makarov, 1998; Szpunar, 1999; Fingerova, 1999; Günther, 1992; Koplík, 2002). Allerdings wurden in diesen Arbeiten verschiedene GPC-Materialien verwendet, die für diesen Massenbereich speziell geeignet waren (häufig Sephadex bzw. Superdex). In dieser Arbeit wurden jedoch Überlappungen von vielen Speziespeaks bei einem geschätzten Massenbereich von 25 - 50 kDa gefunden (Tabelle 3-4 – Speziesgruppe 1; Elutionsvolumen 404 – 431 mL). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass das eingesetzte Sephacryl-S400HR besonders in dem niedrigen Massenbereich bereits ein anderes Trennverhalten für diese Speziesgruppe aufwies als Sephadex bzw. Superdex. Die untere Trenngrenze des Sephacryls (400HR) lag bei 20 kDa (=Elutionsvolumen von 14 mL, bzw. nur 1 1/2 Fraktionen hinter dem Elutionsvolumen der Speziesgruppe-1).

Möglich ist ebenfalls, dass die Speziesgruppe-1 verschiedene nicht globuläre Spezies beinhaltet, die im Trennverlauf durch das Sephacryl-S400HR eine größere Molekülgröße vorgeben könnten. Verschiedene Spezies mit ähnlicher Molekülgröße können sich also in den GPC-Fraktionen befinden, die aufgrund des niedrigen Auflösungsvermögens der GPC in den angegebenen Gruppen gemeinsam eluierten. Zur eindeutigen Beurteilung dieses Verhaltens und der Zusammenhänge zwischen den Elementen und ihrer spezifischen bzw. unspezifischen Bindungsformen ist eine Identifizierung der Spezies samt den von ihnen gebundenen Elementen erforderlich.

Ein allgemein bekanntes Problem der Speziationsanalytik von natürlich vorkommenden Metallspezies in biologischen Proben besteht darin, dass nicht nur die Referenzmaterialien sondern auch die einfachen Standards für die meisten Metallspezies fehlen, insbesondere für die im Spuren- bzw. Ultraspurenbereich vorkommenden Analyten. Es ist verständlich, dass die Speziationsanalytik heutzutage an erster Stelle mit einem Erkundungsvorhaben (Suchen nach den neuen Spezies) anstatt mit Bestätigungsvorhaben (Bestimmung einer bereits erwarteten Spezies) betrieben wird (Vgl. Lobinski, 1998).

Demnach handelt es sich bei den hier erhaltenen Ergebnissen der GPC-ICP-QMS nicht um eine Identifizierung, wie sie in der Chromatographie typisch ist (Übereinstimmung der Retentionszeiten der Analyten mit denen von erhältlichen Standards). Im Allgemeinen stellen die Peaküberlappungen ein Indiz für einen möglichen Zusammenhang zwischen den Elementen dar. Zur Überprüfung der vorgeschlagenen Zusammenhänge müssen weitere komplementäre bzw. orthogonale Methoden herangezogen werden. Z.B. durch die Auswahl eines anderen GPC-Säulenmaterials, dessen Trennvermögen ein besseres Optimum für den erwarteten Massenbereich besitzt, oder anderer Chromatographie- bzw. Elektrophoresemethoden. Erst nach einer solchen Bestätigung kann von einem Zusammenhang zwischen den Spezies durch deren Bindungsformen gesprochen werden (Szpunar, 1999; Lobinski, 1998; Gonzales LaFuente, 1999; Lobinski & Potin Gautier, 1998). Es ist also in derartigen Fällen unumgänglich, zur Identifizierung bzw. Charakterisierung der Spezies auf verschiedene aufschlussreichere Analysemethoden zurückzugreifen (Szpunar, 2000).

3.4 Untersuchung der HM-Cd-SP in *Arabidopsis thaliana*

Im Anschluß an die Multielementuntersuchungen in den 10 verschiedenen Pflanzenproben wurde eine gezielte Untersuchung der hochmolekularen Cd-Spezies von *Arabidopsis* durchgeführt. Zuerst erfolgte eine Untersuchung über die Molekülart der HM-Cd-SP durch Verdau mit dem Enzym Proteinase K. Danach wurden Anreicherungsverfahren zur Isolierung der Spezies optimiert. Um die Konzentration der HM-Cd-SP in den Probelösungen zu erhöhen, führten verschiedene Anreicherungsverfahren durchgeführt (Ultrafiltrations- und Fällungsversuche). Außerdem erfolgte eine weitere Aufreinigung der HM-Cd-SP durch native kontinuierliche Gelelektrophorese. Die Abbildung 3-22 zeigt die Arbeitsschritte der Untersuchungen, auf die in den Unterkapiteln im Einzelnen eingegangen wird.

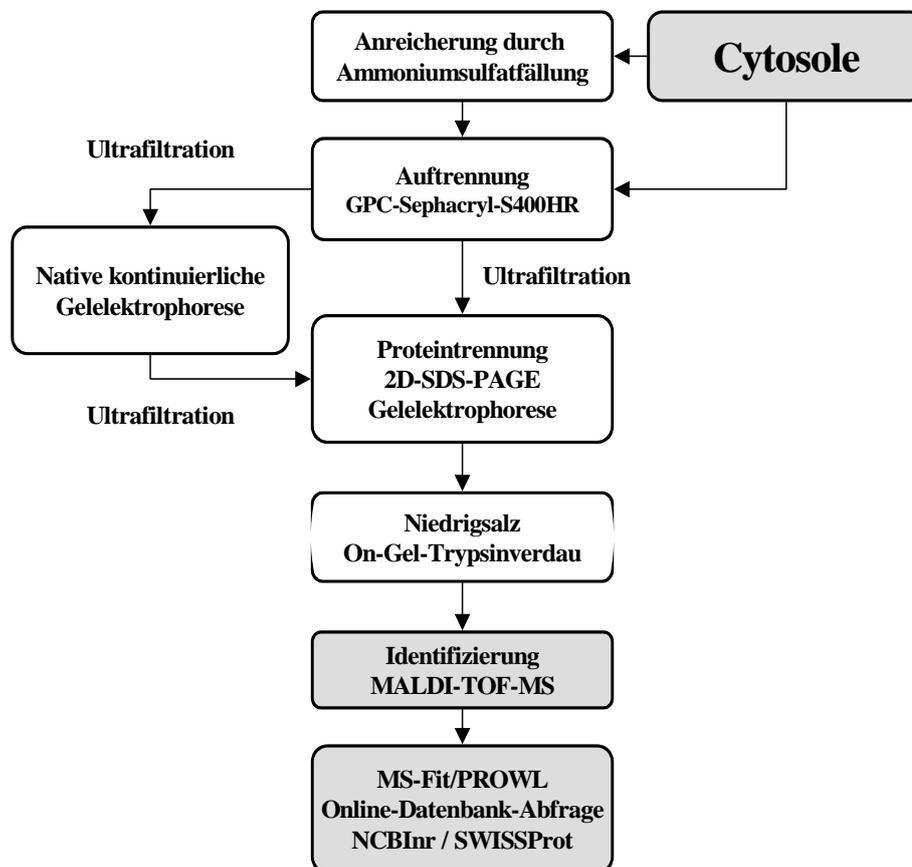


Abbildung 3-22 Arbeitsschritte zur Isolierung und Identifizierung der hochmolekularen Cd-Spezies aus dem Cytosol von *Arabidopsis thaliana*

3.4.1 Gelpermeationschromatographie der HM-Cd-Spezies

Die GPC-Untersuchungen haben gezeigt, dass in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* das gleiche Elutionsprofil von Cadmium wie in den Untersuchungen der pflanzlichen Lebensmittel sowie in vorangegangenen Arbeiten (Ji, 1997) gefunden wurde. Durch GPC-ICP-MS-Kopplung wurden mindestens zwei Cadmiumspezies in Arabidopsiscytosol detektiert. Das erste Peakmaximum mit einer Konzentration von 2,6 $\mu\text{g/L}$ Cd wurde im hochmolekularen Bereich gefunden (Abbildung 3-23). Das zweite Peakmaximum mit einer Konzentration von 3,5 $\mu\text{g/L}$ Cd wurde im niedermolekularen Bereich detektiert. Gemäß der Kalibration mit Proteinstandards wurden für beide gefundene Peakmaxima folgende Molekulargewichte abgeschätzt:

Tabelle 3-5 Abschätzung der Molekulargewichte der Cadmiumspezies in Arabidopsiscytosol

Cd-Spezies	Elutionsvolumen der Peakmaxima	Molekulargewicht
Hochmolekulare Spezies	341 mL	200 kDa
Niedermolekulare Spezies	413 mL	< 40 kDa

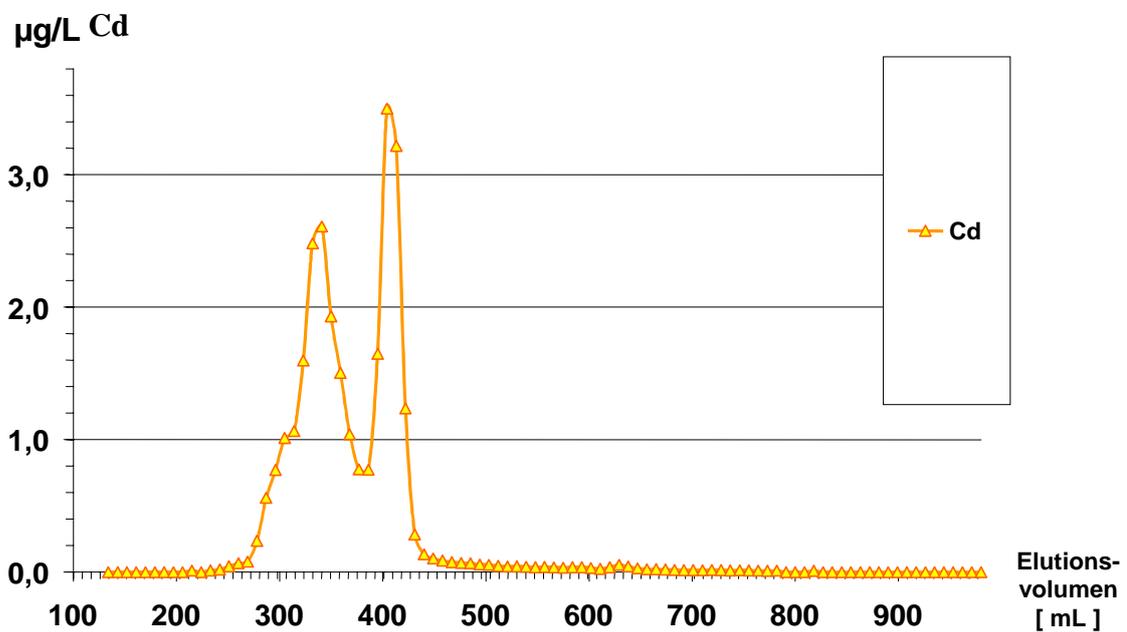


Abbildung 3-23 Elutionsverhalten von Cd bei der GPC von Arabidopsiscytosol

3.4.2 Bestimmung weiterer Elemente in der Fraktion der HM-Cd-SP

Nach der GPC-Untersuchung des Arabidopsiscytosols wurden drei weitere Elemente (Ba, Fe und Cu) in der Fraktion der HM-Cd-SP gefunden. Die Konzentration von Fe war ebenfalls im Peakmaximum der HM-Cd-SP am höchsten (341 mL). Das Peakmaximum von Cu war ein wenig nach höherem Elutionsvolumen verschoben (360 mL). Ba wurde in der Fraktion der HM-Cd-SP mit Konzentration von 0,13 $\mu\text{g/L}$ gefunden.

Tabelle 3-6 Konzentrationen von Cu, Fe und Ba in der Peakmaximafraktion der HM-Cd-SP

Element	Konzentration
Cu	1,8 $\mu\text{g/L}$
Fe	15,9 $\mu\text{g/L}$
Ba	0,13 $\mu\text{g/L}$

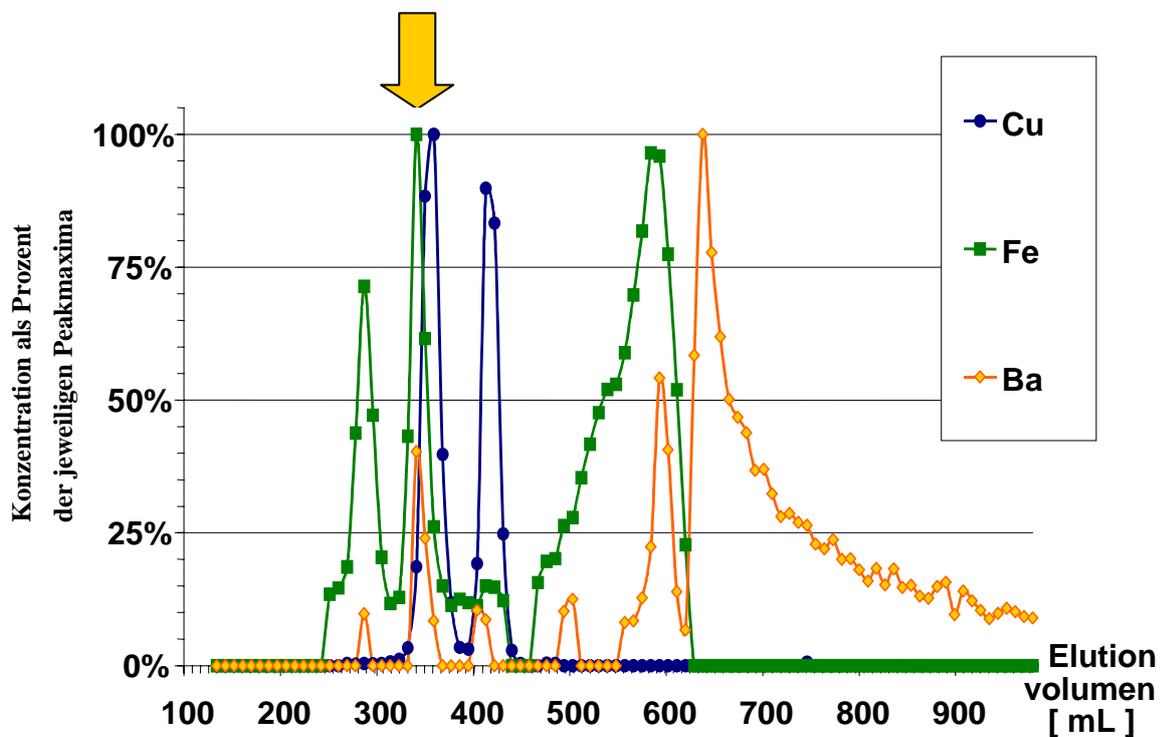


Abbildung 3-24 Elutionsverhalten von Cu, Fe und Ba bei der GPC von Arabidopsiscytosol

(Pfeil: Markierung des Peakmaximums der HM-Cd-SP)

Weitere Elemente konnten durch Quadrupol-ICP-MS nicht in relevanten Konzentrationen (großer Blindwert) in der Fraktion der HM-Cd-SP gefunden werden. Im Vergleich zu der Cd-Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/L}$ in dieser Fraktion (Abbildung 3-24) ist die Cu-Konzentration mit 2,0 $\mu\text{g/L}$ ähnlich, während die Fe-Konzentration mit 15,9 $\mu\text{g/L}$ deutlich höher ist. Der Ba-Gehalt der Fraktion der HM-Cd-SP ist nur sehr gering.

3.4.3 Behandlung der HM-Cd-SP mit Proteinase K

Proteinase K ist ein endolytisches Proteaseenzym, das Peptidbindungen an der Carboxylseite der aliphatischen, aromatischen oder hydrophoben Aminosäuren spaltet. Proteinase K wird von dem Pilz *Tritirachium album* Limber produziert und allgemein als Serinprotease klassifiziert. Eine Proteasebehandlung des Cytosols sollte die im Cytosol enthaltenen Proteine verdauen. Liegen hochmolekulare Elementproteinspezies vor, würden diese dann durch die Proteinase K gespalten. Die entsprechenden Elementpeaks würden damit bei einer Untersuchung mit der GPC entweder ganz verschwinden oder es erscheint in dem Elutionsbereich der kleineren Moleküle ein neuer Peak des Elements, der durch neu entstandene kleinere Elementbindungsformen (Element-Peptid-Komplexe) hervorgerufen wird.

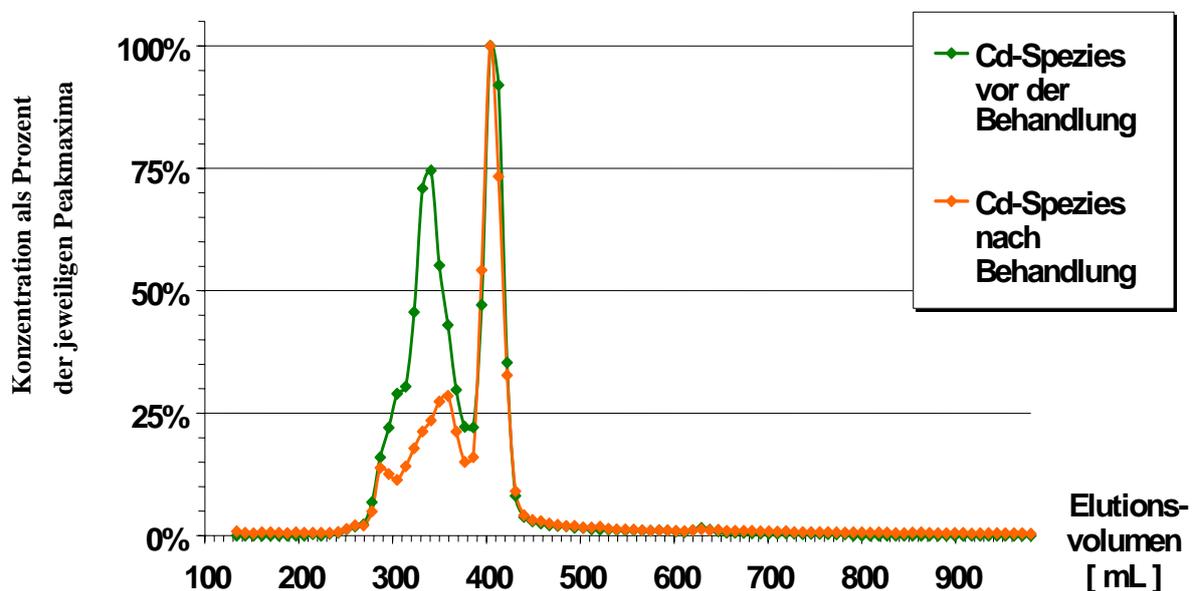


Abbildung 3-25 Vergleich der GPC-Spektren des Elements Cadmium vor und nach der Behandlung des Cytosols mit dem Enzym Proteinase K

Die Untersuchung des mit Proteinase K behandelten Arabidopsiscytosols durch GPC zeigte, dass die hochmolekulare Cd-Spezies zu einem großen Teil zerstört wurde (Abbildung 3-25). Daraus ergibt sich, dass die HM-Cd-SP ein Protein sein müssen. Das freigesetzte Cadmium aus der HM-Cd-SP wurde nicht an andere Stelle wieder gefunden. Es wurde folglich nicht durch die bei der enzymatischen Behandlung entstandenen niedermolekularen Peptide gebunden, sondern als freie Ionen durch das Gelmaterial oder die Glaswandung der GPC-Anlage adsorbiert (Adsorptionseffekt Kapitel 3.2.1).

Die Behandlung des Cytosols mit Proteinase K ergab für die drei hochmolekularen Ba-, Fe- und Cu-Spezies aus der Fraktion der HM-Cd-SP ein unterschiedliches Bild. Während die 200 kDa Kupferbindungsform keinen erkennbaren enzymatischen Abbau zeigte, wurde bei den 200 kDa Ba- und Fe-Spezies eine Veränderung beobachtet. Wie in Abbildung 3-26 zu sehen ist, verschwinden die zwei hochmolekularen Fe-Peaks nach dem Verdau durch Proteinase K (Vgl. Abbildung 3-25). Es erschien ein dritter Peak im Bereich der niedrigen Molekulargewichte.

Die Auswertung der Ba-Spezies erwies sich aufgrund der geringen Konzentration als schwierig, da der Drift der Ba-Basislinie bei beiden Versuchen nicht direkt vergleichbar war. Jedoch ließ sich der Verdauprozess der hochmolekularen Ba-Spezies (200 kDa) noch erkennen. Im Gegensatz dazu konnte man keine Aussage erhalten, um welche Verbindungsklasse es sich bei der Cu-Spezies handelt. Offensichtlich ist die 200 kDa Cu-Spezies kein Protein. Hier kommen Komplexe des Elements mit Nucleinsäuren oder Polysacchariden in Frage.

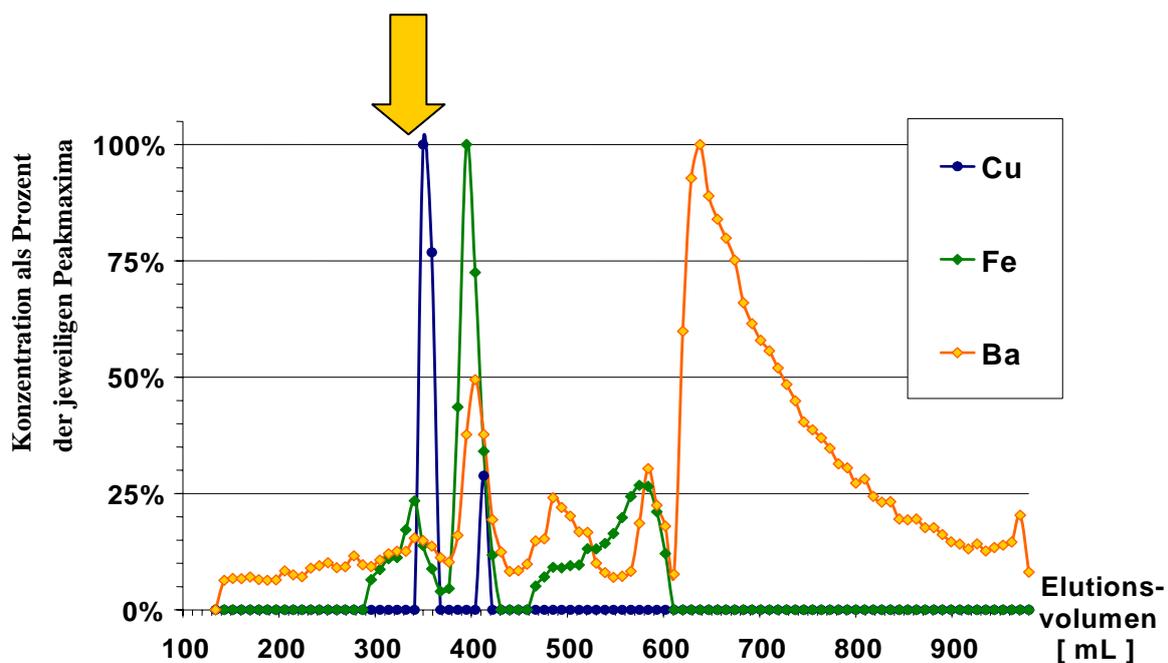


Abbildung 3-26 Elutionsverhalten von Cu, Fe und Ba bei der GPC von Arabidopsiscytosol nach Behandlung mit Proteinase K

(Pfeil : Markierung des Peakmaximums der HM-Cd-SP)

3.4.4 Anreicherung der HM-Cd-SP durch Ammoniumsulfatfällung

Zur Isolierung von Proteinen wird häufig eine Fällung durch Ammoniumsulfat eingesetzt. Diese Methode wurde bei der Isolierung der HM-Cd-SP im folgenden angewandt. Dazu wurde das Arabidopsis-cytosol mit verschiedenen Konzentrationen an Ammoniumsulfat versetzt und die gefällten Proteine abgetrennt. Die Niederschläge wurden in Puffer gelöst und einer GPC-Untersuchung unterzogen. Die Ergebnisse mit drei verschiedenen Ammoniumsulfat-Sättigungsgraden sind in Abbildung 3-27 dargestellt.

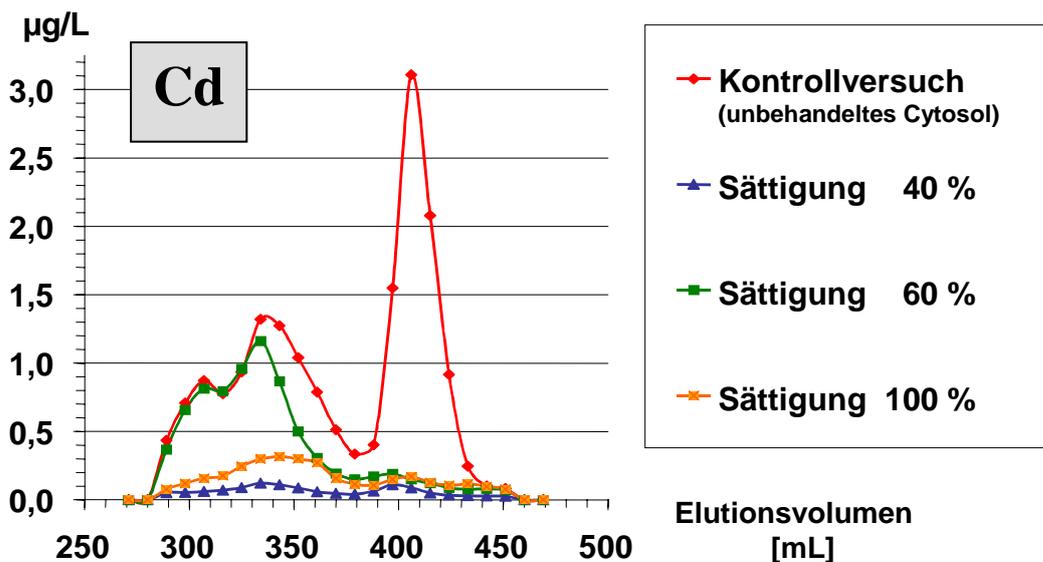


Abbildung 3-27 Elutionsverhalten der Cd-Spezies bei verschiedenen Sättigungskonzentrationen des Ammoniumsulfats.

(Die Untersuchung der Sättigungskonzentration von Ammoniumsulfat zur Fällung der hochmolekularen Cd-Spezies zeigte ein Ausbeuteoptimum bei 40-60% Sättigung)

Die mehrstufige Erhöhung der Ammoniumsulfat-Sättigungskonzentration und die anschließende GPC-Untersuchung der gefällten Proteine ergab folgende Ergebnisse:

- Die hochmolekularen Cd-Spezies blieben bei der Ammoniumsulfatfällung erhalten.
- Bei einer Fällung mit 60% Sättigungskonzentration des Ammoniumsulfats wurde eine über 80%ige Ausbeute der hochmolekularen Cd-Spezies erreicht.
- Weitere 5%-ige Abstufungen der Sättigungskonzentration hatten keine weitere effizientere Fraktionierung zur Folge (45%, 50%, 55%)

Die niedermolekularen Cd-Spezies konnten im ausgefällten Pellet nicht mehr nachgewiesen werden. Sie verblieben demnach trotz der hohen Sättigungskonzentration im Cytosol löslich.

Im weiteren Verlauf wurde das Verhalten der Ba-, Fe- und Cu-Spezies bei der sukzessiven Proteinfällung aus dem Arabidopsiszytosol durch Ammoniumsulfat ebenfalls untersucht. Die Ergebnisse für Ba zeigten, dass bei keiner der Sättigungskonzentrationen eine Fällung der Spezies zu beobachten war (s. Abbildung 3-28). Bei einer Fällung mit 40%iger Sättigung konnte die 200 kDa Cu-Spezies zum größten Teils im Pellet wieder gefunden werden. Bei Fe wurde die 200 kDa Spezies nur geringfügig bei einer Sättigungskonzentration von 60% wieder gefunden. Somit wurde insgesamt bei der angewandten optimalen Fällungskonzentration von 60% eine gute Aufreinigung der HM-Cd-SP von den drei weiteren hier diskutierten Elementspezies erzielt.

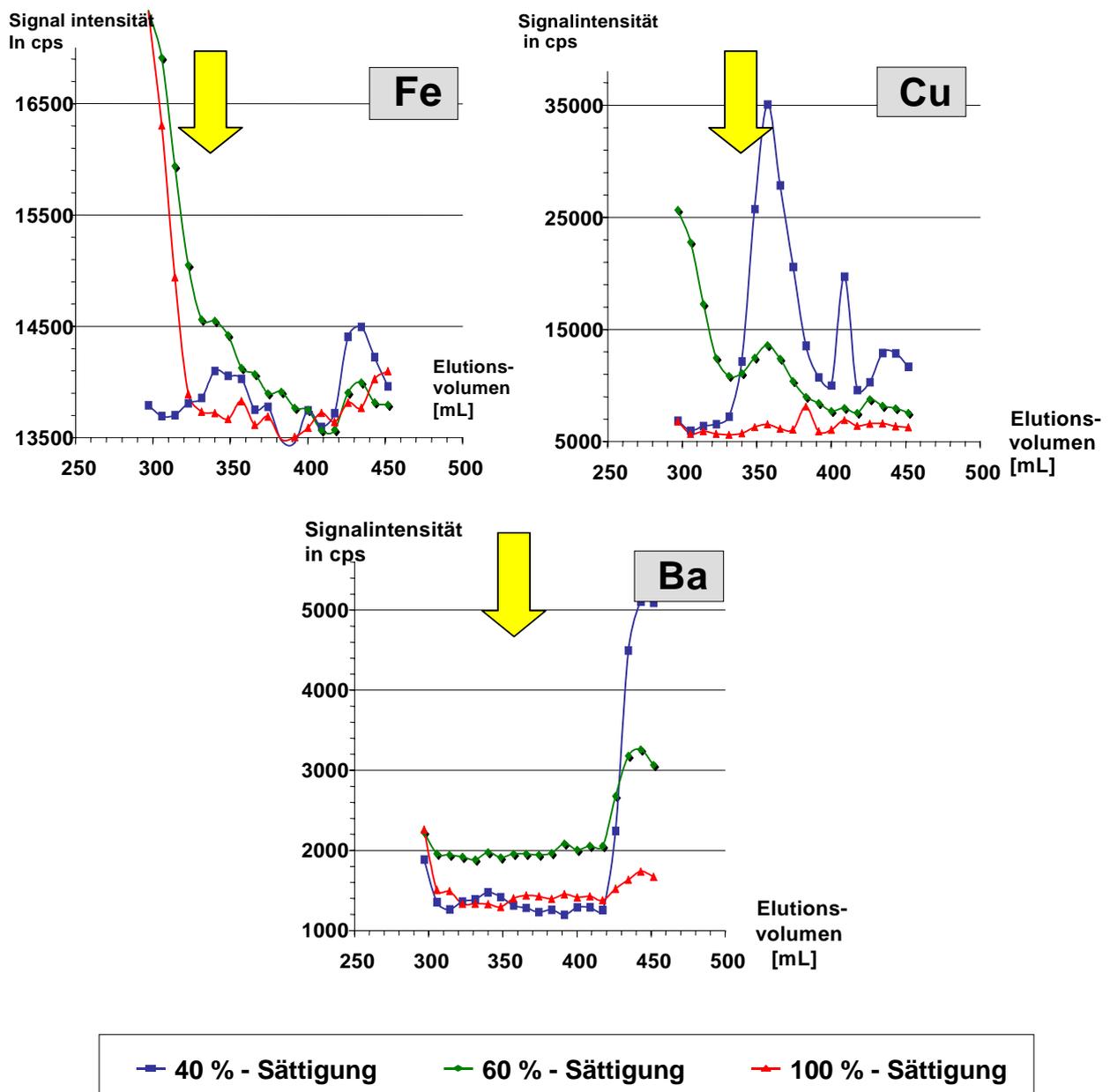


Abbildung 3-28 Qualitative Darstellung der Ba-, Fe- und Cu-Konzentrationen in den GPC-Fractionen bei der Ammoniumsulfatfraktionierung.

(Pfeil : Markierung des Peakmaximums der HM-Cd-SP)

Angesichts dieser Ergebnisse kann man zusammenfassend sagen, dass die Ammoniumsulfatfällung nicht nur eine präparative Anreicherung der Cd-Proteine lieferte, sondern auch eine effiziente Möglichkeit darstellt, um diese Spezies schon zu Beginn der Aufreinigung von vielen weiteren elementspezies abzutrennen.

3.4.5 Proteintrennung mit nativer kontinuierlicher PAGE

Die Aufreinigung der Proteine durch native kontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde im Anschluß an die GPC-Trennung durchgeführt. Als Probe wurde die GPC-Fraktion des Arabidopsiscytosols mit der höchsten Cd-Konzentration eingesetzt. Die Geschwindigkeit der Wanderung von Proteinen hängt bei der PAGE sowohl von ihrer Größe als auch von ihrer Ladung ab. Die Proteine liegen bei dieser schonenden Methode in ihrer nativen Form vor. Dadurch wird eine Abdissoziation des Cadmiums von den Proteinen verhindert.

In Abbildung 3-29 ist das Elutionsverhalten der HM-Cd-SP aus der GPC-Fraktion bei der Durchführung der PAGE dargestellt. Im PAGE-Spektrum ist deutlich ein Cd-Peak zu erkennen. Damit ist eine weitere Aufreinigung der HM-Cd-SP durch PAGE sehr gut möglich. In wieweit ein Aufreinigungseffekt der Cd-Spezies durch die Methode erbracht worden ist, wird bei der Untersuchung der Fraktion mit der 2D-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zu sehen sein. Aus dem Wanderungsverhalten der HM-Cd-SP bei der nativen kontinuierlichen PAGE wird deutlich, dass die Spezies bei pH 10 als Anion vorliegt.

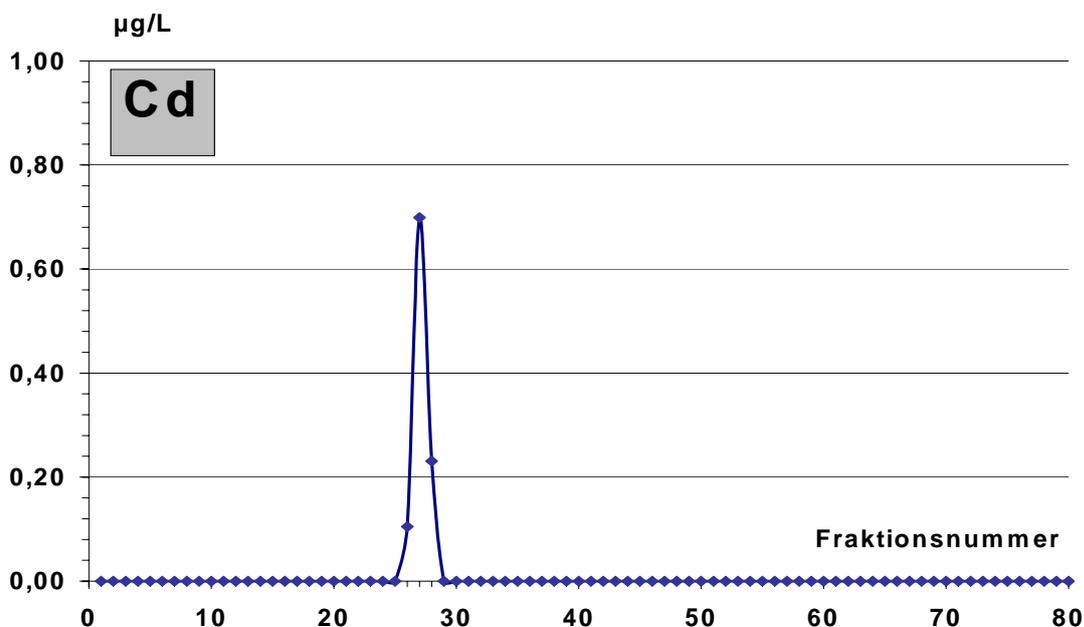


Abbildung 3-29 Cd-Konzentrationen in den PAGE-Fraktionen nach der PAGE-Trennung der GPC-Fraktion der HM-Cd-SP.

3.4.6 Proteintrennung mit zweidimensionaler Gelelektrophorese

Durch die leistungsstarke Methode der zweidimensionalen Gelelektrophorese ist es möglich, über tausend Proteine in einem Einzellauf zu trennen. Die Methode wurde zur Strukturaufklärung der HM-Cd-SP in den Fraktionen der Gelpermeationschromatographie und der nativen kontinuierlichen Elektrophorese eingesetzt. Nach Aufkonzentrierung der Fraktionen durch Ultrafiltration wurden die erhaltenen Proteine in SDS-Lösung aufgenommen und mittels einer denaturierenden SDS-Gelelektrophorese weiter aufgetrennt. Aufgrund der Notwendigkeit der massenspektrometrischen Identifizierung der isolierten Proteine muss die Coomassie-Färbung angewendet werden, die zwar als nicht nachweisstark gilt, aber eine reversible Bindung mit den Proteinen eingeht, so dass sie sich wieder herauswaschen lässt. Es wurde eine Vergleichsuntersuchung durchgeführt, um den Aufreinigungseffekt der nativen kontinuierlichen PAGE zu untersuchen (s. Abbildung 3-30).

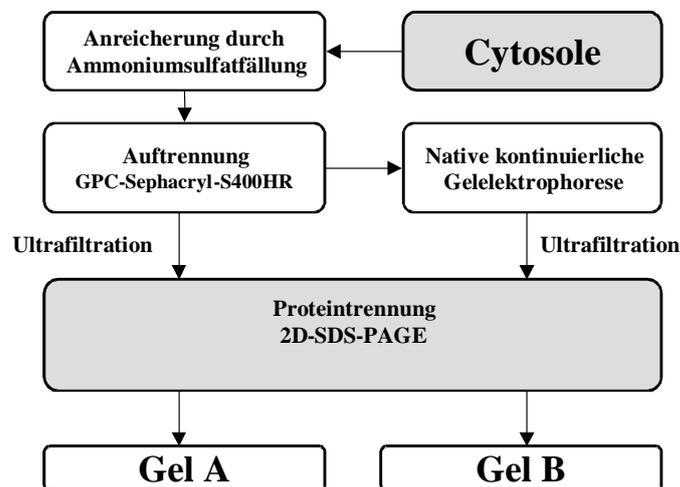
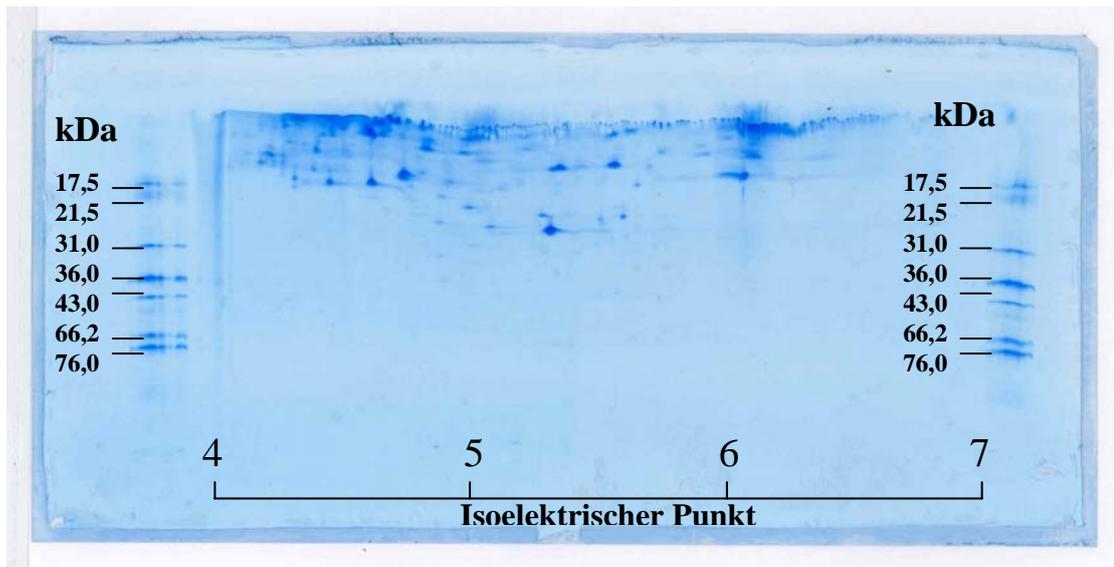


Abbildung 3-30 Untersuchung des Aufreinigungseffekts der nativen kontinuierlichen Gelelektrophorese

Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

- Die Zielproteine wurden in einem pI-Bereich zwischen 4 bis 7 größtenteils akkumuliert, so dass die Untersuchung mit einem IPG-Streifen von pI 4-7 von Vorteil ist (Abbildung 3-31).
- Die Zielproteine wurden größtenteils bei Molekulargewichten kleiner als 50 kDa gefunden (Abb.3-31). Dies schließt die Möglichkeit nicht aus, dass Proteine mit höherer Masse in geringer Menge in der Probe enthalten waren, die dann bei der Färbung nicht sichtbar gemacht werden konnten. Auf ein nichtlineares Gradientgel wurde verzichtet, da dieses im Bereich kleiner Molekulargewichte nur eine sehr enge Trennstrecke und somit schlechtere Auflösung bietet.

A.



B.

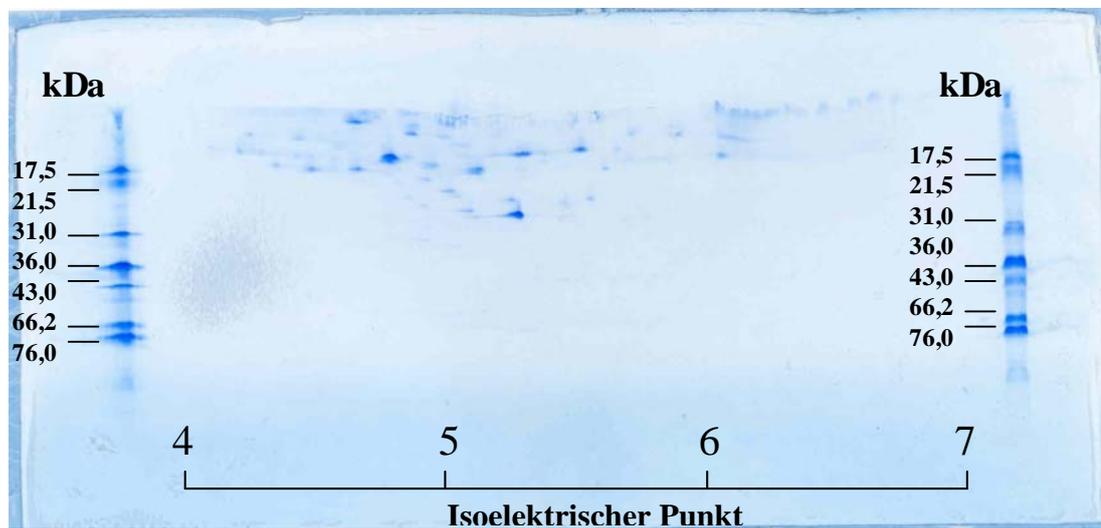


Abbildung 3-31 2D-SDS-PAGE der Cd-Proteine von Arabidopsis nach verschiedenen Aufreinigungen

A: 2D-SDS-PAGE nach Aufreinigung durch Ammoniumsulfatfällung, GPC und anschließender Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration

B: 2D-SDS-PAGE mit zusätzlicher Aufreinigung durch native kontinuierliche PAGE (s. Abb.3-32)

Die Ergebnisse der 2D-SDS-PAGE zeigen, dass die Trennung mit den standardisierten Gelen sehr gut reproduzierbar ist. Ein Ergebnisvergleich der zweidimensionalen Untersuchung ist in der Abbildung 3-31 zu sehen, wobei zwischen beiden Untersuchungen im Gel A und B gezeigt werden konnte, dass die Aufreinigung durch native kontinuierliche PAGE-Gelelektrophorese lediglich eine weitere Abtrennung im Bereich der kleinen Peptide gebracht hatte, die in der Lauffront der Wanderungslinie versammelt waren.

Im Hauptfeld des Trennbereiches können bis auf wenige schwach erkennbare Spots keine großen Unterschiede beobachtet werden. An der Intensität der gefärbten Proteinspots, die in beiden Gelen erscheinen, ist ein Konzentrationsverlust erkennbar, der durch die zusätzliche Reinigung durch die native PAGE verursacht wurde.

Ebenfalls anhand der Farbintensität waren in dem Hauptfeld des Trennbereiches (Gel B) nach drei Aufreinigungsschritten noch etwa 40 Proteinspots erkennbar. 18 Proteinspots hoben sich durch intensive Farbflecken hervor, die aus dem Gel zum Trypsinverdau herausgeschnitten wurden (Abbildung 3-32). Wichtig bei der Auswahl der zu verdauenden Proteinspots war, dass der Spot bei beiden Gelen (A und B) wiedergefunden worden war.

Trotz zahlreicher Anreicherungsversuche wurden keine Proteine gefunden, die ein Molekulargewicht von 200 kDa haben könnten. Dies bedeutet, dass es sich bei dem gesuchten hochmolekularen Cd-Protein wahrscheinlich um ein Protein-Oligomer handeln muss, dessen Subeinheiten jeweils kleinere Molekulargewichte haben. Die quartäre Struktur des Proteins wurde durch die Anwendung des Detergents SDS zerstört. Ein Teil der identifizierten Proteine sind dann die Untereinheiten des Cadmiumbindungsproteins.

3.4.7 Trypsin-Verdau und anschließende MALDI-TOF-MS Untersuchung

Zur MALDI-TOF-MS-Untersuchung wurden die 18 farbintensivsten Proteinspots aus dem entwickelten Gel herausgeschnitten und nach einer Niedrigsalz-Probenbehandlung (Schaffer, 2001) zum Trypsinverdau aufbereitet. In der Abbildung 3-32 sind die ausgesuchten Spots aus dem 2D-SDS-PAGE-Gel dargestellt.

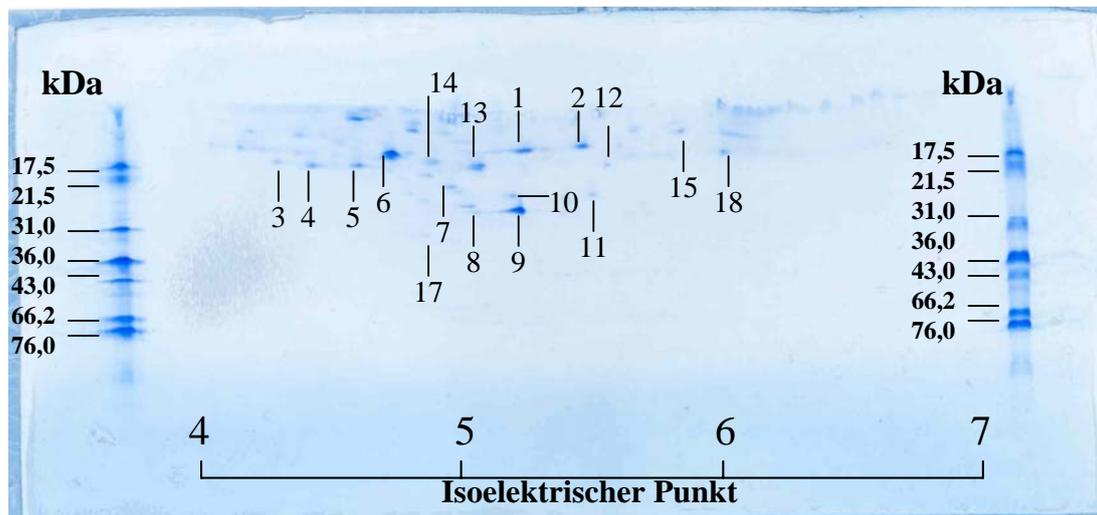


Abbildung 3-32 Die Auswahl der zum Trypsinverdau herangezogenen Proteinspots
(Vgl. Abbildung 3-31B)

Die Messung der durch Trypsinverdau entstandenen Proteinfragmente erfolgte im kalibrierten Massenbereich zwischen 900 bis 4000 Da. Die MS-Spektren sind im Anhang Kapitel 6.5.1 – 6.5.18 einzeln abgebildet und die daraus entnommenen Peptidmassen sind in Tabelle 6-5, Kapitel 6.5 im Anhang aufgelistet. Mit den erhaltenen Peptidmassen wurde eine on-line-Datenbankanalyse mittels Abfrage-Algorithmus der Rockefeller-Universität (ProFound) und der UCSF (MS-Fit) durchgeführt, wobei die Suche auf der NCBI-Proteindatenbank basierte.

Einige Proteinspots konnten eindeutig identifiziert werden, für andere wiederum wurden von den Suchprogrammen mehrere mögliche Proteinkandidaten vorgeschlagen, die wegen der unsicheren Ergebnislage hier nicht aufgeführt sind. In Tabelle 3-7 sind die Ergebnisse aufgelistet, bei denen die vorgeschlagene Zuordnung der Proteine in den beiden Suchprogrammen eine gute Trefferquote hatte (12 Spots).

Tabelle 3-7 Ergebnisse von 12 untersuchten Proteinspots nach der on-line-Datenbankanalyse der Peptidmassen aus den MALDI-TOF-MS-Messungen

Spot-Nr.	Ident. (%)	Pept. Mat.	MW (kDa)	Cov. (%)	Accession	Proteininformation
Ribulose-1,5-biphosphat-carboxylase/oxygenase (RuBisCo)						
1	100	7(43) ^a	20,3	50,0	68060 (PF) 15240901 (Msfit)	RuBisCo small subunit 3b precursor
5	100	7(18) ^a	52,9	15,0	7525041	RuBisCo large chain
6	55	5(21) ^a	52,9	12,0	7525041	RuBisCo large chain
8	73	4(23) ^b	48,02	16,0	1944432 (PF) 7525041 (Msfit)	RuBisCo large chain
9	98	5(35) ^a	48,02	19,0	1944432 (PF)	RuBisCo large chain
13	90	5(26)	53,45	12,0	7525041	RuBisCo large chain
14	56	7(38) ^a	20,3	40,0	15240901	RuBisCo small subunit 3b precursor
LRR (Leucin-Rich-Repeat) Protein						
12	83	5(21) ^a	203,4	5,0	15217891	LRR-Protein
F1O19.10						
2	100	8(50) ^a	14,9	50,0	13926229	F1O19.10 unbekannte Funktion
AtATM-Protein						
17	75	13(27) ^a	439,7	6,0	7960715	AtATM-Protein
18	87	12(26) ^a	439,7	6,0	7960715	AtATM-Protein
Unbekanntes Protein						
11	94	7(36)	84,1	12,0	14475940	Unbekannte Funktion/Homolog

PF=ProFound; Pept.Mat.=Anzahl der übereinstimmenden Fragmente in möglichen Gesamtfragmenten; Ident.= Wahrscheinlichkeit der Zuordnung (ProFound); Accession=Protein-Kennnummer in dem NCBI-Datenbankeintrag, Cov = % Übereinstimmung, Stand Datenbank : 01.Dezember 2003

Für die restlichen sechs Spots konnte keine eindeutige Identifizierung der Proteine festgestellt werden. Ihr Datenbankabgleich lieferte nur unzufriedenstellende Ergebnisse (MS-Fit Score <1000; PF<50%), wobei die vorgeschlagenen Kandidaten die minimale Anzahl an Peptidübereinstimmung (>=4) nicht erreicht hatten und einen Massenfehler größer als 50ppm aufwiesen. Sie wurden deshalb nicht in die Tabelle 3-7 aufgenommen.

3.4.8 Diskussion

Die Wirkung von Cadmium auf höhere Pflanzen wurde bereits unter vielen Aspekten untersucht (Sanita di Toppi, 1999). Verschiedene schädliche Wirkungen sind inzwischen bis hin zu den Prozessen auf molekularer Ebene bekannt (Pavlikova, 2002). Dabei wurden unterschiedliche Pflanzen zur Untersuchung herangezogen (Mais: Drazkiewicz, 2003; Raps: Carrier, 2003; Möhren, Sanita di Toppi, 1999; Weizen: Nigam, 2000; Tabak: Vögelilange & Wagner, 1990; Arabidopsis halleri und Thlaspi caerulescens in der Phytoremediation: Lombi, 2000, Küpper, 2000; Krämer, 2000). Strasdeit et al. sprach sogar von einem spezifischen Cadmiumprotein in *Thalassiosira weissflogii*, einer Kieselalge, die bei Zinkmangel eine Cadmium-Carbonanhydrase (Cd-CA) synthetisieren kann (Strasdeit, 2001). Die bekanntesten und bestuntersuchten Cd-Bindungsformen sind jedoch die niedermolekularen Phytochelatine und Metallothioneine (Zenk, 1996; Nordberg 1998, Schmöger, 2000; Cobbett & Goldsbrough, 2002). Nur sehr wenig ist über hochmolekulare Cd-Bindungsformen bekannt. Hinweise auf ihr Vorliegen wurden jedoch bereits im letzten Jahrzehnt publiziert (Kemenji, 1992; Ji, 1997; Günther; 2000).

Wie der Tabelle 3-7 zu entnehmen ist, wurden unter den zwölf identifizierten Proteinen sieben Fragmente bzw. Proteine aus den Untereinheiten des Rubisco-Proteins gefunden. Im Weiteren wurden zwei Proteinfragmente des AtATM-Proteins, ein Proteinfragment aus der LRR-Proteinfamilie (Leucin-Rich-Repeat-Protein), ein Protein namens F1O19.10 und ein Proteinfragment mit unbekannter Funktion identifiziert.

Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/oxygenase (Rubisco)

Rubisco ist ein wichtiges Photosyntheseenzym der Chloroplasten, das auf der Oberfläche der Stromaseite der Thylakoidmembranen lokalisiert ist. Seine Funktion besteht darin, die Fixierung von CO₂ aus der Atmosphäre durch Kondensation mit Ribulose-1,5-bisphosphat zu einer intermediären C₆-Verbindung zu katalysieren. Es besteht aus acht großen L-Untereinheiten (LSU, je nach Spezies 51 - 58 kDa) und acht kleinen S-Untereinheiten (SSU, 12 - 18 kDa). Das Enzym kommt in den Chloroplasten sehr reichlich vor und macht etwa 16 % ihres Gesamtproteins aus. Wahrscheinlich ist Rubisco sogar das häufigste Protein, sicher aber das häufigste Enzym in der Biosphäre. Diese großen Mengen sind notwendig, weil Rubisco nur sehr langsam arbeitet (Stryer 1995).

Die Bedingungen während der unterschiedlichen Aufreinigungen wurden so optimiert, dass bei der Ammoniumsulfatfällung, der Fraktionierung durch die GPC und bei der nativen kontinuierlichen PAGE die isolierten Fraktionen stets die höchste Cd-Konzentration hatten. Trotz dieser mehreren Aufreinigungsschritte hatte Rubisco immer noch die intensivste Färbung in der Gelelektrophorese gezeigt.

Rubisco war also in den Fraktionen mit hohen Cd-Konzentrationen am Ende jedes Aufreinigungsschrittes immer zu finden. Daraus lässt sich schließen, dass einerseits eine Bindung zwischen den Cd-Ionen und dem Rubisco-Protein besteht, die möglicherweise die mehrstufigen Aufreinigungsschritte überstehen konnte. Andererseits ist auch eine Verschleppung des in hohen Konzentrationen in Pflanzen vorkommenden Proteins während der Aufreinigungsprozedur möglich.

AtATM-Protein

Im Gegensatz zu Hefen oder Säugetieren ist über Signalrespons aufgrund von DNA-Schädigung in Pflanzen wenig bekannt. Die ATM-Proteine (Ataxia-telangiectasia mutated proteins) sind Proteinkinasen, deren Aktivität durch DNA-Schädigung induziert werden, zum Beispiel bei einem Bruch in einem DNA-Doppelstrang. Sie spielen eine zentrale Rolle als Responsfaktoren bei stress induzierten DNA-Schäden (Garcia, 2003; Eckardt, 2003). Das AtATM-Protein ist das ATM-Protein in *Arabidopsis thaliana*. Über Schädigungsmechanismen der DNA durch ein Überangebot von Cadmium in Zellen, bzw. über eine direkte Wechselwirkung der ATM-Proteine mit dem Cadmium ist bis heute sehr wenig bekannt (Shah & Dubey, 1995; Pavlikova, 2002).

LRR (Leucin-Rich-Repeat-Protein)

Unter den identifizierten Proteinen liegt das Molekulargewicht des LRR-Proteins (203 kDa) am nächsten an dem ermittelten Molekulargewicht der HM-Cd-SP (200 kDa) aus der Gelpermeationschromatographie. Ein Protein mit diesem Molekulargewicht konnte auf dem 2D-SDS-Gel nicht direkt entdeckt werden. Jedoch wurde in Spot 12 ein Fragment des LRR-Proteins detektiert. Da die Untersuchung nur auf 18 Spots beschränkt war, und nicht an allen sichtbaren Proteinspots durchgeführt wurde, ist ein weiteres Vorliegen von Fragmenten des LRR-Proteins nicht auszuschließen. Aus den hier erhaltenen Ergebnissen und aus dem ermittelten Molekulargewicht der HM-Cd-SP ist mit großer Wahrscheinlichkeit das LRR-Protein das gesuchte hochmolekulare Cadmiumbindungsprotein.

In der LRR-Proteinfamilie bilden die Leucinreißverschlußproteine (Leucinzipper) die Hauptgruppe. Die Leucinreißverschlußproteine gehören zu der wichtigsten Gruppe von Regulatoren der Transkription bei Eukaryonten. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass in einer Region von ca. 35 Resten etwa jede siebte Position durch ein Leucin eingenommen wird. Die Beteiligung vieler Leucinzipper wurde in biochemischen Reaktionen häufig mit den Abwehrmechanismen gegen einen Cadmium- bzw. Oxidationsstress (H_2O_2 /Superoxide) des Organismus in Verbindung gebracht - insbesondere bei der Synthese des Glutathions, das ein wesentlicher Grundbaustein der Phytochelatine ist (Drazkiewicz, 2003; Dormer, 2000)..

In Abbildung 3-33 ist die Sequenz des LRR-Proteins, das wahrscheinlich die HM-Cd-SP darstellt, aufgeführt. Es besteht insgesamt aus 1784 Aminosäuren. Interessant ist hierbei, dass Cystein lediglich 29 Mal zu finden ist und damit die HM-Cd-SP ein Cystein-armes Protein ist. Bei sehr bekannten Metallbindungsproteinen bzw. -peptiden wie Metallothioneinen und Phytochelatinen spielt Cystein eine zentrale Rolle bei der Bindung der Metallionen über die SH-Gruppe. Die Aminosäuren mit Carboxylgruppen in der Seitenkette kommen hingegen mit der Anzahl 100 (Asparaginsäure) und mit der Anzahl 84 (Glutaminsäure) sehr viel häufiger vor. Deshalb ist eine Beteiligung der negativ geladenen Carboxylgruppen bei der Bindung des Cadmiums sehr wahrscheinlich.

1 mliftipqff faawvmvsl qmqgyiscie kerkgllelk ayvnkeysyd wsndtksdcc
 61 rwervecdrtr sgrvigfln qtfsdpilin lslfhpfeel rtlnlydfgc tgwfddihgy
 121 kslgklkkle ildmgnnevn nsvlpflnaa sslrtlilhg nnmegtfpmk elkdslnlel
 181 ldlsgnllng pvpglavlhk lhaldlsdnt fsgslgregl cqlknlqeld lsqneftgpf
 241 pqcfssltql qvldmssnqf ngtlpsvisn ldsleylsls dnkfeffsf dlianlsklk
 301 vflksskssl lhieseisq lkfrlsvidl kycnleavps flqqqkdlrl inlsnnkltg
 361 ipswfleny pklrvllwn nsftihlpr llvhslhvld lsvnkfdewl pnnighvlpn
 421 ishlslsng fqgnlpssfs emkkiffldl shnnlsgslp kkfcigcssl silklsynrf
 481 sgkifppmk lesrlviad nnqfteitdv lihskglvfl elsnnslqgv ipswfggyf
 541 lylsvsdnll ngtipstlfn vsqlldlr nkfsgnlpsh fsfrhmgly lhdnefsgpv
 601 pstllenvml ldlnnklsq tiprfvsny flylllrgna ltghiptslc elksirvldl
 661 annrlngsip pclnnvsfgr sldyeidpdf gssygmvrqd qeletesysrs lvplefeld
 721 ysgyldftve faskrydsy mgesfkfmg ldfssnelig eiprelgdfq riralnshn
 781 slsglvpesf snltdiesid lsfvnlhgpi phdltkldyi vvfsvsynnl sglipsqgkf
 841 lslvtnyig nplfegttn kscddntsgf keidshsgdd etaidmetfy wslfatyafv
 901 mvmdlmvlm mimmmvssld ahghiscies erkgllleka ylniseypyw wpndtnnsdc
 961 ckwervkcdl tsgrysfer lknleildis engvntvlp fintasslkt lihgnnmeg
 1021 tfpmkelinl rnlleldsk nqfvqvpdl anfhnlqgld msdnkfsnsgn kglcqlknrl
 1081 eldlsqnkft gqfpqcdsl tqlqvldiss nnfngtvppl irnldsveyl alsdnefkf
 1141 fslelianls klkvklssr snllrklks slqpkfqlsv ielqnenlen vpsfiqhkd
 1201 lhvinlsnnk ltgvfpywl ekypnlrvll lqnnsltmle lprllnhtlq ildlsannfd
 1261 qrlpenigkv lpinrhlns nngfqwilps sfgemkdikf ldshnnfsg slpmkfligc
 1321 sslhtlksy nkffgqifpk qtnfgslvvl iannnlftgi adglrnvqsl gvldlsnnyl
 1381 qgvipswfgg fffaylflsn nll egtlpst lfskptfkil dlsgnkfsgn lpshtgmdm
 1441 sllylndnef sgtpstlik dvlvdlrnn klsgtipfv knefilslll rgntltghip
 1501 tdlcglrsir ildlannrlk gsiptclnnv sfgrrlneyv ngdklpfein ddeefavysr
 1561 llvprqysp dytgvlmfv efaskryds ytqesfnmf gdlssnls gdipkelgdl
 1621 qriralnsh nslsglipqs fsnltdiesi dlsfnllrgp ipqdlskldy mvfvsvsynn
 1681 lsgsipshgk fstldetnfi gnllcgsai nrsdddntt eflsddqsg deetidmei
 1741 fywslaatyg vtwtivfl cfdspwrrvw fhfvdafisl fkcw

Abkürzungen:

A: Alanin	C: Cystein	H: Histidin	F: Phenylalanin
R: Arginin	Q: Glutamin	I : Isoleucin	P: Prolin
N: Asparagin	E: Glutaminsäure	L: Leucin	S: Serin
D: Asparaginsäure	V: Valin	K: Lysin	T: Threonin
Y: Tyrosin	G: Glycin	M: Methionin	W: Tryptophan

Abbildung 3-33 Aminosäuresequenz der postulierten hochmolekularen Cd-Spezies

(Cysteine rot markiert, Asparaginsäure und Glutaminsäure blau markiert)

4 ZUSAMMENFASSUNG

Das Resorptionsverhalten von Elementen im menschlichen Organismus wird entscheidend durch deren Bindungsformen beeinflusst. Außerdem existieren bei der Aufnahme aus der Nahrung zahlreiche Wechselwirkungen zwischen den Elementen. Zur ernährungsphysiologischen und toxikologischen Bewertung von Elementgehalten in Lebensmitteln ist deshalb eine Multielement-Speziation äußerst wichtig. Nur aufgrund dieser differenzierten Sichtweise sind Angaben über Bedarf, Grenzwerte und über das Verhalten von Elementen sinnvoll.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Bindungsverhalten von 42 Elementen in neun verschiedenen, handelsüblichen pflanzlichen Lebensmitteln (Paprika, Kohlrabi, Gurken, Möhren, Tomaten, Eissalat, Endiviensalat, Kopfsalat und Feldsalat) und einem Phytomodellsystem (*Arabidopsis thaliana*) untersucht. Dazu wurden die Pflanzen einem Zellaufschluss durch Ultra-Turrax-Behandlung in Puffer unterzogen und die entstandenen Homogenate zentrifugiert. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der Elemente im Überstand (Cytosol) und im Pellet durch ICP-MS nach Säureaufschluß bestimmt. Bei 15 Elementen (Li, B, Rb, Mg, Ca, Ba, Sr, Fe, Mn, Co, Cu, Ni, Zn, Cd, Mo) konnten die Verteilungen zwischen Cytosol und Pellet bei allen Pflanzenproben sicher quantifiziert werden. Cytosolanteile von über 50% wurden bei Li, Rb, Zn, Mg und Cu gefunden. Die Cytosolanteile von B, Cd, Ca, Mn, Co und Mo lagen bei über 35% und bei Fe, Ni, Ba und Sr wurden zwischen 25%-35% erreicht. Die Quantifizierung von Be, Y, U und der Lanthanoide war in den einzelnen Zellfraktionen nicht zufriedenstellend möglich. Trotzdem konnten auch hier erste halbquantitative Abschätzungen vorgenommen werden.

Die erhaltenen Cytosole der einzelnen pflanzlichen Lebensmittel wurden anschließend durch Gelpermeationschromatographie (Trennbereich 20 – 8000 kDa) weiter aufgetrennt. In den einzelnen Fraktionen wurden dann die Elementgehalte durch ICP-MS direkt und ohne Aufschluss bestimmt (GPC-ICP-MS-off-line-Kopplung). Dazu wurden alle Systemparameter so optimiert, dass möglichst viele Elemente simultan untersucht werden konnten. Hierbei stellte insbesondere die Lösung der verschiedenen Interferenzprobleme eine große Herausforderung dar.

Bei der Anwendung der off-line-Kopplung von GPC und ICP-MS konnten alle 15 oben genannten Elemente in den erhaltenen GPC-Fraktionen bei allen 10 Pflanzen quantitativ detektiert werden. Das Elutionsverhalten von Li, Rb und Mg war bei nahezu allen untersuchten Cytosolen identisch. Die Elemente eluierten im stark niedermolekularen Bereich und liegen wahrscheinlich als freie Ionen vor. Die Elemente Co, Ni und Zn fanden sich

ebenfalls als ein identischer Einzelpeak bei allen Pflanzencytosolen wieder. Jedoch war hier ihr Elutionsbereich nach höherem Molekulargewicht verschoben.

Kupfer eluierte bei allen untersuchten Pflanzencytosolen als stark ausgeprägter Doppelpack mit geschätzten Molekulargewichten von 40 kDa und 140 kDa. Interessant war hierbei, dass in dem 140 kDa Bereich kaum andere Elemente detektiert wurden. Bei Bor wurden ebenfalls häufig 2 Elutionsbereiche beobachtet, die außerhalb des Kalibrierbereiches der GPC lagen und damit eine Molmasse von kleiner als 20 kDa hatten. Bei vielen Pflanzen wurden mindestens 3 verschiedene Fe-Spezies gefunden, die meistens größer als 100 kDa waren. Cadmium eluierte bei den meisten Pflanzen zum größten Teil als hochmolekulare Spezies mit einem Molekulargewicht von ca. 200 kDa. Bei Elementen aus der Gruppe der Erdalkalimetalle konnten sehr späte Elutionen beobachtet werden, die zum Teil insbesondere bei Ca sehr heterogen erschienen. Mo und Mn eluieren ebenfalls in einem sehr niedermolekularen Bereich. Nur vereinzelt konnten hochmolekulare Spezies dieser beiden Elemente detektiert werden. Die Elemente Ba und Sr zeigten dagegen eine starke Präsenz im hochmolekularen Bereich (>200 kDa).

Neben den 15 oben genannten Elementen konnten in den erhaltenen GPC-Fractionen bei verschiedenen untersuchten Pflanzen weitere Elemente semi-quantitativ bestimmt werden. Im Molekulargewichtsbereich von ca. 40 kDa eluierte ein großer Anteil der Elemente Pb, Ga, Sn, Sb, Rh und Y. Weiterhin konnten mehrere Al-Spezies auch im extrem hochmolekularen Bereich bei einer Pflanze nachgewiesen werden (>8000 kDa). Desweiteren zeigte Tl neben einer 40 kDa Spezies eine auffällige Elution in einem sehr niedermolekularen Bereich bei nahezu allen Pflanzen. In *Arabidopsis thaliana* konnten auch zusätzlich Spezies von Yb, Er, Lu, Tm, Ho und Dy mit exakt gleichem Elutionsverhalten im 40 kDa Bereich detektiert werden.

Interessant war in diesem Zusammenhang, dass in *Arabidopsis thaliana* viele Elemente bei der GPC das gleiche Elutionsverhalten zeigten wie bei den pflanzlichen Lebensmitteln. Diese Pflanze kann somit vielfach als Modellsystem für die Element-Speziation in pflanzlichen Lebensmitteln dienen. Das Genom von *Arabidopsis thaliana* ist seit längerer Zeit bekannt und damit ist auch eine Identifizierung von möglicherweise vorliegenden Element-Proteinspezies mittels Methoden der modernen Proteomics sehr gut möglich.

Dies sollte am Beispiel der hochmolekularen 200 kDa Cd-Spezies (HM-Cd-SP) durchgeführt werden. Die HM-Cd-SP wurde in vielen hier untersuchten Cytosolen gefunden und stellt eine wichtige Cadmiumbindungsform dar. Durch eine enzymatische Untersuchung mittels Proteinase K wurde nachgewiesen, dass es sich bei der HM-Cd-SP um ein Protein handeln muss.

Die HM-Cd-SP von *Arabidopsis thaliana* wurde durch Ammoniumsulfatfällung, GPC und native kontinuierliche PAGE aufgereinigt. Das erhaltene Präparat wurde durch 2D-SDS-PAGE aufgetrennt, wobei nach Coomassie-Färbung ca. 40 Proteinspots visuell erkennbar waren, die im Massenbereich < 50 kDa und im pI-Bereich von 4-7 gefunden wurden. Die 18 intensivsten Proteinspots wurden herausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und die Massen der erhaltenen Peptide mittels MALDI-TOF-MS bestimmt. Die erhaltenen Informationen wurden einer ProFound- und MS-Fit-Datenbankanalyse unterzogen.

Von den untersuchten 18 Proteinspots konnten mindestens zwölf Proteinfragmente identifiziert werden. Sieben Fragmente aus den Untereinheiten des Rubisco-Proteins (480 kDa), zwei Fragmente des AtATM-Proteins (440 kDa), ein Fragment des LRR-Proteins (203 kDa), das F1O19.10-Protein (50 kDa) und ein Protein mit unbekannter Funktion (12 kDa). Aus den hier erhaltenen Ergebnissen und aus dem ermittelten Molekulargewicht der HM-Cd-SP von 200 kDa ist mit großer Wahrscheinlichkeit das LRR-Protein das gesuchte hochmolekulare Cadmiumbindungsprotein.

5 LITERATURVERZEICHNIS

Barnes RM (1998), Capillary electrophoresis and inductively coupled plasma spectrometry: Status report, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 361: 246-251

Bayon MM, Cabezuelo ABS, Gonzalez EB, Alonso JIG, Sanz-Medel A (1999), Capabilities of fast protein liquid chromatography coupled to a double focusing inductively coupled plasma mass spectrometer for trace metal speciation in human serum, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14: 947-951

Bertini I, Luchinat C, Provenzani A, Rosato A, Vasos PR (2002), Browsing gene banks for Fe2S2 ferredoxins and structural modeling of 88 plant-type sequences: An analysis of fold and function, *Proteins-Structure Function and Genetics* 46: 110-127

Bertini I, Rosato A (2003), Bioinorganic chemistry in the postgenomic era, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 3601-3604

Caroli S (1995), Element Speciation-Challenges and Prospects, *Microchemical Journal* 51: 64-72

Carrier P, Baryl A, Havaux M (2003), Cadmium distribution and microlocalization in oilseed rape (*Brassica napus*) after long-term growth on cadmium-contaminated soil, *Planta* 216: 939-950

Castagnetto JM, Hennessy SW, Roberts VA, Getzoff ED, Tainer JA, Pique ME (2002), MDB: The metalloprotein database and browser at the scripps research institute, *Nucleic Acids Research* 30: 379-382

Clemens S, Palmgren MG, Kramer U (2002), A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation, *Trends in Plant Science* 7: 309-315

Cobbett C, Goldsbrough P (2002), Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis, *Annual Review of Plant Biology* 53: 159-182

Crews HM, Dean JR, Ebdon L, Massey RC (1989), Application of High-Performance Liquid Chromatography Inductively Coupled Plasma Mass-Spectrometry to the Investigation of Cadmium Speciation in Pig-Kidney Following Cooking and In vitro Gastrointestinal Digestion, *Analyst* 114: 895-899

Das AK, Chakraborty R, Cervera ML, delaGuardia M (1996), Metal speciation in biological fluids - A review, *Mikrochimica Acta* 122: 209-246

- Degtyarenko K (2000), Bioinorganic motifs: Towards functional classifications of metalloproteins, *Bioinformatics* 851-864
- Di Toppi LS, Gabbrielli R (1999), Response to cadmium in higher plants, *Environmental and Experimental Botany* 41: 105-130
- Di Toppi LS, Lambardi M, Pecchioni N, Pazzagli L, Durante M, Gabbrielli R (1999), Effects of cadmium stress on hairy roots of *Daucus carota*, *Journal of Plant Physiology* 154: 385-391
- Diazgarcia ME, Alavamoreno F, Sanzmedel A (1994), Potassium-Selective Optrode Based on An Immobilized Fluorogenic Crown-Ether, *Mikrochimica Acta* 113: 211-222
- Dormer UH, Westwater J, McLaren NF, Kent NA, Mellor J, Jamieson DJ (2000), Cadmium-inducible expression of the yeast GSH1 gene requires a functional sulfur-amino acid regulatory network, *Journal of Biological Chemistry* 275: 32611-32616
- Drazkiewicz M, Tukendorf A, Baszynski T (2003), Age-dependent response of maize leaf segments to cadmium treatment: Effect on chlorophyll fluorescence and phytochelatin accumulation, *Journal of Plant Physiology* 160: 247-254
- Drazkiewicz M, Skorzynska-Polit E, Wojcik M, Krupa Z (2003), Does GSH modify cadmium effect on enzymes of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis thaliana*?, *Free Radical Research* 37: 36
- Eckardt NA (2003), ATM to the rescue: Repairing DNA damage, *Plant Cell* 15: 1-3
- Evans GW, Johnson JE, Brushmiller JG, Ames RW (1979), Detection of Labile Zinc-Binding Ligands in Biological-Fluids by Modified Gel-Filtration Chromatography, *Analytical Chemistry* 51: 839-843
- Ferrarello CN, de la Campa MDF, Muniz CS, Sanz-Medel A (2000), Metal distribution patterns in the mussel *Mytilus edulis* cytosols using size-exclusion chromatography and double focusing ICP-MS detection, *Analyst* 125: 2223-2229
- Fingerova H, Koplík R (1999), Study of minerals and trace element species in soybean flour, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 363: 545-549
- Foley RC, Liang ZM, Singh KB (1997), Analysis of type 1 metallothionein cDNAs in *Vicia faba*, *Plant Molecular Biology* 33:583-591
- Frisk P, Yaqob A, Lindh U (2002), Indications of selenium protection against cadmium toxicity in cultured K-562 cells, *Science of the Total Environment* 296: 189-197

- Garcia V, Bruchet H, Comesca D, Granier F, Bouchez D, Tissier A (2003), AtATM is essential for meiosis and the somatic response to DNA damage in plants, *Plant Cell* 15: 119-132
- Gardiner PE, Ottaway JM, Fell GS, Burns RR (1981), The Application of Gel-Filtration and Electrothermal Atomic-Absorption Spectrometry to the Speciation of Protein-Bound Zinc and Copper in Human-Blood Serum, *Analytica Chimica Acta* 124: 281-294
- Görg A (2001), *2D-SDS-Elektrophorese, Manuskript zum Elektrophorese-Kurs*, München,
- Grill E (1989) Phytochelatin in plants. In DH Hamer, DR Winge, eds, Metal ion homeostasis: molecular biology and biochemistry. Alan R. Liss, New York, pp 283-300.
- Günther K, Waldner H (1992), Speciation of Zinc and Cadmium in Ordinary Vegetable Foodstuffs, *Analytica Chimica Acta* 259: 165-173
- Günther K. (1995), Beiträge zur Multielement-Speziation in pflanzlichen Lebensmitteln: Studien zur Bindungsform zahlreicher Elemente unter Berücksichtigung von Zink und Cadmium, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Habilitationsarbeit, Berichte des Forschungszentrums Jülich 3358
- Günther K, Ji G, Kastenholz B (2000), Characterization of high molecular weight cadmium species in contaminated vegetable food, *Fresenius J Anal Chem* 368: 281-287
- Ha SB, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett C (1999), Phytochelatin synthase genes from arabidopsis and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Plant Cell* 11: 1153-1163
- Hill SJ, Bloxham MJ, Worsfold PJ (1993), Chromatography Coupled with Inductively-Coupled Plasma-Atomic Emission-Spectrometry and Inductively-Coupled Plasma-Mass Spectrometry - A Review, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 8: 499-515
- Jakubowski N, Thomas C, Klueppel D, Stuewer D (1998), Speciation of metals in biomolecules by use of inductively coupled plasma mass spectrometry with low and high mass resolution, *Analusis* 26: M37-M43
- Ji G (1997), Charakterisierung HM-Cd-spezies in kontaminierten pflanzlichen Lebensmitteln, Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Johnson PE, Evans GW (1980), Binding of Zinc and Copper to Some Gel-Filtration Media, *Journal of Chromatography* 188: 405-407

Kawashima I, Kennedy TD, Chino M, Lane BG (1992), Wheat Ec metallothionein genes: like mammalian Zn₂C metallothionein genes, wheat Zn₂C metallothionein genes are conspicuously expressed during embryogenesis. *Eur. J. Biochem.* 209:971–76

Kemenji D (1992), Beiträge zur Charakterisierung von hochmolekularen Cadmiumbindungsformen in pflanzlichen Lebensmitteln, Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Kiefer F (1991), Metals as essential trace elements for plants, animals and humans, In: Metals and their compounds in the Environment, Merian, E., ed., VCH, Weinheim, Germany, p 481-489

Klueppel D, Jakubowski N, Messerschmidt J, Stuewer D, Klockow D (1998), Speciation of platinum metabolites in plants by size-exclusion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13: 255-262

Koplik R, Borkova M, Mestek O, Kominkova J, Suchanek M (2002), Application of size-exclusion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry for fractionation of element species in seeds of legumes, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 775: 179-187

Koplik R, Pavelkova H, Cincibuchova J, Mestek O, Kvasnicka F, Suchanek M (2002), Fractionation of phosphorus and trace elements species in soybean flour and common white bean seeds by size exclusion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 770: 261-273

Krachler M (1997), ICP-MS for the simultaneous determination of trace elements in biological samples, Dissertation, Karl-Franzens Universität Graz

Krämer U (2000), Cadmium for all meals - plants with unusual appetite, Commentary, *New Phytologist* 1-5

Küpper H, Lombi E, Zhao FJ, McGrath SP (2002), Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*, *Planta* 75-84

LaFuente JMG, Marchante-Gayon JM, Sanchez MLF, Sanz-Medel A (1999), Urinary selenium speciation by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry: advantages of detection with a double-focusing mass analyser with a hydride generation interface, *Talanta* 50: 207-217

Leopold I, Gunther D, Schmidt J, Neumann D (1999), Phytochelatins and heavy metal tolerance, *Phytochemistry* 50: 1323-1328

Lippard SJ, Berg JM (1994), *Bioanorganische Chemie*, Marcel Dekker, New York, USA

Lobinski R (1998), Speciation - targets, analytical solutions and markets, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 53: 177-185

Lobinski R, Pereiro IR, Chassaigne H, Wasik A, Szpunar J (1998), Elemental speciation and coupled techniques - towards faster and reliable analyses - Plenary Lecture, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13: 859-867

Lobinski R, Potin-Gautier M (1998), Metals and biomolecules - bioinorganic analytical chemistry, *Analisis* 26: M21-M24

Lobinski R, Szpunar J (1999), Biochemical speciation analysis by hyphenated techniques, *Analytica Chimica Acta* 400: 321-332

Lombi E, Zhao FJ, Dunham SJ, McGrath SP (2000), Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*, *New Phytologist* 145: 11-20

Makarov A, Szpunar J (1998), The coupling of size-exclusion HPLC with ICP-MS in bioinorganic analysis, *Analisis* 26: M44-M48

Marti-Renom MA, Stuart AC, Fiser A, Sanchez R, Melo F, Sali A (2000), Comparative protein structure modeling of genes and genomes, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 29: 291-325

Martin MT (1988), Metal-Free Chromatographic Media, *Methods in Enzymology* 158: 15-21

Matsunaga T, Watanabe-Oda, Ishii T (1997), *Plant Nutrition for Suitable Food Production and Environment* 89

Matsunaga T, Ishii T, Watanabe H (1996), Speciation of water-soluble boron compounds in radish roots by size exclusion HPLC/ICP-MS, *Analytical Sciences* 12: 673-675

Merian E (1991), *Metals and their compounds in the Environment*, VCH, Weinheim, Germany,

Mestek O, Kominkova J, Koplik R, Borkova M, Suchanek M (2002), Quantification of copper and zinc species fractions in legume seeds extracts by SEC/ICP-MS: validation and uncertainty estimation, *Talanta* 57: 1133-1142

Ma M, Lau PS, Jia ZT, Tsang WK, Lam KS, Tam FZ, Wong YS (2003), The isolation and characterization of Type I MT cDNA from a heavy metal tolerant plant *Festuca rubra*, *Plant Science* 164:51-60

Michalke B, Schramel P (1998), Application of capillary zone electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry and capillary isoelectric focusing-inductively coupled plasma mass spectrometry for selenium speciation, *Journal of Chromatography A* 807: 71-80

Mota AM, Simões ML (1996), Direct methods of speciation of heavy metals in natural waters, Chapter 2, in: S.Caroli (Ed.), *Element Speciation in Bioinorganic Chemistry*, Wiley Interscience, New York

Murphy A, Zhou J, Goldsbrough PB, Taiz L (1997), Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiology* 113: 1293-1301.

Nieboer E, Richardson DHS (1980), The Replacement of the Non-Descript Term Heavy-Metals by A Biologically and Chemically Significant Classification of Metal-Ions, *Environmental Pollution Series B-Chemical and Physical* 1: 3-26

Nielsen FH (1994), *Ultratrace minerals: "Modern Nutrition in Health and Disease"*, Philadelphia: Lea&Febiger, p.269-286

Nielsen FH (1998), Ultratrace elements in nutrition: Current knowledge and speculation, *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 11: 251-274

Nigam R, Srivastava S, Prakash S, Srivastava MM (2000), Effect of organic acids on the availability of cadmium in wheat, *Chemical Speciation and Bioavailability* 12: 125-132

Nordberg M (1998), Metallothioneins: historical review and state of knowledge, *Talanta* 46: 243-254

Odegard KE, Lund W (1997), Multi-element speciation of tea infusion using cation-exchange separation and size-exclusion chromatography in combination with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 12: 403-408

Pavlikova D, Pavlik M, Vasickova S, Szakova J, Tlustos P, Vokac K, Balik J (2002), The effect of soil properties on cadmium bonds to organic substances of spinach biomass, *Applied Organometallic Chemistry* 16: 187-191

Perkin Elmer (1998), *SIMA-6000 Manual*,

Perkin Elmer (2000), *ELAN-6100 Manual*,

Pfannhauser W (1988), *Essentielle Spurenelemente in der Nahrung*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

Pharmacia Biotech (1990), *Gel filtration, 6th. Edition*

Rausser WE (1999), Structure and function of metal chelators produced by plants. *CellBiochemistry and Biophysics* 31: 19-48.

Reinecke H, Dunemann L (1990), Does the Supplementation of Metal-Ions Modify the Intrinsic Distribution of Element Species in Food Extracts, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 338: 630-634

Robinson NJ, Tommey AM, Kuske C, Jackson PJ (1993), Plant metallothioneins, *Biochem. J.* 295:1-10

Sanz-Medel A (1998), Trace element analytical speciation in biological systems: importance, challenges and trends, *Spectrochimica Acta Part B* 53: 197-211

Sasakura C, Suzuki KT (1998), Biological interaction between transition metals (Ag, Cd and Hg), selenide/sulfide and selenoprotein P, *Journal of Inorganic Biochemistry* 71: 159-162

Schaffer S, Weil B, Nguyen VD, Dongmann G, Gunther K, Nickolaus M, Hermann T, Bott M (2001), A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*, *Electrophoresis* 22: 4404-4422

Shah K, Dubey RS (1995), Effect of Cadmium on Rna Level As Well As Activity and Molecular-Forms of Ribonuclease in Growing Rice Seedlings, *Plant Physiology and Biochemistry* 33: 577-584

Silva JJFd, Williams RJ (2001), *The biological chemistry of the elements : the inorganic chemistry of life*, Oxford : Univ. Press

Stone JA, Vyn TJ, Clarke ND (1990), Ridge Tillage for Corn and Soybean Production on Clay and Clay-Loam Soils in Southwestern Ontario - A Review, *Soil & Tillage Research* 18: 219-230

Strasdeit H (2001), The first cadmium-specific enzyme, *Angewandte Chemie-International Edition* 40: 707-709

Strasdeit H (1992), Beiträge zur Komplexchemie und bioanorganischen Chemie des Cadmiums. Habilitationsschrift, Fachbereich Anorganische Chemie, Universität Oldenburg

Stryer L (2004), *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin-Oxford

Sturgeon RE (2000), Current practice and recent developments in analytical methodology for trace element analysis of soils, plants, and water, *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 31: 1479-1512

Sunaga H, Suzuki KT (1988), Methylation of Residual Carboxyl Groups in Gel-Permeation Column and Its Effect on Elution and Distribution of Metals and Proteins in Blood-Serum, *Journal of Liquid Chromatography* 11: 701-711

Szpunar J, Pellerin P, Makarov A, Doco T, Williams P, Medina B, Lobinski R (1998), Speciation analysis for biomolecular complexes of lead in wine by size-exclusion high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13: 749-754

Szpunar J, Pellerin P, Makarov A, Doco T, Williams P, Lobinski R (1999), Speciation of metal-carbohydrate complexes in fruit and vegetable samples by size-exclusion HPLC-ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14: 639-644

Szpunar J (2000), Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques, *Analyst* 125: 963-988

Szpunar J, Lobinski R (2002), Multidimensional approaches in biochemical speciation analysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373: 404-411

Templeton DM, Ariese F, Cornelis R, Danielsson LG, Muntau H, Van Leeuwen HP, Lobinski R (2000), Guidelines for Terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, Structural aspects, and methodological approaches, *Pure Appl.Chem.* 72: 1453-1470

Vatamaniuk OK, Bucher EA, Ward JT, Rea PA (2001), A new pathway for heavy metal detoxification in animals - phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*, *J. Biol. Chem.* 276:20817-20

Wang J (1988), *Electroanalytical Techniques in clinical chemistry and laboratory medicine*, VCH, New York

WHO (1973), Trace elements in human nutrition, *Techn.Rep.Ser.* 532

Zenk MH (1996), Heavy metal detoxification in higher plants - A review, *Gene* 179: 21-30

Zoorob GK, McKiernan JW, Caruso JA (1998), ICP-MS for elemental speciation studies, *Mikrochimica Acta* 128: 145-168

6 ANHANG

Internetadressen zu Kapitel 1-1 :

PDB : <http://www.rcsb.org/databases.html>

RCSB : <http://www.rcsb.org/index.html>

MDB : <http://metallo.scripps.edu/>

TSRI : <http://www.scripps.edu/>

PROMISE : <http://metallo.scripps.edu/PROMISE/>

Im Weiteren sind Tabellen, Abbildungen und Spektren als Nachschlagwerk aufgeführt, auf die in den Diskussionen im Kapitel 3 nicht explizit eingegangen wurde.

6.1 Löslichkeitsverhalten der Elemente

6.1.1 Cytosolgewinnung aus den Pflanzenmaterialien

Tabelle 6-1 **Bezug : Kap. 3.1.1; Die Tabelle stellt die gewonnene Cytosolmenge dar, bezogen auf das Frischgewicht der aufbereiteten Pflanzenproben. Aufgeführt sind zusätzlich die Verdünnungsfaktoren der Cytosole, die durch Zusatz von Trispuffer (doppelte Menge des eingesetzten Pflanzenmaterials) entstanden sind.**

Pflanzenprobe	Ohne Pufferzusatz		Nach Pufferzusatz		Verdünnungs-Faktor
	% Cytosol	% Pellet	% Cytosol	% Pellet	
Gurke	94,5%	5,5%	98,2%	1,8 %	3,1
Eissalat	90,3%	9,7%	96,8%	3,2 %	3,2
Endiviensalat	86,1%	13,9%	95,4%	4,6 %	3,3
Tomate	85,3%	14,7%	95,1%	4,9 %	3,3
Kopfsalat	82,1%	11,1%	94,0%	3,7 %	3,2
Feldsalat	80,0%	20,0%	93,3%	6,7 %	3,4
Paprika	58,2%	41,8%	86,1%	13,9 %	4,4
Kohlrabi	40,8%	59,2%	80,3%	19,7 %	5,9
Möhren	3,6%	96,1%	67,9%	32,0 %	52,5
Arabidopsis	63,6%	36,4%	87,9%	12,1 %	4,1

6.1.2 Zellaufschluß durch Ultra-Turrax

(Cytosol/Pellet-Verteilung)

Angaben zu Tabelle :

- Der Gehalt in den Homogenaten wird gleich 100% gesetzt
- Aufgeführt in der Tabelle sind die Standardabweichungen aus den Bestimmungen
- Cyt. = Cytosolanteil, Pell. = Pelletanteil, Hom. = Homogenat
- P+C = Summe aus relativem Cytosol- und Pelletanteil

- RSD = relative Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung (Ausnahme: bei Werten mit einem Ausreißer und bei Einzelprobennahme für das Gurkencytosol)
- < BW = Wert ist kleiner als Säureblindwert (RSD<0,5%, wird als 0% abgerundet)
- n.b. = nicht bestimmbar, da weniger als drei Werte auswertbar waren

Tabelle 6-2 Bezug : Kap. 3.1.3; Die Werte stellen die Verteilungen der untersuchten Elemente in den Pellets und Cytosolen als prozentualen Wiederfindungen dar, die aus den Homogenaten gewonnen wurden.

% in Cyt. (RSD)	% in Pell. (RSD)	RSD Hom.	P+C %		% in Cyt. (RSD)	% in Pell. (RSD)	RSD Hom.	P+C %
Eisbergsalat					Endiviansalat (Forts.)			
Li 68,7 (12%)	< BW (n.b.)	7%	68,7	Sr 7,5 (1%)	102 (10%)	4%	109,4	
B 15,8 (47%)	81,6 (3%)	7%	97,4	Mo 61,7 (0%)	44,9 (8%)	3%	106,5	
Mg 29,2 (1%)	67,3 (4%)	2%	96,5	Cd 38,5 (1%)	59,1 (2%)	1%	97,6	
Ca 12,2 (1%)	94,8 (4%)	2%	107	Ba < BW (n.b.)	128 (9%)	30%	128,1	
Mn 30,8 (1%)	84 (5%)	2%	114,8	Pb < BW (n.b.)	104 (8%)	14%	104,0	
Fe 27,5 (1%)	72,4 (9%)	1%	99,9	Al < BW (n.b.)	109 (8%)	4%	108,9	
Co 91 (53%)	73,6 (28%)	29%	164,6	Ga < BW (n.b.)	94 (3%)	n.b.	93,8	
Ni 29,1 (19%)	92 (5%)	8%	121,1	Sn 12,8 (12%)	77,5 (13%)	6%	90,2	
Cu 77,6 (4%)	26,9 (4%)	5%	104,5	Sb < BW (n.b.)	103 (25%)	24%	103,2	
Zn 97,8 (13%)	38,5 (19%)	30%	136,3	Be < BW (n.b.)	47,0 (19%)	6%	47,0	
Rb 91,7 (1%)	11 (3%)	2%	102,7	Y < BW (n.b.)	60,1 (10%)	72%	60,1	
Sr 4,2 (5%)	99,4 (4%)	2%	103,6	La < BW (n.b.)	54,7 (5%)	63%	54,7	
Mo 58,9 (2%)	45,9 (7%)	4%	104,8	Ce < BW (n.b.)	48 (4%)	61%	48,0	
Cd 59,2 (2%)	40 (4%)	1%	99,1	Pr < BW (n.b.)	47,5 (6%)	60%	47,5	
Ba 34,3 (22%)	40,8 (23%)	16%	75,1	Nd < BW (n.b.)	45,5 (8%)	59%	45,5	
Sn < BW (n.b.)	91,9 (11%)	8%	91,9	Sm < BW (n.b.)	45,5 (5%)	58%	45,5	
Y < BW (n.b.)	122,1 (9%)	23%	122,1	Eu < BW (n.b.)	76,5 (9%)	35%	76,5	
La < BW (n.b.)	121,9 (5%)	27%	121,9	Gd < BW (n.b.)	52 (8%)	58%	52,0	
Ce < BW (n.b.)	117,4 (13%)	8%	117,4	Tb < BW (n.b.)	58,7 (5%)	58%	58,7	
Pr < BW (n.b.)	134,4 (4%)	40%	134,4	Dy < BW (n.b.)	63,3 (10%)	64%	63,3	
Nd < BW (n.b.)	92,4 (10%)	n.b.	92,4	Ho < BW (n.b.)	60,8 (8%)	71%	60,8	
Sm < BW (n.b.)	51,7 (5%)	n.b.	51,7	Er 38,2 (n.b.)	57,4 (12%)	73%	95,6	
Gd < BW (n.b.)	95,9 (6%)	15%	95,9	Tm < BW (n.b.)	58,1 (17%)	83%	58,1	
				Yb < BW (n.b.)	57,3 (28%)	83%	57,3	
				Lu 3,8 (n.b.)	54,7 (12%)	83%	58,5	
				U < BW (n.b.)	79,5 (8%)	49%	79,5	
Endiviansalat					Feldsalat			
Li 52,6 (5%)	47,7 (8%)	3%	100,3	Li 68,9 (3%)	35,5 (17%)	3%	104,4	
B < BW (n.b.)	75,4 (7%)	7%	75,4	B 49,2 (9%)	54,2 (11%)	10%	103,4	
Mg 49,9 (0%)	51,2 (2%)	1%	101,0	Mg 77,5 (5%)	29,4 (8%)	0%	106,9	
Ca 25,3 (0%)	78,6 (15%)	1%	103,9	Ca 70,6 (4%)	40,5 (9%)	4%	111,0	
Mn 26,9 (0%)	81,8 (4%)	3%	108,7	Mn 35 (2%)	66,2 (9%)	1%	101,2	
Fe 16,6 (1%)	92 (5%)	5%	108,1	Fe < BW (n.b.)	97,2 (16%)	8%	97,2	
Co 16,3 (23%)	104 (14%)	12%	120,4	Co 50,7 (16%)	69,2 (16%)	23%	119,9	
Ni 23,1 (1%)	110 (13%)	10%	132,7	Ni 14,4 (1%)	89,9 (18%)	10%	104,2	
Cu 69,3 (1%)	32,9 (2%)	1%	102,2					
Zn 61,6 (4%)	37,7 (2%)	0%	99,4					
Rb 89,6 (1%)	11,2 (4%)	6%	100,8					

	% in Cyt. (RSD)	% in Pell. (RSD)	RSD Hom.	P+C %		% in Cyt. (RSD)	% in Pell. (RSD)	RSD Hom.	P+C %
Feldsalat (Forts.)					Kopfsalat (Forts.)				
Cu	66,1 (1%)	34,0 (7%)	6%	100,2	Pb	< BW (n.b.)	117 (18%)	n.b.	116,8
Zn	85,8 (1%)	31,9 (3%)	10%	117,7	Sn	< BW (n.b.)	75,0 (20%)	7%	75,0
Rb	88,9 (1%)	12,9 (8%)	1%	101,8	Sb	53,7 (n.b.)	78,2 (1%)	16%	131,8
Sr	43,3 (2%)	59,5 (12%)	2%	102,8	Y	< BW (n.b.)	116 (3%)	1%	115,8
Mo	20,8 (3%)	83,9 (16%)	5%	104,7	La	< BW (n.b.)	103 (0%)	1%	102,5
Cd	30,2 (4%)	70,2 (10%)	2%	100,5	Ce	< BW (n.b.)	148 (1%)	8%	148,4
Ba	9,9 (5%)	74,1 (15%)	11%	83,9	Pr	< BW (n.b.)	102 (1%)	1%	101,7
Tl	64,9 (18%)	36,8 (6%)	43%	101,7	Nd	< BW (n.b.)	101 (1%)	0%	101,3
Pb	9,3 (14%)	135 (21%)	11%	144,4	Sm	< BW (n.b.)	103 (0%)	2%	102,9
Bi	7,3 (n.b.)	101 (19%)	3%	108,5	Eu	< BW (n.b.)	106 (1%)	3%	105,7
Al	0,7 (25%)	98,0 (21%)	8%	98,6	Gd	< BW (n.b.)	104 (0%)	2%	103,9
Ga	14,9 (12%)	78,7 (18%)	12%	93,7	Tb	< BW (n.b.)	101 (1%)	1%	100,8
Se	111 (25%)	7,7 (33%)	15%	118,2	Dy	< BW (n.b.)	102 (1%)	1%	102,1
Rh	52,5 (4%)	55,0 (24%)	2%	107,5	Ho	< BW (n.b.)	109 (0%)	1%	108,9
Sn	28,5 (35%)	73,3 (10%)	20%	101,8	Er	< BW (n.b.)	105 (1%)	3%	104,8
Sb	58,0 (12%)	106 (17%)	13%	164,4	Tm	< BW (n.b.)	129 (1%)	5%	129,2
Be	< BW (n.b.)	102 (23%)	3%	101,7	Yb	< BW (n.b.)	110 (0%)	1%	109,6
Y	1,6 (3%)	110 (16%)	3%	111,6	Lu	< BW (n.b.)	139 (0%)	6%	138,5
La	1,3 (6%)	99,2 (23%)	20%	100,5	Gurke				
Ce	1,2 (23%)	100 (24%)	18%	100,9	Li	96,4 (n.b.)	2,9 (6%)	0%	99,3
Pr	0,9 (3%)	103 (24%)	16%	104,3	B	77,0 (n.b.)	29,2 (8%)	n.b.	106,3
Nd	0,9 (8%)	106 (24%)	15%	106,9	Mg	91,8 (n.b.)	11,0 (1%)	1%	102,7
Sm	1,6 (7%)	111 (26%)	8%	112,4	Ca	77,5 (n.b.)	21,6 (1%)	1%	99,1
Eu	< BW (n.b.)	103 (18%)	7%	102,7	Mn	37,2 (n.b.)	59,0 (3%)	5%	96,2
Gd	< BW (n.b.)	111 (22%)	10%	111,0	Fe	3,4 (n.b.)	98,6 (3%)	19%	101,9
Tb	1,0 (n.b.)	117 (19%)	8%	118,1	Co	4,6 (n.b.)	91,2 (2%)	13%	95,8
Dy	1,4 (n.b.)	115 (15%)	5%	115,9	Ni	3,7 (n.b.)	102 (3%)	21%	105,4
Ho	< BW (n.b.)	114 (15%)	7%	114,0	Cu	42,6 (n.b.)	58 (2%)	6%	101,0
Er	1,6 (n.b.)	111 (15%)	11%	112,3	Zn	82,8 (n.b.)	24,2 (4%)	3%	107,0
Tm	< BW (n.b.)	111 (17%)	9%	110,6	Rb	102,9 (n.b.)	2,9 (1%)	1%	105,9
Yb	< BW (n.b.)	110 (19%)	9%	109,9	Sr	46,3 (n.b.)	45,8 (1%)	0%	92,1
Lu	< BW (n.b.)	101 (16%)	10%	101,1	Mo	9,1 (n.b.)	102 (4%)	10%	110,7
U	7,4 (1%)	92 (13%)	9%	99,3	Cd	10,2 (n.b.)	87,0 (3%)	14%	97,2
Kopfsalat					Ba	< BW (n.b.)	23,2 (21%)	41%	23,2
Li	88,7 (0%)	7,4 (1%)	1%	96,0	Tl	84 (n.b.)	27,0 (1%)	25%	111,7
B	58,4 (28%)	81,9 (10%)	7%	140,2	Ga	< BW (n.b.)	81,4 (2%)	9%	81,4
Mg	79,0 (1%)	36,8 (0%)	0%	115,8	Ru	< BW (n.b.)	119 (45%)	n.b.	119,4
Ca	59,3 (2%)	67,7 (4%)	2%	126,9	Rh	< BW (n.b.)	125 (6%)	n.b.	125,5
Mn	54,7 (2%)	65,1 (2%)	1%	119,8	Sb	< BW (n.b.)	77,8 (6%)	9%	77,8
Fe	24,1 (0%)	91,8 (5%)	1%	115,9	Kohlrabi				
Co	27,7 (126%)	56,6 (93%)	79%	84,3	Li	62,1 (5%)	38,0 (9%)	8%	100,2
Ni	32,6 (2%)	93,3 (2%)	6%	125,9	B	36,0 (2%)	73,0 (5%)	4%	109,0
Cu	74,0 (2%)	34,5 (0%)	0%	108,5	Mg	55,6 (1%)	39,5 (1%)	1%	95,1
Zn	45,5 (4%)	61,9 (2%)	3%	107,3	Ca	31,1 (1%)	55,8 (2%)	1%	86,9
Rb	100 (1%)	8,7 (1%)	1%	108,3	Mn	21,2 (1%)	72,8 (1%)	2%	94,0
Sr	32,4 (1%)	105 (3%)	4%	136,9	Fe	19,7 (1%)	87,0 (9%)	11%	106,7
Mo	26,1 (16%)	101 (9%)	15%	127,1	Co	26,8 (1%)	68,4 (11%)	7%	95,2
Cd	39,0 (0%)	69,6 (0%)	2%	108,6	Ni	10,9 (1%)	92,4 (5%)	14%	103,2
Ba	< BW (n.b.)	178 (13%)	6%	178,4					

	% in Cyt. (RSD)	% in Pell. (RSD)	RSD Hom.	P+C %		% in Cyt. (RSD)	% in Pell. (RSD)	RSD Hom.	P+C %
Kohlrabi (Forts.)					Paprika				
Cu	59,8 (1%)	46,1 (1%)	2%	106,0	Li	76,2 (2%)	22,6 (4%)	4%	98,8
Zn	15,5 (60%)	51,2 (18%)	7%	66,7	B	38,0 (n.b.)	70,6 (22%)	5%	108,6
Rb	67,6 (0%)	23,9 (0%)	1%	91,5	Mg	44,3 (1%)	63,4 (4%)	2%	107,7
Sr	13,0 (0%)	77,5 (3%)	3%	90,4	Ca	13,0 (2%)	97,3 (5%)	4%	110,3
Mo	19,1 (1%)	77,4 (5%)	14%	96,4	Mn	32,7 (2%)	66,4 (9%)	2%	99,1
Cd	50,5 (3%)	43,1 (4%)	8%	93,6	Fe	6,8 (0%)	108 (6%)	7%	114,7
Ba	38,9 (63%)	63,2 (8%)	43%	102,1	Co	39,4 (7%)	51,5 (12%)	25%	90,9
Tl	70,9 (50%)	247 (6%)	71%	318,3	Ni	13,1 (2%)	89,8 (23%)	52%	102,9
Pb	< BW (n.b.)	79,9 (41%)	27%	79,9	Cu	75,2 (1%)	22,6 (1%)	6%	97,8
Al	< BW (n.b.)	97,2 (6%)	30%	97,2	Zn	63,0 (10%)	48,4 (14%)	11%	111,5
Sn	< BW (n.b.)	74,1 (24%)	27%	74,1	Rb	78,8 (1%)	23,6 (2%)	1%	102,4
Sb	< BW (n.b.)	111 (9%)	25%	110,9	Sr	< BW (n.b.)	112 (6%)	5%	111,6
Y	< BW (n.b.)	104 (6%)	39%	104,2	Mo	45,4 (0%)	56,6 (19%)	28%	102,0
La	< BW (n.b.)	103 (13%)	35%	103,3	Ba	12,3 (n.b.)	92,3 (38%)	46%	104,6
Ce	< BW (n.b.)	112 (28%)	37%	112,4	Tomate				
Pr	< BW (n.b.)	101 (6%)	25%	101,0	Li	90,9 (1%)	8,5 (1%)	1%	99,5
Nd	< BW (n.b.)	89,6 (7%)	24%	89,6	B	59,7 (1%)	38,7 (5%)	5%	98,5
Sm	< BW (n.b.)	47,1 (4%)	14%	47,1	Mg	80,3 (2%)	21,9 (1%)	2%	102,2
Gd	26,3 (n.b.)	69,6 (7%)	18%	95,9	Ca	31,6 (1%)	68,7 (2%)	1%	100,3
Dy	< BW (n.b.)	81,9 (12%)	20%	81,9	Mn	71,0 (1%)	32,2 (2%)	3%	103,2
Ho	< BW (n.b.)	89,2 (7%)	40%	89,2	Fe	21,3 (1%)	83,3 (1%)	1%	104,6
Er	< BW (n.b.)	65,1 (22%)	80%	65,1	Co	73,1 (3%)	36,8 (33%)	9%	109,8
Yb	< BW (n.b.)	94,8 (11%)	30%	94,8	Ni	82,9 (0%)	48,3 (14%)	6%	131,3
Möhren					Cu	71,8 (1%)	28,1 (2%)	1%	99,9
B	< BW (n.b.)	77,3 (4%)	n.b.	77,3	Zn	78,7 (5%)	26,3 (6%)	8%	105,0
Mg	24,4 (6%)	81,1 (8%)	3%	105,5	Rb	92,1 (1%)	8,6 (1%)	1%	100,7
Ca	11,2 (2%)	95,0 (10%)	2%	106,2	Sr	27,3 (1%)	84,5 (2%)	2%	111,8
Mn	13,3 (1%)	88,2 (8%)	2%	101,4	Mo	74,2 (0%)	32,5 (6%)	1%	106,7
Fe	9,8 (1%)	92,6 (8%)	7%	102,4	Cd	57,0 (1%)	40,3 (1%)	1%	97,3
Co	25,2 (99%)	76,9 (15%)	23%	102,2	Ba	37,0 (n.b.)	27,6 (39%)	29%	64,5
Ni	13,0 (1%)	92,1 (10%)	10%	105,1	Al	< BW (n.b.)	117 (2%)	1%	117,0
Cu	57,2 (1%)	51,9 (7%)	2%	109,0	Ga	83,5 (16%)	38,0 (n.b.)	8%	121,5
Zn	34,2 (33%)	65,7 (53%)	64%	99,9	Se	91,5 (87%)	10,7 (29%)	39%	102,2
Rb	59,1 (1%)	47,9 (3%)	3%	107,1	Rh	35,5 (9%)	45,5 (5%)	11%	81,0
Sr	2,7 (1%)	112 (5%)	4%	114,4	Y	38,4 (16%)	60,7 (16%)	7%	99,1
Mo	15,0 (1%)	90,5 (10%)	9%	105,5	La	< BW (n.b.)	83,1 (18%)	7%	83,1
Cd	52,6 (2%)	54,7 (4%)	2%	107,3	Ce	33,9 (1%)	73,5 (18%)	18%	107,4
Ba	< BW (n.b.)	101 (9%)	1%	100,8	Pr	< BW (n.b.)	90,8 (18%)	7%	90,8
Tl	45,8 (3%)	60,8 (6%)	2%	106,7	Nd	< BW (n.b.)	85,1 (20%)	5%	85,1
Se	90,3 (45%)	42,0 (13%)	n.b.	132,2	Gd	< BW (n.b.)	75,2 (22%)	14%	75,2
Y	< BW (n.b.)	76,1 (8%)	n.b.	76,1	U	< BW (n.b.)	81,3 (5%)	4%	81,3
La	< BW (n.b.)	99,7 (n.b.)	n.b.	99,7					
Sm	< BW (n.b.)	102 (n.b.)	n.b.	102,1					
Tb	< BW (n.b.)	98,0 (n.b.)	n.b.	98,0					
Dy	< BW (n.b.)	93,4 (5%)	n.b.	93,4					

6.2 Die GPC-Wiederfindungen der Elemente in den Pflanzencytosolen

Tabelle 6-3 Bezug : Kap. 3.2; Aufgeführt sind die Wiederfindungen der Elemente nach der Trennung der Pflanzencytosole durch GPC-Sephacryl S400HR. Die Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei Trennläufen und werden mit ihrer relativen Standardabweichungen (RSD) aufgelistet. Etwa 27 Elemente werden in den untersuchten Pflanzenproben wiedergefunden (Wiederfindungen kleiner als 1% werden in der Tabelle mit „ - “ angegeben). Die Werte stellen ein Vergleich der Ergebnisse der GPC-Messreihen ohne EDTA-Reinigung und mit EDTA-Spülung zwischen jedem Trennlauf dar.

		Mittelwert Wiederfindung				Mittelwert Wiederfindung			
		ohne EDTA	RSD	mit EDTA	RSD	ohne EDTA	RSD	mit EDTA	RSD
		Eisbergssalat				Endiviansalat			
1	Li	57%	9%	28%	17%	36%	1%	47%	10%
2	B	65%	18%	45%	6%	27%	22%	68%	22%
3	Mg	88%	12%	84%	7%	45%	8%	90%	12%
4	Al	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Ca	-	-	-	-	12%	15%	22%	6%
6	Mn	2%	3%	11%	10%	96%	42%	31%	6%
7	Fe	68%	25%	34%	3%	52%	5%	-	-
8	Co	1128%	522%	101%	24%	2644%	1230%	91%	16%
9	Ni	1349%	529%	107%	17%	239%	12%	55%	6%
10	Cu	397%	55%	172%	6%	102%	2%	95%	21%
11	Zn	156%	97%	140%	13%	136%	12%	107%	21%
12	Ga	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Se	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Rb	136%	14%	130%	5%	140%	3%	123%	11%
15	Sr	115%	71%	66%	18%	36%	76%	9%	28%
16	Y	-	-	-	-	1%	0%	1%	0%
17	Mo	1%	3%	32%	25%	24%	13%	46%	6%
18	Rh	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Cd	15%	16%	27%	6%	388%	120%	22%	7%
20	Sn	-	-	-	-	1%	9%	13%	15%
21	Sb	-	-	-	-	1%	0%	1%	0%
22	Ba	1%	0%	1%	0%	-	-	-	-
23	La	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Ce	-	-	-	-	-	-	-	-
25	Tl	1%	24%	85%	13%	-	-	-	-
26	Pb	68%	32%	-	-	36%	20%	6%	7%
27	U	-	-	-	-	1%	0%	1%	0%

(Forts. Tabelle 6.3)

		Mittelwert Wiederfindung				Mittelwert Wiederfindung			
		ohne EDTA	RSD	mit EDTA	RSD	ohne EDTA	RSD	mit EDTA	RSD
		Feldsalat				Kopfsalat			
1	Li	81%	7%	71%	13%	64%	3%	64%	6%
2	B	96%	10%	80%	10%	20%	23%	79%	12%
3	Mg	104%	10%	85%	6%	107%	11%	92%	6%
4	Al	1047%	491%	80%	18%	1%	0%	330%	149%
5	Ca	91%	7%	92%	2%	31%	3%	53%	5%
6	Mn	97%	2%	91%	4%	69%	4%	86%	4%
7	Fe	11%	33%	121%	36%	1%	0%	157%	15%
8	Co	799%	589%	98%	6%	1245%	86%	95%	48%
9	Ni	650%	217%	99%	5%	1357%	238%	81%	1%
10	Cu	227%	67%	104%	28%	102%	8%	136%	32%
11	Zn	264%	29%	148%	8%	184%	12%	149%	2%
12	Ga	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Se	1%	6%	25%	7%	-	-	-	-
14	Rb	114%	6%	116%	2%	89%	2%	99%	2%
15	Sr	38%	1%	63%	2%	8%	4%	-	-
16	Y	56948%	53957%	1297%	1646%	168%	81%	-	-
17	Mo	61%	47%	116%	48%	-	-	-	-
18	Rh	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Cd	204%	37%	58%	13%	462%	182%	47%	4%
20	Sn	1%	0%	1%	0%	1%	0%	74%	45%
21	Sb	1%	18%	41%	34%	1%	0%	1%	0%
22	Ba	1%	0%	1%	0%	1%	0%	1%	0%
23	La	271%	18%	-	-	23%	29%	-	-
24	Ce	295%	71%	-	-	148%	122%	-	-
25	Tl	-	-	-	-	1%	0%	1%	0%
26	Pb	1%	0%	1%	0%	910%	567%	-	-
27	U	327%	489%	1035%	1041%	1%	0%	1%	0%
		Kohlrabi				Möhren			
1	Li	36%	9%	39%	7%	-	-	-	-
2	B	82%	24%	82%	15%	77%	26%	96%	10%
3	Mg	80%	11%	76%	1%	73%	14%	87%	9%
4	Al	-	-	-	-	1%	0%	1%	0%
5	Ca	23%	4%	45%	4%	3%	4%	5%	6%
6	Mn	80%	9%	72%	11%	40%	32%	32%	12%
7	Fe	71%	17%	85%	14%	61%	18%	65%	5%
8	Co	3424%	605%	104%	6%	761%	133%	101%	6%
9	Ni	292%	23%	119%	10%	132%	27%	73%	4%
10	Cu	628%	145%	152%	57%	65%	12%	58%	1%
11	Zn	253%	47%	151%	9%	91%	43%	103%	24%
12	Ga	1%	0%	1%	0%	1%	0%	1%	0%
13	Se	-	-	-	-	21%	3%	14%	3%
14	Rb	93%	4%	103%	0%	94%	15%	93%	4%
15	Sr	16%	4%	26%	5%	13%	17%	18%	11%
16	Y	-	-	-	-	460%	187%	3423%	6095%
17	Mo	82%	23%	135%	4%	4%	9%	41%	14%
18	Rh	289%	47%	142%	36%	-	-	-	-
19	Cd	122%	58%	76%	1%	79%	45%	67%	3%
20	Sn	151%	19%	33%	18%	1%	15%	95%	34%
21	Sb	1%	49%	47%	27%	1%	0%	1%	0%
22	Ba	1%	0%	1%	0%	1%	0%	1%	0%

		Mittelwert Wiederfindung				Mittelwert Wiederfindung			
		ohne EDTA	RSD	mit EDTA	RSD	ohne EDTA	RSD	mit EDTA	RSD
		(Kohlrabi)				(Möhren)			
23	La	10296%	345%	62%	98%	230%	79%	26%	214%
24	Ce	10873%	992%	165%	224%	267%	98%	116%	105%
25	Tl	1%	140%	55%	23%	57%	46%	8%	5%
26	Pb	494%	36%	-	-	-	-	-	-
27	U	1%	0%	1%	0%	1%	0%	1%	0%
		Paprika				Tomate			
1	Li	75%	3%	71%	11%	65%	9%	69%	3%
2	B	64%	2%	64%	9%	15%	39%	70%	4%
3	Mg	97%	5%	81%	6%	65%	9%	84%	4%
4	Al	4757%	3006%	639%	287%	1049%	957%	299%	77%
5	Ca	20%	14%	4%	3%	40%	63%	26%	17%
6	Mn	5%	6%	19%	13%	85%	30%	44%	18%
7	Fe	300%	153%	21%	7%	37%	23%	7%	24%
8	Co	2723%	2569%	87%	3%	10152%	2994%	124%	15%
9	Ni	3755%	1677%	106%	17%	1361%	207%	91%	12%
10	Cu	256%	49%	61%	6%	81%	4%	75%	6%
11	Zn	305%	99%	119%	1%	490%	7%	185%	24%
12	Ga	1%	0%	1%	0%	1%	0%	1%	0%
13	Se	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Rb	108%	7%	95%	5%	148%	5%	126%	5%
15	Sr	1%	0%	1%	0%	59%	52%	97%	6%
16	Y	-	-	-	-	1%	83%	291%	199%
17	Mo	1%	0%	51%	17%	242%	227%	-	-
18	Rh	396%	617%	1296%	211%	48%	55%	51%	61%
19	Cd	1405%	1295%	7%	12%	77%	47%	34%	3%
20	Sn	21%	30%	2%	7%	129%	157%	93%	47%
21	Sb	-	-	-	-	1%	30%	119%	47%
22	Ba	1%	0%	1%	0%	1%	0%	1%	0%
23	La	827%	61%	-	-	66%	57%	-	-
24	Ce	-	-	-	-	-	-	-	-
25	Tl	1%	0%	1%	0%	1%	0%	87%	63%
26	Pb	196%	303%	-	-	1%	0%	1%	0%
27	U	1%	0%	1%	0%	1%	0%	1%	0%
		Gurke							
1	Li	74%	20%	75%	19%	Al	-		
2	B	74%	39%	82%	44%	Ga	-		
3	Mg	82%	45%	74%	23%	Se	-		
4	Ca	17%	30%	35%	7%	Y	-		
5	Mn	11%	3%	63%	15%	Rh	-		
6	Fe	13%	3%	4%	4%		-		
7	Co	839%	491%	95%	13%	Sn	-		
8	Ni	178%	34%	28%	7%	La	-		
9	Cu	77%	14%	49%	16%	Ce	-		
10	Zn	133%	14%	107%	9%	Pb	-		
11	Rb	122%	21%	100%	4%	U	-		
12	Sr	90%	123%	35%	5%				
13	Mo	6%	5%	35%	24%				
14	Sb	1%	0%	1%	0%				
15	Ba	1%	0%	1%	0%				
16	Tl	1%	23%	40%	36%				
17	Cd	2234%	641%	-	-				

6.3 Quantitative Spektren der Pflanzencytosole nach GPC-ICP-MS

Bezug : Kap.3.3.2

Folgende Abbildungen zeigen die gemessenen Konzentrationen der einzelnen Elemente in den GPC-Fraktionen mit Elutionsvolumen von 100-900mL, jeweils nach Pflanzen dargestellt. Konzentrationen mit ähnlichen Größenordnungen werden in den Diagrammen zusammen gruppiert. Dabei wurden nur die Spezies in die Diagramme aufgenommen, die quantitativ auswertbare Peaks zeigten. Aufgrund geringer Konzentrationen fielen solche Elementspektren heraus, die nach den Grundlinienkorrekturen keine quantitativen Peaks mehr zeigten. Als Blindwerte galten die Konzentrationen der Vorlaufeluatate aus der Säule mit achtfacher Standardabweichung nach fünffacher Messung.

Folgende Spezies wurden in den jeweiligen Pflanzencytosolen gefunden:

1. Eisbergsalat (15 Spezies) : Mg, Zn, Cu, Rb, Fe, Ni, B, Mn, Mo, Ba, Co, Sr, Cd, Li, Tl
2. Endiviensalat (18 Spezies) : Mg, Zn, Ca, Rb, Cu, Ni, B, Mn, Mo, Sr, Pb, Co, Sn, Li, Sb, Cd, U, Y
3. Feldsalat (27 Spezies) : Mg, Ca, Zn, Fe, B, Mn, Rb, Cu, Ni, Sr, Al, Se, Li, Ba, Co, Mo, Pb, Sn, Cd, Y, Sb, U, Yb, Er, Lu, Tm
4. Kopfsalat (17(21) Spezies) : Mg, Ca, Zn, Rb, Mn, Cu, B, Fe, Li, Ni, Al, Ba, Sn, Cd, Co, Sb, Tl, (Y, U, La, Ce)
5. Gurke (16 Spezies) : Mg, Zn, Ca, Fe, B, Mn, Rb, Cu, Ni, Li, Ba, Sr, Mo, Co, Sb, Tl
6. Paprika (21 Spezies) : Mg, Zn, Ca, Fe, B, Al, Rb, Cu, Ni, Mn, Li, Ba, Mo, Co, Sr, Sn, U, Ga, Cd, Rh, Tl
7. Tomate (23 Spezies) : Mg, Zn, Ca, B, Rb, Cu, Al, Mn, Li, Ni, Fe, Sr, Ba, Co, Sn, Cd, Pb, Ga, Sb, U, Y, Tl, Rh
8. Kohlrabi (23 Spezies) : Mg, Zn, Ca, Fe, B, Cu, Rb, Ni, Mn, Mo, Sr, Ba, Co, Li, Ga, Cd, Sn, Sb, U, Ce, Tl, Rh, La
9. Möhren (26 Spezies) : Mg, Zn, Ca, Fe, B, Rb, Cu, Ni, Al, Mn, Ba, Se, Mo, Co, Sr, Sn, Cd, Y, U, Ga, La, Ce, Sb, Tl, Yb, Rh
10. Arabidopsis (27 Spezies) : Ca, Mg, Zn, Cu, B, Sr, Mn, Fe, Al, Rb, Ni, Cd, Mo, Pb, Ba, Sn, Co, Li, Yb, Y, Er, Lu, Tl, Tm, Ho, Dy, U

6.3.1 Spezies in Eisbergsalatcytosol

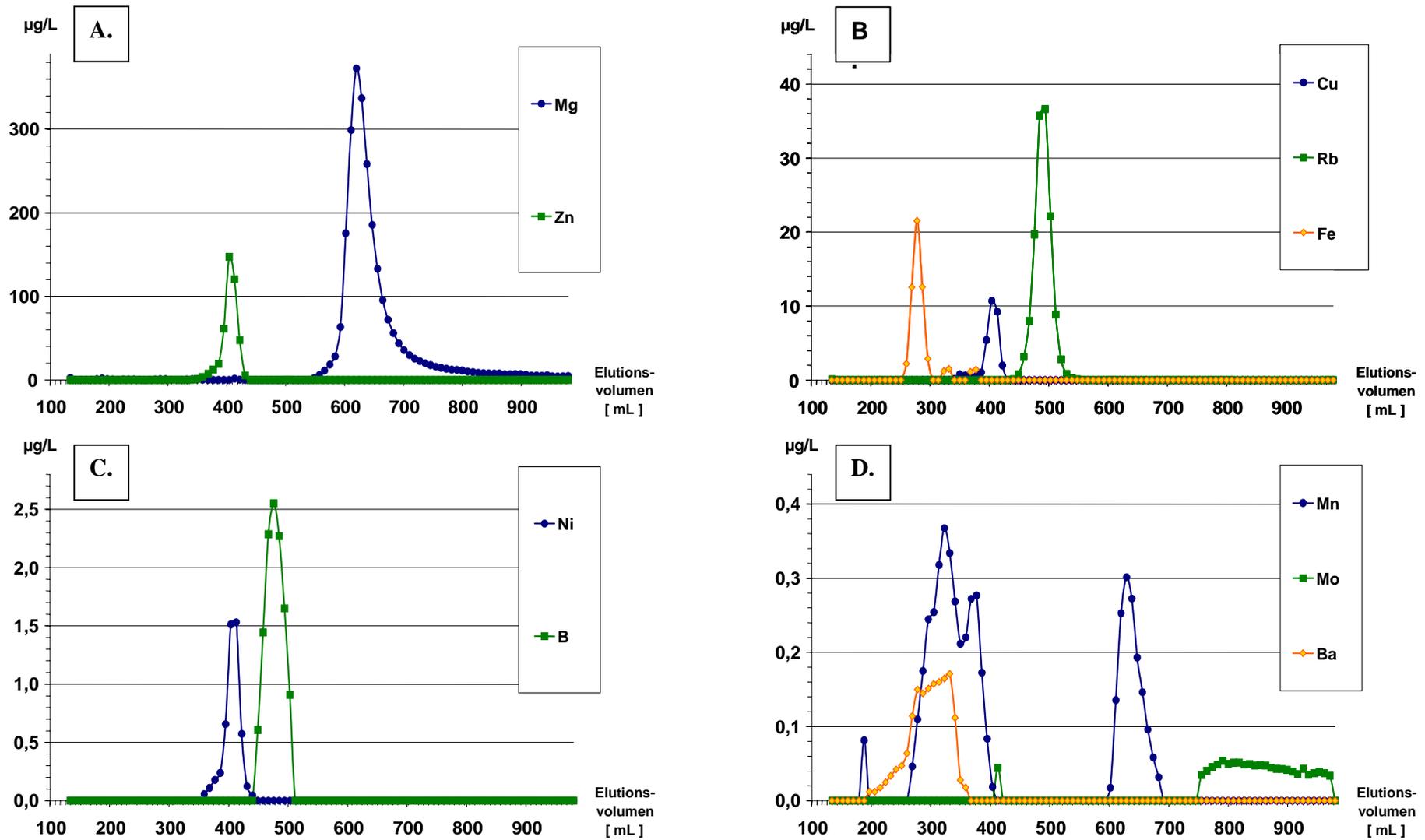


Abbildung 6-1 GPC-Elutionsprofile von verschiedenen Spezies in Eisbergsalatcytosol

(Weitere Spezies in Eisbergsalatcytosol)

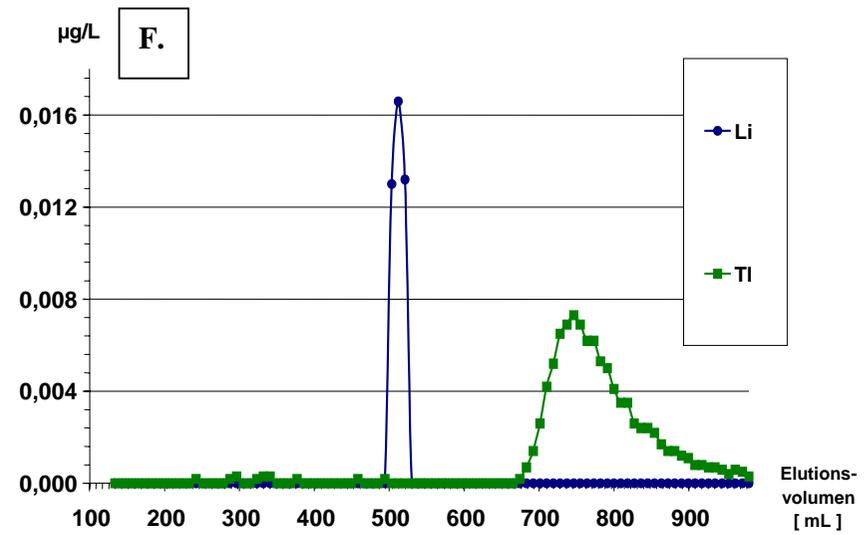
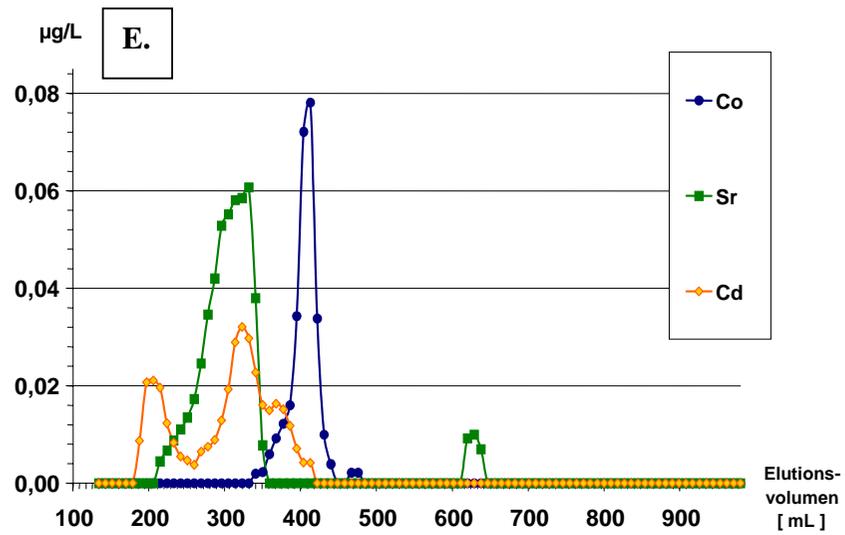


Abbildung 6-2 GPC-Elutionsprofile weiterer Spezies in Eisbergsalatcytosol

6.3.2 Spezies in Endiviensalatcytosol

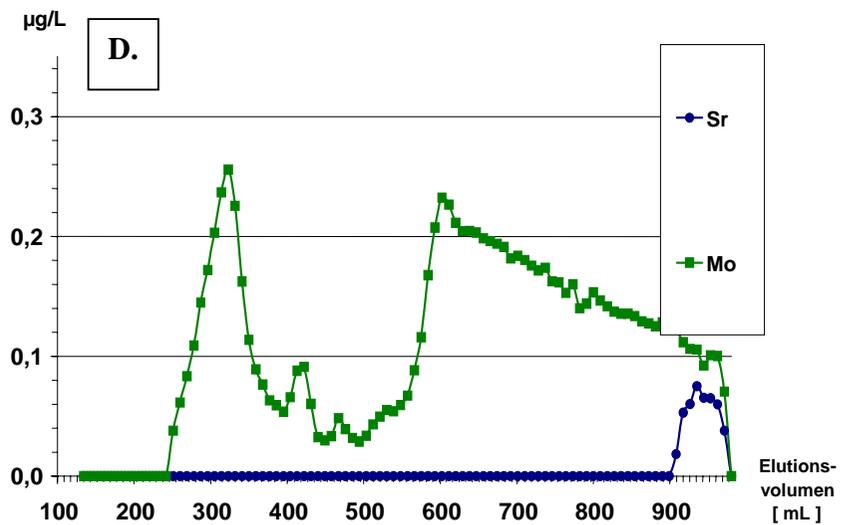
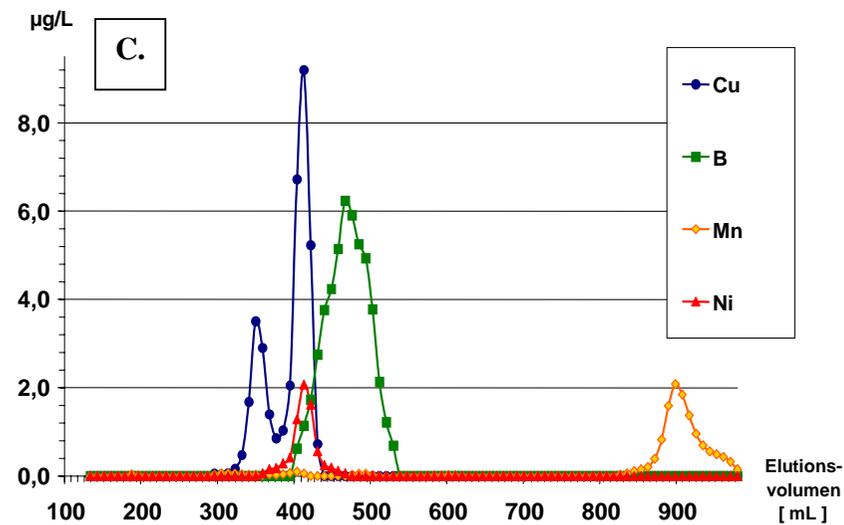
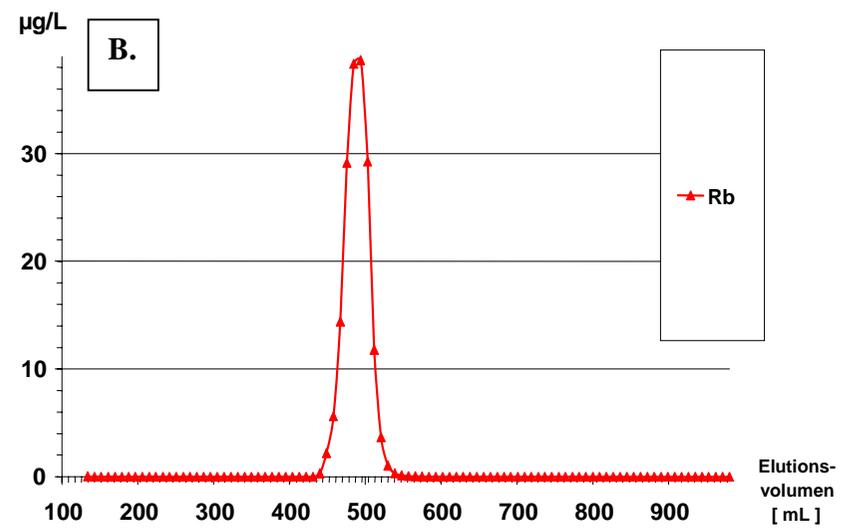
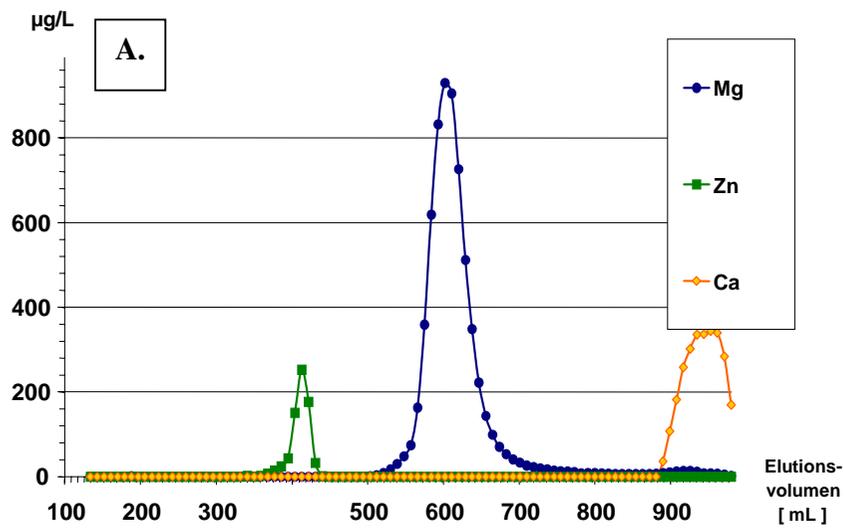


Abbildung 6-3 GPC-Elutionsprofile von verschiedenen Spezies in Endiviensalatcytosol

(Weitere Spezies in Endiviensalatcytosol)

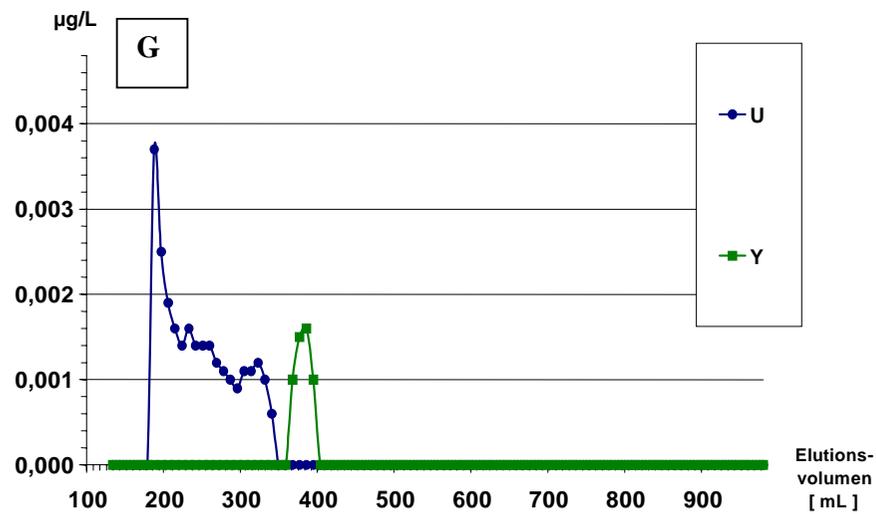
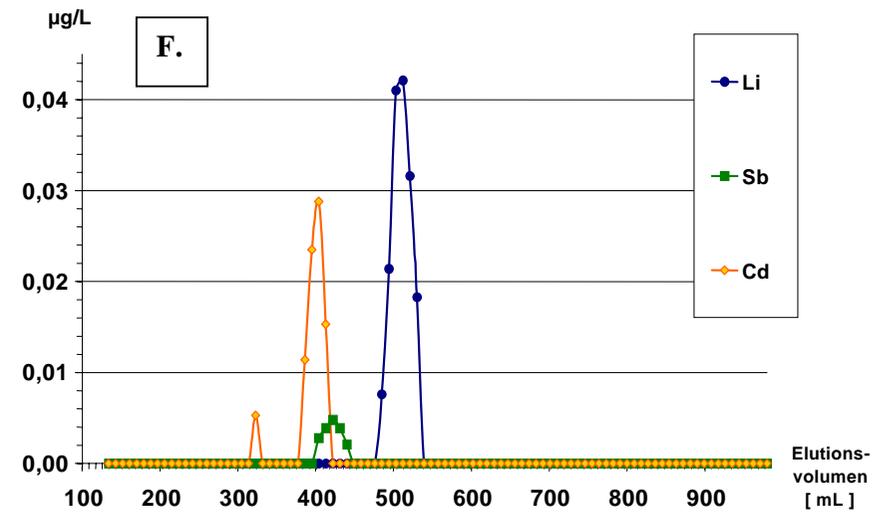
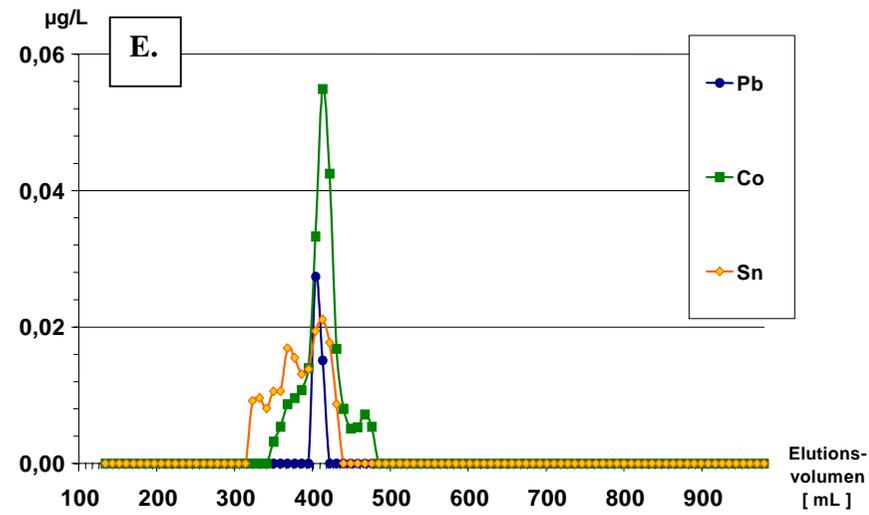


Abbildung 6-4 GPC-Elutionsprofile weiterer Spezies in Endiviensalatcytosol

6.3.3 Spezies in Feldsalatcytosol

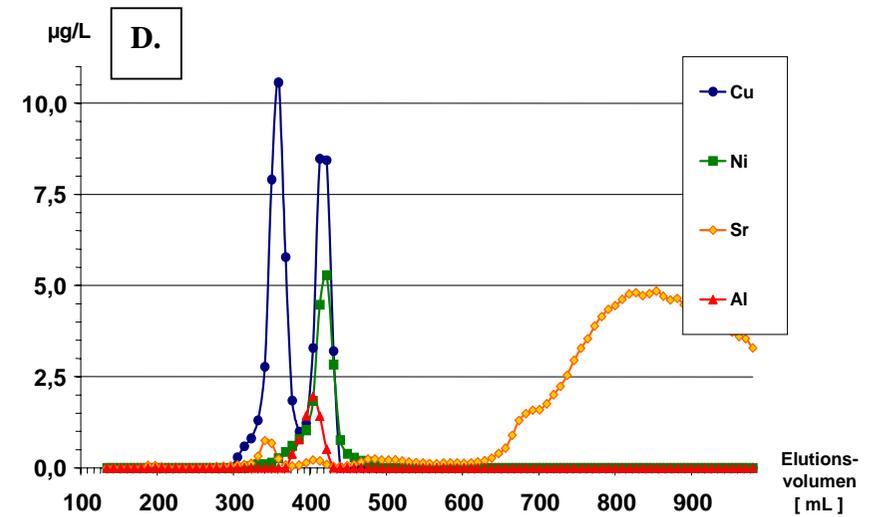
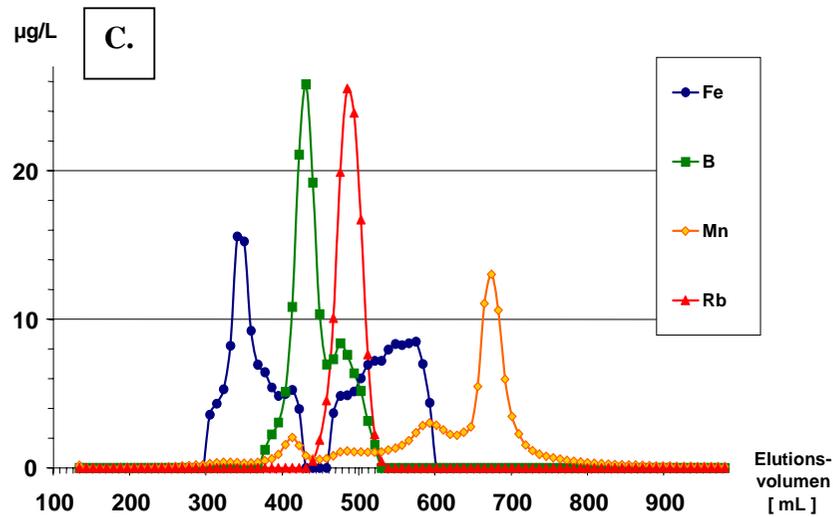
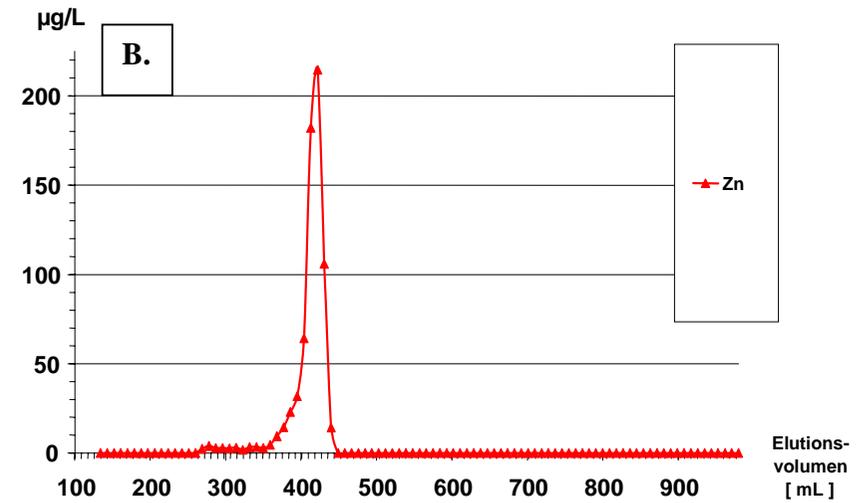
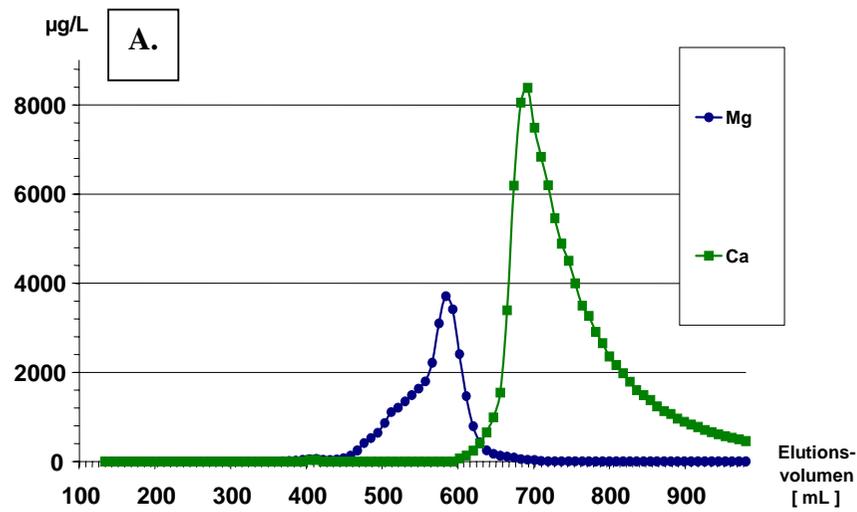


Abbildung 6-5 GPC-Elutionsprofile von verschiedenen Spezies in Feldsalatcytosol

(Weitere Spezies in Feldsalatcytosol)

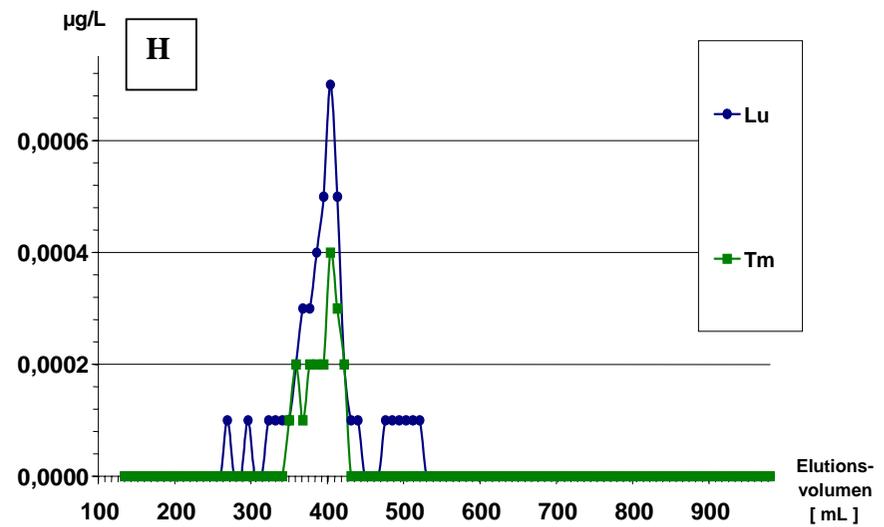
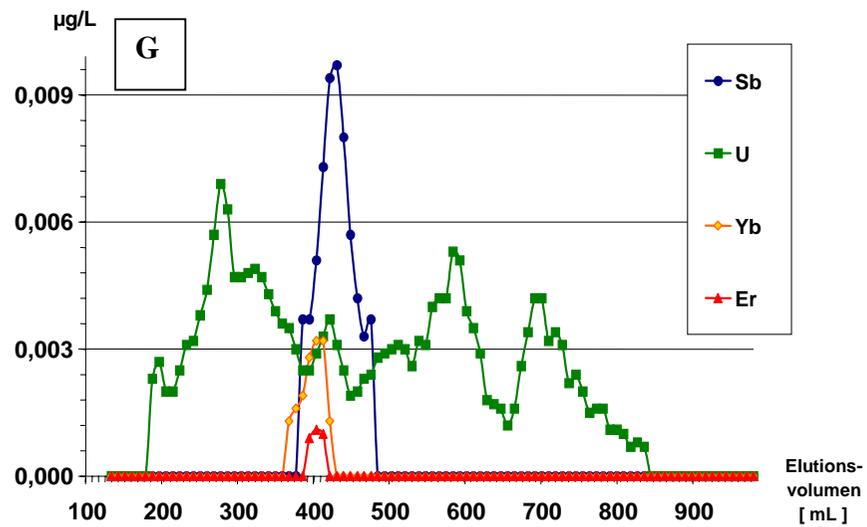
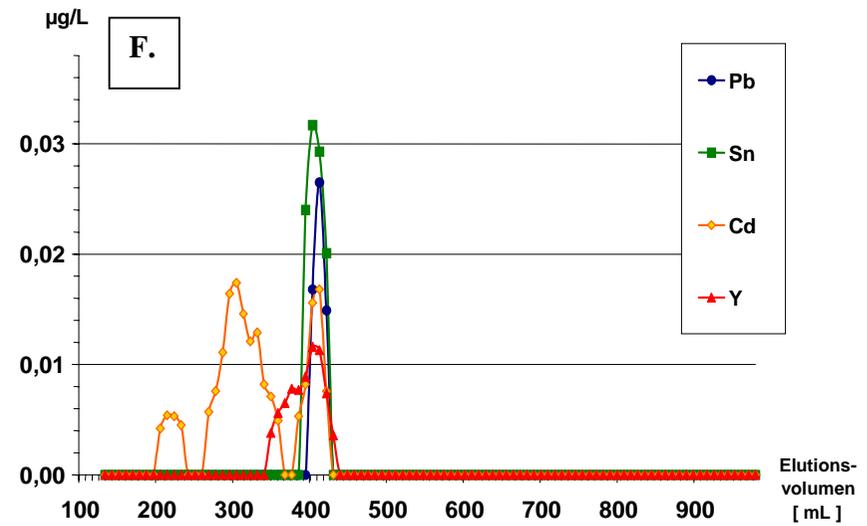
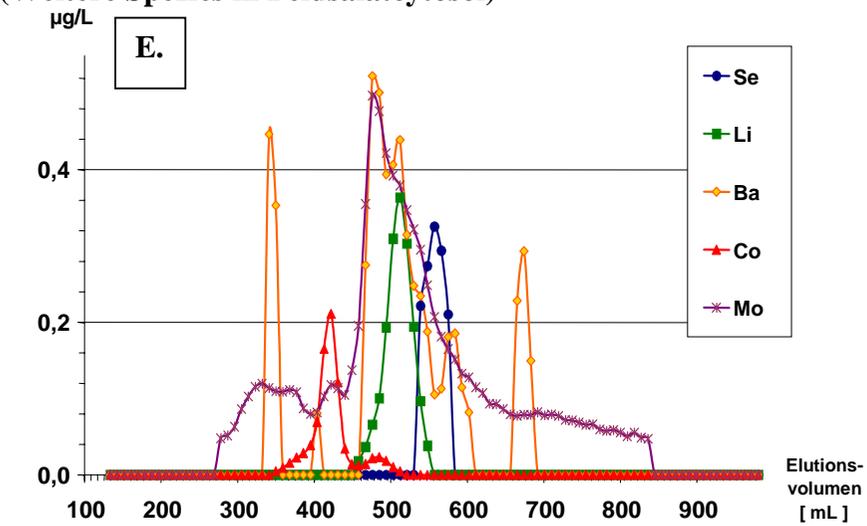


Abbildung 6-6 GPC-Elutionsprofile weiterer Spezies in Feldsalatcytosol

6.3.4 Spezies in Kopfsalatcytosol

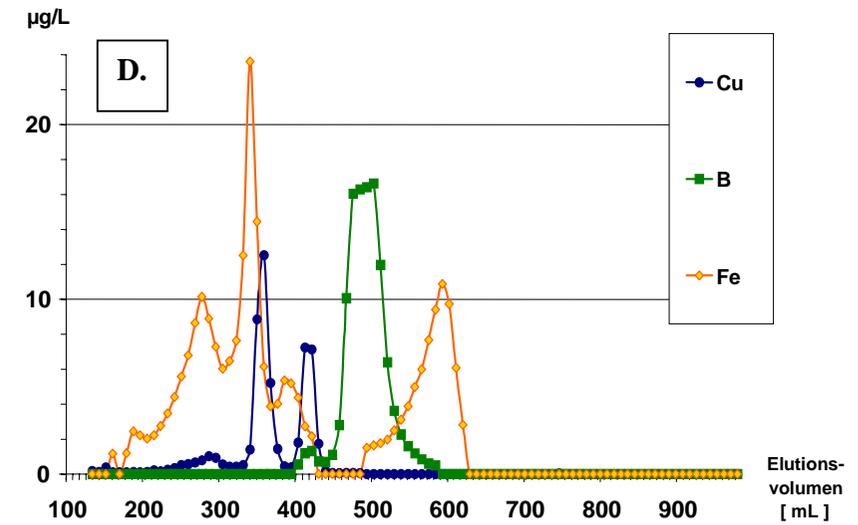
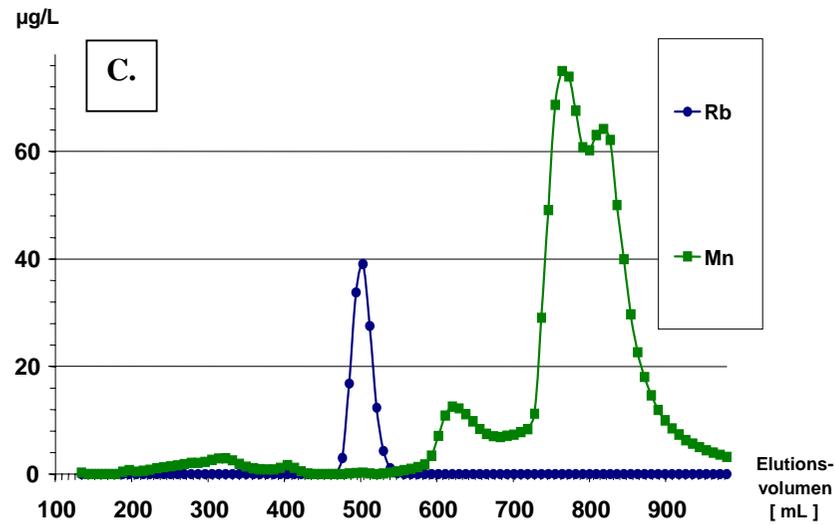
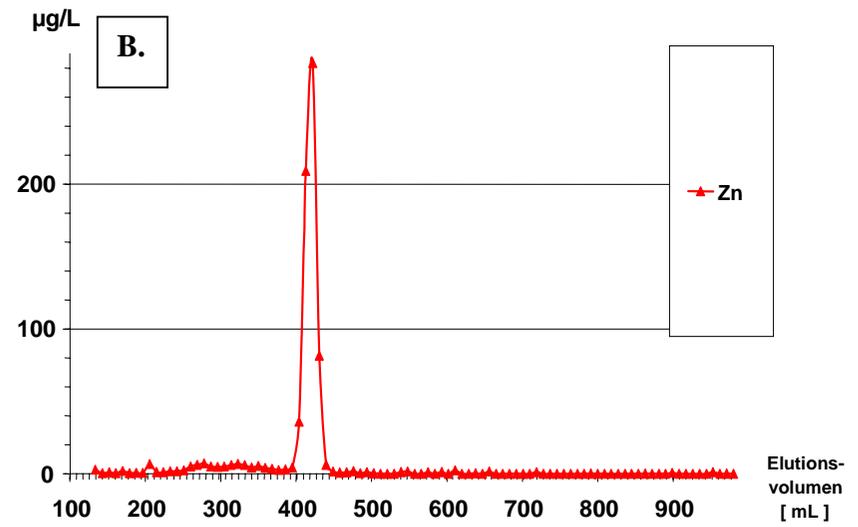
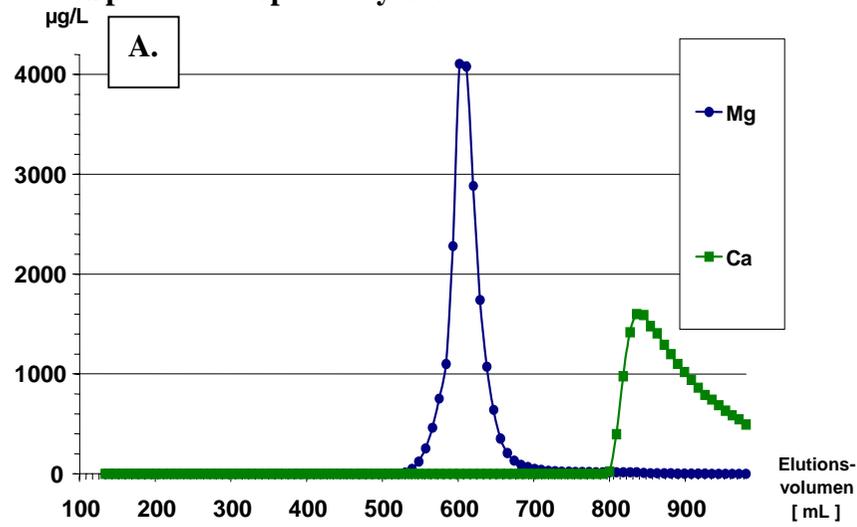


Abbildung 6-7 GPC-Elutionsprofile von verschiedenen Spezies in Kopfsalatcytosol

(Weitere Spezies in Kopfsalatcytosol)

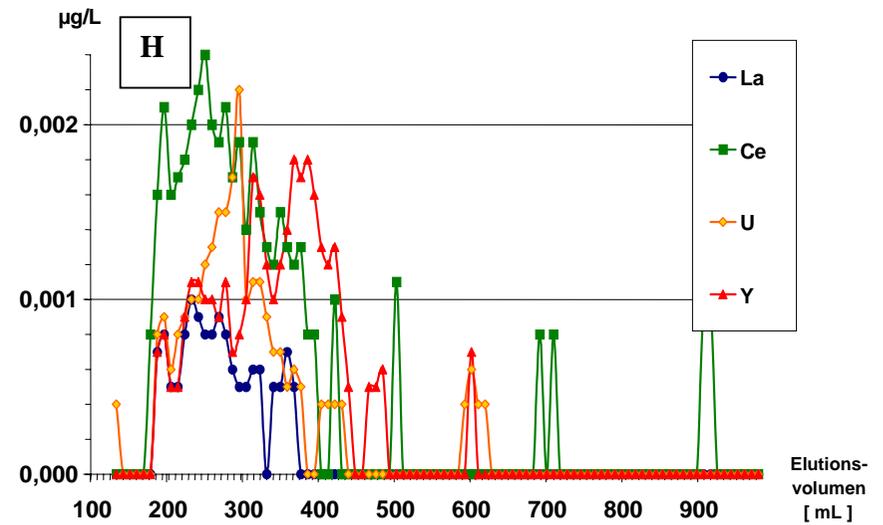
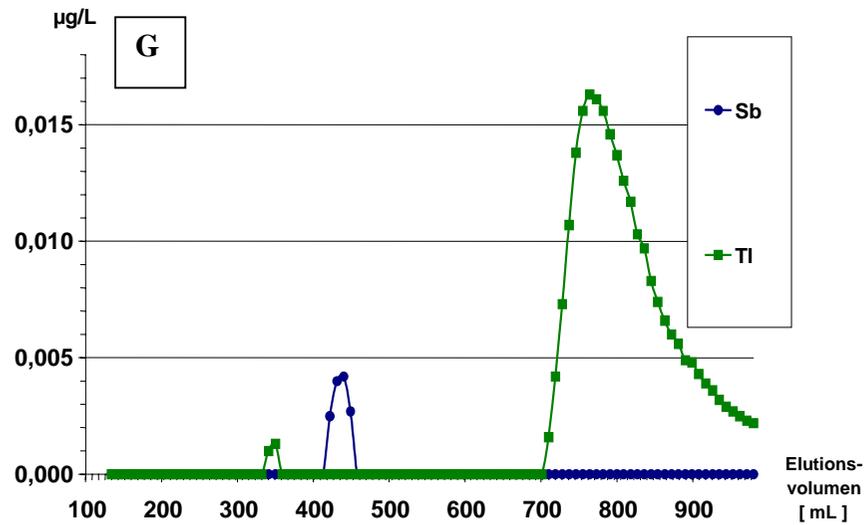
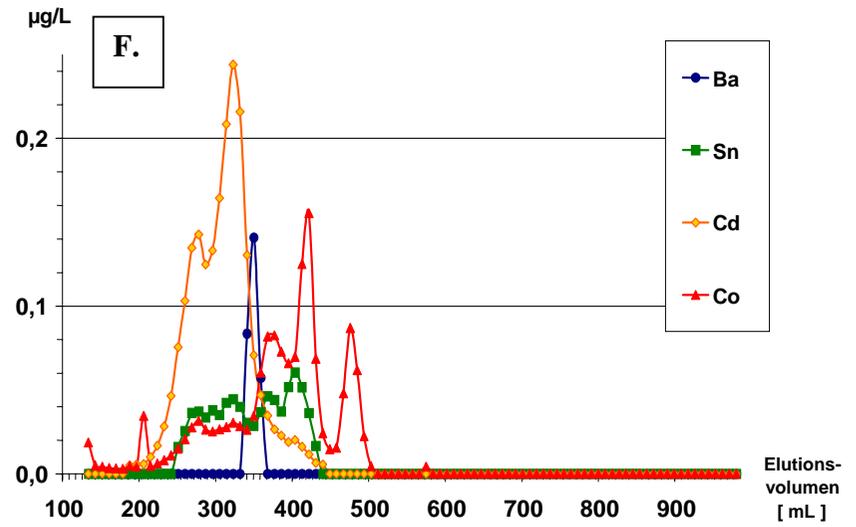
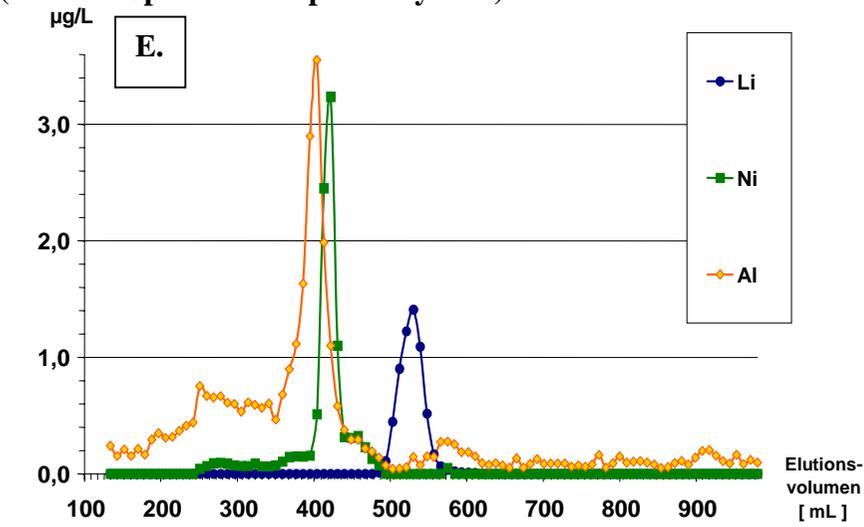


Abbildung 6-8 GPC-Elutionsprofile weiterer Spezies in Kopfsalatcytosol

6.3.5 Spezies in Gurkencytosol

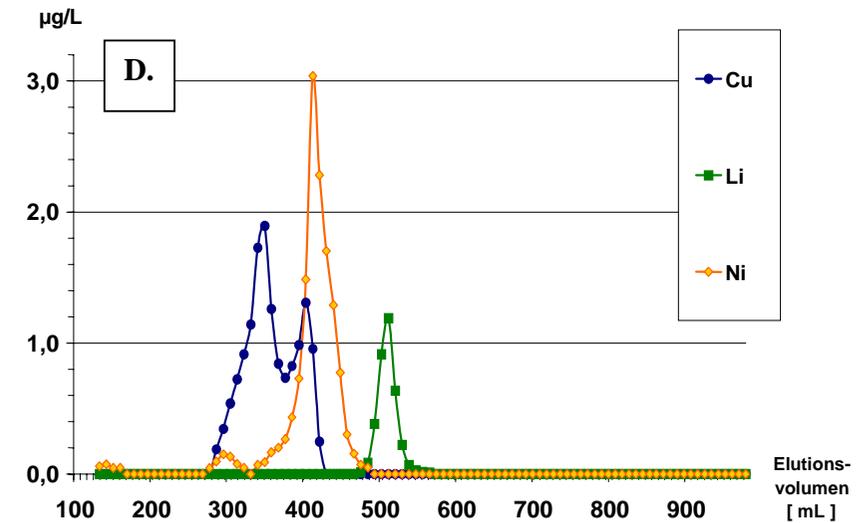
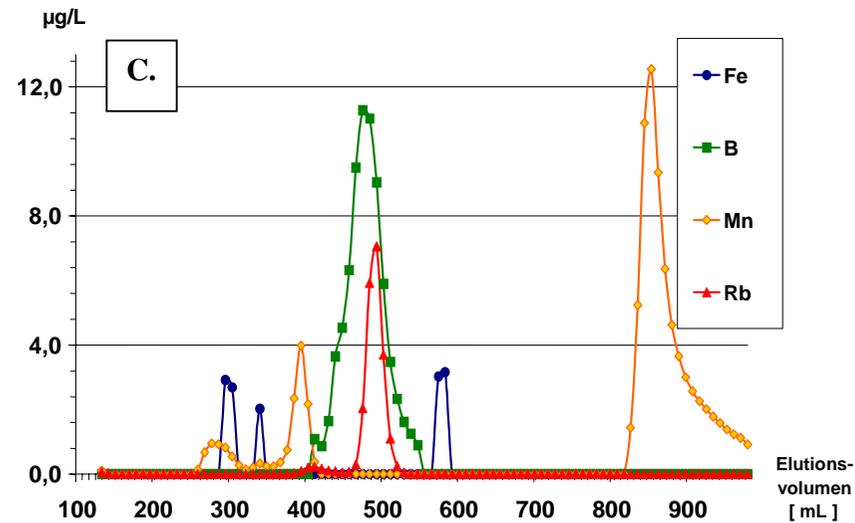
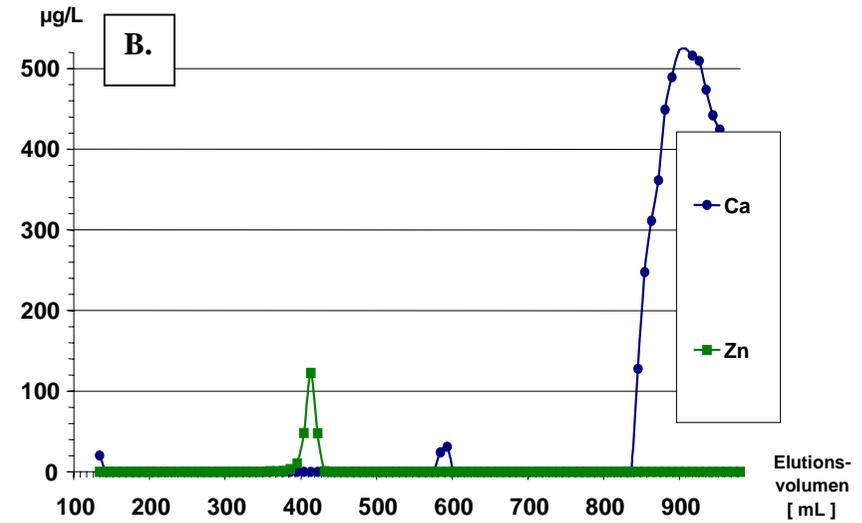
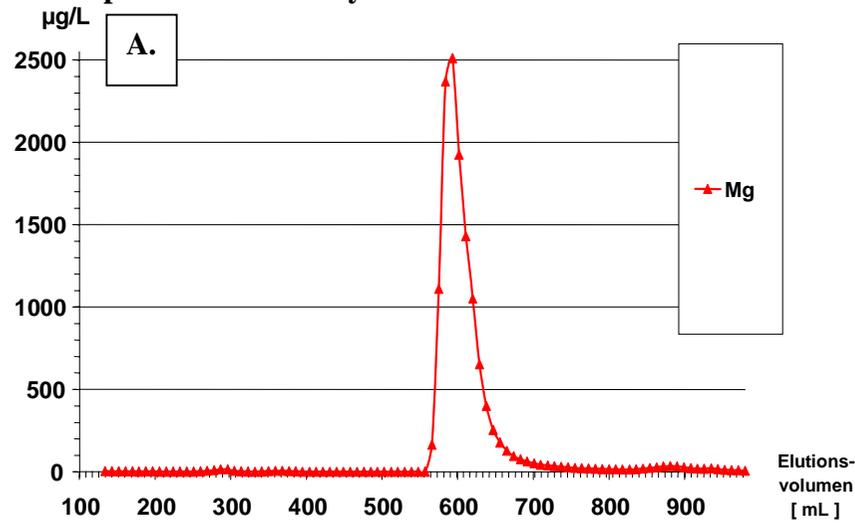


Abbildung 6-9 GPC-Elutionsprofile von verschiedenen Spezies in Gurkencytosol

(Weitere Spezies in Gurkencytosol)

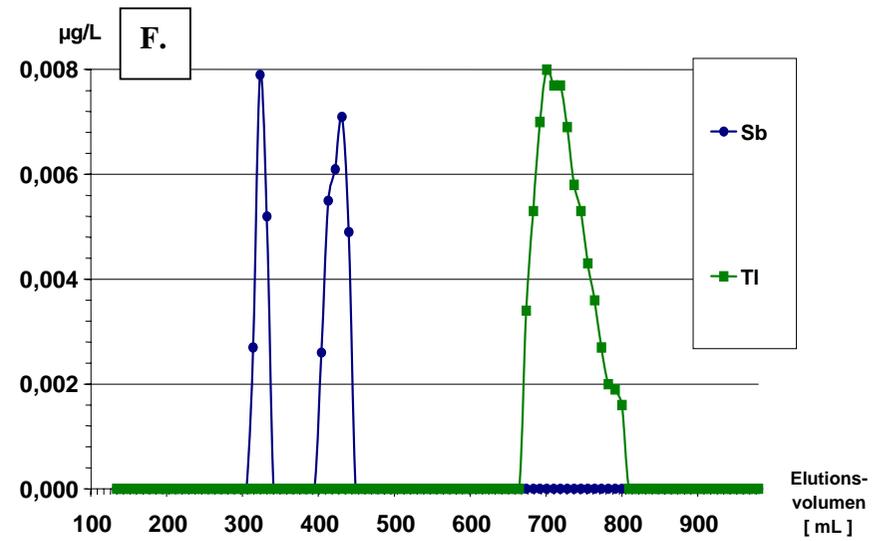
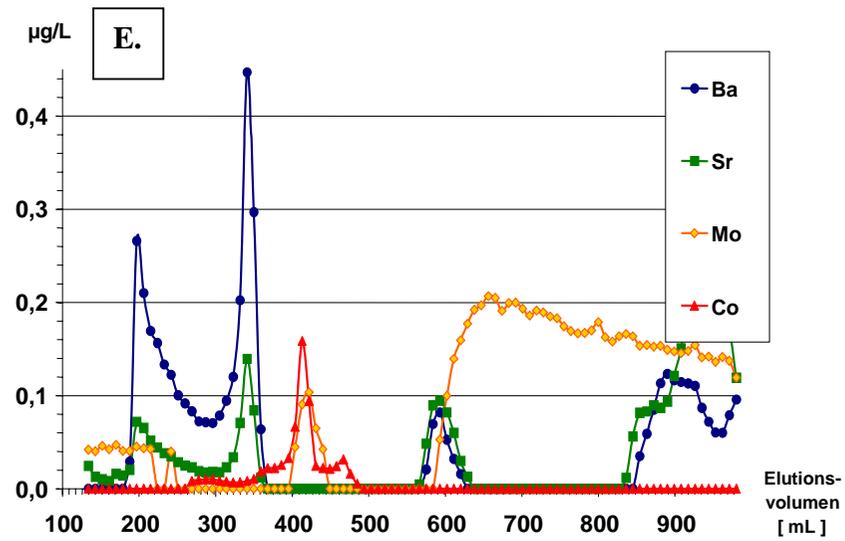


Abbildung 6-10 GPC-Elutionsprofile weiterer Spezies in Gurkencytosol

6.3.6 Spezies in Paprikacytosol

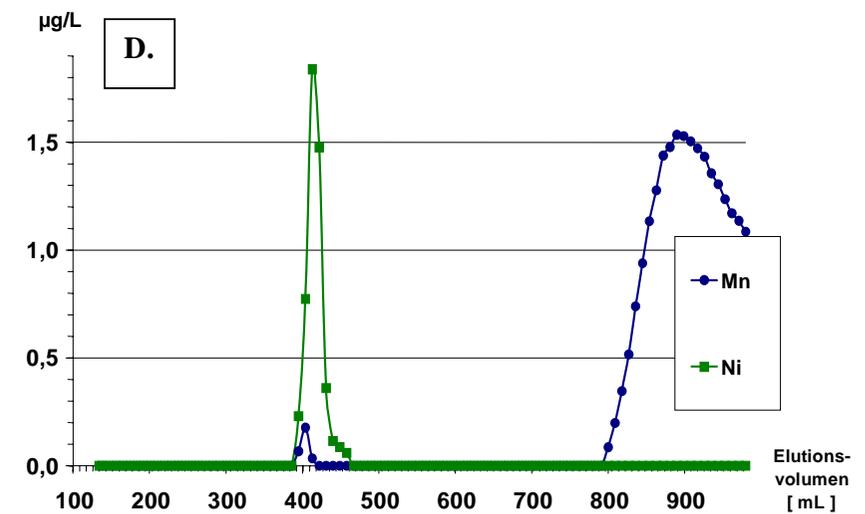
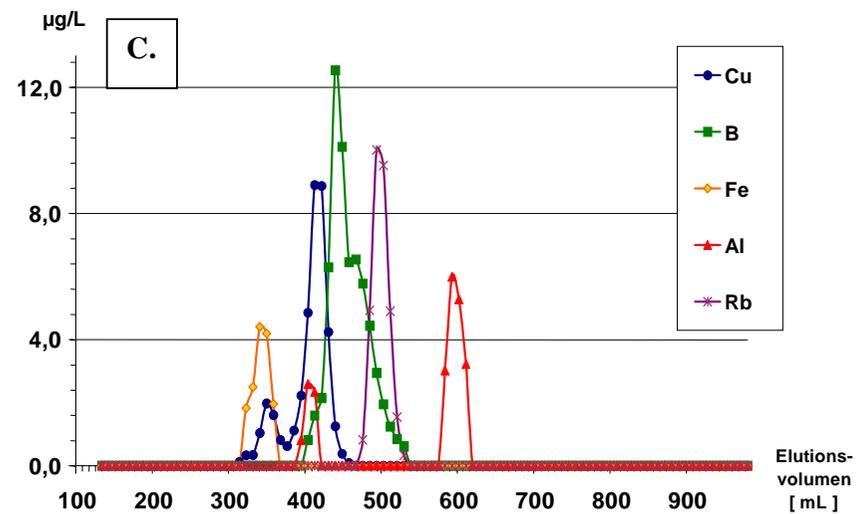
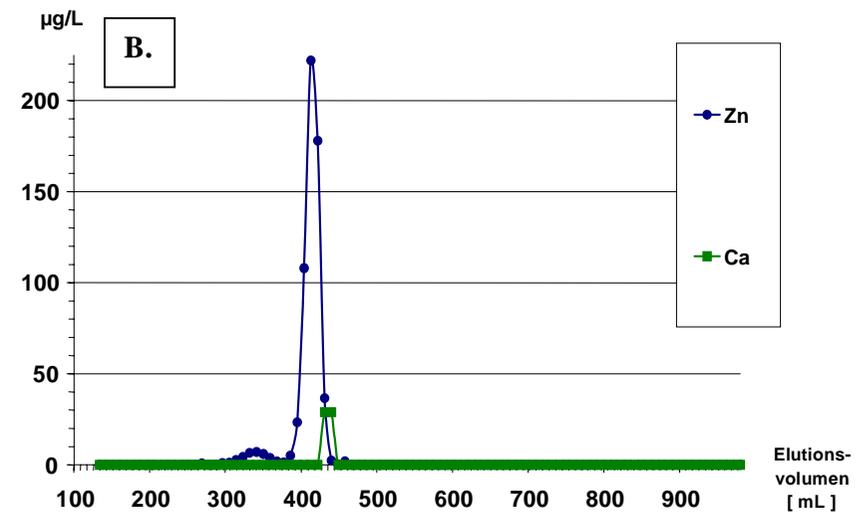
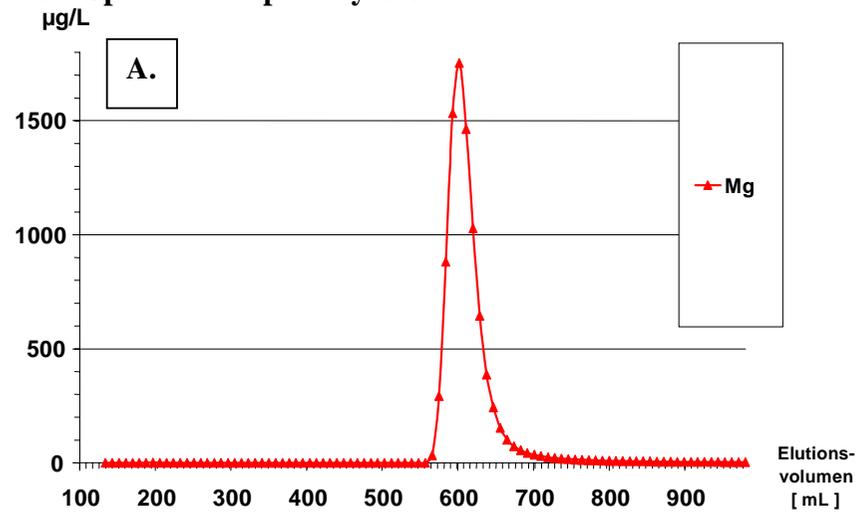


Abbildung 6-11 GPC-Elutionsprofile von verschiedenen Spezies in Paprikacytosol

(Weitere Spezies in Paprikacytosol)

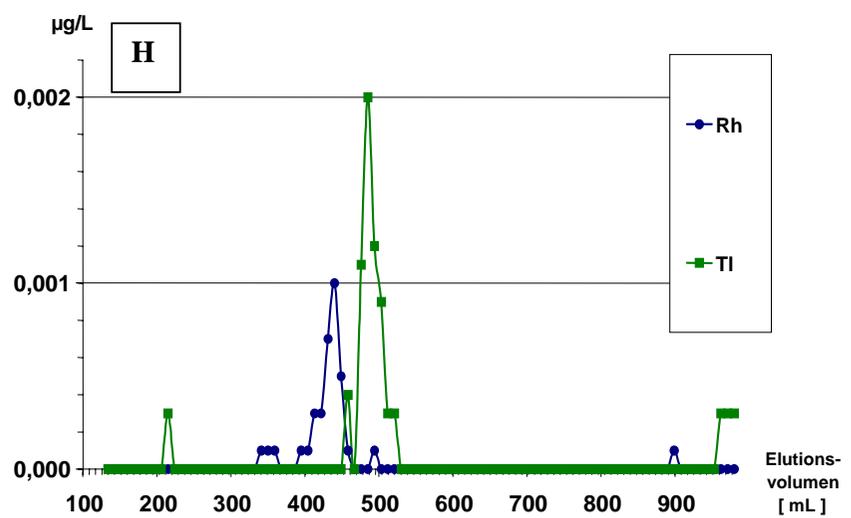
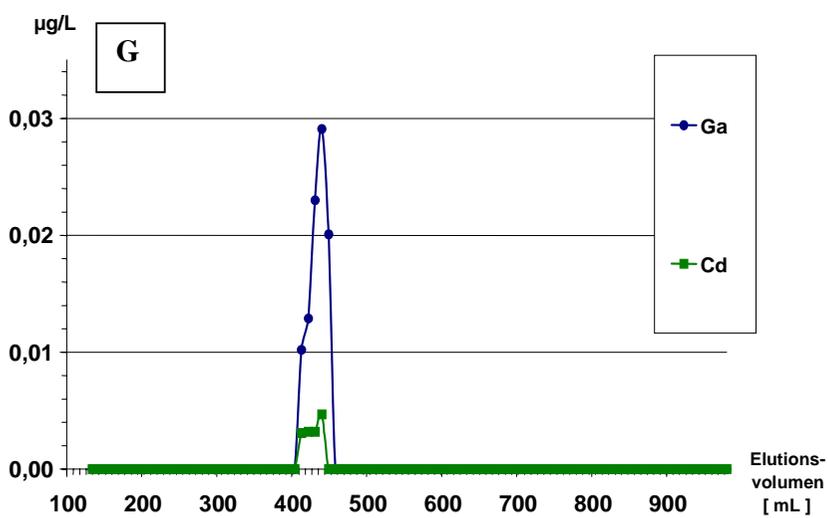
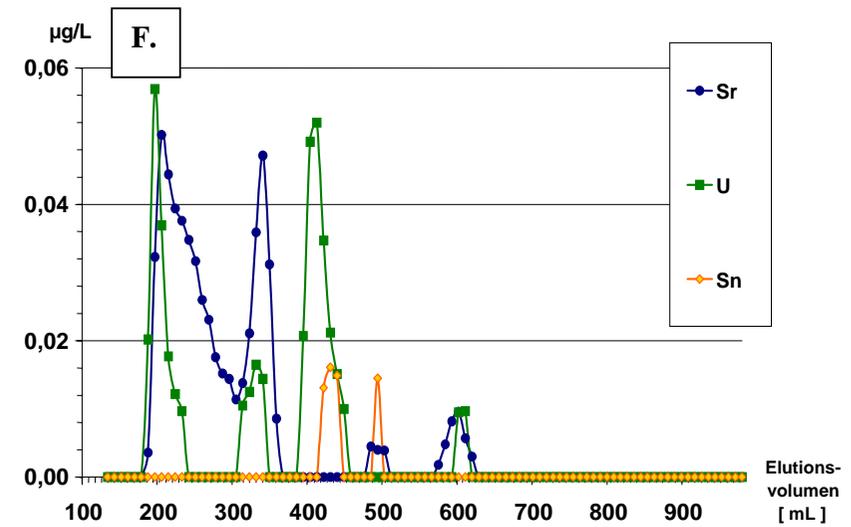
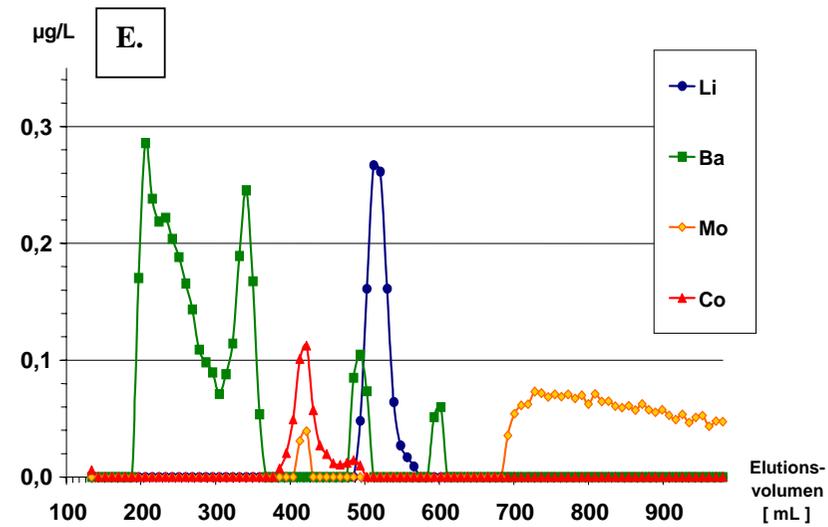


Abbildung 6-12 GPC-Elutionsprofile weiterer Spezies in Paprikacytosol

6.3.7 Spezies in Tomatencytosol

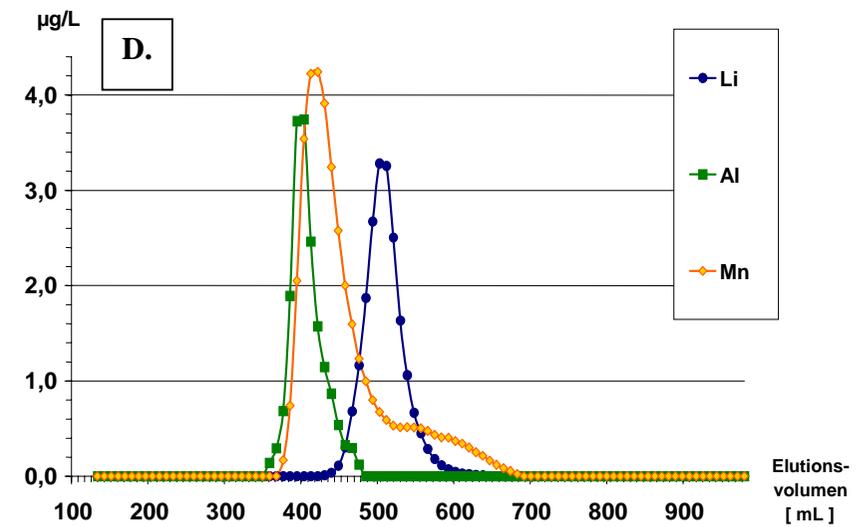
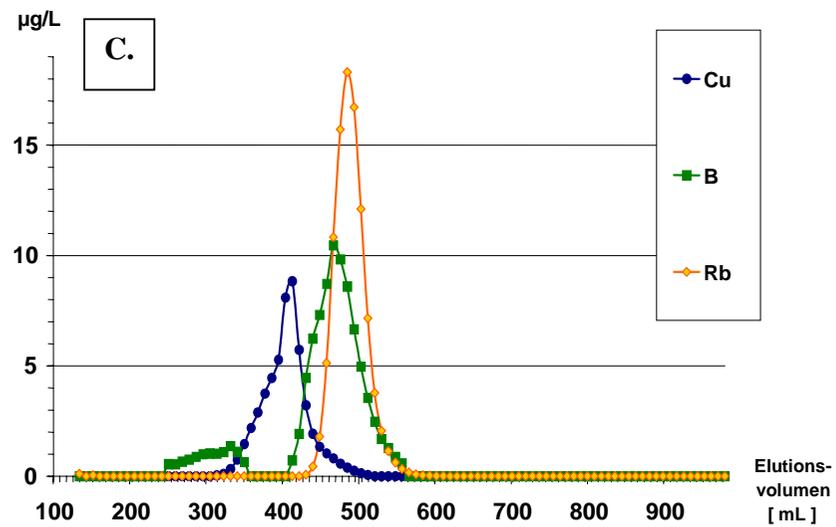
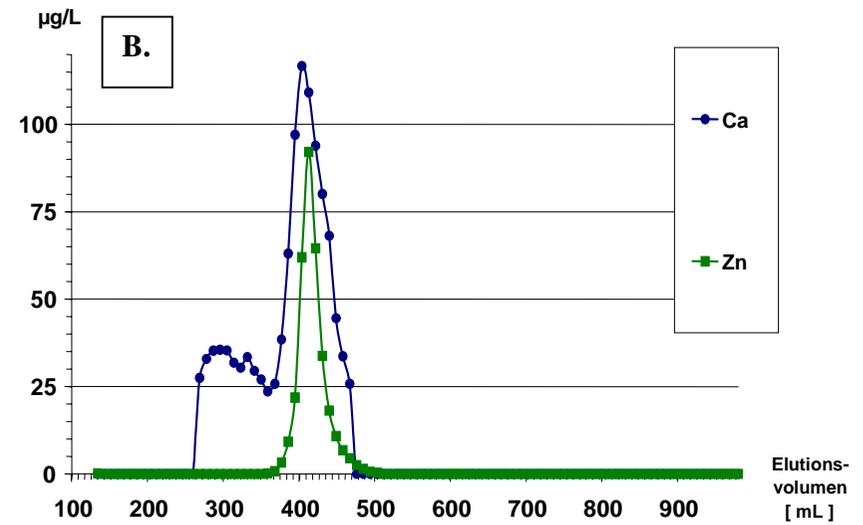
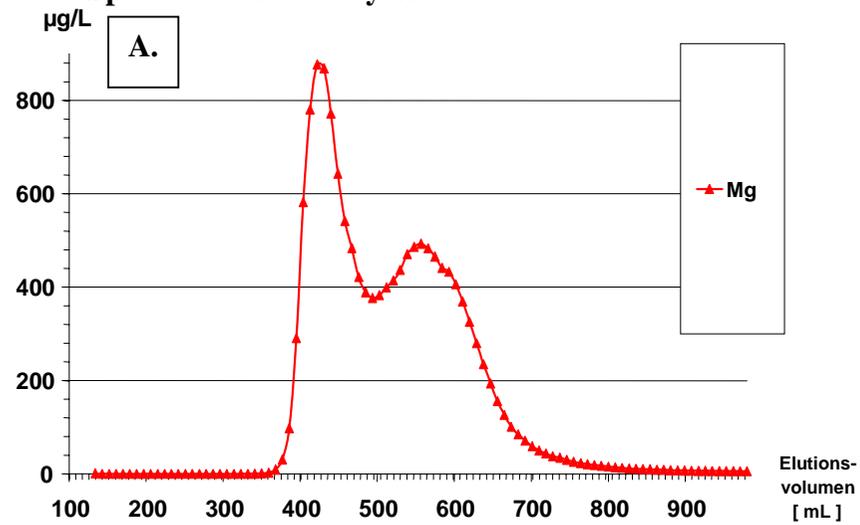


Abbildung 6-13 GPC-Elutionsprofile von verschiedenen Spezies in Tomatencytosol

(Weitere Spezies in Tomatencytosol)

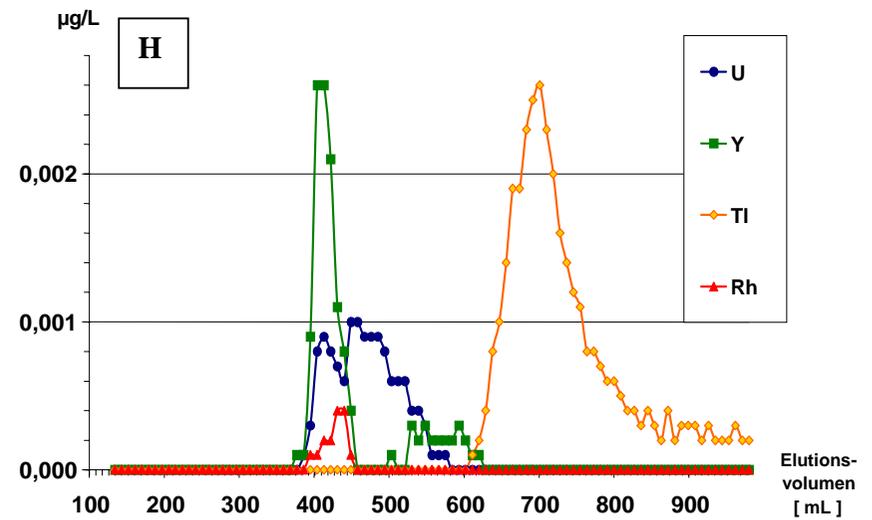
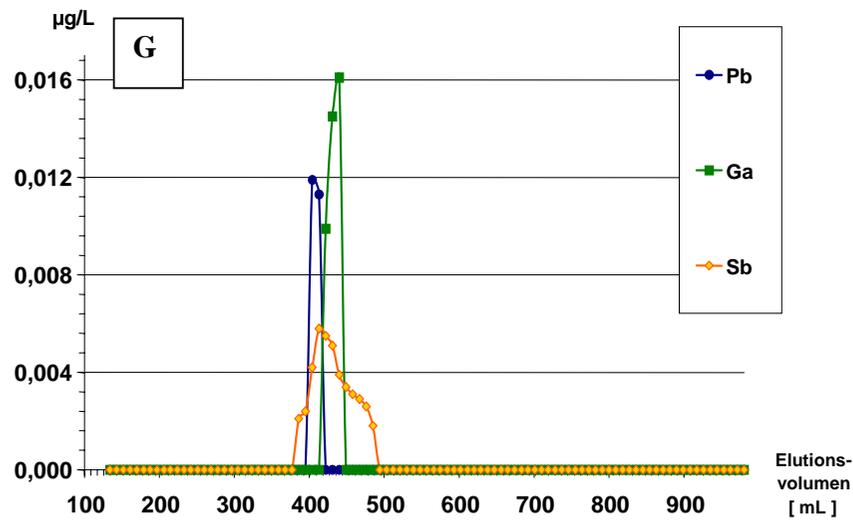
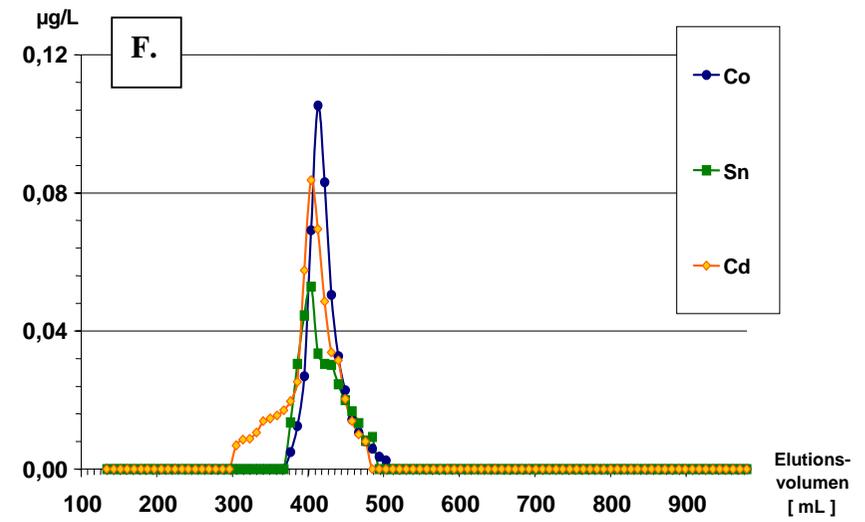
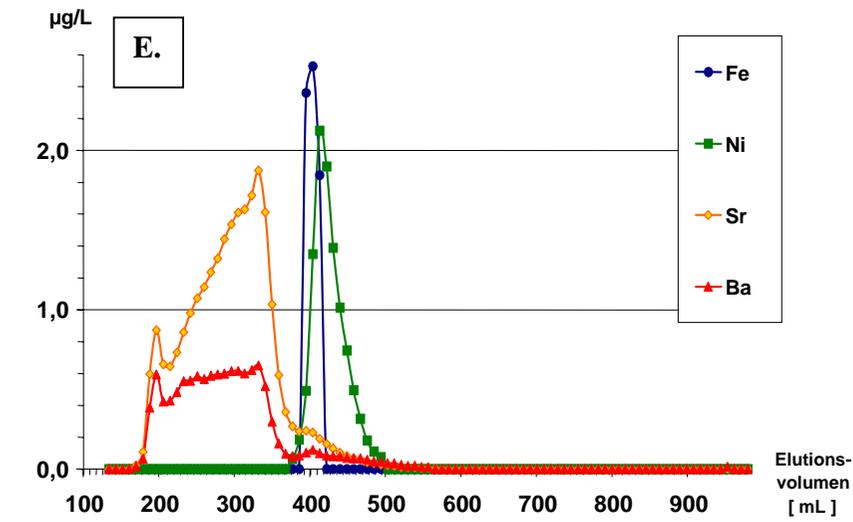


Abbildung 6-14 GPC-Elutionsprofile weiterer Spezies in Tomatencytosol

6.3.8 Spezies in Kohlrabicytosol

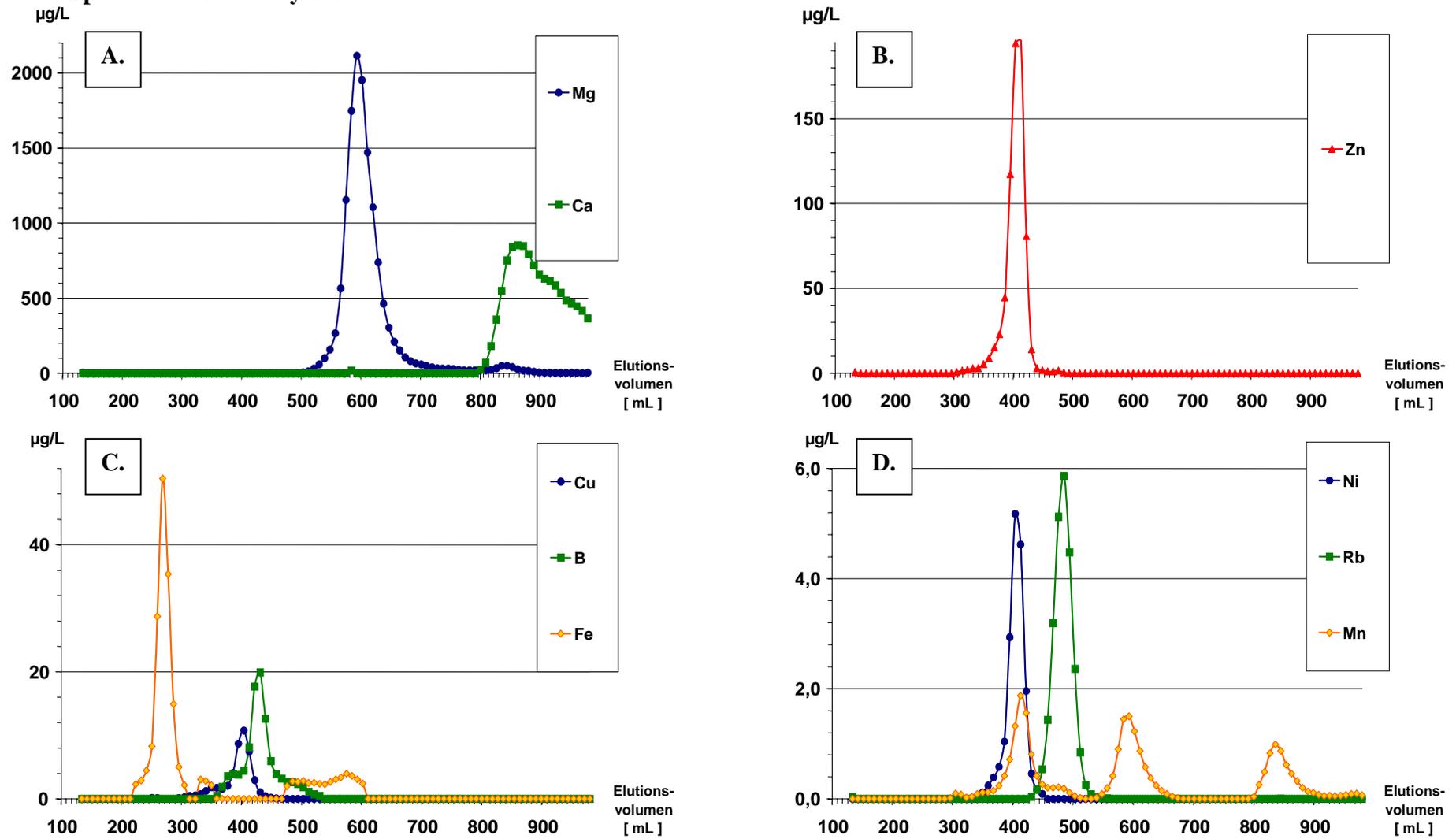


Abbildung 6-15 GPC-Elutionsprofile von verschiedenen Spezies in Kohlrabicytosol

(Weitere Spezies in Kohlrabicytosol)

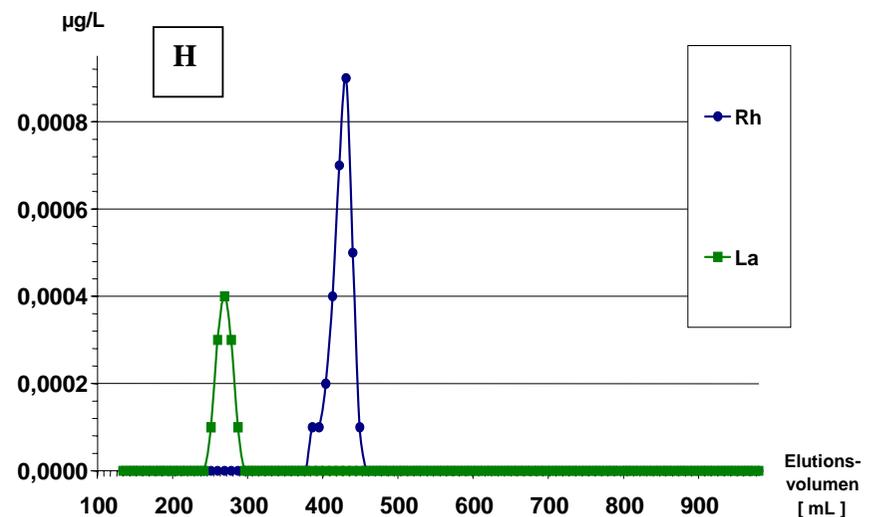
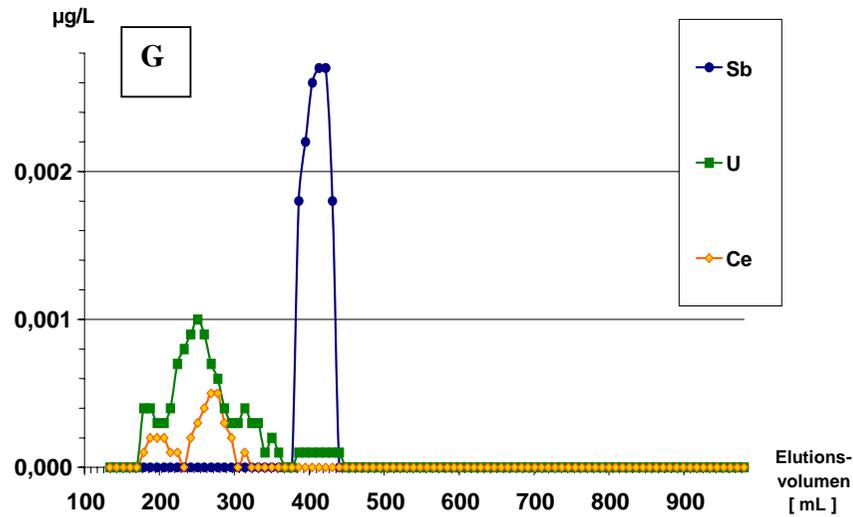
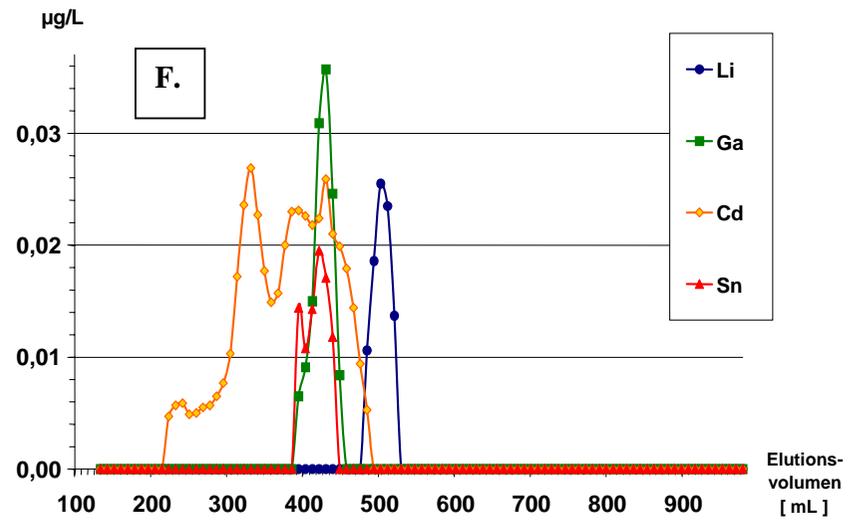
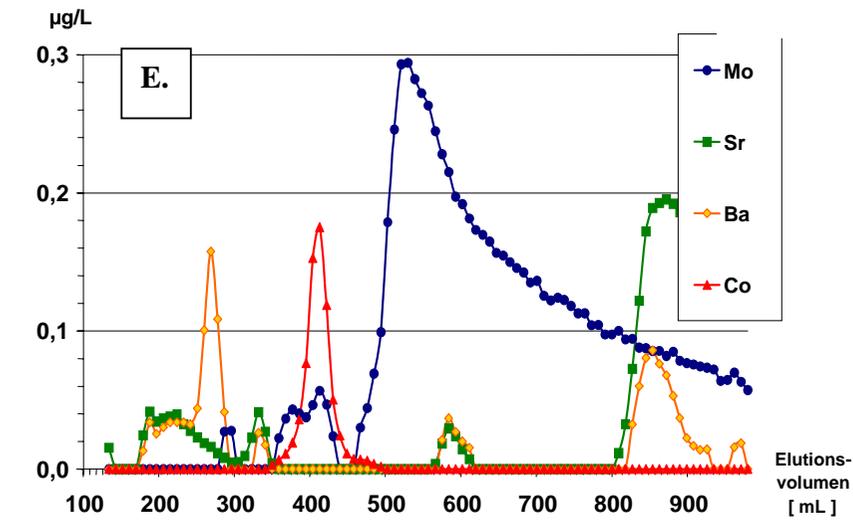


Abbildung 6-16 GPC-Elutionsprofile weiterer Spezies in Kohlrabicytosol

6.3.9 Spezies in Möhrencytosol

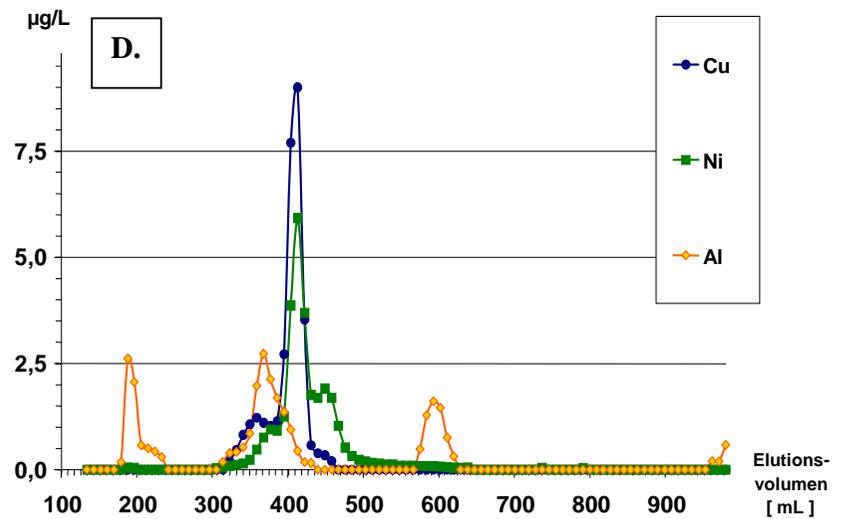
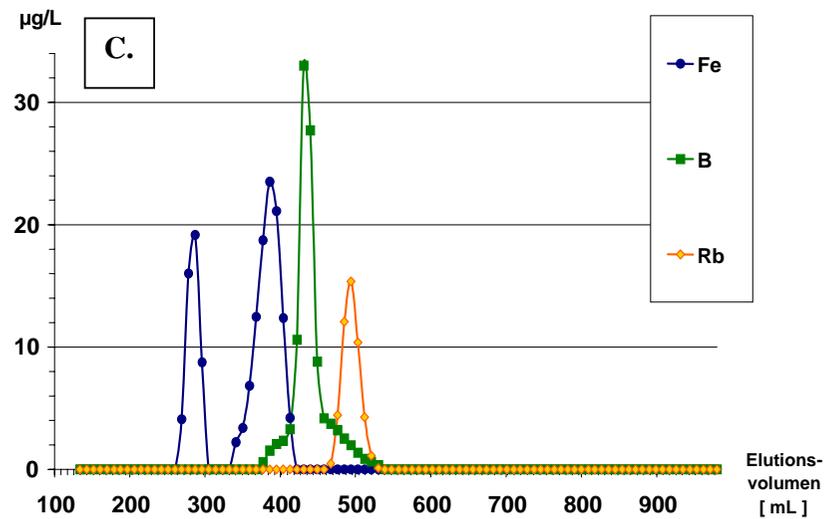
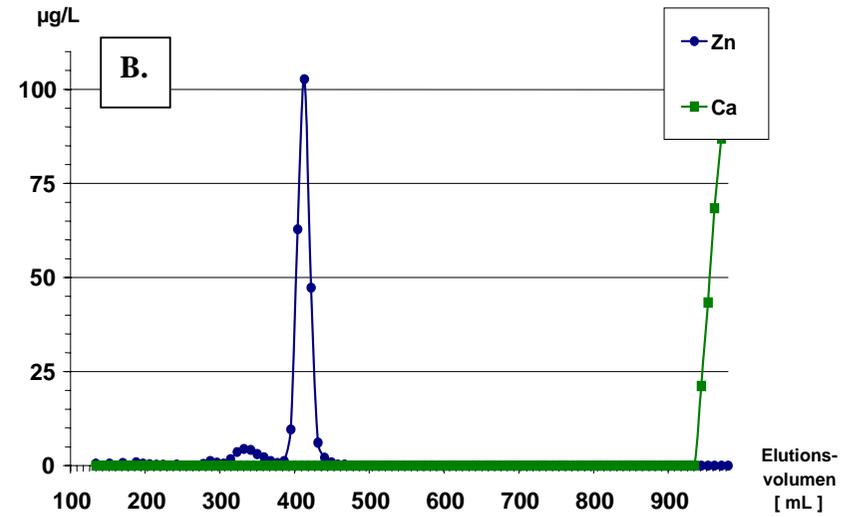
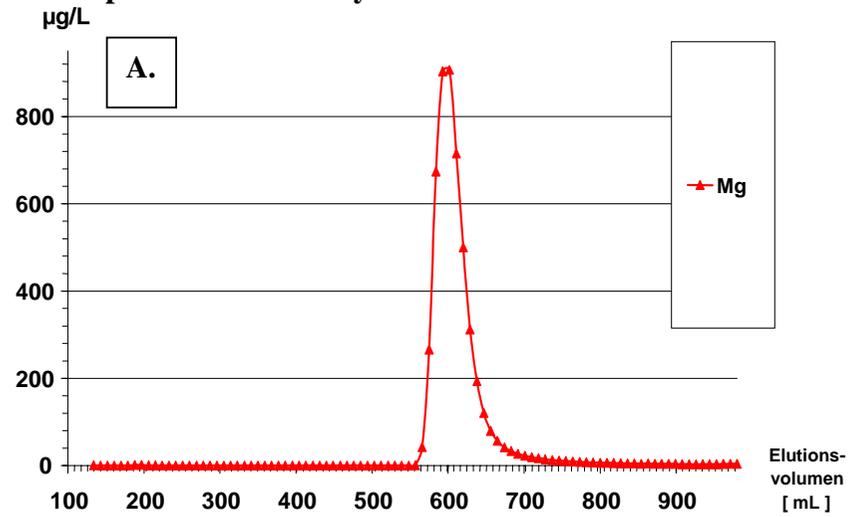


Abbildung 6-17 GPC-Elutionsprofile von verschiedenen Spezies in Möhrencytosol

(Weitere Spezies in Möhrencytosol)

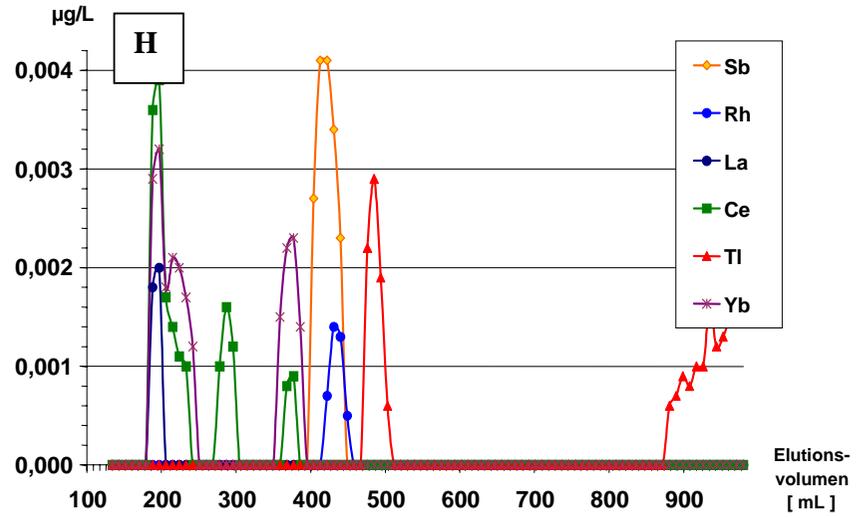
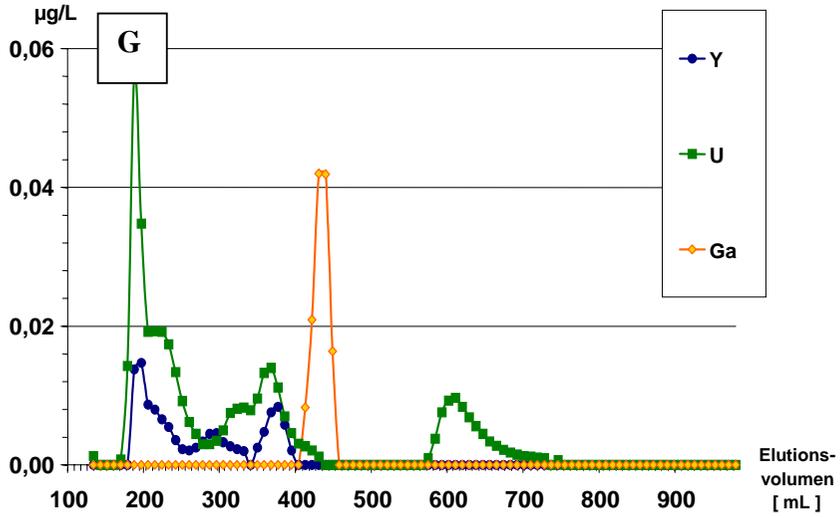
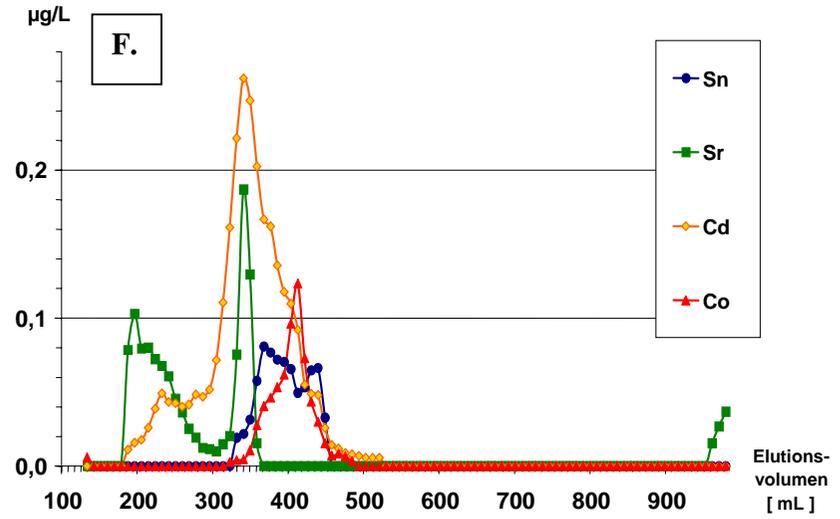
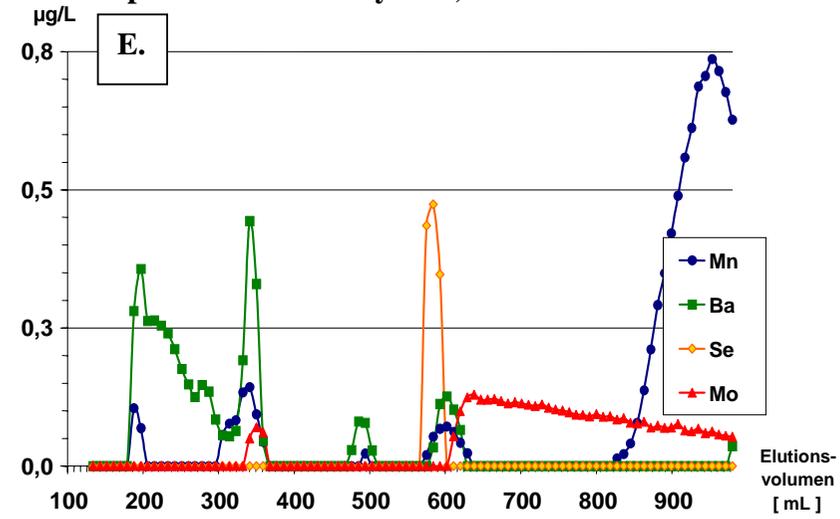


Abbildung 6-18 GPC-Elutionsprofile weiterer Spezies in Möhrencytosol

6.3.10 Spezies in Arabidopsiszytosol

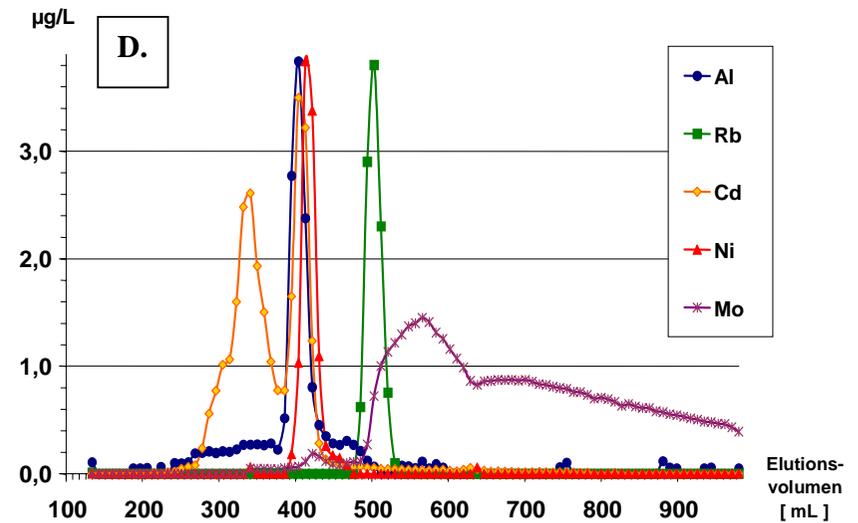
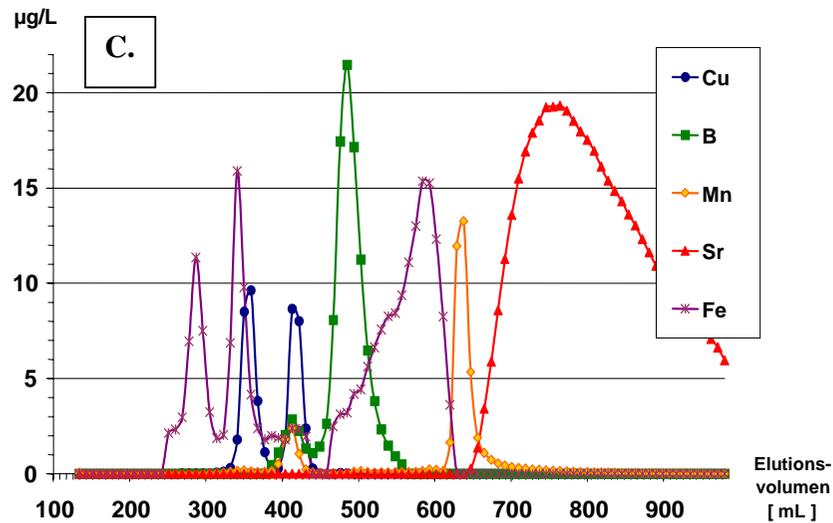
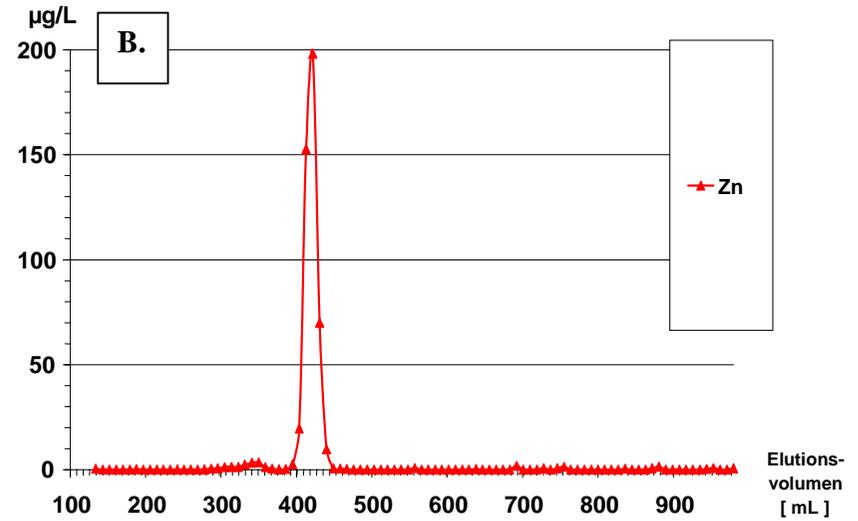
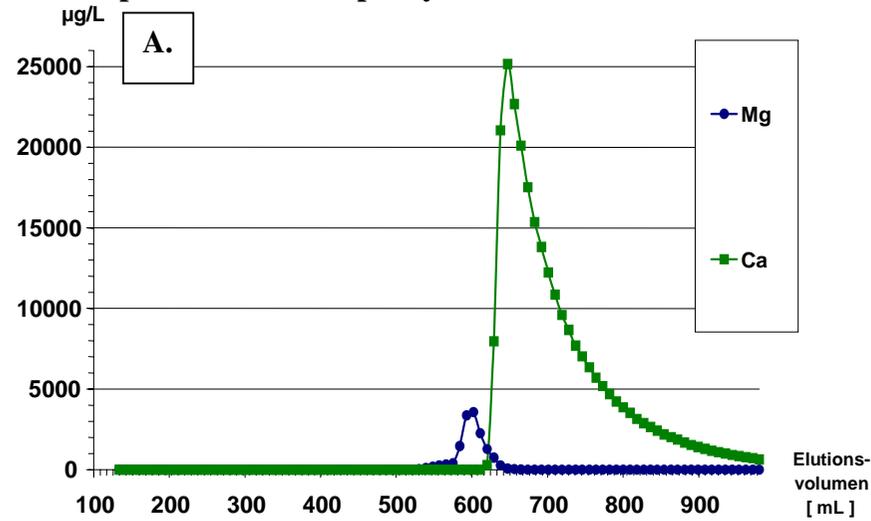


Abbildung 6-19 GPC-Elutionsprofile von verschiedenen Spezies in Arabidopsiszytosol

(Weitere Spezies in Arabidopsiszytosol)

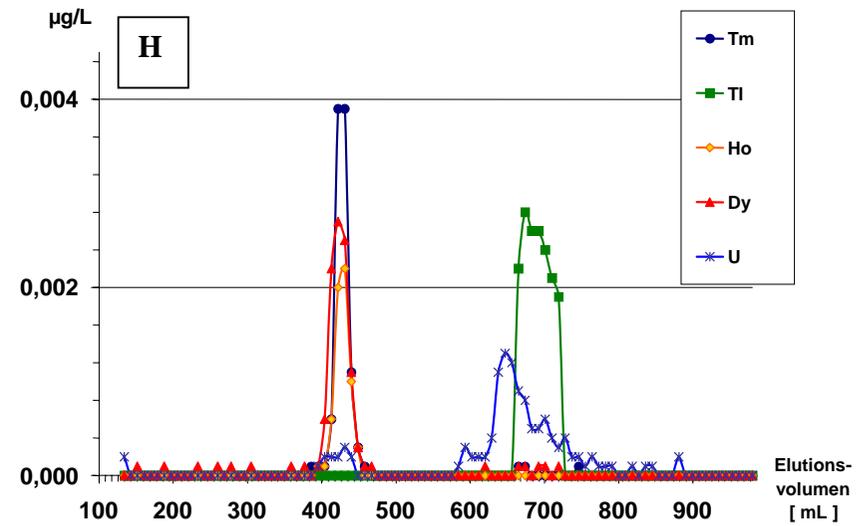
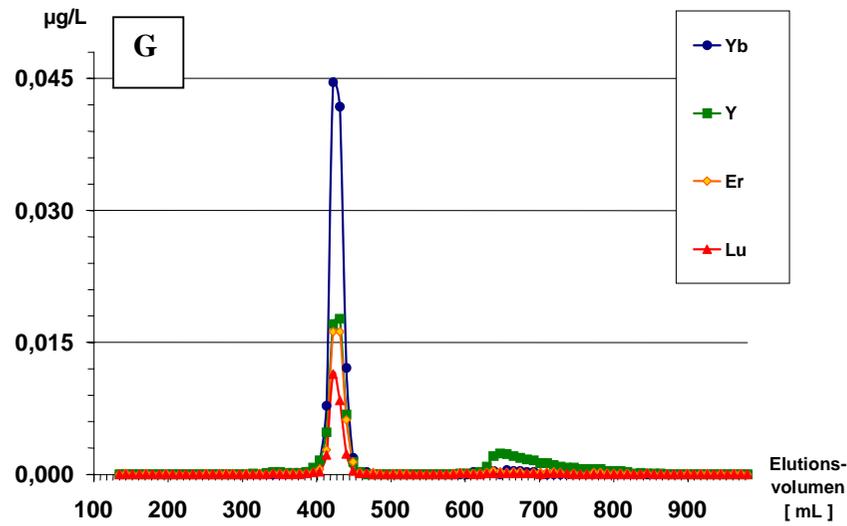
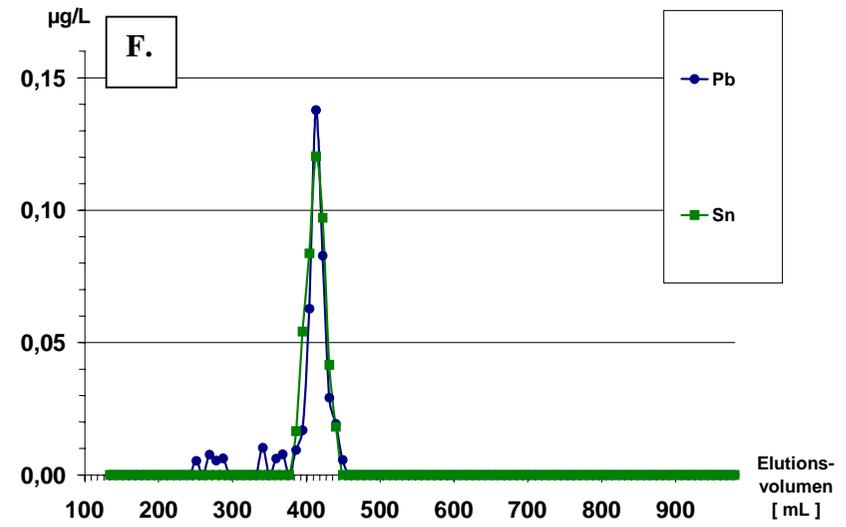
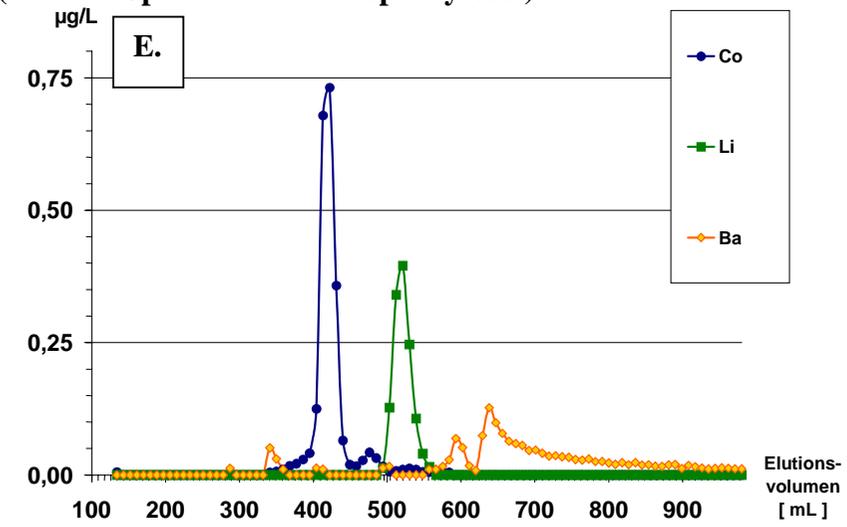


Abbildung 6-20 GPC-Elutionsprofile weiterer Spezies in Arabidopsiszytosol

6.4 Zusammenstellung der Spezies nach ihrem gebundenen Element

Tabelle 6-4 **Bezug :** Kap.3.3.3; Folgende Tabelle zeigen die Elutionsvolumen der Peakmaximen der einzelnen Elementspezies in den GPC-Fractionen. Die Schätzung der Molekülgröße der Spezies erfolgt nur bei Spezies, deren Peakform die ideale chromatographische Peak entspricht (ohne Tailing-Effekte) und dessen Elutionsvolumen innerhalb der kalibrierten Massenbereich befindet (280 mL < V_e < 410 mL).

	<u>Elutionsvolumen [mL]</u>										<u>Molekulargewicht [kDa]</u>									
	<u>Arb.</u>	<u>Esb.</u>	<u>Edv.</u>	<u>Fds.</u>	<u>Grk.</u>	<u>Klb.</u>	<u>Kpf.</u>	<u>Mhr.</u>	<u>Ppr.</u>	<u>Tmt.</u>	<u>Arb.</u>	<u>Esb.</u>	<u>Edv.</u>	<u>Fld.</u>	<u>Grk.</u>	<u>Klb.</u>	<u>Kpf.</u>	<u>Mhr.</u>	<u>Ppr.</u>	<u>Tmt.</u>
Li	521	512	512	512	512	503	530	512	512	503										
Rb	503	494	494	485	494	485	503	494	494	485										
Mg	602	620	602	584	593	593	602	602	602	422										35
Ca	647		953	692	908	863	836	980	440	404										50
Sr	764	332	935	854	935	971		341	206	332		250						200		250
		629		341	341	341		197	341				200	200	200				200	
				404	593	593			602				50							
					197				494											
Ba	638	332		476	341	269	350	341	206	332		250		200		167	200			250
	593				206	332		206	341							250			200	
	341				593	584		602	494		200									
	503					854		494	602											
	404										50									
	287										700									

(Forts. Tabelle 6.4)

	<u>Elutionsvolumen [mL]</u>										<u>Molekulargewicht [kDa]</u>										
	<u>Arb.</u>	<u>Esb.</u>	<u>Edv.</u>	<u>Fds.</u>	<u>Grk.</u>	<u>Klb.</u>	<u>Kpf.</u>	<u>Mhr.</u>	<u>Ppr.</u>	<u>Tmt.</u>	<u>Arb.</u>	<u>Esb.</u>	<u>Edv.</u>	<u>Fld.</u>	<u>Grk.</u>	<u>Klb.</u>	<u>Kpf.</u>	<u>Mhr.</u>	<u>Ppr.</u>	<u>Tmt.</u>	
B	485	476	467	431	476	431	503	431	440	467											
	413			476					467		40										
Al	404			404			404	368	593	404	50		50			50	110			50	
								188	404										50		
								593													
Se				557				584													
Ga						431		431	440	440											
Sb		413	422	431	323	413	440	413	296			40	35		300	40		40	550		
				440																	
Pb	413		404	413						404	40		50	40							50
Tl	674	746			701	746	764	485	485	701											
Sn	413		413	404		422	665	368	431	404	40		40	50		35		110		50	
Mn	638	323	899	674	854	413	764	953	890	422		300				40				35	
	413	377	314	593	395	593	818	602	404		40	90	375		60				50		
		629	404	413	278	836	620	341					50	40				200			
			494					188													
Fe	341	278		341	584	269	341	386	341	404	200			200			200	75	200	50	
	287			575			386	287			700						75	700			
	584						593														
							278														
Co	422	413	413	422	413	413	422	413	422	413	35	40	40	35	40	40	35	40	35	40	
	476		467	476	467		368		485								110				
							476														

(Forts. Tabelle 6.4)

	<u>Elutionsvolumen [mL]</u>										<u>Molekulargewicht [kDa]</u>									
	<u>Arb.</u>	<u>Esb.</u>	<u>Edv.</u>	<u>Fds.</u>	<u>Grk.</u>	<u>Klb.</u>	<u>Kpf.</u>	<u>Mhr.</u>	<u>Ppr.</u>	<u>Tmt.</u>	<u>Arb.</u>	<u>Esb.</u>	<u>Edv.</u>	<u>Fld.</u>	<u>Grk.</u>	<u>Klb.</u>	<u>Kpf.</u>	<u>Mhr.</u>	<u>Ppr.</u>	<u>Tmt.</u>
Ni	413	413	413	422	413	404	422	413	413	413	40	40	40	34	40	50	34	40	40	40
							458	449												
Cu	413	404	413	359	350	404	359	413	413	413	40	50	40	137	167	50	137	40	40	40
	359	359	359	413	413	359	359	359	359		140	140	140	40	40	140	140	140	140	
Zn	422	404	413	422	413	413	422	413	413	413	35	50	40	35	40	40	35	40	40	40
Mo	566	791	323	476	656	530	323	638	728	431			300			300				
Cd	404	323	404	305		332	323	341	440	404	50	300	50	450		250	300	200		50
	341	368	323	332		431	278				200	110	300	250						
		206		413		386								40		75				
				215																
Y	431		386	404				197		404			75	50						50
Rh					431	431		431	440	431										
La						269		197												
Ce						269		197												
Dy	422										35									
Ho	422										35									
Er	422			404							35		50							
Yb	422			404							35		50							
Tm	422			404							35		50							
Lu	422			404							35		50							
U	647		188	278		251	296	188	197	449							550			
									413	413									40	40

(Forts. Tabelle 6.4)

MW (kDa)	<u>Arb.</u>	<u>Esb.</u>	<u>Edv.</u>	<u>Fld.</u>	<u>Grk.</u>	<u>Klb.</u>	<u>Kpf.</u>	<u>Mhr.</u>	<u>Ppr.</u>	<u>Tmt.</u>
25 - 50	Co 34	Co 41	Co 41	Co 34	Co 41	Co 41	Co 34	Co 41	Co 34	Co 41
	Ni 41	Ni 41	Ni 41	Ni 34	Ni 41	Ni 50	Ni 34	Ni 41	Ni 41	Ni 41
	Cu 41	Cu 50	Cu 41	Cu 41	Cu 41	Cu 50	Cu 41	Cu 41	Cu 41	Cu 41
	Zn 34	Zn 50	Zn 41	Zn 34	Zn 41	Zn 41	Zn 34	Zn 41	Zn 41	Zn 41
	Al 50			Al 50		B 27	Al 50	B 27	Al 50	Al 50
	B 41			B 27		Mn 41	Sb 22	Ga 27	B 22	Ca 50
	Ba 50		Mn 50	Mn 41		Ga 27		Sb 41	Ca 22	Fe 50
	Mn 41		Cd 50	Cd 41		Cd 27			Mn 50	Ga 22
	Cd 50		Sn 41	Sb 27	Mn 61	Sn 34			Ga 22	Mg 34
	Sn 41		Sb 34	Sn 50	Sb 22	Sb 41			Cd 22	Mn 34
	Pb 41	Sb 41	Pb 50	Sr 50					Sn 27	Mo 27
				Pb 41						Cd 50
	Dy 34									Pb 50
	Er 34			Er 50	Rh 27	Rh 27		Rh 27	Rh 22	Sn 50
	Ho 34			Lu 50						
	Lu 34			Tm 50						
	Tm 34			Y 50						
	Y 27			Yb 50						
	Yb 34									
112 - 165	Cu 137	Cd 112	Cu 137	Cu 137	Cu 167	Cu 137	Co 112	Al 112	Cu 137	
		Cu 137					Cu 137	Sn 112	Ba 205	
165 - 250	Ba 205	Ba 250		Fe 205	Ba 205	Sr 205	Ba 167	Ba 205		Ba 250
	Cd 205	Sr 250		Sr 205	Sr 205	Ba 250	Fe 205	Cd 205		Sr 250
	Fe 205			Cd 250		Cd 250		Mn 205		
								Sr 205		

6.5 MALDI-Ergebnisse

Tabelle 6-5 Bezug: Kap.3.4.7 ; Trypsin-InGel-Verdau und erhaltene Massenfragmente bei anschließender MALDI-TOF-MS Untersuchung des Arabidopsisycytosols. Aufgelistet sind die Peptidfragmente der 18 mit dem Enzym Trypsin verdauten Proteinspots aus der 2D-SDS-Gelelektrophorese.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11						
	907,5	907,5	909,0	1846,7	915,7	2228,1	951,2	1968,9	951,3	1447,8	951,3	951,3	1021,5	951,3	942,5	1940,9	2408,0
	935,5	914,4	948,4	1885,8	933,8	2230,2	994,2	1987,0	994,3	1546,8	1010,3	994,3	1407,7	994,3	951,3	1962,9	2419,2
	951,3	930,4	951,2	1947,9	951,3	2239,1	1010,2	2052,9	1010,3	1568,8	1021,6	1010,3	1421,7	1010,3	992,6	1968,9	2435,1
	952,5	935,5	1010,3	2096,9	994,3	2383,9	1066,0	2063,9	1116,6	1788,9	1193,6	1021,5	1449,4	1021,5	994,3	1979,8	2441,2
	994,3	951,3	1232,6	2258,0	1010,3	2662,3	1116,5	2083,0	1228,7	1936,0	1424,8	1407,7	1465,8	1407,6	1010,3	1987,0	2447,1
	1010,3	1009,5	1314,7	2351,9	1021,5	2691,2	1228,6	2211,0	1231,7	1941,0	1465,8	1424,8	1466,3	1424,7	1096,6	2003,0	2452,0
	1365,5	1333,5	1339,6	2383,9	1155,3	2721,3	1249,6	2226,0	1247,7	1987,1	1466,4	1465,8	1467,8	1465,7	1126,5	2009,0	2478,2
	1548,8	1351,5	1551,7	2410,0	1407,6	2748,2	1324,6	2239,1	1249,7	2239,2	1479,8	1466,3	1479,8	1466,3	1155,3	3347,5	2523,2
	1570,8	1352,1	1584,7	2457,2	1707,8	2807,2	1424,7	2261,0	1250,2	2419,3	1487,8	1479,8	1487,7	1479,7	1179,6	3393,7	2564,2
	1663,8	1373,5	1707,7	2469,1	1811,8	2914,5	1447,7	2340,1	1334,7	2564,2	1941,0	1487,7	2035,9	1487,7	1282,7	3599,6	2663,3
	1685,9	1524,7	1735,8	2477,0	1940,9	3338,7	1546,7	2407,9	1424,8	2807,3		1940,9	2052,9	2239,1	1316,7	2083,0	2807,2
	2080,9	1548,8	1741,7	2501,0	2039,9	3635,8	1561,7	2419,2		2914,5		1987,1	2074,9	2807,2	1365,6	2158,1	2825,2
	2086,0	1570,8	1763,8	2766,2	2066,0	3854,5	1568,7	2478,2				2052,9	3854,8		1416,5	2211,1	2914,4
	2102,9	1665,8	1791,7	2831,1	2084,0	3855,7	1584,7	2564,0				2239,1	3858,7		1424,7	2221,1	2935,3
	2108,0	2081,0	1827,7	2914,3	2211,1		1788,8	2807,2				2807,3			1426,7	2225,1	3101,4
	2126,0	2102,9	1838,9	3192,4	2225,1		1802,9	2825,2				2914,5			1475,7	2239,1	3102,5
							1866,8	2914,4				3854,8			1748,9	2261,1	3313,2
							1935,9	3346,5							1791,7	2297,1	3346,7
							1940,9	3855,7							1802,9	2383,9	

(Forts. Tabelle 6.5)

Nr.	12		13			14	15		16		17			18		
	900,2	1962,9	992,6	1962,9	2408,0	914,4	951,3	1969,0	900,3	2419,2	900,3	1690,7	2261,1	900,3	1802,9	2467,2
	904,2	1987,0	1010,3	1969,0	2409,0	930,4	994,3	2064,0	902,3	2563,1	925,3	1763,9	2267,1	951,3	1923,9	2478,2
	907,3	2052,9	1116,6	1987,0	2419,2	935,5	1010,3	2075,0	951,3	2564,1	951,3	1775,9	2297,2	992,6	1940,9	2564,2
	950,2	2074,9	1228,6	2011,9	2435,1	951,3	1155,3	2083,0	994,3	2717,0	992,6	1791,7	2383,9	994,3	1962,9	2662,3
	951,2	2211,1	1231,7	2083,0	2564,1	952,5	1203,7	2105,0	1010,3	2807,3	994,3	1802,9	2419,2	1010,3	1969,0	2693,2
	994,3	2239,1	1249,7	2104,9	2662,2	1010,3	1228,7	2111,0	1155,3	2808,3	1010,3	1923,9	2467,2	1126,5	1987,1	2717,0
	1010,3	2261,0	1424,7	2116,0	2663,3	1223,6	1249,7	2121,0	1424,8	2914,5	1126,5	1940,9	2478,2	1155,3	2009,0	2739,3
	1155,3	2419,2	1446,7	3346,5	2691,2	1347,5	1282,7	2127,0	1475,8	3094,6	1155,3	1962,9	2564,2	1235,5	2083,0	2806,2
	1424,7	2564,1	1447,7	3347,4	2723,4	1365,5	1403,7	2211,1	1941,0	3346,7	1235,5	1969,0	2717,0	1316,8	2211,1	2807,3
	1465,7	2807,2	1539,8	3349,4	2749,3	1366,1	1424,8	2239,2	1962,9	3347,6	1316,8	1987,1	2806,2	1365,6	2221,1	2808,3
	1487,7	2915,4	1546,7	3392,7	2805,3	1424,7	1447,8	2283,1	1987,1	3391,8	1365,6	2009,0	2807,3	1424,7	2225,1	2825,3
	1940,9		1568,7	3636,9	2807,2	1548,8	1546,7	2311,2	2052,9	3392,9	1424,7	2083,0	2808,3	1442,7	2239,1	2914,5
			1635,7	2196,1	2825,3	1570,7	1635,8	2467,3	2074,9	3810,7	1442,7	2211,1	2825,3	1446,7	2261,1	3000,4
			1691,8	2211,1	2828,2	1940,9	1748,9	2489,3	2083,0	3854,8	1446,7	2221,1	2914,5	1475,7	2267,1	3346,5
			1748,9	2221,1	2911,5	1987,0	1788,9	2580,3	2211,1	3860,0	1475,7	2225,1	3000,4	1690,7	2383,9	
			1788,9	2225,1	2913,3	2080,9	1940,9	2609,3	2239,1	3866,9	1581,8	2239,1	3346,5	1775,9	2419,2	
			1922,9	2230,1	2914,5	2239,0	1962,9	2807,3	2383,9							
			1924,5	2239,1	2918,4	2807,1										
			1940,9	2261,1	2923,2											

6.5.1 AS-43 Spot-1

(AS: AutoSampler; s.Kap.3.4.7 , Seite 109)

Voyager Spec #1[BP = 952.5,

Spot-1

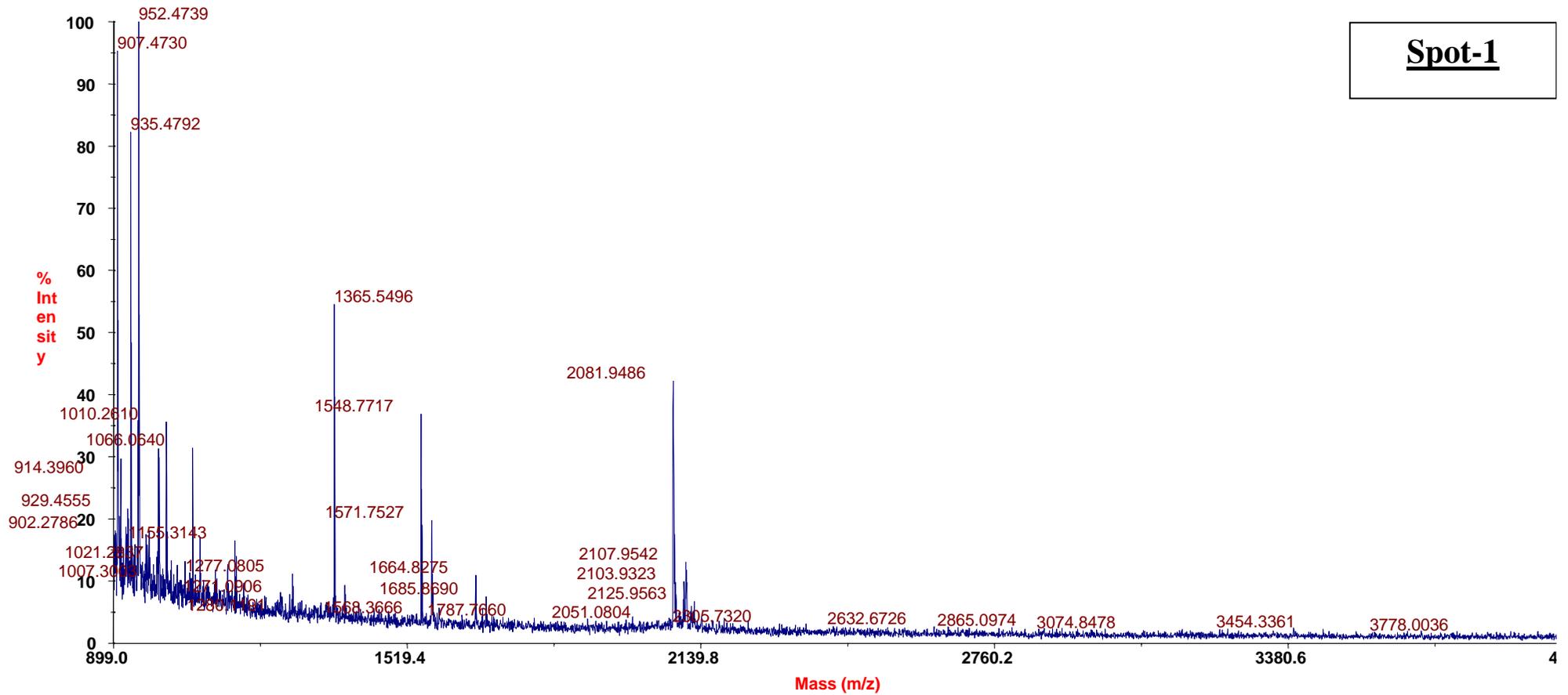
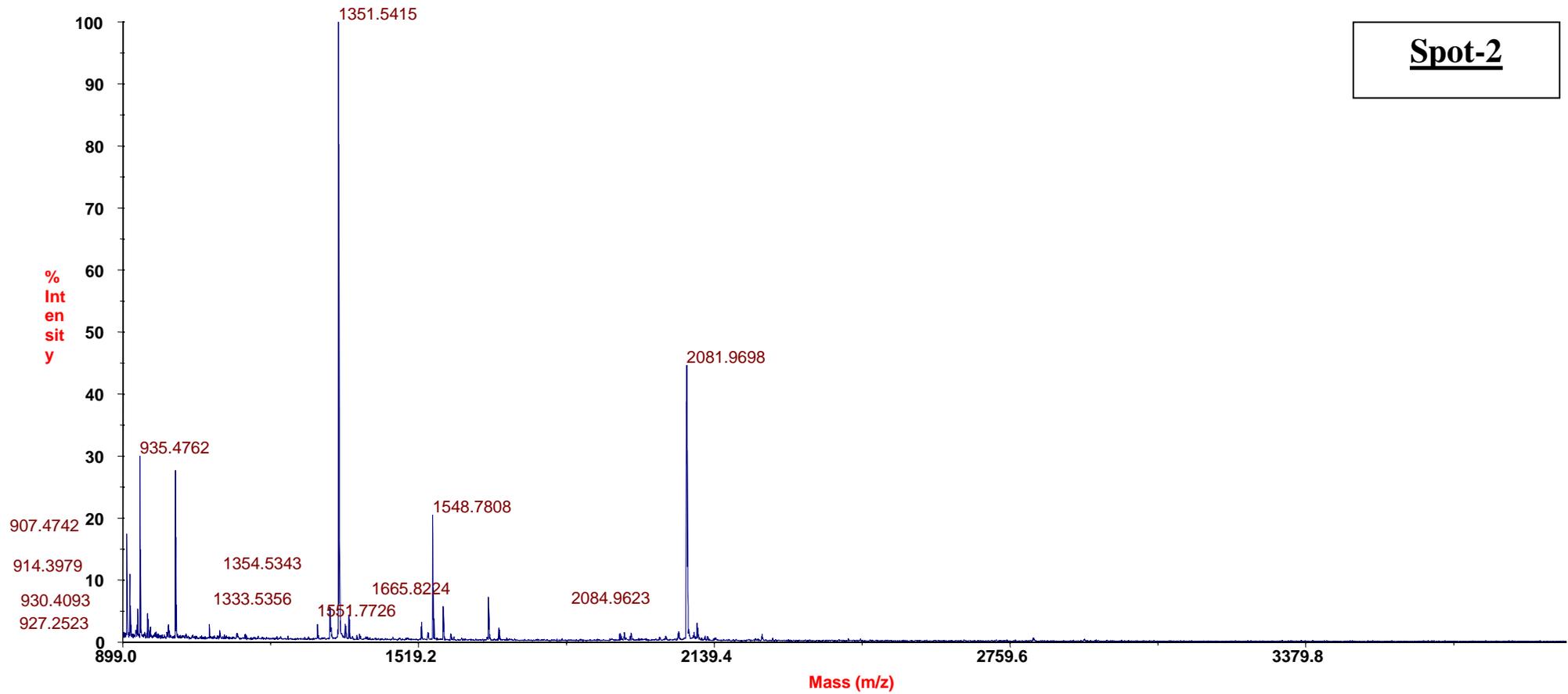


Abbildung 6-21 MALDI-TOF-MS-Spektren von Peptid-Spot Nr.1 bis 18 vom 2D-SDS-PAGE

6.5.2 AS-44 Spot-2

Voyager Spec #1[BP = 1351.6,

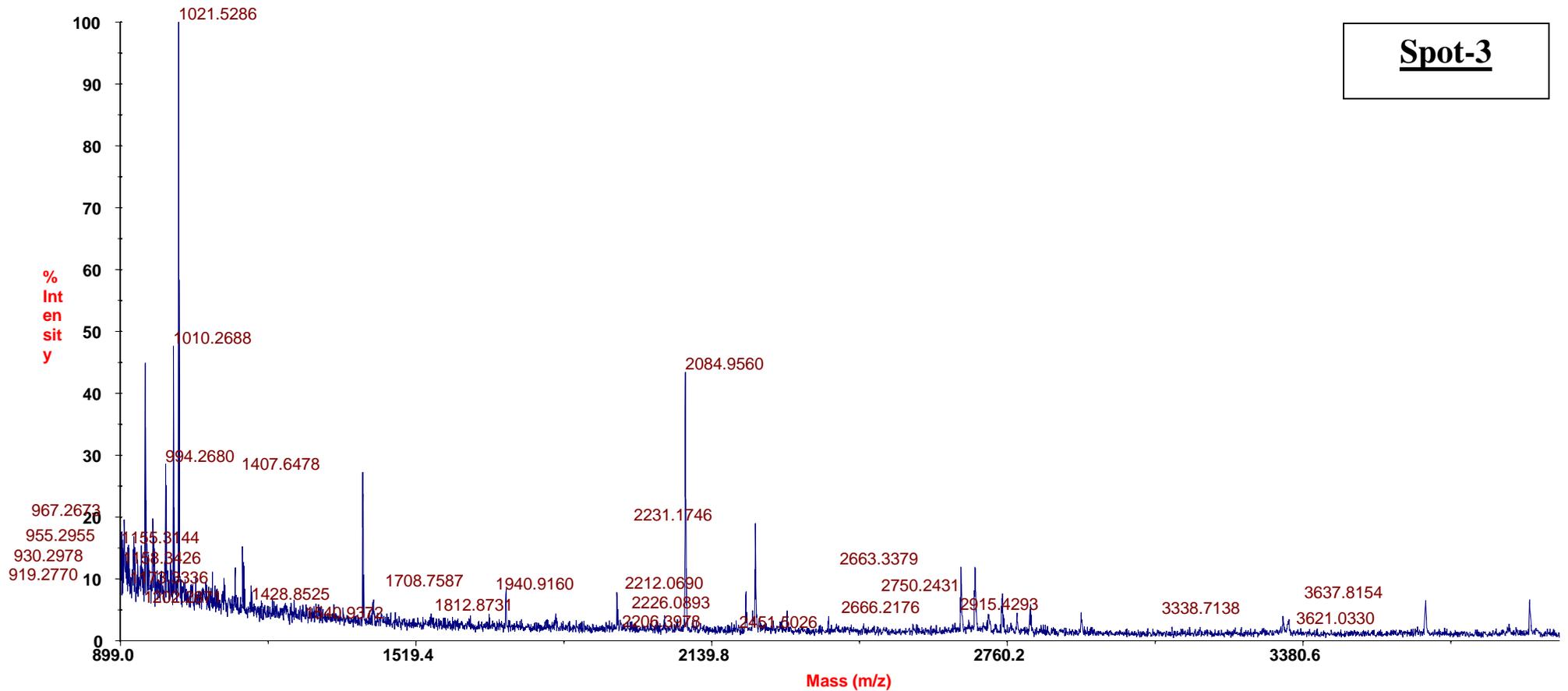


Spot-2

Forts. Abbildung 6-21 MALDI-TOF-MS-Spektren von Peptid-Spot Nr.2 vom 2D-SDS-PAGE (s.Kap.3.4.7 , Seite 109)

6.5.3 AS-46 Spot-3

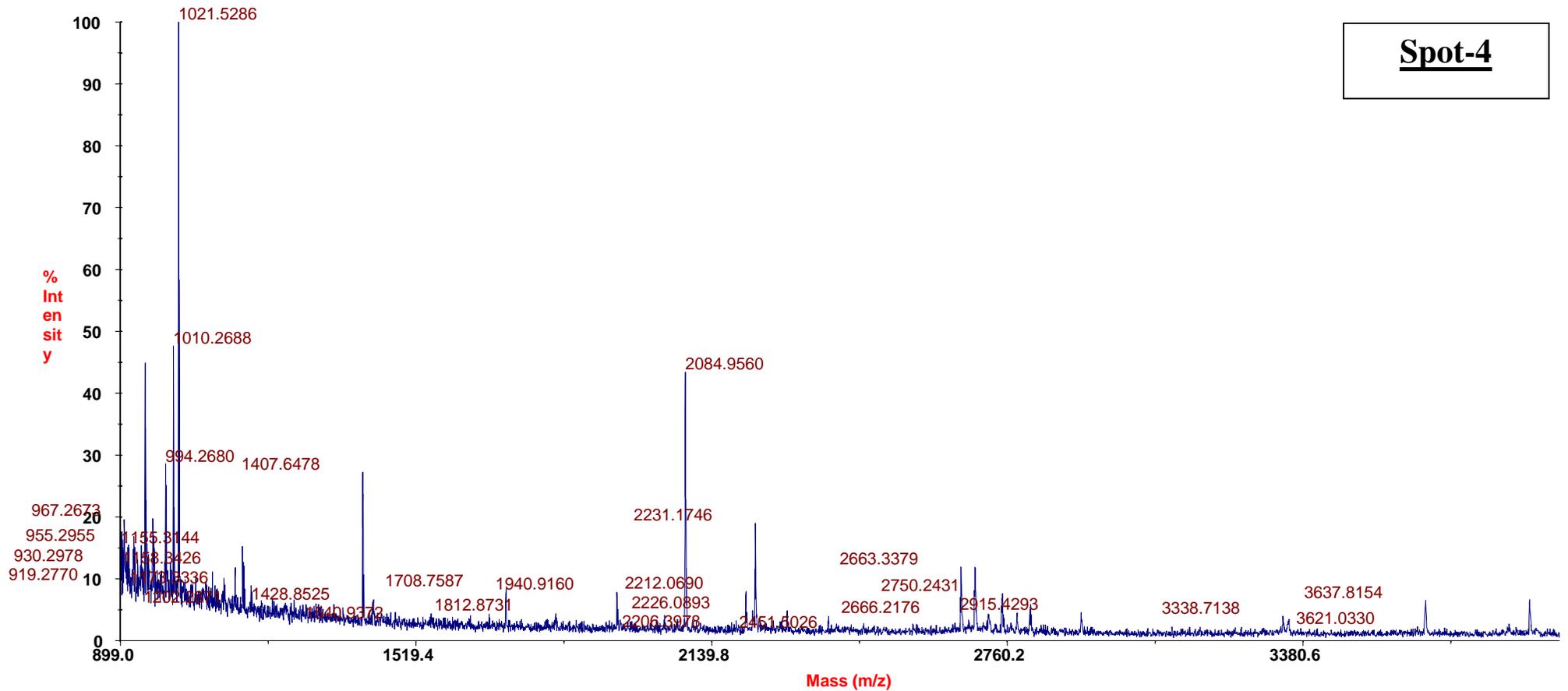
Voyager Spec #1[BP = 1021.5,



Forts. Abbildung 6-21 MALDI-TOF-MS-Spektren von Peptid-Spot Nr.3 vom 2D-SDS-PAGE (s.Kap.3.4.7 , Seite 109)

6.5.4 AS-47 Spot-4

Voyager Spec #1[BP = 1021.5,

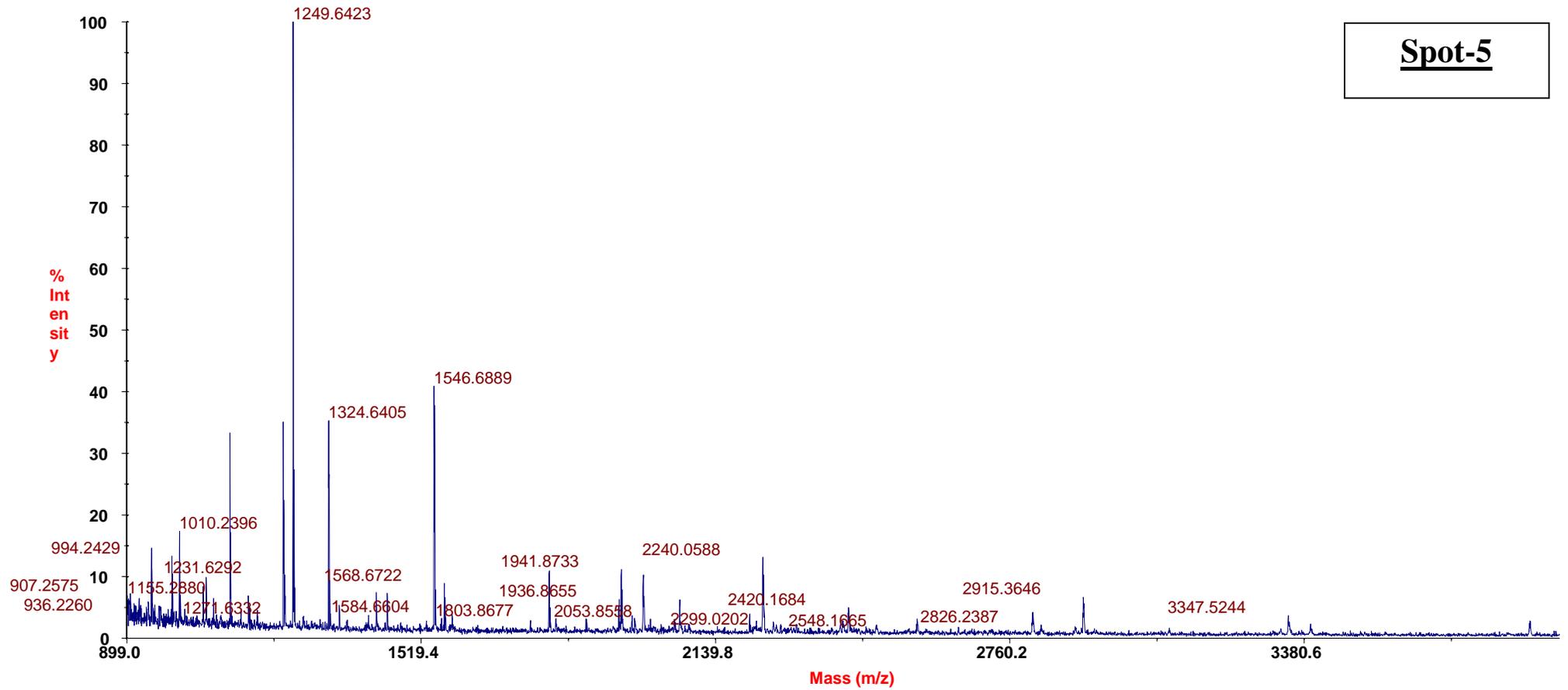


Forts. Abbildung 6-21 MALDI-TOF-MS-Spektren von Peptid-Spot Nr.4 vom 2D-SDS-PAGE (s.Kap.3.4.7 , Seite 109)

6.5.5 AS-48 Spot-5

Voyager Spec #1[BP = 1249.7,

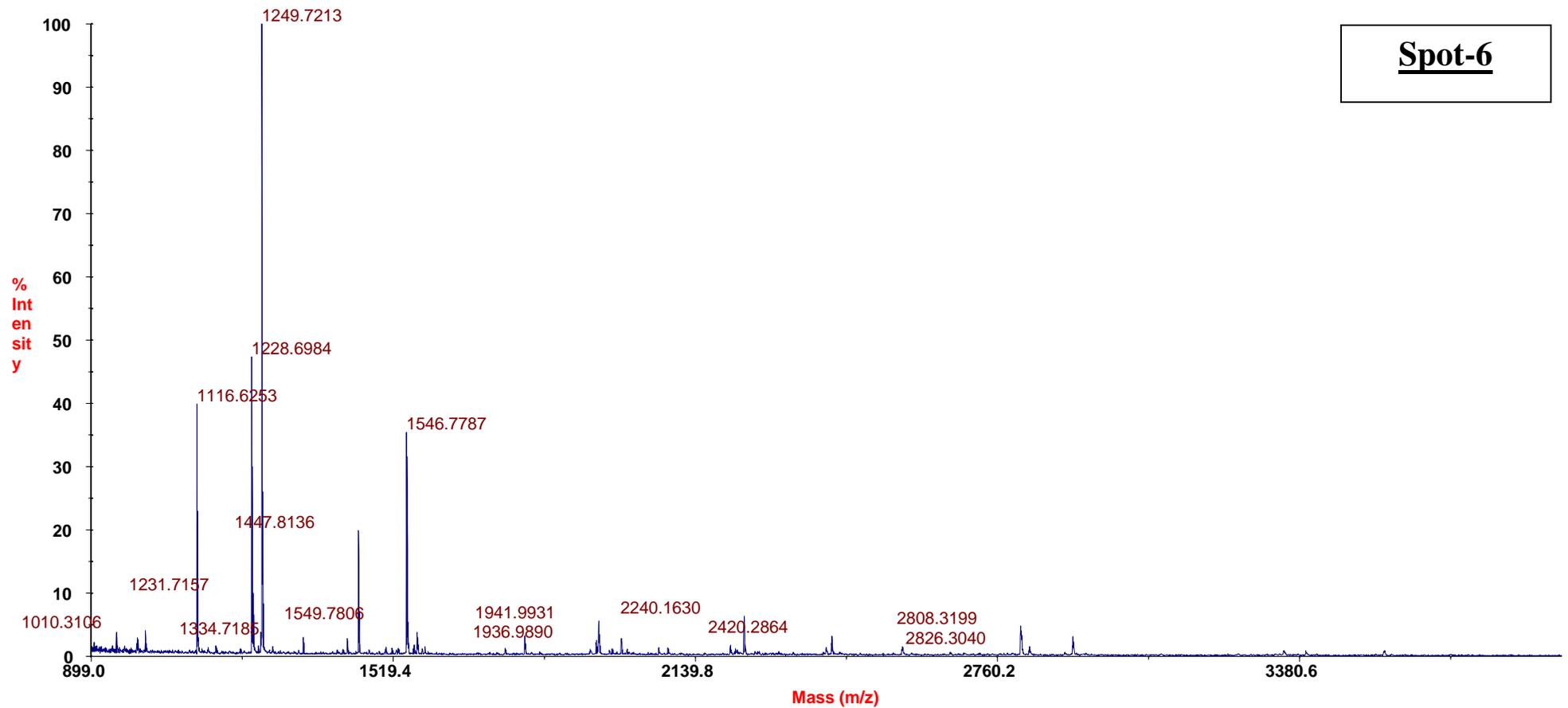
Spot-5



Forts. Abbildung 6-21 MALDI-TOF-MS-Spektren von Peptid-Spot Nr.5 vom 2D-SDS-PAGE (s.Kap.3.4.7 , Seite 109)

6.5.6 AS-49 Spot-6

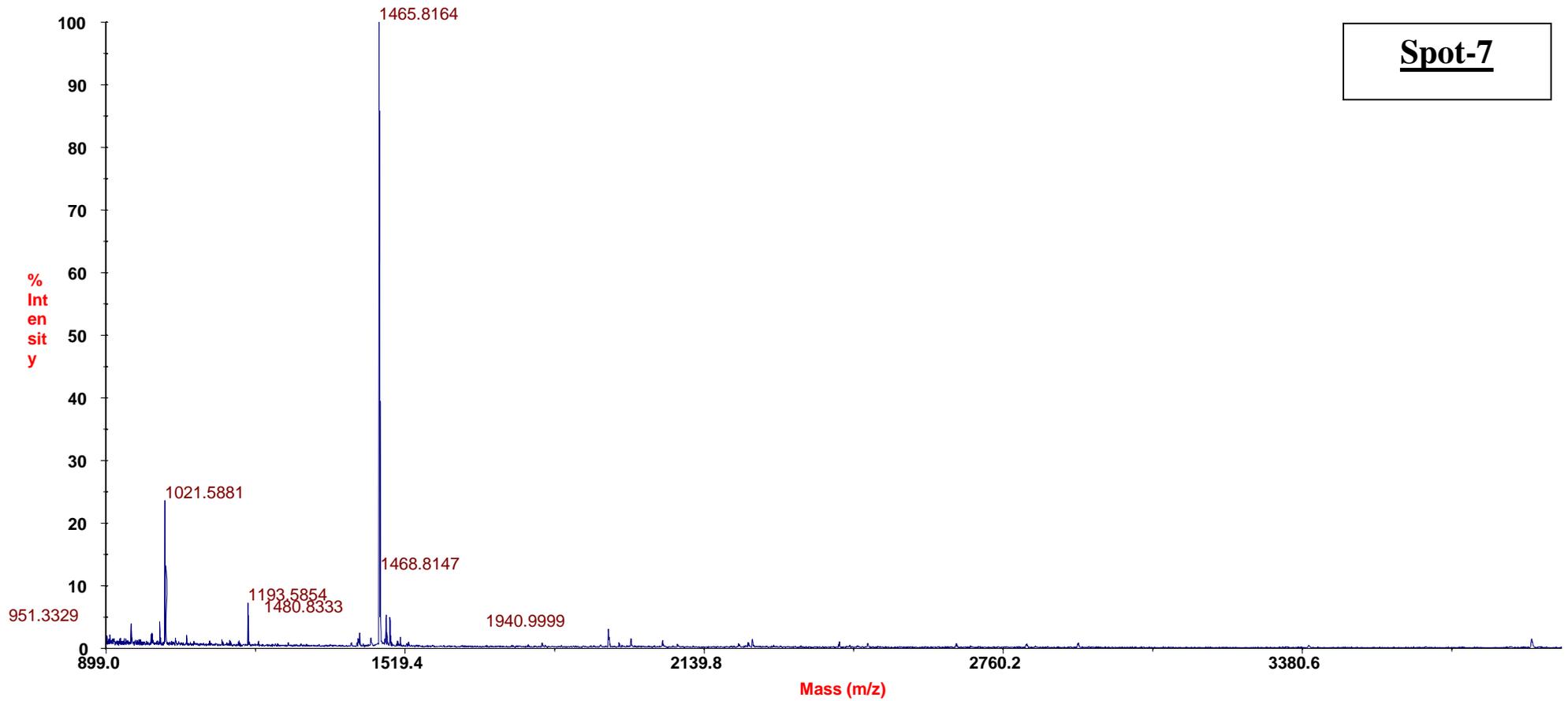
Voyager Spec #1[BP = 1249.7,



Forts. Abbildung 6-21 MALDI-TOF-MS-Spektren von Peptid-Spot Nr.6 vom 2D-SDS-PAGE (s.Kap.3.4.7 , Seite 109)

6.5.7 AS-61 Spot-7

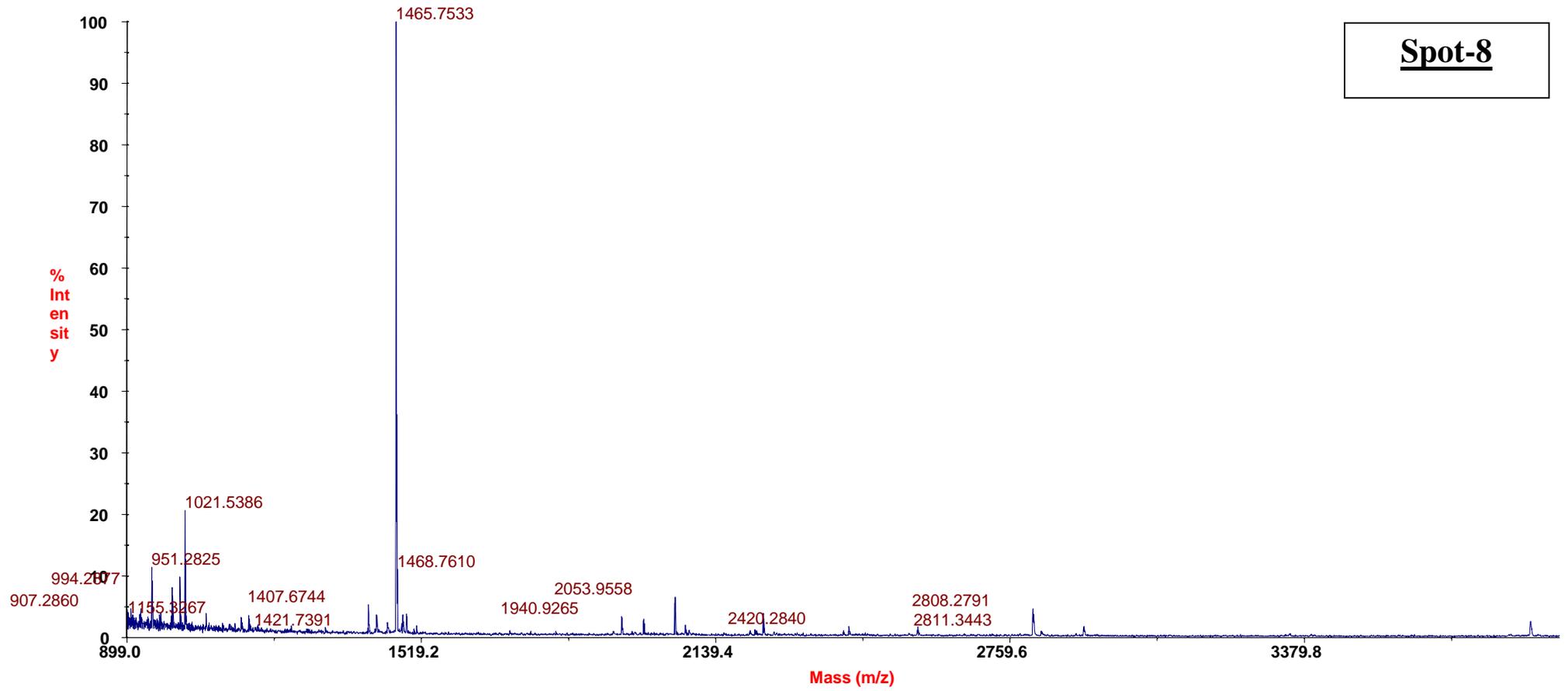
Voyager Spec #1[BP = 1465.8,



Forts. Abbildung 6-21 MALDI-TOF-MS-Spektren von Peptid-Spot Nr.7 vom 2D-SDS-PAGE (s.Kap.3.4.7 , Seite 109)

6.5.8 AS-62 Spot-8

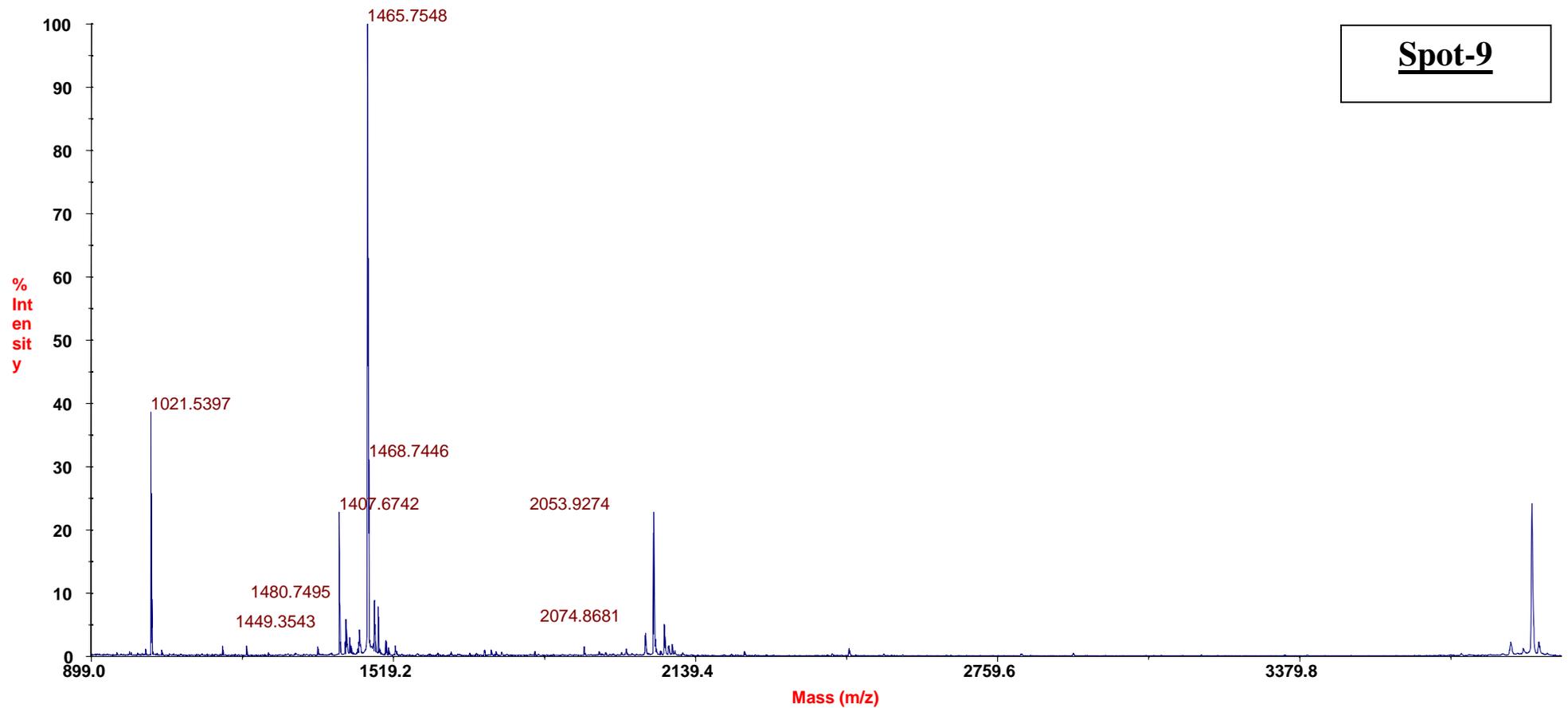
Voyager Spec #1[BP = 1465.7,



Forts. Abbildung 6-21 MALDI-TOF-MS-Spektren von Peptid-Spot Nr.8 vom 2D-SDS-PAGE (s.Kap.3.4.7 , Seite 109)

6.5.9 AS-63 Spot-9

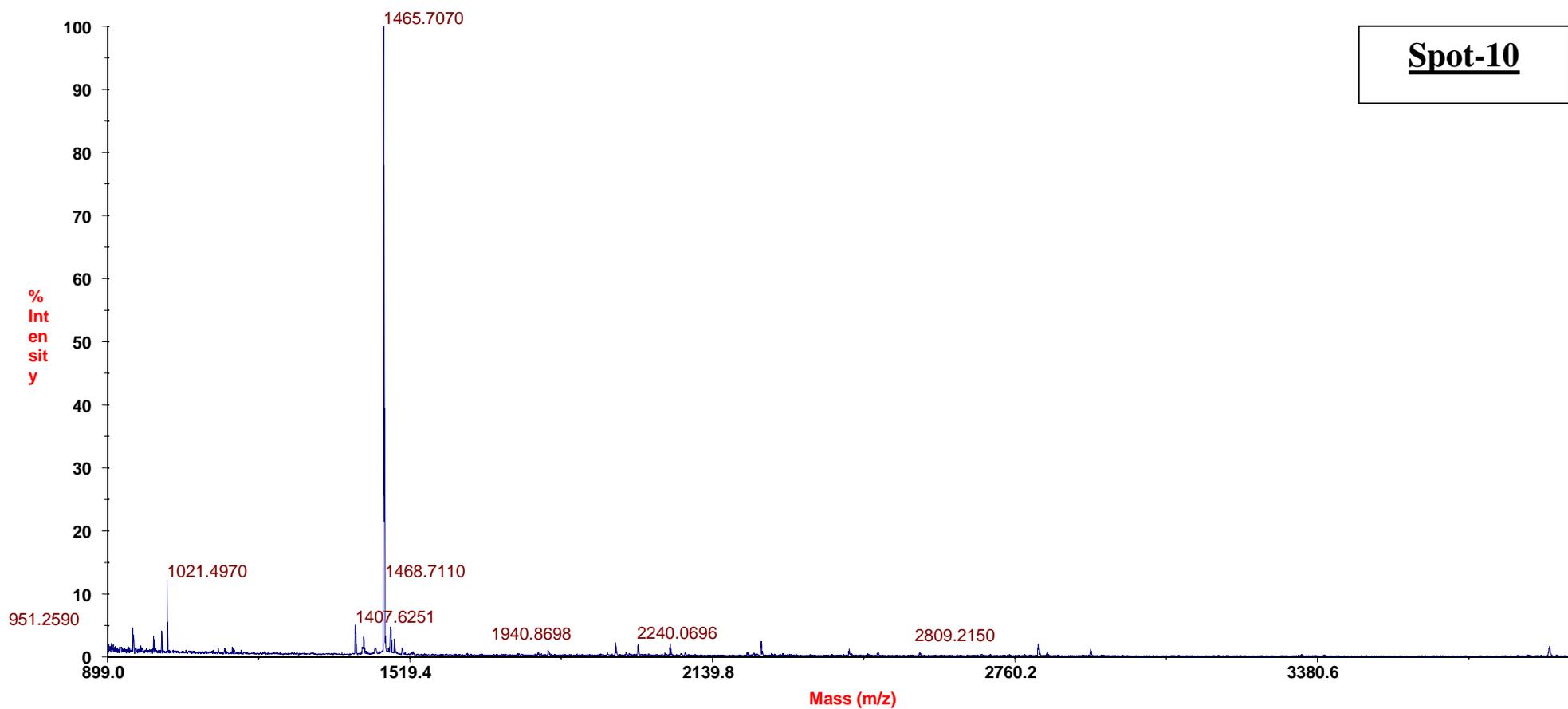
Voyager Spec #1[BP = 1465.7,



Forts. Abbildung 6-21 MALDI-TOF-MS-Spektren von Peptid-Spot Nr.9 vom 2D-SDS-PAGE (s.Kap.3.4.7 , Seite 19)

6.5.10 AS-64 Spot-10

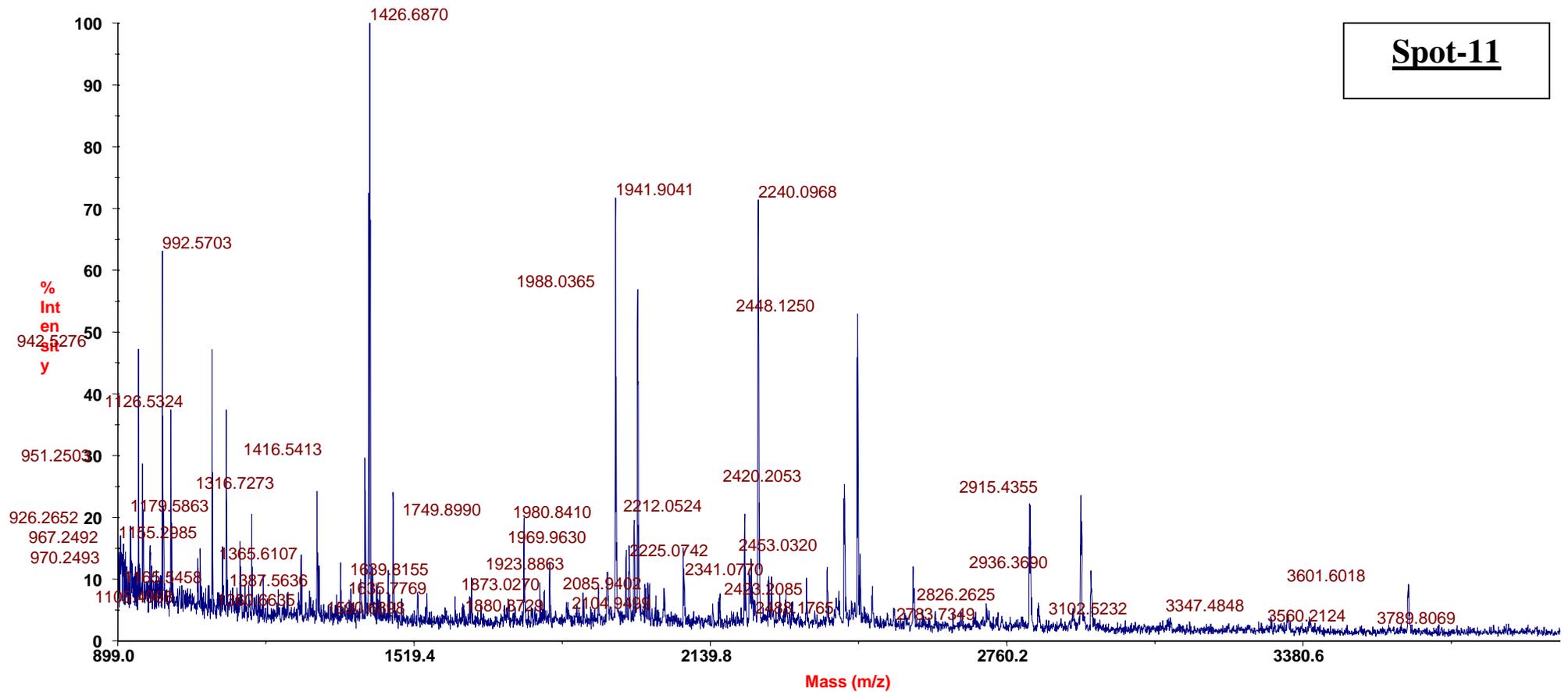
Voyager Spec #1[BP = 1465.7,



Forts. Abbildung 6-21 MALDI-TOF-MS-Spektren von Peptid-Spot Nr.10 vom 2D-SDS-PAGE (s.Kap.3.4.7, Seite 109)

6.5.11 AS-65 Spot-11

Voyager Spec #1[BP = 1426.7,

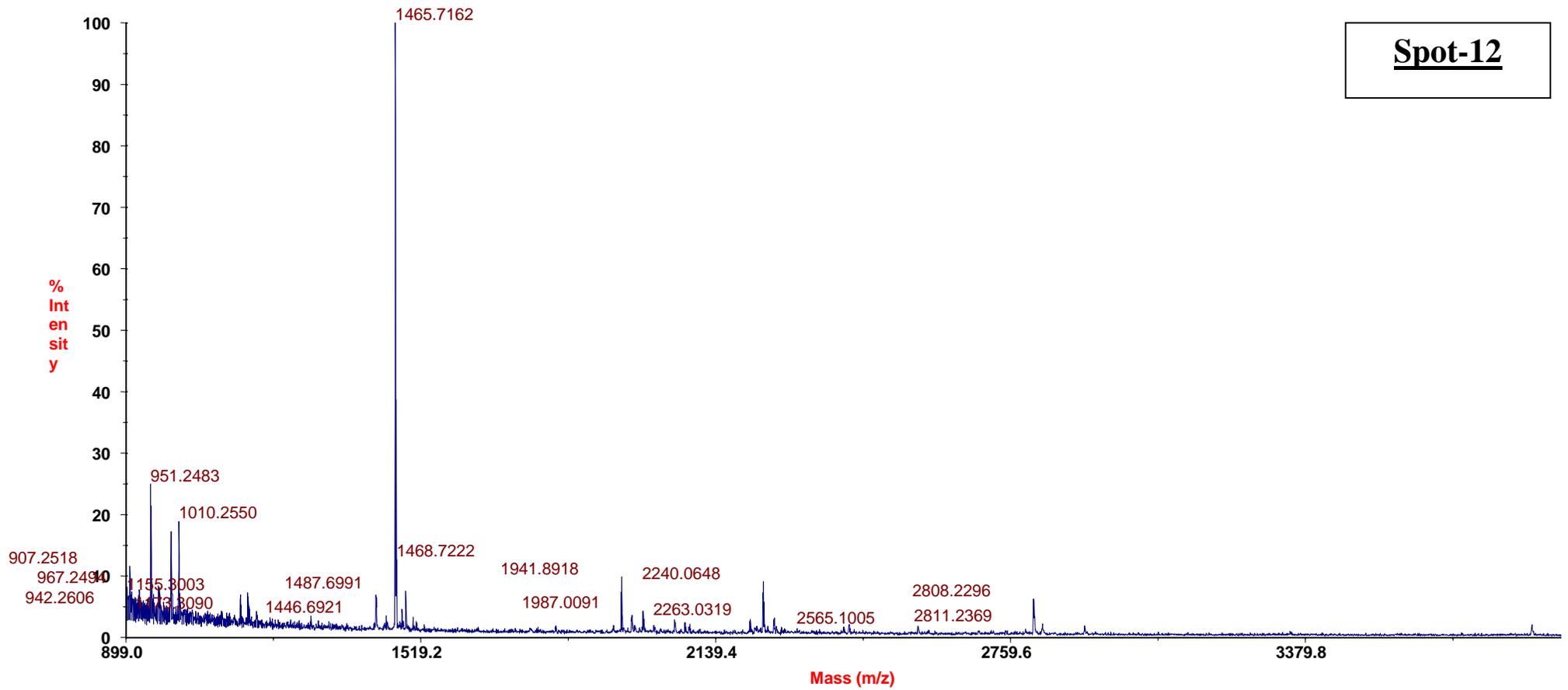


Forts. Abbildung 6-21 MALDI-TOF-MS-Spektren von Peptid-Spot Nr.11 vom 2D-SDS-PAGE (s.Kap.3.4.7 , Seite 109)

6.5.12 AS-66 Spot-12

Voyager Spec #1[BP = 1465.7,

Spot-12

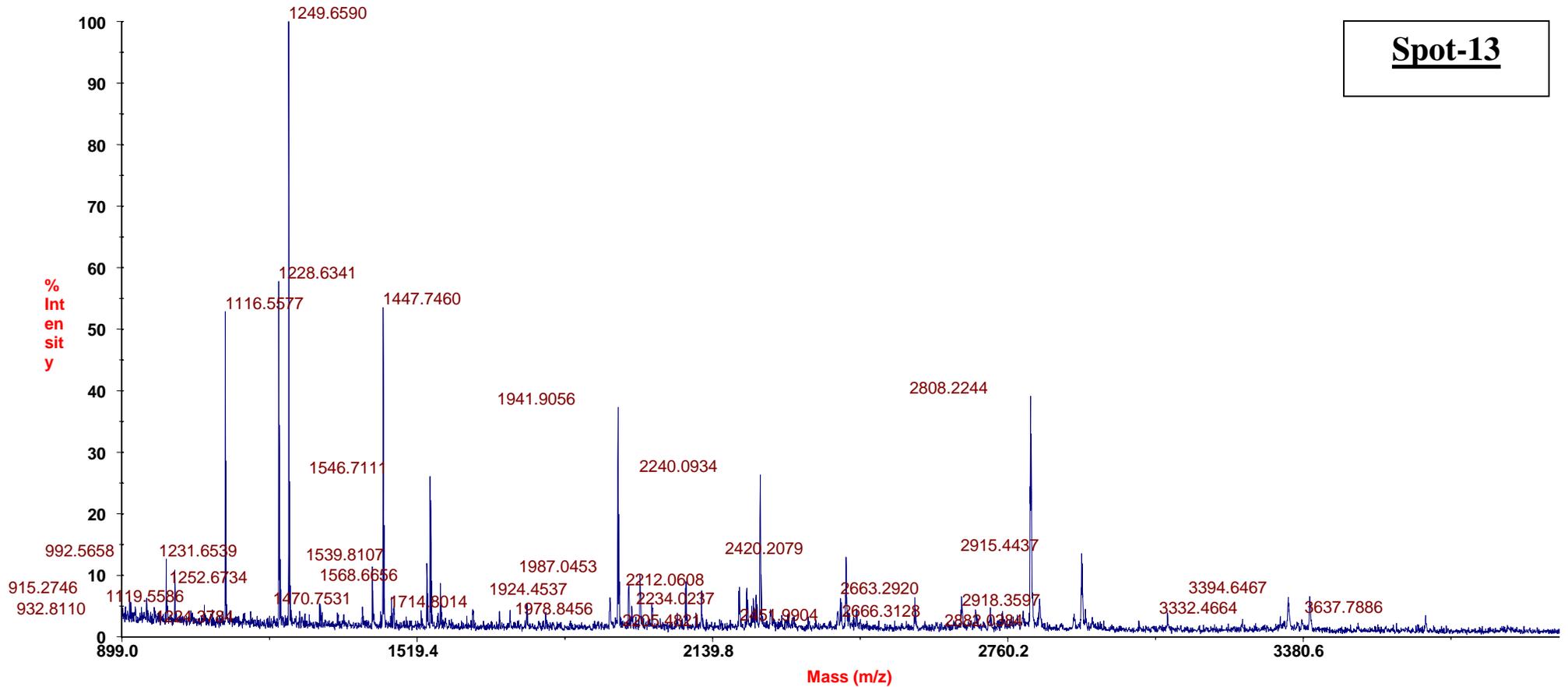


Forts. Abbildung 6-21 MALDI-TOF-MS-Spektren von Peptid-Spot Nr.12 vom 2D-SDS-PAGE (s.Kap.3.4.7 , Seite 109)

6.5.13 AS-67 Spot-13

Voyager Spec #1[BP = 1249.6,

Spot-13

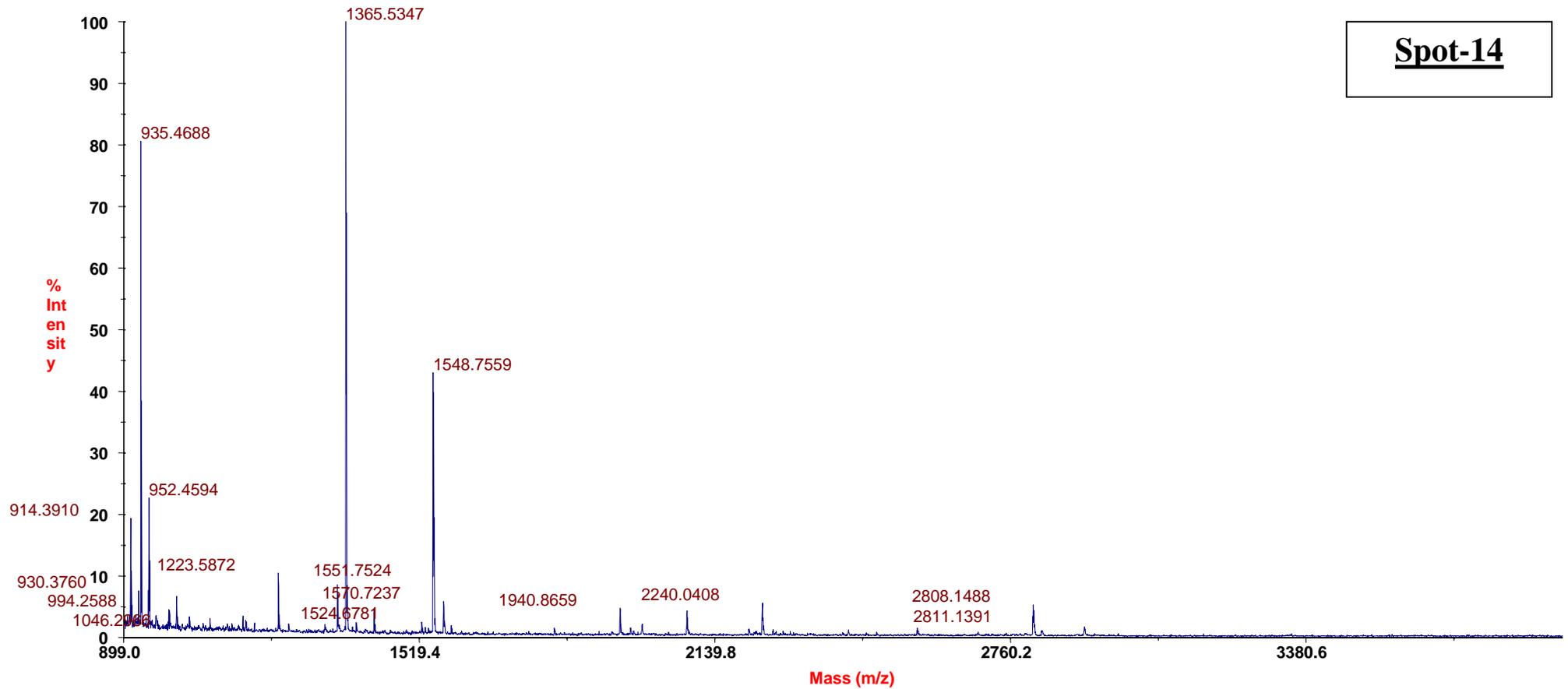


Forts. Abbildung 6-21 MALDI-TOF-MS-Spektren von Peptid-Spot Nr.13 vom 2D-SDS-PAGE (s.Kap.3.4.7, Seite 109)

6.5.14 AS-68 Spot-14

Voyager Spec #1[BP = 1365.5,

Spot-14

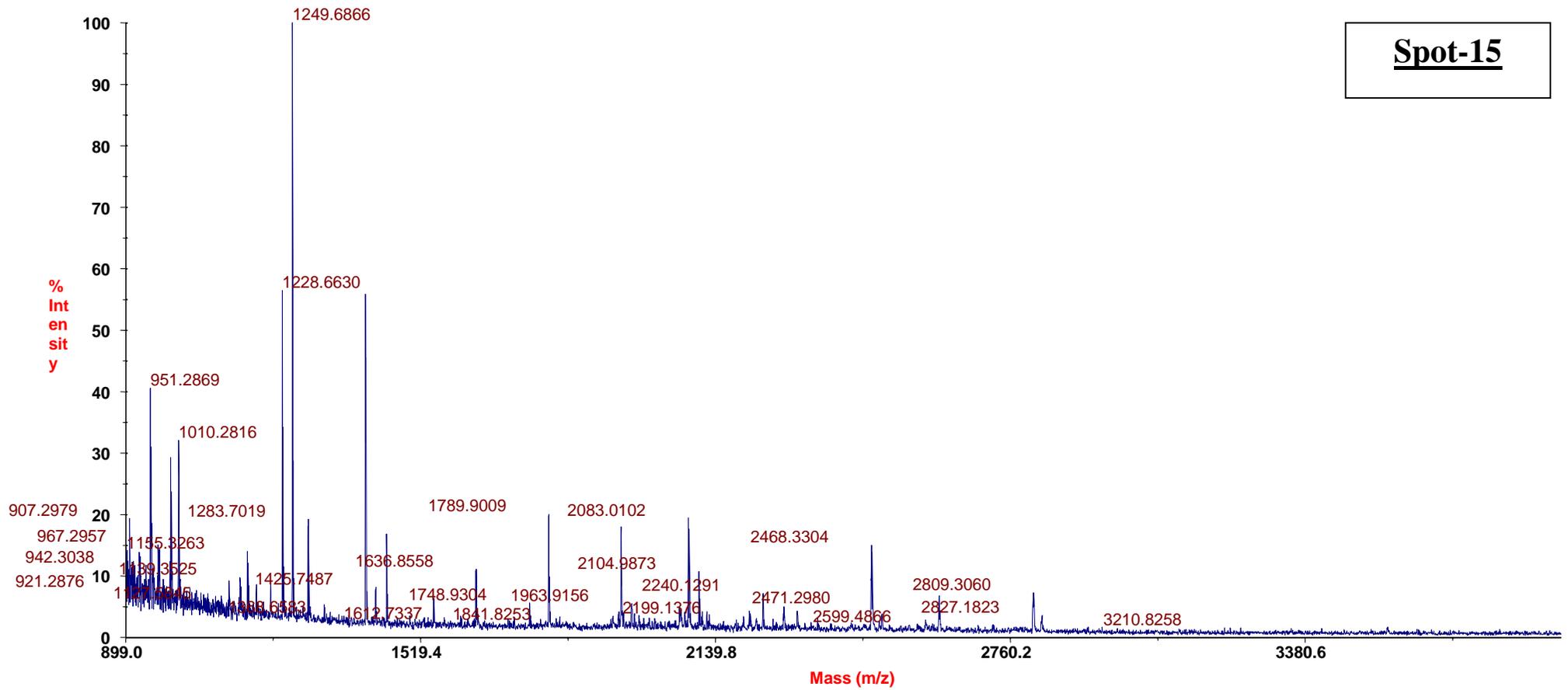


Forts. Abbildung 6-21 MALDI-TOF-MS-Spektren von Peptid-Spot Nr.14 vom 2D-SDS-PAGE (s.Kap.3.4.7 , Seite 109)

6.5.15 AS-69 Spot-15

Voyager Spec #1 [BP = 1249.7,

Spot-15

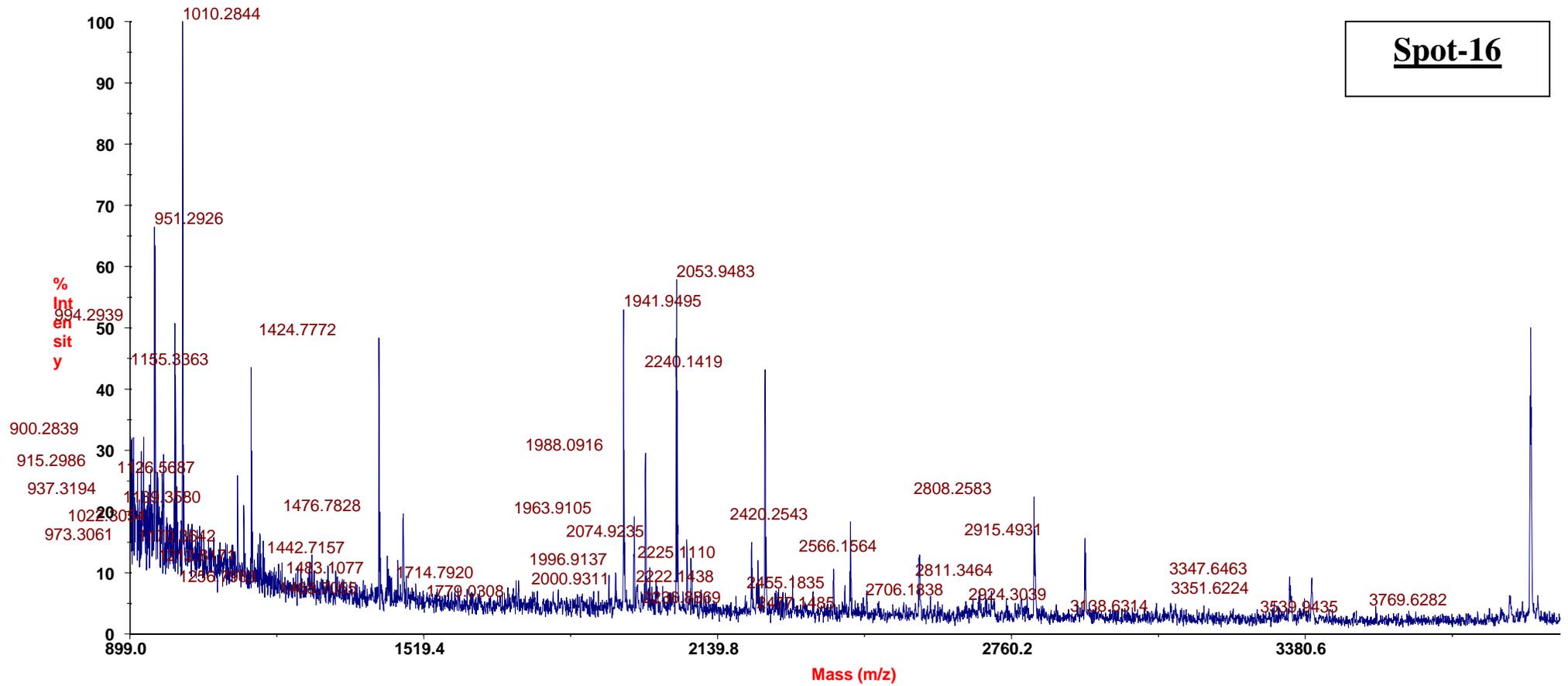


Forts. Abbildung 6-21 MALDI-TOF-MS-Spektren von Peptid-Spot Nr.15 vom 2D-SDS-PAGE (s.Kap.3.4.7 , Seite 109)

6.5.16 AS-70 Spot-16

Voyager Spec #1[BP = 1010.3,

Spot-16

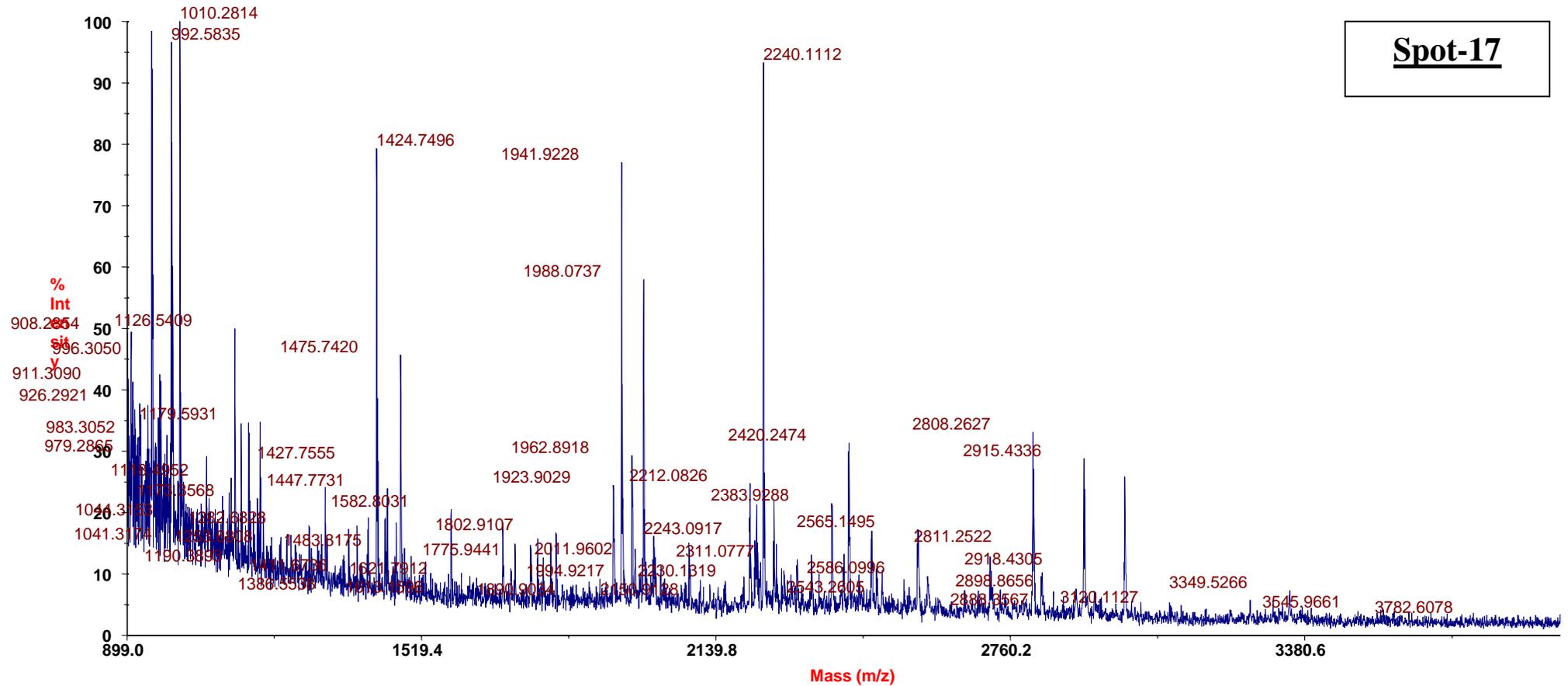


Forts. Abbildung 6-21 MALDI-TOF-MS-Spektren von Peptid-Spot Nr.16 vom 2D-SDS-PAGE (s.Kap.3.4.7 , Seite 109)

6.5.17 AS-75 Spot-17

Voyager Spec #1[BP = 1010.3,

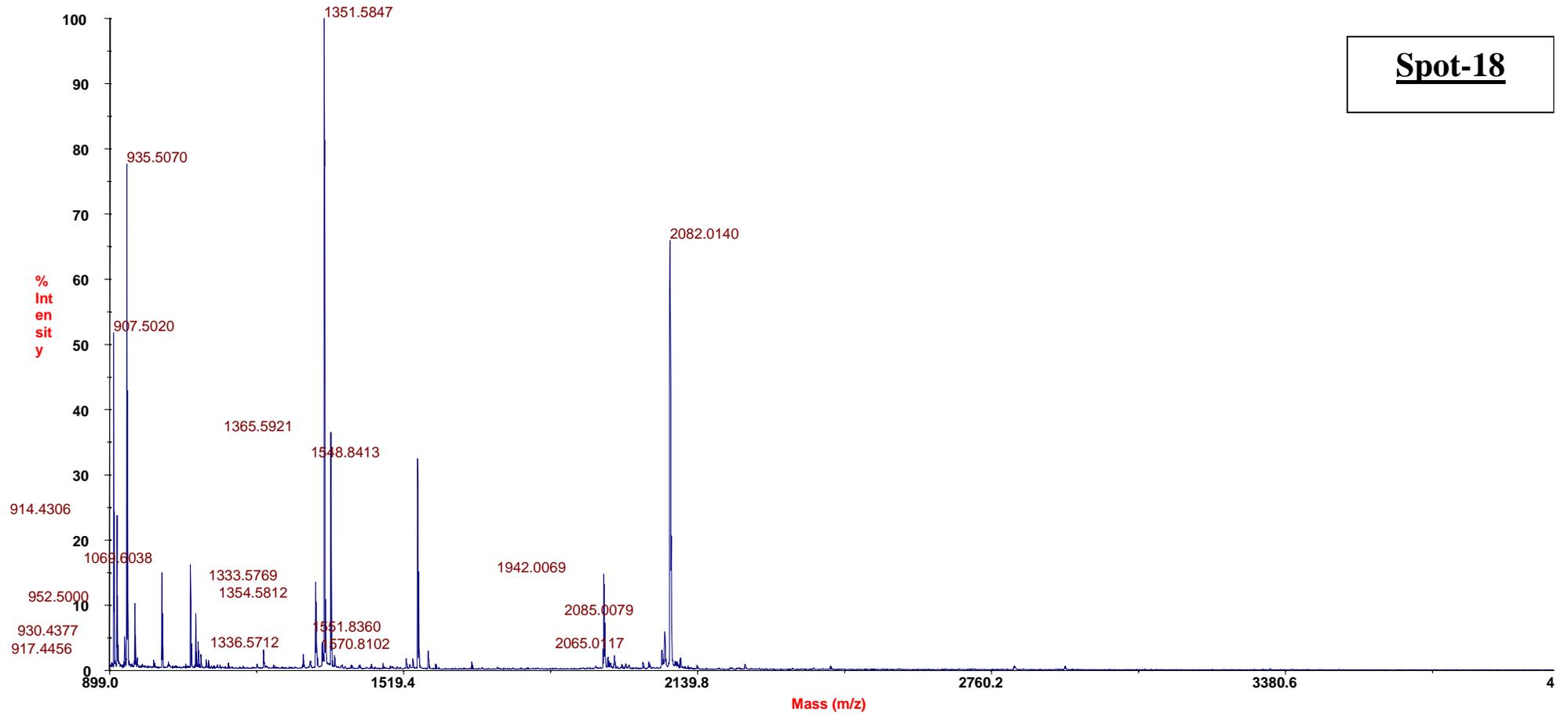
Spot-17



Forts. Abbildung 6-21 MALDI-TOF-MS-Spektren von Peptid-Spot Nr.17 vom 2D-SDS-PAGE (s.Kap.3.4.7 , Seite 109)

6.5.18 AS-76 Spot-18

Voyager Spec #1[BP = 1351.6, 33702]



Spot-18

Forts. Abbildung 6-21 MALDI-TOF-MS-Spektren von Peptid-Spot Nr.18 vom 2D-SDS-PAGE (s.Kap.3.4.7 , Seite 109)

7 DANKSAGUNG

Bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. K.Günther, bedanke ich mich ganz herzlich für die große Chance, eine Doktorarbeit im renommierten Forschungszentrum Jülich anzufertigen, für das interessante Thema und insbesondere für die Unterstützung während meiner Zeit im Forschungszentrum. Die intensive Betreuung bis zur Endphase der Arbeit war sehr entscheidend für das Gelingen der Dissertation. Mein Dank gilt ebenfalls Professorin Dr. G.M. König für die Übernahme des Korreferates.

Für die Aufnahme und die Förderung durch das Institut für Angewandte Physikalische Chemie danke ich Prof. Dr.Dr. M.J.Schwuger. Ein besonderer Dank möchte ich auch Herrn Prof. Dr. U.Schurr für die Einbindung der Arbeit im neuen Institut für Phytosphäre aussprechen, sowie für seine vielseitige tatkräftige Unterstützung, die zum Abschluß der Arbeit beigetragen hat.

Für die sehr ausführliche und genaue Einarbeitung in der Gelpermeationschromatographie, intensive Betreuung mit der nativen kontinuierlichen Gelelektrophorese sowie zahlreiche Diskussionen der Ergebnisse möchte ich mich ganz herzlich bei Bernd Kastenholz bedanken.

Mein großer Dank gilt auch Dr. Steffen Schaffer für die Einführung in die 2D-SDS-Gelelektrophorese und Dr. Axel Niebisch für die Einführung in die Voyager-MALDI-TOF-MS sowie für die vielen Ratschläge bei darüber hinaus gehenden Fragen. Es hat immer wieder Spaß gemacht, neue Methoden von kompetenten Kollegen zu lernen und anzueignen.

Für die Zusammenarbeit zum Anzucht und Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana* möchte ich mich herzlichst bei Juniorprofessorin Dr. Janzik und Andrea Neuwohner bedanken, die nicht nur fachliche Hilfestellungen gegeben haben, sondern mir die Biologie im wissenschaftlichen Umfeld ganz neuen Stellenwert vermittelt haben.

Für Korrekturhilfe danke ich Anne Wehrhan, Helmut Kneifel, Carola Mohl und Morten Schonert. Eine ausgezeichnete Labor- und Büroatmosphäre habt ihr während und nach meinen schweren Zeiten in Jülich geschaffen, deshalb möchte ich hier auch euch herzlichst danken Torsten Räcker, Katrin Wieland und Katja Vossen. Insbesondere eurer unermüdlicher Beistand nicht nur in der Arbeit hat bei mir seinen festen Platz gefunden.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlichst meinem Bruder, meinen Jülicher-WG-Mitbewohnern, und meinen Emmanuel-Geschwistern, die die Zeiten der Doktorarbeit das Leben lebenswert gemacht haben.

Danke....Ihnen und euch allen

Lebenslauf

Persönliche Daten: Name: Budi Muktiono
Geburt: in Semarang, Indonesien
Nationalität: Indonesisch
Beruf: Staatl. gepr. Lebensmittelchemiker

Schulbildung:

1979-1988 : Katholische Grund- und Mittelschule Kebon Dalem, Semarang
1988-1991 : Gymnasium der Jesuitenschule Ignatius de Loyola, Semarang
1991-1992 : Deutsche Schule am Goethe-Institut, Jakarta
1992 : Anreise nach Deutschland zur Aufnahme des Studiums

Studium:

1992-1993 : Studienkolleg für ausländische Studenten der Universität Münster
1993 : Beginn des Studiums der Lebensmittelchemie an der Universität Münster
1996 : Vordiplom in Chemie an der Universität Münster
1998 : 1. Staatsexamen für Lebensmittelchemiker an der Universität Münster
1998-1999 : Praktisches Jahr am CVUA (Chemisches- und Landes-Veterinär-Untersuchungsamt) Münster
1999 : 2. Staatsexamen für Lebensmittelchemiker

Berufliche Weiterbildung:

06.97 – 08.97: Dr. Weßling-Group, Lebensmittelanalytik, Altenberge
07.98 – 10.98: Nestlé Deutschland AG, QS-Zentrallabor Frankfurt, Rückstands- und Kontaminantenanalytik
11.98 – 01.99: Alcum GmbH, Umweltanalytik/Mikrobiologie, Rietberg
02.99 – 03.99: Veterinäramt, Kreisverwaltung Siegburg
04.99 – 10.99: CVUA (Chemisches- und Landes-Veterinär-Untersuchungsamt) Münster
01.2000 – 2004: Promotion am Institut für Angewandte Physikalische Chemie und am Institut für Phytosphäre des Forschungszentrums Jülich