

**Physiologisch-biochemische Charakterisierung  
schwermetallinduzierter Reaktionen des aquatischen  
Hyphomyceten *Heliscus lugdunensis*  
(Teleomorph: *Nectria lugdunensis*)**

**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von Diplom-Biochemikerin Bianca Braha (geb. Pierau)  
geb. am 22. Juni 1975  
in Schönebeck/Elbe

Gutachter:

1. Prof. Dr. G.-J. Krauß, M.-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. K. Jung, Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle
3. Prof. Dr. F. Bärlocher, Mt. Allison University, Sackville, Canada

Halle (Saale), den 13.09.2004

**urn:nbn:de:gbv:3-000007183**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007183>]

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Aquatische Hyphomyceten	1
1.2	Schwermetalle und ihre Wirkung auf Pilze und Mikroorganismen	2
1.3	Die pilzliche Zellwand	4
1.4	Metallaufnahme	5
1.5	Thiolhaltige Peptide und Proteine in der Schwermetallstressantwort bei Pilzen	6
1.5.1	Sulfatassimilation und Cystein-Biosynthese	6
1.5.2	Glutathion	7
1.5.3	Phytochelatine	9
1.5.4	Metallothioneine (MT)	11
1.5.5	Metallochaperone	13
1.6	Ziel der Arbeit	14
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1	Herkunft der Pilze	15
2.2	Anzucht der Pilze	16
2.2.1	Stammkultur	16
2.2.2	Flüssigkultur	16
2.2.3	Wachstumsuntersuchungen	17
2.2.4	Einfluss von Sulfat und Magnesium auf das Wachstum des <i>H. lugdunensis</i> Stammes H4-2-4	17
2.3	Sporulation	17
2.4	Molekularbiologische Methoden – Isolierung und Charakterisierung der 18S rDNA	18
2.4.1	DNA-Isolierung	18
2.4.2	Gelelektrophorese	18
2.4.3	Primer-Design und DNA-Amplifikation mittels PCR	18
2.4.4	Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i> -Zellen	19
2.4.5	Klonierung von PCR-Fragmenten	20
2.4.6	Auswertung der Sequenzdaten und Erstellung eines Stammbaumes	21
2.5	Molekularbiologische Methoden – Glutathionsynthetase	22
2.5.1	Isolierung eines Glutathionsynthetase-Gen-Fragmentes	22
2.5.2	Isolierung der RNA	23
2.5.3	Northern Blot	24
2.6	Biochemische und analytische Methoden	25
2.6.1	Trockenmassebestimmung	25
2.6.2	Vitalitätsbestimmung	25
2.6.3	Zellaufschluss zur Analyse von Cystein, $\gamma$ -Glutamylcystein und Glutathion	26

---

2.6.4	Bestimmung des Gesamthiolgehaltes	26
2.6.5	Enzymatische Bestimmung des Glutathiongehaltes	26
2.6.6	Bestimmung des oxidierten und reduzierten Glutathions, $\gamma$ -Glutamylcysteins und Cysteins mittels Monobrombimanderivatisierung und RP-HPLC	27
2.6.7	Nachweis weiterer Thiole mittels Ellmans Reagenz und Nachsäulenderivatisierung	28
2.6.8	Gelpermeation und Bestimmung des Cd(II)-Gehaltes der Fraktionen	29
2.6.9	Massenspektrometrie	30
2.6.10	Sulfatbestimmung mittels Kapillarelektrophorese	30
2.6.11	Sulfidnachweis mittels Methylenblau	31
2.6.12	Bestimmung der Biosorption und Akkumulation	32
2.6.13	Gaschromatographische Analyse der Monosaccharidzusammensetzung der pilzlichen Zellwand	33
2.7	Statistische Auswertung	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>36</b>
3.1	Phylogenetische Untersuchungen	36
3.2	Wachstumsuntersuchungen	38
3.2.1	Wachstum von <i>H. lugdunensis</i> unter schwermetallfreien Bedingungen	38
3.2.2	Beeinflussung der Biomasse unter Schwermetallstress	39
3.2.3	Vergleich des Biomassenverlustes in Abhängigkeit von der Temperatur	40
3.3	Vitalitätsuntersuchungen	41
3.3.1	Vitalität in Abhängigkeit von der Temperatur	42
3.4	Einfluss der Schwermetalle Cd(II) und Zn(II) auf den Wassergehalt	43
3.5	Einfluss der Schwermetalle Cd(II) und Zn(II) auf den pH-Wert im Kulturmedium von <i>H. lugdunensis</i>	44
3.6	Untersuchungen zur Zellwandzusammensetzung	45
3.7	Akkumulations- und Biosorptionsvermögen	46
3.7.1	Biosorption	46
3.7.2	Akkumulation	49
3.7.3	Biosorption und Akkumulation in Abhängigkeit von der Temperatur	51
3.8	Untersuchungen zum Thiolstoffwechsel unter Cd(II) und Zn(II)-Belastung	52
3.8.1	Beeinflussung des Sulfat-Gehaltes	52
3.8.2	Cystein und $\gamma$ -Glutamylcysteingehalte	53
3.8.3	Glutathiongehalte (oxidiert und reduziert)	56
3.8.4	Einfluss der Anzuchtstemperatur auf Thiolgehalte unter Cd(II)- Stress	60
3.8.5	Untersuchungen zur Transkriptakkumulation der Glutathion-Synthetase	61
3.8.6	Sulfid-Gehalt unter Schwermetallstress	62
3.8.7	Induktion weiterer Ellman-positiver Verbindungen unter Schwermetallbelastung	64
3.9	Untersuchung zur Cadmiumbindung mittels Gelpermeationschromatographie	67

3.10	Einfluss von $\text{SO}_4^{2-}$ und $\text{Mg}^{2+}$ auf die Schwermetalltoleranz von <i>H. lugdunensis</i> Stamm H4-2-4	69
3.10.1	Beeinflussung der Biomasse	69
3.10.2	Thiolgehalte unter $\text{SO}_4^{2-}$ -Zusatz	70
3.10.3	Biosorption und Akkumulation in <i>H. lugdunensis</i> H4-2-4 unter dem Einfluss von $\text{SO}_4^{2-}$ und $\text{Mg}^{2+}$	72
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>74</b>
4.1	Phylogenetische Untersuchungen	74
4.2	Wachstums- und Vitalitätsuntersuchungen	75
4.2.1	Einfluss der Temperatur auf die Biomasse und die Vitalität in <i>H. lugdunensis</i> unter Cd(II)- Stress	77
4.3	Beeinflussung des Wasserhaushaltes	78
4.4	Zellwandzusammensetzung in <i>H. lugdunensis</i> unter Schwermetallstress	79
4.5	Akkumulations- und Biosorptionsvermögen der <i>H. lugdunensis</i> - Stämme H4-2-4 und H8-2-1	81
4.5.1	Akkumulation und Biosorption	81
4.5.2	Einfluss des pH-Wertes im Medium auf Biosorption und Akkumulation	87
4.5.3	Einfluss der Temperatur auf die Biosorption und Akkumulation	88
4.6	Untersuchungen zum Thiolmetabolismus der <i>H. lugdunensis</i> Stämme H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II) und Zn(II)-Stress	90
4.6.1	Beeinflussung des Sulfat-Gehaltes durch Cd(II) und Zn(II)	90
4.6.2	Beeinflussung des Cystein- und $\gamma$ -Glutamylcysteingehaltes durch Cd(II) und Zn(II)-Belastung	92
4.6.3	Sulfidgehalte unter dem Einfluss der Cd(II) und Zn(II)-Belastung	100
4.6.4	Weitere durch Schwermetall induzierbare Thiolverbindungen	102
4.6.5	Erste Untersuchungen zur Cd(II)-Bindung an Thiolpeptide in <i>H.lugdunensis</i>	107
4.7	Beeinflussung der Schwermetalltoleranz in H4-2-4 durch Sulfat und Magnesium im Medium	108
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>111</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>116</b>

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Aquatische Hyphomyceten

Der Ascomycet *Heliscus lugdunensis* (Teleomorph: *Nectria lugdunensis*) gehört zur Gruppe der aquatischen Hyphomyceten (AQH). Die AQH stellen keine einheitliche Gruppe verwandter Pilzarten dar, sondern repräsentieren Pilze, die sich morphologisch und physiologisch an das aquatische Ökosystem angepasst haben (Dix und Webster, 1995). Sie sporulieren nur unter Wasser und besiedeln submers zersetzende Blätter in Flüssen und Seen (Bärlocher, 1992). In der Nahrungskette des aquatischen Ökosystems kommt ihnen als Destruenten von organischem Material eine primäre Bedeutung zu. Sie konditionieren einerseits organisches Material für andere heterotrophe Organismen, stehen gleichzeitig aber auch selbst als Nahrungsquelle für Makroinvertebraten zur Verfügung (Gessner et al., 2003). Jede Änderung der Pilzgemeinschaft, z. B. durch Schwermetalleintrag auf Grund anthropogener Einflüsse kann die Inkorporation von Blattmaterial in die Nahrungskette entweder durch Veränderung der Abbaurate oder der Nutzbarkeit für Makroinvertebraten nachhaltig beeinflussen (Bermingham, 1996). In ihrem vorwiegendem Lebensraum, den gut durchlüfteten, sauberen Gewässern, können bis zu 90 % der Biomasse-zersetzenden Organismen aquatische Hyphomyceten sein (Gessner und Chauvet, 1997). In Abhängigkeit von der Substratverfügbarkeit sowie der Temperatur unterliegt das Auftreten von AQH jedoch starken periodischen Schwankungen (Bärlocher, 2004).

In extrem belasteten Standorten des Mansfelder Landes (Abb. 5), einem Gebiet, das seit Jahrhunderten vom Kupferschieferbergbau geprägt wurde und mit den Folgen der Belastung zu kämpfen hat, existiert überraschenderweise eine große Vielfalt dieser aquatischen Hyphomyceten. In Oberflächengewässern, wie beispielsweise Haldensickerwässer oder kleinere Flussläufe, die durch Metalle und Metalloide (siehe Tab. 2 und Tab. 3) unterschiedlich belastet sind, konnten etwa 30 verschiedene Arten nachgewiesen werden (Krauss et al., 1998; Krauss et al., 2001; Sridhar, 2000; Sridhar et al., 2001). Dennoch weisen AQH eine hohe Sensitivität gegenüber Umweltbelastungen auf (Bermingham et al., 1998; Webster, 1981). So wurde in dem am stärksten belasteten Untersuchungsstandort H4 (25 µM Cd, 208 µM Cu, 9,3 µM Pb, 40 mM Zn) im Gegensatz zu anderen moderat bis wenig belasteten Standorten im Mansfelder Land die geringste Artenvielfalt (17 Spezies) gefunden (Krauss et al., 2003a; Sridhar, 2000).

Doch nicht nur in diesen teilweise stark belasteten Oberflächengewässern, sondern auch in Grundwässern des Mansfelder Landes wurde erstmals das Vorkommen von aquatischen Hyphomyceten nachgewiesen (Krauss et al., 2003b).

Die Fähigkeit von AQH in diesen zum Teil stark belasteten Gewässern zu überleben, erfordert eine Reihe biochemischer und struktureller Eigenschaften sowie physiologische und/oder genetische Adaptationen, die bisher nur sehr wenig aufgeklärt sind.

## 1.2 Schwermetalle und ihre Wirkung auf Pilze und Mikroorganismen

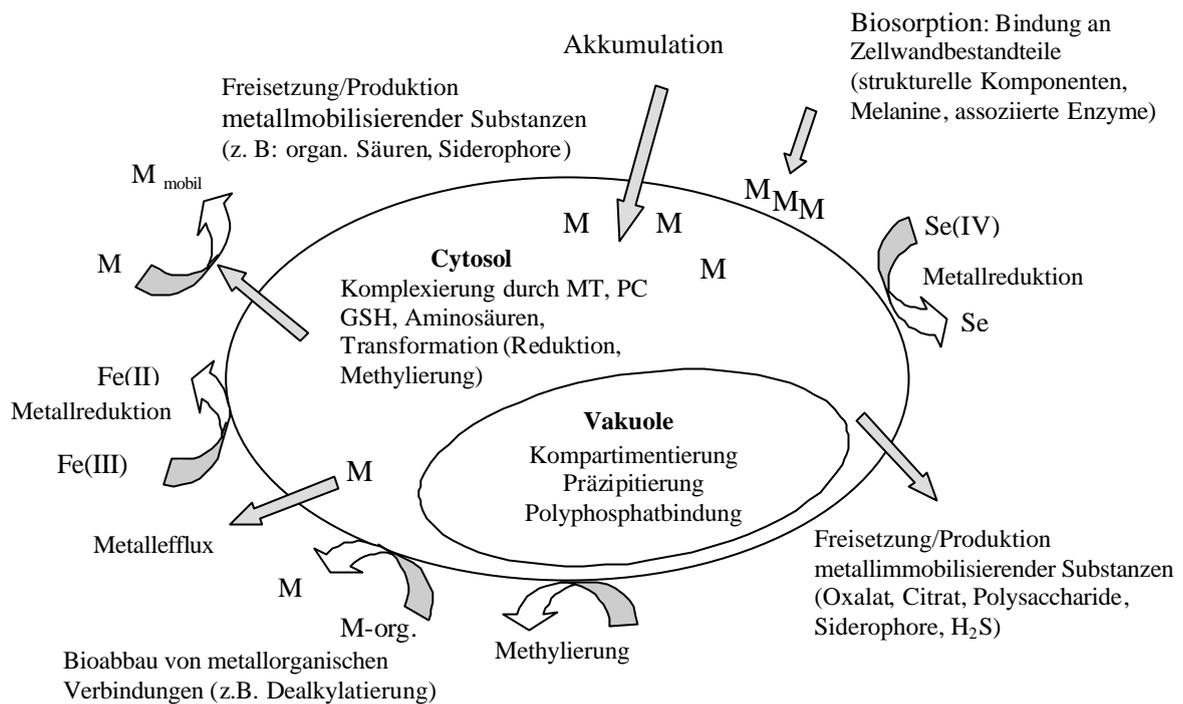
Alle Organismen, so auch Hefen und Pilze benötigen neben Stickstoff- und Kohlenstoffquellen (Makronährstoffe) Spuren- oder Mikronährstoffe für ihre Entwicklung. Zu den Spurenelementen gehört eine Reihe von Metallen, die aufgrund ihrer Dichte von ca.  $5 \text{ g/cm}^3$  und höher zu den Schwermetallen gezählt werden (Holleman und Wiberg, 1985). Die meisten Schwermetalle sind Übergangsmetalle mit unvollständig aufgefüllten d-Orbitalen. Diese d-Orbitale sind die Ursache, dass Schwermetall-Ionen eine Reihe von Komplexen bilden können, die teilweise redoxaktive Fähigkeiten besitzen (Nies, 1999). Die Schwermetalle mit der größten Bedeutung für die meisten Organismen im Stoffwechsel sind Eisen, Kupfer, Mangan, Kobalt und Zink (Van Ho et al., 2002). Zink spielt neben der Funktion als Cofaktor in über 300 Enzymen (z. B. Carboanhydrasen, Alkoholdehydrogenase, verschiedenen Isomerasen, RNA- und DNA-Polymerasen) vor allem als Strukturelement in Proteinen wie z. B. Zinkfingerproteinen eine entscheidende Rolle (Eide, 2000; Gaither und Eide, 2001; Van Ho et al., 2002).

Die Quellen der Schwermetallemission sind teils natürlichen (Vulkane, Verwitterung), teils anthropogenen Ursprungs (Rauchgase, Fabrikabwässer, Bergbau, Sondermüll, Autoabgase). Das nichtessentielle Element Cadmium findet in der Elektroindustrie und Galvanik, als Farbpigment in Farben und in Batterien eine weite Anwendung und tritt als Beiprodukt der Zink- und Eisengewinnung auf (Avery, 2001). Wie auch Zink zählt Cadmium nicht zu den redoxaktiven Metallen.

Neben der Funktion als Biokatalysatoren wirken sowohl essentielle als auch nichtessentielle Schwermetalle in Abhängigkeit von ihrer Konzentration als Zellgifte. So kann ein Überschuss an Eisen oder Kupfer die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies über die Fenton-Reaktion verursachen, die dazu führen, dass biologische Makromoleküle wie DNA, Proteine oder Lipide durch Oxidationen zerstört werden (Avery, 2001; Eide, 2000). Weiterhin können Metalle wie Cadmium, Blei oder Quecksilber an wichtige Domänen innerhalb der Enzyme binden, deren Funktion inhibieren und infolge dessen den gesamten Stoffwechsel beeinflussen. Diese Inaktivierung wird häufig durch die hohe Affinität zu Thiol-, Amino- und Carboxylgruppen verursacht.

Um dem entgegen zu wirken, haben Mikroorganismen eine Reihe von Mechanismen entwickelt, um sich vor einer Schwermetalltoxizität zu schützen. Eine Zusammenfassung dieser Interaktionen zeigt Abb. 1.

Die Metallbindung an der Zellwand und extrazelluläre Präzipitate stellen erste Schutzmechanismen nach außen hin dar. Die als Biosorption bezeichnete Bindung der Metalle an der Oberfläche resultiert aus den Wechselwirkungen der Metalle mit pilzlichen Zellwandbestandteilen, wie strukturellen Komponenten, Melaninen, anderen Pigmenten, zellwandassoziierten Enzymen und deren funktionellen Gruppen (Baldrian, 2003; Gadd, 1993; Singleton und Tobin, 1996). Diese Interaktionen schließen Ionenaustausch, Adsorption, Komplexbildung und Präzipitierung an der Zelloberfläche mit ein.



**Abb. 1** Interaktion von Metallen mit Pilzen (nach Gadd, 1993; 2001; Ledin, 2000)

Hefen und Pilze sind außerdem in der Lage, extrazelluläre Substanzen zur Metallpräzipitierung zu synthetisieren. So bilden vor allem Weißfäulepilze Oxalate und präzipitieren dadurch Calcium, Cadmium, Kobalt, Kupfer, Mangan, Strontium und Zink (Baldrian, 2003; Jarosz-Wilkolazka und Gadd, 2003). Aber auch Polysaccharide (Baldrian, 2003; Breierova et al., 2002) und andere Verbindungen wie H<sub>2</sub>S, Melanine, Citrat oder Siderophore können zur Metallpräzipitierung führen (Gadd, 1993; 2001).

Neben den extrazellulären gibt es eine Reihe weiterer Schutzmechanismen wie der verringerte Transport durch die Zellmembran, verbunden mit einer verringerten Akkumulation, ein aktiver Efflux sowie die Komplexierung der Metalle durch unterschiedlichste Verbindungen, z.B. Glutathion, Phytochelatine, Metallothioneine, Aminosäuren und Kompartimentierung in der Vakuole (Gadd, 2001; Gadd und Sayer, 2000; Mejare und Bulow, 2001).

Alle diese Reaktionen haben im Laufe der Entwicklung zu Schwermetallresistenzen, genetisch fixierte Eigenschaften, in Organismen geführt. Dabei ist die Resistenz im Gegensatz zur Toleranz eine direkte biochemische Reaktion auf eine Metallspezies. Die Toleranz hingegen wird durch intrinsische Eigenschaften bestimmt. Dabei führen beispielsweise pigmentierte, undurchlässige Zellwände, extrazelluläre Polysaccharide oder andere Metabolite, die zur Metallbindung beitragen, zu einer Toleranz (Gadd, 1993).

### 1.3 Die pilzliche Zellwand

Die pilzliche Zellwand beinhaltet eine Reihe unterschiedlichster Strukturen, die von der dünnen mehr oder weniger unstrukturierten Zellwand in der Wachstumszone bis zur zum Teil sehr dicken, festen Zellwand in alten Hyphen reicht (Burgstaller, 1997).

Sie hat eine Reihe verschiedener Funktionen zu erfüllen. Sie ist der erste Kontakt einer Zelle mit deren Umgebung und schützt sie vor chemischen und physikalischen Einwirkungen. Sie fungiert als kontrollierte Diffusionsbarriere für z.B. Metalle und kontrolliert zu einem gewissen Grad den Stoffaustausch mit der Umgebung (Gadd, 1993). Weiterhin ist sie für die Formgebung der Zellen verantwortlich und kann als Kohlenstoffreserve genutzt werden. In Hinsicht auf diese Funktionen ist es nicht verwunderlich, dass die Zellwand eine sehr komplexe und dynamische Struktur aufweist (Kuhn und Trinci, 1990; Peberdy, 1990).

Sie enthält Chitin-Mikrofibrillen, die von einer amorphen Schicht aus Proteinen und Polysacchariden (Mannan, Glucan, Galaktane) umgeben ist. Eine Zusammenfassung allgemeiner pilzlicher Zellwandbestandteile zeigt Tab. 1. Die Zellwandbestandteile können zwischen den verschiedenen Pilzgruppen, als auch innerhalb einer Gruppe, sogar innerhalb derselben Art deutlich variieren, was häufig für phylogenetische Analysen herangezogen wird (Ahrazem et al., 2001; Prillinger et al., 1993).

Die Zellwände der meisten Hefen bestehen hauptsächlich aus Mannoproteinen, die mit  $\beta$ -1,3-Glucankomponenten verknüpft sind (Peberdy, 1990).

**Tab. 1 Bestandteile der pilzlichen Zellwand (nach Gadd, 1993; Peberdy, 1990)**

<b>Stützsubstanzen</b>	
Chitin:	$\beta$ -1,4-verknüpftes Homopolymer aus N-acetyl-D-Glucosamin
$\beta$ -Glucane:	Homopolymer aus Glucoseeinheiten mit $\beta$ -1,3- und $\beta$ -1,6-glycosidischer Bindung
Cellulose:	$\beta$ -1,4-verknüpftes Homopolymer aus D-Glucose
<b>Matrixkomponenten</b>	
$\alpha$ -Glucan:	$\alpha$ -1,3-verknüpftes Homopolymer aus D-Glucose
Glycoproteine, Mannoproteine	
<b>Weitere Bestandteile</b>	
Chitosan:	$\beta$ -1,4-verknüpftes Polymer aus D-Glucosamin
D-Galaktosaminpolymere, Polyuronsäuren, Melanine, Lipide	

Die Zellwand mit ihrer unterschiedlichen Struktur bietet eine Reihe von Bindungsstellen für Metallionen. Zu den bevorzugten Bindungsstellen in der pilzlichen Zellwand gehören Amino-Phosphoryl-, Sulfhydryl-, Carboxyl- oder Hydroxylgruppen. Carboxylgruppen werden dabei als eine Hauptkomponente der Metallbindung in der pilzlichen Zellwand postuliert. Fourest et al. (1996) zeigten in *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *Penicillium crysogenum* und *Trichoderma reesei*, dass der Carboxyl-Gehalt mit 30 % - 70 % an der Zn(II)-Bindung beteiligt ist. Diese

Bindekapazitäten, die eine wichtige Rolle bei Biosorptionuntersuchungen spielen, sind Metall- und Organismus-abhängig (Volesky und Holan, 1995).

Umweltfaktoren wie die Anwesenheit verschiedener Metallionen können die Zellwandzusammensetzung beeinflussen. So zeigte die Zellwand von *Fusarium oxysporum*-Kulturen, die in Gegenwart von Kupfer kultiviert wurden, Unterschiede in der Zusammensetzung der Gesamtzuckerkomponenten (Anstieg) und eine Zellwandverdickung (Hefnawy und Razak, 1998). Dagegen wurde in *Cunninghamella blakesleeana* eine Verringerung des Zuckeranteils unter Kupferstress beobachtet (Venkateswerlu und Stotzky, 1986). Somit könnte die Modifikation der Zellwand in verschiedener Weise ein wichtiger Mechanismus sein, mit dem Pilze auf Stressbedingungen reagieren.

## 1.4 Metallaufnahme

Für physiologische Untersuchungen des Metabolismus' ist der intrazelluläre Metallgehalt von Bedeutung. Bei biotechnologischen Fragestellungen hingegen wird selten zwischen extra- und intrazellulär gebundenem Metall unterschieden, obwohl auch hier von der Metallaufnahme gesprochen wird. Oft wird in diesem Zusammenhang von einer Metabolismus-unabhängigen (**Biosorption**) und Metabolismus-abhängigen Aufnahme (**Akkumulation**) gesprochen (Blackwell et al., 1995).

Im weiteren soll nur auf die energieabhängige Metallaufnahme (intrazelluläre Akkumulation) eingegangen werden. Sie ist gegenüber der Biosorption ein langsamerer Prozess und in erster Linie vom pH-Wert, der Temperatur, dem Vorhandensein anderer Ionen im Medium und dem Organismus (hier Hefen) selbst abhängig (Blackwell et al., 1995).

Der Transport von mono- und bivalenten Kationen in filamentösen Pilzen wird vor allem durch das Membranpotential ( $\Delta\phi$ ) und den Protonengradienten ( $\Delta\text{pH}$ ) an der Plasmamembran getrieben. Dabei scheint die  $\text{H}^+$ -ATPase-Aktivität nicht nur in der Aufrechterhaltung des Protonengradienten eine wichtige Rolle zu spielen, sondern auch in der Regulierung der Aufnahme potentiell toxischer Metallionen (Burgstaller, 1997; Gadd, 1993).

Für essentielle Metalle wie Eisen, Kupfer, Mangan oder Zink existieren zwei oder mehr spezifische Transporter im Modellobjekt *Saccharomyces cerevisiae* (Eide, 2000; Van Ho et al., 2002). Beispielsweise wurden in diesem Organismus bisher 2 Zinkaufnahme-Systeme identifiziert. Dabei codiert das *ZRT1*-Gen für den Transporter des hoch affinen Aufnahmesystems und *ZRT2* für den Transporter des niedrig affinen Aufnahmesystems (Zhao und Eide, 1996a, b). Doch muss es noch mindestens ein weiteres Transportsystem geben, da *zrt1zrt2* Deletionsmutanten überlebensfähig sind (Gaither und Eide, 2001).

Wie für Zink konnten in *S. cerevisiae* auch für Kupfer, Eisen und Mangan hoch und niedrig affine Transportsysteme, deren Regulation von einer Vielzahl äußerer Faktoren abhängig ist, identifiziert werden (Eide, 2000; Radisky und Kaplan, 1999; Van Ho et al., 2002).

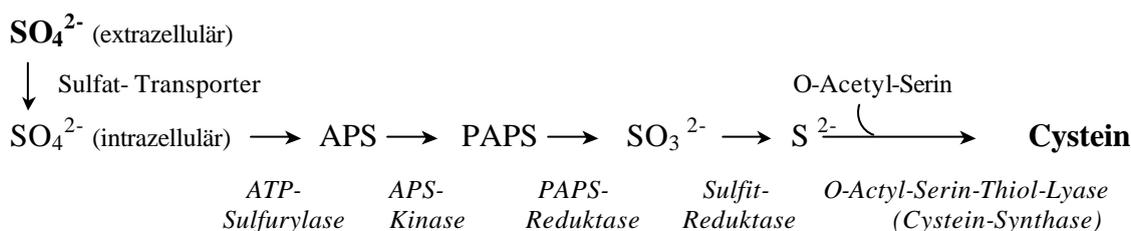
Teilweise basierend auf dem Wissen aus *S. cerevisiae* wurden bisher mehr als 80 Zink-Transporter aus verschiedenen Eukaryonten identifiziert (Gaither und Eide, 2001). Im Gegensatz zum prokaryontischen System, wo Zink-Transporter zur Familie der ABC-Transporter (ATP-binding cassette) und P-Typ-ATPasen gehörend identifiziert wurden (Nies, 1999), spielen diese im eukaryontischen System keine große Rolle. Hier wurden Transporter nachgewiesen, die zur Familie der ZIP- (ZRT-, IRT-like Proteins) und CDF- (Cation Diffusion Facilitator) Transporter gehören (Gaither und Eide, 2001). Letztere stellen im Gegensatz zu den ZIP-Transportern Efflux-Systeme dar.

Die Aufnahme der meisten für pilzliche Organismen nicht essentiellen Schwermetallionen erfolgt über Transporter, Ionenkanäle/-pumpen oder Carrier essentieller Ionen, z.B. Calcium, Eisen, Zink (Clemens und Simm, 2003; Gadd, 2001; Gomes et al., 2002). Für Cadmium ist bisher kein eigenes Transportsystem bekannt. Es wird angenommen, dass vor allem der Calcium-Transporter LCT1 eine wichtige Rolle in der Cadmiumaufnahme in *Schizosaccharomyces pombe* spielt (Clemens et al., 1998). In *S. cerevisiae* konnte weiterhin eine Assoziation des Cadmium-Transports mit den Nramp-Transportern (natural resistance associated macrophage protein) Smf1p und Smf2p nachgewiesen werden, die eigentlich für den Transport von Mangan und Kobalt verantwortlich sind (Liu et al., 1997; Portnoy et al., 2000). Blaudez et al. (2000) fanden für den Ektomyorrhiza-Pilz *P. involutus* heraus, dass die Cd(II)-Aufnahme sowohl vom Membranpotential, vom Carrier-vermittelten Transport als auch vom Calcium-Transport abhängig ist.

## **1.5 Thiolhaltige Peptide und Proteine in der Schwermetallstressantwort bei Pilzen**

### **1.5.1 Sulfatassimilation und Cystein-Biosynthese**

Schwefel in Form von Sulfat ist eines der sechs Makronährstoffe in Pflanzen und Pilzen und wird in den Aminosäuren Cystein, Methionin und einer Reihe weiterer Metabolite gefunden (Leustek und Saito, 1999). In Folge des Schwefelstoffwechsels kommt es durch Sulfat-assimilation (Abb. 2) und weiteren Reaktionen zur Synthese verschiedener Metabolite (Sulfid, Cystein,  $\gamma$ -Glutamylcystein, Glutathion), die in der Schwermetalldetoxifikation eine essentielle Rolle spielen. Dabei erfolgt die Reduktion des Sulfats über Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) und Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) zu Sulfit und weiter zu Sulfid. Die Reduktion zum Cystein erfolgt für die Ascomyceten *Aspergillus nidulans* und *Neurospora crassa* wie in Abb. 2 gezeigt. Dabei kann Cystein auch aus Homocystein und Cystathionin regeneriert werden. Die Hefe *S. pombe* zeigt diesen letzten Schritt nicht. In *S. cerevisiae* hingegen erfolgt die Cysteinsynthese nur über Homocystein und Cystathionin und nicht aus O-Acetyl-Serin und Sulfid (Brzywczy et al., 2002; Marzluf, 1997).



**Abb. 2 Schwefelassimilation bis zum Cystein in *A. nidulans* und *N. crassa* (nach Marzluf, 1997)**

Die Aufnahme von Sulfate in *S. cerevisiae* erfolgt ähnlich wie in Pflanzen (Hawkesford et al., 1993; Leustek und Saito, 1999) als Protonensymport im Verhältnis 1:3 (Burgstaller, 1997). In *N. crassa* werden Sulfatpermeasen für den Transport verantwortlich gemacht (Marzluf, 1997). Die Regulierung und Aufrechterhaltung des Schwefelstoffwechsels in Pilzen ist noch nicht vollständig geklärt. Erschwerend zeigt sich dabei, dass die Erkenntnisse zur Regulierung von einem pilzlichen Organismus nicht ohne Weiteres auf einen anderen übertragen werden können, wie die Beispiele *A. nidulans* und *N. crassa* zeigen (Marzluf, 1997).

## 1.5.2 Glutathion

Glutathion (GSH; L- $\gamma$ -Glutamyl-L-Cysteinylglycin) ist das am häufigsten in pflanzlichen, tierischen und pilzlichen Zellen vorkommende niedermolekulare Thiol mit einer Konzentration von bis zu 10 mM (Leustek und Saito, 1999; Penninckx, 2002). Die Synthese erfolgt in zwei ATP-abhängigen Schritten, wobei die  $\gamma$ -EC-Synthetase (EC 6.3.2.2), codiert durch das *GSH1*-Gen, Cystein und Glutamat durch eine Isopeptidbindung verknüpft und die GSH-Synthetase (EC 6.3.2.1), codiert durch das *GSH2*-Gen, Glycin addiert (Abb. 3). Dabei unterliegt die  $\gamma$ -EC-Synthetase einer feedback-Inhibierung durch GSH und wird transkriptional, wie auch die GSH-Synthetase, kontrolliert (Meister, 1989; Noctor et al., 2002; Penninckx und Elskens, 1993; Wheeler et al., 2002; Xiang und Oliver, 1998). Die ungewöhnliche Bindung des  $\gamma$ -C-Atoms des Glutamats mit der Aminogruppe des Cystein stellt möglicherweise einen außergewöhnlichen Schutz gegen proteolytischen Abbau des Glutathions dar (Grant et al., 1996).



**Abb. 3 Biosynthese von Glutathion (nach Meister, 1989)**

Aufgrund der nukleophilen Eigenschaften der Thiolgruppe des Cysteins (Abb. 4), agiert GSH in erster Linie als Schutzmechanismus gegen reaktive Sauerstoffspezies und andere elektrophile Verbindungen wie Toxine, Xenobiotika oder Schwermetalle. Sein niedriges Redoxpotential ( $E'_{\text{o}} = -240 \text{ mV}$  für die Thiolgruppe) gibt diesem Tripeptid die Eigenschaft eines zellulären Redoxpuffers (Penninckx, 2002). Doch Glutathion hat im Stoffwechsel eine weitaus komplexere



Glutathion für die Regenerierung von Dehydroascorbat zu Ascorbat, einem weiteren Antioxidans, verantwortlich ist (Noctor und Foyer, 1998).

GSH spielt eine Schlüsselrolle in der zellulären Abwehr gegen reaktive, elektrophile Verbindungen. Viele Xenobiotika können entweder spontan oder über die GSH-S-Transferase mit der Thiolgruppe des Glutathions reagieren. Diese GSH-X-Konjugate können dann durch den YCF1-Transporter (Li et al., 1996) oder durch V-Typ-ATPasen als Anion-Uniport in die Vakuole transportiert und somit entgiftet werden. Aber auch ein Transport der GSH-X-Konjugate mittels ATP-getriebenen System nach außen scheint möglich (Penninckx, 2002).

Unter dem Einfluss von Schwermetallen kommt GSH weiterhin die Funktionen eines Komplexbildners zu. Auf Grund der chemischen Reaktivität sollte GSH in der Lage sein auch mit Schwermetallen Komplexe einzugehen. In *Candida glabrata* konnte die Bindung von GSH an Cadmium gezeigt werden, wobei GSH mit zunehmender Kulturdauer durch Phytochelatine, einem Kondensationsprodukt (siehe 1.5.3) aus Glutathioneinheiten, ersetzt wurde (Barbas et al., 1992). Auch CdS-Partikel, umgeben von GSH, wurden unter bestimmten Kulturbedingungen in dieser Hefe gefunden (Dameron et al., 1989b). In *S. cerevisiae* hingegen wird allein dem Bis-(glutathionato)-cadmiumkomplex  $[Cd(GSH)_2]$  die Funktion der Cadmiumkomplexierung zugeschrieben (Li et al., 1997). Inwieweit GSH alleiniger Chelator für Schwermetalle sein kann ist bis jetzt noch völlig unklar.

Eine weitere wichtige Bedeutung des GSH liegt in der Präkursorfunktion für Phytochelatine, die eine Hauptfunktion in der Schwermetallkomplexierung in vielen Organismen übernehmen.

### 1.5.3 Phytochelatine

Phytochelatine (PC) stellen eine Gruppe Schwermetall-bindender Peptide in höheren Pflanzen und einigen Pilzen dar. Sie wurden erstmals von Murasugi et al. (1981) in *S. pombe* als cadmiumbindende Peptide beschrieben und später von Kondo et al. (1984) als Cadystine bezeichnet. Kurz darauf wurden Peptide der gleichen Struktur auch in Pflanzen gefunden und als Phytochelatine bezeichnet (Grill et al., 1985).

Das Vorkommen der PC beschränkt sich nicht mehr ausschließlich auf das Pflanzen- und Pilzreich. Infolge von Klonierungsexperimenten konnten auch Homologe des Phytochelatin-synthase-Gens in *Caenorhabditis elegans* (Nematode) und *Dictyostelium discoideum* (Schleimpilz) nachgewiesen werden (Clemens et al., 2001; Cobbett und Goldsbrough, 2002; Vatamaniuk et al., 2001, 2002)

Phytochelatine sind Polymere der Struktur  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-X}$  (Abb. 4). Neben  $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-Gly}$ , der am häufigsten auftretende Form sind folgende weitere Strukturen bekannt:  $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-Glu}$  aus Mais,  $(\gamma\text{-GluCys})_n$  aus Mais und einigen Hefen,  $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$  in Leguminosen,  $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-Ser}$  in Reis sowie  $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-Gln}$  aus Meerrettich (Chassaigne et al., 2001; Rauser, 1999; Schat et al., 2002).

Unter Schwermetallexposition werden PC durch die Übertragung einer  $\gamma$ -Glu-Cys-Einheit aus Glutathion auf ein weiteres Glutathion- oder PC-Molekül durch das konstitutive Enzym Phytochelatinsynthase (EC 2.3.2.15) nichtribosomal synthetisiert (Grill et al., 1989). Kinetische Studien haben gezeigt, dass die Biosynthese innerhalb von Minuten erfolgt und unabhängig von der *de novo* Proteinsynthese ist (Cobbett, 2000a). Der Zusammenhang zwischen PC- und GSH-Biosynthese wird auch dadurch deutlich, dass ein Defekt im GSH-Metabolismus zu einem Verlust der PC-Synthese in der Hefe *S. pombe* führte (Mutoh und Hayashi, 1988).

Die Regulation der PC-Synthaseaktivität ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Es scheint, dass sowohl Cadmium oder andere Metallionen (Kupfer, Silber, Quecksilber, Zink, Blei, Arsen, Gold) in freier Form (Oven et al., 2002b) als auch Schwermetall-Glutathion-Thiolate bzw. GSH-Derivate mit blockierten Thiolgruppen darin involviert sind (Cobbett und Goldsbrough, 2002; Vatamaniuk et al., 2000).

Aber auch andere Faktoren, wie die Verletzung der Zellwand oder Chitosanbehandlung (Hayashi et al., 1992) oder die Exposition mit den Fungiziden Tetramethylthiuramdisulfid (TMTD) und Dimethyldithiocarbamat (DMDTC) führten in der Hefe *S. pombe* zu einer PC-Induktion (Mutoh et al., 1991).

Die Chelatierung der Schwermetalle durch Phytochelatine erfolgt cytosolisch und die Komplexe (LMW: *low molecular weight* in Bezug auf das Elutionsverhalten in der Ausschlusschromatographie) werden, ähnlich wie die GSH-Cd-Komplexe, über einen ABC-Transporter, lokalisiert im Tonoplasten, in die Vakuole transportiert (GSH-Cd = YCF1; Li et al., 1997; PC-Cd = HMT1; Ortiz et al., 1995). In den Vakuolen kann es durch Einlagerung von Sulfid zur Bildung sogenannter HMW- (*high molecular weight*) Komplexe kommen. Dabei übernimmt Sulfid eine wichtige Rolle in der Stabilisierung (Cobbett und Goldsbrough, 2002).

In *C. glabrata* wurden CdS-Komplexe auch im Cytosol detektiert, die erst mit zunehmender Kulturdauer in die Vakuole transportiert wurden (Mehra et al., 1994).

Die Art der Ausbildung der verschiedenen Komplexe ist von den Wachstumsbedingungen abhängig. *S. pombe* und *C. glabrata*, kultiviert in Vollmedium und exponiert mit Cadmium, formen CdS-Partikel, die mit GSH und  $\gamma$ -EC umgeben sind. Die gleichen Bedingungen im Minimalmedium führten zur Bildung eines Cadmiumadduktes, das von Peptiden der Struktur  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  umgeben war (Dameron et al., 1989b).

Neben einigen Hefe- bzw. Pilz-Arten, die in der Lage sind höhermolekulare PC zu synthetisieren, z. B. *S. pombe*, *M. racemosus* (Kondo et al., 1984; Miersch et al., 2001) konnte in anderen Vertretern nur PC der Struktur  $(\gamma\text{-GluCys})_2\text{-Gly}$ , wie es auch in *H. lugdunensis* der Fall ist, identifiziert werden. So wurde in *C. glabrata* (Mehra et al., 1988) *S. cerevisiae* und *N. crassa* (Kneer et al., 1992) sowie *Saccharomyces exiguus*, *Pichia farinosa*, *Torulaspora delbrueckii*,

*Kluyveromyces lactis* und *Saccharomyces carlsbergensis* nur die Fähigkeit zur PC 2-Synthese beobachtet, jedoch keine PC-Synthase-Aktivität nachgewiesen (Inouhe et al., 1996).

Neben dem bereits beschriebenen Syntheseweg konnte ein zweiter Syntheseweg in *S. pombe* nachgewiesen werden. Dabei ist der erste Schritt eine Polymerisation, bei dem  $\gamma$ -EC von  $(\gamma\text{-EC})_n$  auf GSH durch entweder GSH-Synthetase, eine Carboxypeptidase oder ein bisher unbekanntes weiteres Enzym übertragen wird. Anschließend wird durch die GSH-Synthetase ein Glycin addiert (Hayashi et al., 1991). Eine *S. pombe* Mutante, defizient in der PC-Synthese, konnte durch den Einbau des *gsh2* Gens für die Glutathionsynthetase wieder die Fähigkeit zur PC-Synthese erlangen (Al-Lahham et al., 1999). Dies lässt den Schluss zu, dass der Glutathionsynthetase möglicherweise eine Nebenrolle in der PC-Synthese zukommen könnte.

Eine weitere Möglichkeit ist die Neusynthese von PC durch Carboxypeptidasen (CPasen). Neben einem Abbau des Glutathions fanden Imai et al. (1996) und Tsuchisaka et al. (1999) die Synthese von PC 2. Ein in *E. coli* transformiertes Carboxypeptidase-Gen aus Reis bewirkte ebenfalls eine PC 2-Syntheseaktivität. Auch CPase-transformierte Tabakzellkulturen zeigten bei Zusatz von GSH zum zellfreien Extrakt und nach Inkubation unter 100  $\mu$ M Cadmium eine PC 2-Syntheseaktivität. Außerdem waren diese Kulturen Cadmium-toleranter (Tsuchisaka et al., 2000).

Nach der Entdeckung und Aufklärung der Struktur von Phytochelatinen in Pflanzen wurde vermutet, dass sie das funktionale Äquivalent zu den Metallothioneinen im tierischen Organismus sind. Doch nach der Entdeckung verschiedener Metallothionein-Gene in Pflanzen ist diese Aussage nicht mehr haltbar (Cobbett und Goldsbrough, 2002).

#### 1.5.4 Metallothioneine (MT)

Metallothioneine sind kleine, gencodierte, cysteinreiche, keine aromatischen Aminosäuren enthaltende, ubiquitär im Tierreich vorkommende Polypeptide von denen lange bekannt ist, dass sie eine Reihe von  $d^{10}$ -Metallionen wie Cadmium, Zink and Kupfer binden. Sie spielen sowohl in der Metallhomöostase der Zelle als auch in der Schwermetalldetoxifikation eine entscheidende Rolle (Hamer, 1986).

Mittlerweile wurden MT-Gene weit verbreitet im Pflanzen- und Pilzreich, und sogar bei Prokaryonten (*Synechococcus*) gefunden (Cobbett und Goldsbrough, 2002).

In einigen pilzlichen Systemen z. B. in *Beauveria bassiana* (Kameo et al., 2000) oder *Pichia farinosa* und *Torulasporea delbrueckii* (Inouhe et al., 1996) wird von Metallothioneinen gesprochen, obwohl nur die Bindefähigkeit zu Metallionen nachgewiesen wurde und keine Aminosäure- oder Gensequenz bekannt sind.

Die Synthese der MT wird auf transkriptionalem Level durch verschiedene Faktoren wie Metalle, oxidativen Stress (Liu und Thiele, 1997) aber auch Alterungsprozesse (Averbeck et al., 2001) oder Apressorienbildung (Hwang und Kolattukudy, 1995) reguliert bzw. induziert.

Der häufigste Induktor der MT-Synthese in Tieren und Hefen ist Kupfer(II), wobei auch Zink und Cadmium zur Induktion beitragen können.

In *S. pombe* wurde kürzlich ein Metallothionein-Gen (*zym1*) identifiziert, das in der Zink-Homöostase eine Rolle zu spielen scheint, aber auch durch Cadmium, jedoch nicht durch Kupfer beeinflusst werden kann (Borrelly et al., 2002). Ob es eine Rolle in der Cadmiumtoleranz spielt ist ungewiss, denn  $\Delta$ *zym1*-Mutanten zeigten kein verändertes Verhalten gegenüber dem Wildtyp unter Cadmium-Belastung (Clemens und Simm, 2003). In *C. albicans* (Oh et al., 1999), *C. glabrata* (Mehra et al., 1988), *Agaricus bisporus* (Münger und Lerch, 1985), *N. crassa* (Lerch, 1980) und *S. cerevisiae* (Prinz und Weser, 1975) wurden Proteine (MT) isoliert, die vor allem durch Kupfer induzierbar waren. *S. cerevisiae*, welches sehr häufig als Modellobjekt eingesetzt wird, zeigte weiterhin eine Induzierbarkeit des MT durch Cadmium (Inouhe et al., 1989).

Das Metallothionein-Gen *CUP1* welches in *S. cerevisiae* jedoch nicht in *S. pombe* gefunden wurde, vermittelt die Kupfer- und Cadmiumresistenz. Das CUP1-Protein chelatiert dabei die Metallionen, wie es auch für die tierischen und einige pilzliche Metallothioneine beschrieben wird. Wird dieses Gen auf normalem Level exprimiert, so vermittelt es nur die Kupferresistenz. Wird es überexprimiert, so kann es auch gegen Cadmium schützen. Es ist jedoch nicht in der Lage Nickel-, Kobalt- oder Zink-Resistenz zu vermitteln (Perego und Howell, 1997).

Ein weiteres Kupfer-Resistenz-Gen in *S. cerevisiae* ist *CRS5* (copper resistance suppressor), dessen Produkt Homologien zum tierischen Metallothionein zeigt (Culotta et al., 1994). Im Gegensatz zu *CRS5* ist *CUP1* jedoch potenter in der Kupferresistenz. Eine mögliche Ursache dafür ist, dass jedes *CUP1*-Gen vier UAS-Regionen (upstream activation sequence) enthält, *CRS5* hingegen nur eine solche Promotorsequenz (Perego und Howell, 1997). Der Einfluss von Cadmium auf *CRS5* bleibt momentan noch offen.

Die Expression der Metallothionein-Gene wird durch eine Reihe von Transkriptions-Faktoren geregelt. In *S. cerevisiae* wird *CUP1* und möglicherweise auch *CRS5* durch das *CUP2/ACE1*-Gen, welches ein 225 Aminosäuren langes Protein codiert, reguliert. Dabei verursacht Kupfer eine Veränderung im ACE1-Polypeptid, was eine Bindung dessen an den vier Bindestellen in der *CUP1*-Gen-Promotor-Region fördert (Culotta et al., 1994; Perego und Howell, 1997). Die unterschiedliche Regulierung durch die Transkriptionsfaktoren mag dafür verantwortlich sein, dass das *CUP1*-Gen zum einen Kupfer- und zum anderen Cadmiumresistenz vermitteln kann (Tohoyama et al., 1992).

Die Klassifizierung der MT erfolgt anhand ihrer Struktur. Die zahlreichen Cysteinylreste, die in der Metallkomplexierung involviert sind, kommen in zwei Sequenzabschnitten in Domänen der Form -Cys-Cys-, -Cys-X-Cys- oder -Cys-X-X-Cys- vor (Hamer, 1986). Danach wurden sie lange in MT der Klasse I oder II eingeteilt, wobei die Klasse I der Verteilung der Cysteine in Säuger-MT entsprach. Binz und Kägi (1999) schlugen eine neue Klassifizierung vor, die die

Sequenzhomologien und phylogenetischen Verwandtschaften mehr berücksichtigen soll. Nach diesem Einteilungsprinzip gehören die pilzlichen MT zu den Familien 8-13 und die Phytochelatine zur Familie 99 (in: SWISS\_PROT: <http://www.expasy.org/cgi-bin/list?-metallo.txt>). Dieses System hat sich jedoch noch nicht endgültig durchgesetzt (Cobbett und Goldsbrough, 2002).

### 1.5.5 Metallochaperone

Für die Metallhomöostase einer Zelle spielen neben den MT Metallochaperone eine bedeutende Rolle. Sie sind spezifische, diffusionsfähige Metallionenrezeptoren, die in die intrazelluläre Metallverteilung involviert sind. Nach heutigem Kenntnisstand stellen Metallochaperone jedoch keine Detoxifikationsproteine dar (O'Halloran und Culotta, 2000).

Die Konzentration freier Metallionen, z.B. Kupfer in der Zelle ist unter physiologischen Bedingungen so gering, dass ihre Verteilung zu den Orten des Verbrauchs nur über Hilfsproteine verlaufen kann (Rae et al., 1999). In *S. cerevisiae* wurde erstmals von Tzagoloff und Mitarbeiter (Glerum et al., 1996) das Protein COX17 (*cytochrome c oxidase*) beschrieben, das sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien lokalisiert ist und eine Art Shuttle-Protein für Kupfer [Cu(I)] zum Cytochrom-c-Oxidase-Komplex darstellt. Die vier der sechs Cysteinyreste sind dabei in der Metallkomplexierung und -verteilung involviert (Srinivasan et al., 1998).

Ein weiteres Shuttle-System in *S. cerevisiae* ist ATX1 (*anti-oxidant*). Es bindet Kupfer über Cysteinygruppen und transportiert diese zur CCC2 P-Typ-ATPase, einem Kupfertransporter welcher im Golgi-Apparat lokalisiert ist (O'Halloran und Culotta, 2000).

Weiterhin konnte in *S. cerevisiae* LYS7 (erstmalig als im Lysinstoffwechsel involviertes Protein beschrieben) als Kupferchaperon identifiziert werden, welches für die Inkorporation von Kupfer in die Cu/Zn-Superoxiddismutase verantwortlich ist (Culotta et al., 1997).

Auch wenn bis jetzt nur Metallochaperone für Kupfer identifiziert wurden und erste Hinweise für ein mögliches Eisenchaperon vorliegen (O'Halloran und Culotta, 2000), so ist es doch wahrscheinlich, dass auch für andere essentielle Metalle, die als Co-Faktoren dienen, solche „Metallverteilungssysteme“ existieren. Für *E. coli* konnte beispielsweise gezeigt werden, dass praktisch kein freies Zink vorliegt, was auf mögliche intrazelluläre Zink-Transportsysteme schließen lässt (Outten und O'Halloran, 2001).

## 1.6 Ziel der Arbeit

Aquatische Hyphomycete, denen bisher eine hohe Sensitivität gegenüber Schwermetallen nachgesagt wurde, treten in erstaunlich hoher Artenvielfalt in extrem belasteten Standorten des Mansfelder Landes auf. Als primäre Destruenten erfüllen sie in der Nahrungskette des aquatischen Ökosystems eine bedeutende ökologische Rolle. Anthropogene Einflüsse, z.B. ein hoher Schwermetalleintrag, können dieses Gefüge empfindlich stören.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein Beitrag zur Erkenntnis über die physiologisch-biochemischen Grundlagen der Anpassung dieser Organismengruppe an die extremen Bedingungen am Standort, speziell den hohen Schwermetallkonzentrationen, erbracht werden.

Es war zu klären, ob differente Standortbedingungen dazu führen, dass verschiedene Toleranzmechanismen entwickelt werden, die dann die Ausbildung unterschiedlicher Ökotypen bedingen. Für diese Untersuchungen wurde der am häufigsten vorkommende Vertreter der aquatischen Hyphomyceten „*Heliscus lugdunensis*“ herangezogen.

Aus zwei moderat belasteten und einem stark belasteten Standort wurden 3 *H. lugdunensis*-Stämme (H6-06-10, H8-2-1, H4-2-4) isoliert. Die Verifizierung der Zugehörigkeit dieser Stämme zu den Ascomyceten mittels 18S rDNA-Analyse stand am Anfang der Arbeit.

Für die physiologisch-biochemischen Untersuchungen hinsichtlich ihrer Stressantwort auf Cadmium und Zink wurden die zwei *H. lugdunensis*-Stämme H4-2-4 und H8-2-1 aus einem stark und einem moderat belasteten Standorten verglichen. Schwerpunkte der Untersuchungen waren das Wachstumsverhalten, der Wasserhaushalt, das Biosorptions- und Akkumulationsvermögen sowie der Thiolstoffwechsel (Sulfatversorgung, Cystein-,  $\gamma$ -Glutamylcystein-, Glutathionmetabolismus, Beeinflussung der Sulfidbiosynthese) auch im Hinblick auf die Anzuchtstemperatur und die Wachstumsphase.

Da der erste Kontakt eines Organismus mit seiner Umgebung die Zellwand ist und für *H. lugdunensis* bisher keine Informationen zur Zellwandzusammensetzung vorlagen, sollte diese in ersten Ansätzen (Zuckerkomponenten) geklärt und die Beeinflussung durch Cadmium und Zink bestimmt werden.

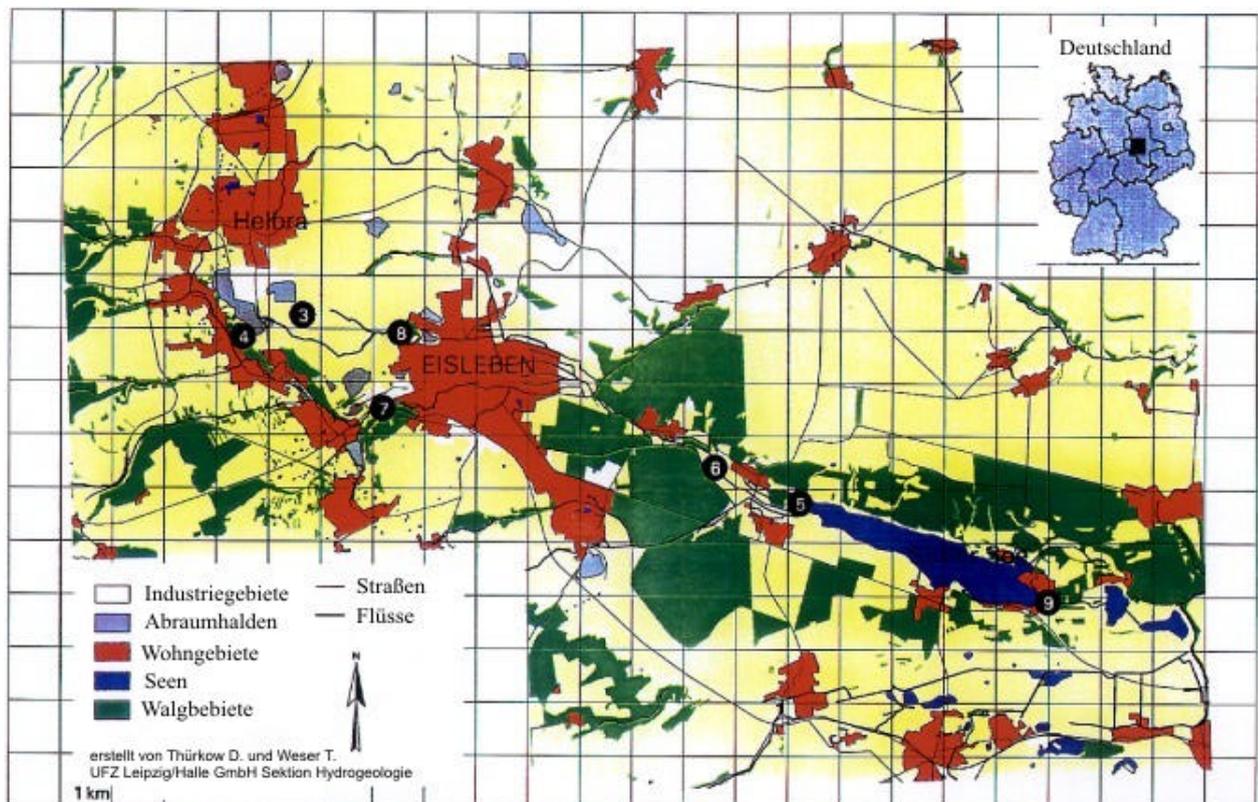
Der Einfluss weiterer Ionen (Sulfat, Magnesium) im Medium auf das Toleranzverhalten des Stammes H4-2-4 gegenüber Cadmium und Zink war zu untersuchen, da Schwermetalle am Standort nie als Einzelelemente vorkommen, was zu Ionenkonkurrenzen führen kann.

Abschließend stellte sich die Frage, ob die gefundenen Ergebnisse den Schluss erlauben, dass es sich bei den biochemisch untersuchten *H. lugdunensis* Stämmen H4-2-4 und H8-2-1 möglicherweise um zwei Ökotypen handelt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Herkunft der Pilze

Die für die phylogenetischen und biochemischen Untersuchungen herangezogenen Stämme des aquatischen Hyphomyceten *Heliscus lugdunensis* (Sacc. et Théry) H4-2-4, H8-2-1 und H6-06-10 stammen aus den Untersuchungsstandorten „Stadtborn Hergisdorf/Helbra (H 4)“, „Bach Glume bei Lutherstadt Eisleben (H 8)“ und „Bach Böse Sieben - Zufluss Süßer See/Wormsleben (H6)“ im Mansfelder Land (Abb. 5) (Krauss et al., 1998; Krauss et al., 2001).



**Abb. 5 Probenstandorte im Mansfelder Land**

Die Koordinaten der Standorte nach dem Transverse Mercator (Bessel)-System sind folgende: H4: x-4463985; y-5712061; H6: x-4474021; y-5708094; H8: x-4467731; y-5711315. Die Stämme wurden von G. Krauß (UFZ Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle Department Grundwassermikrobiologie) isoliert.

Die Untersuchungsstandorte sind durch unterschiedliche hydrochemische Daten (Tab. 2) und Schwermetallgehalte (Tab. 3) charakterisiert.

**Tab.2 Hydrochemische Daten der Standorte H4, H6 und H8 im Mansfelder Land (Krauss et al., 2001)**

Standort	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>		PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>		pH	Redoxpotential	Leitfähigkeit	Temperatur
	mg/L	µM	mg/L	µM				
H4	6750	70300	0,16	1,68	6,2	257	8,55	6,5
H6	570	5936	0,45	4,73	8,1	152	2,41	13,0
H8	850	8800	1,60	16,8	8,0	177	3,19	11,2

**Tab.3 Schwermetallgehalte der Standorte H4, H6 und H8 im Mansfelder Land (Krauss et al., 2001)**

Standort	Cd		Cu		Fe		Mn		Pb		Zn	
	mg/L	µM	mg/L	µM	mg/L	µM	mg/L	µM	mg/L	µM	mg/L	µM
H4	2,80	24,91	13,25	208,5	0,05	0,89	19,10	347,7	1,90	9,30	2600	39773
H6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,17	3,04	0,10	1,82	n.d.	n.d.	0,40	6,12
H8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,80	14,32	0,37	6,73	0,10	0,40	0,98	14,99

## 2.2 Anzucht der Pilze

### 2.2.1 Stammkultur

Die untersuchten *Heliscus*-Stämme wurden als Oberflächenkultur auf Agarplatten folgender Zusammensetzung angezogen (Atlas, 1997):

1,0 % Malz

1,5 % Agar

Dazu wurde aus einer Agarplatte mittels Korkbohrer (Durchmesser: 8 mm) ein mit Pilzmycel bewachsenes Agarstück (aus der Wachstumszone) ausgestant und auf eine neue Platte passagiert. Die Agarplatten wurden bei 14 °C im Dunkeln kultiviert.

### 2.2.2 Flüssigkultur

Die Anzucht der Pilze in Flüssigkultur erfolgte im Malz-Pepton-Medium (Atlas, 1997):

0,5 % Malz

0,1 % Pepton (Difco)

pH 5,0 – 5,2

Dazu wurden aus einer Oberflächenkultur mittels Korkbohrer Mycelstücke (Durchmesser: 8 mm) ausgestant und in sterilem, destilliertem Wasser im Verhältnis 1:1 mittels Ultra-Turrax ca. 1 min homogenisiert. 1 mL dieses Homogenisats diente zur Inokulation von 75 mL Flüssigmedium. Die Kultivierung erfolgte in 200 mL-Erlenmeyerkolben bei 14 °C (für Temperaturversuche auch bei 10 °C) und einer Schüttelgeschwindigkeit von 120 U/min. Nach zwei (H4-2-4) bzw. drei (H8-2-1) Tagen wurde dem Ansatz die entsprechende Menge einer steril filtrierten Schwermetalllösung in Form des Chlorides zur Einstellung der Schwermetallkonzentration zugegeben, wobei stets eine Kontrolle ohne Schwermetall mitgeführt wurde.

### 2.2.3 Wachstumsuntersuchungen

Um zu gewährleisten, dass genügend Material für weitere Untersuchungen zur Verfügung stand, wurden Kulturen der *Heliscus*-Stämme ohne Schwermetallbelastung wie unter 2.2.2 beschrieben angezogen und der Wachstumsverlauf bestimmt. Dafür wurde täglich das Pilzmycel über einen Papierfilter (Filtrax® 388) abgesaugt und das Trockengewicht bestimmt (2.6.1).

Ausgehend von diesen Untersuchungen wurde der Stamm H4-2-4 bei einer Anzuchtstemperatur von 14 °C nach 5 bzw. 7 Tagen und der Stamm H 8-2-1 nach 6 bzw. 8 Tagen während der logarithmischen bzw. stationären Wachstumsphase geerntet.

Für die Anzuchtstemperatur von 10 °C wurde H4-2-4 nach 8 Tagen und H 8-2-1 nach 10 Tagen nur in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet.

Die Wachstumsuntersuchungen wurden jeweils mit 3 Parallelen durchgeführt und mehrfach wiederholt.

### 2.2.4 Einfluss von Sulfat und Magnesium auf das Wachstum des *H. lugdunensis* Stammes H4-2-4

Der *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 aus dem stark belasteten Standort wurde hinsichtlich des Einfluss' anderer Ionen auf das Wachstum und die Schwermetalltoleranz näher untersucht. Dafür wurde dem Kulturmedium, das bereits eine Sulfatkonzentration von 0,2 mM besaß (Bestimmung mittels kapillarelektrophoretischer Methode siehe 2.6.10) Sulfat im Bereich von 0,5-20 mM als Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugefügt. Um den Einfluss von Magnesium zu untersuchen, wurde auch dieses in separaten Versuchen im Konzentrationsbereich von 0,5-20 mM als Magnesiumacetat [Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>] zugegeben.

## 2.3 Sporulation

Um die *Heliscus*-Stämme zum Sporulieren zu bringen, wurden aus einer Stammkultur (2.2.1) je 3 Agarstücke ausgestochen, in 150 mL sterilisiertes, bidestilliertes Wasser gegeben und 48-72 Stunden belüftet (steril).

Anschließend wurden diese Suspensionen durch einen Filter (Millipore® 8 µm) abgesaugt und mittels Zeiss Axiovert 200 mikroskopiert und mit Hilfe der AxioCamMRC (Zeiss) und der Software AxioVision 3.0 ausgewertet.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden – Isolierung und Charakterisierung der 18S rDNA

### 2.4.1 DNA-Isolierung

Zur Extraktion der pilzlichen DNA wurde der DNeasy Plant Mini Kit von QIAGEN verwendet und nach Vorschrift des Herstellers verfahren.

### 2.4.2 Gelelektrophorese

Die Reinheit der DNA wurde in 2 %igen Agarose-Gelen (Zusatz von Ethidiumbromid einer Endkonzentration von 0,5 µg/mL), die mit 0,5 x TAE-Laufpuffer (0,5 x TAE: 20 mM Tris-Acetat, pH 8,0; 0,5 mM EDTA) angesetzt und überschichtet wurden, überprüft. Die zu analysierende DNA wurde mit Ladepuffer (Blue/Orange Loading Dye, Promega, Mannheim) im Verhältnis 1:5 versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80-100 V und Raumtemperatur. Die Dokumentation erfolgte mittels Videoprintsystem (Pharmacia, Freiburg).

### 2.4.3 Primer-Design und DNA-Amplifikation mittels PCR

Die Amplifikation der 18S rDNA erfolgte nach Tab. 4 mit dem in Tab. 5 aufgeführten Programm unter Verwendung eines Sprint-PCR-Thermoblocks (Hybaid, Heidelberg).

**Tab. 4 Ansatz der Polymerase-Kettenreaktion**

Komponente	Volumen [µL]	Endkonzentration in PCR
Puffer Fermentas, MBI (10 x)	5	1 x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2	1 mM
Primer EF 3	1,5	0,21 pmol/µL
Primer EF 4	1,5	0,21 pmol/µL
dNTP's (10mM)	1,25	250 µM
<i>Taq</i> -Polymerase (5U/mL)	0,2	1 U
Template		100-500 ng
Steriles Bidest.	ad 50	

**Tab. 5 Temperaturprogramm der Polymerase-Kettenreaktion**

Zeit [s]	Temperatur in °C	Vorgang
120	94	1. Denaturierung der dsDNA
15	94	2.1 Denaturierung der dsDNA
30	50	2.2 Annealing
60	72	2.3 Elongation
		2.4 2.1-2.3 = 10 Zyklen
15	94	3.1 Denaturierung der dsDNA
30	50	3.2 Annealing
60 + 20	72	3.3 Elongation
		3.4 3.1 – 3.3 20 Zyklen
Maximal über Nacht	4	Lagerung

Zur Reinigung der DNA-Fragmente wurde der „PCR-Purification-Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet.

#### 2.4.3.1 Sequenzierung der DNA

Für die Sequenzierung der 18S rDNA wurden die in Tab. 6 aufgeführten Primer genutzt (Smit et al., 1999). Die Sequenzierung erfolgte mit dem ABI PRISM™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystem, Weiterstadt). Es wurden 0,5-1 µg des gereinigten PCR-Produktes mit 1 µL des entsprechenden Primers (4 pmol/µL) und 2 µL des „Dye Terminator Reaktion Kit“ versetzt und auf ein Endvolumen von 10 µL mit Bidest aufgefüllt.

**Tab. 6 Primer zur Amplifikation und Sequenzierung der 18S rDNA**

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Schmelztemperatur [°C]*
EF3	TCC TCT AAA TGA CCA AGT TGG	54,0
EF4	GGA AGG GRT GTA TT ATT AG	52,2
Pi18S1	TGT ATT CGA GCA TAG GCC TGC	59,8
Pi18S2	CGT CCG GAT ACG AGC TTA TGT	59,8
Pi18S3	ACA TAA GCT CGT ATC CGG ACG	59,8
Pi18S4	GCA GGC CTA TGC TCG AAT ACA	59,8
Pi5	GTT CGG CAC CTT ACG AGA AAT C	60,3

\*Schmelztemperatur nach Angaben des Herstellers (MWG-Biotech AG Ebersberg)

Die Sequenzierung erfolgte in 33 Zyklen im Termocycler (Hybaid, Heidelberg) mit folgendem Programm:

Denaturierung (1 x)		2 min	94 °C
Amplifikation (33 x)	Denaturierung	30s	94 °C
	Annealing	15s	(5 °C unter der Primerschmelztemperatur)
	Elongation	120s	60 °C
	Lagerung	4 °C	

Das Produkt wurde anschließend mit 30 µL 99% Ethanol versetzt und bei Raumtemperatur 12000 U/min für 20 min zentrifugiert (Eppendorf 5415C). Nach dem Waschen mit 70% Ethanol und Zentrifugation wurden die Proben an der Luft getrocknet und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Die Elektrophorese erfolgte nach Angaben des ABI PRISM™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit und wurde mit dem ABI PRISM 377 ( PE Biosystem, Weiterstadt) ausgewertet.

#### 2.4.4 Medien zur Anzucht von *E. coli*-Zellen

Die zur Anzucht von *E. coli* verwendeten Nährmedien hatten folgende Zusammensetzung:

- Nährbouillon: 15 g/L Nährbouillon II (Immunopräparate, Berlin)

- Luria-Bertani (LB)-Medium: 5 g/L Hefeextrakt (Immunopräparate, Berlin)  
10 g/L Bacto-Trypton (Immunopräparate, Berlin)  
10 g/L NaCl (Merck)  
(15 g/L Agar Roth)

Selektive Nähragarplatten: 26 g/L Nähragar II (Immunopräparate, Berlin)

Nach dem Autoklavieren wurden der abgekühlten Lösung folgende Substanzen zugesetzt:

Ampicillin (400 mg/mL)	Endkonzentration: 125 µg/mL
IPTG (20 mg/mL)	Endkonzentration: 48 µg/mL
X-Gal (20 mg/mL in DMF)	Endkonzentration: 10 µg/mL

## 2.4.5 Klonierung von PCR-Fragmenten

Zur Klonierung der PCR-Produkte wurde das „pGEM<sup>®</sup>-T Easy-Vektor-System I“ (Promega, Madison) verwendet.

### 2.4.5.1 Ligation von PCR Produkten

Das zu klonierende PCR-Fragment (18S rDNA) wurde wie unter 2.4.3 beschrieben aufgereinigt. Der Ligationsansatz enthielt: 1 µL pGEM<sup>®</sup>-T Easy-Vektor, 1 µL T4-DNA-Ligase, 1 µL Ligationspuffer (10x) (Promega, Madison) und 7 µL des gereinigten PCR-Produktes. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

### 2.4.5.2 Mikrodialyse und Transformation durch Elektroporation

Zur Optimierung der Transformationsbedingungen wurde der Ligationsansatz mikrodialysiert. Dazu wurde ein Nitrocellulose-Filter (0,25 µm; 47 mm Millipore) auf die Oberfläche einer sterilen, 10% Glycerinlösung gelegt, der Ligationsansatz aufgetragen und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die zur Transformation nötigen Zellen von *E. coli* XLI-blue MRF-Zellen (kompetente Zelle) wurde freundlicherweise von der Gruppe Dr. U. Lechner M.-Luther-Universität Halle-Wittenberg bereitgestellt.

Die Elektroporation erfolgte im Gene Pulser (Biorad Laboratories GmbH, München). 40 µL kompetente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 5 µL mikrodialysiertem Ligationsansatz versetzt und in eine sterile vorgekühlte Elektroporationsküvette (ECU-102, Peq Lab Biotechnologie, Erlangen) mit 0,2 cm Elektrodenabstand überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 200 Ω und 2,5 kV. Danach wurden die Zellen in 1 mL Nährbouillon-Medium aufgenommen, 1 Stunde bei 37 °C ohne schütteln inkubiert und anschließend 100 µL Aliquotes auf selektive Nähragarplatten plattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Lagerung der Platten für einige Stunden bei 4 °C wurden die weißen (positiven) von den blauen (negativen) Klonen selektiert.

### 2.4.5.3 Lagerung und Glycerinkultur transformierter *E. coli*-Zellen

Die unter 2.4.5.2 gewonnenen positiven Klone wurden entweder für kurze Zeit auf Nähragarplatten bei 4 °C gelagert, für weitere Versuche in Nährbouillon-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin bei 37 °C und schütteln angereichert oder für längere Lagerung 500 µL einer Suspensionskultur mit 15 % Glycerin versetzt und bei –80 °C tiefgefroren.

### 2.4.5.4 Vektorspezifische Amplifikation klonierter Fragmente

Die Amplifikation klonierter Fragmente aus dem pGEM<sup>®</sup>-T Easy-Vektor erfolgte mittels folgendem PCR-Programm (Tab. 7) und Primern (Tab. 8).

**Tab. 7 PCR-Programm zur Amplifikation vektorspezifisch klonierter Fragmente**

Zeit [s]	Temperatur in °C	Vorgang
180	94	1. Denaturierung der dsDNA
45	94	2.1 Denaturierung der dsDNA
45	59	2.2 Annealing
60	72	2.3 Elongation
		2.4 2.1-2.3 = 30 Zyklen
300	72	3. Elongation
	4	4. Lagerung

**Tab. 8 Primer zur Amplifikation in pGEM<sup>®</sup>-T Easy klonierter Fragmente**

Primer	Sequenz (5' ? 3')
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA
PG2r	GGC CGC GAA TTC ACT AGT G

### 2.4.5.5 Präparation von Plasmid-DNA

5 mL einer *E. coli* Übernachtskultur wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Nach Zugabe des PE-Waschpuffers wurde eine 2-5minütige Inkubation eingefügt. Wie unter 2.4.3.1 konnte dann sequenziert werden.

### 2.4.6 Auswertung der Sequenzdaten und Erstellung eines Stammbaumes

Die Sequenzen wurden mit den Daten in der EMBL-Datenbank über das Programm „Blast“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast?Jform=0>) verglichen und mit dem Programm ClustalX ([http://www.biozentrum.unibas.ch/~biophit/clustal/ClustalX\\_help.html](http://www.biozentrum.unibas.ch/~biophit/clustal/ClustalX_help.html)) einander gegenüber gestellt. Das *alignment* wurde manuell kontrolliert und wenn nötig korrigiert. Um die Daten im FASTA-Format aus dem Bioedit-Programm in ein NEXUS-Format (für Apple Macintosh-Rechner) zu transferieren, was für die Erstellung des Stammbaumes nötig war, wurde das Programm FORCOM (<http://www.bioinformatics.vg/cgi-bin/biolinks>) genutzt.

Zur Erstellung des Stammbaumes in Anlehnung an die Phylogenie nach Prillinger (2002) wurde das Programm PAUP 4.0b für Macintosh genutzt. Dazu wurde eine heuristische Suche

durchgeführt und eine strikte Auswertung (parsimony) festgesetzt. Die Analyse beinhaltete neben den 3 eigenen Stämmen 27 weitere Taxa unter anderem der Ordnungen *Xylariales*, *Sordariales*, *Hypocreales* und *Microascales*, deren Sequenz aus verschiedenen Nukleotidsequenz-Datenbanken (EMBL, GenBank) herangezogen wurde. Die Zugangsnummern (Accession numbers) und Organismen sind in Tab. 9 zusammengefasst.

Die Analyse basierte auf 1622 Charakteren (Nukleotide), die ungeordnet und gleich gewichtet waren. Davon waren 1152 Nukleotide konstant, 184 variabel und der Rest uninformativ. Der phylogenetische Baum wurde durch eine „branch swapping (Zweig-Tausch)-Analyse“ konstruiert. Es wurden 160 Bäume als Ergebnis von 722 evolutionären Schritten gefunden. Daraus wurde ein Consensus-Baum kalkuliert. Um die Richtigkeit dieses Baumes zu stärken wurde weiterhin ein Bootstrap-Baum mit 100 Wiederholungen konstruiert und mit dem vorangegangenen verglichen.

**Tab. 9 Organismen und deren accession-Nummern (Identifikationsnummern) der partiellen 18S rDNA der Datenbank GenBank und EMBL, die zur Stammbaumanalyse herangezogen wurden**

Organismus	Nummer	Organismus	Nummer
<i>Illosporium carneum</i>	AF289655	<i>Verticillium dahliae</i>	AF104926
<i>Myrothecium roridum</i>	AJ301994	<i>V. chlamydosporium</i>	AB100362
<i>Acremonium alternatum</i>	AY083232	<i>V. psalliotae</i>	AB083034
<i>Trichoderma koningii</i>	AF218790	<i>Nectria cinnabarina</i>	AB003949
<i>Pichia spec.</i> MBIC4209	AB022439	<i>N. lugdunensis</i> CBE98	AY204604
<i>Chaetomium globosum</i>	AB048285	<i>N. lugdunensis</i> CCMF245	AY204603
<i>Xylaria polymorpha</i>	Z49785	<i>Fusarium oxysporum</i>	AF219123
<i>Tetracladium apiense</i>	AF388575	<i>Fusarium</i> NRRL	AF289654
<i>T. furcatum</i>	AF388578	<i>Gibberella pulicaris</i>	AF081467
<i>T. maxilliforme</i>	AF388577	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	X58056
<i>T. setigerum</i>	AF388574	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Z75578
<i>T. marchalianum</i> CCMF312	AF388576	<i>Neurospora crassa</i>	AY046271
<i>T. marchalianum</i> CCMF11391	AF388579	<i>Candida glabrata</i>	AY083230
<i>T. marchalianum</i> CCMLH89	AF388580		

## 2.5 Molekularbiologische Methoden – Glutathionsynthetase

### 2.5.1 Isolierung eines Glutathionsynthetase-Gen-Fragmentes

Die unter 2.4.1 isolierte DNA wurde als Template eingesetzt, um aufgrund von Sequenzvergleichen mittels Computerdatenbanken (2.4.3.1) konservierte Gensequenzen der Glutathionsynthetase (GSH-Synthetase) zu identifizieren. In Anhang B ist ein Vergleich von GSH-Synthetase-Sequenzen verschiedener pilzlicher Organismen dargestellt. In Tab. 10 und Tab. 11 sind die primer und das PCR-Programm aufgeführt, mit denen ein rund 750 Basenpaare großes

Fragment amplifiziert werden konnte bzw. die abgeleiteten primer aus der Sequenzierung. Als Positivkontrolle wurde *S. pombe*-DNA eingesetzt.

Der PCR-Ansatz enthielt: 2 µL Puffer, 1 µL 20 pM Primer 1, 1 µL 20 pM Primer 2,  
1 µL 20 mM dNTP-Mix, 0,5 µL DNA (ca. 0,5 µg)  
0,25 µL Taq (50 U/mL), 14,25 µL Tridest.

**Tab. 10 Primer zur Amplifikation eines GSH-Synthetase- Genfragmentes**

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Schmelztemperatur [°C]*
GSH-S1 (MWG)	AAR CAI GTI GAI TTI AAY AC	47,1
GSH rev 1(Roth)	ATT GTT TCC RCC RCC YTC YC	48,7
GSHS-H_for (MWG)	GGT TTG AGC ACG TAC GCC TGG	63,7
GSHS-H_rev (MWG)	CCT CGA CAC TCC CAT AGC CG	63,5

\*Schmelztemperatur nach Angaben des Herstellers (in Klammern)

**Tab. 11 Temperaturprogramm der PCR (40 Zyklen) zu Amplifikation eines GSH-Synthetase-Genfragmentes**

Zeit [s]	Temperatur in °C	Vorgang
300	94	
30	94	Denaturierung
60	35-50 (Gradient)	Annealing
90	72	Extension
300	72	

Die Fragmente wurden wie unter 2.4.5 beschrieben kloniert, aufgereinigt und sequenziert, wobei hier jedoch das „pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor-System I“ (Promega, Madison) verwendet wurde.

### 2.5.2 Isolierung der RNA

Zur Isolierung der RNA wurden ca. 200 mg Frischmaterial mit flüssigem Stickstoff gemörsert, in Eppendorfcups gefüllt und nach Zugabe von 200 µL RNA-Puffer [50 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM NaCl, 50 mM EDTA, 0,25 % (w/v) SDS] mindestens 30 s auf dem Vortex geschüttelt. Anschließend wurde den Proben 200 µL Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1 (Roth) zugegeben und 5 min bei 18.000 U/min geschüttelt. Nach erneuter Zugabe von 750 µL RNA-Puffer wurden die Proben für 5 min bei 10000 U/min (Eppendorf-Zentrifuge) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und nochmals mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1 (Roth) im Verhältnis 1:1 versetzt und erneut geschüttelt. Nach der Zentrifugation (5 min) bei 4 °C und 10000 U/min wurde der Überstand abgenommen und die RNA mit 0,1 Vol. 3 M NaAcetat pH 5,2 und 0,6 Vol. Isopropanol (Roth) gefällt. Die Proben wurden erneut wie oben zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µL 70 % EtOH gewaschen und anschließend getrocknet. Die RNA wurde in

50-100  $\mu\text{L}$  Tridest aufgenommen. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde durch Bestimmung der optischen Dichte bei 260 und 280 nm ermittelt. Die Lagerung erfolgte bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.5.3 Northern Blot

#### 2.5.3.1 Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung des Northern Blots wurde die unter 2.5.2 gewonnene RNA in einem Gel aufgetrennt. (Die Gelkammer wurde durch 30minütige Inkubation in 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  vorbereitet.) Für das RNA-Gel wurden 2,67 g Agarose in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  aufgeköcht und nach Abkühlen auf  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit 13,5 mL 10 x MEN (200 mM MOPS, 50 mM NaAc, 10 mM EDTA pH 7,0 (NaOH) und 22 mL Formaldehyd (37 %) versetzt.

Zur Vorbereitung der RNA-Proben wurden diese mit  $x\ \mu\text{L}$  Ladepuffer (5  $\mu\text{L}$  N,N-Dimethylformamid, 2  $\mu\text{L}$  37 % (v/v) Formakdehyd, 1  $\mu\text{L}$  10 x MEN, 0,5  $\mu\text{L}$  Ethidiumbromid (1 mg/mL) ohne Farbstoff +  $y\ \mu\text{L}$  RNA (10–50  $\mu\text{g}$ , optimal 20  $\mu\text{g}$ ) versetzt und 15 min bei  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  denaturiert. Anschließend wurde die Proben für 2 min auf Eis abgekühlt und 1,5  $\mu\text{L}$  Farbstofflösung (50 % v/v Glycerol, 1 mM EDTA, 0,25 % w/v Bromphenolblau) dazugegeben. Die Proben wurden aufs Gel geladen und über Nacht in 1x MEN bei ca. 7mA oder 2h bei 85 mA getrennt. Anschließend wurde das Gel dokumentiert, wobei immer auf die Vermeidung von RNase-Kontamination geachtet wurde.

#### 2.5.3.2 Northern Blot

Das unter 2.5.3.1 erhaltene Gel wurde in Tridest (2 x 10 min) und 1x 20 min in 10 x SSC (20 x: 3 M Na-Citrat, 3 M NaCl, pH 7,0) unter Schütteln gewaschen.

Das Blotten des Gels auf eine Nylonmembran (Hybond<sup>+</sup>, Amersham Biosciences, Freiburg) erfolgte über Nacht mit 20 x SSC.

Anschließend wurde die Membran markiert und für 2 h bei  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gebacken (crosslink). Zur Prähybridisierung wurde die Membran in  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  warmen Churchpuffer: 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,2 (28 % 0,5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 72 % 0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 1% (w/v) BSA, 1 mM EDTA, 7% (w/v) SDS 3-4 h oder über Nacht im Hybridisierungssofen inkubiert.

Die entsprechende Sonden wurden mittels PCR amplifiziert und über einen Gelextraktionskit (QIAGEN) gereinigt (2.5.1). Ca. 50 ng Sonde wurden für die Hybridisierung eingesetzt.

Das Labelling erfolgte mittels „Megaprime DNA Labelling System“ (Amersham Biosciences, Freiburg) nach dem Herstellerprotokoll, wobei mit 50  $\mu\text{Ci}$   $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dATP gearbeitet wurde. Die nicht eingebauten Nukleotide wurden unter Verwendung von ProbeQuant<sup>TM</sup> G-50 Micro Columns (Amersham Biosciences, Freiburg) entfernt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Churchpuffer. Anschließend wurde die Membran mit Waschlösung (2x SSC/0,1 % [w/v] SDS) jeweils 15 min bei  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  gewaschen und die Radioaktivität gemessen. Danach wurde die Membran für mindestens einen Tag auf einen Phosphorscreen (Amersham

Biosciences, Freiburg) gelegt. Die Entwicklung erfolgte im Phosphorimager (Strom, Amersham Biosciences, Freiburg).

Die Membran konnte mit Striplösung (1% SDS 0,1x SSC, 40 mM Tris-HCl, pH 7,5) gewaschen und für weitere Sonden verwendet werden (Je 15 min bei 80 °C strippen und Radioaktivität überprüfen).

## 2.6 Biochemische und analytische Methoden

Zur Untersuchung der biochemischen Reaktionen auf Schwermetallstress wurden die *H. lugdunensis*-Stämme H4-2-4 aus einem stark belasteten Standort und H8-2-1 aus einem moderat belasteten Standort eingesetzt (Tab. 2; Tab. 3).

### 2.6.1 Trockenmassebestimmung

Alle Bestimmungen wurden auf Trockenmassen bezogen. Dazu wurden die Proben 24 Stunden bei 65 °C getrocknet. Diese Vorgehensweise wurde ebenfalls eingesetzt, um das Verhältnis Frischmasse : Trockenmasse (FM/TM) und somit den Einfluss der Schwermetalle auf den Wasserhaushalt der Organismen zu bestimmen.

### 2.6.2 Vitalitätsbestimmung

Das Prinzip der Vitalitätsbestimmung ist die Reduktion von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid durch Dehydrogenasen (TTC) zu Triphenylformazan. TTC fungiert als Protonenakzeptor. Dabei entsteht eine rote, wasserunlösliche Verbindung (Abb.6). Die Bestimmung der Gesamtdehydrogenaseaktivität ist eine gebräuchliche Methode den Aktivitätszustand von Geweben oder Zellsuspensionskulturen zu ermitteln (Gräser, 1977).

Hierfür wurden 50 mg Pilzmaterial gemörsert, mit 2 mL Phosphatpuffer (0,05 mM pH 7,5) und 0,5 mL 0,5 % TTC versetzt und 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Formazan mit 1 mL Eisessig und 2 mL Toluol extrahiert (zur besseren Trennung der beiden Phasen wurde kurz zentrifugiert). Die Bestimmung der Extinktion des Formazans erfolgte bei 380 nm, wobei die Kontrolle als 100% Ausbeute angesehen wurde (Fahmy und Walsh, 1952).

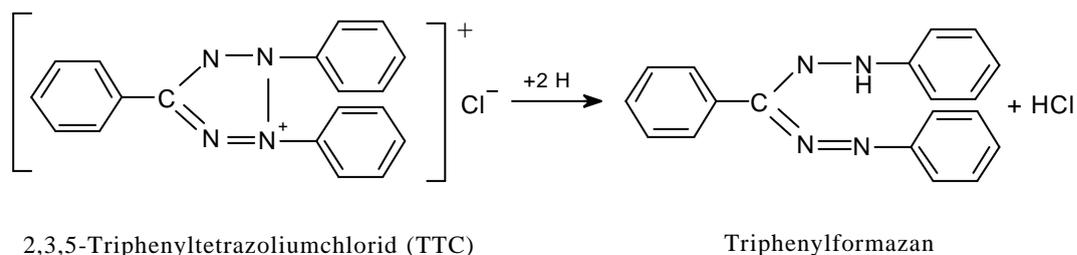


Abb. 6 Reduktion von TTC zu Triphenylformazan

### 2.6.3 Zellaufschluss zur Analyse von Cystein, g-Glutamylcystein und Glutathion

Zur Bestimmung thiolhaltiger Peptide wurde frisch geerntetes Pilzmycel unter flüssigem Stickstoff gemörsert, 50 mg eingewogen und mit 1 mL 0,1 N HCl extrahiert. Anschließend wurde 20 min bei 11000 U/min, 4 °C (Hettich 30RF) zum Abtrennen der Zelltrümmer zentrifugiert (Kranner und Grill, 1996).

### 2.6.4 Bestimmung des Gesamtthiolgehaltes

Der Gesamtthiolgehalt wurde mittels Ellmans Reagenz (300 µM DTNB in 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8) bestimmt (Ellman, 1959). Dazu wurden 100 µL Probe mit 3,9 mL Ellmans-Reagenz versetzt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 410 nm die Extinktion bestimmt. Kalibriert wurde im Bereich von 10-100 µg GSH/mL 0,1 N HCl.

### 2.6.5 Enzymatische Bestimmung des Glutathiongehaltes

Zur Ermittlung der Glutathionkonzentration in den sauren Extrakten (2.6.3) wurde der enzymatische Glutathion-Reduktase-Test (Anderson, 1985) angewendet. Bei dieser Bestimmung wird die enzymatisch katalysierte Reaktion der Glutathion-Reduktase (Reaktion 1) mit der spontanen Oxidation von Glutathion durch DTNB [5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure)] gekoppelt (Reaktion 2) wobei TNB (5-Thio-2-Nitrobenzoesäure) gebildet wird, welches bei einer Wellenlänge von 410 nm detektierbar ist.



Zur Bestimmung wurden folgende Lösungen eingesetzt:

Na-Phosphatpuffer: A: 143 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

B: 143 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (× 12 H<sub>2</sub>O)

C: Na-Phosphatpuffer (A:B = 1:5,25) + 6,3 mM EDTA×Na<sub>2</sub>, pH 7,5

<b>Ansatz:</b>	NADPH + H <sup>+</sup>	450 µM in C	700 µL
	DTNB	6 mM in C	100 µL
	H <sub>2</sub> O		665 µL
	Probe		25 µL
	GSSG-Reduktase 20 U/mL		10 µL (Starten der Reaktion)

Die Bestimmungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Zu Beginn einer Messung wurde im Bereich von 5-60 µg/mL kalibriert.

### 2.6.6 Bestimmung des oxidierten und reduzierten Glutathions, $\gamma$ -Glutamylcysteins und Cysteins mittels Monobrombimanderivatisierung und RP-HPLC

Monobrombiman reagiert mit den SH-Gruppen des Cysteins,  $\gamma$ -Glu-Cys und Glutathions nach dem dargestellten Schema (Abb. 7). Im Anschluss an diese Derivatisierung können mittels RP-HPLC die thiolhaltigen Verbindungen getrennt werden. Glutathion in der reduzierten und oxidierten Form wird durch Blockierung der SH-Gruppen vor der Reduktion mittels NEM (N-Ethylmaleinimid) differenziert. Die Bimanderivate können nach Anregung (420 nm) bei 520 nm detektiert werden (Fluoreszenzdetektion).

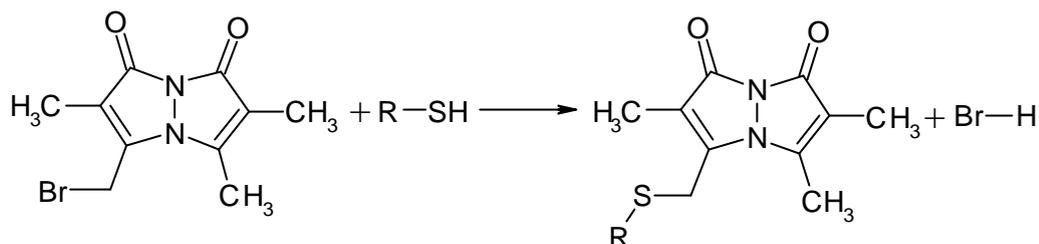


Abb. 7 Reaktionsschema von Monobrombiman mit SH-Gruppen

Die Extraktion der Pilzproben erfolgte wie unter 2.6.3 beschrieben. Die Derivatisierung von reduziertem GSH,  $\gamma$ -EC und Cystein (freie -SH) und oxidiertem Glutathion wurde nach Kranner und Grill (1996) modifiziert und wie folgt beschrieben durchgeführt.

120  $\mu\text{L}$  Aliquote wurden mit 180  $\mu\text{L}$  0,2 M CHES, pH 9,3 versetzt und nach Zugabe von 30  $\mu\text{L}$  6 mM DTE eine Stunde bei 4  $^{\circ}\text{C}$  zur Reduktion der Thiole inkubiert. Anschließend wurden 10  $\mu\text{L}$  30 mM Biman (in MeOH) zugegeben und 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur derivatisiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250  $\mu\text{L}$  5 % Essigsäure abgestoppt.

Zur Bestimmung des oxidierten Glutathions (GSSG) wurden 200  $\mu\text{L}$  Aliquote mit 300  $\mu\text{L}$  0,2 M CHES und 50  $\mu\text{L}$  5 mM NEM versetzt und 10 min Raumtemperatur inkubiert. Das überschüssige NEM wurde mit 3 x 500  $\mu\text{L}$  Toluol extrahiert (Beim Auftreten einer trüben Zwischenphase wurde kurz zentrifugiert wodurch eine bessere Phasentrennung erreicht wurde). 300  $\mu\text{L}$  der NEM-behandelten Probe wurden mit 30  $\mu\text{L}$  6 mM DTE versetzt und 1 Stunde bei 4  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden wiederum 10  $\mu\text{L}$  30 mM Biman (in MeOH) zugegeben und 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur derivatisiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250  $\mu\text{L}$  5 % Essigsäure abgestoppt.

Die Trennung der Derivate erfolgte mit RP-HPLC.

Stationäre Phase: Lichrospher 60 RP Select B (5 $\mu\text{m}$ , 250\*4 mm)

Mobile Phase: A: 2% MeOH/98% H<sub>2</sub>O (bidest.), 2,5 % konz. Essigsäure; pH 4,3

B: 90% MeOH/10% H<sub>2</sub>O (bidest.), 2,5 % konz. Essigsäure; pH 3,9

Gradient:

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0,0	97	3
15,0	93	7
30,0	0	100
31,1	0	100
35,0	0	100
35,1	97	3
45,0	97	3

Fluss: 0,9 mL/min

Injektionsvolumen: 50  $\mu$ L (Injektionsschleife 100  $\mu$ L)

Detektion: Fluoreszenz: 420/520 nm (UV/Vis 254 nm)

HPLC: Merck-Hitachi LaChrom  
 Fluoreszenz-Detektor: L 7480  
 UV-VIS-Detektor: L 7420  
 Autosampler: L 7200  
 Pumpe: L 7100  
 Software: D 7000 HPLC-System-Manager

Die Kalibrierung aller untersuchten Thiole erfolgte im Bereich von 0,2-8  $\mu$ g/mL.

### 2.6.7 Nachweis weiterer Thiole mittels Ellmans Reagenz und Nachsäulen-derivatisierung

Die Bestimmung weiterer Thiole (z.B. Phytochelatine) erfolgte durch Nachsäulenderivatisierung mittels Ellmans Reagenz (DTNB) einer Konzentration von 30  $\mu$ M in 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 8,0.

Zur Extraktion wurden 200 mg mit  $\text{N}_2$  gemörstertes Pilzmaterial mit 400  $\mu$ L NaOH (1N mit 1mg  $\text{NaBH}_4$ /mL) versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde 5 min bei 11000 U/min (Hettich 30RF) zentrifugiert und das Volumen des Überstandes bestimmt. 500  $\mu$ L des Überstandes wurden mit 140  $\mu$ L 3,6 N HCl versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde wiederum 5 min bei 11000 U/min und 4°C zentrifugiert und das Volumen des Überstandes bestimmt (Gallego et al., 1996). Die Trennung der Verbindungen erfolgte mittels HPLC.

Stationäre Phase: C-18 (SuperpacPep S, Pharmacia) (5 $\mu$ m, 250\*4 mm)  
 Mobile Phase: A:  $\text{H}_2\text{O}$  (bidest.), pH 3,0 (TFA)  
 B: Acetonitril

Gradient:

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0,0	98	2
20,0	80	20
25,0	80	20

Fluss: 0,8 mL/min

Injektionsvolumen: 50 µL (Injektionsschleife 100 µL)

Nachsäulenderivatisierung: Reaktionsschleife: 1mL

Fluss: 0,4 mL/min

Detektion: 410 nm

HPLC: Merck-Hitachi LaChrom

DAD-Detektor: L 7450

Pumpe: L 7100

Autosampler L-7200

Software: Model D-7000 HPLC-System-Manager

Zur Identifizierung weiterer Thiole wurde die Trennung ohne Nachsäulenderivatisierung und bei Detektion von 220 nm durchgeführt, die Proben entsprechend ihrer Retentionszeiten fraktioniert und zur massenspektroskopischen Analyse gegeben (2.6.9).

### 2.6.8 Gelpermeation und Bestimmung des Cd(II)-Gehaltes der Fraktionen

Zur Analyse schwermetallbindender, speziell Cd(II)-bindender Proteine und Peptide wurden die Pilze unter flüssigem Stickstoff gemörsert und im Verhältnis 1:3 mit 25 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF (EtOH) pH 7,5 extrahiert.

Anschließend wurden die Proben 45 min bei 11000 U/min (Hettich 30 RF) und 4 °C zentrifugiert. Die Trennung der Verbindungen erfolgte isokratisch mittels HPLC.

Stationäre Phase: Superdex75 (Fraktionierbereich 3-70 kDa )

Superdex Peptide (Fraktionierbereich 0,1-6 kDa)

Mobile Phase: 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 7,9

Fluss: 0,4 mL/min

Injektionsvolumen: 50 µL (Injektionsschleife 100 µL)

Detektion: 220; 254; 280 nm

HPLC:	Merck-Hitachi LaChrom
DAD-Detektor:	L 7450
Pumpe:	L 7100
Autosampler	L-7200
Software:	D-7000 HPLC-System-Manager

Alle 3 min wurden Fraktionen gesammelt, die mittels Monobrombiman-Methode (siehe 2.6.6) nach vorheriger Ansäuerung mit 0,1N HCl (80 µL) auf Glutathion getestet wurden. Außerdem erfolgte die Bestimmung des Cd(II)-Gehaltes mittels Analyst 800 Perkin Elmer Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometer mit folgendem Programm:

Temperatur [°C]	Anlauf (Ramp) Zeit [s]	Halte (Hold) Zeit [s]
110	1	30
130	15	30
500	10	20
1500	0	5
2450	1	3

Alle Cd(II)-haltigen Proben wurden massenspektroskopisch untersucht.

### 2.6.9 Massenspektrometrie

Proben aus der Gelpermeation und der Analyse weiterer Thiolverbindungen wurden massenspektroskopisch untersucht. Dazu wurden die ESI-Spektren mittels ESQUIRE-LC Ionentrap Spektrometer aufgenommen. Das Spektrometer war mit einer ESI Quelle (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) ausgestattet. Die Injektion der Proben erfolgte mit einer Kolbenpumpe (Cole/Parmer Instrument Company) bei einer Flussrate von 3 µL/min.

MALDI Spektren wurden mit einem Bruker REFLEX Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Germany), aufgerüstet mit einer gitterlosen verzögerten ausziehbaren Ionenfalle (pulsed ion extraction) aufgenommen. Als Matrix wurde  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymethylsäure genutzt. Die Nomenklatur der Fragmente erfolgte nach Roepstorff und Fohlman (1984).

### 2.6.10 Sulfatbestimmung mittels Kapillarelektrophorese

Zur Bestimmung der Sulfatgehalte in den Pilzproben kam eine kapillarelektrophoretische Methode, die auf der Nutzung der indirekten UV-Absorption beruht, zum Einsatz (Ross, 1995). 50 mg bis 100 mg Pilzmaterial wurden mit N<sub>2</sub> gemörsert und nach Zugabe von 3,5 Vol. Bident auf dem Vortex geschüttelt und anschließend 10 min bei 90 °C inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 4°C und 11000 U/min (Hettich 30 RF) wurde der Überstand abgenommen und die Zentrifugationsschritte solange wiederholt bis keine milchige/fettige Oberphase mehr vorhanden war (sehr wichtig für Reproduzierbarkeit).

Die Trennung der anorganischen Anionen erfolgte mittels HEWLETT-PACKARD-HP<sup>3</sup>-Kapillarelektrophoresesystem mit Dioden-Array-Detektor, ausgestattet mit einer Chemstation Hard- und Software zur Auswertung der Elektropherogramme. Zur Trennung wurde eine Kapillare (SUPELCO FS 50 CE) mit einem Innendurchmesser von 50  $\mu\text{m}$  verwendet. Die Kapillare wurde auf 20 °C temperiert. Die Injektion der Proben erfolgte durch Druck bei 200 mbar  $\text{s}^{-1}$ . Vor jedem Lauf wurde die Kapillare 5 min mit 0,1 N NaOH, 5 min mit 10 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 2 min mit Bidest und 5 min mit Puffer äquilibriert.

Der Analysenpuffer hatte folgende Zusammensetzung: 2,25 mM Pyromellinsäure, 6,50 mM NaOH, 0,75 mM Hexamethoniumhydroxid, 1,60 mM Triethanolamin (pH 11,4).

Die Länge der Kapillare betrug 24,5 cm (effektiv). Die Analysen erfolgten bei einer Spannung von 18 kV und negativer Polarität. Die Proben wurde bei einer Signalwellenlänge von 350 nm und einer Referenzwellenlänge von 235 nm als positive Peaks detektiert. In Abb. 8 ist die Trennung von verschiedenen Anionen mit dieser Methode dargestellt.

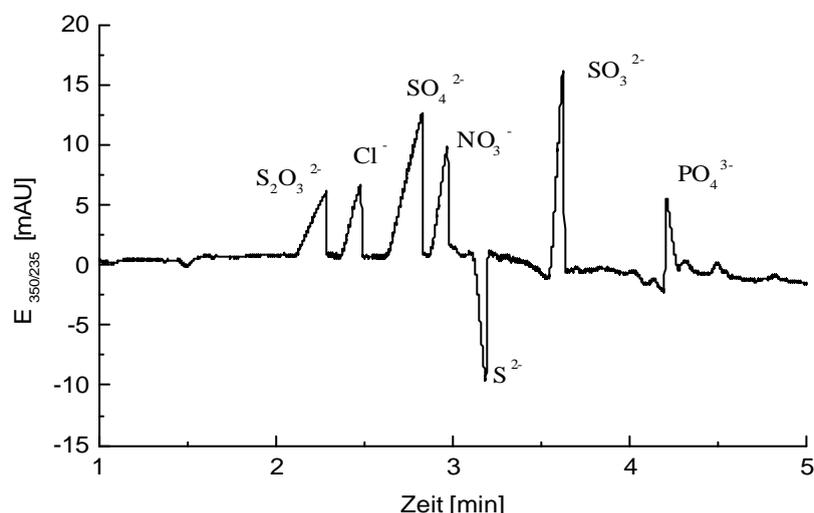


Abb. 8 Trennung von Anionen mittels Kapillarelektrophorese (Standard 0,5 mM)

Zur Kalibrierung wurde  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  im Bereich von 1 mM-0,01 mM verwendet.

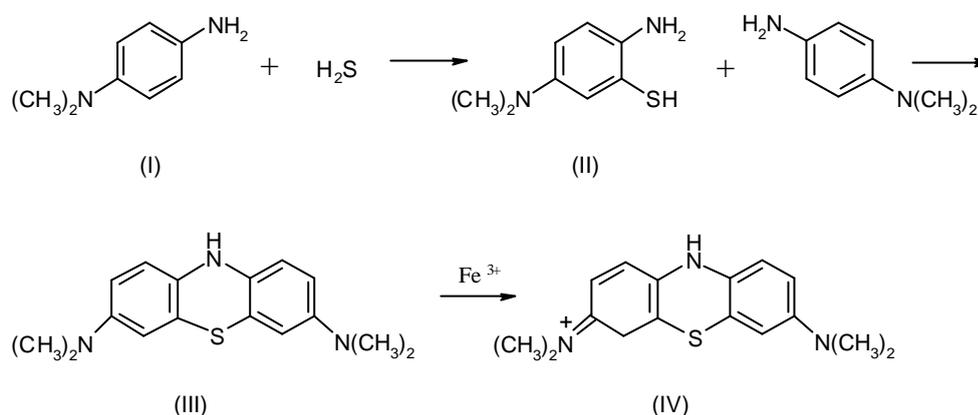
### 2.6.11 Sulfidnachweis mittels Methylenblau

Zur Bestimmung des Gesamtsulfidgehaltes in den Pilzzellen wurden die Methylenblaumethode nach King and Morris (1967) und Trüper und Schlegel (1964) modifiziert (Gilboa-Garber, 1971). Dabei reagiert Schwefelwasserstoff mit N,N-Dimethyl-p-Phenylendiamin (DMPD) (I) über die Zwischenverbindung 3-Mercapto-N,N-Dimethyl-p-Phenylendiamin (II) zum farblosen Leucomethylenblau (III), welches durch  $\text{Fe}^{3+}$  zu Methylenblau (IV) oxidiert wird (Abb. 9). Methylenblau absorbiert Licht der Wellenlänge 665 nm.

Zur Bestimmung der Gesamtsulfidgehaltes wurde das frische Pilzmaterial unter flüssigem  $\text{N}_2$  gemörsert und ca. 100 mg mit 1 mL sauerstofffreiem entionisiertem Wasser durch 3-5 min

Schütteln auf dem Vortex extrahiert. Dieser Extrakt wurde bei 4°C und 11000U/min für 15 min zentrifugiert. Vom klaren Überstand (wenn nötig Zentrifugation wiederholt) wurde die Methyleneblaureaktion durchgeführt.

1480 µL sauerstofffreies Wasser wurde in 2 mL-Küvetten vorgelegt und 300 µL des Extraktüberstandes dazu gegeben. Nach Zugabe von 200 µL N,N-Dimethyl-p-Phenylendiaminlösung (0,2 % C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub> x 2 HCl in 20 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) und 2-minütigem Rühren wurden 20 µL Ammoniumeisensulfatlösung (10 % FeNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>) x 12 H<sub>2</sub>O in 2 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) hinzugefügt, die Küvetten mit Parafilm verschlossen und gut geschüttelt. Der Ansatz wurde 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.



**Abb. 9** Reaktionsschema der Methyleneblau-Methode [N,N-Dimethyl-p-Phenylendiamin (I); 3-Mercapto-N,N-Dimethyl-p-Phenylendiamin (II); Leucomethyleneblau (III); Methyleneblau (IV)]

Die Kalibrierung durch Sulfidstandards, die täglich frisch bereitet wurden, erfolgte im Bereich von 0,2-100 µmol/L.

### 2.6.12 Bestimmung der Biosorption und Akkumulation

Zur Bestimmung des intrazellulären und extrazellulären Schwermetallgehaltes wurde die Biosorption und Akkumulation bestimmt. Dabei wird in dieser Arbeit bei dem Begriff „Akkumulation“ die Menge Schwermetall definiert, die über die Zeit unter unterschiedlichen Schwermetallkonzentrationen in die Zelle aufgenommen wird und somit den intrazellulären Gehalt darstellt.

#### 2.6.12.1 Probenaufarbeitung

Das unter unterschiedlichen Schwermetallkonzentrationen kultivierte Material der *H. lugdunensis*-Stämme wurde über einen Filter (Millipore 0,45 µm) mittels Absaugvorrichtung abgetrennt und folgenden Waschrufen unterworfen. Dabei sollte das an der Zellwand adsorbierte Cadmium und Zink aufgrund geringerer Affinitäten zu bestimmten Bindungsstellen gegen Nickel ausgetauscht werden (Brown und Wells, 1988).

1. 100 mL Bidest (W<sub>1</sub>)
2. 100 mL 20 mM NiCl<sub>2</sub> (Ni<sub>1</sub>)
3. 100 mL 20 mM NiCl<sub>2</sub> (Ni<sub>2</sub>)
4. 100 mL 20 mM NiCl<sub>2</sub> (Ni<sub>3</sub>)
5. 100 mL Bidest (W<sub>2</sub>)

Die wässrigen Waschungen wurden mittels Glasspatel suspendiert und abgesaugt. Die Nickelwaschungen wurden suspendiert, 10 min unter Rühren inkubiert und dann abgesaugt.

Das Pilzmycel wurde anschließend auf Alufolie über Nacht bei 65 °C getrocknet.

#### 2.6.12.2 Probenaufschluss zur Bestimmung der intrazellulären Schwermetallmenge

Das im Mycel enthaltene Schwermetall wurde durch sauren Aufschluss in der Mikrowelle (CEM MDS 2100) für die quantitative Bestimmung mittels Atomabsorptionsspektroskopie verfügbar gemacht. Dazu wurden ca. 50 mg der unter 2.6.12.1 gewonnenen Trockenmasse in Druckgefäßen mit 4 mL Salpetersäure (suprapur, 65 %) und 2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (suprapur, 30 %) versetzt und in der Mikrowelle nach den in Tab. 12 angegebenen Bedingungen aufgeschlossen.

**Tab. 12 Reaktionsparameter des Mikrowellenaufschlusses**

STUFE	DRUCK [BAR]	ZEIT [MIN]	TAP-ZEIT [MIN]	MAX. TEMPERATUR [°C]
1	130	10	5	---
2	275	20	10	180

Nach dem Aufschluss wurden die Proben mit bidestilliertem Wasser auf 30-50 mL aufgefüllt und der Gehalt an Schwermetall mittels AAS bestimmt.

#### 2.6.12.3 Bestimmung der Schwermetallgehalte am Atomabsorptionsspektrometer

Der Schwermetall-Gehalt aller unter 2.6.12.2 und 2.6.12.3 gewonnenen Lösungen, inklusive Medien, wurde mittels AAS (ATI Unicam ) bestimmt. Bei Bedarf wurden die Lösungen mit Bidest verdünnt. Eine Kalibrierung erfolgte bei beiden Metallen im Bereich von 0,125-1 mg/L mittels CertiPUR-Elementstandards Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> und Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

### 2.6.13 Gaschromatographische Analyse der Monosaccharidzusammensetzung der pilzlichen Zellwand

#### 2.6.13.1 Isolierung der Zellwand

Die Isolierung der Zellwand erfolgte nach Mitteilung von Prof. Moerschbacher, Universität Münster, in dessen Arbeitsgruppe auch die Arbeiten zur Zellwandanalyse stattfanden.

Pilzmaterial (ca. 1g FM) wurde mit N<sub>2</sub> gemörsert und in 10 mL 1 M Imidazol pH 7 homogenisiert. Es wurde 10 min bei 11.000 rpm (Hettich Universal 30 RF) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet 3x mit 10 mL Bidest gewaschen und jeweils 5 min zentrifugiert (11.000 rpm). Anschließend wurde 2x mit 10 mL MeOH:Chloroform 1:1 und 2x

mit 10 mL Aceton gewaschen und je 10 min zentrifugiert. Die Proben wurden über Nacht lyophilisiert und dann homogenisiert (mörsern).

### 2.6.13.2 Modifizierung der Zucker zu flüchtigen Derivaten

Zur Durchführung dieser Arbeitsschritte wurden nur wasserfreie Chemikalien verwendet.

In Anlehnung an die Arbeit von Chaplin (1982) wurden die glykosidischen Bindungen der Inhaltsstoffe der Zellwand durch methanolische Hydrolyse gespalten. Dazu wurden ca. 200 µg Zellwandmaterial eingewogen, 30 µL Inositol (1mM, interner Standard) dazugegeben, die Proben gefriergetrocknet und mit 200 µL "1,5 M methanolischer HCl" (Acetylchlorid in Methanol) und 50 µL Methylacetat über Nacht bei 80 °C hydrolysiert.

Anschließend wurden die Proben abgekühlt, mit 4 Tropfen Butanol versetzt und bei 40 °C im N<sub>2</sub>-Strom getrocknet.

Durch Hydrolyse werden die Aminozucker partiell de-N-acetyliert. Somit wird eine Re-N-Acetylierung und partielle milde De-O-Acetylierung notwendig. Dazu wurden dem Methanolyseprodukt 200 µL trockenes Methanol, 20 µL Pyridin und 20 µL Acetanhydrid sukzessive zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 4 Tropfen Butanol wurden die Proben wieder bei 40 °C über einen N<sub>2</sub>-Strom getrocknet.

Zur De-O-Acetylierung wurde zu den trockenen Proben 200 µL 0,1 M methanolische HCl und 50 µL Methylacetat gegeben, geschüttelt und 30 min bei 65 °C inkubiert und anschließend wie oben nach Zugabe von Butanol getrocknet.

Um die Proben zu verflüchtigen, wurden sie mit Trimethylsilan derivatisiert. Dazu wurden zur Probe mittels hexangespülter Hamilton-Spritze 30 µL Silylierungsreagenz (Silyl-2110 = Hexamethyldisilan : Trimethylchlorsilan : Pyridin 2 : 1 : 10; Chromatographie Service GmbH) gegeben und mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Unmittelbar vor der Injektion in den Gaschromatographen wurden die Proben ohne Erwärmung unter schwachem N<sub>2</sub>-Strom getrocknet, sorgfältig in 30 µL Isooctan aufgenommen und 1 µL injiziert.

Es wurde mit einer Gaschromatographieanlage der HP 6890 Series GC-System mit "GC ChemStation"-Software gearbeitet. Die Trennbedingungen waren folgende:

Trärgas:	Stickstoff 5.0
Strömungsgeschwindigkeit:	1 mL/min
Säule:	OV-1, 100 Methyl Gum Fused Silica Kapillarsäule (25 m x 320 µm x 0,25 µm nominal) Chromatographie Service
Injektor:	Splitinjektor
Splitverhältnis:	1:10
Injektionsvolumen:	1 µL
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID)

Zündgase: Wasserstoff 4.6; Druckluft  
 Make-up-Gas: Stickstoff

Zur qualitativen und quantitativen Auswertung lagen Kalibrierkurven der einzelnen Zucker vor. Die qualitative Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme der einzelnen peak-Verhältnisse, die aus der unterschiedlichen Zusammensetzung der Zucker aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Pyranosid,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Furanosid und offenkettiger Form resultieren sowie des internen Standards Inositol. In Abb. 10 ist die Trennung eines Standardgemisches der untersuchten Zucker dargestellt.

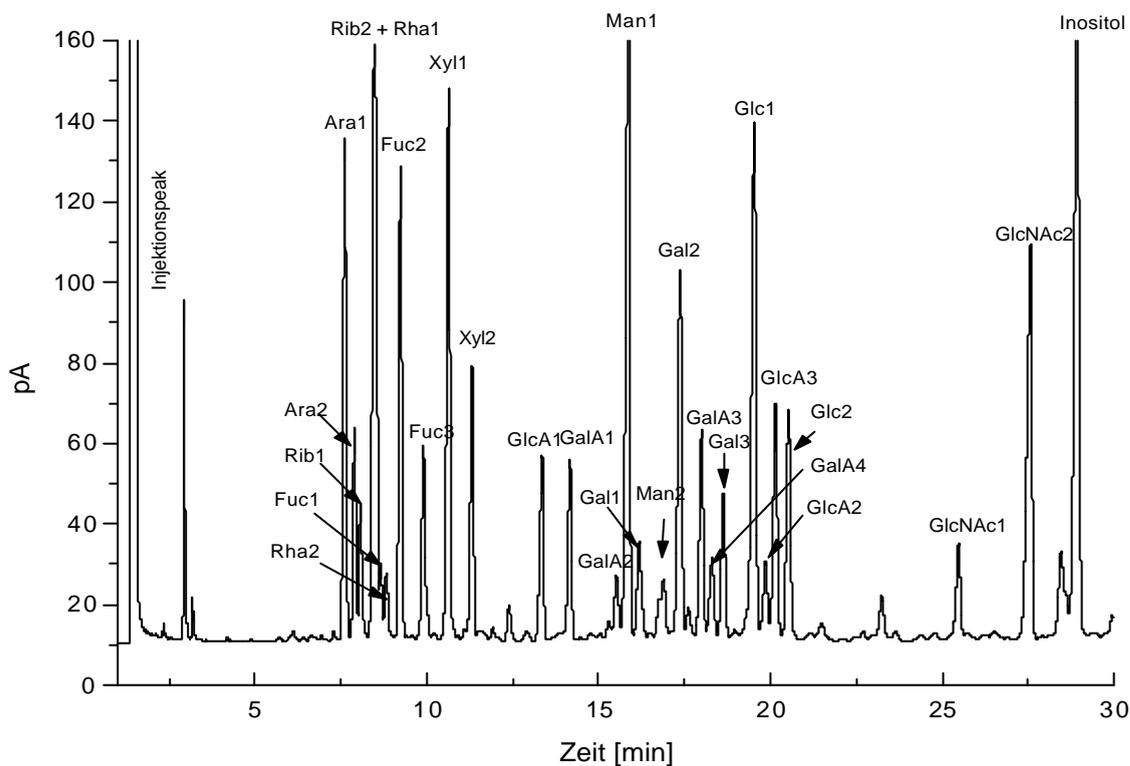


Abb. 10 Trennung von Zuckerstandards mittels Gaschromatographie (Standardsubstanzen: 100 nM)

## 2.7 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung der gewonnenen Ergebnisse wurde das Computerprogramm MS Excel 2000 genutzt. Signifikanzen wurden durch One-way ANOVA (analysis of variance) und anschließendem Tukey-Kramer-Test, welcher nach Ermittlung der P-Werte nochmals alle Mittelwerte untereinander auf ihre signifikante Verschiedenheit testet, ermittelt. Dazu wurde das Computerprogramm GraphPad InStat 3.00 für Windows 95, GraphPad Software San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com) genutzt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Phylogenetische Untersuchungen

*Heliscus lugdunensis* wird sehr häufig anhand seiner typisch nelkenförmigen Sporenform charakterisiert (Abb. 11). Webster erkannte den perfekten, teleomorphen Habitus *Nectria lugdunensis* und ordnete damit *Heliscus lugdunensis* den Ascomyceten zu (1959). *H. lugdunensis* gehört in die Unterabteilung der *Pezizomycotina*, zur Klasse *Sordariomycetes*, zur Unterklasse *Hypocreomycetidae*, in die Ordnung der *Hypocreales* und der Familie *Nectriaceae*. Charakterisiert wird er meistens auf Grund seiner Sporenform.

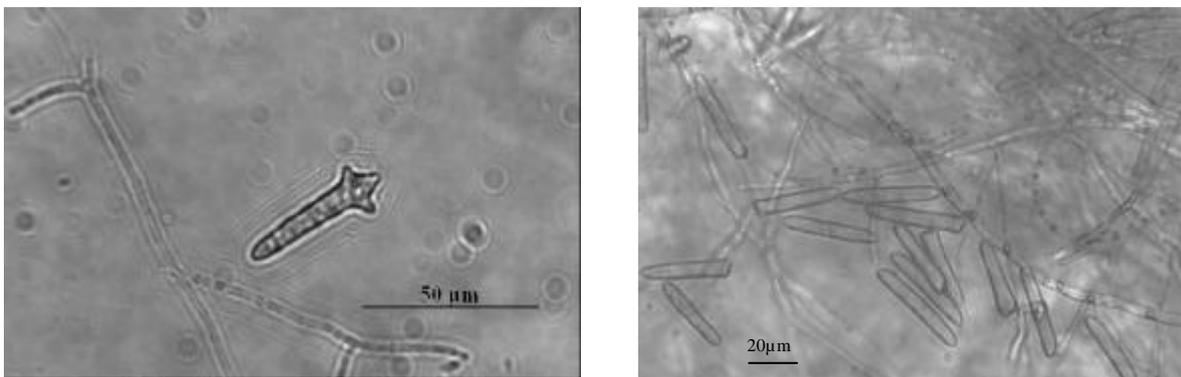


Abb. 11 Sporen von *H. lugdunensis* (Lichtmikroskopische Aufnahme)

Die phylogenetisch-morphologische Einordnung sollte anhand der partiellen 18S rDNA-Sequenz bestätigt werden, da die gefundenen Sporen nicht immer die typische Nelkenform zeigten. Weiterhin war zu klären, ob die Stämme *H. lugdunensis* H4-2-4, H8-2-1 und H6-06-10 Unterschiede in ihrer 18S rDNA aufweisen und damit möglicherweise Ökotypen darstellen. Die Sequenzdaten sind in Anhang B dargestellt. Sie sind zwischen 1460 bp (H6-06-10) und 1561 bp (H4-2-4) lang. Die Sequenz von H4-2-4 wurde in die Datenbank (GenBank) mit der Identifizierungsnummer AY231639 eingestellt. Der Sequenzvergleich ergab wenige Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen, wobei es sich oft um den Austausch einzelner Basen handelt. In der BLAST-Suchmaschine (NCBI) ergab der Vergleich die höchsten Homologien zu *Illosporium carneum* und *Fusarium* NRRL (beide 99 %). In Abb. 12 ist der unter den hier gewählten Bedingungen erstellte Stammbaum zu finden.

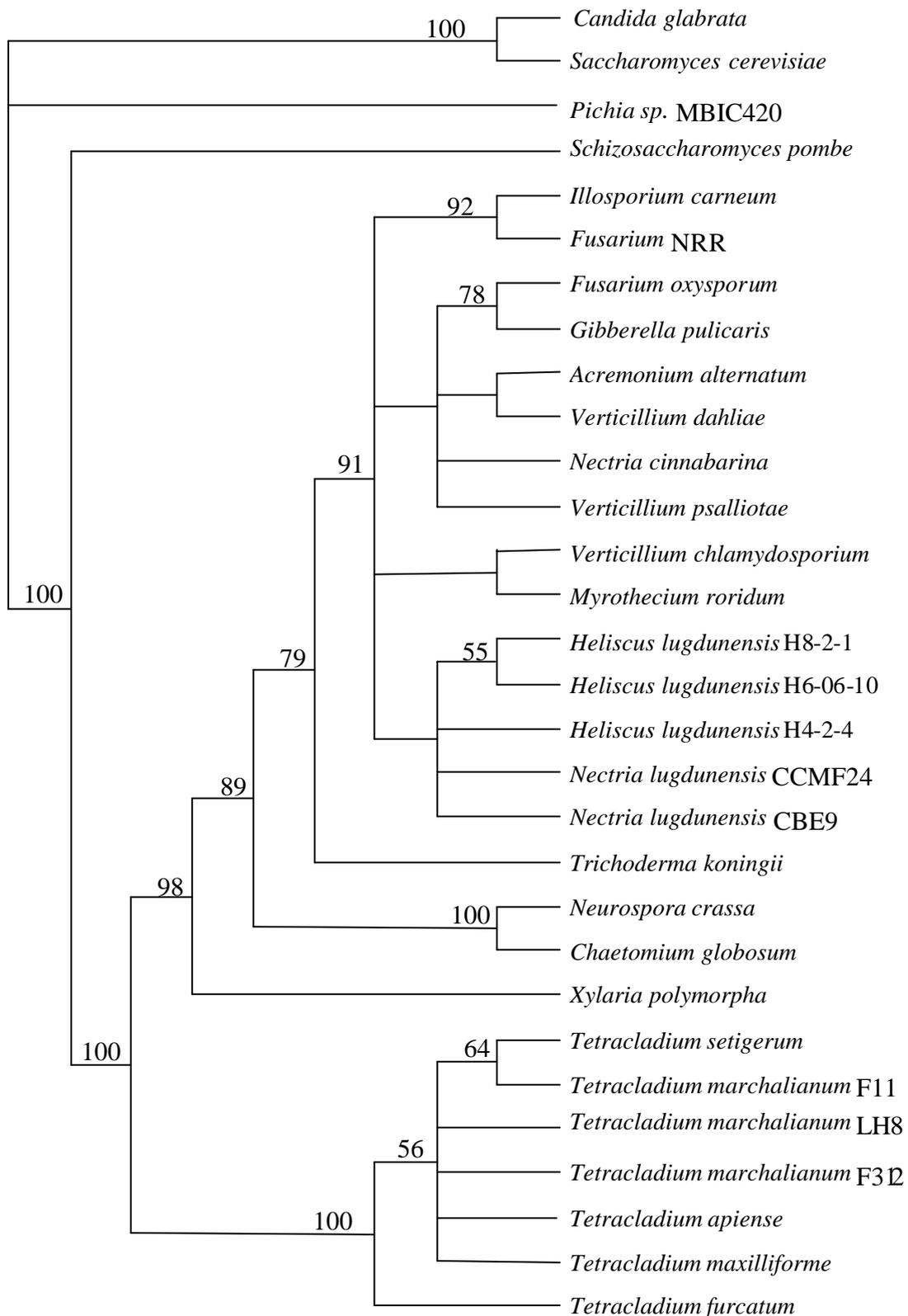


Abb. 12 Phylogenetischer Baum einiger *H. lugdunensis* nahestehender Arten basierend auf der partiellen Sequenz der 18S rDNA. Hier dargestellt ist ein strikter Parsimony-Baum. Zur Kalkulierung der Verzweigungen wurde das PAUP-Programm 4.0b (2.4.6) genutzt. Die Nummern auf den Verzweigungen geben die Prozente an mit denen eine Verzweigung in 100 bootstrap Wiederholungen 50 mal und häufiger erschien

## 3.2 Wachstumsuntersuchungen

### 3.2.1 Wachstum von *H. lugdunensis* unter schwermetallfreien Bedingungen

Am Beginn der biochemischen Untersuchungen stand die Charakterisierung des Wachstums der hier verwendeten Stämme H4-2-4 und H8-2-1. Beide zeigten das typische sigmoide Verhalten der Wachstumskurve einer statischen Kultur wie sie bereits in früheren Arbeiten gefunden wurde (Groß, 2000; Pierau, 1999). Dabei war das Wachstumsverhalten von der Temperatur abhängig (Abb. 13). Der Stamm H8-2-1 zeigte ein langsamerer Wachstum als der Stamm H4-2-4 und beide wiesen bei Verringerung der Anzuchtstemperatur um 4 °C ein verzögertes Wachstum auf. Die lag-Phase des Stammes H4-2-4 verlängerte sich von 2 auf 4 Tagen und die des Stammes H8-2-1 von 4 auf 6 Tage. Die logarithmische Wachstumsphase ging für den Stamm H4-2-4 bei einer Temperatur von 14 °C am Tag 6 in die stationäre Phase über, bei 10 °C war dieses Stadium am Tag 9 erreicht. Der Stamm H8-2-1 erreichte diesen Punkt nach 8 bzw. 11 Tagen. Aus diesen Ergebnissen resultieren die unter 2.2.3 beschriebenen Untersuchungszeitpunkte.

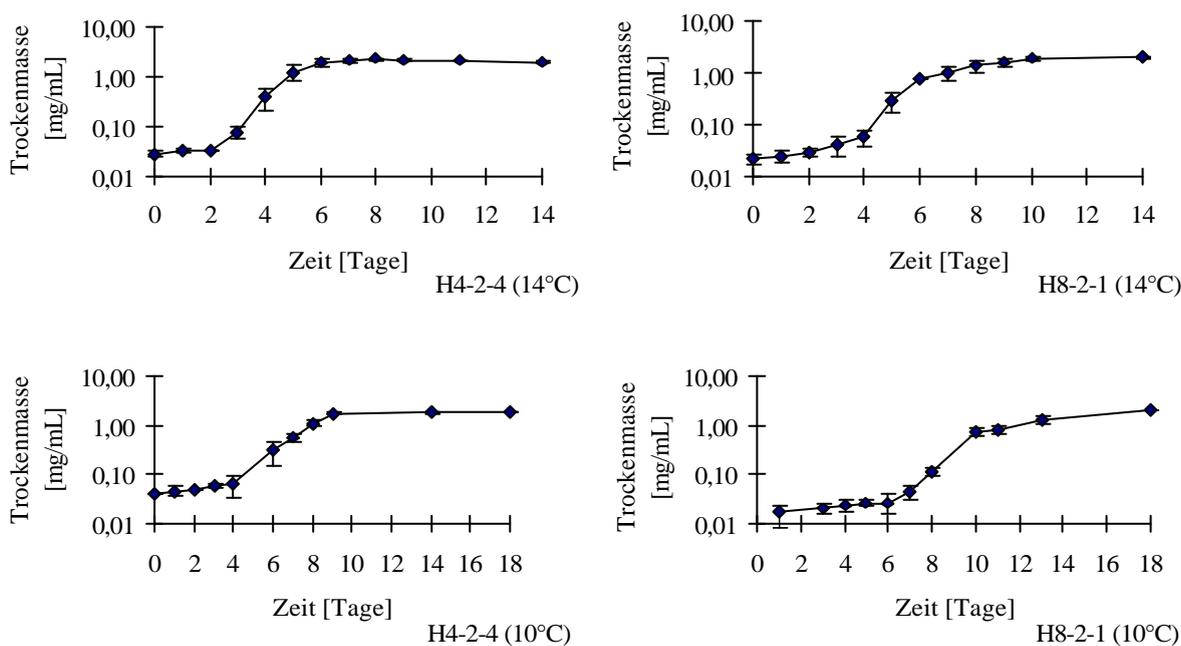
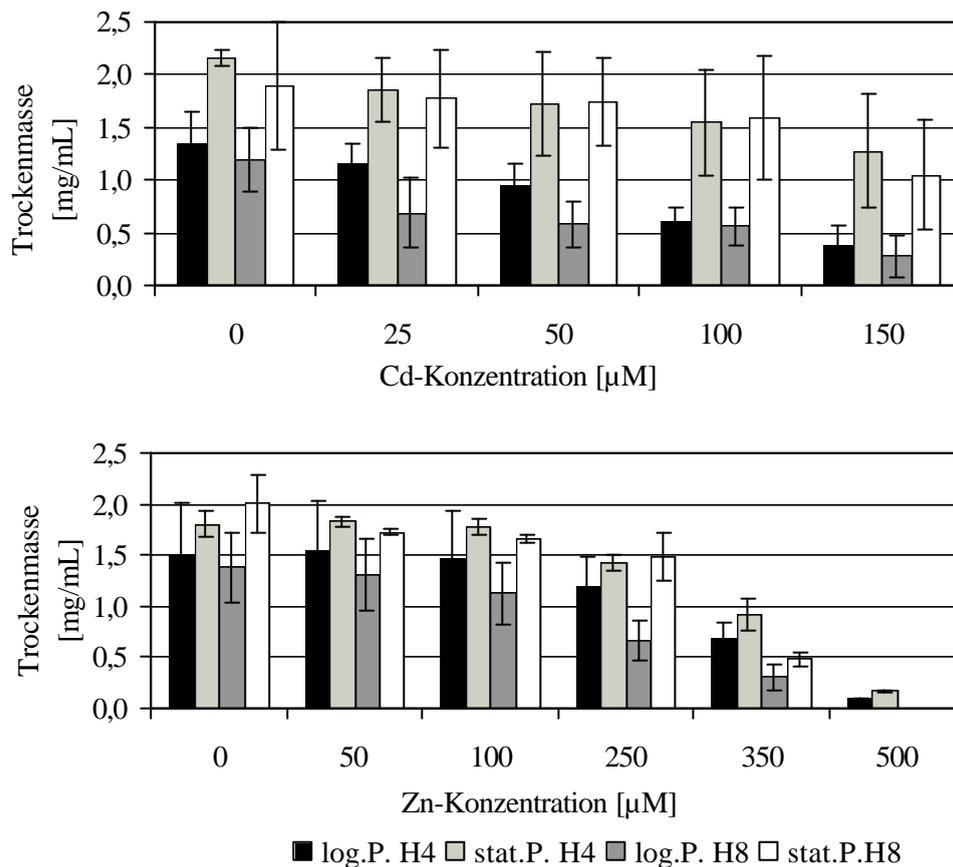


Abb. 13 Wachstum der *H. lugdunensis*-Stämme H4-2-4 und H8-2-1 in Abhängigkeit von der Zeit und Temperatur (120 U/min, dunkel) (n=3)

Die Biomasse in der stationären Phase unterschied sich nicht signifikant in Abhängigkeit von der Temperatur, wobei der Stamm H8-2-1 mit rund 1,90 mg/mL eine etwas geringere Biomasse aufwies als H4-2-4 mit durchschnittlich 2,15 mg/mL.

### 3.2.2 Beeinflussung der Biomasse unter Schwermetallstress

Wachstumsuntersuchungen zum Verhalten von *H. lugdunensis* unter Schwermetallstress wurden bereits in voran gegangenen Arbeiten durchgeführt (Groß, 2000). An dieser Stelle soll gezeigt werden wie sich die Belastung mit Cd(II) und Zn(II) auf die Biomasseproduktion an den definierten Untersuchungs- bzw. Wachstumspunkten (Mitte logarithmischer Phase und stationärer Phase) auswirkte. In Abb. 14 sind die Trockenmassen dargestellt.



**Abb. 14** Trockenmasse in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase der *H. lugdunensis*-Stämme H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)- und Zn(II)-Stress (14 °C, 120 U/min, dunkel) ( $n \geq 5$ )

Deutlich sind die Unterschiede zwischen den Wachstumsphasen zu erkennen. In der stationären Phase war die Biomasse beider Stämme höher. Hier war eine signifikante Verringerung der Biomasse ( $P < 0,05$ ) für beide Stämme erst ab 50 µM Cd(II) zu beobachten im Gegensatz zur logarithmischen Phase wo bereits 25 µM Cd(II) eine signifikante Hemmung verursachte. Für Zink war die Inhibierung beim Stamm H4-2-4 erst ab 250 µM Zn(II) in beiden Phasen signifikant, bei Stamm H8-2-1 war sie in der logarithmischen Phase bereits bei 100 µM Zn(II) signifikant.

Die Verringerung der Biomasse betrug für H4-2-4 in der logarithmische Phase 71 % für 150 µM Cd(II) bzw. 54 % für 350 µM Zn(II) und in der stationären Phase 51 % für 150 µM Cd(II) bzw. 49 % für 350 µM Zn(II). Für H8-2-1 betrug die Wachstumshemmung für die logarithmische

Phase 67 % bzw. 78 % und in der stationären Phase 45 % bzw. 76 %. Die Rohdaten sind im Anhang A (Tab. 1 und Tab. 2) dargestellt.

Der Stamm H4-2-4 aus dem belasteten Standort zeigte noch bei 500  $\mu\text{M}$  Zn(II) Wachstum (6 % in der logarithmischen Phase bzw. 9 % in der stationären Phase in Bezug zur Kontrolle). Dies war bei H8-2-1 nicht zu verzeichnen.

Es wird deutlich, dass die Verringerung der Biomasse bei maximaler Belastung für den Stamm H4-2-4 aus dem belasteten Standort durch Cd(II) größer ist als durch Zn(II). Für den Stamm H8-2-1 ist die Beeinflussung (Verringerung) der Biomasse durch Zn(II) stärker als durch Cd(II).

Der Biomasseverlust unter Schwermetallstress kann für beide Stämme mathematisch am besten mittels quadratischer Gleichung beschrieben werden (Tab. 13).

**Tab. 13 Mathematische Beschreibung des Biomasseverlustes**

	Mathematische Funktion	Regressionskoeffizient
<b>Cadmium</b>		
H4-2-4 logarithmische Phase	$y = 0,0148x^2 - 0,157x + 1,523$	0,9924
H4-2-4 stationäre Phase	$y = 0,0021x^2 - 0,219x + 2,342$	0,9823
H8-2-1 logarithmische Phase	$y = 0,0229x^2 - 0,651x + 1,183$	0,9434
H8-2-1 stationäre Phase	$y = 0,0672x^2 - 0,212x + 1,706$	0,9485
<b>Zink</b>		
H4-2-4 logarithmische Phase	$y = -0,081x^2 + 0,296x + 1,286$	0,9975
H4-2-4 stationäre Phase	$y = -0,109x^2 + 0,431x + 1,453$	0,9978
H8-2-1 logarithmische Phase	$y = -0,061x^2 + 0,082x + 1,373$	0,9897
H8-2-1 stationäre Phase	$y = -0,112x^2 + 0,339x + 1,682$	0,9212

### 3.2.3 Vergleich des Biomassenverlustes in Abhängigkeit von der Temperatur

Hierbei sollte untersucht werden, ob die Temperatur (10 °C und 14 °C) einen Einfluss auf das Wachstum von *H. lugdunensis* hat. Dazu wurden die Pilze wie unter 2.2 beschrieben angezogen und die Trockenmasse in der logarithmischen Wachstumsphase bestimmt. Exemplarisch wurde nur der Einfluss von Cadmium untersucht. Da der Stamm H8-2-1 im Gegensatz zum Stamm H4-2-4 bei einer Temperatur von 10 °C nur ein Wachstum bis 50  $\mu\text{M}$  Cd(II) zeigte, konnten nur Belastungen von 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  betrachtet werden. In Tab. 14 sind die Mittelwerte der Untersuchung dargestellt.

Die Verringerung der Biomasse bei einer Belastung mit 25  $\mu\text{M}$  bzw. 50  $\mu\text{M}$  Cd(II) und einer Anzuchtstemperatur von 10 °C betrug für H4-2-4 41 % bzw. 57 % und für H8-2-1 52 % bzw. 68 %. Im Gegensatz dazu verringerte sich das Wachstum bei 14 °C um 13 % und 29 % bzw. 29 % und 40 %. Die Signifikanzbestimmungen durch ANOVA ergaben für die Biomasseabnahme signifikante Verringerungen.

**Tab. 14 Einfluss der Temperatur auf den Biomasseverlust unter Cd(II)-Belastung der *H. lugdunensis*-Stämme H4-2-4 und H8-2-1 in der logarithmischen Wachstumsphase (120 U/min, dunkel) (n = 4 für 10 °C und n = 5 für 14 °C)**

Cd [ $\mu$ M]	Trockenmasse [mg/mL] 10 °C		Trockenmasse [mg/mL] 14 °C	
	H4-2-4	H8-2-1	H4-2-4	H8-2-1
0	1,18 $\pm$ 0,18	0,74 $\pm$ 0,21	1,34 $\pm$ 0,30	0,97 $\pm$ 0,20
25	0,70 $\pm$ 0,10	0,36 $\pm$ 0,06	1,16 $\pm$ 0,19	0,69 $\pm$ 0,24
50	0,50 $\pm$ 0,08	0,23 $\pm$ 0,05	0,95 $\pm$ 0,20	0,58 $\pm$ 0,21
Signifikanz (P)	0,0003	0,008	0,001	0,039

### 3.3 Vitalitätsuntersuchungen

Als Parameter zur Bestimmung der Vitalität wurde das Reduktionsvermögen der Dehydrogenasen genutzt. Diese Methode ist in der Biologie bei Aktivitätsuntersuchungen an Zellkulturen verbreitet (Bhupathiraju et al., 1999; DiMaio und Shillito, 1989; Towell und Mazur, 1975), wenn keine Zellzahl- (Bakterien, Hefen) oder Fluoreszenzmessungen (Pflanzen) möglich sind.

In Abb. 15 ist die Beeinflussung der Vitalität durch Cd(II) und Zn(II) dargestellt. Dabei beziehen sich alle Werte auf die Kontrolle, deren Extinktionswert in Bezug zur Trockenmasse bei jeder Messung auf 100 % festgelegt wurde.

Unter den hier verwendeten Anzuchtbedingungen konnte eine Verringerung der Vitalität sowohl durch Cd(II), als auch Zn(II) in Abhängigkeit von der Schwermetallkonzentration beobachtet werden. Dabei ist P für die Cd(II)-Werte = 0,012 und für die Zn(II)-Werte = 0,0001.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Wachstumsphasen konnte nicht beobachtet werden, auch wenn der intrazelluläre Gehalt an Schwermetall variierte (3.7.2). Jedoch scheinen Unterschiede zwischen den beiden Stämme in der logarithmischen Phase aufzutreten. So wurde die Vitalität des Stammes H4-2-4 durch 25  $\mu$ M Cd(II) stärker verringert (auf 55 %) als das bei H8-2-1 der Fall war (auf 84 %). Bei hohen Konzentrationen (150  $\mu$ M) drehte sich dieses Verhältnis um und der Stamm H8-2-1 zeigte mit 16 % eine deutlich geringere Vitalität als der Stamm H4-2-4 mit 34,5 %. Solche Unterschiede waren in der stationären Phase für Cd(II) nicht zu beobachten.

Unter niedrigen Zn(II)-Konzentrationen war zu beobachten, dass die Vitalität von H4-2-4 weniger beeinflusst wurde als von H8-2-1, wobei der Vitalitätsanstieg beim Stamm H4-2-4 in der stationären Phase auf 118 % bemerkenswert ist. Bei einer 250  $\mu$ M Zn(II)-Gabe wurde die Vitalität von H4-2-4 auf ca. 53 % verringert. H8-2-1 zeigte eine Verminderung auf ca. 42 % wobei es keine Unterschiede zwischen den Wachstumsphasen gab. Bei einer Belastung mit 350  $\mu$ M Zn(II) betrug die Vitalität beider Stämme in beiden Phasen etwa 30 %.

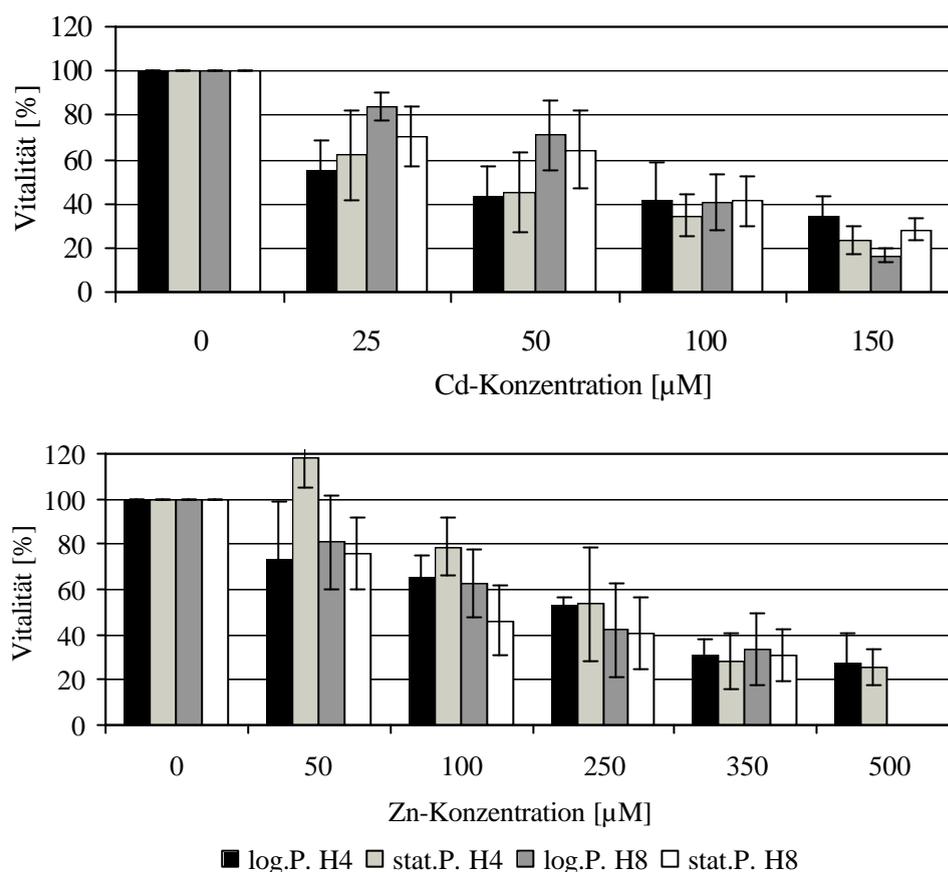


Abb. 15 Vitalitätsbestimmung mittels Triphenyl-Tetrazoliumchlorid-Methode in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase der *H. lugdunensis*-Stämme H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)- und Zn(II)-Belastung (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 5)

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Cd(II) die Vitalität stärker herabsetzt als Zn(II) (Abb. 15, Anhang A Tab. 3 + 4).

### 3.3.1 Vitalität in Abhängigkeit von der Temperatur

Weiterhin sollte der Einfluss der Anzuchtstemperatur auf die Vitalität der Pilzstämme in der logarithmischen Wachstumsphase geklärt werden. In Tab. 15 sind die Daten zusammengefasst.

Tab. 15 Einfluss der Temperatur auf die Vitalität der *H. lugdunensis*-Stämme H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)-Belastung in der logarithmischen Wachstumsphase (120 U/min, dunkel) (n = 4 für 10 °C und n = 5 für 14 °C)

Cd [ $\mu\text{M}$ ]	Vitalität [Yield %] 10 °C		Vitalität [Yield %] 14 °C	
	H4-2-4	H8-2-1	H4-2-4	H8-2-1
0	100	100	100	100
25	63,10 $\pm$ 13,01	66,18 $\pm$ 14,44	54,95 $\pm$ 13,87	83,90 $\pm$ 6,22
50	48,35 $\pm$ 13,90	53,65 $\pm$ 18,28	43,58 $\pm$ 13,41	70,89 $\pm$ 15,82
Signifikanz (P)	0,0003	0,0024	0,0001	0,0001

Für den Stamm H4-2-4 zeigen sich unter diesen Bedingungen keine signifikanten Unterschiede zwischen 10 °C und 14 °C ( $P = 0,399$  für 25  $\mu\text{M}$  und  $P = 0,618$  für 50  $\mu\text{M}$ ). Eine Temperaturerniedrigung um 4°C setzt die Vitalität um 21 % (25  $\mu\text{M}$ ) bzw. 24 % (50  $\mu\text{M}$ ) in Stamm H8-2-1 herab ( $P = 0,041$  bzw.  $P = 0,172$ ).

### 3.4 Einfluss der Schwermetalle Cd(II) und Zn(II) auf den Wassergehalt

Beim Ermitteln des Verhältnisses von Frischmasse zur Trockenmasse wurde beobachtet, dass der Wassergehalt von *H. lugdunensis* durch Erhöhung der Schwermetallkonzentration gesenkt wird (Abb. 16). Dies könnte ein weiteres Indiz für die Vitalität eines Organismus' sein.

In den Kontrollansätzen betrug das Frischmasse-zu-Trockenmasse-Verhältnis für H4-2-4 8,0 und 8,1 in der logarithmischen bzw. stationären Wachstumsphase. Für H8-2-1 waren es 8,4 bzw. 8,8. Die Phasenunterschiede sind nicht signifikant.

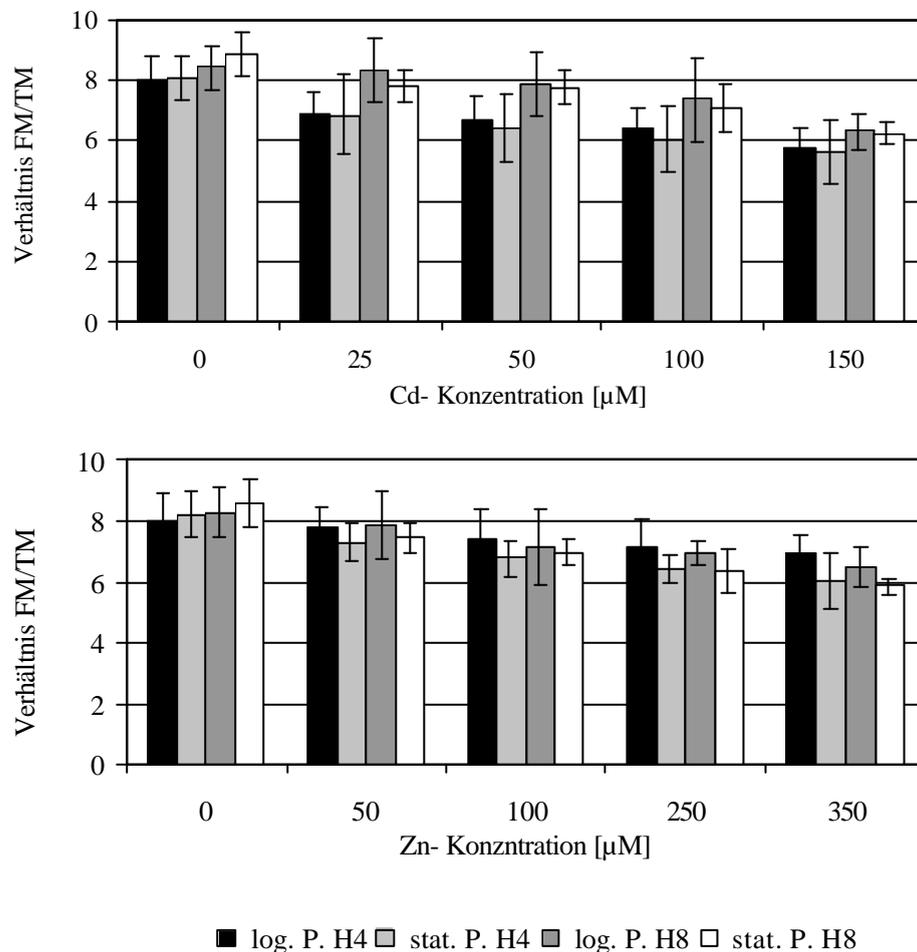


Abb. 16 Beeinflussung des Wassergehaltes in *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 durch Cd(II)- und Zn(II)-Stress in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase ( $n = 5-14$ )

Mit zunehmender Schwermetallkonzentration sinkt dieses Verhältnis und beträgt für den Stamm H4-2-4 bei einer 150  $\mu\text{M}$  Cd(II)-Belastung in der logarithmischen Phase nur noch 72 % und in der stationären Phase 69,5 % der Kontrolle. Für den Stamm H8-2-1 sind es 75 % bzw. 70 %. Die P-Werte dazu betragen  $P = 0,0005$  und  $P < 0,0001$  für H4-2-4. Für H8-2-1 ist  $P < 0,0001$  für beide Wachstumsphasen.

Auch für Zn(II) können solche Effekte beobachtet werden, obwohl die prozentuale Abnahme bei diesem Metall im Gegensatz zu Cd(II) geringer ist. So betrug das Verhältnis für H4-2-4 in der logarithmischen Phase bei einer 350  $\mu\text{M}$  Belastung 86 % ( $P = 0,026$ ) und in der stationären Phase 73 % ( $P < 0,0001$ ) der Kontrolle. Für H8-2-1 sind es 78 bzw. 68 % ( $P = 0,0359$  bzw.  $P < 0,0001$ ).

Der Wassergehalt im Stamm H8-2-1 scheint unter Cd(II) weniger beeinflusst zu werden als beim Stamm H4-2-4. Für Zn(II) lassen sich solche Tendenzen nicht beobachten.

Die Absolutwerte sind im Anhang A in Tab. 22 dargestellt.

### 3.5 Einfluss der Schwermetalle Cd(II) und Zn(II) auf den pH-Wert im Kulturmedium von *H. lugdunensis*

Da berichtet wird, dass unter Schwermetallstress einige Pilze Säuren ins Medium abgeben, wurde der pH-Wert im Mediums näher untersucht. Die Medien hatten vor der Inokulation einen pH von  $5,17 \pm 0,12$ .

Nach Ernte der Pilze wurde eine Ansäuerung des Mediums in den Kontrollen der beiden Stämme und Untersuchungszeiten gemessen. In den belasteten Proben trat ebenfalls eine Ansäuerung auf doch war diese geringer als in den Kontrollen. Weiterhin konnten keine signifikanten Veränderungen in Abhängigkeit vom Schwermetall und dessen Konzentration festgestellt werden, obwohl sich für Cd(II) nicht signifikante Tendenzen erkennen ließen. So war die Ansäuerung des Mediums mit zunehmender Konzentration geringer (Tab. 16). Für Zink blieben die pH-Werte unverändert zur Kontrolle

**Tab. 16 Untersuchungen zum pH-Wert in den Kulturmedien der *H. lugdunensis*-Stämme H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)-Belastung (n = 3-5)**

	H4-2-4		H8-2-1	
	Log. Phase	Stationäre Phase	Log. Phase	Stationäre Phase
reines Medium	$5,17 \pm 0,120$	$5,17 \pm 0,120$	$5,17 \pm 0,120$	$5,17 \pm 0,120$
Kontrolle	$3,81 \pm 0,296$	$4,00 \pm 0,073$	$4,10 \pm 0,210$	$4,29 \pm 0,059$
25 $\mu\text{M}$ Cd(II)	$4,23 \pm 0,014$	$4,27 \pm 0,006$	$4,34 \pm 0,085$	$4,20 \pm 0,080$
50 $\mu\text{M}$ Cd(II)	$4,25 \pm 0,028$	$4,24 \pm 0,026$	$4,52 \pm 0,042$	$4,24 \pm 0,150$
100 $\mu\text{M}$ Cd(II)	$4,35 \pm 0,117$	$4,29 \pm 0,081$	$4,79 \pm 0,210$	$4,45 \pm 0,224$
150 $\mu\text{M}$ Cd(II)	$5,07 \pm 0,313$	$4,78 \pm 0,618$	$4,91 \pm 0,380$	$5,14 \pm 0,569$

Die beiden Stämme zeigten in der Kontrolle in der stationären Phase einen leicht höheren pH-Wert im Vergleich zur logarithmischen Phase. Beide Stämme säuern das Medium mit zunehmender Cd(II)-Konzentration, vor allem bei 150  $\mu\text{M}$ , weniger an.

### 3.6 Untersuchungen zur Zellwandzusammensetzung

Organismen kommen in ihrer Umgebung mit Schadstoffen und Xenobiotika zuerst an ihrer äußersten Begrenzungsschicht in Berührung. Für Pflanzen und Pilze ist dies die Zellwand. Da für *H. lugdunensis* keine Literaturdaten zur Zellwandzusammensetzung vorlagen, sollten im Rahmen dieser Arbeit erste Untersuchungen durchgeführt werden. Außerdem stellte sich die Frage, ob sich die Zellwandzusammensetzung von *H. lugdunensis* unter Schwermetallstress verändert. Dazu wurde die löslichen Zuckerfraktionen bzw. Monosaccharidzusammensetzung mittels Gaschromatographie (2.6.13) bestimmt (Abb. 17).

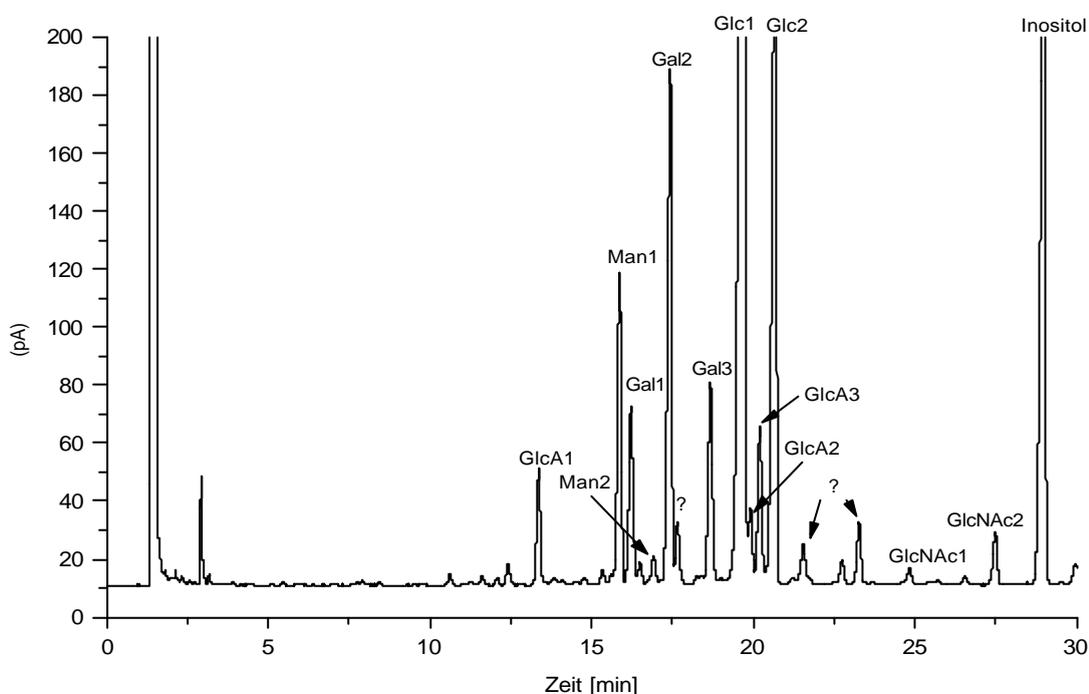


Abb. 17 Gaschromatogramm einer ungestressten *H. lugdunensis* Zellwandfraktion

Aus diesem Chromatogramm wird deutlich, dass die Hauptbestandteile der Zellwand bei *H. lugdunensis* Glucose, Galaktose, Mannose und Glucuronsäure sind. Nur in sehr geringen Konzentrationen kann N-Acetyl-Glucosamin, der Grundbaustein des Chitins, bestimmt werden.

Beide Stämme wurden in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und untersucht. Gestresst wurde exemplarisch mit 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) und 250  $\mu\text{M}$  Zn(II), Konzentrationen, die biochemisch bereits eine signifikante Beeinflussung des Stoffwechsels (Thiolmetabolismus) bewirkten. In Tab. 17 sind die Zuckerkhäufigkeiten dargestellt.

**Tab. 17 Zusammensetzung der Zuckerfraktionen aus der Zellwand von *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 in der logarithmischen Wachstumsphase unter Cd(II)- und Zn(II)-Belastung (n=4). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle (P < 0,05) sind grau schattiert dargestellt**

	H4-2-4			H8-2-1		
	Zuckeranteile [% Totalgewicht]			Zuckeranteile [% Totalgewicht]		
	Kontrolle	100 µM Cd	250 µM Zn	Kontrolle	100 µM Cd	250 µM Zn
N-Acetyl-Glucosamin	3,00 ± 0,14	3,79 ± 1,23	3,06 ± 0,54	3,07 ± 0,97	3,27 ± 1,04	3,36 ± 0,63
Mannose	4,50 ± 1,26	4,17 ± 1,43	4,38 ± 0,74	7,00 ± 1,67	5,83 ± 0,53	7,03 ± 1,63
Glucuronsäure	8,45 ± 1,76	5,56 ± 1,66	8,66 ± 1,45	9,60 ± 2,04	7,60 ± 0,88	8,24 ± 1,82
Galaktose	12,31 ± 3,41	14,94 ± 5,71	12,84 ± 0,69	22,43 ± 4,21	19,23 ± 3,25	15,33 ± 3,32
Glucose	31,59 ± 5,53	17,25 ± 6,05	31,01 ± 7,54	36,77 ± 7,05	35,73 ± 7,96	30,46 ± 5,90
Summe	59,85	45,71	59,95	78,87	71,66	64,42

Der Zuckeranteil der Zellwand in den Kontrollen beider Pilzstämmen lag zwischen 59,8 % (H4-2-4) und 78,9 % (H8-2-1). Die stärksten Stammunterschiede sind im Mannose- und Galaktose-Anteil zu finden. Im Stamm H4-2-4 wird unter Cd(II)-Stress der Glucuronsäure- und Glucose-Anteil der Zellwand signifikant um 34 % bzw. 45 % verringert. Auch der Gesamtzuckeranteil sinkt. Im Stamm H8-2-1 hingegen sind keine signifikanten Veränderungen unter Cd(II)-Belastung zu beobachten, obwohl auch hier der Glucuronsäure-Anteil um 21 % sinkt. 250 µM Zn(II) haben auf die Zuckerzusammensetzung der Zellwand des Stammes aus dem belasteten Standort keinen Einfluss. Hingegen reagiert H8-2-1 mit einer signifikanten Verringerung des Galaktose-Anteils um 32 %. Dies wirkte sich auch auf die Gesamtsumme aus, die ebenfalls verringert wurde.

### 3.7 Akkumulations- und Biosorptionsvermögen

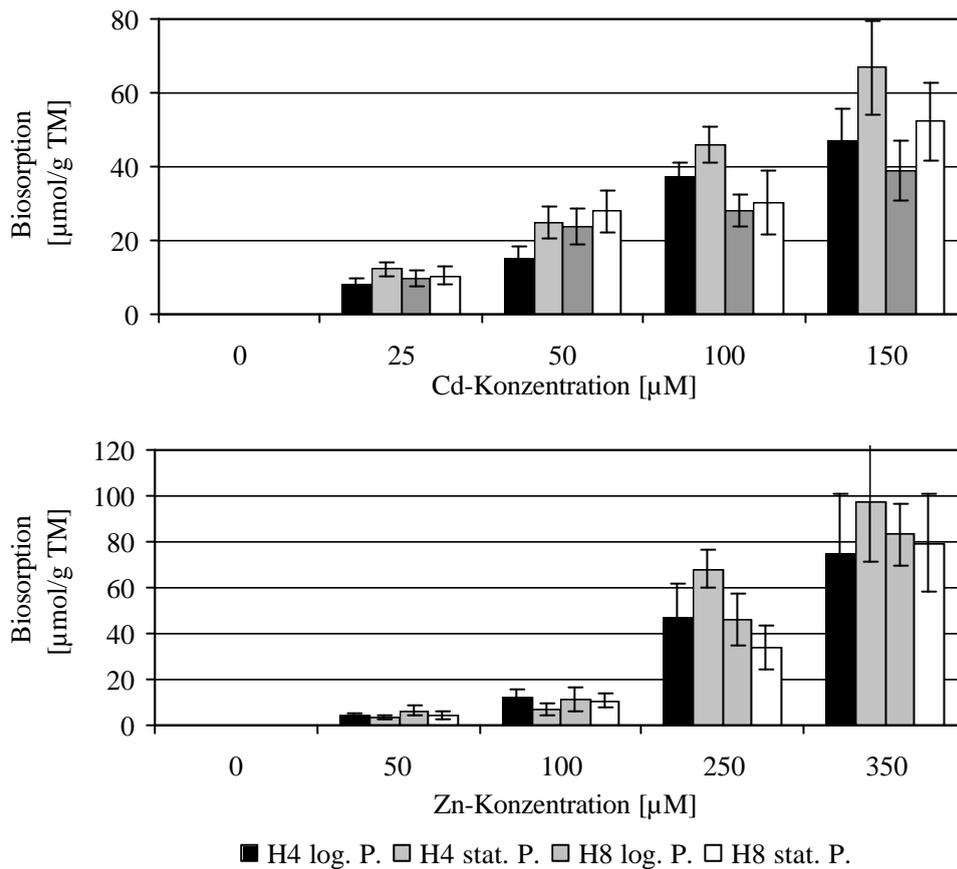
Die Schädigung von Organismen durch Schwermetalle und somit auch die Biomasseproduktion hängt vor allem von der aufgenommenen Metallmenge ab, die dann im Stoffwechsel verfügbar ist. Dieses Aufnahmevermögen, im Weiteren als Akkumulation bezeichnet, ist von der Biosorption der Metalle abhängig. Die Metallaufnahme bei Pilzen ist ein biphasischer Prozess, bestehend aus einem Stoffwechsel-unabhängigen (Biosorption) und Stoffwechsel-abhängigen (Akkumulation) Schritt (Blackwell et al., 1995).

#### 3.7.1 Biosorption

Die Menge an Schwermetall, die an der Zellwand über unterschiedlichste Mechanismen gebunden wird - Biosorption - sollte bestimmt werden. Dazu wurden die Pilze wie unter 2.2 und 2.6.12 beschrieben angezogen und aufgeschlossen. In Abb. 18 ist das Biosorptionsverhalten der *H. lugdunensis*-Stämme dargestellt.

Die Biosorption von Cd(II) und Zn(II) durch *H. lugdunensis* ist abhängig vom angebotenen Metall sowie dessen Konzentration. Vor allem bei höheren Metallkonzentrationen wird in der

stationären Wachstumsphase deutlich mehr Metall als in der logarithmischen Phase biosorbiert. Dabei muss berücksichtigt werden, dass zwischen den Kulturphasen Differenzen in der Metallexposition liegen (3 Tage bei Ernte in der logarithmischen Phase, 5 Tage bei Ernte in der stationären Phase). H4-2-4 biosorbiert bei einer Belastung mit 25  $\mu\text{M}$  Cd(II) 8,2  $\mu\text{mol/g}$  TM in der logarithmischen Phase bzw. 12,2  $\mu\text{mol/g}$  TM in der stationären Phase. Bei einer Belastung mit 150  $\mu\text{M}$  Cd(II) sind es 47,2 bzw. 66,9  $\mu\text{mol/g}$  TM. Das entspricht einem Anstieg um das 6fache bzw. 5,5fache.



**Abb. 18** Biosorption durch *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 in der logarithmischen und stationären Phase in Abhängigkeit von der Schwermetallkonzentration (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 4 für Cadmium; n = 5 für Zink)

Auch Stamm H8-2-1 biosorbierte in der stationären Phase unter hohen Schwermetallkonzentrationen mehr Cd(II) als in der logarithmischen Phase. Die Mittelwerte betragen für eine Belastung mit 25  $\mu\text{M}$  Cd(II) 9,8  $\mu\text{mol/g}$  TM und 10,4  $\mu\text{mol/g}$  TM und 39,1 bzw. 52,2  $\mu\text{mol/g}$  TM für eine Belastung mit 150  $\mu\text{M}$  Cd(II), was einen Anstieg um das 4- bzw. 5fache bedeutet.

Es kann festgestellt werden, dass der Stamm H4-2-4 bei höheren Cd(II)-Konzentrationen mehr Schwermetall biosorbierte als Stamm H8-2-1.

Die Wiederfindung für Cd(II) lag zwischen 85% und 110% und wurde mit berücksichtigt.

Für Zink ließen sich ähnliche Tendenzen beobachten. So biosorbierte der Stamm H4-2-4 auch hier mehr Metall als der Stamm H8-2-1. Einzige Differenz ist der Wert für 350 µM Zn(II) in der logarithmischen Phase, bei dem diese Tendenz nicht erkennbar ist. Man muss davon ausgehen, dass hohe Standardabweichungen exakte Aussagen in diesem Bereich erschweren.

Der Stamm H4-2-4 biosorbiert bei einer Belastung mit 50 µM Zn(II) 4,2 µmol/g TM in der logarithmischen Phase und 3,2 µmol/g TM in der stationären Phase, bei einer Belastung mit 350 µM 75,1 bzw. 97,4 µmol/g TM. Das entspricht einem Anstieg um das 13,5 bzw. 30fache. H8-2-1 biosorbierte 6,2 bzw. 4,1 µmol/g TM bei einer Belastung mit 50 µM Zn(II) und 83,3 bzw. 79,5 µmol/g TM bei einer Belastung mit 350 µM Zn(II) in der logarithmischen bzw. stationären Phase, d.h., eine Steigerung um das 13,5 bzw. 19fache. Bei einer 350 µM Zn(II)-Exposition biosorbierte H8-2-1 in der stationären Phase rund 20 % weniger Zn(II) als H4-2-4.

Bei niedriger Zn(II)-Belastung ist die Biosorption in der stationären Phase bei beiden Stämmen geringer als in der logarithmischen Phase. Für H8-2-1 trifft dies auch für hohe Zn(II)-Konzentrationen zu.

Die Wiederfindungsraten für Zn(II) lagen zwischen 71 % und 124 %.

Die mathematische Beschreibung der Biosorption in Abhängigkeit von der Cd(II) und Zn(II)-Konzentration ist in Tab. 18 zusammengefasst.

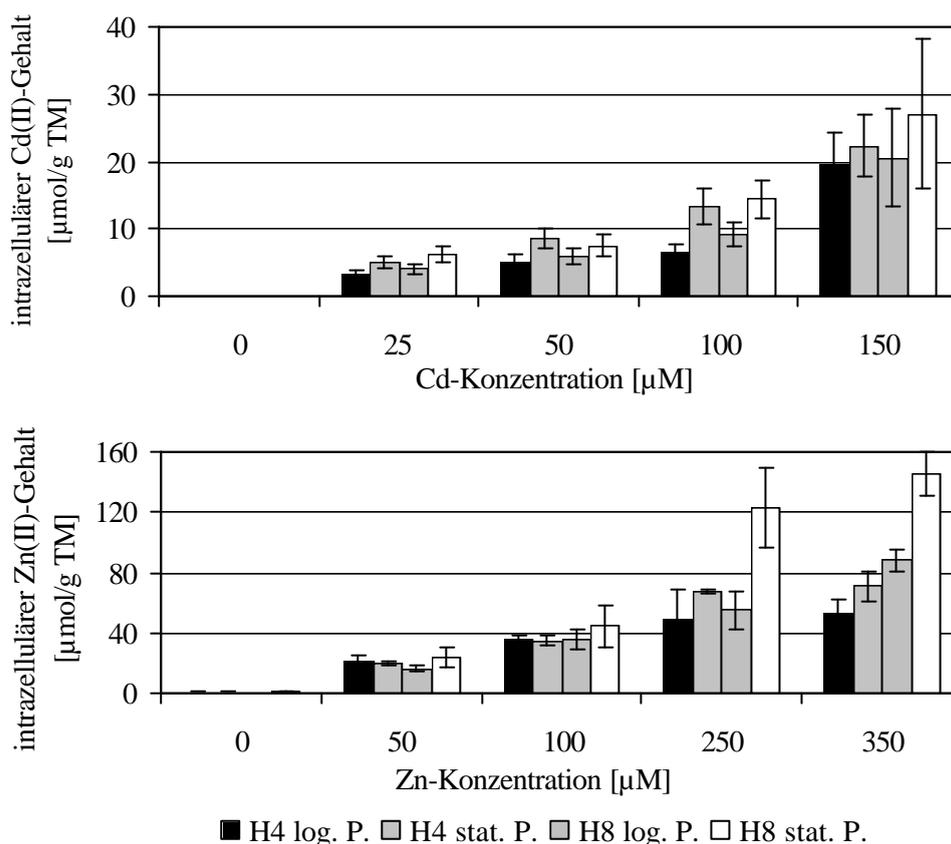
**Tab. 18 Mathematische Beschreibung des Biosorption durch *H. lugdunensis* in Abhängigkeit von der Schwermetallkonzentration**

	Mathematische Funktion	Regressionskoeffizient R <sup>2</sup>
<b>Cadmium</b>		
H4-2-4 logarithmische Phase	$y = 0,6737x^2 + 10,551x + 4,4164$	0,961
H4-2-4 stationäre Phase	$y = 2,1165x^2 + 7,9516x + 1,6858$	0,998
H8-2-1 logarithmische Phase	$y = -0,7404x^2 + 12,895x - 1,451$	0,967
H8-2-1 stationäre Phase	$y = 1,0871x^2 + 7,3696x + 3,6475$	0,934
<b>Zink</b>		
H4-2-4 logarithmische Phase	$y = 1,727 e^{0,995x}$	0,970
H4-2-4 stationäre Phase	$y = 0,847e^{1,249x}$	0,924
H8-2-1 logarithmische Phase	$y = 2,281e^{0,920x}$	0,969
H8-2-1 stationäre Phase	$y = 1,515e^{1,0018x}$	0,998

Entsprechend Volesky und Holan (1995) wurden keine direkten Kinetiken aufgenommen, da es sich bei der Anzucht der Pilzstämmen um eine wachsende Kultur handelte. Das bedeutet, dass das Verhältnis von Biomasse zu angebotenen Schwermetall ständig variiert. Durch diesen Fakt wären die Parameter, die zur Erstellung einer Biosorptionsisotherme nach Langmuir und Freundlich erforderlich sind, variabel und die Kinetik mit Fehlern behaftet bzw. nicht aussagekräftig und weiterhin nicht mit anderen Kinetiken vergleichbar.

### 3.7.2 Akkumulation

Die Akkumulation, in diesem Fall gleichzusetzen mit dem intrazellulären Gehalt an Schwermetall zeigte, wie auch die Biosorption eine Abhängigkeit von der Metallkonzentration und der Expositions- bzw. Wachstumsdauer. In Abb. 19 ist das Akkumulationsverhalten beider Stämme in Bezug auf Cd(II) und Zn(II) dargestellt. Es wird deutlich, dass beide Stämme eine höhere Kapazität in der Aufnahme von Zink zeigen. Außerdem nahmen sie in der stationären Phase sowohl mehr Cd(II) als auch Zn(II) auf.



**Abb. 19** Akkumulation von Cd(II) und Zn(II) durch die *H. lugdunensis*-Stämme H4-2-4 und H8-2-1 in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 4)

Der Stamm H4-2-4 akkumulierte bei einer Cd(II)-Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  in der logarithmischen Phase 3,20  $\mu\text{mol/g TM}$  und in der stationären Phase 4,98  $\mu\text{mol/g TM}$ . Die akkumulierte Menge erhöhte sich mit steigender Konzentration und erreichte bei 150  $\mu\text{M}$  19,56  $\mu\text{mol/g TM}$  bzw. 22,32  $\mu\text{mol/g TM}$ , was einem Anstieg um das 6- bzw. 4,5fache entspricht. Im Gegensatz dazu akkumulierte der Stamm H8-2-1 4,09  $\mu\text{mol/g TM}$  bzw. 6,23  $\mu\text{mol/g TM}$  bei einer Belastung mit 25  $\mu\text{M}$  Cd(II) und das 6,5fache (20,58  $\mu\text{mol/g TM}$ ) bzw. 5,5fache (27,1  $\mu\text{mol/g TM}$ ) bei einer Belastung von 150  $\mu\text{M}$ .

Für Zink wurden ähnliche Befunde gemessen. Beide Stämme haben einen Grundgehalt an intrazellulärem Zn(II) von etwa 0,5 µmol/g TM in der logarithmischen und 0,6 µmol/g TM in der stationären Wachstumsphase.

Bei einer Belastung mit 50 µM Zn(II) stieg dieser Gehalt bei H4-2-4 durchschnittlich auf 20,8 µmol/g TM in der logarithmischen und 19,5 µmol/g TM in der stationären Phase an. Bei dem Stamm H8-2-1 war ein Anstieg auf 16,1 bzw. 23,9 µmol/g TM zu beobachten, wobei die Unterschiede zwischen den beiden Stämmen, aber auch den Wachstumsphasen nicht signifikant waren. Erst bei höheren Belastungskonzentrationen mit Zn(II) wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Phasen, aber auch Stämmen deutlich. So akkumulierte H4-2-4 bei einer 350 µM Belastung 52,97 bzw. 70,8 µmol/g TM und H8-2-1 88,1 bzw. 145,3 µmol/g TM. Das heißt, dass bei H4-2-4 die Akkumulation um das 2,5fache bzw. 3,5fache und für H8-2-1 um das 5,5fache bzw. 6fache ansteigt.

Außerdem wird deutlich, dass H8-2-1 bei einer Belastung mit 350 µM Zn(II) in beiden Wachstumsphasen etwa doppelt soviel Zn(II) akkumuliert wie H4-2-4.

Der Stamm H8-2-1 aus dem moderat belasteten Standort akkumulierte bei höheren Schwermetallbelastungen durchschnittlich mehr Cd(II) und Zn(II), wohingegen der Stamm H4-2-4 mehr Metall biosorbierte.

**Tab. 19 Mathematische Beschreibung des Akkumulation durch *H. lugdunensis* in Abhängigkeit von der Schwermetallkonzentration**

	Mathematische Funktion	Regressionskoeffizient R <sup>2</sup>
<b>Cadmium</b>		
H4-2-4 logarithmische Phase	$y = 2,7548x^2 - 8,7243x + 9,7768$	0,9558
H4-2-4 stationäre Phase	$y = 1,3540x^2 - 1,0883x + 4,8628$	0,9975
H8-2-1 logarithmische Phase	$y = 2,3877x^2 - 6,6530x + 8,7570$	0,9878
H8-2-1 stationäre Phase	$y = 2,8612x^2 - 7,3493x + 10,710$	1,000
<b>Zink</b>		
H4-2-4 logarithmische Phase	$y = 17,109 e^{0,9115x}$	0,8988
H4-2-4 stationäre Phase	$y = 13,698 e^{0,4518x}$	0,9176
H8-2-1 logarithmische Phase	$y = 10,201 e^{0,5543x}$	0,9793
H8-2-1 stationäre Phase	$y = 13,219 e^{0,6432x}$	0,9415

Mathematisch lässt sich die Akkumulation von Cd(II) gut mittels quadratischer Gleichung und für Zn(II) exponentiell beschreiben. Zur Berechnung der exponentiellen Werte wurden die Werte der Kontrolle nicht mit einbezogen. Die Regressionskoeffizienten für Zn(II) zeigen, dass die Näherung nicht optimal ist. Das könnte daran liegen, dass bei hohen Metallkonzentrationen, wie zu erwarten, bereits eine Sättigung zu beobachten war.

### 3.7.3 Biosorption und Akkumulation in Abhängigkeit von der Temperatur

Physikalisch gesehen ist die Biosorption, eine Form der Adsorption, von der Temperatur abhängig. In der Literatur sind jedoch sowohl temperaturabhängige als auch temperaturunabhängige Biosorptions- und Akkumulationsvorgänge bei verschiedenen Organismen (meist pilzlichen Ursprungs) beschrieben (Blackwell et al., 1995). Deswegen war für die *H. lugdunensis*-Stämme eine Einschätzung der Biosorption und Akkumulation in Abhängigkeit von der Temperatur sinnvoll. In Tab. 20 sind die Werte für die Biosorption und Akkumulation von Cd(II) bei einer Belastung von 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  für die beiden untersuchten Stämme dargestellt.

Für *H. lugdunensis* liegt eine Abhängigkeit der Biosorption und Akkumulation von der Temperatur vor, wobei die Biosorption stärker durch eine Temperatursteigerung um 4 °C vermindert, als die Akkumulation erhöht wird.

H4-2-4 biosorbiert bei 10 °C und einer Belastung mit 25  $\mu\text{M}$  Cd(II) 1,5mal ( $P = 0,004$ ) und bei einer Belastung mit 50  $\mu\text{M}$  Cd(II) 2mal ( $P = 0,0004$ ) mehr Metall als bei 14 °C. Auch bei H8-2-1 ist die Biosorption bei niedrigerer Temperatur um das 1,5- ( $P = 0,02$ ) bzw. 2fache ( $P = 0,04$ ) erhöht.

**Tab. 20** Biosorption und Akkumulation von Cd(II) durch die *H. lugdunensis*-Stämme H4-2-4 und H8-2-1 in der logarithmischen Wachstumsphase unter unterschiedlichen Anzuchtstemperaturen (120 U/min, dunkel) (n=3 für 10 °C und n=4 für 15 °C)

	Biosorption [ $\mu\text{mol/g TM}$ ]		Akkumulation [ $\mu\text{mol/g TM}$ ]	
	10 °C	14 °C	10 °C	14 °C
H4-2-4				
25 $\mu\text{M}$ Cd(II)	12,63 $\pm$ 0,65	8,21 $\pm$ 1,39	3,00 $\pm$ 0,15	3,20 $\pm$ 0,61
50 $\mu\text{M}$ Cd(II)	33,63 $\pm$ 2,66	15,17 $\pm$ 2,95	3,80 $\pm$ 0,28	5,16 $\pm$ 0,99
H8-2-1				
25 $\mu\text{M}$ Cd(II)	14,35 $\pm$ 1,13	9,85 $\pm$ 2,17	4,06 $\pm$ 0,40	4,90 $\pm$ 0,78
50 $\mu\text{M}$ Cd(II)	43,15 $\pm$ 13,45	23,94 $\pm$ 4,93	4,21 $\pm$ 0,63	5,87 $\pm$ 1,21

Die Akkumulation als Prozess, der vom Stoffwechsel abhängig ist, wird weniger stark beeinflusst. Dabei ist hier zu erkennen, dass eine Erhöhung der Temperatur um 4 °C die Aufnahme steigert. So stieg für H4-2-4 die Aufnahme um 7% ( $P = 0,6$ ) bei 25  $\mu\text{M}$  und 35 % bei 50  $\mu\text{M}$  Cd(II)-Belastung ( $P = 0,07$ ) und bei H8-2-1 um 21 % ( $P = 0,15$ ) bzw. 39 % ( $P = 0,09$ ) nicht signifikant an.

Zu beobachten ist, dass H8-2-1 bei diesen Metallkonzentrationen sowohl mehr Cd(II) biosorbiert als auch akkumuliert, was möglicherweise auch die Ursache für den stärkeren Biomasseverlust sein könnte (siehe 3.2.3).

### 3.8 Untersuchungen zum Thiolstoffwechsel unter Cd(II) und Zn(II)-Belastung

#### 3.8.1 Beeinflussung des Sulfat-Gehaltes

Als Ausgangsmetabolit für den Schwefelstoffwechsel kann Sulfat angesehen werden. Durch Sulfatassimilation werden daraus weitere Metabolite (Cystein, Sulfid,  $\gamma$ -Glutamylcystein etc.) synthetisiert, die in der Schwermetalldetoxifikation eine große Rolle spielen. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob sich der Gehalt an intrazellulären Sulfat durch Einwirkung von Schwermetallen beeinflussen lässt. Dabei stand für die Organismen nur das im Komplexmedium (2.2.2) vorhandene Sulfat, welches durchschnittlich zwischen 0,16 und 0,20  $\mu\text{mol/mL}$  betrug, zur Verfügung.

In Abb. 20 ist der intrazelluläre Sulfatgehalt der *H. lugdunensis*-Stämmen unter Schwermetallbelastung in den einzelnen Wachstumsphasen dargestellt.

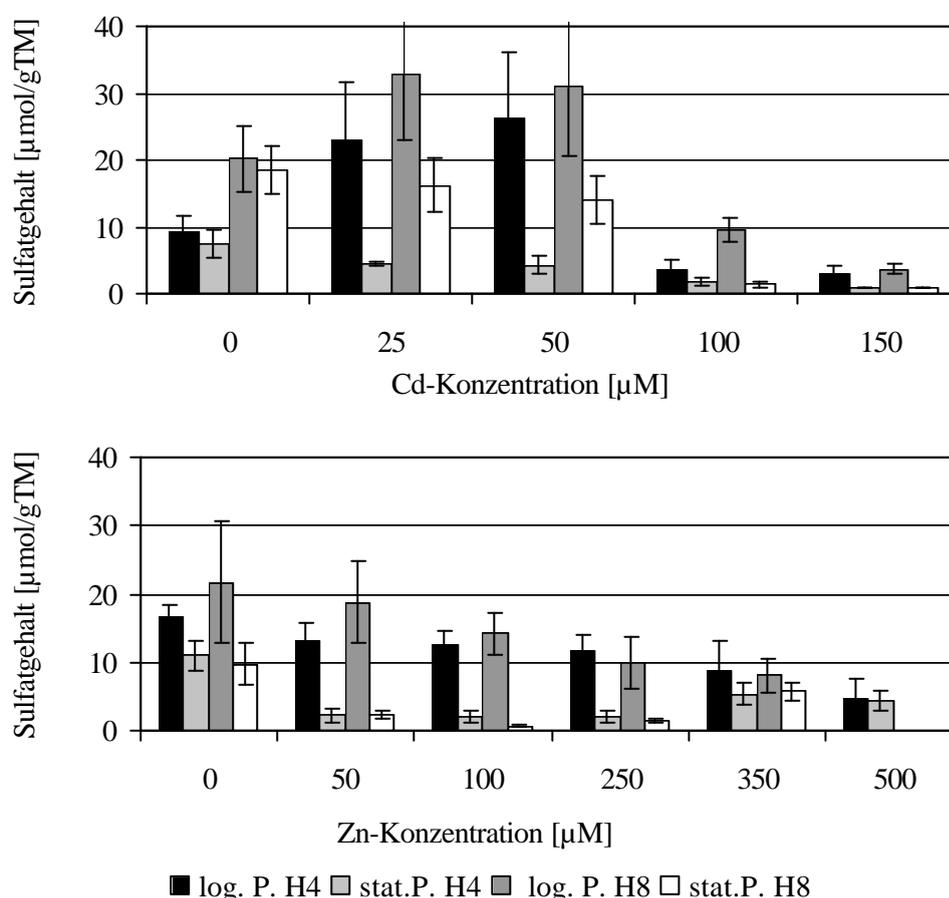


Abb. 20 Sulfat-Gehalt von *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)- und Zn(II)-Stress in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 5-6)

Es zeigt sich, dass die Belastung mit geringeren Cd(II)-Konzentrationen in der logarithmischen Wachstumsphase zuerst zu einem Anstieg des Sulfats, bei höheren Konzentrationen hingegen zu einem drastischen Abfall führt. Dabei steigt der Gehalt an Sulfat bei einer Belastung mit 50  $\mu\text{M}$  Cd(II) für H4-2-4 von 9,2 auf 26,3  $\mu\text{mol/g TM}$  ( $P = 0,046$ ) und für H8-2-1 von 20,2 auf

30,9  $\mu\text{mol/g}$  TM ( $P = 0,044$ ) an. Bei einer Belastung mit 150  $\mu\text{M}$  Cd(II) sank der Sulfatgehalt jedoch drastisch, wobei für den Stamm H4-2-4 nur noch 2,0  $\mu\text{mol/g}$  TM ( $P = 0,038$ ) und für den Stamm H8-2-1 3,6  $\mu\text{mol/g}$  TM ( $P = 0,0001$ ) messbar waren.

In der stationären Phase war eine kontinuierliche Abnahme des Sulfatgehaltes in beiden Stämmen zu beobachten. Dabei sank der Sulfatgehalt bis zu einer Belastung von 150  $\mu\text{M}$  Cd(II) bei H4-2-4 von 7,4 auf 0,8  $\mu\text{mol/g}$  TM ( $P = 0,001$ ) und bei H8-2-1 von 18,5 auf 0,9  $\mu\text{mol/g}$  TM ( $P = 0,005$ ) ab. Die Rohdaten sind in Anhang A Tab. 9 zusammengefasst.

Für Zn(II) war unter den hier geführten Versuchsbedingungen eine kontinuierliche, fast lineare Abnahme des Gehaltes an Sulfat in der logarithmischen Phase für beide Stämme zu beobachten. Für H4-2-4 bedeutete dies eine Abnahme von 16,6 auf 8,9  $\mu\text{mol/g}$  TM bei einer 350  $\mu\text{M}$  Zn(II)-Belastung, was etwa 54 % entspricht. Der Stamm H8-2-1 zeigt eine Verringerung des Sulfatgehaltes von 21,7 auf 8,0  $\mu\text{mol/g}$  TM. Das entspricht 37 % der Kontrolle. In der stationären Phase kommt es zuerst zu einer drastischen Abnahme des Sulfats in den Zellen, wobei bei H4-2-4 der Gehalt an Sulfat bis zu einer Belastung von 250  $\mu\text{M}$  auf 1,97  $\mu\text{mol/g}$  TM sinkt und dann bei 350  $\mu\text{M}$  auf 5,3  $\mu\text{mol/g}$  TM ansteigt und bis 500  $\mu\text{M}$  auf 4,3  $\mu\text{mol/g}$  TM wieder sinkt. Auch der Stamm H8-2-1 zeigt diese Fluktuation. Dabei erreicht er bereits bei 100  $\mu\text{M}$  Zn(II)-Belastung ein Minimum an Sulfat in den Zellen (0,6  $\mu\text{mol/g}$  TM) und steigt dann wieder bis auf 5,8  $\mu\text{mol/g}$  TM bei 350  $\mu\text{M}$  Belastung an.

Eine mathematische Näherung zur Beschreibung der Sulfatgehalte stellte sich als schwierig heraus.

Exemplarisch wurden die Sulfatgehalte in den Medien kontrolliert, wobei unabhängig vom Stamm und der Wachstumsdauer bei Cd(II)- und Zn(II)-Belastung eine Verringerung der schon sehr geringen Sulfatgehalte beobachtet werden konnte. Bei höheren Zn(II)-Konzentrationen stieg der Sulfatgehalt, möglicherweise aufgrund des verringerten Wachstums, wieder langsam an (nicht dargestellt).

Nährlösungen der stationären Phase des Kontrollansatzes zeigten geringere Sulfatgehalte als Medien der logarithmische Phase.

Deutlich sichtbar werden bei den unbelasteten Proben die Unterschiede in den Sulfatgehalten zwischen den einzelnen Phasen und zwischen den einzelnen Stämmen. Der Stamm H4-2-4, aus dem belasteten Standort mit hohen Sulfatgehalten, wies einen geringeren intrazellulären Sulfatgehalt auf. Die Kontrollen des Cd(II)- und Zn(II)-Ansatzes zeigen unterschiedliche Sulfatgehalte, was möglicherweise auf einen Biorhythmus (auch im Wachstum) zurückgeführt werden muss.

### 3.8.2 Cystein und g-Glutamylcysteingehalte

Die thiolhaltige Aminosäure Cystein stellt einen Endpunkt der assimilatorischen Sulfatreduktion und einen Ausgangspunkt für die Synthese von Thioleptiden dar. Durch die Kondensation von

Cystein mit L-Glutaminsäure (katalysiert durch  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase;  $\gamma$ -ECS) entsteht  $\gamma$ -Glutamylcystein ( $\gamma$ -EC). Dieses Thiodipeptid ist bereits zur Schwermetallkomplexierung in der Lage. Wichtiger jedoch ist die Bedeutung von Cystein und  $\gamma$ -EC als Präkursoren für die Synthese von Glutathion. In Abb. 21 ist der Cysteingehalt in den untersuchten Pilzstämmen unter den hier verwendeten Laborbedingungen dargestellt.

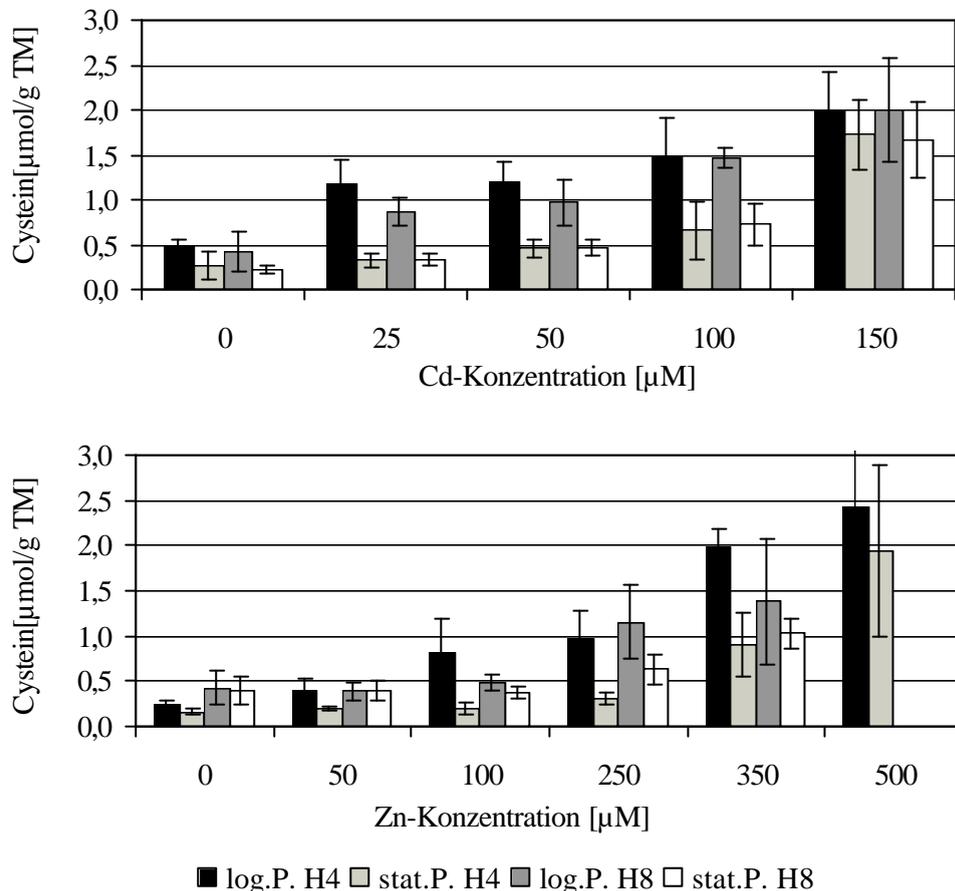


Abb. 21 Cystein-Gehalt von *H. lugdunensis*-Stamm H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)- und Zn(II)-Stress in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 4-6)

Der Cysteingehalt in den Pilzkulturen wird bereits ab einer Cadmiumkonzentration von 25  $\mu$ M signifikant erhöht ( $P = 0,001-0,004$  für beide Stämme und Phasen). So steigt der Gehalt an Cystein von 0,5  $\mu$ mol/g TM beim Stamm H4-2-4 in der logarithmischen Phase auf maximal 1,66  $\mu$ mol/g TM bei einer Belastung mit 150  $\mu$ M Cd(II) an, was einem Anstieg von 330 % entspricht. In der stationären Phase war der Anstieg bei hohen Belastungen sogar noch größer (550 %). Dies ist jedoch auch einer geringeren Ausgangskonzentration geschuldet. In H8-2-1 stieg der Cysteingehalt um 375 % in der logarithmischen und um 650 % in der stationären Phase an. Unter diesen Versuchsbedingungen zeigte H8-2-1 jedoch von Anfang an einen geringeren Cysteingehalt, was prozentual einen stärkeren Anstieg verursachte. Dabei stieg der Gehalt von 0,42 auf 2,00  $\mu$ mol/g TM bzw. von 0,22 auf 1,67  $\mu$ mol/g TM bei einer 150  $\mu$ M Belastung an.

Durch Zink ist der Cysteinpool in *H. lugdunensis* induzierbar. So steigt beim Stamm H4-2-4 der Gehalt von 0,23 auf 1,99  $\mu\text{mol/g TM}$  bzw. von 0,17 auf 0,91  $\mu\text{mol/g TM}$  (logarithmische und stationäre Phase, 350  $\mu\text{M}$  Zink) und ist durch 500  $\mu\text{M}$  noch weiter induzierbar. Der Anstieg ist ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  (logarithmische Phase) bzw. 250  $\mu\text{M}$  (stationäre Phase) signifikant. Für H8-2-1 ist der Anstieg in beiden Phasen erst ab 250  $\mu\text{M}$  signifikant. Dabei steigt die intrazelluläre Cysteinkonzentration von der Kontrolle bis zu einer 350  $\mu\text{M}$  Belastung von 0,43 auf 1,39  $\mu\text{mol/g TM}$  bzw. 0,39 auf 1,03  $\mu\text{mol/g TM}$  (logarithmische bzw. stationäre Phase).

Neben Cystein ist auch  $\gamma$ -Glutamylcystein ( $\gamma$ -EC) ein Präkursor des Glutathions. In Abb. 22 sind die Daten der Beeinflussung des  $\gamma$ -EC in *H. lugdunensis* durch Cd(II) und Zn(II) zusammengefasst.

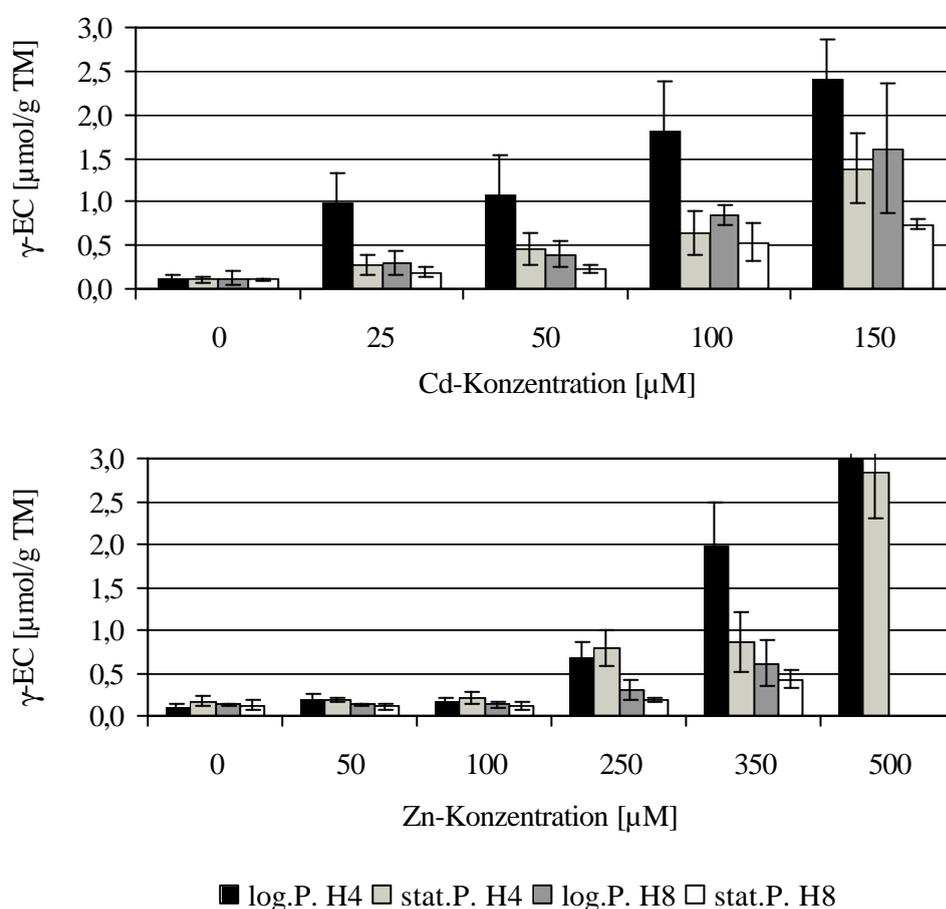


Abb. 22  $\gamma$ -Glutamylcystein-Gehalte von *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)- und Zn(II)-Stress in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 5)

Auch  $\gamma$ -EC wird in beiden *H. lugdunensis*-Stämmen ebenso wie Cystein sowohl durch Cd(II) als auch durch Zn(II) induziert. Dabei stieg der Gehalt an  $\gamma$ -EC in H4-2-4 bei Cd(II)-Belastung von 0,12  $\mu\text{mol/g TM}$  bereits bei 25  $\mu\text{M}$  auf 0,99  $\mu\text{mol/g TM}$  an, was etwa dem 8,5fachen der Kontrolle entspricht. Bei 150  $\mu\text{M}$  Schwermetallgabe erreichte der Wert 2,4  $\mu\text{mol/g TM}$ . Die Gehalte in der stationären Phase liegen deutlich unter denen in der logarithmischen. Der Stamm

H4-2-4 erreichte bei 25  $\mu\text{M}$  nur 0,27  $\mu\text{mol/g}$  TM und bei 150  $\mu\text{M}$  1,4  $\mu\text{mol/g}$  TM. Wiederum zeigte H8-2-1 in der stationären Phase eine verringerte Reaktion, wobei auch hier ein geringerer Anstieg als bei H4-2-4 zu beobachten war. So konnte eine Erhöhung des  $\gamma\text{-EC}$ -Gehaltes von 0,13  $\mu\text{mol/g}$  TM auf 1,6  $\mu\text{mol/g}$  TM in der logarithmischen Phase bei 150  $\mu\text{M}$  Cd(II) ermittelt werden. In der stationären Phase wurde ein Anstieg von 0,11  $\mu\text{mol/g}$  TM auf 0,74  $\mu\text{mol/g}$  TM gemessen. Das heißt, dass genau wie bei H4-2-4 bei der höchsten Cd(II)-Konzentration in der stationären Phase nur die Hälfte an  $\gamma\text{-EC}$  messbar war. Für alle Werte-Paare gilt  $P \leq 0,025$ .

Zink ruft in beiden *H. lugdunensis*-Stämmen eine Induktion des  $\gamma\text{-EC}$ -Pools hervor, wobei erst ab einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  signifikante Veränderungen gemessen wurden. Hierbei werden auch die Unterschiede zwischen den einzelnen Wachstumsphasen deutlich. So war in der stationären Phase weniger messbar als in der logarithmischen. Ein Anstieg um das 6,7fache (von 0,10 auf 0,68  $\mu\text{mol/g}$  TM) konnte bei H4-2-4 in der logarithmischen Phase [250  $\mu\text{M}$  Zn(II)] bestimmt werden. Bei 350  $\mu\text{M}$  Zn(II) wurde das 19,5fache gemessen. In der stationären Phase wurde nur eine Induktion um das 4,5 bzw. 5fache gemessen. Im Gegensatz dazu erreichte die Induktion bei H8-2-1 in der logarithmischen Phase nur das 2- bzw. 4,5fache in der logarithmischen Phase bei 250  $\mu\text{M}$  bzw. 350  $\mu\text{M}$  Zn(II) (von 0,11  $\mu\text{mol/g}$  TM über 0,30 auf 0,62  $\mu\text{mol/g}$  TM) und in der stationären Phase das 1,5fache bzw. 3,5fache (von 0,13  $\mu\text{mol/g}$  TM über 0,18 auf 0,43  $\mu\text{mol/g}$  TM).

### 3.8.3 Glutathiongehalte (oxidiert und reduziert)

Glutathion erfüllt eine wichtige Rolle bei der Xenobiotika- und Schwermetalldetoxifizierung. Aufgrund seiner Thiolgruppe kann es selbst Schwermetalle binden, aber auch als Vorstufe für weitere schwermetallbindende Komplexe angesehen werden.

Die Bestimmung des Gesamtglutathions erfolgte sowohl durch Derivatisierung mit Monobrombiman (2.6.6) als auch enzymatisch (2.6.5). Der Gehalt an reduziertem GSH wurde durch Subtraktion des oxidierten Glutathions (GSSG) kalkuliert. Ein Vergleich beider Methoden wurden bereits von Berlich (1998) durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass die enzymatische Bestimmung in der Regel etwas höhere Werte lieferte als die Fluoreszenzbestimmung. Der prozentuale Anstieg zeigte jedoch keine signifikanten Veränderungen.

#### 3.8.3.1 Reduziertes Glutathion (GSH)

Der aquatische Hyphomycet *H. lugdunensis* zeigte unter den hier verwendeten Laborbedingungen einen sehr hohen Grundlevel an Glutathion (GSH) im Gegensatz zu seinen Präkursoren. Er betrug in der Kontrolle je nach Versuchsreihen und Wachstumsphase zwischen 5,3 und 9,7  $\mu\text{mol/g}$  TM (H4-2-4) bzw. 6,6 und 8,7  $\mu\text{mol/g}$  TM (H8-2-1).

Wie bereits seine Vorstufen, Cystein und  $\gamma\text{-EC}$ , konnte auch der Glutathiongehalt in *H. lugdunensis* sowohl durch Cd(II) als auch Zn(II) in Abhängigkeit vom Stamm, der Konzentration und Wachstumsphase induziert werden. Dabei erfolgten die Anstiege weniger drastisch. Die Daten sind in Abb. 23 zusammengefasst. Der GSH-Gehalt für H4-2-4 stieg in der

logarithmischen Phase um 87 % von 9,5 auf 17,8  $\mu\text{mol/g TM}$  bei 25  $\mu\text{M Cd(II)}$ -Zugabe. Bis zu einer Belastung mit 150  $\mu\text{M}$  erhöhte sich dieser Wert weiter auf 22,6  $\mu\text{mol/g TM}$ . In der stationären Phase war über die gesamte Konzentrationsbreite nur ein Anstieg bis 15,2  $\mu\text{mol/g TM}$  zu verzeichnen, wobei mit einem P-Wert  $\leq 0,002$  alle Werte beider Phasen von der Kontrolle signifikant verschieden waren.

H8-2-1 reagierte ähnlich. So stieg in der logarithmischen Phase der GSH-Gehalt von 8,1 auf maximal 25,8  $\mu\text{mol/g TM}$  an (150  $\mu\text{M}$ ). In der stationären Phase war eine Steigerung von 8,7 auf 16,1  $\mu\text{mol/g TM}$  bei dieser Konzentration zu verzeichnen, wobei hier der Anstieg erst ab 50  $\mu\text{M}$  signifikant war.

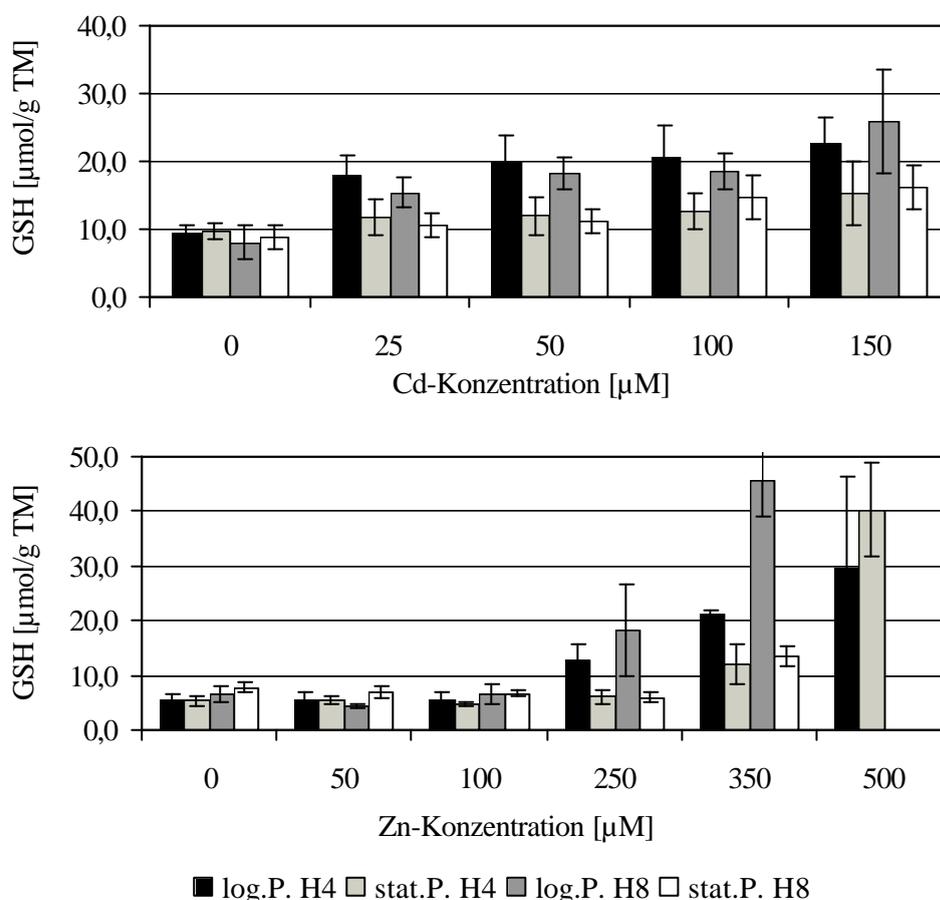


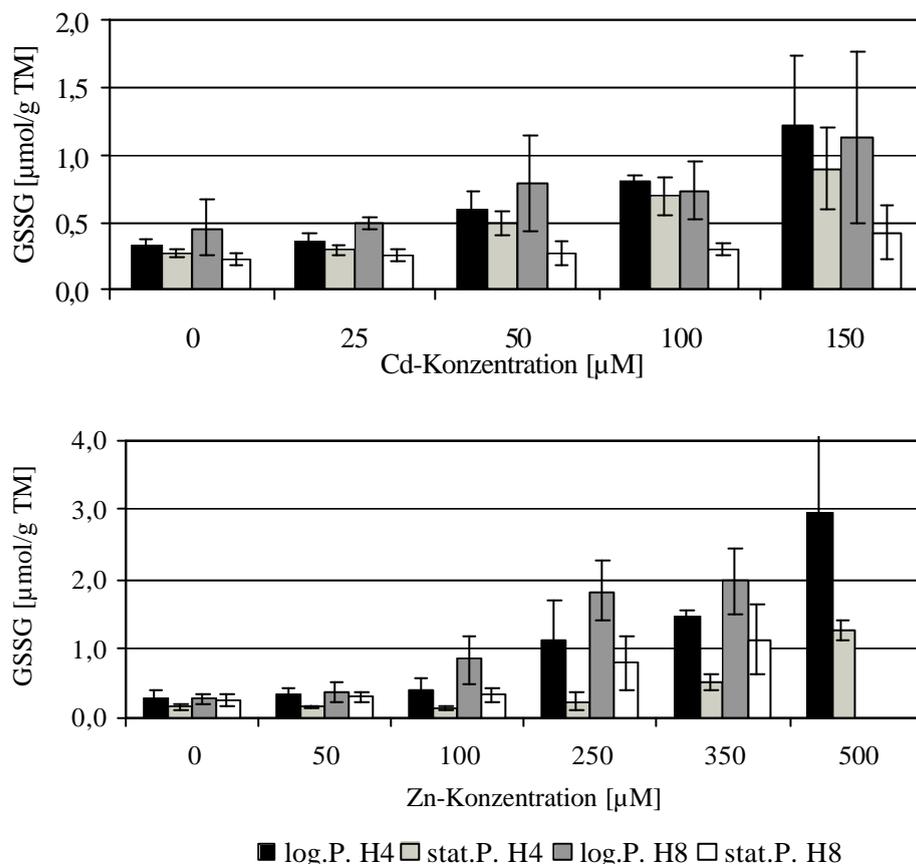
Abb. 23 Glutathion-Gehalte (GSH) von *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)- und Zn(II)-Belastung in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 5)

Unter Zn(II)-Belastung kam es, wie bei Cystein und  $\gamma$ -EC, erst ab einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  zu einer signifikanten Induktion ( $P = 0,01$ ) des GSH-Gehaltes. Dabei stieg der Gehalt für H4-2-4 in der logarithmischen Phase um 140 % von 5,4  $\mu\text{mol/g TM}$  auf 12,9  $\mu\text{mol/g TM}$  und erreichte bei 500  $\mu\text{mol}$  Belastung 29,6  $\mu\text{mol/g TM}$ . In der stationären Phase waren es 6,0 (250  $\mu\text{M}$ ) 12,0 (350  $\mu\text{M}$ ) bzw. 40,3  $\mu\text{mol/g TM}$  (500  $\mu\text{M}$ ).

Der Stamm H8-2-1 zeigte in der logarithmischen Phase einen Anstieg bis zu 592 % ( $P < 0,0001$ ) bei 350  $\mu\text{M}$  Belastung (von 6,6 auf 45,7  $\mu\text{mol/g TM}$ ). In der stationären Phase waren es nur 75 % bei gleicher Konzentration (7,7 auf 13,5  $\mu\text{mol/g TM}$ ).

### 3.8.3.2 Oxidiertes Glutathion (GSSG)

Eine Aussage über den Redoxstatus und somit den Stresszustand einer Zelle lässt sich neben dem reduzierten Glutathion auch über das oxidierte Glutathion (GSSG) und das Verhältnis von GSH/GSSG treffen. In Abb. 24 sind die Anstiege der GSSG-Gehalte unter Cd(II)- und Zn(II)-Belastung graphisch dargestellt.



**Abb. 24** Oxidierte Glutathion-Gehalte (GSSG) von *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)- und Zn(II)-Belastung in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) ( $n = 4$  für Cadmium;  $n = 5$  für Zink)

Es zeigt sich, dass der Gehalt an GSSG ebenfalls wie das GSH einer Hochregulierung sowohl durch Cd(II) als auch durch Zn(II) unterliegt. Dabei kann wiederum eine Wachstumsphasenabhängigkeit beobachtet werden. So stieg der GSSG-Gehalt bei H4-2-4 in der logarithmischen Phase von 0,33 in der Kontrolle auf 1,22  $\mu\text{mol/g TM}$  bei einer Belastung mit 150  $\mu\text{M}$  Cd(II) kontinuierlich an ( $P = 0,0006$ ) wobei die Anstiege ab 100  $\mu\text{M}$  signifikant waren. Dies entspricht einer Erhöhung um 270 %. In der stationären Phase konnte ein Anstieg um 230 % (von 0,27 auf 0,90  $\mu\text{mol/g TM}$ ) verzeichnet werden. Für den Stamm H8-2-1 wurde in der logarithmischen

Phase ein Anstieg von 0,48 auf 1,14  $\mu\text{mol/g TM}$  (148%) analysiert. Hier lag der P-Wert aufgrund der relativ hohen Standardabweichungen bei 0,095.

Auch in der stationären Phase war der Anstieg nach ANOVA nicht signifikant ( $P=0,091$ ), obwohl eine Erhöhung von 0,22 auf 0,43  $\mu\text{mol/g TM}$  ermittelt werden konnte, was einem Anstieg von 93 % entspricht.

Zn(II) als essentielles Element führt in hohen Konzentrationen ebenfalls zu einem Anstieg des intrazellulären GSSG-Gehaltes. Dabei stieg der Gehalt von 0,27  $\mu\text{mol/g TM}$  bei der Kontrolle auf 1,46 (350  $\mu\text{M}$ ) bzw. 2,95  $\mu\text{mol/g TM}$  (500  $\mu\text{M}$ ) in H4-2-4 an. Bereits bei niedrigen Konzentrationen konnte in der logarithmischen Phase ein, wenn auch nicht signifikanter ( $P>0,5$ ) Anstieg, beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde in der stationären Phase kein Anstieg des GSSG-Gehaltes in den unteren Konzentrationen gemessen. Erst bei einer Belastung mit 250  $\mu\text{M}$  war eine Erhöhung um 48 % messbar und erst ab 350  $\mu\text{M}$  Zn(II)-Belastung war dieser Anstieg signifikant. Für die gesamte Messreihe betrug der P-Wert nach ANOVA-Analyse 0,0001.

Für den Stamm H8-2-1 wurde in der logarithmischen Phase ebenfalls bei den niedrigen Konzentrationen eine Induktion beobachtet, die ab 100  $\mu\text{M}$  Zn(II) bereits signifikant war ( $P<0,001$  für die gesamte Messreihe). So stieg die GSSG-Konzentration von 0,28 über 0,84 (100  $\mu\text{M}$ ) auf 1,98  $\mu\text{mol/g TM}$  bei einer 350  $\mu\text{M}$  Belastung. Wie in vorangegangenen Befunden war auch hier die Reaktion in der stationären Phase geringer. So war nur eine Steigerung des GSSG-Gehaltes um 32 % (0,32  $\mu\text{mol/g TM}$ , 100  $\mu\text{M}$ ), 226 % (0,80  $\mu\text{mol/g TM}$ , 250  $\mu\text{M}$ ) bzw. 356 % (1,12  $\mu\text{mol/g TM}$ ) messbar ( $P = 0,0019$ ).

Die Rohdaten sind im Anhang in Tabelle 17 und 18 dargestellt.

### 3.8.3.3 GSH:GSSG-Verhältnis

Neben den einzelnen Glutathionspezies wurde auch das Verhältnis untereinander verglichen. Aufgrund der geringen GSSG-Werte wurden die Mittelwerte aller Messreihen in die Berechnungen einbezogen, da es sonst zu sehr hohen Standardabweichungen gekommen wäre.

Die Ergebnisse sind in Tab. 21 zusammengefasst.

Unter Cd(II)-Einfluss wurde neben dem Anstieg von GSH und GSSG auch ein Anstieg des GSH:GSSG-Verhältnisses bei 25  $\mu\text{M}$  Cd(II) für beide Phasen und Stämme ermittelt. Für die folgenden Konzentrationen war dann jedoch eine fast kontinuierliche Abnahme zu verzeichnen, die für H4-2-4 etwa der Hälfte des Ausgangswertes und für H8-2-1 etwa den Ausgangswert erreichte. Für Zn(II) nahm das Verhältnis mit einigen Ausnahmen fast kontinuierlich in beiden Stämmen und Phasen ab.

Das GSH:GSSG-Verhältnis zwischen der logarithmischen und stationärer Wachstumsphase in der Kontrolle weist deutliche Unterschiede auf. In der stationären Phase wurden höhere Werte ermittelt als in der logarithmischen Phase.

**Tab. 21 GSH/GSSG-Verhältnis der *H. lugdunensis*-Stämme H4-2-4 und H8-2-1 unter Zn(II)- und Cd(II)-Belastung (Ermittelt durch Division der erhaltenen GSH- und GSSG-Mittelwerte)**

	H4-2-4		H8-2-1	
	Log. Phase	Stationäre Phase	Log. Phase	Stationäre Phase
Kontrolle	28,9	36,0	17,6	39,4
25 µM Cd(II)	50,9	40,3	31,2	40,9
50 µM Cd(II)	40,1	20,1	22,9	41,1
100 µM Cd(II)	29,4	15,6	25,1	49,5
150 µM Cd(II)	18,5	16,9	22,7	37,4
Kontrolle	19,7	34,1	24,8	31,5
50 µM Zn(II)	17,1	36,8	11,6	23,8
100 µM Zn(II)	13,3	33,5	7,7	20,8
250 µM Zn(II)	11,4	26,1	9,9	7,4
350 µM Zn(II)	14,6	22,9	23,1	12,1
500 µM Zn(II)	10,1	31,7		

### 3.8.4 Einfluss der Anzuchtstemperatur auf Thiolgehalte unter Cd(II)- Stress

Es wurde untersucht, inwieweit die Thiolgehalte durch verschiedene Temperaturen beeinflusst werden. In Tab. 22 sind diese Werte vergleichend zusammengestellt.

Ein Temperaturanstieg um 4 °C erhöhte den Thiolpool (GSH, GSSG, Cystein,  $\gamma$ -EC) in beiden Stämmen bereits in den Kontrollversuchen. Dabei änderte sich das GSH:GSSG-Verhältnis in H4-2-4 kaum (10 °C: 31; 14 °C: 29). Auch bei moderater Cd(II)-Belastung (25 µM) ist keine Verschiebung im GSH:GSSG-Verhältnis zu beobachten (10 °C: 59,7; 14 °C: 50,9). Erst ab 50 µM kommt es bei niedrigeren Temperaturen zu einem Anstieg, wohingegen bei der höheren Temperatur das Verhältnis wieder geringer wird (10 °C: 63,4; 14 °C: 33,9).

In H8-2-1 ändert sich das GSH:GSSG-Verhältnis stärker (10 °C: 52; 14 °C: 18), wobei diese Diskrepanz bei den weiterhin untersuchten Cd(II)-Konzentrationen erhalten bleibt.

Für die einzelnen Thiolspezies ändert sich die Tendenz des prozentualen Anstieges häufig nicht drastisch bzw. signifikant. So steigt beispielsweise des GSH-Gehalt in H4-2-4 bei 10 °C um 160 % und bei 14 °C um 110 % von der Kontrolle bis zu einer 50 µM Belastung an. Für GSSG sind es in diesem Fall 28 % bzw. 78 %.

Bemerkenswerte Unterschiede zeigt nur Stamm H4-2-4 im Cystein- und  $\gamma$ -EC-Pool. Da beträgt der Anstieg bei 10 °C 540 % (Cystein) bzw. 458 % ( $\gamma$ -EC) und bei 14 °C 142 % (Cystein) bzw. 800 % ( $\gamma$ -EC). Dies lässt jedoch keine Temperaturtendenz erkennen, da die Werte gegenläufig sind.

**Tab. 22 Einfluss der Temperatur (14 °C, 10 °C) auf den Thiolpool (GSH, GSSG, Cystein, g-EC) der *H. lugdunensis*-Stämme H4-2-4 und H8-2-1 in der logarithmischen Wachstumsphase und Cd(II)-Stress (n = 4)**

	GSH [ $\mu\text{mol/g TM}$ ]		GSSG [ $\mu\text{mol/g TM}$ ]	
	10 °C	14 °C	10 °C	14 °C
<b>H4-2-4</b>				
Kontrolle	5,56 $\pm$ 1,64	9,54 $\pm$ 0,92	0,18 $\pm$ 0,06	0,33 $\pm$ 0,04
25 $\mu\text{M}$ Cd(II)	12,53 $\pm$ 1,59	17,83 $\pm$ 2,95	0,21 $\pm$ 0,05	0,35 $\pm$ 0,08
50 $\mu\text{M}$ Cd(II)	14,59 $\pm$ 2,01	20,03 $\pm$ 3,91	0,23 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,13
P (ANOVA)	0,0001	0,0014	0,130	0,005
<b>H8-2-1</b>				
Kontrolle	5,68 $\pm$ 0,58	8,05 $\pm$ 2,48	0,11 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,20
25 $\mu\text{M}$ Cd(II)	8,13 $\pm$ 0,55	15,44 $\pm$ 2,09	0,13 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,04
50 $\mu\text{M}$ Cd(II)	8,88 $\pm$ 1,69	18,22 $\pm$ 2,34	0,15 $\pm$ 0,02	0,79 $\pm$ 0,36
P (ANOVA)	0,0058	0,0004	0,020	0,1525
	Cystein [ $\mu\text{mol/g TM}$ ]		g-EC [ $\mu\text{mol/g TM}$ ]	
	10 °C	14 °C	10 °C	14 °C
<b>H4-2-4</b>				
Kontrolle	0,22 $\pm$ 0,06	0,50 $\pm$ 0,06	0,12 $\pm$ 0,05	0,12 $\pm$ 0,06
25 $\mu\text{M}$ Cd(II)	0,97 $\pm$ 0,30	1,18 $\pm$ 0,26	0,45 $\pm$ 0,15	0,99 $\pm$ 0,34
50 $\mu\text{M}$ Cd(II)	1,41 $\pm$ 0,44	1,21 $\pm$ 0,22	0,67 $\pm$ 0,23	1,08 $\pm$ 0,46
P (ANOVA)	0,0013	0,001	0,003	0,005
<b>H8-2-1</b>				
Kontrolle	0,20 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,23	0,08 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,08
25 $\mu\text{M}$ Cd(II)	0,32 $\pm$ 0,06	0,87 $\pm$ 0,16	0,10 $\pm$ 0,03	0,29 $\pm$ 0,14
50 $\mu\text{M}$ Cd(II)	0,45 $\pm$ 0,05	0,97 $\pm$ 0,26	0,21 $\pm$ 0,06	0,39 $\pm$ 0,15
P (ANOVA)	0,0001	0,0144	0,0023	< 0,0001

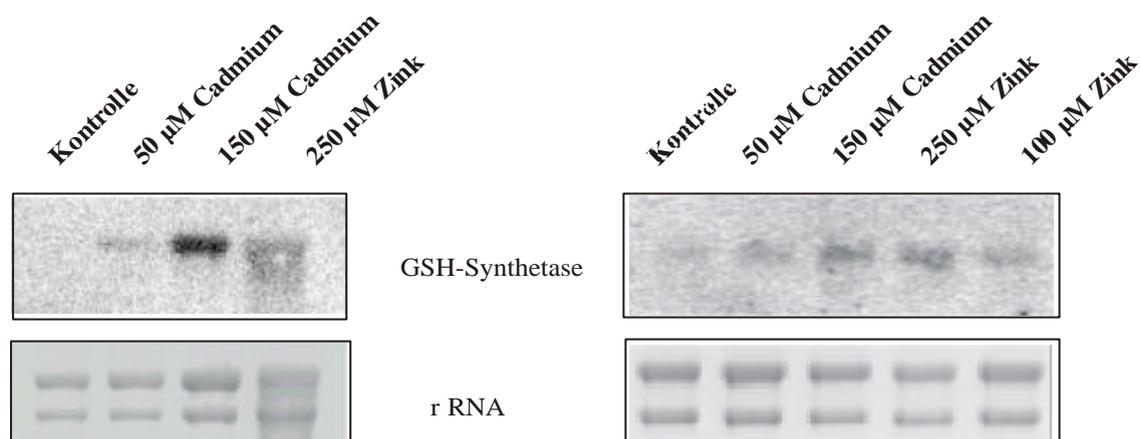
### 3.8.5 Untersuchungen zur Transkriptakkumulation der Glutathion-Synthetase

Neben den Endprodukten des Thiolstoffwechsels sollte die Beeinflussung einiger Enzyme des GSH-Syntheseweges auf RNA-Ebene in ersten Ansätzen untersucht werden. Neben der  $\gamma$ -Glutamylcystein synthetase ( $\gamma$ -ECS EC 6.3.2.2) sollte die Glutathion synthetase näher betrachtet werden. Am Anfang stand die Herstellung einer geeigneten Sonde. Durch die geringen Sequenzhomologien gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht, für die  $\gamma$ -ECS eine Sequenzinformation und somit eine Sonde zu erhalten (siehe Anhang B).

Für die Glutathion synthetase konnte aus *H. lugdunensis* H4-2-4 ein 785 bp-Fragment ermittelt und in die GeneBank-Datenbank (AY 297429) eingestellt werden (siehe Anhang B 3.). Es zeigte in seiner Sequenz translatiert Homologien (52%) zu einem hypothetischen Protein aus *N. crassa* (EAA33767.1). Weiterhin wurden Sequenzhomologien zur Glutathion synthetase im

Afrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* (P35668) (43 %), zur Glutathionsynthetase in *S. pombe* (AAL41009.1| AF448236\_1) (37 %), einigen Proteinen aus *Drosophila melanogaster* und zu weiteren Glutathionsynthetasen mit geringerer Homologie gefunden.

Dieses Fragment wurde als Sonde eingesetzt um zu untersuchen, ob das Enzym auf RNA-Ebene durch unterschiedlichste Schwermetalle und Konzentrationen in beiden Stämmen beeinflusst wird (Abb. 25). Als Bezugspunkt zur Ermittlung der Transkriptakkumulation wurde rRNA als Beladungskontrolle eingesetzt.



**Abb. 25** Northern-Blot Analyse zur Beeinflussung der Glutathionsynthetase in *H. lugdunensis* H4-2-4 (links) und H8-2-1 (rechts) durch unterschiedliche Schwermetallkonzentrationen in der logarithmischen Wachstumsphase

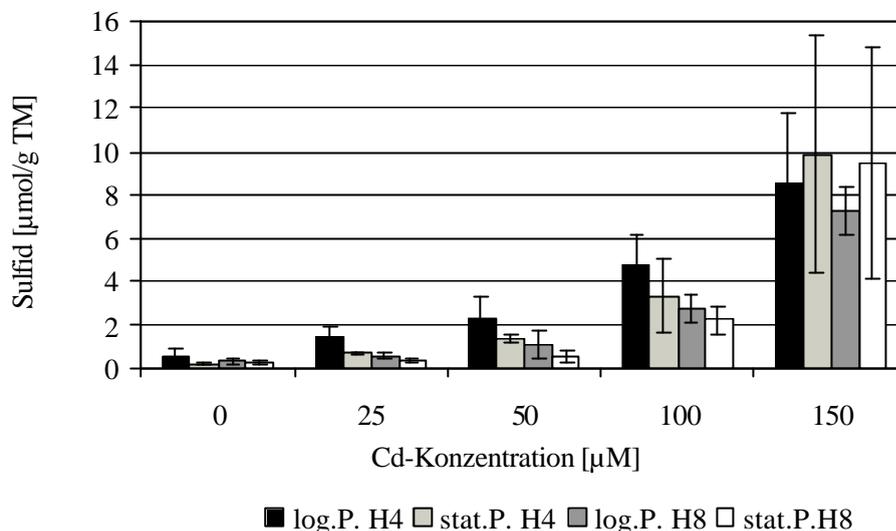
Die GSH-S zeigt sowohl unter Cd(II)- als auch Zn(II)-Belastung eine transiente Transkriptakkumulation in Abhängigkeit von der Konzentration.

Für H4-2-4 ist die Bande bei einer Belastung mit 250 µM Zn(II) nur halb so stark, wie die bei einer Belastung mit 150 µM Cd(II). Bei H8-2-1 sind beide Banden gleich stark. Für H8-2-1 konnte weiterhin gezeigt werden, dass bei einer Belastung mit 100 mM Zn(II) der mRNA-Level im Gegensatz zur Kontrolle leicht erhöht wird, obwohl unter diesen Bedingungen noch keine Glutathionerhöhung messbar war (Abb. 23). In Bezug auf eine Glutathionerhöhung reagierte H8-2-1 unter Zn(II)-Belastung stärker als H4-2-4 (Abb. 23). Für H4-2-4 kann keine Aussage zur Induktion der GSH-S auf RNA-Ebene bei 100 µM Zn(II) getroffen werden, da es trotz mehrmaliger Wiederholung unter diesen Versuchsbedingungen nicht gelang RNA in ausreichender Konzentrationen und Reinheit zu gewinnen.

### 3.8.6 Sulfid-Gehalt unter Schwermetallstress

Es ist bekannt, dass einige Hefen und filamentöse Pilze (z. B. *S. pombe*, *C. glabrata*) unter Schwermetallstress mit einer Erhöhung des intra- und extrazellulären Sulfid-Gehaltes reagieren. Bei Ansäuerung des Rohextraktes (0,1 N HCl) zur Glutathionbestimmung konnte beobachtet werden, dass ein typischer Sulfidgeruch entwich. Daraufhin wurden die Pilze wie unter 2.2 beschrieben angezogen und nach 2.6.11 extrahiert und analysiert. Dabei konnte ein

konzentrationsabhängiger Anstieg des intrazellulären Sulfid-Gehaltes unter Cd(II)-Belastung (Abb. 26), jedoch nicht unter den hier gewählten Zn(II)-Konzentrationen (50-350  $\mu\text{M}$ ) nachgewiesen werden.



**Abb. 26** Intrazellulärer Sulfidgehalt von *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)- Belastung in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 3-6)

Der Anstieg des Sulfids erfolgte für beide Phasen und Stämme fast exponentiell (H4-2-4 log. Phase:  $y = 0,3233e^{0,6631x}$   $R^2 = 0,9935$ ; stationäre Phase:  $y = 0,0916e^{0,921x}$   $R^2 = 0,9926$ ; H8-2-1 log. Phase:  $y = 0,1226e^{0,7866x}$   $R^2 = 0,9848$ ; stationäre Phase:  $y = 0,0642e^{0,9113x}$   $R^2 = 0,9112$ ). Der Grundlevel, der im Bereich der messtechnischen Nachweisgrenze lag, betrug bei H4-2-4 zwischen 0,57  $\mu\text{mol/g TM}$  in der logarithmischen und 0,22 in der stationären Phase (Anhang Tab. 19). Dieser stieg dann bis auf 8,49 bzw. 9,87  $\mu\text{mol/g TM}$  an (150 $\mu\text{M}$ ). Auch für H8-2-1 konnten ähnliche Befunde erhalten werden. So stieg in der logarithmischen Phase der Sulfid-Gehalt von 0,32  $\mu\text{mol/g TM}$  auf 7,27 (150  $\mu\text{M}$ ) und in der stationären Phase von 0,25  $\mu\text{mol/g TM}$  auf 9,46 an.

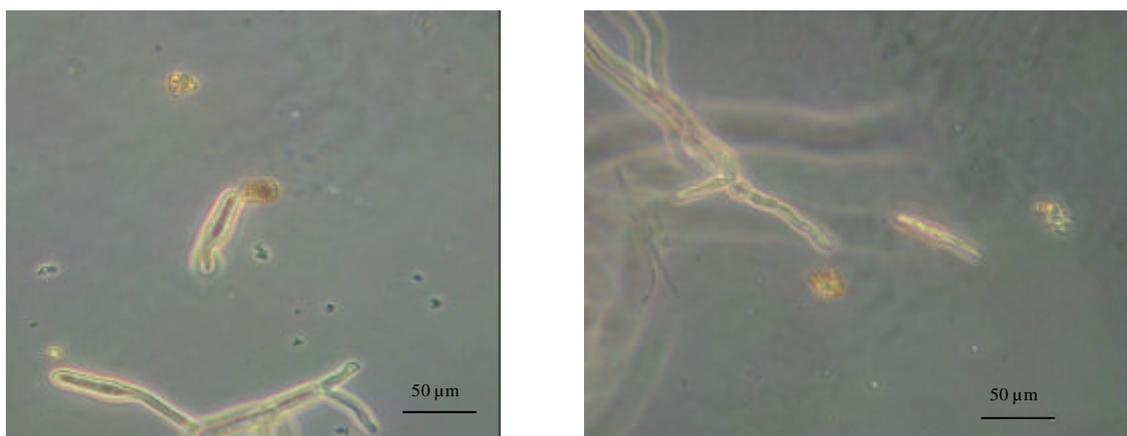
Die P-Werte für die Sulfidgehalte unter den hier gewählten Bedingungen betragen für H4-2-4 in der logarithmische Phase 0,0002, in der stationäre Phase 0,0013 und für H8-2-1 in der logarithmische Phase  $< 0,0001$  und in der stationäre Phase 0,0009.

Auch im Medium konnte ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  für H4-2-4 und ab 100  $\mu\text{M}$  für H8-2-1 in der stationären Phase ein deutlicher Sulfid-Anstieg gegenüber der Kontrolle gemessen werden (nicht dargestellt). Für H4-2-4 wurde in der stationären Phase bei einer Belastung mit 150  $\mu\text{M}$  Cd(II)  $1,49 \pm 0,50$  nmol/mL Sulfid bestimmt im Gegensatz zur Kontrolle mit 0,34 nmol/mL. Für H8-2-1 waren es  $1,00 \pm 0,76$  nmol/mL. In beiden Fällen erfolgte der Anstieg

in Abhängigkeit von der Konzentration polynomisch ( $R^2 \geq 0,98$ ). In der logarithmischen Phase lagen die Sulfid-Gehalte im Medium unter denen in der stationären Phase.

Von Rother (2002) wurde in Standkulturen eines anderen *H. lugdunensis*-Stammes unter Cd(II)-Belastung amorphe kristallähnliche Aggregate gefunden.

In den Schüttelkulturen der Stämme H4-2-4 und H8-2-1 waren unter dem Mikroskop nur sehr vereinzelt sehr kleine Kristallaggregate zu beobachten. Erst wenn die Kultur nach Zugabe von Cd(II) als Standkultur geführt wurde, kam es zur häufigeren Formation größerer Strukturen. Einige mikroskopische Beobachtungen sind in Abb. 27 zusammengefasst.



**Abb. 27** Kristallähnliche amorphe Aggregate im Medium von *H. lugdunensis* H4-2-4 nach 5tägiger Inkubation ohne Schütteln nach 100 µMCd(II)-Zugabe

### 3.8.7 Induktion weiterer Ellman-positiver Verbindungen unter Schwermetallbelastung

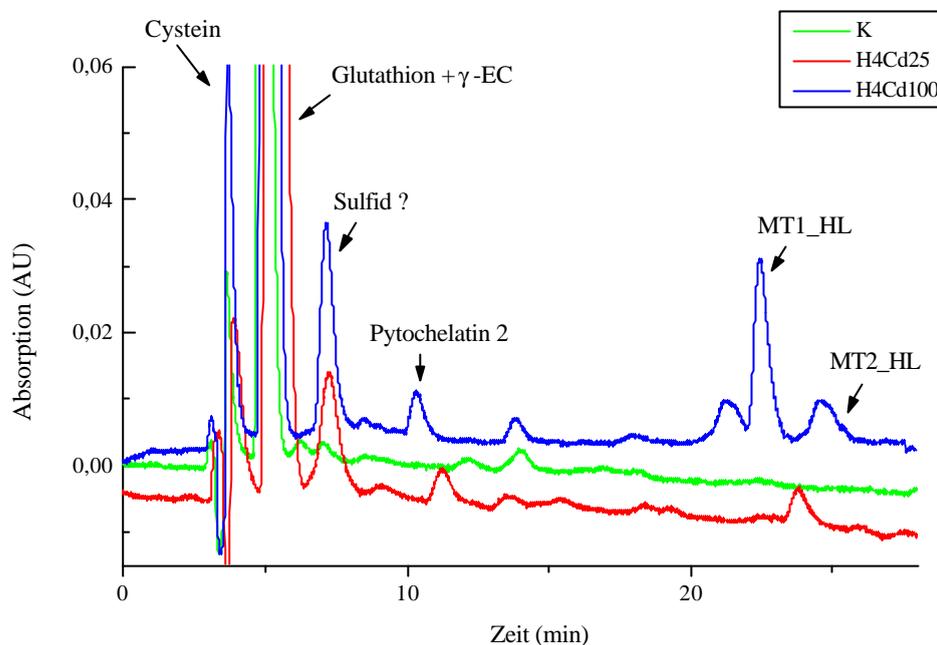
Nach Kultivierung von *H. lugdunensis* in Malz/Pepton-Medium konnten in der Kontrolle und unter Metalleinfluss, besonders Cd(II), Ellman-positive Verbindungen nachgewiesen werden. In Abb. 28 ist dies exemplarisch für Stamm H4-2-4 dargestellt.

Aufgrund früherer Arbeiten und Trennung von Standardsubstanzen kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem ersten Peak um Cystein und bei dem zweiten Peak um  $\gamma$ -EC in Koelution mit Glutathion handelt. Der dritte Peak stellt möglicherweise Sulfid dar. Für *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 konnte das Vorhandensein von Phytochelatrin 2 nachgewiesen und mittels Massenspektrometrie bestätigt werden (Peak 4). Bei den letzten beiden Peaks handelt es sich um Metallothioneine (Jaeckel, 2002).

Zn(II) führte zu keinem charakteristischen Unterschied in den HPLC-Profilen zwischen Kontrollen und belasteten Proben mit Ausnahme der Cystein- und Glutathion-Peak-Intensitäten.

Zur Quantifizierung von Cystein,  $\gamma$ -EC und Glutathion kam die Methode der Ellman-Derivatisierung nicht zum Einsatz. Es wurde die Methode mittels Monobrombiman (2.6.6) genutzt. Der Sulfid-Peak konnte nicht massenspektroskopisch verifiziert werden, so dass eine

Aussage zur Identität nur aufgrund von Retentionszeitvergleich mit Standards gegeben werden kann. Daraufhin erfolgte die Bestimmung des Sulfids mittels Methylenblaumethode (2.6.11).



**Abb. 28** RP-HPLC von Cd(II) exponierten *H. lugdunensis* Extrakten (Stamm H4-2-4) mit Nachsäulen-derivatisierung durch DTNB (Ellman Reagenz) in der logarithmischen Phase (14 °C, 120 U/min, dunkel)

In weiteren Versuchen wurde der Phytochelatin 2-Gehalt quantifiziert (Abb. 29). Bei Belastung der Pilzkulturen mit 25 und 50  $\mu\text{M}$  Cd(II) reagierten diese nur mit einer minimalen PC 2 Synthese. Dabei reagierte Stamm H4-2-4 eher bei geringeren Konzentrationen als H8-2-1. Konzentrationen von 150  $\mu\text{M}$  führten zu einer drastischen, exponentiellen Erhöhung des PC 2-Spiegels in beiden Pilz-Stämmen, wobei H8-2-1 stärker reagiert als H4-2-4. Zwischen der logarithmischen und stationären Wachstumsphase waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen. Für H4-2-4 konnten 1,20 bzw. 1,67  $\mu\text{mol}$  GSH-Äquivalente/g TM und für H8-2-1 3,97 und 3,49  $\mu\text{mol}$  GSH-Äquivalente/g TM gemessen werden. Das entspricht näherungsweise für H4-2-4 4,6 % (logarithmische Phase) bzw. 10,94 % (stationäre Phase) und für H8-2-1 17,6 % bzw. 21,6 % des Gesamtglutathiongehaltes. Die Anstiege der PC 2-Gehalte sind mit  $P < 0,0001$  sehr signifikant.

Höhere Formen von Phytochelatinen konnten unter den hier gewählten Bedingungen nicht detektiert werden.

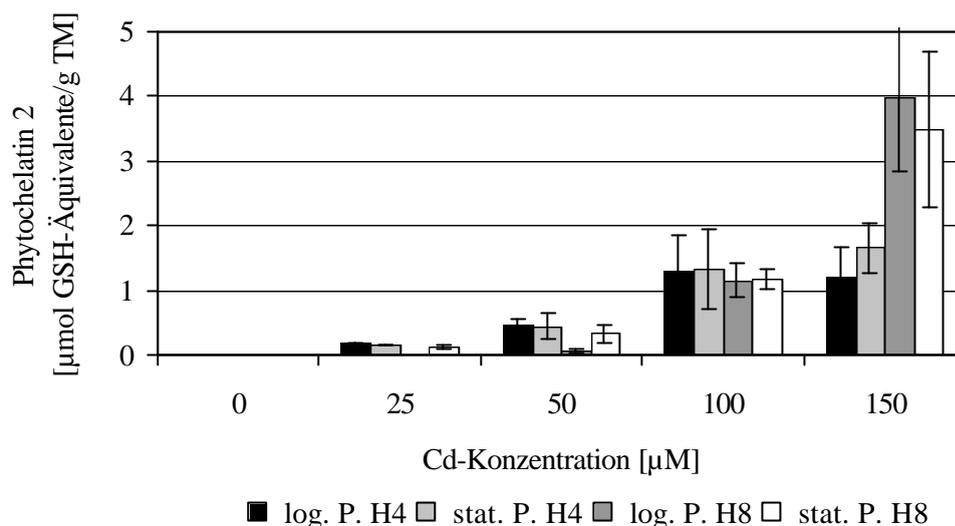


Abb. 29 Phytochelatin 2-Gehalte ( $\mu\text{mol GSH}\text{-}\ddot{\text{A}}\text{quivalente/g TM}$ ) in *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)-Belastung in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase ( $14\text{ }^\circ\text{C}$ , 120 U/min, dunkel) (Kontrolle:  $n = 8$ ; Cadmium:  $n = 4$ )

Weiterhin traten im Retentionszeitbereich von 22 - 25 min weitere Peaks auf, die teilweise bereits von P. Jaeckel (2002) als Metallothioneine identifiziert wurden. MT2\_HL (hier die Bezeichnung für den Peak mit  $t_R$  25 min in Anlehnung an Jaeckel, 2002) trat unter Cd(II)-Belastung nicht kontinuierlich auf (Daten nicht gezeigt). Das Auftreten und Verhalten von MT1\_HL (hier die Bezeichnung für den Peak mit  $t_R$  22 min) unter Cd(II)-Stress konnte hingegen in den beiden Stämmen und Untersuchungsphasen gut beschrieben und massenspektrometrisch bestätigt werden (Abb. 30, Anhang B Abb. 6, Abb. 7).

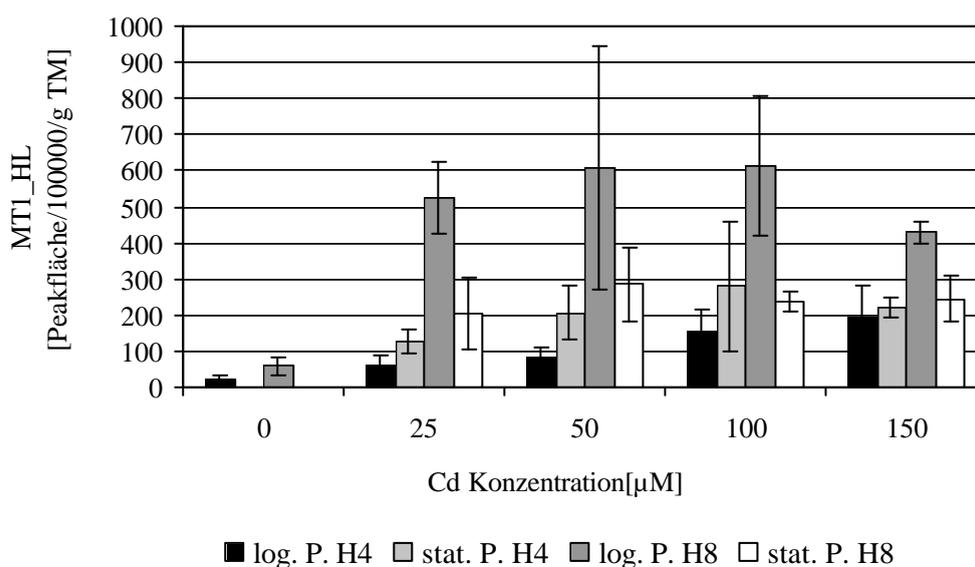


Abb. 30 MT1\_HL-Gehalte in *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)-Belastung in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase ( $14\text{ }^\circ\text{C}$ , 120 U/min, dunkel) ( $n = 4-6$ )

Im Stamm H4-2-4 stieg der Gehalt an MT1\_HL in der logarithmischen Phase kontinuierlich bis zur höchsten Konzentration (150  $\mu\text{M}$ ) auf 784 % an. H8-2-1 hingegen zeigte ein Maximum zwischen 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  (1047 %), welches in seiner Quantität deutlich über den Gehalten von H4-2-4 lag. Der Gehalt betrug exemplarisch bei 50  $\mu\text{M}$  für H4-2-4 nur 14 % dessen was in H8-2-1 gemessen werden konnte. Weiterhin zeigte Stamm H4-2-4 in der stationären Phase eine höhere MT1\_HL-Synthese im Gegensatz zu Stamm H8-2-1 der in der logarithmischen Phase eine stärkere Synthese aufwies.

Beide Stämme zeigen ein unterschiedliches Verhalten in ihrer Kinetik in Abhängigkeit von der Wachstumsphase und der Cd(II)-Konzentration.

Weiterhin ist anzumerken, dass bei beiden Stämmen bereits in der Kontrolle der logarithmischen Phase Spuren von MT1\_HL bestimmt werden konnten, in der stationären Phase hingegen nicht.

### 3.9 Untersuchung zur Cadmiumbindung mittels Gelpermeationschromatographie

Es stellte sich die Frage welche Verbindungen in der Komplexbildung des Cd(II) in *H. lugdunensis* die wichtigste Rolle übernehmen. Dazu wurden die Pilze wie unter 2.2 beschrieben angezogen und die Proben nach 2.6.8 aufgearbeitet und analysiert. Es wurde exemplarisch eine Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  Cd(II) gewählt und in der logarithmischen Phase geerntet. Abb. 31 zeigt ein HPLC-Profil mit Cd(II)-Gehalten in den einzelnen Fraktionen. H8-2-1 zeigte unter den hier gewählten Bedingungen das gleiche Profil.

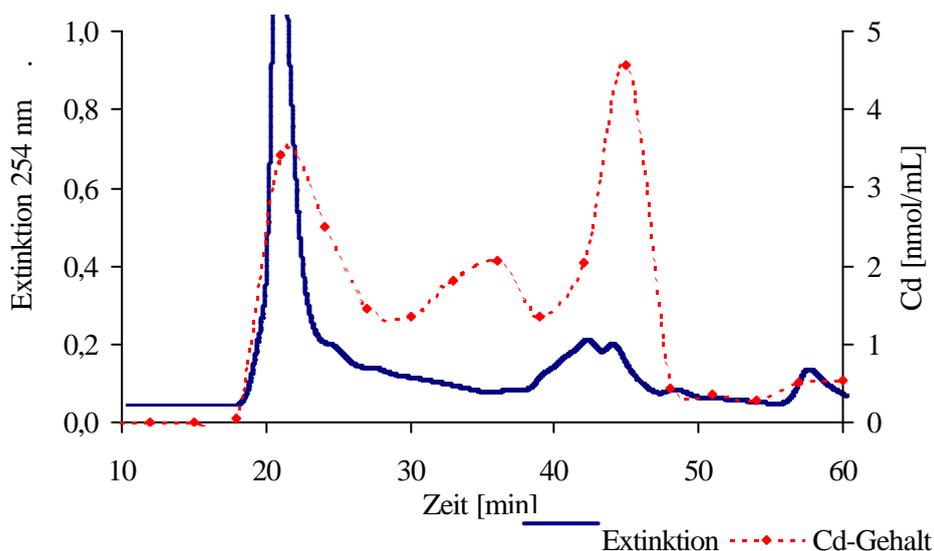
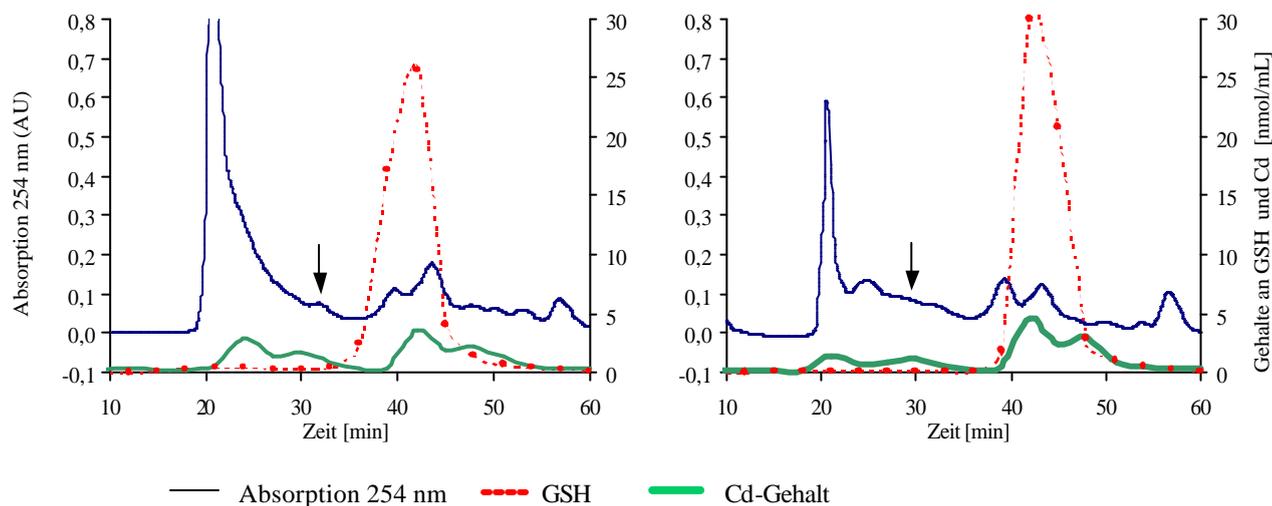


Abb. 31 Gelpermeationschromatographie (Superdex 75) eines Extraktes von *H. lugdunensis* H4-2-4 in der logarithmischen Phase unter 150  $\mu\text{M}$  Cd(II) und Cd(II) Verteilung in den einzelnen Fraktionen

In der Cd(II)-Verteilung konnten 3 Maxima bestimmt werden. Das erste Maximum wurde im Ausschlussvolumen der Säule (>70 kDa) detektiert (HMW-high molecular weight). Ein weiteres Cd(II)-Maximum lag im Bereich von 35 min (MMW-middle molecular weight). Für die MMW-Fraktion wurde jedoch kein Signal bei einer Wellenlänge von 254 nm, dem Absorptionsmaximum der Cd-S-Bindung detektiert. Die höchste Cd(II)-Konzentration konnte in den Fraktionen zwischen 42 und 45 min (LMW-low molecular weight) bestimmt werden. In diesem Bereich trat auch ein großer (gesplitteter) Peak bei 254 nm auf, der auf eine Cd-S-Bindung hin deutete.

Daraufhin wurden die Extrakte an einer Gelpermeationssäule (Ausschlussvolumen 6 kDa) untersucht (Abb. 32). Neben dem Glutathion wurde auch Sulfid bestimmt, da dieses an der Schwermetallkomplexbildung, vor allem mit Cd(II), beteiligt sein kann. Sulfide konnte bei den Trennungen mit beiden Gelpermeationssäulen (Superdex 75 und Superdex peptide) nur im Ausschlussvolumen nachgewiesen werden (Daten nicht in der Darstellung mit aufgenommen).



**Abb. 32** Profil der Gelpermeation an einer Superdex peptide Säule eines Extraktes von *H. lugdunensis* H4-2-4 (links) und H8-2-1 (rechts) in der logarithmischen Phase unter 150  $\mu$ M Cd(II) und Verteilung von Cd(II) und GSH in den einzelnen Fraktionen. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter 2.6.8. beschrieben

Beide Pilzstämme zeigten ein sehr ähnliches Profil in ihrem Absorptionsverhalten bei 254 nm, ihrer Cd(II)- und GSH-Verteilung. In den Fraktionen zwischen 38 und 42 min ist Glutathion mit einer Konzentration bis zu 30 nmol/mL und Cd(II) bis zu einer Konzentration von 5 nmol/mL am stärksten verteilt. Daraus lässt sich näherungsweise ein Verhältnis von GSH:Cd(II) von 6:1 ermitteln. Dabei ist anzumerken, dass in dieser Wachstumsphase das Verhältnis von Gesamt-Cd(II) und Glutathion in der Zelle näherungsweise 1:1 beträgt (3.7.2 und 3.8.3). Die Cd(II)-Bestimmung zeigte weitere, kleinere Maxima bei 30 min und 48 min. Im ersten Fall kann komplementär auch ein kleiner Peak bei 254 nm beobachtet werden (Pfeil), der auf die Bindung

des Cd(II) an SH-Gruppen anderer Verbindungen (möglicherweise Metallothioneine) schließen lässt.

### **3.10 Einfluss von $\text{SO}_4^{2-}$ und $\text{Mg}^{2+}$ auf die Schwermetalltoleranz von *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4**

Es ist bekannt, dass verschiedene Ionen die Bioverfügbarkeit von Metallionen und das Toleranzverhalten von Organismen verändern. Aus diesem Grund wurde der Einfluss des bivalenten Magnesium (Magnesiumacetat) und des Sulfats (Natriumsulfat), welches in hohen Konzentrationen am Standort H4 vorkommt, auf den Stamm H4-2-4 unter Cd(II)- und Zn(II)-Stress untersucht.

#### **3.10.1 Beeinflussung der Biomasse**

Am Beginn der Untersuchungen wurde der Einfluss von  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{SO}_4^{2-}$  auf die Schwermetalltoleranz von *H. lugdunensis* H4-2-4 gegenüber 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) und 250  $\mu\text{M}$  Zn(II) in der logarithmischen Wachstumsphase bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass sich die zugesetzten Ionen mit zunehmender Konzentration im Medium positiv auf die Toleranz von H4-2-4 auswirkten (Abb. 33).

Sulfat steigert die Biomasseproduktion in geringem Maße (12 %) in den Kontrollen und bewirkt in den belasteten Proben ebenso eine Erhöhung. So konnte trotz Zn(II)-Belastung durch 20 mM Sulfatgabe Biomasse wie in der Kontrolle erreicht werden. Bei Cd(II)-Belastung kann die Biomasseproduktion von 0,69 mg/mL auf 1,30 mg/mL gesteigert werden (56 % der Kontrolle).

Weiterhin ist zu beobachten, dass der Biomasseanstieg mit zunehmender Sulfatkonzentration unter Zn(II)-Belastung bereits bei niedrigeren Werten stärker ausgeprägt ist als bei Cd(II)-Belastung.

Der Zusatz von  $\text{Mg}^{2+}$  führt zu keiner signifikanten Veränderung in der Biomasseproduktion in den Kontrollen, jedoch wie  $\text{SO}_4^{2-}$  zu einer Verringerung des Biomasseverlustes unter Schwermetallbelastung. So führten 20 mM MgAc zu einer Trockenmassesteigerung von 0,69 mg/mL auf 1,24 mg/mL unter 100  $\mu\text{M}$  Cd(II)-Belastung und von 0,52 mg/mL auf 1,29 mg/mL unter 250  $\mu\text{M}$  Zn(II)-Belastung. Dies entspricht 58 % bzw. 60 % der Kontrolle. Für die Zn(II)-Belastung scheint damit ein Plateau erreicht zu sein.

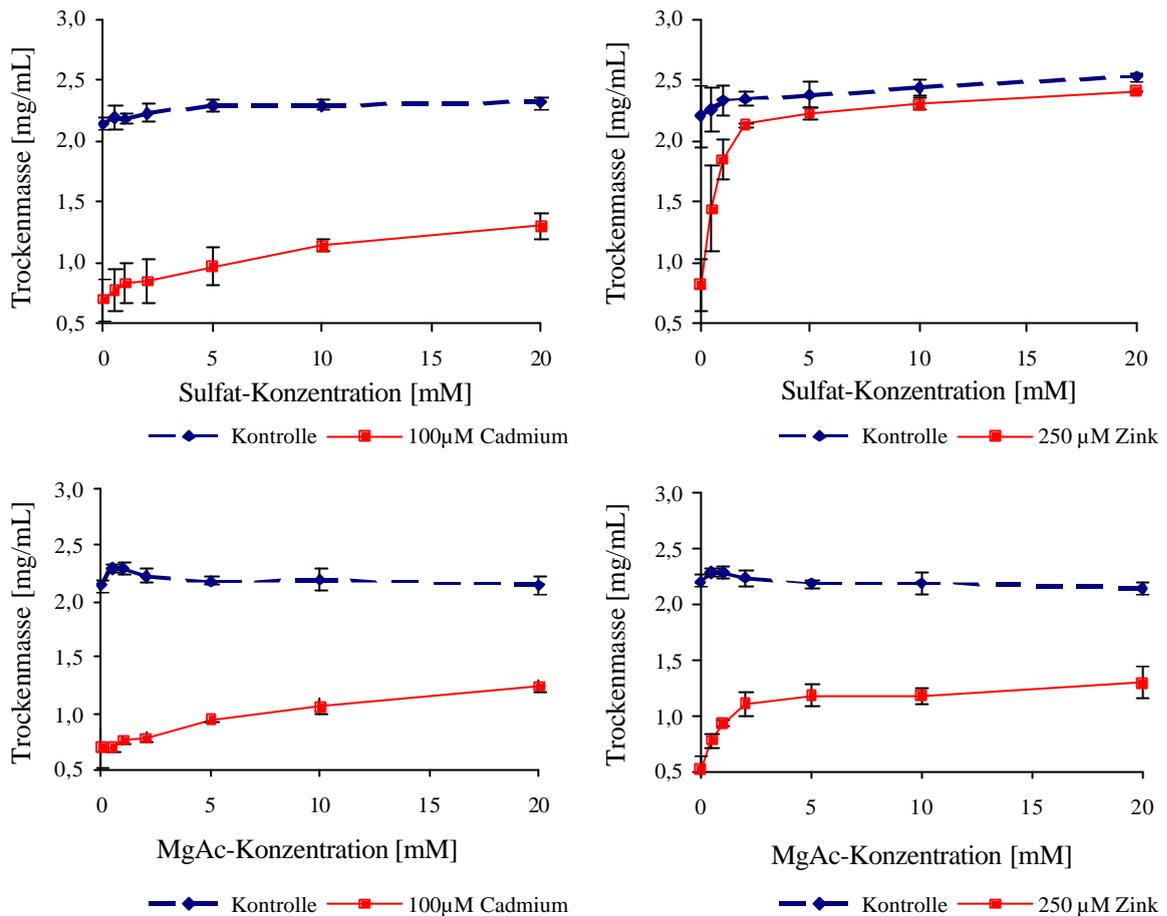


Abb. 33 Beeinflussung der Biomasseproduktion (Trockenmasse) unter 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) und 250  $\mu\text{M}$  Zn(II) in *H. lugdunensis* H4-2-4 durch zunehmende Sulfat- ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) und Magnesium- [ $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ] Konzentrationen in der logarithmischen Wachstumsphase ( $n = 3-5$ )

### 3.10.2 Thiolgehalte unter $\text{SO}_4^{2-}$ -Zusatz

Die Anregung des Thiolmetabolismus durch zusätzliche Sulfatgabe als Ursache für die Steigerung der Toleranz schien möglich und sollte geklärt werden. Hierfür wurde zunächst der intrazelluläre Sulfatgehalt ohne und mit 20 mM Sulfatgabe bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 23 zusammengefasst. Es wurden nur 20 mM gewählt, da hier die größte Toleranz (Biomasseproduktion) erreicht wurde und diese Konzentration den natürlichen Standortbedingungen am nächsten (ca. 70 mM im Standort H4) lag.

**Tab. 23 Intrazellulärer Sulfatgehalt in *H. lugdunensis* H4-2-4 mit und ohne 20 mM Sulfatzugabe in der logarithmischen Wachstumsphase unter Zn(II)- und Cd(II)-Stress (n = 3)**

	Sulfatgehalt [ $\mu\text{mol/g TM}$ ]	
	Kontrolle	20 mM $\text{SO}_4^{2-}$ -Zusatz
Kontrolle	$5,76 \pm 1,86$	$47,54 \pm 8,91$
100 $\mu\text{M Cd(II)}$	$2,55 \pm 0,26$	$43,06 \pm 4,63$
250 $\mu\text{M Zn(II)}$	$3,03 \pm 1,40$	$47,33 \pm 10,92$

Es wird deutlich, dass unter zusätzlicher Gabe von Sulfat der intrazellulären Sulfatgehalt drastisch steigt. In Proben ohne Sulfat kam es, wie bereit unter 3.8.1 beschrieben, zu einer Abnahme des Sulfats, die im Medium angebotenen  $0,20 \mu\text{mol/mL}$  reichten nicht aus, um den Sulfatpool aufrecht zu erhalten. Eine Steigerung der Sulfatkonzentration im Medium um ca. das 100fache verursacht eine Steigerung der Sulfatkonzentration in der Zelle um das 8fache in der Kontrolle. Unter 100  $\mu\text{M Cd(II)}$  kam es zu einer nicht signifikanten Abnahme des intrazellulären Sulfatpools um 10 %, die auf einen erhöhten Sulfatumsatz schließen ließ. Unter Zn(II) und Sulfatgabe gab es keine Veränderungen zur Sulfatkontrolle. Dabei wird deutlich, dass die Verringerung des Sulfatpools, wie sie in Proben ohne Sulfatgabe gefunden wird, auf einen Verbrauch hindeutet.

Da der Sulfatpool gesteigert wurde war anzunehmen, dass auch der intrazelluläre Thiolpool einer Hochregulierung unterlag. Deshalb wurde zuerst der Gesamtthiolgehalt und anschließend der Glutathiongehalt betrachtet. Die Ergebnisse sind in Tab. 24 zusammengefasst.

**Tab. 24 Gesamtthiol- und Glutathiongehalt in *H. lugdunensis* H4-2-4 mit und ohne 20 mM Sulfatzugabe in der logarithmischen Wachstumsphase unter Zn(II)- und Cd(II)-Stress (n=3)**

	Kontrolle	20 mM $\text{SO}_4^{2-}$ -Zusatz
	Thiolgehalt [ $\mu\text{mol GSH-Äquivalent/g TM}$ ]	
Kontrolle	$21,52 \pm 1,56$	$29,49 \pm 3,23$
100 $\mu\text{M Cd(II)}$	$43,84 \pm 12,91$	$31,27 \pm 3,00$
250 $\mu\text{M Zn(II)}$	$51,22 \pm 0,88$	$25,57 \pm 4,17$
	Glutathion [ $\mu\text{mol/g TM}$ ]	
Kontrolle	$12,19 \pm 2,79$	$14,74 \pm 1,62$
100 $\mu\text{M Cd(II)}$	$21,92 \pm 6,45$	$16,64 \pm 1,50$
250 $\mu\text{M Zn(II)}$	$25,62 \pm 0,45$	$12,77 \pm 2,09$

Der Thiolpool wird durch Sulfatgabe gesteigert, bleibt aber unter Stresssituationen unter dem Gehalt der Probe ohne Zusatz. In der unbelasteten Probe von *H. lugdunensis* steigt der Gesamtthiolgehalt um 37 % signifikant an (t-Test:  $P = 0,0183$ ). Für Glutathion hingegen ist nur eine nichtsignifikante Steigerung ( $P = 0,24$ ) um 21 % zu verzeichnen. Wird H4-2-4 im Normalmedium mit 100  $\mu\text{M Cd(II)}$  und 250  $\mu\text{M Zn(II)}$  gestresst, kommt es zu einer Steigerung der

Thiol- und Glutathiongehalte um das doppelte bis 2,5fache. Dieser Anstieg ist für Proben im sulfatreichen Medium jedoch nicht zu beobachten. Die Cd(II)-Belastung führt sowohl beim Thiol- als auch beim Glutathiongehalt zu einer sehr geringen nicht signifikanten Steigerung. Unter Zn(II)-Belastung kommt es sogar zu einer Verringerung (nicht signifikant) um 14 % bzw. 13 %.

### 3.10.3 Biosorption und Akkumulation in *H. lugdunensis* H4-2-4 unter dem Einfluss von $\text{SO}_4^{2-}$ und $\text{Mg}^{2+}$

Nach den Befunden aus Kapitel 3.10.2 kann die Induktion von thiolhaltigen Verbindungen nicht die Ursache für die Toleranz unter  $\text{SO}_4^{2-}$ -Zusatz sein. Auch für die Befunde unter  $\text{Mg}^{2+}$ -Zugabe muss nach weiteren Ursachen gesucht werden. Möglich wäre eine Beeinflussung der Metallaufnahme. Aufgrund dessen wurde untersucht, wie sich sowohl  $\text{SO}_4^{2-}$  als auch  $\text{Mg}^{2+}$  auf die Biosorption und Akkumulation in *H. lugdunensis* H4-2-4 in der logarithmischen Wachstumsphase auswirken. Aus der Literatur ist bereits der unterschiedliche Einfluss von Fremdionen auf die Biosorption und Akkumulation von verschiedenen Organismen bekannt.

Abb. 34 zeigt, dass sowohl Sulfat als auch  $\text{Mg}^{2+}$  die Biosorption und Akkumulation von Cd(II) drastisch verringern ( $P < 0,0001$  für  $\text{SO}_4^{2-}$ ;  $P < 0,0001$   $\text{MgAc}$ )

20 mM Sulfat im Kulturmedium verringerten die Biosorption von Cd(II) von 27,3  $\mu\text{mol/g TM}$  auf nur 3,7  $\mu\text{mol/g TM}$ , was noch 14 % der Probe ohne Sulfatzugabe entspricht. Magnesium in der gleichen Konzentration verringerte von 27,3  $\mu\text{mol/g TM}$  auf 10,7  $\mu\text{mol/g TM}$  (39 %).

Die Akkumulation von Cd(II) wurde durch 20 mM Sulfat auf 10 % herabgesetzt. Gleichzeitig setzt 20 mM  $\text{Mg}^{2+}$  die Akkumulation von Cd(II) auf 48 % herab.

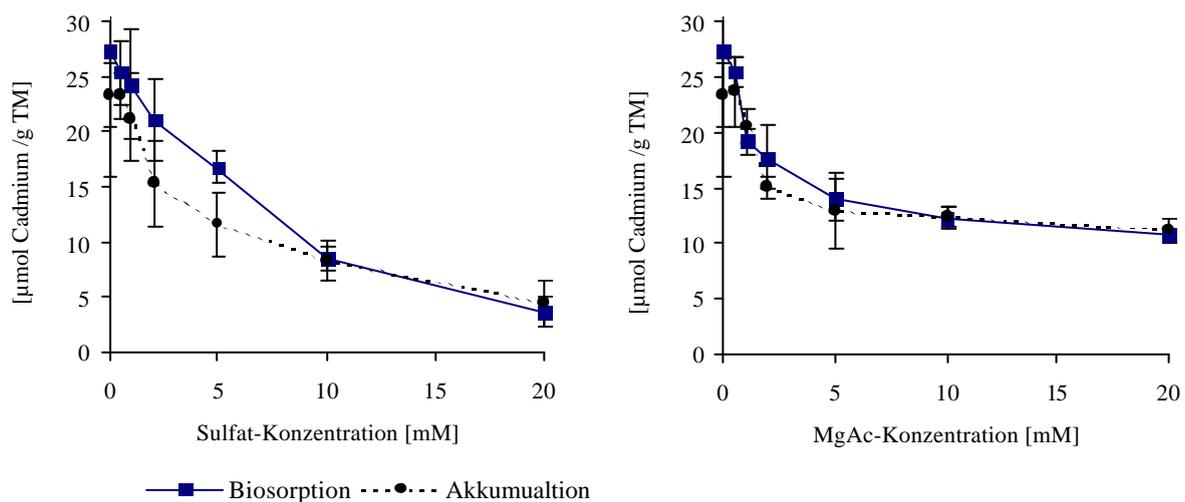
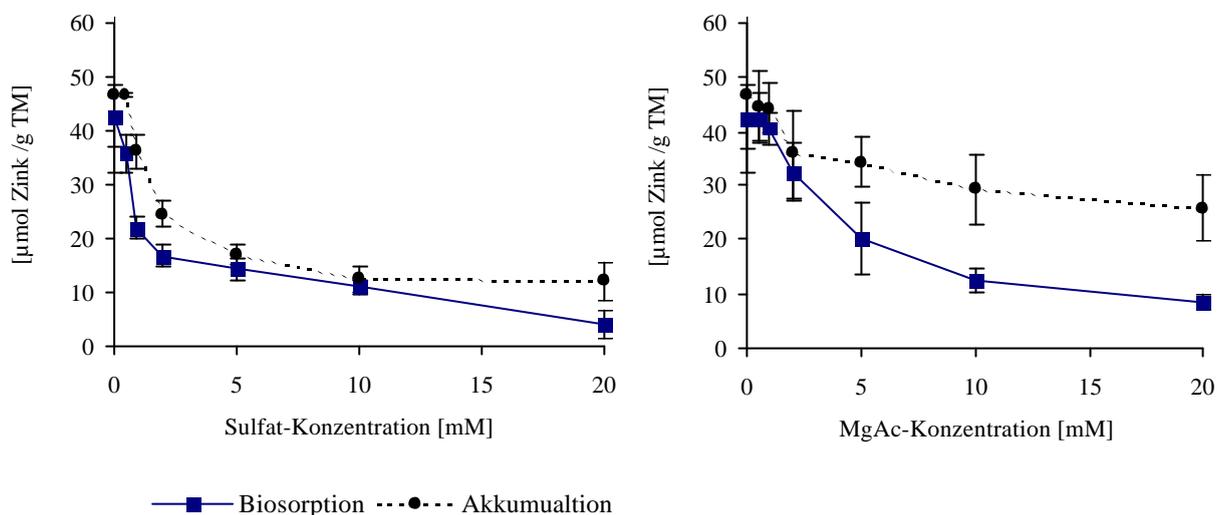


Abb. 34 Beeinflussung der Biosorption und Akkumulation von 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) in *H. lugdunensis* H4-2-4 in der logarithmischen Wachstumsphase in Abhängigkeit von der Sulfat- ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) und  $\text{Mg}^{2+}$  [ $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ] - Konzentration ( $\text{SO}_4^{2-}$ :  $n = 3$ ;  $\text{Mg}^{2+}$ :  $n = 4-5$ )

Auch für Zn(II) sind diese Tendenzen zu beobachten. Hier verringern 20 mM Sulfat die Biosorption auf 9 %, Magnesium hingegen nur auf 19 %.

Die Akkumulation von Zn(II) wurde durch 20 mM Sulfat auf 26 % herabgesetzt, wohingegen 20 mM Magnesium die Akkumulation von Zn(II) nur auf 54 % verringerte (Abb. 35) ( $P < 0,0001$  für  $\text{SO}_4^{2-}$   $P = 0,0345$  für MgAc).



**Abb. 35** Beeinflussung der Biosorption und Akkumulation von 250 µM Zn(II) durch *H. lugdunensis* H4-2-4 in der logarithmischen Wachstumsphase in Abhängigkeit von der Sulfat- ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) und  $\text{Mg}^{2+}$  [ $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ] - Konzentration ( $\text{SO}_4^{2-}$ :  $n = 3$ ;  $\text{Mg}^{2+}$ :  $n = 4-5$ )

Sowohl die Biosorption als auch die Akkumulation von Cd(II) und Zn(II) werden durch Fremdionen, hier  $\text{SO}_4^{2-}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  signifikant herabgesetzt, wobei der Einfluss von Sulfat im Vergleich zu Magnesium stärker ist.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Akkumulation nichtessentieller Schwermetalle [hier Cd(II)] stärker beeinträchtigt wird als die von essentiellen Schwermetallen [hier Zn(II)]. Möglicherweise stellt dies einen Schutzmechanismus dar. Die Biosorption nichtessentieller Schwermetalle wird hingegen durch 20 mM Sulfat und  $\text{Mg}^{2+}$  weniger beeinflusst.

Die Abnahme der Biosorption und Akkumulation war für die 4 Kombinationen konzentrationsabhängig, jedoch weder linear, exponentiell noch polynomisch. Die Rohdaten sind im Anhang A in Tab. 27 zusammengefasst.

## 4 Diskussion

### 4.1 Phylogenetische Untersuchungen

Die phylogenetische Charakterisierung aquatischer Hyphomyceten (AQH) anhand klassischer Identifizierungsmethoden, z.B. Sporenform, Morphologie, biochemische Eigenschaften ist, vor allem unter extremen Bedingungen, z.B. Schwermetallkontamination nicht immer eindeutig (Sridhar, persönl. Mitteilung). Die Sequenzierung von 18S rDNA und 25S rDNA ist ein gutes Hilfsmittel um taxonomische Fragen zu klären, wenn die klassischen Methoden nicht weiterhelfen (Valente et al., 1999). Auch lassen sich mit diesen Methoden bereits Stammunterschiede finden. O'Donnell (1993) konnte an 25S rDNA Sequenzen zeigen, dass zwei *Heliscus lugdunensis* Stämme, die im Rahmen einer Verwandtschaftsanalyse von Fusarienarten mit untersucht wurden, unterschiedlichen Untergruppen zugeordnet werden konnten.

Erste Ergebnisse zur Einteilung von AQH aufgrund kompletter 18S rDNA-Sequenzen wurden von Nikolcheva und Bärlocher (2002) an verschiedenen *Tetracladium*-Stämmen gewonnen.

Um die phylogenetische Position von *H. lugdunensis* H4-2-4, H8-2-1 und H6-06-10 im Pilzreich anhand der 18S rDNA zu verifizieren, legten wir unseren Analysen die Arbeiten von Prillinger et al. (2002) an Asco- und Basidiomyceten und Nikolcheva und Bärlocher (2002) an *Tetracladium* zu Grunde. Die Ergebnisse zeigen, obwohl in Anzahl der Taxa und Länge der 18S rDNA Sequenzen verschieden, Gemeinsamkeiten zu denen von Prillinger et al. (2002). *N. crassa* und *Chaetomium globosum* (Sordariales) clustern mit einem hohen bootstrap (100) und auch *Fusarium oxysporum* und *Giberella pulicaris* bilden eine Gruppe (bootstrap 95).

Von der Parsimony-Analyse zur Kalkulierung des Stammbaumes wird ersichtlich, dass die drei *H. lugdunensis* Stämme H4-2-4, H8-2-1 und H6-06-10 zusammen mit den anderen *Nectria lugdunensis* Stämmen eine Gruppe bilden, die zu einer großen Gruppe gehören, die neben *Illosporium carneum*, *Fusarium* und *Verticillium* Arten auch *Acremonium alternatum* und *Myrothecium roridum* enthalten und zur Ordnung der *Hypocreales* gehören. Dies bestätigt die Zugehörigkeit der 3 Stämme in die Einteilung von Webster (1992) und Marvanova, (persönl. Mitteilung) zur Unterabteilung der *Pezizomycotina*, zur Klasse *Sordariomycetes*, zur Unterklasse *Hypocreomycetidae*, zur Ordnung der *Hypocreales* und der Familie *Nectriaceae*.

Innerhalb der „*Nectria*-Gruppe“ ergab die Stammbaumanalyse eine Gruppierung zwischen H8-2-1 und H6-06-10, beides Stämme aus moderat belasteten Standorten. Dies ist mit 55 % nicht signifikant, zeigt aber eine Tendenz, die vermuten lässt, dass zwischen H4-2-4 und H8-2-1, die im Weiteren biochemisch untersuchten Stämme, eine Aufspaltung in 2 Ökotypen vorliegen könnte.

Die Sequenzbereiche der 18S rDNA zeigen häufig jedoch eine zu hohe Konservierung, eine zu geringe Auflösung, um Unterschiede in der Stamm- und Spezieseinteilung erlauben zu können. Um solche Unterschiede aufzuklären, erfordert es die Analyse von mehr variablen Regionen im

pilzlichen Genom (Nikolcheva und Bärlocher, 2002). ITS-Regionen (Internal transcribed spacer) zwischen den codierenden Regionen der ribosomalen Untereinheiten oder mitochondriale DNA sind mehr informativ. Die Untersuchung von ITS-Regionen würde möglicherweise eine klarere Aussage über das Verwandtschaftsverhältnis der *H. lugdunensis* Stämme geben.

## 4.2 Wachstums- und Vitalitätsuntersuchungen

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war es, zwei *H. lugdunensis* Stämme aus unterschiedlich belasteten Standorten miteinander hinsichtlich ihrer Physiologie gegenüber Schwermetallbelastung und in Bezug auf die Anzuchtstemperatur zu vergleichen.

Das Wachstum beider Stämme H4-2-4 und H8-2-1 zeigte in unbelasteten Malz/Pepton-Medium signifikante Unterschiede (Abb. 13, S. 38). Der Stamm H8-2-1 wuchs langsamer als der Stamm H4-2-4 aus dem belasteten Standort. Eine Verringerung der Temperatur führte in beiden Stämmen unter unbelasteten Bedingungen zu einer Verringerung der Wachstumsrate. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei Pflanzen gemacht. Für *Elodea canadensis* L.C. und *Ranunculus aquatilis* (L.) konnte z.B. gezeigt werden, dass eine Temperaturerhöhung von 5 °C auf 15 °C die Wachstumsrate um das 2,3- bzw. 3,5fache steigerte (Madsen und Brix, 1997). Dies wurde unter anderem mit einer gesteigerten Photosynthese-Leistung erklärt. Für Pilze ist wahrscheinlich die allgemeine Steigerung der Stoffwechselaktivität entscheidend. Für andere aquatische Hyphomyceten konnte der Einfluss der Temperatur auf die Conidienproduktion gezeigt werden (Chauvet und Suberkropp, 1998). Es wurde vermutet, dass die Conidienproduktion zu dem Zeitpunkt einsetzt, wenn die Temperatur für das Wachstum des jeweiligen Organismus' nicht mehr optimal ist.

Die Beobachtung, dass beide *H. lugdunensis*-Stämme unter unbelasteten Bedingungen Unterschiede zeigten und die 18S rDNA-Analyse Differenzen aufwies, ließ vermuten, dass die Stämme auch Unterschiede in ihrer Stressantwort aufweisen.

Cd(II) als Spurenelement ist toxisch für alle Organismen. Zn(II) hingegen ist essentiell aber in hohen Konzentrationen ebenfalls toxisch. Beide Metalle, obwohl nicht redoxaktiv, können den Redoxstatus einer Zelle durch die Induktion der Bildung freier Radikale oder reaktiver Sauerstoffspezies und der Beeinflussung des Pools an Antioxidantien (GSH) in Pilzen beeinflussen (Avery, 2001). Obwohl Pilze eine Reihe von antioxidativen Molekülen und Enzymen, die vor oxidativem Stress schützen, besitzen, führen hohe Schwermetallkonzentrationen zu einer Inhibierung des pilzlichen Wachstums und zu Zellschädigungen. Dies war auch bei *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 und H8-2-1 zu beobachten (Abb. 14. S. 39).

Bereits in früheren Laborexperimenten an verschiedenen *H. lugdunensis*-Stämmen unter Schwermetallstress konnte dies bestätigt werden (Abel und Bärlocher, 1984; Braha et al., 2004; Jaeckel, 2002; Krauss et al., 1998; Miersch et al., 1997). In allen Arbeiten wurde gezeigt, dass Cd(II) gegenüber Zn(II) zu einem höheren Verlust der Biomasse bzw. des Wachstums führte, auch wenn unterschiedliche Anzuchtbedingungen gewählt wurden.

Der Einfluss von Cd(II) und Zn(II) auf die Biomasse ist ein integrales Ergebnis der komplexen Beeinflussung des gesamten Stoffwechsels. Deutlich wird in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Expositionszeit. In beiden Stämmen wurde sowohl unter Cd(II) als auch unter Zn(II) eine stärkere Verringerung der Biomasse in der logarithmischen Wachstumsphase beobachtet, obwohl hier nur eine Expositionszeit von 3 gegenüber 5 Tagen in der stationären Phase vorlag (Tab. 25). Auch *Curvularia lunata*, ein Cd(II)-toleranter Hyphomycet zeigte dieses Verhalten (Vepachedu et al., 1997).

**Tab. 25 Biomasseverlust in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase der *H. lugdunensis*-Stämme H4-2-4 und H8-2-1 unter ausgewählten Schwermetallstress-Bedingungen**

	Biomasseverlust [%] H4-2-4		Biomasseverlust [%] H8-2-1	
	logarithmische Phase	stationäre Phase	logarithmische Phase	stationäre Phase
150 µM Cd(II)	71	51	77	45
350 µM Zn(II)	54	49	78	76

Eine mögliche Ursache dafür wäre die fortschreitende Komplexierung von Cd(II) und Zn(II) durch metallbindende Proteine oder Peptide (z.B. Thiole) wofür ein GSH- und Phytochelatin-Anstieg spricht (Abb. 23, S. 57, Abb. 29, S. 66), eine vakuoläre Kompartimentierung (Gadd, 1993), sowie die Präzipitierung durch Sulfide oder die extrazelluläre Komplexierung durch Säuren (Oxalate, Citrate) (Gadd, 1990). Ein möglicher Efflux der Metalle kann ausgeschlossen werden, da der intrazelluläre Gehalt beider Metalle in der stationären Phase, vor allem bei hohen Konzentrationen, über denen in der logarithmischen Phase lag (Abb. 19, S. 49).

Der geringere Biomasseverlust durch Zn(II) gegenüber Cd(II) gleicher Konzentration (Abb. 14, S. 39) weist darauf, dass Zn(II) eine essentielle Rolle in der Struktur und Funktion einer Vielzahl von Proteinen und somit im Stoffwechsel spielt (Van Ho et al., 2002).

Der Biomasseverlust von Stamm H8-2-1 unter Cd(II)-Stress (150 µM) ist nicht signifikant höher als bei Stamm H4-2-4. Nach einer 350 µM Zn(II)-Belastung hingegen ist dieser deutlich größer. Möglicherweise weist Stamm H4-2-4, adaptiert an Zinkkonzentrationen bis 40 nM am Standort, eine höhere Toleranz auf. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Arbeit von Pawlik-Skowronska (2003), die unterschiedliche biochemische Reaktionen in einem Zn(II)-toleranten Ökotyp aus einem Zn(II)-belasteten Standort und einem Zn(II)-sensitiven Ökotyp aus einem unbelasteten Standort der Alge *Stigeoclonium tenue* fand.

Vitalitätsuntersuchungen zeigten eine Metall- und Dosisabhängigkeit, jedoch keine signifikante Phasenabhängigkeit. In der Literatur gibt es keine Hinweise zum Einsatz von 2,3,5-Triphenyl-tetrazoliumchlorid zur Bestimmung der Vitalität unter Schwermetallstress in filamentösen Pilzen. Diese Methode wird in erster Linie zur Vitalitätsbestimmung in Tierzell- und Bakterienkulturen eingesetzt (Bhupathiraju et al., 1999; Towell und Mazur, 1975). Sie erwies sich aber auch für filamentöse Pilze als geeignet. Im Vergleich zur Biomassebestimmung ist die

Vitalitätsuntersuchung sensitiver. Bereits bei 25  $\mu\text{M}$  Cd(II) und 50  $\mu\text{M}$  Zn(II) verringert sich die Vitalität prozentual stärker als die der Biomasse. Die Biomasseproduktion ist ein Ergebnis der Beeinflussung aller Stoffwechselprozesse, die Bestimmung der Vitalität hingegen nur die Reduktionsfähigkeit der gesamten Dehydrogenasen (2.6.2). Möglicherweise werden diese sowohl durch Cd(II) als auch durch Zn(II) inhibiert.

Die Untersuchung des Einfluss' der Salinität auf *Ulva fasciata* (Chlorophyta) mit der gleichen Methode ergab, dass bis zu einer Salinität von 30 ‰ die Vitalität bzw. das Vermögen zur Reduktion von TTC anstieg (Lee und Chen, 1998). Der Einfluss hoher NaCl-Konzentrationen auf die Enzymaktivitäten allgemein wurde hingegen nicht diskutiert.

Prinzipiell ist es schwierig, diese Ergebnisse mit Vitalitätsuntersuchungen zu vergleichen, die z.B. Soares et al. (2002) an *S. cerevisiae* durch Ausplattieren auf schwermetallhaltigen Agar und Vergleich der Kolonienzahl gewonnen hatten. Auch White und Gadd (1987) nutzen die Methode des Ausplattierens um die Vitalität von *S. cerevisiae* unter Zn(II)-Stress einzuschätzen. Dabei beobachteten sie bei allen eingesetzten Zn(II)-Konzentrationen (5-100  $\mu\text{M}$ ) eine Inhibierung des  $\text{H}^+$ - Effluxes und der  $\text{K}^+$ - Aufnahme und damit auch eine Verringerung der „Vitalität“, ausgedrückt als Kolonienzahl prozentual zur Kontrolle.

Eine weitere Methode die Ott et al. (2002) zur Bestimmung der Vitalität bei *Paxillus involutus* unter Cd(II)-Stress nutzten, war die Ergosterolbestimmung. Dabei nahm der Ergosterolgehalt mit zunehmender Cd(II)-Konzentration ab. Die Methode der Ergosterolbestimmung wird jedoch häufiger zur Bestimmung pilzlicher Biomasse als zur Vitalitätsbestimmung eingesetzt (Gessner und Chauvet, 1997). Bermingham et al. (1995) merkten kritisch an, dass Schwermetalle das Verhältnis von Pilzbiomasse zu Ergosterol stören bzw. negativ beeinflussen können. Auch die Kulturbedingungen wie Medium, Temperatur oder Schüttelgeschwindigkeit zeigten unter Laborbedingungen einen Einfluss auf den Ergosterolgehalt in Pilzen (Gessner et al., 2003).

Die Vitalität wird in der Literatur in unterschiedlichster Weise bestimmt, wobei diese oft mit der Biomasseproduktion konform geht, untereinander jedoch aufgrund der unterschiedlichsten Bestimmungsmethoden schwer zu vergleichen ist.

#### **4.2.1 Einfluss der Temperatur auf die Biomasse und die Vitalität in *H. lugdunensis* unter Cd(II)- Stress**

Die Biomasseproduktion ist von der Temperatur abhängig. Der Biomasseverlust unter Cd(II) (25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$ ) ist in beiden Stämmen bei 14° C gegenüber 10° C deutlich geringer. Eine verringerte Schwermetallaufnahme ist in *H. lugdunensis* nicht die Ursache dafür, da mit höherer Temperatur eine gesteigerte Akkumulation gemessen werden konnte (Tab. 20). Es wäre denkbar, dass eine bessere Stoffwechsellleistung, die sich auch im besseren Wachstum der unbelasteten Kontrollen widerspiegelt, dafür verantwortlich ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden keine optimalen Wachstumstemperaturen bestimmt, da im Temperaturbereich des natürlichen Habitates gearbeitet werden sollte. Doch Graça (1995) fand heraus, dass die optimale Wachstumstemperatur für einen *H. lugdunensis*-Stamm aus einem Fluss in Mittel-Portugal in

komplexer Malz-Flüssigkultur (MEB, Difco, 15 g/L) zwischen 20 °C und 25 °C lag und ab 5 °C kontinuierlich anstieg. Der Stamm erreichte damit das höchste Temperaturoptimum von vier untersuchten aquatischen Hyphomyceten (Graça und Ferreira, 1995).

Die Vitalität zeigt unter Cd(II)-Belastung ebenfalls eine Beeinflussung durch die Temperatur im Stamm H8-2-1. Im Stamm H4-2-4 hingegen ist sie nicht signifikant verschieden zwischen 14 °C und 10 °C (Tab. 15). Stamm H8-2-1 lässt den Schluss zu, dass, wie bei der Biomasse, ein erhöhter Stoffwechselumsatz bei höheren Temperaturen dazu führt, dass der Vitalitätsverlustes durch Cd(II)-Exposition vermindert werden kann.

### 4.3 Beeinflussung des Wasserhaushaltes

Neben der Beeinflussung der Biomasse und der Vitalität ist auch der Wasserhaushalt eines Organismus' unter Schwermetallstress von vielen Parametern abhängig. Für Pflanzen wurde unter Cadmiumstress neben Nekrosen und einem verminderten Wachstum auch ein Welken aller Pflanzenteile beobachtet (Perfus-Barbeoch et al., 2002). Dabei ist eine Störung bzw. Falschregulierung der Stomata die Ursache für den gestörten Wasserhaushalt. Für Pilze muss nach anderen Ursachen gesucht werden, denn in *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 konnte ebenfalls eine Verringerung des Wassergehaltes unter Cd(II)- und Zn(II)-Belastung nachgewiesen werden (Abb. 16, S. 43). Da die Pilze in flüssigen Medium angezogen wurden, muss man vermuten, dass eine Änderung der Osmolarität, verbunden mit einer Änderung des Ionenhaushaltes für den Wasserverlust in der Zelle verantwortlich ist.

In der Literatur wird häufig berichtet, dass begleitend mit der Schwermetallaufnahme in Pilzen und Hefen eine Freisetzung von Ionen in das Medium beobachtet werden konnte (Blackwell et al., 1995; Blackwell und Tobin, 1999; Gharieb, 2001; White und Gadd, 1987). Dabei handelt es sich um den Efflux von  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $H^+$  und  $Ca^{2+}$ . Es wird diskutiert, dass die Metalle zu einer Zerstörung der Plasmamembran führen, deren elektrochemischen Gradienten stören oder Antiporter aktivieren (Gharieb, 2001). Die Stöchiometrie für die Aufnahme von Metallen und Efflux von Ionen ist dabei nicht immer eindeutig und für die Metalle und auch Organismen zum Teil unterschiedlich (Blackwell et al., 1995). Auch bedingen nicht immer dieselben Metalle einen Efflux aller oben genannten Ionen. Blackwell und Tobin (1999) benutzten den verringerten intrazellulären  $K^+$ -Gehalt unter Cd(II) in *S. cerevisiae* sogar als Indikator für die Zelltoxizität. Der Einfluss dieser Beobachtungen auf den Wassergehalt der pilzlichen Zelle blieb bei diesen Untersuchungen jedoch weitgehend unbeachtet. Es ist denkbar, dass sich durch den Efflux der Ionen das Konzentrationsgefälle bzw. das chemische Potential ( $\mu_i$ ) verschiebt. Dabei würde die Ionenkonzentration im Raum um die Zelle (im Mikrokosmos) im Gegensatz zum Zellinneren ansteigen und einen Wasserausstrom bedingen. Der intrazelluläre Wassergehalt würde demzufolge sinken.

Ob die hier für *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 beobachtete Verringerung des Wassergehaltes auf einen Ausstrom von Ionen zurückzuführen ist, bleibt zu klären. Es wird aber wieder deutlich,

dass Cd(II) gegenüber Zn(II) eine stärkere Beeinflussung ausübt, die nicht signifikant von der Wachstumsphase abhängig ist, obwohl in der stationären Phase bei beiden Stämmen immer ein etwas geringeres FM/TM-Verhältnis beobachtet wurde. Prozentual betrachtet ist die Abnahme des Wassergehaltes unter maximaler Cd(II)-Belastung für beide Stämme etwa gleich. Für Zn(II) ist der Verlust prozentual für H4-2-4 etwas geringer als für H8-2-1. Möglicherweise spiegelt sich auch hier die höhere Toleranz von H4-2-4 gegenüber Zn(II) wider.

#### 4.4 Zellwandzusammensetzung in *H. lugdunensis* unter Schwermetallstress

Der erste Kontakt einer Pilzzelle mit toxischen Metallen, sofern diese nicht durch Oxalate und Citrate (Gadd, 1999; Jarosz-Wilkolazka und Gadd, 2003), Glycoproteine (bei einigen Hefen) (Breierova et al., 2002) oder Sulfide (*S. cerevisiae*) (Gadd, 1992) komplexiert bzw. präzipitiert wurden, ist die Zellwand. Die Zusammensetzung der pilzlichen Zellwand ist für das Überleben in extremen Lebensräumen entscheidend (Blackwell et al., 1995). Sie fungiert als Diffusionsbarriere, die die Aufnahme von Verbindungen, darunter auch toxische Metalle, kontrolliert (Gadd, 1993). Sie beinhaltet eine Reihe unterschiedlichster Strukturen, die von der dünnen mehr oder weniger unstrukturierten Zellwand in der Wachstumszone bis zur zum Teil sehr dicken, festen Zellwand in alten Hyphen reicht (Burgstaller, 1997) und bestimmt die Biosorptionskapazitäten eines Organismus (Peberdy, 1990; Venkateswerlu und Stotzky, 1989).

Die Zellwand ist eine komplexe Struktur, die Chitinmikrofibrillen, umgeben von einer amorphen Schicht aus Proteinen und Polysacchariden (Mannan, Glukan, Galaktane) enthält (Kuhn und Trinci, 1990; Peberdy, 1990). Dass Chitin nicht immer der Hauptanteil der pilzlichen Zellwand ist, konnte an dem Ascomyceten *H. lugdunensis*, für den bisher keine Informationen zur Zusammensetzung der Zellwand und zu deren Beeinflussung durch Schwermetalle vorlagen, gezeigt werden.

Gleiche Ergebnisse fanden Nguyen et al. (1998) für einige, ebenfalls zu den Ascomyceten gehörende Hefen (*Kloeckera apiculata*, *Debaryomyces hansenii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Kluyveromyces marxianus*, *S. cerevisiae*). Ähnlich wie bei *H. lugdunensis* waren die Hauptbestandteile der Zellwand in diesen Organismen Glucose und Mannose. Galaktose und Glucuronsäure wurden nicht weiter untersucht.

In Stämmen der Art *Nectria cinnabarina*, einem nahen Verwandten von *H. lugdunensis*, und *Sesquicillium*-Spezies, ebenfalls zu den Hypocreales gehörend, konnten Ahrazem et al. (2001) auch Glukose, Galaktose, Mannose, Glukuronsäure und in geringen Mengen oder gar nicht N-Acetylglukosamin als Hauptbestandteil der Zellwand identifizieren. Dabei traten auch hier Glukose und Galaktose am häufigsten auf (Vergleich Tab. 17, S. 46).

Dies bestärkt die nahe Verwandtschaft von *N. cinnabarina* zu *H. lugdunensis* obwohl dieser im Stammbaum zur 18S rDNA-Analyse nicht direkt mit *H. lugdunensis* clustert (Abb. 12, S. 37). Die Zellwandanalyse wird sehr häufig zur Einschätzung phylogenetischer Sachverhalte genutzt

(Ahrazem et al., 2001; Prillinger et al., 1993), obwohl sich zeigt, dass Untersuchungen auf molekularer Ebene oft aussagekräftiger sind.

Die prozentuale Zellwandzusammensetzung der Stämme H4-2-4 und H8-2-1 unterscheidet sich für Mannose und Galaktose signifikant. Das ist nicht überraschend, fanden doch auch Nguyen et al. (1998) und Ahrazem et al. (2001) Unterschiede in der prozentualen Zuckerzusammensetzung der Zellwand in den dort untersuchten Hefe- bzw. *Nectria*-Stämmen.

Augenmerk der Untersuchungen in dieser Arbeit war weiterhin die Beeinflussung der Zellwandzusammensetzung (Polysaccharide) durch Schwermetallstress. Morphologische Unterschiede (elektronenmikroskopisch) zwischen Cu(II)-belasteten und unbelasteten pilzlichen Zellwänden fand Gardea-Torresdey et al. (1997) in *Mucor rouxii*, wobei die Zellwand unter Metallstress verdickt wurde. Auch Gharieb (2001) beobachtete Bulbenbildung in *Alternaria* und *Fusarium* spec., die auf Veränderungen in der Zellwand schließen lassen. Diese konnte auch für *H. lugdunensis* beobachtet werden. Die Funktion dieser durch Cd(II) induzierten Strukturen ist unbekannt, denkbar wäre die Bindung der Metalle an funktionelle Gruppen der Zellwand, die in der Zellproliferation involviert sind.

Die Metallbindung an die Zellwand ist ein komplexer Vorgang. Die Bindung ist abhängig von der Zellwandstruktur und Zusammensetzung. Letztere kann durch das Vorhandensein von Metallen beeinflusst werden (Gadd, 1993; Venkateswerlu und Stotzky, 1989). Zur Zusammensetzung der Zuckerbestandteile in der pilzlichen Zellwand in Abhängigkeit von der Schwermetallkonzentration im Medium ist wenig bekannt. Hefnawy und Razak (1998) fanden, dass der Gesamtzuckeranteil der Zellwand in *Fusarium oxysporum* in Gegenwart von Kupfer ansteigt. Sie diskutierten die Erhöhung der Zuckeranteile unter Schwermetallstress als Schutzmechanismus in Form einer Zellwandverdickung.

Für *H. lugdunensis* wurde unter 100 µM Cd-Stress hingegen eine Abnahme des Zuckergehaltes gefunden, der für Stamm H4-2-4 aus dem belasteten Standort ausgeprägter war als für Stamm H8-2-1. Auch 250 µM Zn(II) verringerten den Zuckergehalt, vor allem den Galaktoseanteil, in Stamm H8-2-1. Der Zuckergehalt der Zellwand von H4-2-4 hingegen blieb durch Zn(II)-Belastung unbeeinflusst.

In *Cunninghamella blakesleeana* wurde ebenfalls eine Verringerung des Zuckeranteils unter Kupferstress gefunden (Venkateswerlu und Stotzky, 1986).

Es ist denkbar, dass durch eine Verringerung der Zuckerbestandteile der Zellwand Metallbindestellen vermindert werden (an den funktionellen Gruppen der Zucker). Vor allem die Verringerung des Glucuronsäureanteils würde diese Annahme stützen, da Carboxylgruppen als eine Hauptkomponente der Metallbindung in der Zellwand postuliert werden. So zeigten Fourest et al. (1996), dass in *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *P. caryogenum* und *Trichoderma reesei* der COOH-Gehalt mit 30 %-70 % an der Zn(II)-Bindung beteiligt ist.

Offensichtlich ist die Modifikation der Zellwand, verbunden mit Adaptationsprozessen in der Biosorption und Akkumulation ein wichtiger Schutzmechanismus im Zuge der spezifischen Anpassung von Pilzen an Schwermetallstress.

## 4.5 Akkumulations- und Biosorptionsvermögen der *H. lugdunensis*-Stämme H4-2-4 und H8-2-1

### 4.5.1 Akkumulation und Biosorption

Die Biomasseproduktion, die Vitalität sowie der Wasserhaushalt unter Metallbelastung reflektieren komplexe biochemische Adaptationen beginnend mit der Biosorption und Akkumulation.

Mikroorganismen, darunter auch Pilze haben ein hohes Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis auf Grund ihrer geringen Größe (Ledin, 2000). Auf Grund der daraus resultierenden großen Oberfläche zeigen sie eine hohe Kapazität, um mit Metallen in der Umgebung zu interagieren.

Die Metallaufnahme in Pilzen ist ein biphasischer Prozess. Der erste Schritt, die Biosorption oft auch als passive Akkumulation bezeichnet, ist ein schneller, Metabolismus-unabhängiger Prozess. Sie ist abhängig von der Oberflächenstruktur des Organismus und der chemischen Zusammensetzung der Zellwand, der zu bindenden Metallspezies und der Expositionsdauer (Volesky und May-Phillips, 1995; White und Gadd, 1987). Die Bioakkumulation hingegen ist ein langsamerer Metabolismus-abhängiger Schritt. Sie wird von der Temperatur, dem pH-Wert, der Zusammensetzung des Mediums und der Gegenwart von Inhibitoren der Metallaufnahmesysteme (Blackwell et al., 1995; Kapoor und Viraraghavan, 1997a) beeinflusst.

Es ist möglich, dass unterschiedliche Bindekapazitäten eine Rolle in der Schwermetalltoleranz spielen. Dafür können unterschiedliche Strukturen an der Zelloberfläche verantwortlich sein. Die Bindung der Metalle dort kann über Carboxyl-, Hydroxyl-, Sulfhydryl-, Phosphat- oder Aminogruppen, die Bestandteile von Kohlenhydraten, Lipiden oder Proteinen sein können, als Ionenaustausch-Prozess erfolgen (Fourest et al., 1996; Kapoor und Viraraghavan, 1997b).

In *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 werden Cd(II) und Zn(II) konzentrations- und zeitabhängig sorbiert (Abb. 18, S. 47). Dabei weisen beide Stämme unterschiedliche Quantitäten in der Biosorption von Cd(II) und Zn(II) auf. So biosorbierte der Stamm H4-2-4 bei einer 100 µM Cd(II)-Gabe 37,5 µmol/g TM und bei einer 100 µM Zn(II)-Gabe 12,5 µmol/g TM in der logarithmischen Phase (nach 3 Tagen Schwermetallexposition).

In der stationären Phase waren es 45,8 bzw. 6,9 µmol/g TM. Auch der Stamm H8-2-1 sorbierte bei gleicher Konzentration weniger Zn(II) als Cd(II). Dies bestätigt die Abhängigkeit der Biosorption von der Metallspezies. *H. lugdunensis* zeigt bei gleicher Konzentration eine höhere Cd(II)- als Zn(II)-Biosorption (**Cd > Zn**). Dies wurde auch für lebende *S. cerevisiae*-Kulturen beobachtet (Avery und Tobin, 1993). Volesky und May-Phillips (1995) hingegen analysierten sowohl für lebendes (nicht wachsendes) als auch für totes *S. cerevisiae*-Material höhere

Bindekapazitäten für Zn(II) als für Cd(II). Dabei wurde zwischen totem und lebendem Material kein signifikanter Unterschied in der Metallbindung beobachtet (Volesky und May-Phillips, 1995). Für die unterschiedlichen Befunde in den beiden Arbeiten ist möglicherweise der pH-Wert oder die Zusammensetzung des Mediums verantwortlich, da die Anzuchtstemperatur jeweils 25° C betrug. Avery und Tobin (1993) arbeiteten bei einem pH-Wert von 5,5; Volesky und May-Phillips (1995) hingegen bei 4,0.

Fanden Volesky und May-Phillips (1995) keine Unterschiede zwischen totem und lebendem Material in *S. cerevisiae*, so konnten Yan und Viraraghavan (2003) in *M. rouxii*, Unterschiede in den Bindekapazitäten für Zn(II) zwischen lebendem und totem Material nachweisen. Lebendes Material biosorbierte 75 µmol Cd(II)/g und 119 µmol Zn(II)/g, durch Druck und Hitze behandeltes Pilzmycel hingegen 74 µmol Cd(II)/g und 255 µmol Zn(II)/g. Dies zeigt, dass die Bindekapazitäten für Cd(II) durch diese Bedingungen nicht beeinflussbar sind, für Zn(II) hingegen schon. Daraus lässt sich schließen, dass für beide Metalle unterschiedliche Bindungsstellen an der Zellwand vorliegen müssen oder Bindestellen für Zn(II) durch die thermische Behandlung freigelegt werden.

Auch inaktiviertes Material der filamentösen Pilze *Aspergillus niger* (Akthar et al., 1996) und *Rhizopus arrhizus* (Tobin et al., 1984) zeigten höhere Zn(II)- als Cd(II)-Biosorptionskapazitäten.

Die Aufnahme von Kinetiken zur Einschätzung von Biosorptionskapazitäten eines Organismus z.B. nach Langmuir und Freundlich kann nur an totem oder nicht wachsendem Material durchgeführt werden, da bei wachsendem Material das Verhältnis zwischen Biomasse und verfügbarem Metall kontinuierlich variiert (Ledin, 2000; Volesky und Holan, 1995), (Volesky, persönliche Mitteilung).

In der Literatur werden Biosorption und Akkumulation als konzentrationsabhängige Prozesse beschrieben. Dies konnte auch für *H. lugdunensis* bestätigt werden. Für den Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* (inaktiviertes Material) wurde experimentell und mathematisch bestimmt, dass die Anfangskonzentration des Metalls die am meisten signifikante Variable im Biosorptionsprozess (keine Unterteilung zwischen intra- und extrazellulärem Metall) im Gegensatz zur Menge des Biosorbens und des pH-Wertes der Lösung ist (Gopal et al., 2002).

Von der Anfangskonzentration der Metalle hängt es ebenfalls ab, wann eine Absättigung der Sorption eintritt. Für *H. lugdunensis* konnte für beide Metalle und Stämme in *vitro* keine Sättigung festgestellt werden. Möglicherweise liegt die Konzentration, bei der eine Sättigung der Biosorption eintreten würde, über der letalen Dosis der Pilze.

Die Biosorption bzw. die passive Akkumulation in Pilzen variiert mit der Temperatur, mit der Expositionszeit, der Mediumzusammensetzung und dessen pH-Wert, aber auch mit der Zelldichte und dem Alter der Zellen (Kapoor und Viraraghavan, 1997a).

So erstaunt es nicht, dass die Ergebnisse für *H. lugdunensis* H4-2-4 in der vorliegenden Arbeit zu Ergebnissen am selben Stamm im Rahmen einer anderen Untersuchung (Jaeckel, 2002) differieren. Wurden in der vorliegenden Arbeit nach einer 100 µmolaren, 5tägigen Belastung

ca. 45  $\mu\text{mol/g}$  TM Cd(II) und ca. 7  $\mu\text{mol/g}$  TM Zn(II) biosorbiert, waren es in der Arbeit von Jaeckel ca. 18,5  $\mu\text{mol/g}$  TM Cd(II) und ca. 17  $\mu\text{mol/g}$  TM Zn(II). Die verwendeten Medien waren gleich, doch benutzte Jaeckel (2002) eine Anzuchtsmethode, die dazu führte, dass sich ihre Kulturen noch in der spät-logarithmischen Wachstumsphase befanden. *H. lugdunensis*-Kulturen in der vorliegenden Arbeit befanden sich bereits in der stationären Phase.

Die Ergebnisse zeigen weiterhin sehr deutlich die Abhängigkeit der Biosorption von der Wachstumsphase. 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) werden in der stationären Phase mehr biosorbiert, für Zn(II) gleicher Konzentration hingegen wird der höhere Anteil in der logarithmischen Phase messbar.

Die Schwierigkeit der quantitativen Vergleichbarkeit von Sorptions- und Akkumulationsprozessen soll am Beispiel von *S. cerevisiae* und Cu(II) (da hier die meisten relevanten Studien vorliegen) gezeigt werden (Tab. 26).

**Tab. 26 Maximale Bindekapazitäten für Cu(II) durch *S. cerevisiae* (nicht lebendes Material)**

Maximale Bindekapazität [ $\mu\text{mol/g}$ TM]	Cu(II)-Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Referenz
23	bis 50	Huang et al. (1990)
98	bis 50	Avery und Tobin (1993)
ca. 100-400	bis 3000	Volesky und May-Phillips (1995)
140	bis 4550	Dönmez und Aksu (1999)

Die Vorgehensweisen zur Bestimmung der Cu(II)-Bindung sind in den vier Referenzen (Tab. 26) ähnlich, wobei unterschiedliche Stämme einer Art verwendet wurden. Es wird deutlich, dass bei gleicher eingesetzter Konzentration die Biosorptionskapazitäten bis zum 4fachen, sonst sogar bis zum 20fachen variieren können. Möglicherweise spielen die Medienzusammensetzungen und deren pH-Werte eine entscheidende Rolle und erschweren damit die Vergleichbarkeit von Biosorptionsprozessen.

Untersuchungen zur Biosorption werden oft aus dem Blickpunkt der Biotechnologie geführt und dadurch häufig sehr hohe Metallkonzentrationen in Betracht gezogen. Nur zwei der in Tab. 26 aufgeführten Autoren setzten bei ihren Untersuchungen Konzentrationen ein, die den Bedingungen an natürlichen Standorten nahe kommen und somit für biochemische Fragestellungen von Relevanz sind.

Für die Stämme H4-2-4 und H8-2-1 liegt die maximale Biosorption von Cd(II) und Zn(II) [stationäre Phase, 150  $\mu\text{M}$  Cd(II): H4-2-4 = 66,9  $\mu\text{mol/g}$  TM; H8-2-1 = 52,2  $\mu\text{mol/g}$  TM und 350  $\mu\text{M}$  Zn(II): H4-2-4 = 97,4  $\mu\text{mol/g}$  TM; H8-2-1 = 79,5] im Bereich dessen, was auch für andere Pilze gemessen werden konnte (Kapoor und Viraraghavan, 1997a; Volesky und Holan, 1995; Yin et al., 1999). Dabei befindet sich *H. lugdunensis* im Bereich der Organismen, die Cd(II) und Zn(II) weniger gut biosorbieren.

Es stellte sich weiterhin die Frage, warum bei niedrigen Zn(II)-Konzentrationen in der logarithmischen Phase in beiden Stämmen mehr biosorbiert wird als in der stationären Phase, obwohl bekannt ist, dass mit zunehmender Expositionsdauer (in der stationären Phase) auch die Biosorption sowohl in totem als auch in lebendem Pilzmaterial zunimmt (Akthar et al., 1996; Dönmez und Aksu, 1999, 2001). Für Cd(II) wurde dies in beiden Stämmen bestätigt, für Zink traf dies nicht zu. Möglich wäre, dass durch das erhöhte Zn(II)-Angebot in einer nicht toxischen Dosis [keine Beeinflussung der Biomasse, nur geringe Herabsetzung der Vitalität (Abb. 14, S. 39; Abb. 15, S. 42)] eine gesteigerte Aufnahme dieses Metalls in *H. lugdunensis* erfolgt, denn bei höheren Konzentrationen wurde auch bei Zn(II) in der stationären Phase mehr biosorbiert.

Bei hohen Metallkonzentrationen zeigen sich in der vorliegenden Arbeit deutliche Unterschiede in der Biosorption zwischen den Stämmen [stationäre Phase, 150 µM Cd(II): H4-2-4 = 66,9 µmol/g TM; H8-2-1 = 52,2 µmol/g TM und 350 µM Zn(II): H4-2-4 = 97,4 µmol/g TM; H8-2-1 = 79,5]. Der tolerantere Stamm H4-2-4 biosorbierte im Durchschnitt mehr Metall als der Stamm H8-2-1 aus dem moderat belasteten Standort [für Zn(II) nicht signifikant]. Auch Gardea-Torresdey et al. (1997) fanden für *M. rouxii*, dass der Cd(II) tolerante Stamm eine etwas höhere Metallbindekapazität aufwies als der sensitive. Ebenfalls zeigte ein aus Abwasser isolierter und an Metall adaptierter *Candida*-Stamm, dass seine Bindekapazitäten von Cu(II) und Ni(II) gegenüber einem unadaptiertem Stamm deutlich höher lagen (Dönmez und Aksu, 2001).

Es ist möglich, dass auf Grund unterschiedlicher Strukturen an der Zelloberfläche, unterschiedliche Bindekapazitäten eine Rolle in der Schwermetalltoleranz spielen (Fourest et al., 1996; Kapoor und Viraraghavan, 1997b). Daher könnten unterschiedliche Oberflächenstrukturen in den Stämmen H4-2-4 und H8-2-1 zu den Differenzen in der Biosorption führen.

Dies würde ebenfalls die Unterschiede in den Mengen an Cd(II) und Zn(II) erklären, die bei gleicher molarer Belastung biosorbiert werden.

Ein Hinweis auf diese Sachverhalte könnte die unterschiedliche Desorbierbarkeit verschiedener Metalle sein, wie es z.B. Kapoor und Viraraghavan (1996) für inaktiviertes *A. niger*-Material gefunden haben (Tab. 27).

**Tab. 27 Desorptionseffizienz unterschiedlicher chemischer Reagenzien an alkalisch (0,5 N NaOH) vorbehandeltem *A. niger* (Kapoor und Viraraghavan, 1996)**

Desorptions-Reagenz	Desorption Pb [%]	Desorption Cd [%]	Desorption Ni [%]
H <sub>2</sub> O	3,6	14,1	22,6
0,1 N HNO <sub>3</sub>	98,9	98,9	99,3
1,0 N HNO <sub>3</sub>	99,0	94,2	91,7
0,1 M CaCl	30,1	94,4	64,8
0,1 M MgSO <sub>4</sub>	14,7	79,6	28,8
0,1 N Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	13,0	91,4	5,4
0,1 N NaHCO <sub>3</sub>	20,4	44,2	29,1
0,1 N NH <sub>4</sub> Cl	7,2	47,8	60,5

Hierbei werden Pb(II), Cd(II) und Ni(II) durch gleiche Desorptionsreagenzien in verschiedenem Maße abgelöst.

Die Begriffe Biosorption und Akkumulation werden in der Literatur in unterschiedlicher Weise gebraucht. In der vorliegenden Arbeit wird als Akkumulation nur der intrazelluläre Gehalt an Schwermetall definiert. Diese Schwermetallmenge ist für die Beeinflussung des Stoffwechsels von Relevanz. Im Gegensatz zur Biosorption ist dies ein Metabolismus-abhängiger Prozess. Die Menge an aufgenommenem Metall liegt häufig unter der biosorbierten, was wiederum eine Schutzfunktion darstellt.

Für *H. lugdunensis* zeigt sich, dass auch die Akkumulation ein zeit- und konzentrations-abhängiger Prozess ist, wobei letzterer mittels quadratischer Funktion beschrieben werden kann. Bei einer maximalen Cd(II)-Belastung von 150 µM kommt es zu einer maximalen Aufnahme in der stationären Phase von 22,3 µmol/g TM durch H4-2-4 und 27,13 µmol/g TM durch H8-2-1. Diese Werte sind mit Ergebnissen zur Akkumulation in anderen pilzlichen Vertretern vergleichbar [*A. niger*: 40 µmol/g, *M. rouxii*: 15,3 µmol/g (Mullen et al., 1992), *P. involutus*: 27 µmol/g TM (Blaudez et al., 2000)].

Auch die Zn(II)-Aufnahme ist mit 70,8 µmol/g TM für H4-2-4 und 145,3 µmol/g TM für H8-2-1 mit anderen pilzlichen Vertretern zu vergleichen [*Saccharomyces spec.*: 120 µmol/g TM (Singleton und Tobin, 1996), *Candida utilis*: bis 60 µmol/g TM (Failla et al., 1976) *Sporobolomyces roseus*: bis 90 µmol/g TM, *S. cerevisiae*: 160 µmol/g TM (Mowll und Gadd, 1983)].

Neben der Konzentrationsabhängigkeit der Akkumulation wird, besonders in Stamm H8-2-1 unter hohen Zn(II)-Belastungen, deutlich, dass in der stationären Phase in beiden Stämmen mehr Metall akkumuliert wird als in der logarithmischen Wachstumsphase (Abb. 19, S. 49). Soares et al. (2002) diskutieren in ihrer Veröffentlichung in Bezug auf die Unterschiede in der Metallaufnahme - Cd(II), Cu(II) und Pb(II) - in *S. cerevisiae*, verglichen mit den Daten von Volesky und May-Phillips (1995) in einem anderen Stamm, dass möglicherweise das Alter einer

Kultur eine entscheidende Rolle für die Aufnahme spielt. Auch die Kultur- und Anzuchtbedingungen spielen dabei eine entscheidende Rolle.

Der Stamm H4-2-4 akkumulierte bei Jaeckel (2002) 11,8  $\mu\text{mol Cd(II)/g TM}$  und 25,1  $\mu\text{mol Zn(II)/g TM}$  unter 100  $\mu\text{M}$  Belastung. In der vorliegenden Arbeit wurden bei gleicher Konzentration und Expositionsdauer (5 Tage) 13,3  $\mu\text{mol Cd(II)/g TM}$  und 34,8  $\mu\text{mol Zn(II)/g TM}$  bestimmt. Die Werte liegen nah beieinander, obwohl sich die Kultur in der Arbeit von Jaeckel (2002) noch in der logarithmischen und die Kulturen in der vorliegenden Arbeit bereits in der stationären Phase befanden.

Neben der Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Akkumulation wird deutlich, wie unterschiedlich Cd(II) und Zn(II) aufgenommen werden. Sowohl H4-2-4 als auch H8-2-1 nehmen bei gleicher Belastung ca. 3- (stationäre Phase) bis 6mal (logarithmische Phase) mehr Zn(II) auf als Cd(II). Außerdem liegen die Werte der Zn(II)-Akkumulation bei allen Konzentrationen über dem, was extrazellulär gebunden wird. Ausgenommen ist Stamm H4-2-4 bei einer 350  $\mu\text{M}$  Zn(II)-Belastung. Hier biosorbiert der Stamm mehr als er akkumuliert, was wiederum als Adaptation des toleranteren Stammes angesehen werden kann.

Bereits Jaeckel (2002) bestätigte für den Stamm H4-2-4, dass die Zn(II)-Akkumulation über der Biosorption liegt, für andere Pilzgruppen jedoch ist dies in der Literatur nicht gezeigt worden. Möglicherweise sind die unterschiedliche Toxizität von Cd(II) und Zn(II) und die damit verbundenen unterschiedlichen Aufnahmestrategien verantwortlich.

Für die Aufnahme von Cd(II) werden in der Literatur mehrere Wege postuliert, die jedoch alle nicht Cd(II)-spezifisch sind und häufig die Transportwege für essentielle Ionen darstellen. Blaudez et al. (2000) fanden für den Ektomyorrhiza-Pilz *P. involutus* heraus, dass die Cd(II)-Aufnahme sowohl vom Membranpotential, vom Carrier-vermittelten Transport aber auch vom Calcium-Transport abhängig ist. Die Expression pflanzlicher cDNA für den Transporter LCT1 in *S. cerevisiae* führte zu einem deutlichen Ca(II)- und Cd(II)-Einstrom, was vermuten ließ, dass Cd(II) über Ca(II)-Transporter im pflanzlichen System mit aufgenommen werden kann (Clemens et al., 1998). In *S. cerevisiae* führte das Ausschalten des Gens für den Zinktransporter ZRT1 dazu, dass die Zellen nicht mehr in der Lage waren Cd(II) in das Zellinnere zu transportieren. Zn(II) hingegen wird gezielt aufgenommen und strikt reguliert (Gomes et al., 2002). Dafür ist in Hefen ein hochaffiner (Zrt1p) und ein niedrig affiner Transporter (Zrt2p) verantwortlich (Gaither und Eide, 2001; Guerinot und Eide, 1999; Van Ho et al., 2002).

Es ist denkbar, dass der Bedarf an Zn(II) als essentielles Element sehr hoch liegt und auf Grund seiner geringen Toxizität, in größerem Maße aufgenommen wird. Cd(II) hingegen wird zwar über essentielle Transporter oder Kanäle mit aufgenommen, führt aber auf Grund seiner toxischen Wirkung unter höheren Konzentrationen zuerst zu deren Blockade und anschließend zur kompletten Schädigung.

*H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 zeigten in der zeit- und konzentrationsabhängigen Aufnahme von Cd(II) und Zn(II) ein ähnliches Verhalten. Doch wie bei der Biosorption sind vor allem bei

hohen Metallkonzentrationen Unterschiede zwischen den beiden Stämmen erkennbar. So akkumuliert H8-2-1 aus dem moderaten Standort mehr Cd(II) und signifikant mehr Zn(II), vor allem in der stationären Phase. Dass Stämme aus unterschiedlich belasteten Standorten Differenzen in der Metallaufnahme zeigen können, beobachteten auch Zhao et al. (2002) für zwei Ökotypen der Cd(II)-Hyperakkumulator-Pflanze *Thlaspi cerulescens*. In einem Ökotyp zeigte sich eine 4,5fach höhere Cd(II)- und eine 1,5fach höhere Zn(II)-Aufnahme im Vergleich zum anderen Ökotyp. Die Autoren vermuten, dass es sich hierbei um eine unterschiedliche Ausprägung von Cd(II)-Transportsystemen, vor allem Ca(II)-Kanäle handeln könnte. Ebenfalls eine verringerte Aufnahme, hier jedoch von Zn(II), des toleranteren Stammes zeigte die Blaualge *Oscillatoria angustissima* (Ahuja et al., 2001). Im Gegensatz dazu wurden in Untersuchungen an einem Cd(II)-resistenten und einem Cd(II)-sensitiven Stamm von *N. crassa* durch Levine und Marzluf (1989) keine Unterschiede in der Cd(II)-Aufnahme gefunden.

Es kann angenommen werden, dass die unterschiedlichen Biosorptions- und Akkumulationskapazitäten gegenüber hohen Cd(II)- und Zn(II)-Konzentrationen in Flüssigkultur, vor allem in der stationären Wachstumsphase, Adaptationen an die verschiedenen Standortbedingungen der beiden *H. lugdunensis* Stämme darstellen. Der Stamm H4-2-4 aus dem stark belasteten Standort biosorbiert bei hohen Metallkonzentrationen mehr Cd(II) und Zn(II) als Stamm H8-2-1 aus dem moderat belasteten Standort. Im Gegensatz dazu zeigt dieser wiederum eine höhere Akkumulation bei hohen Metallkonzentrationen.

#### 4.5.2 Einfluss des pH-Wertes im Medium auf Biosorption und Akkumulation

Die Biosorption und Akkumulation von Metallen in Pilzen kann vom pH-Wert abhängig sein und je nach Metall und Organismus stark differieren (Blackwell et al., 1995; Kapoor und Viraraghavan, 1997a). Mit steigendem pH-Wert können beispielsweise funktionelle Gruppen an der mikrobiellen Oberfläche deprotoniert werden und dadurch frei für die Bindung von Kationen zur Verfügung stehen. Im Gegensatz dazu führt ein niedriger pH-Wert zu einer Protonierung und damit verbunden Verringerung der negativen Ladung an den Bindestellen, was in einer Inhibierung der Metallbindung resultieren würde (Yan und Viraraghavan, 2003). Viele Untersuchungen zeigten auch, dass nicht immer ein steigender pH-Wert zu einer Steigerung in Biosorption und Akkumulation von Metallen führt. Dönmez und Aksu (1999) zeigten z.B., dass die Cu(II)-Aufnahme durch *S. cerevisiae* und *S. pombe* bei pH 4 optimal ist. Eine Erhöhung oder Verminderung des pH-Wertes um eine Einheit führten bereits wieder zu einer Verringerung der Aufnahme. Für *Candida spec.* konnte ebenfalls eine bessere Biosorption bei pH 4 im Gegensatz zu höheren oder niedrigeren Werten gefunden werden (Dönmez und Aksu, 2001). Für *P. involutus* lag das pH-Optimum der Cd(II)-Aufnahme bei 4,5 (Blaudez et al., 2000). Einige Studien haben gezeigt, dass einige Pilze organische Verbindungen freisetzen können, um damit möglicherweise auch den pH-Wert in ihrer Umgebung zu regulieren (Gadd, 1993). Beispielsweise wurden in Gegenwart verschiedenster Metalle Oxalate und Citrate (Gadd, 1999;

Jarosz-Wilkolazka und Gadd, 2003; Murphy und Levy, 1983) gefunden, die einen Einfluss auf den pH-Wert des Mediums hatten. Weiterhin ist denkbar, dass Glycoproteine (bei einigen Hefen) (Breierova et al., 2002) oder Sulfide (*S. cerevisiae*) (Gadd, 1992) nicht nur der Schwermetallkomplexierung dienen sondern auch durch eine Änderung des pH-Wertes im Medium eine veränderte Binde- und Aufnahmekapazität von Metallen hervorrufen.

Die Stämme H4-2-4 und H8-2-1 zeigten eine Ansäuerung des Mediums in den Kontrollansätzen, d.h. in unbelasteten Medien (siehe 3.5). Ob organische Säuren dafür verantwortlich sind, wurde nicht getestet, kann aber vermutet werden. Möglicherweise dient die Ansäuerung des komplexen Kulturmediums zur besseren Verfügbarmachung von Nährstoffen. In unbelasteten Ansätzen zeigte *Fusarium spec.* hingegen eine Steigerung des pH-Wertes im Medium mit der Zeit. Wurde diesem Medium Cd(II) zugesetzt, kam es mit steigender Konzentration über die Zeit zu einer Abnahme des pH-Wertes im Medium (Gharieb, 2001).

Wurde dem Medium für *H. lugdunensis* Zn(II) zugesetzt gab es keine Unterschiede im pH-Wert zur Kontrolle. Unter Cd(II)-Belastung hingegen ließen sich, nicht immer signifikante, Tendenzen erkennen. Der pH-Wert nahm mit der Cd(II)-Belastung im Medium unabhängig von der Wachstumsphase in beiden Stämmen zu. Dabei waren keine Stammesunterschiede zu beobachten.

Die Zunahme des pH-Wertes unter Cd(II)-Belastung im Medium könnte zwei Ursachen haben. Um die Biosorption und Akkumulation zu verringern, könnten *H. lugdunensis* den pH-Wert im Medium erhöhen. Es wäre auch denkbar, dass Cd(II) den Efflux von pH-Wert regulierenden Substanzen, die nicht weiter untersucht und identifiziert wurden, inhibiert und dadurch die Zunahme des pH-Wertes im Medium bedingt. Zu einer Erhöhung des pH-Wertes in Pilzen unter Schwermetallstress liegen in der Literatur keine Befunde vor.

Da keine Ansäuerung des Mediums unter Metallstress vorlag ist anzunehmen, dass *H. lugdunensis* nicht mit der Freisetzung von Säuren zur Präzipitierung und Komplexierung von Schwermetallionen reagiert.

#### 4.5.3 Einfluss der Temperatur auf die Biosorption und Akkumulation

Physikalisch betrachtet ist die Biosorption, eine Form der Adsorption, von der Temperatur abhängig. In der Literatur sind sowohl temperaturunabhängige wie auch temperaturabhängige Biosorptions- und Akkumulationsvorgänge an pilzlichen Organismen beschrieben worden (Blackwell et al., 1995; Singleton und Tobin, 1996). Für *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 konnte bei einer 25 µM und 50 µM Cd(II)-Belastung eine Abhängigkeit der Biosorption und Akkumulation von der Anzuchtstemperatur (3.7.3) gezeigt werden. Für beide Stämme betrug die Biosorption bei 14 °C nur ca. die Hälfte im Vergleich zu 10 °C.

Adsorption und Desorption stellen ein Gleichgewicht dar, dessen Lage von der Temperatur abhängig ist. Nach dem *Le Chatelierschen* Prinzip für exotherme Vorgänge muss mit steigender Temperatur die Adsorption abnehmen. Dieses Prinzip, was Freundlich und Langmuir als

Grundlage ihrer Untersuchungen nutzen, wird auch an *H. lugdunensis* (beide Stämmen) bestätigt. Bei 14 °C zeigen sie eine geringere Biosorption als bei 10 °C. Auch Mameri et al. (1999) fanden eine Abnahme der Biosorption von Zn(II) durch *Streptomyces rimosus* mit Zunahme der Temperatur.

Ahuja et al. (1999) beobachteten in ihrer Arbeit zur Biosorption von Zn(II) an dem Cyanobakterium *O. angustissima* keine Temperaturabhängigkeit im Bereich von 25-45 °C. Dazu gibt es zwei Bemerkungen. Der Temperaturbereich könnte für solche Untersuchungen zu hoch angesetzt sein. Außerdem bestimmen die Autoren nur den Zn(II)-Gehalt im Medium und schließen daraus auf die aufgenommene Schwermetallmenge. Dabei berücksichtigen sie nicht, dass zwischen der intra- und extrazellulären Metallverteilung Unterschiede in Abhängigkeit von der Temperatur auftreten können.

Die Akkumulation, d.h. die Aufnahme der Metalle ins Zellinnere, ist ein energieabhängiger Prozess. Beiden *H. lugdunensis*-Stämme reagieren mit einer verstärkten, nicht signifikanten, Aufnahme von Cd(II) in das Zellinnere bei einer Temperaturerhöhung um 4°C. Dabei wird die Akkumulation durch die Temperatur weniger beeinflusst als die Biosorption. Jedoch kann bereits dieser kleine Anstieg der intrazellulären Konzentration Folgen haben, vor allem dann, wenn die toxische Dosis damit erreicht wird. Für beiden *Heliscus*-Stämme scheint dies nicht zu zutreffen, da ihre Biomasse und Vitalität durch den intrazellulären Anstieg der Cd(II)-Konzentration von 3,8 auf 5,2 µmol/g TM in H4-2-4 und 4,2 auf 5,9 µmol/g TM in H8-2-1 unter 50 µM Metallgabe nicht negativ beeinflusst werden (Tab. 14, Tab. 15).

In *Candida utilis* stieg die Akkumulation von Zn(II) nur unter Glucosezusatz in Abhängigkeit von der Temperatur kontinuierlich von 5 °C bis 37 °C signifikant an. Wurde keine Glucose zugesetzt, hatte die Temperatur keinen Einfluss auf die Aufnahmesteigerung (Failla et al., 1976). Die Autoren diskutieren, dass Glucose die energieabhängige Zn(II)-Aufnahme fördert und Aufnahmekapazität durch Temperaturerhöhung gesteigert wird. Die Basidiomyceten-Hefe *Rhodotorula rubra* nahm bei 37 °C mehr Cd(II) als bei 25 °C auf. Pb(II) jedoch wurde bei 25 °C besser aufgenommen (Salinas et al., 2000). Dabei betrachten die Autoren intra- und extrazellulären Schwermetallgehalt gleichzeitig, so dass nicht genau gesagt werden kann, ob die Temperaturerhöhung eine stärkere Bindung an die Zelloberfläche oder eine stärkere Aufnahme bedingt. Dadurch bleibt unklar, warum sich die beiden Metalle in *R. rubra* so unterschiedlich verhalten. Einen weiteren Einfluss der Temperatur auf die Akkumulation fanden Blaudez et al. (2000) für Cd(II) im Weißfäulepilz *P. involutus*. Sie beobachteten eine Absenkung der Cd(II)-Aufnahme in das Cytoplasma auf 27 % und in die Vakuole auf 10 %, wenn die Temperatur während der Aufnahmeexperimente auf 4 °C abgesenkt wurde.

Biosorption und Akkumulation von 25 und 50 µM Cd(II) in beiden *H. lugdunensis*-Stämmen werden durch die Temperatur erwartungsgemäß beeinflusst, wobei die Biosorption einer stärkeren Beeinflussung unterliegt. Die prozentuale Änderung der Biosorption von Cd(II) unter 10° C und 14° C bei H4-2-4 und H8-2-1 bleibt gleich. Die Akkumulation in H8-2-1 wird

hingegen stärker induziert als in H4-2-4 (Tab. 20). Dies stützt wieder die These, dass eine erhöhte Cd(II)-Aufnahme in H8-2-1 gegenüber H4-2-4 für die höhere Sensitivität des ersten Stammes verantwortlich sein könnte.

Bei einem Vergleich von Literaturdaten muss auch die Anzuchtstemperatur mit berücksichtigt werden, da sie einen erheblichen Einfluss auf Biosorption und Akkumulation haben kann.

## **4.6 Untersuchungen zum Thiolmetabolismus der *H. lugdunensis* Stämme H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II) und Zn(II)-Stress**

### **4.6.1 Beeinflussung des Sulfat-Gehaltes durch Cd(II) und Zn(II)**

Sulfat ist Ausgangsmetabolit des Schwefelstoffwechsels. Durch Sulfatassimilation und weiterer Reaktionen kommt es zur Synthese verschiedener Metabolite (Sulfid, Cystein,  $\gamma$ -Glutamylcystein, Glutathion), die in der Schwermetalldetoxifikation eine essentielle Rolle spielen. Über die Aufnahme und den Gehalt an Sulfat in Pilzen sowie dessen Beeinflussung durch Schwermetallbelastung ist im Gegensatz zum pflanzlichen System sehr wenig bekannt. Die Aufnahme von Sulfat in *S. cerevisiae* erfolgt als Protonensymport im Verhältnis 1:3 (Burgstaller, 1997) ähnlich wie für Pflanzen beschrieben (Hawkesford et al., 1993; Leustek und Saito, 1999). In *N. crassa* werden Permeasen für den Sulfat-Transport verantwortlich gemacht (Marzluf, 1997). Der intrazelluläre Gehalt an Sulfat in Pilzen bleibt jedoch ungeklärt. Für *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 lag der intrazelluläre Sulfatgehalt zwischen 9,2 und 16,6  $\mu\text{mol/g TM}$  und für H8-2-1 zwischen 20,2 und 21,7  $\mu\text{mol/g TM}$  in den Kontrollen der logarithmischen Phase. In der stationären Phase wiesen beide Stämme geringere Sulfatgehalte auf. Dies ist sicher auf einen Verbrauch zurückzuführen. Auch die Sulfatgehalte in den Medien nahmen ab, was darauf hin deutet, dass diese durch Sulfataufnahme durch die Hyphomyceten-Kulturen verarmt sind. Unter Schwermetallbelastung kommt es in *H. lugdunensis* zu einer Fluktuation des intrazellulären Sulfatgehaltes in Abhängigkeit von der Metallkonzentration. In beiden Stämmen wurde in der logarithmischen Phase bei 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  Cd(II)-Belastung ein Anstieg bestimmt. Bei höheren Konzentrationen und in der stationären Phase hingegen nimmt der Sulfatgehalt sofort ab. Der Anstieg bei niedrigeren Konzentrationen lässt einen schnelleren Influx von Sulfat als dessen Metabolisierung vermuten.

Eine gesteigerte Sulfataufnahme unter niedrigen Cd(II)-Konzentrationen (10  $\mu\text{M}$ ) konnte auch in Maiswurzeln beobachtet werden (Nocito et al., 2002). Die Autoren zeigen, dass die Aufnahme sowohl durch den hoch- als auch den niedrigaffinen Sulfattransporter, getrieben durch den elektrochemischen Protonengradienten, erfolgt.

Die Verringerung des Sulfatgehaltes in beiden *H. lugdunensis*-Stämmen als Ergebnis einer verringerten Aufnahme scheint nicht zwingend wahrscheinlich, da der Sulfatgehalt in den Medien kontinuierlich abnahm (Daten nicht gezeigt). Möglich ist, dass Cd(II) die Sulfatassimilation steigert, wie es auch Nussbaum et al. (1988) für Mais beschrieb. Auch für Zn(II) könnten ähnliche Mechanismen gültig sein.

Der schnelle intrazelluläre Verbrauch des anorganischen Sulfats lässt eine Metabolisierung in andere thiolhaltige Verbindungen vermuten. Dies konnte mit den Beobachtungen eines gesteigerten Cystein,  $\gamma$ -EC- und Glutathionpools bestätigt werden (siehe 4.6.2).

In dem Wassermoos *Fontinalis antipyretica* wurde eine Verringerung des Sulfatgehaltes nach 38tägiger Sulfatverarmung beobachtet. Unter Zugabe von 100  $\mu$ M Cd(II) kam es auf Grund einer gesteigerten GSH-Biosynthese zu einer weiteren Verringerung des Sulfatpools, der jedoch durch Sulfatzusatz im Medium regeneriert werden konnte (Sutter, 2000).

Es ist für Pflanzen bekannt, dass Glutathion als Feedback-Regler der Sulfataufnahme fungiert (Davidian et al., 2000). Es könnte für *H. lugdunensis* angenommen werden, dass durch den gesteigerten Glutathionpool die Sulfataufnahme verringert wird. Da die Kulturmedien jedoch an Sulfat verarmten scheint dies für *H. lugdunensis* nicht zu zutreffen.

Sulfatgabe (20 mM) in *H. lugdunensis*-Kulturen Stamm H4-2-4 führte zu einer Steigerung des Sulfatpools (Tab. 23, S. 71). Gleichzeitig wurde jedoch die Akkumulation von Cd(II) und Zn(II) verringert (Abb. 34, S. 72, Abb. 35, S. 73), so dass eine Aussage über Beeinflussung des Thiolpools (Cystein, GSH,  $\gamma$ -EC) unter Schwermetallstress erschwert wird.

Erstaunlich und nur mit der Möglichkeit von unterschiedlichen Regulationsprozessen zu erklären, sind die Differenzen der Sulfatgehalte der hier untersuchten Stämme in Abhängigkeit von der Zn(II)- oder Cd(II)-Belastung. Zn(II) in geringen Konzentrationen führt zu einer Aktivierung der Stoffwechselaktivität, gekoppelt mit einer schnellen Sulfatmetabolisierung und Abnahme des intrazellulären Sulfatgehaltes. Bei hohen Zn(II)-Konzentrationen (350  $\mu$ M) stieg der Sulfatgehalt in der stationären Phase in beiden Stämmen jedoch wieder an. Es wäre möglich, dass, wie es Hawkesford (2000) für Pflanzen zusammenfasst, eine Remobilisierung des vakuolären Sulfatpools durch drastische Herabsenkung des cytoplasmatischen Pools hervorgerufen wurde.

In der stationären Phasen wurde im Vergleich zur logarithmischen Phase in beiden *Heliscus*-Stämmen weniger Sulfat analysiert. Durch Metabolisierung des Sulfates kommt es zur Verringerung des Sulfatpools in den Zellen. Der Sulfatgehalt von 0,2  $\mu$ mol/mL im Medium reicht nicht aus um den Pool zu regenerieren.

Signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen H4-2-4 und H8-2-1 gibt es bereits in den Kontrollen, wobei H8-2-1 einen höheren Grundlevel an Sulfat aufweist als H4-2-4 aus dem belasteten Standort mit einer Sulfatkonzentrationen von 70 mM. Unter 25  $\mu$ M und 50  $\mu$ M Cd(II)-Belastung weist Stamm H8-2-1 ebenfalls höhere Sulfatkonzentrationen auf. In beiden Stämmen führt eine gesteigerte Schwermetallbelastung zu einer Verringerung des freien Sulfatpools in Abhängigkeit von der Konzentration und der Zeit.

Die Regulierung des Sulfatmetabolismus' in Abhängigkeit von Schwermetallen im Kulturmedium bleibt offen, zumal die Schwefelassimilation in Pilzen speziell in Hyphomyceten noch weitgehend ungeklärt ist. Bisher sind nur die z.T. differierenden Sulfatassimilationswege aus

*S. pombe*, *A. niger* und *S. cerevisiae* bekannt, die vom pflanzlichen System abweichen (Brzywczy et al., 2002; Marzluf, 1997).

#### 4.6.2 Beeinflussung des Cystein- und $\gamma$ -Glutamylcysteingehaltes durch Cd(II) und Zn(II)-Belastung

Ein Endprodukt der Sulfatassimilation ist Cystein. Es stellt zum einen eine Vorstufe des Glutathions dar, wirkt in vielen Proteinen als stabilisierende Komponente (Disulfidbrücken) und kann selbst, vor allem in Pflanzen an der Komplexbildung zur Schwermetalldetoxifikation, beteiligt sein (Dameron et al., 1989b; Oven et al., 2002a). Ein Anstieg des Cysteinpools, der ebenfalls eine Schwefelressource darstellt, wird auch unter Schwermetallstress beobachtet (Miersch et al., 2001).

In Tab. 28 sind alle Thiolgehalte der *H. lugdunensis*-Stämme unter unbelasteten Bedingungen zusammenfassend dargestellt. Dabei wurden die Kontrollwerte der Zn(II)- wie auch der Cd(II)-Versuche gemittelt, um mögliche Differenzen durch jahreszeitliche Schwankungen zu minimieren (s. auch Anhang A).

**Tab. 28** Thiolgehalte (Mittelwerte) in den Kontrollen der *H. lugdunensis*- Stämme H4-2-4 und H8-2-1 [ $\mu\text{mol/g TM}$ ]

H4-2-4				H8-2-1			
Cystein	$\gamma$ -EC	GSH	GSSG	Cvstein	$\gamma$ -EC	GSH	GSSG
Logarithmische Phase				Logarithmische Phase			
0,366	0,108	7,46	0,301	0,425	0,129	7,34	0,363
Stationäre Phase				Stationäre Phase			
0,215	0,137	7,52	0,213	0,309	0,119	8,28	0,235

Die Verringerung des Sulfatgehaltes unter Schwermetallstress in *H. lugdunensis* ließ vermuten, dass durch dessen Verbrauch Thiole, darunter Cystein, in ihrer Bildung induziert werden. Ein bemerkenswerter Anstieg des Cysteinpools bestätigte diese Vermutung. Für den Stamm H4-2-4 wurden unter Cd(II)-Belastung Anstiege bis 550 % beobachtet, für den Stamm H8-2-1 sogar bis 650 %. Auch unter Zn(II)-Belastung waren die Anstiege um bis zu 870 % bzw. 220 % enorm. Für Cd(II) werden solche Befunde in der Literatur ebenfalls beschrieben. So fanden Miersch et al. (2001) am Zygomyceten *M. racemosus* auch eine Induktion des freien Cysteins unter Cd(II)-Stress (100  $\mu\text{M}$ ) jedoch nicht unter Zn(II)-Belastung.

Auch Mais reagiert unter geringer Cd(II)-Belastung (10  $\mu\text{M}$ ) mit einem Anstieg um 25 % (24 h) bzw. 50 % (48 h) wobei die Unterschiede in der Inkubationsdauer dabei nicht sehr deutlich werden (Nocito et al., 2002).

Für *H. lugdunensis* wurde hingegen ähnlich wie beim Sulfat und den weiteren hier untersuchten Thiolen ( $\gamma$ -EC, Glutathion) in beiden Stämmen in der stationären Phase weniger Cystein gefunden. Dies lässt auf eine schnelle Umsetzung der freien Poole schließen. Miersch et al.

(2001) fanden am Zygomyceten *M. racemosus* ebenfalls, dass mit zunehmender Inkubationszeit der Thiolpool, hier Cystein, abnahm.

Oven et al. (2002a) beobachteten bei den Pflanzen *Crotalaria cobalticola*, *R. serpentina* und *Silene cucubalus* ebenfalls einen signifikanten Anstieg des Cysteingehaltes jedoch nicht des GSH oder Phytochelatingehaltes unter Kobaltstress. In der Gelpermeationschromatographie kam es zur Koelution von Kobalt and Cystein in den Zellextrakten. Dies ließ die Autoren vermuten, dass freies Cystein ebenfalls an der Schwermetallkomplexierung beteiligt ist. Auch bei *H. lugdunensis* wurde nach der Gelpermeation (4.6.5) der Cysteingehalt in den einzelnen Fraktionen untersucht. Es wurden jedoch keine signifikanten Konzentrationen in den Cd(II)-haltigen Fraktionen gefunden, die auf eine Beteiligung des Cysteins an der Schwermetallkomplexierung schließen lassen.

Die Regulierung der Cysteinsynthese in Hyphomyceten ist bisher noch ungeklärt. Für *A. nidulans*, *S. pombe* und *S. cerevisiae* sind 3 verschiedene Synthesewege bekannt (Brzywczy et al., 2002; Marzluf, 1997). Für *H. lugdunensis* ist unbekannt, auf welchem Weg Cystein synthetisiert wird.

Das Dipeptid  $\gamma$ -Glutamylcystein nimmt im Thiolpool von *H. lugdunensis* den geringsten Anteil ein (Tab. 28). Es ist Präkursor für Glutathion und möglicherweise auch zu einem geringen Teil aufgrund seiner Struktur an der Schwermetallkomplexierung beteiligt, wie es Dameron et al. (1989b) in *C. glabrata* fanden.

Unter Cd(II)-Stress konnte in *H. lugdunensis* ein großer Anstieg des  $\gamma$ -EC-Gehaltes bestimmt werden. In der logarithmischen Phase betrug er für H4-2-4 das 20fache und für H8-2-1 das 12fache der Kontrolle. In der stationären Phase lagen die  $\gamma$ -EC-Gehalte beider Stämmen darunter.

Auch im pflanzlichen System (Mais) konnte unter 10  $\mu$ M-Cd(II) eine Erhöhung des  $\gamma$ -EC-Gehaltes um 70 % (24h) bzw. 86 % (48 h) bestimmt werden (Nocito et al., 2002). Hierbei wird deutlich, dass  $\gamma$ -EC im Gegensatz zum Cystein in höherem Ausmaß unter Cd(II)-Stress induziert wurde. Trotzdem lag der  $\gamma$ -EC-Pool auch in Mais unter dem des Cysteins, was offensichtlich einen sehr dynamischen Pool darstellt.

Wie beim Cystein lag der  $\gamma$ -EC-Gehalt in den belasteten Proben, vor allem in der logarithmischen Phase im Stamm H4-2-4 über dem des Stammes H8-2-1, obwohl der intrazelluläre Metallgehalt im Stamm H4-2-4 durchschnittlich niedriger war (Abb. 19, S. 49). Auch waren in H4-2-4 bereits bei geringeren Metallkonzentrationen signifikante Anstiege zu verzeichnen. Dies gilt sowohl für die Cd(II)-, wie auch die Zn(II)-Belastung.

Unter Zn(II)-Stress wird deutlich, dass die Regulation der Cystein- und  $\gamma$ -EC-Synthese nacheinander erfolgen. So wird durch 100  $\mu$ M Zn(II) in H4-2-4 in der logarithmischen Phase der Cysteingehalt signifikant gesteigert, der  $\gamma$ -EC-Gehalt jedoch noch nicht. Dies geschieht hier erst

ab 250  $\mu\text{M}$  Zn(II). Die gleiche Tendenz ist in H8-2-1 zu beobachten, jedoch sind die Werte für diese Konzentrationen nicht signifikant.

Die Anstiege des Cysteingehaltes und des  $\gamma\text{-EC}$ -Gehaltes sind prozentual stärker ausgeprägt als der Anstieg des Glutathions. Cystein und  $\gamma\text{-EC}$  liegen jedoch in viel geringerer Konzentration in den Pilzzellen vor (s. auch Tab. 28), was auf einen höheren *turn over* schließen lässt.

Der intrazelluläre GSH-Pool in *H. lugdunensis* liegt mit 5,4-9,4  $\mu\text{mol/g}$  TM deutlich über dem des Cysteins und  $\gamma\text{-EC}$ 's. Im Vergleich mit pflanzlichen und pilzlichen Systemen liegt er im mittleren bis oberen Bereich. So zeigen z.B. Erbsenkeimlinge einen Gehalt von 3-6  $\mu\text{mol/g}$  TM (Tommasi et al., 2001), *Hordeum vulgare* (Blätter) ca. 3  $\mu\text{mol/g}$  TM (Patra und Panda, 1998), *Populus tremula* (Blätter) 2-4  $\mu\text{mol/g}$  TM (Strohm et al., 1995), *S. cerevisiae* (Wildtyp 1278b) 7  $\mu\text{mol/g}$  TM (Penninckx, 2000), *Articulospora tetracladia* ca. 1  $\mu\text{mol/g}$  TM und *M. racemosus* ca. 2,5  $\mu\text{mol/g}$  TM (Miersch et al., 2001). Der GSH-Gehalt ist abhängig von den Anzuchtbedingungen, dem Kulturalter und dem jeweiligen Organen (bei Pflanzen).

Unter Einfluss von Schwermetallen und anderen Stresssituationen, z.B. oxidativer oder xenobiotischer Stress, wird für viele pilzliche Organismen ein Anstieg des Glutathionspiegels beschrieben (Emri et al., 1997; Penninckx und Elskens, 1993). So konnte bereits für den aquatischen Hyphomyceten *H. lugdunensis* ein Anstieg des Glutathions unter Cd(II)-Belastung gezeigt werden (Jaeckel, 2002; Miersch et al., 1997; Pierau, 1999). Dabei ist der Anstieg eine Funktion der angebotenen Schwermetallmenge und damit verbunden deren intrazellulärer Konzentration. Die GSH-Anstiege unter den maximal untersuchten Schwermetallkonzentrationen [100 $\mu\text{M}$  bzw. 200  $\mu\text{M}$  Cd(II)] in den Arbeiten von Jaeckel (2002) und Miersch (1997) bei unterschiedlichen *Heliscus*-Stämmen liegen im Bereich des 2-3fachen.

Für die beiden Stämme H4-2-1 und H8-2-1 konnten ebenfalls Werte in diesem Bereich bestimmt werden, obwohl die Anzuchtbedingungen zu den Arbeiten von Jaeckel (2002) und Miersch (1997) variierten. Für H4-2-4 wurde bis 150  $\mu\text{M}$  Cd(II) ein linearer Anstieg des GSH in der logarithmischen Phase um das 2,4fache und für H8-2-1 um das 3fache bestimmt (Abb. 23, S. 57). Auch für weitere AQH konnte eine Erhöhung des Glutathionspiegels beobachtet werden. So stieg der GSH-Gehalt in *A. tetracladia* Stamm BB linear bis 25  $\mu\text{M}$  Cd(II) auf das Doppelte an (Miersch et al., 2001).

Die Ergebnisse für *H. lugdunensis* deuten auf eine Involvierung des Glutathions in der Cd(II)-Detoxifizierung hin. Unklar bleibt vorerst, ob die hier beobachteten Anstiege durch oxidativen Stress in der Zelle bedingt werden, wobei Glutathion eine Rolle der Radikalbeseitigung zukommen würde (Grant et al., 1996), oder ob GSH selbst eine Rolle bei der Komplexbildung spielen könnte.

In *S. cerevisiae* wurde die GSH-Synthese unter 1 mM Cd(II) um das 4fache gesteigert. Die Autoren schlussfolgerten, dass GSH primär eine Funktion als Komplexbildner zukommt (Vido et al., 2001).

Die Untersuchungen der Cd(II) exponierten Extrakte aus *H. lugdunensis* mittels Gelpermeation an einer Superdex-peptide-Säule und anschließender Untersuchung der einzelnen Fraktionen ergab, dass ein Großteil des Cd(II) mit Glutathion coeluierte (Abb. 32, S. 68). Dies ist ein erster Hinweis, dass Glutathion direkt bei der Schwermetallkomplexierung in *H. lugdunensis* eine Rolle spielen könnte. Der Nachweis eines GSH-Cd-Komplexes *in vitro* mittels Massenspektrometrie gelang bis jetzt für *H. lugdunensis* noch nicht. Dameron et al. (1989b) vermuteten in *C. glabrata*, dass Cd(II) in Verbindung mit Sulfid durch GSH und  $\gamma$ -EC komplexiert werden kann, wobei auch hier keine massenspektroskopischen Daten vorliegen. Ob Cd(II) in *C. glabrata* von GSH und  $\gamma$ -EC oder Phytochelatinen komplexiert wird, hängt vom Alter und der Dauer der Metallexposition ab (Dameron et al., 1989b).

Li et al. (1997) berichteten, dass der von ihnen entdeckte Glutathion-S-Konjugat-Transporter YCF1 in *S. cerevisiae* ebenfalls in den Transport von Cd(II) in Verbindung mit Glutathion in die Vakuole beteiligt ist. Dazu stellten sie künstlich einen Cd-GS<sub>2</sub>-Komplex her und untersuchten dessen Transport in isolierte Vakuolen. Auch Barbas et al. (1992) zeigten, dass GSH eine wichtige Rolle in der Cd(II)-Komplexierung in *C. glabrata* spielt, wobei sie außerdem die Bedeutung des Sulfids hinwiesen (s. 4.6.3). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass GSH vor allem in Organismen, die nicht über die Fähigkeit der Phytochelatin- oder Metallothioneinbildung verfügen, eine Rolle in der Metallkomplexierung spielt. Aber auch Organismen, die dazu in der Lage sind (z.B. *S. pombe*, *C. glabrata*), bilden Metallkomplexe, die neben Phytochelatinen und Sulfid GSH enthalten.

In der Literatur wird viel über die Induktion von GSH durch Schwermetalle berichtet. Dabei wird häufig gezeigt, dass essentielle Metalle wie Cu(II) oder Zn(II) keinen Einfluss auf den Glutathionpool haben. Möglicherweise ist jedoch die eingesetzte Metallkonzentration zu gering. Für einige pflanzliche Vertreter, z.B. *Dunaliella tertiolecta* (Grünalge) oder *Rauwolfia serpentina*, wird eine Abnahme des Glutathionpools unter Zn(II)-Exposition beschrieben, da sie mit einer Phytochelatininduktion einhergeht (Tsuji et al., 2003; Zenk, 1996). Im tierischen System (Maus) wird ebenfalls eine Zn(II)-Komplexierung durch GSH beschrieben (Andrews, 2001). Zur Beeinflussung der GSH-Synthese durch Zn(II) in Hefen und Pilzen ist jedoch wenig bekannt (Hayashi et al., 1992; Miersch et al., 1997).

In *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 wird mit zunehmender Zn(II)-Konzentration ein erhöhter intrazellulärer GSH-Pool messbar. Dabei ist der Anstieg in der logarithmischen Phase erst ab 250  $\mu$ M, in der stationären Phase erst ab 350  $\mu$ M signifikant (Abb. 23, S. 57).

Die intrazellulären Zn(II)-Gehalte bei diesen Konzentrationen (Abb. 19, S. 49) in beiden Stämmen korrelieren mit den GSH-Gehalten insofern, dass H8-2-1 höhere intrazelluläre Zn(II)-Gehalte aufweist. Im Gegensatz zur Cd(II)-Belastung, wo bis zu einer Konzentration von 100  $\mu$ M in der logarithmischen Phase in H4-2-4 mehr GSH gebildet wurde, zeigte H8-2-1 bei höheren Zn(II)-Konzentrationen einen signifikant höheren GSH-Gehalt. Dass H8-2-1 bei 250  $\mu$ M Zn(II) mehr GSH als H4-2-4 aufwies, konnte bereits Groß (2000) zeigen. Dies lässt

vermuten, dass beide Stämme unterschiedliche Mechanismen bezüglich der Cd(II)- und Zn(II)-Detoxifikation, in denen Glutathion involviert ist, entwickelt haben.

*H. lugdunensis* Stamm BB zeigte ebenfalls einen, wenn auch nicht signifikanten, geringen Anstieg des GSH-Pools unter Zn(II)-Belastung (Miersch et al., 1997). Dabei wurden jedoch nur Konzentrationen bis 200  $\mu$ M in der stationären Phase betrachtet. Die Inkubation bis in die stationäre Phase könnte den unveränderten GSH-Gehalt von *A. tetracladia* unter Zn(II)-Belastung begründen (Miersch et al., 2001).

Ob GSH in der direkten Komplexierung von Zn(II) involviert ist oder ob der Anstieg eine Folge des veränderten Redoxstatus der Zellen ist, bleibt unklar. Um dies zu klären, wären weitere Versuche, beispielsweise die Gelpermeation von GSH-Zn-Komplexen oder EDX-Untersuchungen mittels analytischer Elektronenmikroskopie notwendig.

Es ist bemerkenswert, dass der intrazelluläre Glutathiongehalt sowohl unter Cd(II) als auch unter Zn(II)-Belastung, wie bereits bei Cystein und  $\gamma$ -EC beschrieben, in der stationären Phase geringer ist als in der logarithmischen Phase. Diese Erkenntnisse sind nicht neu. Auch Jaeckel (2002) machte die Beobachtung, dass der GSH-Gehalt unter Cd(II)-Gabe in *H. lugdunensis* mit der Zeit wieder abnimmt. Für *C. glabrata* wurde gezeigt, dass 500  $\mu$ M Cd(II) zu einem GSH Anstieg in der Zelle führte. Dabei betrug die Stimulierung fast das 6fache in Kulturen isoliert in der mittleren logarithmischen Phase und weniger als das 3fache in Kulturen aus der stationären Phase (Barbas et al., 1992). Auch für Pflanzen (*Phaseolus vulgaris*) konnte eine Abnahme des GSH (und Cysteins sowie  $\gamma$ -EC) mit dem Kulturalter bestimmt werden (Matamoros et al., 1999). Es ist möglich, dass GSH nach dem Transport des Metalls in den Vakuolen abgebaut wird, wobei Cd(II) und Zn(II) dann an Ionen in der Vakuole komplexiert werden müssten. Denkbar wäre die Komplexierung an Polyphosphate, wie sie z.B. bei dem Moos *Fontinalis antipyretica* gefunden wurde (Bruns et al., 2001; Sutter, 2000).

Wenn *S. cerevisiae* völlig ohne extrazelluläre Schwefelgabe, die zu einer Mangelversorgung an Sulfat führt, angezogen wird, scheint GSH als endogene Schwefelquelle fungieren zu können. Dies kann bis zu einer Konzentrationverringerung von 10 % des Ausgangs-GSH-Gehaltes führen (Elskens et al., 1991; Penninckx, 2002). In beiden *H. lugdunensis* Stämmen wird deutlich, dass vor allem bei hohen Cd(II)-Konzentrationen und in den stationären Phasen ein Mangel in der Schwefel- bzw. Sulfatversorgung herrscht (Abb. 20, S. 52). Daraus kann vermutet werden, dass auch in *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 GSH teilweise eine Rolle als endogener Schwefeldonor spielen könnte.

Nicht nur der GSH-Gehalt sondern auch der GSSG-Gehalt, der nur einen geringen Anteil des Glutathions ausmacht, und vor allem das Verhältnis beider spiegelt den Redoxstatus einer Zelle wider. Dabei ist bekannt, dass auch Metalle, vor allem toxische und essentielle in hohen Dosen oxidativen Stress in den Zellen auslösen können. Unter diesem Stress kann der Glutathion-

Redoxstatus zur oxidierten Form, in Folge einer gesteigerten GSH-Oxidation und/oder verringerten GSSG-Reduktion mittels Glutathionreduktase, verschoben werden (Noctor et al., 2002; Penninckx und Elskens, 1993).

In unbelasteten *H. lugdunensis* Proben betrug das Verhältnis von GSH:GSSG in der logarithmischen Phase für H4-2-4 20-29 und für H8-2-1 18-25 und in der stationären Phase 34-36 bzw. 31,5-39 (Tab. 21). Deutlich wird, dass das durchschnittliche Verhältnis in der stationären Phase über dem in der logarithmischen Phase liegt. Bei einer Veränderung des oxidativen Status' müsste jedoch das umgekehrte Verhältnis beobachtet werden.

Die GSH:GSSG-Verhältnisse für *H. lugdunensis* korrelieren näherungsweise mit Literaturangaben. Penninckx und Elskens (1993) geben für Mikroorganismen allgemein einen Wert von ca. 50 an, für *S. cerevisiae* wurden Verhältnisse von 45 (Penninckx, 2000) bis 150 (Grant et al., 1998) gefunden, Emri et al. (1997) zeigten für *P. chrysogenum* einen Wert von 13 und in *M. racemosus* sind es 33,5-59 (Miersch et al., 2001). In der Grünalge *Scenedesmus acutus f. alternans* wurde hingegen nur ein GSH:GSSG-Verhältnis von 2 bestimmt (Randhawa et al., 2001). Dabei sind die Verhältnisse von der Anzucht, vom jeweiligen Organismus und äußeren Einflüssen abhängig.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Anstieg des GSSG-Gehaltes in beiden Pilzstämmen sowohl unter Cd(II) als auch unter Zn(II) nachgewiesen werden. Dabei fällt auf, dass der GSSG-Anteil unter Cd(II)-Stress erst ab 50  $\mu\text{M}$  deutlich und ab 100  $\mu\text{M}$  signifikant ansteigt (Abb. 24, S. 58). Der GSH-Pool reagierte bereits bei 25  $\mu\text{M}$ . Dabei treten nur geringe Stammunterschiede auf. So reagiert H8-2-1 in der logarithmischen Phase stärker, in der stationären Phase jedoch geringer als H4-2-4. Bei beiden Stämmen wird in der stationären Phase weniger GSSG messbar. Für beide Stämme stieg das GSH:GSSG-Verhältnis mit einer Cd(II)-Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  und sank dann kontinuierlich ab (Tab. 21). Dabei lagen die Verhältnisse für den Stamm H4-2-4 bei 150  $\mu\text{M}$  Cd(II) deutlich unter dem der Kontrolle. In H8-2-1 erreichten sie die Kontrollwerte.

Unter Zn(II)-Belastung war im Gegensatz zum GSH bereits bei 100  $\mu\text{M}$  ein GSSG-Anstieg in der logarithmischen Phase zu beobachten, in der stationären Phase ab 250  $\mu\text{M}$ . Das GSH-GSSG-Verhältnis sank mit zunehmender Konzentration kontinuierlich, wobei es im Stamm H8-2-1 bei 350  $\mu\text{M}$  wieder leicht anstieg. Das ist ein deutlicher Gegensatz zum Cd(II).

Die Beeinflussung der Redoxzustände hängt sehr vom Organismus und vom Stresszustand ab. Wird der oxidative Status verschoben kommt es zu einer Abnahme des GSH-GSSG-Verhältnis', wie es Emri et al. (1997) für *P. chrysogenum* und Grant et al. (1998) für *S. cerevisiae* mit zunehmender Peroxidkonzentration im Medium zeigten.

Unter Schwermetallstress werden hingegen sehr unterschiedliche Ergebnisse berichtet. In *P. involutus* änderte sich der Redoxstatus nicht signifikant als Antwort auf Cd(II)-Stress. Die GSSG-Konzentration blieb hier bis 500  $\mu\text{M}$  nahezu mit 37 % des Gesamtglutathions konstant (Ott et al., 2002). In der Grünalge *Scenedesmus acutus f. alternans* stieg das GSH:GSSG-Verhältnis im Ni(II)-resistenten Stamm an. Im Ni(II)-sensitiven Stamm sank es jedoch mit

zunehmender Konzentration ab (Randhawa et al., 2001). Die Autoren versuchen, den Unterschied mit unterschiedlichen GSSG-Reduktase-Aktivitäten zu erklären. Dabei zeigte der resistente Stamm eine viel höhere Enzymaktivität, was zur Erhaltung eines hohen GSH-Levels und GSH:GSSG-Verhältnisses führt. Dies kann möglicherweise auch für *H. lugdunensis* eine Rolle spielen. Der Stamm H8-2-1 zeigte durchschnittlich eine geringere Abnahme des Verhältnisses als der resistenter Stamm H4-2-4. In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass H8-2-1 (unter Anzuchtstemperaturen von 10 °C) eine 2fach höhere GSSG-Reduktase-Aktivität aufwies als H4-2-4, der in der vorliegenden Arbeit als toleranter erscheint (Braha et al., 2004). Eine verringerte GSSG-Reduktase-Aktivität unter Metallstress sollte sich in einem gesteigerten GSSG-Gehalt in der Zelle äußern. Dies konnte für *H. lugdunensis* bestätigt werden (Braha et al., 2004).

Neben den Stammunterschieden fällt vor allem das unterschiedliche Verhalten beider Pilze in Bezug auf den Schwermetallstress auf. Steigt unter Cd(II) das GSH:GSSG-Verhältnis zuerst einmal an, nimmt es unter Zn(II) kontinuierlich ab. Letzteres spricht für eine Reaktion infolge von oxidativem Stress in den Zellen, möglicherweise durch Freisetzung freier reaktiver Sauerstoffspezies.

Der Anstieg des GSH:GSSG-Verhältnisses unter Cd(II) hingegen, kann als zweiter Hinweis (neben den Ergebnissen der Gelpermeation, siehe Abb. 32, S. 68 und Kapitel 4.6.5) gedeutet werden, dass GSH in *H. lugdunensis* an der Komplexierung von Cd(II) als Detoxifikationsmechanismus beteiligt ist. Wird GSH aus dem Glutathionkreislauf entzogen, um an der Komplexierung von Metallen beteiligt zu sein, verändert sich das Verhältnis nur geringfügig oder steigt an.

#### 4.6.2.1 Einfluss der Temperatur auf den Thiolpool (GSH, GSSG, Cystein, g-EC) der *H. lugdunensis*-Stämme H4-2-4 und H8-2-1

Da beide Stämme bei einer Anzuchtstemperatur von 10 °C gegenüber 14 °C ein vermindertes Wachstum (Abb. 13) und eine reduzierte intrazelluläre Aufnahme von Cd(II) zeigten (Tab. 20), wurde auch der Thiolpool betrachtet. Es zeigte sich, dass eine um 4 °C erhöhte Anzuchtstemperaturen eine Steigerung des Thiolpools bewirkte. Wahrscheinlich ist das eine Folge der allgemeinen Steigerung der Stoffwechselaktivität bei höheren Temperaturen. Die prozentualen Änderungen der Thiol-Gehalte unter Cd(II)-Belastung zeigten in beiden Stämmen die Tendenz, dass sie bei 14 °C etwas anstiegen (Ausnahme: H4-2-4; Cystein). Dabei ist die Temperatur als Stressfaktor, der zu einer Erhöhung des GSH-Pools führt wie es z.B. Kocsy et al. (2000) für Weizen diskutieren, in diesem Bereich unwahrscheinlich.

Die GSH:GSSG-Verhältnisse bleiben bei beiden Anzuchtstemperaturen in H4-2-4 in der Kontrolle und bei moderater Metallbelastung fast gleich. Sie verschieben sich erst bei 50 µM Cd(II). In H8-2-1 ist das Verhältnis in der Kontrolle und unter 25 µM und 50 µM Cd(II)-

Gabe bei einer Anzuchtstemperatur von 10 °C höher, was als Stammunterschied festgestellt werden muss, jedoch vorerst nicht erklärt werden kann.

Es ist anzunehmen, dass der geringere intrazelluläre Cd(II)-Gehalt bei 10 °C (Tab. 20) ebenfalls einen Einfluss auf den Anstieg des Thiolpools hat. Dies könnte die geringeren prozentualen Steigerungen von GSH, GSSG, Cystein (nicht in H4-2-4) und  $\gamma$ -EC bei 10 °C im Gegensatz zu 14 °C erklären.

Es wird deutlich, dass eine Einschätzung der Thiolgehalte nur sinnvoll ist, wenn eine Aussage über intrazelluläre Metallgehalte getroffen werden kann.

#### 4.6.2.2 Beeinflussung der Glutathion-Synthetase-Expression in *H. lugdunensis*

Glutathion wird in zwei ATP-abhängigen Schritten aus Glutamat, Cystein und Glycin synthetisiert. Im ersten Schritt wird aus Glutamat und Cystein  $\gamma$ -EC durch die  $\gamma$ -EC-Synthetase ( $\gamma$ -EC-S) gebildet. Im zweiten Schritt wird durch die Glutathion-Synthetase (GSH-S)  $\gamma$ -EC und Glycins legiert (Meister, 1989).

Biochemisch konnte gezeigt werden, dass die Glutathionsynthese unter Cd(II)- und Zn(II)-Belastung in *H. lugdunensis* induziert wird. Dabei stellte sich die Frage, ob dies auf transkriptionaler Ebene oder über Enzymaktivitäten reguliert wird.

Durch die geringen Sequenzhomologien im Pilzreich gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht, für die  $\gamma$ -EC-Synthetase Sequenzinformationen für *H. lugdunensis* zu erlangen.

Für die GSH-Synthetase, die für eine Reihe von Organismen isoliert und charakterisiert worden ist (Meister, 1989), konnte jedoch erstmals mit dem 785 bp-Fragment neben der 18S rDNA in diesem aquatischen Hyphomyceten eine Sequenzinformation gewonnen werden.

Tierische und pflanzliche GSH-S zeigen untereinander geringe Homologien in ihren Gensequenzen, was die Suche einer Gensequenz in *H. lugdunensis* erschwerte.

Über die transkriptionale und translationale Regulation dieses Enzyms ist auch in anderen Organismen relativ wenig bekannt. Noctor et al. (1998) fassen zusammen, dass Mais und Tomatenzellen nach Cd(II)-Exposition neben einem erhöhten GSH-Spiegel auch eine erhöhte extrahierbare GSH-Synthetase-Aktivität aufwiesen. Diese Anstiege reflektieren vermutlich steigende *de novo* Synthesen der GSH-Synthetase, wobei eine Beeinflussung auf post-translationaler Ebene nicht ausgeschlossen werden kann.

Für *H. lugdunensis* interessierte, ob eine Regulation auf Genebene durch die untersuchten Metalle Cd(II) und Zn(II) stattfindet. Wurde *H. lugdunensis* in Gegenwart der Metalle angezogen, kam es zu einer transienten Transkriptakkumulation in beiden Stämmen (Abb. 25, S. 62). Dabei war die Induktion der Banden in H4-2-4 und H8-2-1 bei 50  $\mu$ M Cd(II) ähnlich und steigerte sich bei 150  $\mu$ M deutlich. Dabei scheint H4-2-4 aus dem belasteten Standort einen höheren Transkriptlevel aufzuweisen. Auch Zn(II) induzierte deutlich die Transkription des GSH-Synthetase-Gens in den *Heliscus*-Stämmen.

In *Arabidopsis thaliana* wurde dies nicht gefunden (Xiang und Oliver, 1998). Die Autoren setzen jedoch alle Metalle, sowohl essentielle als auch nichtessentielle, in der gleichen Konzentration ein. Das lässt den Schluss zu, dass der intrazelluläre Zn(II)-Gehalt möglicherweise nicht die für die Pflanze toxischen Konzentrationen erreichte und auf Grund dessen zu keiner Induktion des GSH-Synthetase-Gens führte.

Fütterungsexperimente in *A. thaliana* ergaben, dass die Transkriptmenge des GSH-Synthetase-Gens unter Schwermetallexposition (und Jasmonat) gesteigert wurde, jedoch weder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als oxidativer Stress noch Glutathion in oxidierter und reduzierter Form zur Aktivierung dieses Gens (und der  $\gamma$ -EC-S sowie GSSG-Reduktase) führten, obwohl der intrazelluläre Glutathionpool unter diesen Bedingungen deutlich anstieg (Xiang und Oliver, 1998). Für den GSH-Anstieg unter oxidativem Stress muss demnach eine Regulation auf dem posttranskriptionalen Level oder der Translationsebene erfolgen.

Für beide *H. lugdunensis*-Stämme kann gezeigt werden, dass sowohl Cd(II) als auch Zn(II) einen positiven Einfluss auf die Transkriptakkumulation der GSH-Synthetase haben. Inwieweit eine Regulierung durch weitere Faktoren (oxidativer Stress etc.) erfolgt, muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

#### 4.6.3 Sulfidgehalte unter dem Einfluss der Cd(II) und Zn(II)-Belastung

Es ist bekannt, dass einige Hefen (Dameron et al., 1989a) und filamentöse Pilze (Ahmad et al., 2002) unter Cd(II)-Stress einen Anstieg des intra- oder extrazellulären Sulfidgehalts aufweisen. Auch im Pflanzenreich, z.B. *Phaeodactylum tricornutum* (Scarano und Morelli, 2003), *Brassica juncea* (Speiser et al., 1992a), *Silene vulgaris* (Kneer und Zenk, 1997) und *Euglena gracilis* (Weber et al., 1987) wird die Sulfidbildung als Reaktion auf Cd(II)-Stress beobachtet. Dabei spielt Sulfid sehr häufig in der Stabilisierung von Cd-PC-Komplexen eine entscheidende Rolle.

*H. lugdunensis* Proben wurden wässrig extrahiert und analysiert. Dabei wurde ein extrahierbarer Sulfidgehalt beobachtet, der unter Cd-Stress fast exponentiell anstieg. Welcher Sulfid-Syntheseweg in *H. lugdunensis* gegangen wird, um das Sulfid für die Komplexbildung bereit zu stellen, ist unklar. Möglich wäre die Bildung aus Cystein über Cystein-Sulfinat, integriert im Purinstoffwechsel, wie es einige Autoren für *S. pombe* beschreiben (Juang et al., 1993; Ow, 1996; Speiser et al., 1992b). Aber auch der direkte Syntheseweg über die Sulfatassimilation wie er für *C. glabrata* postuliert wird, ist möglich (Hunter und Mehra, 1998; Mehra et al., 1994). Dabei bleibt der Ort der Biosynthese im ersten Fall ungeklärt, wobei das Cytosol als Syntheseort möglich erscheint, da in *C. glabrata* CdS-Kristallite im Cytosol gebildet und dann in die Vakuole transportiert werden (Mehra et al., 1994). Im Gegensatz dazu steht, dass in *S. pombe* der Einbau des Sulfids in diese Aggregate erst in der Vakuole erfolgt (Cobbett, 2000b; Ortiz et al., 1992).

Der Anstieg des Sulfids in den *H. lugdunensis* Stämmen H4-2-4 und H8-2-1 betrug in beiden Stämmen und Phasen unter 150  $\mu$ M Cd(II)-Belastung mehr als das 10fache. Das liegt im Bereich

dessen, was Ow (1996) für *S. pombe* angibt (7fach für Kulturen im Vollmedium, noch stärkere Induktion in Mineralmedien). Dabei konnte für *H. lugdunensis* keine signifikante Abhängigkeit von der Wachstumsphase über den untersuchten Cd(II)-Konzentrationsbereich beobachtet werden (Abb. 26, S. 63). Jedoch war bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  in beiden Stämmen in der stationären Phase weniger Sulfid messbar als in der logarithmischen. Es ist bekannt, dass die Sulfidproduktion in *S. pombe* vom Alter der Kultur und dem Zeitpunkt der Schwermetallzugabe abhängig ist (Williams et al., 1996). Dabei wurde in der stationären Phase kaum eine Induktion der Sulfidbildung beobachtet, was die Ergebnisse für *H. lugdunensis* bis 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) unterstützen würde. Die umgekehrten Verhältnisse bei 150  $\mu\text{M}$  können vorerst nicht interpretiert werden, wobei die hohen Standardabweichungen jedoch nicht außer Acht gelassen werden dürfen.

Sulfid, obwohl Zellgift, scheint eine essentielle Rolle in der Schwermetallhomöostase zu spielen. So sind Mutanten von *C. glabrata*, die Sulfid hyperakkumulierenden, Cd(II) hypertolerant (Mehra et al., 1994). Auch von *S. pombe* existieren Sulfid hyperakkumulierende Mutanten, die Cd(II) resistenter erscheinen [Anmerkung in (Vande Weghe und Ow, 2001)]. Bemerkenswert in der vorliegenden Arbeit ist der höhere messbare Sulfidanteil im Stamm H4-2-4 gegenüber Stamm H8-2-1. Dies untermauert die in der Literatur gemachten Beobachtungen, dass tolerantere/resistentere Stämme oft mehr Sulfid aufweisen, als weniger tolerante.

Im Gegensatz dazu zeigen Mutanten von *S. pombe*, die aufgrund einer *hmt2*-Deletion das Protein HMT2, eine mitochondriale Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase, nicht funktionell bilden können und infolge dessen Sulfid hyperakkumulieren, eine Cd(II)-Sensitivität (Vande Weghe und Ow, 1999, 2001). Als mögliche Ursache vermuten die Autoren die Blockierung der Phytochelatinsynthese infolge der freien CdS-Präzipitierung. Dabei steht die Bildung von PC- und GSH-enthaltenden Komplexen ebenfalls im Mittelpunkt.

Gelpermeationsuntersuchungen (siehe 3.9) lieferten keine Hinweise zur Involvierung des Sulfids in die Bildung höhermolekularer Komplexe in *H. lugdunensis*. Sulfid konnte nur im Ausschlussvolumen der Gelpermeationssäule bestimmt werden (Daten nicht gezeigt), was auf eine Einbindung in sehr hochmolekulare Komplexe schließen lässt. Glutathion war in diesen Fraktionen nicht nachweisbar, so dass die Bildung von GSH-CdS-Komplexen in *H. lugdunensis* nicht bestätigt werden konnte. Dies bildet einen Angriffspunkt für weitere Analysen.

Da die intrazelluläre Bildung von CdS-Komplexen in *C. glabrata* (Dameron et al., 1989b) und *S. pombe* eine entscheidende Rolle in der Cd(II)-Detoxifizierung spielt, ist dies auch für *H. lugdunensis* denkbar. In welcher Form das Sulfid an der Komplexierung beteiligt ist, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

Die Beobachtung, dass mit zunehmender Zeit und Cd(II)-Konzentration auch im Medium der beiden *H. lugdunensis* Stämme H4-2-4 und H8-2-1 Sulfid messbar wird, ist nicht neu. So konnte im Medium von *Fusarium oxysporum*-Kulturen eine Gelbfärbung beobachtet werden, die infolge

von Cd(II)-Stress aus der Bildung von CdS-Nanopartikeln resultierte (Ahmad et al., 2002). Obwohl die Autoren die extrazelluläre Sulfatreduktion diskutieren, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Sulfid intrazellulär in Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration gebildet wird und dann einem Efflux unterliegt, der zur Präzipitierung des extrazellulären Cd(II) führt. Eine Bestimmung des intrazellulären Sulfidgehaltes erfolgte in *F. oxysporum* nicht. Dameron et al. (1989a) und Mehra et al. (1989a) berichteten ebenfalls, dass *S. pombe* und *C. glabrata* extrazelluläre CdS-Partikel nach Cd(II)-Belastung aufwiesen.

Auch Rother (2002) zeigte, dass in Standkulturen eines weiteren *H. lugdunensis* Stammes Cd(II)-Exposition zur Bildung von amorphen, kristallähnlichen Aggregaten führte, die in hohem Anteil Sulfid enthielten. Es ist denkbar, dass die Sauerstoffmangelversorgung hierbei eine bedeutende Rolle spielt.

In der vorliegenden Arbeit war in den Medien der Schüttelkulturen bei hohen Cd(II)-Konzentrationen extrazellulär Sulfid messbar, die Bildung von Aggregaten (siehe Abb. 27, S. 64) fand jedoch erst dann statt, wenn die Kulturen als Standkultur weitergeführt wurden. Ob *H. lugdunensis* über ein Sulfid-Efflux-System verfügt, kann nur spekuliert werden. Möglich ist auch die Freisetzung des Sulfids als Folge von Zellläsionen oder eines passiven Ausstromes, die dann indirekt zur Aggregatbildung führt.

Die Bildung und die Zusammensetzung vor allem intrazellulärer Komplexe in *C. glabrata* und *S. pombe* scheint von verschiedensten Faktoren, z.B. dem GSH/Cd(II)-, dem Cd(II)/S-Verhältnis oder dem pH-Wert abhängig zu sein (Bae und Mehra, 1998).

Ob der höhere Sulfidgehalt im Medium bei Belastung mit 150 µM Cd(II) in H4-2-4 Kulturen ( $1,49 \pm 0,50$  nmol/mL) im Gegensatz zu H8-2-1 ( $1,00 \pm 0,76$  nmol/mL) eine weitere Ursache für den Stammes- und Toleranzunterschied ist, kann nur vermutet werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Induktion der Sulfidbildung in *H. lugdunensis* nur unter Cd(II)-Stress beobachtet werden. Zn(II) hingegen hatte keinen Einfluss auf den Sulfidgehalt. Bae et al. (1997) zeigten *in vitro* die Bildung von Glutathion-ZnS-Komplexen. Ob diese Komplexe auch *in vivo* existieren oder von *H. lugdunensis* gebildet werden können, so wie es Reese und Winge (1988) für *S. pombe* vermuten, ist bisher noch unklar. Wie und in welcher Form die Sulfidbildung geregelt wird, ist auch in anderen Organismen (*S. pombe*, *C. glabrata*) noch weit von der Klärung entfernt (Vande Weghe und Ow, 2001).

#### 4.6.4 Weitere durch Schwermetall induzierbare Thiolverbindungen

Nach der Kultivierung von *H. lugdunensis* unter Cd(II)-Stress konnte die Induktion weiterer Ellman-positiver Verbindungen beobachtet werden (Abb. 28, S. 65). Neben Cystein, GSH und Sulfid wurden PC 2, auch als Cadystin bezeichnet, und Metallothioneine bestimmt.

Die Detoxifizierung von Metallionen durch Phytochelatine ist bei vielen Organismen ein bedeutender Metalltoleranzmechanismus, eingeschlossen Pflanzen, einige Pilze und Hefen.

PC 2 konnte in beiden *H. lugdunensis* Stämmen nachgewiesen werden (Anhang B Abb. 4), wobei bereits Jaeckel (2002) den massenspektroskopischen Nachweis für Stamm H8-2-1 erbrachte. Die Bildung von PC 2 ist konzentrationsabhängig. Es stellte sich die Frage, ob die Verringerung des GSH-Gehaltes in der stationären Phase mit einer PC 2-Synthese einher geht, wie es in der Literatur beschrieben wird (Zenk, 1996). Für beide *H. lugdunensis* Stämme zeigte sich jedoch, dass der PC 2-Gehalt in der stationären Wachstumsphase sich nicht vom PC 2-Gehalt in der logarithmischen Phase unterschied.

Mit der PC 2-Synthese erscheint eine weitere Möglichkeit der Schwermetallchelatierung von *H. lugdunensis* gegeben zu sein. Dabei erreicht der PC 2-Gehalt auch bei den höchsten Schwermetallbelastungen [ $150 \mu\text{M Cd(II)}$ ] jedoch nur 1/20-1/10 (H4-2-4, logarithmische bzw. stationäre Phase) und für H8-2-1 1/6 bzw. 1/5 des GSH-Gehaltes (Vergleich Anhang A Tab. 15 und Tab. 20).

Die Synthese von PC 2 in *H. lugdunensis* bleibt unklar. Der herkömmliche Syntheseweg aus GSH durch das Enzym Phytochelatinsynthase (PCS) (Cobbett und Goldsbrough, 2002) erscheint fraglich, da weder auf molekularer Ebene ein entsprechendes Genfragment identifiziert werden konnte, noch eine *in vitro* Aktivität des Enzyms nachweisbar war. Für eine *S. pombe* Mutante, defizient in der PC-Synthese, wird beschrieben, dass sie durch den Einbau des *gsh2* Gens für die Glutathionsynthetase, wieder die Fähigkeit zur PC-Synthese erlangte (Al-Lahham et al., 1999). Dies führte zur Spekulation, dass entweder die Glutathionsynthetase eine PC synthetisierende Aktivität aufweist, oder dass sie mit der PC-Synthese physisch verknüpft ist. Letztere Aussage wird durch den von Hayashi et al. (1991) postulierten alternativen Syntheseweg in *S. pombe* gestützt, wobei die PC-Biosynthese durch Polymerisierung von  $\gamma$ -EC-Einheiten und anschließender Addition von Glycin durch die Glutathionsynthetase erfolgen kann. Dieser Weg wurde von Grill et al. (1989) für *S. cucubalus* Zellkulturen jedoch ausgeschlossen.

In der Übersichtsliteratur zur Metallhomöostase und -detoxifizierung in Hefen und Pflanzen finden die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Obata wenig Beachtung. Die Autoren konnten jedoch massenspektroskopisch nachweisen, dass Carboxypeptidase Y *in vitro* neben einem Abbau des Glutathions auch zu einer Bildung von PC 2 und PC 3 (hier als Cadystine bezeichnet) führte (Imai et al., 1996). In späteren Arbeiten zeigten Tsuchisaka et al. (1999), dass neben Carboxypeptidase Y auch W und A die Fähigkeit zu PC 2-Synthese zeigen. Ein aus Reis isoliertes Carboxypeptidase-Gen, transformierten sie in *E. coli* und wiesen die *in vivo* PC 2-Syntheseaktivität der Carboxypeptidase nach. CPase-transformierte Tabakzellkulturen zeigten ebenfalls bei Zusatz von GSH zum zellfreien Extrakt und nach Inkubation unter  $100 \mu\text{M Cd(II)}$  eine PC 2-Syntheseaktivität. Außerdem waren diese Kulturen Cd(II) toleranter (Tsuchisaka et al., 2000).

Unklar bleibt, ob diese Carboxypeptidasen strukturelle Homologien zur Phytochelatin-Synthase oder GSH-Synthetase aufweisen, die ähnliche Aktivitäten erklären könnten. Man kann spekulieren, ob nicht vielleicht Carboxypeptidasen oder die GSH-Synthetase die Rolle der PC 2-

Synthese in *H. lugdunensis* wie auch in *S. cerevisiae* (Kneer et al., 1992), *Saccharomyces exiguus* THE1-16B, *Pichia farinosa*, *Torulaspora delbrueckii*, *Kluyveromyces lactis* und *Saccharomyces carlsbergensis*, die ebenfalls nur zur PC 2-Synthese befähigt sind (Inouhe et al., 1996), als Nebenreaktion übernehmen könnten.

Grill et al. (1989) zeigten, dass das PC-Synthesegen konstitutiv ist. Das Produkt konnte jedoch in Kontrollen beider *H. lugdunensis* Stämmen H4-2-4 und H8-2-1 nicht nachgewiesen werden, was ebenfalls einen anderen Syntheseweg vermuten lässt. Erst 25  $\mu\text{M}$  Cd(II) führen zu einer PC 2-Induktion, wobei H4-2-4 schneller und bis 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) deutlich stärker reagierte als H8-2-1. Bei einer Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  Cd(II) zeigte H8-2-1 eine viel stärkere Induktion (Abb. 29, S. 66). Dieser Stammunterschied ist möglicherweise eine Folge des höheren intrazellulären Cd(II)-Gehaltes (Abb. 19, S. 49). Bereits Jaeckel (2002) hat diese Tendenz beobachtet, wenn sie Cd(II) in der logarithmischen Phase zum Kulturansatz gab.

Es wird beschrieben, dass Phytochelatine vor allem in die Ausprägung von Komplexen involviert sind, wobei in *S. pombe* und *C. glabrata* PC 2 den Hauptteil einnimmt (Cobbett und Goldsbrough, 2000; Dameron et al., 1989a; Mehra et al., 1994). Es wird zwischen LMW (low molecular weight) und HMW (high molecular weight) Komplexen unterschieden, wobei die LMW-Fraktion PC und Cd(II) und die HMW-Fraktion zusätzlich Sulfid enthält (Cobbett und Goldsbrough, 2002). (Der Einfluss von Sulfid wurde bereits unter 4.6.3 diskutiert.) Diese Komplexe werden wie die Cd(II)/GSH-Komplexe in die Vakuole transportiert. Äquivalent zum YCF1-Transporter in *S. cerevisiae* werden Cd(II)/PC-Komplexe über den ABC-Typ-Transporter HMT1 in *S. pombe* transportiert (Ortiz et al., 1992; Ortiz et al., 1995). Ob die PC 2-Konzentration in *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 ausreicht, um Komplexe zu bilden und diese über entsprechende Transporter in die Vakuole zu befördern, bleibt unklar.

*H. lugdunensis* zeigte unter Zn(II)-Exposition keine PC 2-Bildung, obwohl dies für anderen Organismen beschrieben wurde. So konnten sowohl in den Grünalgen *Dunaliella tertiolecta* (Tsuji et al., 2003; Tsuji et al., 2002), *Stigeoclonium tenue* (Pawlik-Skowronska, 2003) oder in *R. serpentina* (Grill, 1987) Phytochelatine und verwandte Peptide bestimmt werden. Auch *S. cerevisiae* zeigte unter Zn(II)-Belastung eine Bildung von PC 2 (Kneer et al., 1992). Ließ die Bildung von PC 2 unter Cd(II) in *H. lugdunensis* einen ähnlichen Detoxifikationsweg wie in *S. cerevisiae* vermuten, scheint dies für Zn(II) in der vorliegenden Arbeit nicht zu zutreffen.

Neben Phytochelatinen und Glutathion spielen vor allem Metallothioneine eine entscheidende Rolle in der Metallbindung und infolge dessen in der Metallresistenz bzw. -toleranz. Bereits Jaeckel (2002) konnte zeigen, dass *H. lugdunensis* unter ihren Anzuchtbedingungen weitere, durch Cd(II) induzierbare Strukturen, kleine Metallothioneine, bildete. Aus H8-2-1 wurde eine Verbindung, mit folgender Sequenz isoliert: SPCTCSTCNCAGACNSCSCCTSCSH und als MT1\_HL bezeichnet. Die Verbindung aus H4-2-4 (MT2\_HL) zeigte eine ähnliche Sequenz: MSPCTCSTCNCAGACNTCSCCTSCSH. Dabei unterschieden sie sich nur durch das

N-terminale Methionin und dem Austausch des 4. C-terminalen Serins gegen Threonin voneinander. Die Autorin postulierte, dass es sich um zwei in beiden Pilzstämmen vorkommende Metallothioneine handelt, die der Retentionszeit von 22 bzw. 25 min entsprechen. Dass MT1\_HL auch in Stamm H4-2-4 vorkommt, konnte in der vorliegenden Arbeit massenspektroskopisch gezeigt werden (Anhang B Abb. 5). Die Sequenzen zeigten Homologien zu MT2\_COLGL von *Colletotrichum gleosporioides*, dem Anamorph von *Glomerella cingulata* (ca. 60 %), das in erster Linie unter Appressorienbildung synthetisiert wird (Hwang und Kolattukudy, 1995). Nach der Verteilung des Cysteinmusters werden diese Metallothioneine der Klasse 8 und Unterfamilie f1 der MT, wie auch die *N. crassa* und *A. bisporus* MT, zugeordnet (nach Binz und Kägi; in SWISS\_PROT: <http://www.expasy.org/cgi-bin/lists?metallo.txt>) (Binz und Kägi, 1999). Diese Gruppe stellt eine Klasse kleiner Metallothioneine (ca. 25 Aminosäuren) dar.

In *N. crassa* beschreibt Lerch (1991) 2 Cu-bindende Fraktionen nach der Gelpermeation von exponiertem Material wobei die 2. Fraktion aus 4 MT Spezies besteht, von denen 3 ein zusätzliches Methionin am N-terminalen Ende enthalten bzw. aminoterminal blockiert sind. Möglicherweise ist das eine ähnliche Modifizierung wie bei MT1\_HL und MT2\_HL. Das bereits 1980 isolierte MT aus *N. crassa*, entsprechend der Fraktion 1 in der oben erwähnten Arbeit enthält 25 AS, einschließlich 7 Cysteinresten (Lerch, 1980). Auch *A. bisporus* induziert unter Cu-Stress ein 25 AS langes MT (Münger und Lerch, 1985). Wurden in den vorangegangenen Spezies die MT nur durch Cu induziert, so konnte in *S. cerevisiae* ein 53 AS langes Metallothionein als Produkt des *CUP1* Gens isoliert werden, das sowohl Cu(I) als auch Cd(II) bindet und 12 Cysteinreste enthält (Winge et al., 1985).

Auch *C. glabrata* zeigte die Bildung zweier ca. 4,5 kDa große MT, die unter Kupferbelastung induziert wurden (Winge et al., 1985). Homolog zum MT1 in den ersten 24 N-terminalen Aminosäuren aus *C. glabrata* konnte auch in *C. albicans* ein Cu induziertes MT nachgewiesen werden (Oh et al., 1999). Weitere Arbeiten zeigten, dass die metallbindenden MT in *S. cerevisiae* und *C. glabrata* in der Lage sind, sowohl Cu- als auch Cd(II)-Resistenz, jedoch keine Ni(II), Pt(II), Co(II) oder Zn(II)-Resistenz zu vermitteln (Perego und Howell, 1997).

Wie bereits bei Jaeckel (2002) trat unter den in dieser Arbeit gewählten Anzuchtbedingungen der Peak entsprechend MT2\_HL auch unter hoher Cd(II)-Belastung nicht kontinuierlich auf. In H8-2-1 war sogar nur in der stationären Phase eine Induktion zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Es bleibt unklar, ob das Metallothionein MT2\_HL ein Derivat des ersten ist, oder Cd(II) nur einen schlechten Induktor für diese Verbindung darstellt.

Bei der Induktion von MT1\_HL (Abb. 30, S. 66) werden wieder Stammunterschiede in *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 offensichtlich. So lag der MT1-Gehalt in H8-2-1 in der logarithmischen Wachstumsphase deutlich über dem, des durch gleiche Cd(II)-Konzentrationen in H4-2-4 induzierten. In der stationären Phase waren diese Unterschiede nicht signifikant. H4-2-4 zeigt in der logarithmischen Phase einen kontinuierlichen Anstieg. In der stationären

Phase kam es, wie bei H8-2-1 in beiden Wachstumsphasen, jedoch wieder zu einer Verringerung nach 150  $\mu\text{M}$  Cd(II)-Gabe (bzw. 100  $\mu\text{M}$  in der stationären Phase bei H8-2-1), obwohl der intrazelluläre Cd(II)-Gehalt hier am höchsten war (Abb. 19, S. 49). Möglicherweise kommt den MT in *H. lugdunensis* eine Rolle in der Cd(II)-Detoxifikation zu, doch kann auch eine Rolle in der allgemeinen Metallhomöostase nicht ausgeschlossen werden, da in der unbelasteten logarithmischen Wachstumsphase in beiden Stämmen MT1\_HL nachweisbar war.

Der Einfluss des Zeitpunktes der Metallzugabe auf die MT1\_HL-Bildung konnte bereits gezeigt werden (Jaeckel, 2002). Wurden 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) zum Inokulationszeitpunkt zugegeben, erreichte der MT1\_HL-Gehalt in *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 einen deutlich höheren Wert als bei Zugabe in der logarithmischen Phase. Stamm H8-2-1 hingegen zeigte bei Metallzugabe zum Inokulationszeitpunkt keine MT-Synthese. Die Frage ob der intrazelluläre Cd(II)-Gehalt eine mögliche Ursache für die unterschiedliche MT1\_HL-Bildung in den beiden Belastungsvarianten sein könnte, bleibt jedoch ungeklärt.

Es ist denkbar, dass eine Vielzahl von metallbindenden Proteinen noch nicht charakterisiert ist. So konnten Inouhe et al. (1996) zwar zeigen, dass *Torulaspora delbrueckii* und *Pichia farinosa* in der Lage waren Metallothionein-ähnliche, Cd(II)-bindende Proteine zu synthetisieren, die in der Größe den MT von *S. cerevisiae* ähneln, doch ihre Struktur blieb unklar. Auch Kameo et al. (2000) konnten zeigen, dass in *Beauveria bassiana*, wie *H. lugdunensis* zur Familie der *Hypocreales* gehörend, unter Cd(II)-Stress ein MT gebildet wird, das ca. 2,4 kDa groß ist. Aus vorangegangenen Arbeiten zur Induktion von MT durch Cu in diesem Pilz vermuteten sie, dass es sich um ein 5 Cysteinreste enthaltendes, 22 AS langes Protein handeln könnte. Auch in *Amanita muscaria* und *Boletus edulis* von natürlichen Standorten konnten sowohl Cd,Zn-bindende MT-ähnliche und Cu-bindende MT-ähnliche Proteine nachgewiesen werden. Die Struktur blieb auch hier ungeklärt. Die Aminosäureanalyse eines Proteins aus *A. muscaria* ließ vermuten, dass es sich um ein Aspartat-, Glutamat- und Glycin-reiches Protein handelt, das wenig Cysteinreste enthielt (Collin-Hansen et al., 2002).

Es wurde vermutet, dass die Detoxifikations-Rolle der MT für Cd(II) eine Konsequenz der chemischen Ähnlichkeit zwischen diesem und dem Element Zink ist, da die Zn-Homöostase im tierischen System auch über Metallothioneine geregelt wird (Andrews, 2000). Doch in beiden *H. lugdunensis* Stämmen konnte unter Zn(II)-Belastung im Bereich von 50  $\mu\text{M}$ –350  $\mu\text{M}$  in der vorgelegten Arbeit keine Metallothionein-Induktion nachgewiesen werden, wie es auch für andere Pilze bzw. Hefen bekannt ist (*S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *N. crassa*).

Viele Fragen zur MT-Synthese und Regulation in filamentösen Pilzen sind noch offen, da bis jetzt relativ wenige Arbeiten dazu durchgeführt wurden (Gadd, 2001). Auch in *H. lugdunensis* muss geklärt werden, ob nicht andere Anzuchtbedingungen, z. B. im Minimalmedium, oder Exposition mit weiteren Metallen zu einer stärkeren Induktion der MT führen und Schlussfolgerungen auf die Regulation geben können.

#### 4.6.5 Erste Untersuchungen zur Cd(II)-Bindung an Thiolpeptide in *H.lugdunensis*

Zwei Hauptgruppen von Cd-PC-Komplexen wurden bisher als Detoxifikationsmechanismus in verschiedenen Pflanzen und Hefen detektiert: eine niedermolekulare Form (LMW), in der Cd(II) an Thiolgruppen gebunden ist und eine hochmolekulare Form in der anorganisches Sulfid in die Komplexe eingebaut wurde (Cobbett und Goldsbrough, 2002; Gadd, 2001). Für diese Untersuchungen wurde häufig eine Gelpermeationschromatographie der Extrakte durchgeführt.

In *H. lugdunensis* zeigten beide Stämme 4 Maxima in der Cd(II)-Verteilung: im Ausschlussvolumen der Säule (6 kDa), im Fraktionsbereich von ca. 30 min, bei ca. 42 min und eines bei 48 min (Abb. 32, S. 68). Letztere stellt möglicherweise freies Cd(II) dar.

GSH eluierte mit dem dritten Cd-Peak, wobei ein Verhältnis von GSH:Cd von 6:1 bestimmt wurde. Das erhaltene Chromatogramm zeigt ein ähnliches Profil zu einem Gelpermetationschromatogramm, das mit *A. muscaria* Extrakten, exponiert mit Cd(II) gewonnen werden konnte (Collin-Hansen et al., 2002). Die Autoren diskutierten die Cd(II)-Bindung an MT-ähnliche Peptide, doch bestimmten sie nicht, ob es sich um GSH handeln könnte. Für *H. lugdunensis* scheint es wahrscheinlich, dass wie in *S. cerevisiae* die Cd(II)-Detoxifizierung hauptsächlich von der Chelatierung durch GSH und dem Transport dieser (nicht genauer bestimmten) Komplexe in die Vakuole abhängig ist. Dieser Prozess könnte, wie bereits erwähnt, durch den ABC-Transporter YCF1 (Li et al., 1997) vermittelt werden. Der Anstieg des GSH-GSSG-Verhältnisses (Tab. 21) lässt ebenfalls darauf schließen, dass GSH dem Glutathionkreislauf entzogen wird, um an der Schwermetallkomplexierung beteiligt zu sein.

Die Involvierung des Sulfids in die Bildung höher molekularer Komplexe in *H. lugdunensis* kann ein Angriffspunkt für weitere Untersuchungen sein, da die Sulfidanalysen in den Fraktionen der Gelpermeation keine eindeutigen Hinweise lieferten. Sulfid wurde im Ausschlussvolumen der Gelpermeationssäule bestimmt (Daten nicht gezeigt), was auf eine Einbindung in sehr hochmolekulare Komplexe schließen lässt. Da Glutathion in diesen Fraktionen jedoch nicht bestimmbar war, konnte die Bildung von GSH-CdS-Komplexe in *H. lugdunensis* vorerst nicht bestätigt werden. Da freies Sulfid jedoch flüchtig ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Nichtvorhandensein nur einen methodischen Artefakt darstellt.

In der Gelpermeation wurde bei einer Retentionszeit von 30 min ein kleines Cd(II)-Maximum, verbunden mit einem Peak bei 254 nm deutlich (Pfeile in Abb. 32, S. 68). Dieses lässt auf eine Cd-SH-Bindung schließen. Vermutlich handelt es sich dabei um Metallothionein-Cd-Komplexe (MT1<sub>HL</sub> oder MT2<sub>HL</sub>). Massenspektroskopische Analysen ergaben, dass in beiden *H. lugdunensis* Stämmen MT1<sub>HL</sub> in der Cd(II)-Bindung involviert ist (Anhang B Abb.6, Abb. 7). Jaeckel (2002) beschrieb bereits für Stamm H8-2-1 einen MT1<sub>HL</sub>-Cd-Komplex.

Barbas et al. (1992) zeigten, dass die Verteilung des Cd(II) in Gelpermeationsfraktionen aus Extrakten exponierter *C. glabrata* Kulturen von der Expositionsdauer und dem Alter der Kulturen abhängig ist. In der logarithmischen Phase wurde Cd(II) an GSH komplexiert, später an PC und andere Komplexe. Da in der vorliegenden Arbeit nur Proben in der logarithmischen

Phase (ein Zeitpunkt) betrachtet wurden, muss davon ausgegangen werden, dass zu einem anderen Zeitpunkt die Bindungspartner variieren können.

#### 4.7 Beeinflussung der Schwermetalltoleranz in H4-2-4 durch Sulfat und Magnesium im Medium

Abschließend stellte sich die Frage, ob die hohen Konzentrationen anderer Ionen (z.B. 70 mM  $\text{SO}_4$ ) am Standort H4 einen Einfluss auf die Toleranz gegenüber Cd(II) und Zn(II) in Stamm H4-2-4 ausübt.

Um diesen Einfluss unter Laborbedingungen zu testen, wurde *H. lugdunensis* H4-2-4 in Malz-Pepton-Medium kultiviert, das 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) bzw. 250  $\mu\text{M}$  Zn(II) und in unterschiedlichen Konzentrationen  $\text{SO}_4^{2-}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  enthielt. Dabei nivellierte 20 mM  $\text{SO}_4^{2-}$  den Biomasseverlust durch Zn(II) vollständig, der Verlust durch Cd(II) wurde auf die Hälfte reduziert (Abb. 33, S. 70). Derselbe Befund wurde für Weizen unter 30  $\mu\text{M}$  Cd(II) und  $\text{SO}_4^{2-}$ -Gabe im Bereich von 10-1000  $\mu\text{M}$  gezeigt (McMahon und Anderson, 1998). Es ist denkbar, dass Sulfat mit Bindungsstellen oder Transportwegen für Cd(II) und Zn(II) konkurriert, wie es Blackwell et al. (1998) für  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{K}^+$  in *S. cerevisiae* diskutieren. Weiterhin besteht die Option, dass durch einen verstärkten Sulfatmetabolismus der intrazelluläre Thiolgehalt gesteigert wird und aufgrund dessen eine verstärkte Detoxifizierung stattfindet. Untersuchungen zum Thiolmetabolismus unter Schwermetallstress in Pilzen in Abhängigkeit von der Sulfatkonzentrationen im Medium liegen in der Literatur bisher nicht vor.

In *H. lugdunensis* zeigte sich, dass ein 100fach gesteigertes Sulfatangebot (20 mM) dazu führte, dass der intrazelluläre Gehalt an  $\text{SO}_4^{2-}$  in der Kontrolle um das 8fache anstieg. Im Weizen wurde mit zunehmender  $\text{SO}_4^{2-}$ -Konzentration (bis 1 mM) der intrazelluläre Gehalt in den Wurzeln um das 5fache, in den Blättern um das 3fache gesteigert. Unter Cd(II)-Belastung war diese Tendenz ähnlich (McMahon und Anderson, 1998). In den metallbelasteten Proben von *H. lugdunensis* H4-2-4 führte nur Cd(II) zu einer nicht signifikanten Abnahme des Sulfatpools, Zn(II) jedoch nicht (Tab. 23). Die Untersuchungen zu den Thiolgehalten, wobei der Gesamthiolphool und der Glutathionpool betrachtet wurden, zeigten eine Steigerung in den Kontrollen unter 20 mM Sulfatzusatz. In den belasteten Proben blieb die Erhöhung deutlich unter den Gehalten der Proben ohne Sulfatzusatz (Tab. 24). McMahon und Anderson (1998) hingegen zeigten am Weizen, dass der Glutathionpool in Cd(II)-belasteten Proben etwas anstieg. Dies kann jedoch in *H. lugdunensis* nicht die Ursache für die gesteigerte Biomasseproduktion durch Sulfatzusatz sein. In *H. lugdunensis* H4-2-4 führte das erhöhte Sulfatangebot in belasteten Proben nicht zu einer Steigerung des Thiolphools, der dann zu einer Verringerung der Toxizität führen könnte. Vor allem unter Zn(II)-Belastung wurde der Thiolpool in H4-2-4 nicht beeinflusst.

Wie  $\text{SO}_4^{2-}$  führte auch  $\text{Mg}^{2+}$ , jedoch in geringerem Maße, zu einer Verringerung der Toxizität von 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) und 250  $\mu\text{M}$  Zn(II) in H4-2-4 (Abb. 33, S. 70). Die schützende Wirkung von  $\text{Mg}^{2+}$  in Gegenwart von Schwermetallen wurde auch von Blackwell et al. (1998) für  $\text{Mn}^{2+}$  sowie

Karamushka und Gadd (1994) für  $\text{Cu}^{2+}$  in *S. cerevisiae* gefunden und mit einer Blockierung der Aufnahme diskutiert.

Eine Steigerung der Schwermetalltoleranz durch  $\text{Mg}^{2+}$  aufgrund biochemischer Reaktionen in *H. lugdunensis* erschien nicht wahrscheinlich. So war anzunehmen, dass die Zusätze im Medium einen Einfluss auf die Biosorption und Akkumulation ausüben würden. Im Kapitel 4.5.2 und 4.5.3 wurde die Biosorption und Akkumulation in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Temperatur diskutiert. Aus der Literatur gibt es Befunde, dass andere Ionen im Medium die Biosorption und Akkumulation von Metallen in Mikroorganismen beeinflussen (Gadd, 1993; Ledin, 2000). Wird in Laboruntersuchungen oft nur ein Metall betrachtet, so existieren im natürlichen Habitat Metalle in Gegenwart verschiedenster Kat- und Anionen. Diese Ionen können einen starken Einfluss auf die Biosorption und Akkumulation ausüben. Oft wird dabei eine Reduzierung der Metallbiosorption und -aufnahme beobachtet, wobei auch Stimulierungen und keine Effekte, je nach Metall und Organismus, auftraten (Avery und Tobin, 1993; Ledin, 2000). *H. lugdunensis* H4-2-4 zeigte sowohl unter dem Zusatz von  $\text{NaSO}_4$  als auch unter dem Zusatz von  $\text{MgAc}$  eine deutliche Verringerung der Biosorption und Akkumulation von  $100 \mu\text{M}$   $\text{Cd(II)}$  und  $250 \mu\text{M}$   $\text{Zn(II)}$  in Abhängigkeit von der Konzentration der Zusätze (Abb. 34, S. 72, Abb. 35, S. 73). Ähnliche Tendenzen beobachteten Volesky et al. (1995) für die Aufnahme von Gold durch die Braunalge *Sargassum natans*. Kationen hatten kaum einen Einfluss,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  und  $\text{PO}_4^{3-}$  hingegen setzten die Sorption mit zunehmender Konzentration herab. Den gleichen Effekt zeigte  $\text{Cu(II)}$  und  $\text{Zn(II)}$  bei der  $\text{Cd(II)}$ -Biosorption durch die Braunalge *Ascophyllum nodosum*. In Weizen hingegen führten Sulfatkonzentrationen bis  $100 \mu\text{M}$  (Blättern) bzw.  $200 \mu\text{M}$  (Wurzeln) zu einem Anstieg und erst höhere Konzentrationen (bis  $1 \text{ mM}$ ) zu einer Verminderung der Biosorption (McMahon und Anderson, 1998).

Die Biosorption von  $\text{Cd(II)}$  und  $\text{Zn(II)}$  durch H4-2-4 wurde durch  $20 \text{ mM}$   $\text{SO}_4^{2-}$  am stärksten reduziert. Dabei sank die Biosorption auf  $14 \%$  bzw.  $9 \%$  herab. Das lässt vermuten, dass die hohe  $\text{SO}_4$ -Konzentration am Standort H4 (Tab. 2) eine Rolle in der Tolerierbarkeit der ebenfalls dort herrschenden hohen Schwermetallkonzentrationen (Tab. 3) durch H4-2-4 spielen könnte. Die Herabsetzung der Biosorption von  $\text{Zn(II)}$  durch  $\text{SO}_4^{2-}$  beobachteten auch Ahuja et al. (1999) am Cyanobakterium *O. angustissima*. Die Biosorption wurde durch steigende  $\text{SO}_4^{2-}$ -Konzentrationen bis  $10 \text{ mM}$  auf  $15 \%$  vermindert. Aber auch Chlorid und Nitrat (als Ammoniumsalze) verringerten diese auf  $50 \%$  bzw.  $90 \%$ . Warum diese Anionen die Biosorption erniedrigten, ob es sich um eine Komplexierung oder um eine Konkurrenz um Bindungsplätze handelt, wird nicht diskutiert. Avery und Tobin (1993) betrachteten die Inhibierung der Biosorption in Bezug zur Metallchemie (Prinzip harter und weicher Ionen bzw. Basen und Säuren). Sie zeigten, dass der Inhibierungseffekt durch das harte Sulfat-Ion in *S. cerevisiae* bei harten Metallen wie  $\text{Sr}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  stärker ist. Im Gegensatz dazu waren verstärkte Effekte in der Inhibierung durch das weichere Thiosulfat-Ionen für  $\text{Cu(II)}$  und  $\text{Cd(II)}$  zu beobachten.  $\text{Zn(II)}$  als Übergangsmetall wurde in seiner Biosorption von beiden Ionen etwa gleich inhibiert. Warum

Sulfat die Biosorption herabsetzt bleibt auch hier unklar. Eine Präzipitierung der Metalle wurde weder in der Literatur noch bei den hier beschriebenen Versuchen beobachtet.

An dem Cyanobakterium *O. angustissima* konnten Ahuja et al. (1999) ebenfalls die Verminderung der Biosorption von Zn(II) durch Mg(II) zeigen. Dabei war eine Verringerung um 50 % zu vermerken. Die geringere Beeinflussung der Biosorption durch Mg(II) im Gegensatz zu Sulfat konnte auch für *H. lugdunensis* H4-2-4 gezeigt werden. Auch hier wird die Biosorption durch Mg(II) nur auf 39 % [Cd(II)] bzw. 19 % [Zn(II)] herabgesetzt. Vermutlich ist die Zellwandstruktur für diese Unterschiede verantwortlich.

Akthar et al. (1996) zeigten am nichtlebenden Material von *A. niger*, dass bei der Bindung von Cu(II) und Cd(II) Mg(II) und Ca(II) freigesetzt werden. Auch Kapoor und Viraraghavan (1997b) beobachten eine Freisetzung von Ca(II), Mg(II) und K(I) in *A. niger* bei der Biosorption von Cd(II) und Pb(II). Daraus schlussfolgern die Autoren, dass die Metalle um die Bindungsstelle an der Oberfläche konkurrieren. Dies ist auch für H4-2-4 denkbar.

Ebenso kann vermutet werden, dass infolge der unterschiedlichen Bindestellen oder der niedrigeren Adsorptionsstärken, die Bindungen von Cd(II) und Zn(II) unterschiedlich stark sind. Dies würde begründen, warum die Adsorption von Zn(II) von dem hier untersuchten Kat- bzw. Anion stärker inhibiert wird als Cd(II).

Die Interaktion von Metallen mit biologischen Oberflächen ist eine Voraussetzung für deren intrazelluläre Aufnahme und Akkumulation. Da die Biosorption von Zn(II) und Cd(II) in *H. lugdunensis* H4-2-4 durch Sulfat und Magnesium minimiert wurde, kann angenommen werden, dass auch die Aufnahme beeinträchtigt wird. So wurde die Akkumulation von Cd(II) durch 20 mM Sulfat auf 10 % und von Zn(II) auf 26 % verringert. Mg(II) setzte die Akkumulation auf 48 % bzw. 54 % herab. Zum einen kann angenommen werden, dass der verringerte Metallgehalt auf der Oberfläche eine Verringerung der Aufnahme nach sich zieht. Zum anderen ist denkbar, dass Transportsysteme für Cd(II) und Zn(II) durch das Überangebot an Magnesium und Sulfat kompetitiv gehemmt werden. White und Gadd (1987) diskutieren ihre Ergebnisse der inhibierten Zn(II)-Aufnahme in *S. cerevisiae* durch Magnesium und Kalium auf der Basis der teilweisen Depolarisierung der Zellmembran und der Reduktion der Netto-Oberflächenladung. In *S. cerevisiae* wurde der Biomasseverlust unter Manganstress durch Magnesium verringert (Blackwell et al., 1998). Als Ursache diskutierten die Autoren eine verringerte Aufnahme, wahrscheinlich infolge eines kompetitiven Schutzmechanismus'.

Prozentual gesehen wird die Biosorption stärker gehemmt als die Akkumulation. Für die Verringerung der Toxizität von 100  $\mu$ M Cd(II) und 250  $\mu$ M Zn(II) in der logarithmischen Wachstumsphase von *H. lugdunensis* H4-2-4 ist zum größten Teil jedoch die verringerte Akkumulation verantwortlich.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Schwermetalle stellen immer mehr ein Umweltproblem dar, vor allem durch den gestiegenen anthropogenen Eintrag in die Umwelt. Dabei ist das aquatische Ökosystem ein sehr sensibles System. Den aquatischen Hyphomyceten als primäre Zersetzer von organischen Materialien kommt dabei eine enorme Bedeutung zu. Obwohl sie als Organismen von gut durchlüfteten sauberen Gewässern bekannt sind, wurden sie auch in belasteten Gewässern des Mansfelder Landes gefunden, welches seit Jahrhunderten vom Kupferschieferbergbau geprägt wurde.

Dabei stellte sich die Frage, welche Mechanismen der Anpassung diese Organismen entwickelt haben könnten, um mit hohen Schwermetallbelastungen umzugehen. Dazu wurden die zwei Stämme des aquatischen Hyphomyceten *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 aus einem stark belasteten und H8-2-1 aus einem moderat belasteten Standort hinsichtlich ihrer Stressantwort gegenüber dem toxischen Metall Cd(II) und dem essentiellen Metall Zn(II) untersucht.

Analysen der 18S rDNA bestätigten die Zugehörigkeit dieses Ascomyceten (Stämme H4-2-4, H8-2-1 und H6-06-10) zur Ordnung der *Hypocreales* und Familie der *Nectriaceae*, wie bereits klassische Methoden (Sporenform, Ausbildung von sexuellen Stadien) zeigten.

Stammbaumanalysen nach Parsimony deuten darauf hin, dass sich in Abhängigkeit vom Standort Untergruppen in der *Nectria*-Gruppe ausbilden könnten, die Ökotypen repräsentieren (Abb. 12).

Die Stämme H4-2-4 und H8-2-1 zeigten bereits Unterschiede in ihrem Wachstumsverhalten im unbelasteten Malz-Pepton-Medium. H4-2-4 wies gegenüber H8-2-1 ein schnelleres Wachstum auf. Unter Cd(II)- und Zn(II)-Belastung nahm die Biomasse konzentrationsabhängig in beiden Stämmen ab. Dabei hatte Cd(II) den stärker inhibierenden Effekt. Der Stamm H8-2-1 zeigte sich im Gegensatz zu Stamm H4-2-4 sensitiver gegenüber Cd(II) und Zn(II).

In der stationären Phase zeigten beide Stämme im Vergleich zur logarithmischen Phase einen geringeren Biomasseverlust gegenüber der Kontrolle, was auf eine effiziente Detoxifikation der Metalle mit der Zeit hindeutet.

Auch die Vitalität, ausgedrückt als das Reduktionsvermögen pilzlicher Dehydrogenasen, wurde durch die Metalle Cd(II) und Zn(II) reduziert. Nur bei Cd(II)-Konzentrationen von 150  $\mu$ M war zu beobachten, dass die Vitalität von H8-2-1 gegenüber H4-2-4 stärker verringert wurde. Niedrigere Cd(II)-Konzentrationen führten in diesem Stamm zu einer geringeren Verminderung gegenüber H4-2-4. Dies zeigt, dass Vitalitäts- und Biomasseverlust in *H. lugdunensis* nicht miteinander korrelieren. Auch unter Zn(II)-Belastung ließen sich keine signifikanten Stammunterschiede im Vitalitätsverhalten finden, wobei jedoch die Tendenz zu beobachten war, dass H8-2-1 sensitiver reagiert. Dabei gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Wachstumsphasen.

Der Wassergehalt in *H. lugdunensis*, ausgedrückt als Verhältnis von Frischmasse zu Trockenmasse, wurde sowohl durch Cd(II) als auch durch Zn(II) signifikant verringert. Dies ließ auf eine Disbalance des intrazellulären Ionenhaushaltes schließen. Stamm H8-2-1 zeigte gegenüber Stamm

H4-2-4 unter Cd(II)-Stress einen etwas höheren Wassergehalt. Bei einer Belastung mit 150 µM Cd(II) betrug er in der logarithmischen Phase gegenüber der Kontrolle 75 %, bei H4-2-4 war es 72 %. Zn(II) zeigte in beiden Stämmen einen geringeren Einfluss.

Für den Ascomyceten *H. lugdunensis* lagen bisher keine Information zur Zusammensetzung der Zellwand vor. Erste Ergebnisse zeigten, dass die vorherrschenden Bestandteile der Zuckerfraktion der Zellwand in der logarithmischen Phase aus Glucose, Galaktose, Mannose und Glucuronsäure bestehen. N-Acetyl-Glucosamin, der Grundbaustein des Chitins, konnte nur in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Stamm H8-2-1 wies gegenüber Stamm H4-2-4 eine größere Zuckerfraktion auf, wobei vor allem die Mannose- und Galaktosegehalte erhöht waren. 100 µM Cd(II)-Belastung zeigte in *H. lugdunensis* H8-2-1 keinen signifikanten Einfluss auf die Zusammensetzung der Zuckerfraktion, wobei tendenziell eine Verringerung beobachtet werden konnte. 250 µM Zn(II)-Belastung verringerte in diesem Stamm den Galaktoseanteil signifikant. Stamm H4-2-4 zeigte unter 100 µM Cd(II)-Belastung eine signifikante Verringerung des Glucose- und Glucuronsäureanteils. 250 µM Zn(II) hatten keinen Einfluss auf die Zellwandzusammensetzung in *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4.

Möglicherweise führt die Verringerung der Zuckeranteile in der Zellwand zu einer Abnahme von Schwermetallbindestellen, was als Schutzmechanismus interpretiert werden kann.

Biosorption und intrazelluläre Aufnahme der Metalle erwiesen sich als konzentrations-, metall- und stammspezifische Prozesse. In beiden Stämmen wurde in der stationären Phase mehr Metall biosorbiert und aufgenommen als in der logarithmischen Phase (Abb. 18, Abb. 19).

Dabei biosorbierte der Stamm H4-2-4 bei hohen Metallkonzentrationen tendenziell mehr Cd(II) und Zn(II) als der Stamm H8-2-1, der dagegen mehr Metall intrazellulär aufnahm. Dies kann als Anpassungsmechanismus des Stammes aus dem belasteten Standort (H4-2-4) interpretiert werden. Eine Sättigung der Biosorption bzw. der Aufnahme von Metallen konnte in den Konzentrationsbereichen von 25-150 µM Cd(II) bzw. 50-350 µM Zn(II) nicht gefunden werden. Höhere Konzentrationen wurden nicht untersucht, da sie zur Letalität des untersuchten Organismus führten.

Wurde von beiden Stämmen deutlich mehr Cd(II) an der Zellwand gebunden (biosorbiert) als aufgenommen, ist es bei Zn(II), ausgenommen 250 µM und 350 µM im Stamm H4-2-4, umgekehrt. Die Aufnahme von Zn(II) als essentielles Metall verläuft offenbar spezifischer als die von Cd(II) und wird weniger inhibiert. Dies wirft die Frage nach Metalltransportern in *H. lugdunensis* auf und wäre ein Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Thiolstoffwechsel und Sulfatassimilation ein sehr sensibles System gegenüber Schwermetallstress darstellen. Der Stamm H8-2-1 zeigte in Kontrollansätzen gegenüber H4-2-4 durchschnittlich höhere Sulfatgehalte, wobei in der stationären Phase in beiden Stämmen weniger Sulfat bestimmt werden konnte als in der logarithmischen. Auch unter

Schwermetallexposition war in der stationären Phase ein geringerer Sulfatgehalt zu beobachten, was auf einen gesteigerten Sulfatumsatz und voranschreitenden Verbrauch schließen lässt.

Unter niedriger Cd(II)-Belastung wurde in der logarithmischen Wachstumsphase in beiden Stämmen ein Anstieg des intrazellulären Sulfatgehaltes gefunden, der bei hohen Konzentrationen stark abnahm. In der stationären Phase wurde bereits bei geringen Cd(II)-Konzentrationen eine Verringerung gegenüber der Kontrolle analysiert. Zn(II) verursachte ab 50  $\mu\text{M}$  in beiden Phasen und Stämmen eine Verringerung des intrazellulären Gehaltes.

Cystein stellt einen Endpunkt der Sulfatassimilation dar. Sowohl unter Cd(II)- als auch unter Zn(II)-Stress kam es in *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 und Stamm H8-2-1 zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung des Cysteingehaltes, wobei in der stationären Phase deutlich weniger messbar war. Dies konnte ebenfalls für  $\gamma$ -EC ( $\gamma$ -Glutamylcystein), neben Cystein ein Präkursor des Glutathions, beobachtet werden. Zeigte Cd(II) bereits bei 25  $\mu\text{M}$  eine Wirkung, so war bei Zn(II) erst ab 250  $\mu\text{M}$  ein signifikanter Effekt zu beobachten.

Glutathion spielt eine bedeutende Rolle in der Schwermetalldetoxifizierung. Ab 25  $\mu\text{M}$  Cd(II)- und ab 250  $\mu\text{M}$  Zn(II)-Belastung kommt es in *H. lugdunensis* zu einem Anstieg des reduzierten als auch oxidierten Glutathionspiegels.

Ein Fragment der Glutathion-Synthetase konnte aus Stamm H4-2-4 identifiziert und als Sonde für den Northern-Blot eingesetzt werden. Die Ergebnisse zeigten, dass in beiden *H. lugdunensis* Stämmen eine Transkriptakkumulation mit zunehmender Cd(II)- und Zn(II)-Konzentration vorlag. Für weitere Untersuchungen wäre auch die Regulierung der  $\gamma$ -EC-Synthetase, dem geschwindigkeitsregulierendem Enzym in der GSH-Biosynthese, von Interesse.

Stamm H4-2-4 aus dem hoch belasteten Standort zeigt gegenüber Stamm H8-2-1 bei gleicher intrazellulärer Metallkonzentration höhere Thiolgehalte (Cystein,  $\gamma$ -EC, Glutathion), was eine weitere Ursache der höheren Toleranz dieses Stammes gegenüber Metallen sein kann.

Neben dem reduzierten und oxidierten Glutathion kann vor allem der Quotient aus GSH:GSSG einen Einblicke in den Redoxzustand einer Zelle bzw. Organismus geben. Für *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 und Stamm H8-2-1 wurde beobachtet, dass unter geringer Cd(II)-Belastung das Verhältnis anstieg und mit zunehmender Konzentration in Abhängigkeit von der Wachstumsphase und dem Stamm wieder geringer wurde (Tab. 21). Unter Zn(II)-Gabe kam es direkt zu einer Verringerung des GSH:GSSG-Verhältnis' in Abhängigkeit von der Wachstumsphase möglicherweise als Reaktion auf intrazellulären oxidativen Stress.

Die Befunde zum GSH:GSSG-Verhalten und die Ergebnisse der Gelpermeationschromatographie, in der Cd(II) mit Glutathion coeluierte, lassen die Schlussfolgerung zu, dass in *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 und Stamm H8-2-1 die Cd(II)-Detoxifikation durch Komplexierung mit GSH erfolgen kann. Der geringe PC 2-Anteil unter Cd(II)-Belastung gegenüber GSH stützt diese Aussage. Es bleibt offen, ob ein anschließender Transport in die Vakuole erfolgt.

Ob und inwieweit Sulfid an der Bildung von Cd-Komplex beteiligt ist, konnte noch nicht geklärt werden. Beobachtungen, dass mit zunehmender Cd(II)- jedoch nicht Zn(II)-Konzentration der intrazelluläre Sulfidgehalt in beiden Stämmen stark anstieg, weisen jedoch darauf hin. Signifikante Stamm- oder Phasenunterschiede wurden nicht beobachtet.

Das Auftreten von Phytochelatin 2 in Abhängigkeit von der Cd(II)-Konzentration konnte in beiden *H. lugdunensis* Stämmen nachgewiesen und massenspektroskopisch bestätigt werden (Anhang B Abb. 4). Die Konzentration lag jedoch deutlich unter der des Glutathions. Bei 150  $\mu\text{M}$  bildete Stamm H8-2-1 mehr PC 2, wohingegen er bei 50  $\mu\text{M}$  deutlich weniger als Stamm H4-2-4 synthetisierte (Abb. 29). Der Syntheseweg des PC 2 bleibt unklar, da weder ein PC-Synthase-Gen noch eine PC-Synthase-Aktivität bestimmt werden konnte.

Ferner war das Auftreten von möglicherweise 2 Metallothioneinen zu beobachten, wobei MT1\_HL in beiden Stämmen identifiziert werden konnte. Stamm H8-2-1 synthetisierte mehr MT1\_HL und erreichte ein Maximum bei 100  $\mu\text{M}$  Cd(II). Stamm H4-2-4 synthetisierte weniger aber kontinuierlich bis 150  $\mu\text{M}$ .

Zn(II)-Zugabe hatte keinen Effekt auf die Bildung von PC 2 und Metallothioneinen.

Ob PC 2 und MT1\_HL eine Rolle in der Schwermetalldetoxifikation in *H. lugdunensis* spielen ist unklar. Untersuchungen mittels Gelpermeationschromatographie deuten auf die Involvierung von Metallothioneinen in die Cd(II)-Detoxifikation hin.

Da aus vorangegangenen Arbeiten die Aminosäuresequenz der Metallothioneine bekannt ist, sollte es von Interesse sein, die Gensequenz mittels abgeleiteter primer zu bestimmen und die transkriptionelle Regulierung zu untersuchen.

Die Anzuchtstemperatur kann die Stoffwechselaktivität von Organismen beeinflussen. In den *H. lugdunensis* Stämmen H4-2-4 und H8-2-1 zeigte sich eine Abhängigkeit des Wachstumsverhalten von der Anzuchtstemperatur. 10 °C verzögerten das Wachstum in beiden Stämmen gegenüber 14 °C, wobei die lag-Phase um zwei Tage verlängert wurde. Unter Cd(II)-Belastung war der Biomasseverlust bei 10° C deutlich größer als bei 14° C.

Die Vitalität von Stamm H4-2-4 wurde von den unterschiedlichen Temperaturen nicht signifikant beeinflusst, wohingegen die Vitalität von H8-2-1 durch Temperaturerniedrigung verringert wurde.

Vitalitätsverlust und Biomasseverringern könnten ein Ergebnis unterschiedlicher intrazellulärer Metallkonzentrationen sein.

Durch eine Verringerung der Temperatur um 4°C wurde die Biosorption in Stamm H4-2-4 sowie in Stamm H8-2-1 gesteigert. Die intrazelluläre Aufnahme hingegen wurde durch die Temperaturverringern herabgesetzt. Dieser Einfluss war jedoch nicht immer signifikant.

Eine verringerte Metallaufnahme sollte zu einer höheren Biomasse führen (weniger toxisches Metall im Stoffwechsel). Da dies jedoch nicht der Fall war, muss angenommen werden, dass Detoxifikationsmechanismen durch Temperaturveränderungen beeinflusst werden.

Vergleichende Untersuchungen wurden im Bezug auf den Thiolpool durchgeführt. Dabei zeigten beide *H. lugdunensis* Stämme bereits in den Kontrollansätzen bei 14 °C einen deutlich höheren

Thiolpool (Cystein,  $\gamma$ -EC, GSH) als bei 10 °C. Unter Cd(II)-Belastung war der prozentuale Anstieg der Thiole gegenüber 10 °C jedoch nur geringfügig verschieden. Daher kann angenommen werden, dass unter anderem die durchschnittliche Verdopplung der Ausgangsmenge an Thiolen, vor allem GSH, für die höhere Toleranz unter Cd(II)-Belastung bei 14 ° gegenüber 10 °C verantwortlich ist.

Es zeigt sich, dass bereits eine Temperaturverschiebung von 4°C einen deutlichen Einfluss auf die Toleranz eines Organismus gegenüber Schwermetall, hier Cd(II) und Zn(II), hat.

Sowohl Sulfat- als auch Magnesiumzusatz zu den Medien steigerten die Schwermetalltoleranz in *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 in der logarithmischen Phase unter 100  $\mu$ M Cd(II)- und 250  $\mu$ M Zn(II)-Belastung. Ursache dafür war nicht wie angenommen ein gesteigertes Thiolangebot (Kontrollansätze zeigten unter Sulfatgabe einen erhöhten intrazellulären Sulfatgehalt und Thiolpool), sondern eine verringerte Aufnahme dieser Metalle. Auch die Biosorption von Cd(II) und Zn(II) wurde sowohl durch Sulfat als auch Magnesium herabgesetzt.

Aufnahme und Biosorption wurden durch Sulfat bis zu einer Konzentration von 20 mM, einer Konzentration die noch deutlich unter den Konzentrationen am natürlichen Standort liegt, stärker verringert, als durch Magnesium im gleichen Konzentrationsbereich. Eine Präzipitierung der Metalle, die die Verfügbarkeit verringern würde, wurde nicht beobachtet.

Es konnte gezeigt werden, dass Biosorption und Aufnahme (Akkumulation) von Metallen durch Fremdionen, sowohl Kat- als auch Anionen, beeinflusst werden können. Das hat einen Einfluss auf das Toleranzverhalten von Organismen und muss bei weiteren Untersuchungen berücksichtigt werden.

Alle Untersuchungen dieser Arbeit wurden in Malz/Pepton-Medium durchgeführt. Um standortnähere Bedingungen zu erhalten wäre es hilfreich, ein Mineral- bzw. Minimalmedium für weitere Untersuchungen zu verwenden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Phylogenie und dem physiologisch-biochemischen Verhalten unter Schwermetallstress [Cd(II) und Zn(II)], vor allem der geringeren Metallaufnahme von Stamm H4-2-4 und dessen höherem Thiolpool bei gleicher intrazellulärer Metallkonzentration, lassen vermuten, dass es sich bei den *H. lugdunensis* Stämmen H4-2-4 und H8-2-1, um zwei Ökotypen handelt. Dabei scheint Stamm H4-2-4 aus dem hoch belasteten Standort des Mansfelder Landes gegenüber Stamm H8-2-1 aus einem moderat belasteten Standort toleranter zu sein.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abel, T. H. & Bärlocher, F. (1984) Effects of Cd on aquatic hyphomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 245-251
- Ahmad, A., Mukherjee, P., Mandal, D., Senapati, S., Khan, M. I., Kumar, R. & Sastry, M. (2002) Enzyme mediated extracellular synthesis of CdS nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum*. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 12108-12109
- Ahrazem, O., Prieto, A., Gomez-Miranda, B., Bernabe, M. & Leal, J. A. (2001) Comparison of cell-wall polysaccharides from *Nectria cinnabarina* with those from the group of *Nectria* with *Sesquicillium* anamorphs. *Microbiol.* 147, 1839-1849
- Ahuja, P., Gupta, R. & Saxena, R. K. (1999) Zn<sup>2+</sup> biosorption by *Oscillatoria angustissima*. *Proc. Biochem.* 34, 77-85
- Ahuja, P., Mohapatra, H., Saxena, R. K. & Gupta, R. (2001) Reduced uptake as a mechanism of zinc tolerance in *Oscillatoria angustissima*. *Curr. Microbiol.* 43, 305-310
- Akthar, M. N., Sastry, K. S. & Mohan, P. M. (1996) Mechanism of metal ion biosorption by fungal biomass. *Biomaterials* 9, 21-28
- Al-Lahham, A., Rohde, V., Heim, P., Leuchter, R., Veeck, J., Wunderlich, C., Wolf, K. & Zimmermann, M. (1999) Biosynthesis of phytochelatins in the fission yeast. Phytochelatin synthesis: a second role for the glutathione synthetase gene of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 15, 385-396
- Anderson, M. E. (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 113, 548-555
- Anderson, M. E. (1998) Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem. Biol. Interact.* 111-112, 1-14
- Andrews, G. K. (2000) Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem. Pharmacol.* 59, 95-104
- Andrews, G. K. (2001) Cellular zinc sensors: MTF-1 regulation of gene expression. *Biomaterials* 14, 223-237
- Atlas, R. M. (1997) "Handbook of Microbiological Media" 2/Ed. CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo
- Averbeck, N. B., Borghouts, C., Hamann, A., Specke, V. & Osiewacz, H. D. (2001) Molecular control of copper homeostasis in filamentous fungi: increased expression of a metallothionein gene during aging of *Podospora anserina*. *Mol. Gen. Genom.* 264, 604-612
- Avery, S. & Tobin, J. (1993) Mechanism of adsorption of hard and soft metal ions to *Saccharomyces cerevisiae* and influence of hard and soft anions. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2851-2856
- Avery, S. V. (2001) Metal toxicity in yeasts and the role of oxidative stress. *Adv. Appl. Microbiol.* 49, 111-142

- Bae, W., Abdullah, R., Henderson, D. & Mehra, R. K. (1997) Characteristics of glutathione-capped ZnS nanocrystallites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 16-23
- Bae, W. & Mehra, R. K. (1998) Properties of glutathione- and phytochelatin-capped CdS bionanocrystallites. *J. Inorg. Biochem.* 69, 33-43
- Baldrian, P. (2003) Interaction of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 32, 78-91
- Barbas, J., Santhanagopalan, V., Blaszczyński, M., Ellis, W. R., Jr. & Winge, D. R. (1992) Conversion in the peptides coating cadmium:sulfide crystallites in *Candida glabrata*. *J. Inorg. Biochem.* 48, 95-105
- Bärlocher, F. (1992) "The ecology of aquatic hyphomycetes" Springer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York
- Bärlocher, F. (2004) Freshwater fungal communities. In "The fungal community" (J. White, ed.), Vol. 3. Dekker, New York, in press
- Berlich, M. (1998) Charakterisierung von schwermetallinduzierbaren Verbindungen in *Polytrichum formosum* L. ex Hedw. Diplomarbeit, M.-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
- Bermingham, S. (1996) Effect of pollutants on aquatic hyphomycetes colonizing leaf material in freshwater. In "Fungi and environmental change : symposium of the British Mycological Society" (J. C. Frankland, ed.), 201-217. Cambridge Univ. Press, Cambridge
- Bermingham, S., Fisher, P. J., Martin, A., Marriott, M. & Lappin-Scott, H. (1998) The effect of the herbicide mecoprop on *Heliscus lugdunensis* and its influence on the preferential feeding of *Gammarus pseudolimnaeus*. *Microb. Ecol.* 35, 199-204
- Bermingham, S., Maltby, L. & Cooke, R. C. (1995) A critical assessment of the validity of ergosterol as an indicator of fungal biomass. *Mycol. Res.* 99, 479-484
- Bhupathiraju, V. K., Hernandez, M., Landfear, D. & Alvarez-Cohen, L. (1999) Application of a tetrazolium dye as an indicator of viability in anaerobic bacteria. *J. Microbiol. Methods* 37, 231-243
- Binz, P. A. & Kägi, J. H. R. (1999) Metallothionein: molecular evolution and classification. In "Metallothionein IV" (C. D. Klaassen, ed.), 7-13. Birkenhaeser Verlag, Basel
- Blackwell, K. J., Singleton, I. & Tobin, J. M. (1995) Metal cation uptake by yeast: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 579-584
- Blackwell, K. J. & Tobin, J. M. (1999) Cadmium accumulation and its effects on intracellular ion pools in a brewing strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23, 204-208
- Blackwell, K. J., Tobin, J. M. & Avery, S. V. (1998) Manganese toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: dependence on intracellular and extracellular magnesium concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 751-757

- Blaudez, D., Botton, B. & Chalot, M. (2000) Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiol.* 146, 1109-1117
- Borrelly, G. P., Harrison, M. D., Robinson, A. K., Cox, S. G., Robinson, N. J. & Whitehall, S. K. (2002) Surplus zinc is handled by Zym1 metallothionein and Zhf endoplasmic reticulum transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 277, 30394-30400
- Braha, B., Tintemann, H., Krauss, G. & Krauss, G.-J. (2004) Metal stress response in two strains of the aquatic hyphomycete *Heliscus lugdunensis*. *Microb. Ecol.* submitted
- Breierova, E., Vajczikova, I., Sasinkova, V., Stratilova, E., Fiser, I., Gregor, T. & Sajbidor, J. (2002) Biosorption of cadmium ions by different yeast species. *Z. Naturforsch. [C]* 57, 634-639
- Brown, D. H. & Wells, J. M. (1988) Sequential elution technique for determination of the cellular location fractions. In "Method in Bryology. Proc. Bryol. Meth. Workshop" (J. Glime, ed.), 227-233. Hattori Bot. Lab. Nichinan, Mainz
- Bruns, I., Sutter, K., Menge, S., Neumann, D. & Krauss, G.-J. (2001) Cadmium lets increase the glutathione pool in bryophytes. *J. Plant Physiol.* 158, 79-89
- Brzywczy, J., Sienko, M., Kucharska, A. & Paszewski, A. (2002) Sulphur amino acid synthesis in *Schizosaccharomyces pombe* represents a specific variant of sulphur metabolism in fungi. *Yeast* 19, 29-35
- Burgstaller (1997) Transport of small ions and molecules through the plasma membrane of filamentous fungi. *Crit. Rev. Microbiol.* 23, 1-46
- Chaplin, M. F. (1982) A rapid and sensitive method for the analysis of carbohydrate components in glycoproteins using gas-liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 123, 336-341
- Chassaing, H., Vacchina, V., Kutchan, T. M. & Zenk, M. H. (2001) Identification of phytochelatin-related peptides in maize seedlings exposed to cadmium and obtained enzymatically in vitro. *Phytochemistry* 56, 657-668
- Chauvet, E. & Suberkropp, K. (1998) Temperature and sporulation of aquatic hyphomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1522-1525
- Clemens, S., Antosiewicz, D. M., Ward, J. M., Schachtman, D. P. & Schroeder, J. I. (1998) The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 12043-12048
- Clemens, S., Schroeder, J. I. & Degenkolb, T. (2001) *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. *Eur. J. Biochem.* 268, 3640-3643
- Clemens, S. & Simm, C. (2003) *Schizosaccharomyces pombe* as a model for metal homeostasis in plant cells: the phytochelatin-dependent pathway is the main cadmium detoxification mechanism. *New Phytol.* 159, 323-330
- Cobbett, C. & Goldsbrough, P. (2002) Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 53, 159-182

- Cobbett, C. S. (2000a) Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 211-216
- Cobbett, C. S. (2000b) Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* 123, 825-832
- Cobbett, C. S. & Goldsbrough, P. B. (2000) Mechanisms of metal resistance: metallothioneins and phytochelatins. In "Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean-up the environment" (B. D. Ensley & I. Raskin, eds.), 247-269. John Wiley & Sons, New York
- Collin-Hansen, C., Yttri, K. E., Andersen, R. A., Berthelsen, B. O. & Steinnes, E. (2002) Mushrooms from two meta-contaminated areas in Norway: occurrence of metals and metallothionein-like proteins. *Geochem. Explor. Environ. Anal.* 2, 121-130
- Culotta, V. C., Howard, W. R. & Liu, X. F. (1994) CRS5 encodes a metallothionein-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269, 25295-25302
- Culotta, V. C., Klomp, L. W., Strain, J., Casareno, R. L., Krems, B. & Gitlin, J. D. (1997) The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 272, 23469-72
- Dameron, C. T., Reese, R. N., Mehra, R. K., Kortan, A. R., Carroll, P. J., Steigerwald, M. L., Brus, L. E. & Winge, D. R. (1989a) Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites. *Nature* 338, 596-597
- Dameron, C. T., Smith, B. R. & Winge, D. R. (1989b) Glutathione-coated cadmium-sulfide crystallites in *Candida glabrata*. *J. Biol. Chem.* 264, 17355-17360
- Davidian, J.-C., Hatzfeld, Y., Cathala, N., Tagmount, A. & Vidmar, J. J. (2000) Sulfate uptake and transport in plants. In "Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants" (C. Brunold, ed.), 19-40. Paul Haupt, Bern, Switzerland
- DiMaio, J. J. & Shillito, R. D. (1989) Cryopreservation technology for plant cell cultures. *J. Tiss. Cult. Meth.* 12, 163-169
- Dix, N. J. & Webster, J. (1995) Aquatic fungi. In "Fungal Ecology", 225-265. Chapman & Hall, London
- Dönmez, G. & Aksu, Z. (1999) The effect of copper(II) ions on the growth and bioaccumulation properties of some yeasts. *Proc. Biochem.* 35, 135-142
- Dönmez, G. & Aksu, Z. (2001) Bioaccumulation of copper(II) and nickel(II) by the non-adapted and adapted growing *Candida* sp. *Water Res.* 35, 1425-1434
- Eide, D. J. (2000) Metal ion transport in eukaryotic microorganisms: insights from *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv. Microb. Physiol.* 43, 1-38
- Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochem. and Biophys.* 82, 70-77
- Elskens, M. T., Jaspers, C. J. & Penninckx, M. J. (1991) Glutathione as an endogenous sulphur source in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 137, 637-644
- Emri, T., Pócsi, I. & Szentirmai, A. (1997) Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 809-814

- Fahmy, A. R. & Walsh, E. O. F. (1952) The quantitative determination of dehydrogenase activity in cell suspensions. *Biochem. J.* 51, 55-56
- Failla, M. L., Benedict, C. D. & Weinberg, E. D. (1976) Accumulation and storage of  $Zn^{2+}$  by *Candida utilis*. *J. Gen. Microbiol.* 94, 23-36
- Fourest, E., Serre, A. & Roux, J.-C. (1996) Contribution of carboxyl groups to heavy metal binding sites in fungal cell wall. *Toxicol. Environ. Chem.* 54, 1-10
- Gadd, G. M. (1990) Metal toleranc. In "Microbiology of Extreme Environments" (C. Edwards, ed.), 178-210. Open, Great Britain
- Gadd, G. M. (1992) Metals and microorganisms: a problem of definition. *FEMS Microbiol. Lett.* 79, 197-203
- Gadd, G. M. (1993) Tansley review No.47: Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol.* 124, 25-60
- Gadd, G. M. (1999) Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. *Adv. Microb. Physiol.* 41, 47-92
- Gadd, G. M. (2001) Metal transformations (13). In "Fungi in Bioremediation" (G. M. Gadd, ed.), 359-382. Cambridge University Press, Cambridge
- Gadd, G. M. & Sayer, J. A. (2000) Influence of fungi on the environmental mobility of metals and metalloids. In "Environmental Metal Interactions" (D. R. Lovely, ed.), 237-256. ASM Press, Washington D.C.
- Gaither, L. A. & Eide, D. J. (2001) Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals* 14, 251-270
- Gallego, S. M., Benavides, M. P. & Tomaro, M. L. (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci.* 121, 151-159
- Gardea-Torresdey, J. L., Cano-Aguilera, I., Webb, R. & Gutierrez-Corona, F. (1997) Enhanced copper adsorption and morphological alterations of cells of copper-stressed *Mucor rouxii*. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 435-441
- Gessner, M. O., Bärlocher, F. & Chauvet, E. (2003) Qualitative and quantitative analyses of aquatic hyphomycetes in streams. In "Freshwater mycology" (C. K. M. Tsui & K. D. Hyde, eds.), 127-157. Fungal Diversity Research Series 10, Fungal Diversity Press, Hong Kong
- Gessner, M. O. & Chauvet, E. (1997) Growth and production of aquatic hyphomycetes in decomposing leaf litter. *Limn. Oceanogr.* 42, 496-505
- Gharieb, M. M. (2001) Pattern of cadmium accumulation and essential cations during growth of cadmium-tolerant fungi. *Biometals* 14, 143-151
- Gilboa-Garber, N. (1971) Direct spectrophotometric determination of inorganic sulfide in biological material and in other complex mixtures. *Anal. Biochem.* 43, 129-133
- Glerum, D. M., Shtanko, A. & Tzagaloff, A. (1996) Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 271, 14504-14509

- Gomes, D., Fragoso, L., Riger, C., Panek, A. & Eleutherio, E. (2002) Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1573, 21-25
- Gopal, M., Pakshirajan, K. & Swaminathan, T. (2002) Heavy metal removal by biosorption using *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 102-103, 227-237
- Graça, M. A. S. & Ferreira, R. C. F. (1995) The ability of selected aquatic hyphomycetes and terrestrial fungi to decompose leaves in freshwater. *Sydowia* 47, 167-179
- Grant, C. M., MacIver, F. H. & Dawes, I. W. (1996) Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Gen.* 29, 511-515
- Grant, C. M., Perrone, G. & Dawes, I. W. (1998) Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 893-898
- Gräser, H. (1977) "Biochemisches Praktikum" VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin
- Griffith, O. W. & Mulcahy, R. T. (1999) The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 73, 209-267
- Grill, E. (1987) Phytochelatins, the heavy metal binding peptides of plants: characterization and sequence determination. *Experientia Suppl.* 52, 317-322
- Grill, E., Loeffler, S., Winnacker, E. L. & Zenk, M. H. (1989) Phytochelatins, the heavy-metal binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6838-6842
- Grill, E., Winnacker, E. L. & Zenk, M. H. (1985) Phytochelatins: The principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230, 674-676
- Groß, N. (2000) Untersuchungen zu Wachstum und physiologisch-biochemischer Leistung des aquatischen Hyphomyceten *Heliscus lugdunensis* Sacc. & Therry. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
- Guerinot, M. L. & Eide, D. (1999) Zeroing in on zinc uptake in yeast and plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 244-249
- Hamer, D. H. (1986) Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 913-951
- Hawkesford, M. J. (2000) Plant responses to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S-utilization efficiency. *J. Exp. Bot.* 51, 131-138
- Hawkesford, M. J., Davidian, J.-C. & Grignon, C. (1993) Sulphate/H<sup>+</sup> co-transport in plasma membrane vesicles isolated from *Brassica napus*: increased transport in membranes isolated from sulphur-starved plants. *Planta* 190, 297-304
- Hayashi, Y., Morikawa, S., Kawabata, M. & Hotta, Y. (1992) The synthesis of cadystins, heavy metal chelating peptides, is induced in the fission yeast by wounds of the cell wall or by incubation with chitosan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188, 388-394

- Hayashi, Y., Nakagawa, C. W., Mutoh, N., Isobe, M. & Goto, T. (1991) Two pathways in the biosynthesis of cadystins ( $(\gamma\text{EC})_n\text{G}$ ) in the cell-free system of the fission yeast. *Biochem. Cell Biol.* 69, 115-121
- Hefnawy, M. A. & Razak, A. A. (1998) Alteration of cell-wall composition of *Fusarium oxysporum* by copper stress. *Folia Microbiol.* 543, 453-458
- Holleman, A. F. & Wiberg, E. (1985) "Lehrbuch der Anorganischen Chemie" Walter de Gruyter, Berlin
- Huang, C.-P., Huang, C. P. & Morehart, A. L. (1990) The removal of Cu(II) from dilute aqueous solutions by *S. cerevisiae*. *Water Res.* 24, 433-439
- Hunter, T. C. & Mehra, R. K. (1998) A role for HEM2 in cadmium tolerance. *J. Inorg. Biochem.* 69, 293-303
- Hwang, C. S. & Kolattukudy, P. E. (1995) Isolation and characterization of genes expressed uniquely during appressorium formation by *Colletotrichum gloeosporioides* conidia induced by the host surface wax. *Mol. Gen. Genom.* 247, 282-294
- Imai, K., Obata, H., Shimizu, K. & Komiya, T. (1996) Conversion of glutathione into cadystins and their analogs catalyzed by carboxypeptidase Y. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 1193-1194
- Inouhe, M., Hiyama, M., Tohoyama, H., Joho, M. & Murayama, T. (1989) Cadmium-binding protein in a cadmium-resistant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 993, 51-55
- Inouhe, M., Sumiyoshi, M., Tohoyama, H. & Joho, M. (1996) Resistance to cadmium ions and formation of a cadmium-binding complex in various wild-type yeasts. *Plant Cell Physiol.* 37, 341-346
- Jaekel, P. (2002) Wirkungen von Schwermetallen auf aquatische Pilze aus mikrobiellen Biozönosen des Mansfelder Landes. Dissertation, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
- Jarosz-Wilkolazka, A. & Gadd, G. M. (2003) Oxalate production by wood-rotting fungi growing in toxic metal-amended medium. *Chemosphere* 52, 541-547
- Juang, R. H., McCue, K. F. & Ow, D. W. (1993) Two purine biosynthetic enzymes that are required for cadmium tolerance in *Schizosaccharomyces pombe* utilize cysteine sulfinate in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.* 304, 392-401
- Kameo, S., Iwahashi, H., Kojima, Y. & Satoh, H. (2000) Induction of metallothioneins in the heavy metal resistant fungus *Beauveria bassiana* exposed to copper or cadmium. *Analisis*, 382-385
- Kapoor, A. & Viraraghavan, T. (1996) Biosorption of heavy metal on fungal biomass. In "4th Environmental Engineering Speciality", 333-343, Edmonton, Alberta, Canada
- Kapoor, A. & Viraraghavan, T. (1997a) Fungi as biosorbents. In "Biosorbents for Metal Ions" (J. F. Wase, C., ed.), 67-85. Taylor & Francis, London
- Kapoor, A. & Viraraghavan, T. (1997b) Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger*. *Bioresour. Technol.* 61, 221-227

- Karamushka, V. I. & Gadd, G. M. (1994) Influence of copper on proton efflux from *Saccharomyces cerevisiae* and the protective effect of calcium and magnesium. *FEMS Microbiol. Lett.* 122, 33-38
- King, T. E. & Morris, R. O. (1967) Determination of acid-labile sulfide and sulfhydryl group. *Methods Enzymol.* 10, 634-637
- Kneer, R., Kutchan, T. M., Hochberger, A. & Zenk, M. H. (1992) *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatins. *Arch. Microbiol.* 157, 305-310
- Kneer, R. & Zenk, M. H. (1997) The formation of Cd-phytochelatins complexes in plant cell cultures. *Phytochemistry* 44, 69-74
- Kocsy, G., Szalai, G., Vagujfalvi, A., Stehli, L., Orosz, G. & Galiba, G. (2000) Genetic study of glutathione accumulation during cold hardening in wheat. *Planta* 210, 295-301
- Kondo, N., Imai, K., Isobe, M., Goto, T., Murasugi, A. & Wada-Nakawa, C. (1984) Cadystin A and B, major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced in a fission yeast - separation, revision of structures and synthesis. *Tetrahedron Letters* 25, 3869-3872
- Kranner, I. & Grill, D. (1996) Determination of glutathione and glutathione disulphide in lichens: a comparison of frequently used methods. *Phytochem. Anal.* 7, 24-28
- Krauss, G., Bärlocher, F. & Krauss, G.-J. (2003a) Effects of pollution on aquatic hyphomycetes. In "Freshwater mycology: a practical approach" (K. D. Hyde, ed.), 211-230. Fungal Diversity Research Series 10, Fungal Diversity Press, Hong Kong
- Krauss, G., Bärlocher, F., Schreck, P., Kranich, W., Miersch, J., Dermietzel, F., Wennrich, R. & Krauss, G.-J. (1998) Aquatic hyphomycetes at extremely polluted sites in the Mansfelder Land area. In "Microbiology of polluted aquatic ecosystems: UFZ-Bericht Nr. 10/1998" (P. M. Becker, ed.), 76-83. UFZ, Leipzig
- Krauss, G., Bärlocher, F., Schreck, P., Wennrich, R., Gläser, W. & Krauss, G.-J. (2001) Aquatic hyphomycetes occur in hyperpolluted waters in Central Germany. *Nova Hedwigia* 72, 419-428
- Krauss, G., Sridhar, K. R., Jung, K., Wennrich, R., Ehrman, J. & Bärlocher, F. (2003b) Aquatic hyphomycetes in polluted groundwater habitats of Central Germany. *Microb. Ecol.* 45, 329-339
- Kuhn, P. J. & Trinci, A. P. J. (1990) Cell walls and membranes in fungi - an introduction. In "Biochemistry of Cell Walls & Membranes in Fungi" (A. P. Trinci, P. J. Kuhn, M. J. Jung, M. W. Goosey & L. G. Copping, eds.), 1-4. Springer Verlag, Berlin Heidelberg
- Ledin, M. (2000) Accumulation of metals by microorganisms - processes and importance for soil systems. *Earth Sci. Rev.* 51, 1-31
- Lee, T.-M. & Chen, M.-H. (1998) Hyposaline effect on polyamine accumulation in *Ulva fasciata* (Ulvales, Chlorophyta). *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39, 167-174
- Lerch, K. (1980) Copper metallothionein, a copper-binding protein from *Neurospora crassa*. *Nature* 284, 368-370

- Lerch, K. (1991) Purification of *Neurospora crassa* copper-metallothionein. *Methods Enzymol.* 205, 278-83
- Leustek, T. & Saito, K. (1999) Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiol.* 120, 637-644
- Levine, W. B. & Marzluf, G. A. (1989) Isolation and characterization of cadmium-resistant mutants of *Neurospora crassa*. *Can. J. Microbiol.* 35, 359-365
- Li, Z. S., Lu, Y. P., Zhen, R. G., Szczyzka, M., Thiele, D. J. & Rea, P. A. (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 42-47
- Li, Z.-S., Szczyzka, M., Lu, Y.-P., Thiele, D. J. & Rea, P. A. (1996) The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J. Biol. Chem.* 271, 6509-6517
- Liu, X. D. & Thiele, D. J. (1997) Yeast metallothionein gene expression in response to metals and oxidative stress. *Methods* 11, 289-299
- Liu, X. F., Supek, F., Nelson, N. & Culotta, V. C. (1997) Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 gene. *J. Biol. Chem.* 272, 11763-11769
- Madsen, T. V. & Brix, H. (1997) Growth, photosynthesis and acclimation by two submerged macrophytes in relation to temperature. *Oecologia* 110, 320-327
- Mameri, N., Boudries, N., Addour, L., Belhocine, D., Lounici, H., Grib, H. & Pauss, A. (1999) Batch zinc biosorption by bacterial nonliving *Streptomyces rimosus* biomass. *Wat. Res.* 33, 1347-1354
- Marzluf, G. A. (1997) Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 73-96
- Matamoros, M. A., Moran, J. F., Iturbe-Ormaetxe, I., Rubio, M. C. & Becana, M. (1999) Glutathione and homoglutathione synthesis in legume root nodules. *Plant Physiol.* 121, 879-888
- McMahon, P. J. & Anderson, J. W. (1998) Preferential allocation of sulphur into  $\gamma$ -glutamylcysteinyl peptides in wheat plants grown at low sulphur nutrition in the presence of cadmium. *Physiol. Plant.* 104, 440-448
- Mehdi, K., Thierie, J. & Penninckx, M. J. (2001)  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its role in the vacuolar transport and metabolism of glutathione. *Biochem. J.* 359, 631-637
- Mehra, R. K., Mulchandani, P. & Hunter, T. C. (1994) Role of CdS quantum crystallites in cadmium resistance in *Candida glabrata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200, 1193-1200
- Mehra, R. K., Tarbet, E. B., Gray, W. R. & Winge, D. R. (1988) Metal-specific synthesis of two metallothioneins and gamma-glutamyl peptides in *Candida glabrata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8815-8819
- Meister, A. (1989) Metabolism and function of glutathione. In "Glutathione. Chemical, Biochemical, and Medical Aspects", Vol. A, 367-474. John Wiley & Sons, New York

- Mejare, M. & Bulow, L. (2001) Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends Biotechnol.* 19, 67-73
- Miersch, J., Bärlocher, F., Bruns, I. & Krauss, G.-J. (1997) Effects of cadmium, copper, and zinc on growth and thiol content of aquatic hyphomycetes. *Hydrobiologia* 346, 77 - 84
- Miersch, J., Tschimedbalshir, M., Bärlocher, F., Grams, Y., Pierau, B., Schierhorn, A. & Krauss, G.-J. (2001) Heavy metals and thiol compounds in *Mucor racemosus* and *Articulospora tetracladia*. *Mycol. Res.* 105, 883-889
- Miyake, T., Sammoto, H., Kanayama, M., Tomochika, K., Shinoda, S. & Ono, B. (1999) Role of the sulphate assimilation pathway in utilization of glutathione as a sulphur source by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 1449-1457
- Mowll, J. L. & Gadd, G. M. (1983) Zinc uptake and toxicity in the yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 129, 3421-3425
- Mullen, M. D., Wolf, D. C., Beveridge, T. J. & Bailey, G. W. (1992) Sorption of heavy metals by soil fungi *Aspergillus niger* and *Mucor rouxii*. *Soil Biol. Biochem.* 24, 129-135
- Münger, K. & Lerch, K. (1985) Copper metallothionein from the fungus *Agaricus bisporus*: chemical and spectroscopic properties. *Biochemistry* 24, 6751-6756
- Murasugi, A., Wada, C. & Hayashi, Y. (1981) Cadmium-binding peptide induced in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biochem.* 90, 1561-1564
- Murphy, R. J. & Levy, J. F. (1983) Production of copper oxalate by some copper tolerant fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 81, 165-168
- Mutoh, N. & Hayashi, Y. (1988) Isolation of mutants of *Schizosaccharomyces pombe* unable to synthesize cadystin, small cadmium-binding peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151, 32-39
- Mutoh, N., Kawabata, M. & Hayashi, Y. (1991) Tetramethylthiuram disulfide or dimethyldithiocarbamate induces the synthesis of cadystins, heavy metal chelating peptides, in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 1068-1073
- Nguyen, T. H., Fleet, G. H. & Rogers, P. L. (1998) Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 206-212
- Nies, D. H. (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 730-750
- Nikolcheva, L. & Bärlocher, F. (2002) Phylogeny of *Tetracladium* based on 18S rDNA. *Czech. Mycol.* 53, 285-295
- Nocito, F. F., Pirovano, L., Cocucci, M. & Sacchi, G. A. (2002) Cadmium-induced sulfate uptake in maize roots. *Plant Physiol.* 129, 1872-1879
- Noctor, G., Arisi, A., Jouanin, L., Kunert, K., Rennenberg, H. & Foyer, C. (1998) Review article. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J. Exp. Bot.* 49, 623-647

- Noctor, G. & Foyer, C. H. (1998) Ascorbat and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249-279
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H. & Foyer, C. H. (2002) Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J. Exp. Bot.* 53, 1283-1304
- Nussbaum, S., Schmutz, D. & Brunold, C. (1988) Regulation of assimilatory sulfate reduction by cadmium in *Zea mays* L. *Plant Physiol.* 88, 1407-1410
- O'Donnell, K. (1993) Fusarium and its near relatives. In "The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics" (D. R. Reynolds & J. W. Taylor, eds.). Wallingford. CAB International
- Oh, K. B., Watanabe, T. & Matsuoka, H. (1999) A novel copper-binding protein with characteristics of a metallothionein from a clinical isolate of *Candida albicans*. *Microbiol.* 145, 2423-2429
- O'Halloran, T. V. & Culotta, V. C. (2000) Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J. Biol. Chem.* 275, 25057-25060
- Ortiz, D. F., Kreppel, L., Speiser, D. M., Scheel, G., McDonald, G. & Ow, D. W. (1992) Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *EMBO J.* 11, 3491-3499
- Ortiz, D. F., Ruscitti, T., McCue, K. F. & Ow, D. W. (1995) Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J. Biol. Chem.* 270, 4721-4728
- Ott, T., Fritz, E., Polle, A. & Schutzendubel, A. (2002) Characterisation of antioxidative systems in the ectomycorrhiza-building basidiomycete *Paxillus involutus* (Bartsch) Fr. and its reaction to cadmium. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42, 359-366
- Outten, C. E. & O'Halloran, T. V. (2001) Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* 292, 2488-92
- Oven, M., Grill, E., Golan-Goldhirsh, A., Kutchan, T. M. & Zenk, M. H. (2002a) Increase of free cysteine and citric acid in plant cells exposed to cobalt ions. *Phytochemistry* 60, 467-474
- Oven, M., Page, J. E., Zenk, M. H. & Kutchan, T. M. (2002b) Molecular characterization of the homophytochelatase of soybean *Glycine max*: relation to phytochelatase. *J. Biol. Chem.* 277, 4747-4754
- Ow, D. W. (1996) Heavy metal tolerance genes: prospective tools for bioremediation. *Resour. Conserv. Rec.* 18, 135-149
- Patra, J. & Panda, B. B. (1998) A comparison of biochemical responses to oxidative and metal stress in seedlings of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environ. Pollut.* 101, 99-105
- Pawlik-Skowronska, B. (2003) When adapted to high zinc concentrations the periphytic green alga *Stigeoclonium tenue* produces high amounts of novel phytochelatase-related peptides. *Aquat. Toxicol.* 62, 155-163

- Peberdy, J. F. (1990) Fungal cell walls - a review. *In* "Biochemistry of cell walls & membranes in fungi" (A. P. Trinci, P. J. Kuhn, M. J. Jung, M. W. Goosey & L. G. Copping, eds.), 5-24. Springer Verlag, Berlin Heidelberg
- Penninckx, M. (2000) A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 737-742
- Penninckx, M. J. (2002) An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res.* 2, 295-305
- Penninckx, M. J. & Elskens, M. T. (1993) Metabolism and functions of glutathione in microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* 34, 239-301
- Perego, P. & Howell, S. B. (1997) Molecular mechanisms controlling sensitivity to toxic metal ions in yeast. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 147, 312-318
- Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A. & Forestier, C. (2002) Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J.* 32, 539-548
- Pierau, B. (1999) Charakterisierung von zwei Stämmen des aquatischen Hyphomyceten *Heliscus lugdunensis* (Sacc. and Therry) unter Schwermetallstress. Diplomarbeit, M.-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
- Portnoy, M. E., Liu, X. F. & Culotta, V. C. (2000) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters. *Mol. Cell Biol.* 20, 7893-7902
- Prillinger, H., Lopandic, K., Schweigkofler, W., Deak, R., Aarts, H. J., Bauer, R., Sterflinger, K., Kraus, G. F. & Maraz, A. (2002) Phylogeny and systematics of the fungi with special reference to the Ascomycota and Basidiomycota. *Chem. Immunol.* 81, 207-295
- Prillinger, H., Oberwinkler, F., Umile, C., Tlachac, K., Bauer, R., Dörfler, C. & Taufrazthofer, E. (1993) Analysis of cell wall carbohydrates (neutral sugars) from asco- and basidiomycetous yeasts with and without derivatization. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 39, 1-34
- Prinz, R. & Weser, U. (1975) A naturally occurring Cu-thionein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 356, 767-776
- Radisky, D. & Kaplan, J. (1999) Regulation of transition metal transport across the yeast plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 274, 4481-4484
- Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C. & O'Halloran, T. V. (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284, 805-8
- Randhawa, V. K., Zhou, F., Jin, X., Nalewajko, C. & Kushner, D. J. (2001) Role of oxidative stress and thiol antioxidant enzymes in nickel toxicity and resistance in strains of the green alga *Scenedesmus acutus* f. *alternans*. *Can. J. Microbiol.* 47, 987-993

- Rausser, W. E. (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochem. Biophys.* 31, 19-48
- Reese, R. N. & Winge, D. R. (1988) Sulfide stabilization of the cadmium-gamma-glutamyl peptide complex of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 263, 12832-12835
- Roepstorff, P. & Fohlman, J. (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* 11, 601
- Ross, G. (1995) "Applications of the HP <sup>3D</sup>Capillary Electrophoresis System Vol. 2" Hewlett-Packard Company, Waldbronn
- Rother, M. (2002) Zur Bildung Schwermetall-bindener Proteine in *Heliscus lugdunensis* (Sacc. et Therry) unter Cadmium-Stress. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
- Salinas, E., Orellano, M. E. d., Rezza, I., Martinez, L., Marchesvky, E. & M. Sanz de Tosetti (2000) Removal of cadmium and lead from dilute aqueous solutions by *Rhodotorula rubra*. *Bioresour. Technol.* 72, 107-112
- Scarano, G. & Morelli, E. (2003) Properties of phytochelatin-coated CdS nanocrystallites formed in a marine phytoplanktonic alga (*Phaeodactylum tricornutum*, Bohlin) in response to Cd. *Plant Science* 165, 803-810
- Schat, H., Llugany, M., Vooijs, R., Hartley-Whitaker, J. & Bleeker, P. M. (2002) The role of phytochelatin in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *J. Exp. Bot.* 53, 2381-2392
- Singleton, I. & Tobin, J. M. (1996) Fungal interactions with metals and radionuclides for environmental bioremediation. In "Fungi and Environmental Change" (G. M. Gadd, N. Magan & J. M. Frankland, eds.), Vol. British Mycological Society Symposium, 282-298. Cambridge University Press
- Smit, E., Leeflang, P., Glandorf, B., van Elsas, J. D. & Wernars, K. (1999) Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2614-2621
- Soares, E. V., Duarte, A. P., Boaventura, R. A. & Soares, H. M. (2002) Viability and release of complexing compounds during accumulation of heavy metals by a brewer's yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 836-841
- Speiser, D. M., Abrahamson, S. L., Banuelos, G. & Ow, D. W. (1992a) *Brassica juncea* produces a phytochelatin-cadmium-sulfid complex. *Plant Physiol.* 99, 817-821
- Speiser, D. M., Ortiz, D. F., Kreppel, L., Scheel, G., McDonald, G. & Ow, D. W. (1992b) Purine biosynthetic genes are required for cadmium tolerance in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell Biol.* 12, 5301-5310
- Sridhar, K. R., Krauss, G., Bärlocher, F., Raviraja, N. S., Wennrich, R., Baumbach, R. & Krauss, G.-J. (2001) Decomposition of alder leaves in two heavy metal polluted streams in Central Germany. *Aquat. Microb. Ecol.* 26, 73-80

- Sridhar, K. R., Krauss, G., Bärlocher, F., Wennrich, R. and Krauss, G.-J. (2000) Fungal diversity in heavy metal polluted waters in Central Germany. *Fungal Diversity* 5, 119-129
- Srinivasan, C., Posewitz, M. C., George, G. N. & Winge, D. R. (1998) Characterization of the copper chaperone Cox17 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 37, 7572-7577
- Strohm, M., Jouanin, L., Kunert, K. J., Pruvost, C., Polle, A., Foyer, C. H. & Rennenberg, H. (1995) Regulation of glutathione synthesis in leaves of transgenic poplar (*Populus tremula* & *P. alba*) overexpressing glutathione synthetase. *Plant J.* 7, 141-145
- Sutter, K. (2000) Untersuchungen zur Akkumulation und physiologisch-biochemischen Wirkung von Schwermetallen im Wassermoos *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. Dissertation, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
- Tobin, J. M., Cooper, D. G. & Neufeld, R. J. (1984) Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 821-824
- Tohoyama, H., Tomoyasu, T., Inouhe, M., Joho, M. & Murayama, T. (1992) The gene for cadmium metallothionein from a cadmium-resistant yeast appears to be identical to CUP1 in a copper-resistant strain. *Curr. Genet.* 21, 275-280
- Tommasi, F., Paciolla, C., de Pinto, M. C. & De Gara, L. (2001) A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. *J. Exp. Bot.* 52, 1647-1654
- Towell, L. E. & Mazur, P. (1975) Studies on the reduction of TTC as a viability assay for plant tissue cultures. *Can. J. Bot.* 53, 1097-1102
- Trüper, H. G. & Schlegel, H. G. (1964) Sulphur metabolism in Thiorhodaceae I. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii*. *Antonie van Leeuwenhoek* 30, 225-238
- Tsuchisaka, A., Kimura, T., Imai, K., Senoo, K., Akiyoshi Tanaka & Obata, H. (2000) Improvement of cadystins [( $\gamma$ -EC)<sub>n</sub>G] synthesis activity and Cd tolerance in tobacco cells by transfer of the rice type I carboxypeptidase gene (CPase gene). *Environ. Sci.* 13, 519-528
- Tsuchisaka, A., Kimura, T., Imai, K., Senoo, K., Tanaka, A. & Obata, H. (1999) Cadystins [( $\gamma$ -EC)<sub>n</sub>G] synthesis ability of carboxypeptidase (CPase). *Environ. Sci.* 12, 393-398
- Tsuji, N., Hirayanagi, N., Iwabe, O., Namba, T., Tagawa, M., Miyamoto, S., Miyasaka, H., Takagi, M., Hirata, K. & Miyamoto, K. (2003) Regulation of phytochelatin synthesis by zinc and cadmium in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Phytochemistry* 62, 453-459
- Tsuji, N., Hirayanagi, N., Okada, M., Miyasaka, H., Hirata, K., Zenk, M. H. & Miyamoto, K. (2002) Enhancement of tolerance to heavy metals and oxidative stress in *Dunaliella tertiolecta* by Zn-induced phytochelatin synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 653-659
- Valente, P., Ramos, J. P. & Leoncini, O. (1999) Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. *Can. J. Microbiol.* 45, 949-958
- Van Ho, A., Ward, D. M. & Kaplan, J. (2002) Transition metal transport in yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 237-261

- Vande Weghe, J. G. & Ow, D. W. (1999) A fission yeast gene for mitochondrial sulfide oxidation. *J. Biol. Chem.* 274, 13250-13257
- Vande Weghe, J. G. & Ow, D. W. (2001) Accumulation of metal-binding peptides in fission yeast requires hmt2+. *Mol. Microbiol.* 42, 29-36
- Vatamaniuk, O. K., Bucher, E. A., Ward, J. T. & Rea, P. A. (2001) A new pathway for heavy metal detoxification in animals. Phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 276, 20817-20820
- Vatamaniuk, O. K., Bucher, E. A., Ward, J. T. & Rea, P. A. (2002) Worms take the 'phyto' out of 'phytochelatins'. *Trends Biotechnol.* 20, 61-64
- Vatamaniuk, O. K., Mari, S., Lu, Y. P. & Rea, P. A. (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase: blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *J. Biol. Chem.* 275, 31451-31459
- Venkateswerlu, G. & Stotzky, G. (1986) Copper and cobalt alter the cell wall of *Cunninghamella blakesleeana*. *Can. J. Microbiol.* 32, 654-662
- Venkateswerlu, G. & Stotzky, G. (1989) Binding of metals by cell walls of *Cunninghamella blakesleeana* grown in the presence of copper or cobalt. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, 619-625
- Vepachedu, S. K. V. R. R., Akthar, N. & Mohan, P. M. (1997) Isolation of a cadmium tolerant *Curvularia* sp. from polluted effluents. *Curr. Science* 73, 453-455
- Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M. B. & Labarre, J. (2001) A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 276, 8469-8474
- Volesky, B. & Holan, Z. R. (1995) Biosorption of heavy metals. *Biotechnol. Prog.* 11, 235-250
- Volesky, B. & May-Phillips, H. A. (1995) Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 797-806
- Weber, D. N., Shaw, C. F., 3rd & Petering, D. H. (1987) *Euglena gracilis* cadmium-binding protein-II contains sulfide ion. *J. Biol. Chem.* 262, 6962-6964
- Webster, J. (1959) *Nectria lugdunensis* sp. nov., the perfect state of *Heliscus lugdunensis*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 42, 322-327
- Webster, J. (1981) Biology and ecology of aquatic hyphomycetes. In "The Fungal Community" (D. T. Wicklow & G. C. Carrol, eds.), 681-691. Marcel Dekker, New York
- Webster, J. (1992) Anamorph-teleomorph relationships. In "The Ecology of Aquatic Hyphomycetes" (F. Bärlocher, ed.), 99-117. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Wheeler, G. L., Quinn, K. A., Perrone, G., Dawes, I. W. & Grant, C. M. (2002) Glutathione regulates the expression of gamma-glutamylcysteine synthetase via the Met4 transcription factor. *Mol. Microbiol.* 46, 545-556
- White, C. & Gadd, G. M. (1987) The uptake and cellular distribution of zinc in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 133, 727-737

- Williams, P., Keshavarz-Moore, E. & Dunnill, P. (1996) Production of cadmium sulphide microcrystallites in batch cultivation by *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biotechnol.* 48, 259-267
- Winge, D. R., Nielson, K. B., Gray, W. R. & Hamer, D. H. (1985) Yeast metallothionein. Sequence and metal-binding properties. *J. Biol. Chem.* 260, 14464-14470
- Xiang, C. & Oliver, D. J. (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1539-1550
- Yan, G. & Viraraghavan, T. (2003) Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. *Water Res.* 37, 4486-4496
- Yin, P., Yu, Q., Jin, B. & Ling, Z. (1999) Biosorption removal of cadmium from aqueous solution by using pretreated fungal biomass cultured from starch wastewater. *Water Res.* 33, 1960-1963
- Zenk, M. H. (1996) Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene* 179, 21-30
- Zhao, F. J., Hamon, R. E., Lombi, E., McLaughlin, M. J. & McGrath, S. P. (2002) Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J. Exp. Bot.* 53, 535-543
- Zhao, H. & Eide, D. (1996a) The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2454-2548
- Zhao, H. & Eide, D. (1996b) The *ZRT2* gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271, 23203-23210

---

## Abkürzungsverzeichnis

$\gamma$ -EC	$\gamma$ -Glutamylcystein
AAS	Atomadsorptionsspektrometer
AQH	Aquatischer Hyphomyceten
BSA	Rinderserumalbumin Fraktion V
CHES	N-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure
DMPD	N,N-Dimethyl-p-Phenylendiamin
DTE	Dithioerithrit
DTNB	5,5'-Dithio-bis-nitrobenzoesäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FM	Frischmasse
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
HPLC	High Performance Liquide Chromatography
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactosid
MeOH	Methanol
MgAc	Magnesium-Acetat
MT	Metallothionein
MOPS	3-N-Morpholinsulfonsäure
NADPH + H <sup>+</sup>	Dihyronicotianamidadenindinukleotidphosphat
NEM	N-Ethylmaleiimid
OD	Optische Dichte
PC	Phytochelatin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
Rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TM	Trockenmasse
TNB	Thionitrobenzoesäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid

---

## Chemikalien, die nicht im Text aufgeführt wurden

$\gamma$ -EC	REATEC
Agar-Agar	ROTH
Agarose	SERVA
Ampicillin	QBIAGEN
Bromphenolblau	SIGMA
BSA	MERCK
$\text{CdCl}_2$	VEB Laborchemie Apolda
CHES	MERCK
Cystein	SIGMA
DMPD	FLUKA
dNTP-Mix	PROMEGA
DTNB	SIGMA
DTT	MERCK
$\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$	VEB Laborchemie Apolda
Ethidiumbromid	SIGMA
$\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)$	FLUKA
Formaldehyd	FLUKA
Glutathion-Reduktase	FLUKA
Glycerin	ROTH
GSH	SIGMA
GSSG	SIGMA
$\text{H}_2\text{O}_2$ suprapur	MERCK
Hexamethoniumhydroxid	FLUKA
$\text{HNO}_3$ suprapur	MERCK
Imidazol	MERCK
IPTG	ROTH
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	MERCK
Malzextrakt	MERCK
$\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	VEB Laborchemie Apolda
Monobrombiman	FLUKA
MOPS	SIGMA
N,N-Dimethylformamid	FLUKA
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	MERCK
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	FLUKA
Na-Citrat	MERCK
NaCl	MERCK
$\text{NADPH} \cdot \text{Na}_2$	MERCK
$\text{NaH}_2\text{PO}_2$	MERCK
NEM	SIGMA
$\text{NH}_4\text{HCO}_3$	MERCK

---

NiCl <sub>2</sub>	SIGMA
Pepton	DIFCO
PMSF	SIGMA
Primer	MWG-BIOTECH
Pyromellinsäure	SIGMA
SDS	ROTH
<i>Taq</i> -Polymerase	PROMEGA, FERMENTAS
Toluol	MERCK
Triethanolamin	SIGMA
Tris	MERCK
TTC	MERCK
X-Gal	ROTH
ZnCl <sub>2</sub>	MERCK

## Rohdaten der im Text dargestellten Abbildungen

SD = Standardabweichung

**Tab. 1** Trockenmasse in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase der *H. lugdunensis*-Stämme H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)-Stress (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n ≥ 5)

Cd-Konz. [μM]	H4-2-4				H8-2-1			
	Trockenmasse [mg/mL]				Trockenmasse [mg/mL]			
	Log. P.	SD	Stat. P.	SD	Log. P.	SD	Stat. P.	SD
0	1,34	0,30	2,15	0,08	1,20	0,30	1,90	0,60
25	1,16	0,19	1,85	0,30	0,69	0,34	1,77	0,46
50	0,95	0,20	1,72	0,50	0,58	0,21	1,74	0,42
100	0,60	0,13	1,55	0,50	0,56	0,18	1,58	0,58
150	0,39	0,17	1,28	0,55	0,27	0,19	1,05	0,52

**Tab. 2** Trockenmasse in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase der *H. lugdunensis*-Stämme H4-2-4 und H8-2-1 unter Zn(II)-Stress (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n ≥ 5)

Zn-Konz. [μM]	H4-2-4				H8-2-1			
	Trockenmasse [mg/mL]				Trockenmasse [mg/mL]			
	Log. P.	SD	Stat. P.	SD	Log. P.	SD	Stat. P.	SD
0	1,50	0,52	1,80	0,12	1,38	0,34	2,01	0,28
50	1,54	0,49	1,83	0,05	1,31	0,36	1,73	0,03
100	1,47	0,45	1,77	0,07	1,12	0,30	1,66	0,04
250	1,19	0,29	1,42	0,08	0,66	0,20	1,48	0,23
350	0,69	0,14	0,92	0,16	0,30	0,12	0,48	0,07
500	0,09	0,02	0,17	0,03				

**Tab. 3 Vitalitätsbestimmung mittels Triphenyl-Tetrazoliumchlorid-Methode in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase der *H. lugdunensis*-Stämme H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)-Stress (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n ≥ 5)**

Cd-Konz. [μM]	H4-2-4				H8-2-1			
	Vitalität [Yield %]				Vitalität [Yield%]			
	Log. P.	SD	Stat. P.	SD	Log. P.	SD	Stat. P.	SD
0	100	0,00	100	0,00	100	0,00	100	0,00
25	54,95	13,87	61,90	20,29	83,90	6,22	70,60	13,40
50	43,58	13,41	44,85	18,10	70,89	15,82	64,50	17,20
100	41,25	17,25	34,69	9,50	40,32	12,78	41,14	11,37
150	34,50	9,06	23,67	6,10	16,64	2,99	28,37	4,68

**Tab. 4 Vitalitätsbestimmung mittels Triphenyl-Tetrazoliumchlorid-Methode in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase der *H. lugdunensis*-Stämme H4-2-4 und H8-2-1 unter Zn(II)-Stress (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n ≥ 5)**

Zn-Konz. [μM]	H4-2-4				H8-2-1			
	Vitalität [Yield %]				Vitalität [Yield%]			
	Log. P.	SD	Stat. P.	SD	Log. P.	SD	Stat. P.	SD
0	100	0,00	100	0,00	100	0,00	100	0,00
50	73,06	25,53	118,00	13,23	80,79	20,39	75,55	15,98
100	65,34	9,31	78,90	12,48	62,45	15,22	46,27	15,17
250	53,06	3,09	53,45	25,45	41,95	20,39	40,42	15,98
350	30,87	7,22	28,21	12,32	33,43	15,56	30,90	11,54
500	26,93	13,47	25,89	7,93				

**Tab. 5 Wassergehalte (Verhältnis von Frischmasse/Trockenmasse) in *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)-Belastung in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (Kontrolle: n = 5-14 Cadmium: n = 6-11).**

Cd-Konz. [μM]	H4-2-4				H8-2-1			
	Frischmasse/Trockenmasse				Frischmasse/Trockenmasse			
	Log. P.	SD	Stat. P.	SD	Log. P.	SD	Stat. P.	SD
0	8,03	0,81	8,10	0,75	8,42	0,70	8,87	0,71
25	6,90	0,74	6,84	1,34	8,30	1,06	7,80	0,54
50	6,73	0,74	6,38	1,12	7,89	1,05	7,76	0,58
100	6,40	0,67	6,05	1,09	7,38	1,40	7,10	0,81
150	5,75	0,65	5,63	1,05	6,33	0,60	6,24	0,36

**Tab. 6 Wassergehalte (Verhältnis von Frischmasse/Trockenmasse) in *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 unter Zn(II)-Belastung in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (Kontrolle: n = 12; Zink: n = 5-6)**

Zn-Konz. [μM]	H4-2-4				H8-2-1			
	Frischmasse/Trockenmasse				Frischmasse/Trockenmasse			
	Log. P.	SD	Stat. P.	SD	Log. P.	SD	Stat. P.	SD
0	8,03	0,89	8,19	0,74	8,30	0,83	8,59	0,79
50	7,78	0,71	7,28	0,63	7,83	1,11	7,46	0,46
100	7,41	0,97	6,77	0,59	7,15	1,26	6,97	0,42
250	7,16	0,93	6,44	0,43	6,95	0,41	6,35	0,74
350	6,92	0,63	6,03	0,92	6,47	0,69	5,84	0,27

**Tab. 7 Biosorption durch *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 und H8-2-1 in der logarithmischen und stationären Phase in Abhängigkeit von der Schwermetallkonzentration (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 4)**

Cd-Konz. [μM]	H4-2-4				H8-2-1			
	Biosorption [μmol/g TM]				Biosorption [μmol/g TM]			
	Log. P.	SD	Stat. P.	SD	Log. P.	SD	Stat. P.	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
25	8,21	1,39	12,17	1,99	9,85	2,17	10,40	2,33
50	15,17	2,95	24,80	4,50	23,94	4,93	27,85	5,76
100	37,51	3,58	45,84	2,80	28,01	4,37	30,43	8,61
150	47,16	8,72	66,94	12,74	39,14	8,10	52,22	10,64

**Tab. 8 Biosorption durch *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 und H8-2-1 in der logarithmischen und stationären Phase in Abhängigkeit von der Schwermetallkonzentration (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 4)**

Zn-Konz. [μM]	H4-2-4				H8-2-1			
	Biosorption [μmol/g TM]				Biosorption [μmol/g TM]			
	Log. P.	SD	Stat. P.	SD	Log. P.	SD	Stat. P.	SD
0	0,06	0,02	0,08	0,01	0,05	0,02	0,10	0,03
50	4,23	0,71	3,24	0,88	6,21	2,28	4,12	1,66
100	12,50	3,55	6,93	2,31	11,23	5,367	10,77	2,90
250	46,89	14,47	68,18	8,03	46,07	11,13	33,51	8,35
350	75,06	16,62	97,41	26,12	83,29	13,58	79,53	21,12

**Tab. 9 Aufnahme von Cd(II) durch die *H. lugdunensis*-Stämme H4-2-4 und H8-2-1 in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 4)**

Cd-Konz. [μM]	H4-2-4				H8-2-1			
	Akkumulation [μmol/g TM]				Akkumulation [μmol/g TM]			
	Log. P.	SD	Stat. P.	SD	Log. P.	SD	Stat. P.	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
25	3,20	0,61	4,98	0,89	4,09	0,78	6,23	1,28
50	5,16	1,00	8,54	1,53	5,87	1,21	7,47	1,57
100	6,58	1,14	13,34	2,63	9,25	1,74	14,41	2,81
150	19,56	2,31	22,32	2,50	20,58	7,19	27,10	11,03

**Tab. 10 Aufnahme von Zn(II) durch die *H. lugdunensis*-Stämme H4-2-4 und H8-2-1 in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 4)**

Zn-Konz. [μM]	H4-2-4				H8-2-1			
	Akkumulation [μmol/g TM]				Akkumulation [μmol/g TM]			
	Log P	SD	Stat P.	SD	Log P	SD	Stat P.	SD
0	0,56	0,11	0,61	0,09	0,54	0,09	0,67	0,12
50	20,77	4,30	19,53	1,29	16,09	2,17	23,89	6,37
100	35,95	2,47	34,83	3,74	35,41	6,87	44,50	13,94
250	48,84	19,96	67,05	1,11	55,09	12,84	122,82	25,99
350	52,97	9,80	70,78	10,43	88,12	7,75	145,31	14,72

**Tab. 11 Sulfat-Gehalt von *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)-Stress in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 5-6)**

Cd-Konz. [μM]	H4-2-4				H8-2-1			
	Sulfat [μmol/g TM]				Sulfat [μmol/g TM]			
	Log. P.	SD	Stat. P.	SD	Log. P.	SD	Stat. P.	SD
0	9,21	2,54	7,39	2,09	20,24	4,98	18,49	3,46
25	22,89	8,88	4,46	0,41	32,95	10,08	16,15	4,06
50	26,32	9,83	4,29	1,32	30,98	10,26	14,13	3,56
100	3,55	1,62	1,70	0,63	9,45	1,75	1,39	0,49
150	2,86	1,31	0,82	0,064	3,65	0,75	0,90	0,07

**Tab. 12 Sulfat-Gehalt von *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 unter Zn(II)-Stress in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 5-6)**

Zn-Konz. [μM]	H4-2-4				H8-2-1			
	Sulfat [μmol/g TM]				Sulfat [μmol/g TM]			
	Log. P.	SD	Stat. P.	SD	Log. P.	SD	Stat. P.	SD
0	16,58	1,78	11,03	2,25	21,71	8,94	9,78	1,02
50	13,18	2,49	2,22	0,97	18,83	5,87	2,36	0,53
100	12,55	2,17	1,98	0,82	14,24	3,07	0,62	0,13
250	11,80	2,24	1,97	0,81	9,88	3,82	1,58	0,31
350	8,88	4,28	5,35	1,66	8,03	2,48	5,80	1,32
500	4,77	2,72	4,36	1,43				

**Tab. 13 Cystein-Gehalt von *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)-Belastung in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 5-6)**

Cd-Konz. [μM]	H4-2-4				H8-2-1			
	Cystein [μmol/g TM]				Cystein [μmol/g TM]			
	Log. P.	SD	Stat. P.	SD	Log. P.	SD	Stat. P.	SD
0	0,50	0,07	0,27	0,16	0,42	0,23	0,22	0,04
25	1,18	0,27	0,33	0,07	0,87	0,16	0,33	0,07
50	1,20	0,22	0,46	0,09	0,97	0,26	0,46	0,09
100	1,48	0,42	0,66	0,32	1,47	0,11	0,73	0,24
150	2,00	0,42	1,73	0,39	2,00	0,57	1,67	0,43

**Tab. 14 Cystein-Gehalt von *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 unter Zn(II)-Belastung in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 5-6)**

Zn-Konz. [μM]	H4-2-4				H8-2-1			
	Cystein [μmol/g TM]				Cystein [μmol/g TM]			
	Log. P.	SD	Stat. P.	SD	Log. P.	SD	Stat. P.	SD
0	0,23	0,06	0,17	0,03	0,43	0,18	0,39	0,16
50	0,39	0,14	0,19	0,02	0,39	0,09	0,40	0,12
100	0,81	0,38	0,20	0,07	0,49	0,09	0,37	0,07
250	0,98	0,31	0,31	0,07	1,16	0,41	0,64	0,16
350	1,99	0,19	0,91	0,36	1,39	0,70	1,04	0,17
500	2,42	0,73	1,94	0,95				

**Tab. 15**  $\gamma$ -Glutamylcystein-Gehalte von *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)-Stress in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 5)

Cd-Konz. [ $\mu$ M]	H4-2-4				H8-2-1			
	$\gamma$ -EC [ $\mu$ mol/g TM]				$\gamma$ -EC [ $\mu$ mol/g TM]			
	Log. P.	SD	Stat. P.	SD	Log. P.	SD	Stat. P.	SD
0	0,12	0,06	0,10	0,03	0,13	0,08	0,11	0,01
25	0,99	0,34	0,27	0,11	0,29	0,14	0,19	0,05
50	1,08	0,46	0,45	0,18	0,39	0,15	0,23	0,04
100	1,80	0,58	0,64	0,25	0,86	0,11	0,54	0,22
150	2,41	0,45	1,38	0,41	1,61	0,75	0,74	0,06

**Tab. 16**  $\gamma$ -Glutamylcystein-Gehalte von *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 unter Zn(II)-Stress in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 5)

Zn-Konz. [ $\mu$ M]	H4-2-4				H8-2-1			
	$\gamma$ -EC [ $\mu$ mol/g TM]				$\gamma$ -EC [ $\mu$ mol/g TM]			
	log. P.	Stabw.	stat.P.	Stabw.	log. P.	Stabw.	stat.P.	Stabw.
0	0,10	0,05	0,17	0,06	0,13	0,02	0,13	0,06
50	0,19	0,06	0,19	0,02	0,13	0,02	0,11	0,03
10	0,16	0,04	0,21	0,07	0,13	0,03	0,11	0,05
250	0,68	0,19	0,78	0,21	0,30	0,12	0,18	0,02
350	1,99	0,49	0,856	0,34	0,62	0,26	0,43	0,11
500	2,99	1,28	2,83	0,53				

**Tab. 17** Glutathion-Gehalte von *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)-Belastung in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 5)

Cd-Konz. [ $\mu$ M]	H4-2-4				H8-2-1			
	GSH [ $\mu$ mol/g TM]				GSH [ $\mu$ mol/g TM]			
	Log. P.	SD	Stat. P.	SD	Log. P.	SD	Stat. P.	SD
0	9,54	0,92	9,72	1,21	8,05	2,48	8,80	1,86
25	17,83	2,95	11,90	2,65	15,44	2,09	10,57	1,89
50	20,03	3,91	11,95	2,69	18,22	2,34	11,07	1,76
100	20,49	4,87	12,68	2,57	18,54	2,70	14,76	3,30
150	25,86	3,85	15,26	4,68	22,61	7,74	16,14	3,33

**Tab. 18** Glutathion-Gehalte von *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 unter Zn(II)-Belastung in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 5)

Zn-Konz. [ $\mu$ M]	H4-2-4				H8-2-1			
	GSH [ $\mu$ mol/g TM]				GSH [ $\mu$ mol/g TM]			
	Log. P.	SD	Stat. P.	SD	Log. P.	SD	Stat. P.	SD
0	5,38	1,26	5,32	0,94	6,63	1,42	7,76	0,91
50	5,63	1,33	5,63	0,72	4,38	0,47	6,91	1,19
100	5,57	1,48	4,63	0,36	6,48	1,79	6,73	0,66
250	12,94	2,81	6,04	1,16	18,28	8,26	5,94	0,98
350	21,33	0,52	12,02	3,51	45,76	6,58	13,58	1,75
500	29,64	16,78	40,31	8,69				

**Tab. 19 Oxidierte Glutathion-Gehalte (GSSG) von *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)-Belastung in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 4)**

Cd-Konz. [ $\mu$ M]	H4-2-4				H8-2-1			
	GSSG [ $\mu$ mol/g TM]				GSSG [ $\mu$ mol/g TM]			
	Log. P.	SD	Stat. P.	SD	Log. P.	SD	Stat. P.	SD
0	0,33	0,04	0,27	0,03	0,46	0,20	0,22	0,05
25	0,35	0,08	0,30	0,04	0,49	0,05	0,26	0,04
50	0,59	0,13	0,50	0,08	0,79	0,36	0,27	0,08
100	0,81	0,04	0,70	0,14	0,74	0,22	0,30	0,05
150	1,22	0,51	0,90	0,31	1,14	0,64	0,43	0,20

**Tab. 20 Oxidierte Glutathion-Gehalte (GSSG) von *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 unter Zn(II)-Belastung in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 5)**

Zn-Konz. [ $\mu$ M]	H4-2-4				H8-2-1			
	GSSG [ $\mu$ mol/g TM]				GSSG [ $\mu$ mol/g TM]			
	Log. P.	SD	Stat. P.	SD	Log. P.	SD	Stat. P.	SD
0	0,27	0,13	0,16	0,04	0,27	0,07	0,25	0,07
50	0,33	0,12	0,15	0,02	0,38	0,15	0,29	0,06
100	0,42	0,15	0,14	0,02	0,85	0,34	0,32	0,11
250	1,14	0,57	0,23	0,11	1,83	0,44	0,80	0,38
350	1,46	0,09	0,53	0,11	1,98	0,47	1,12	0,49
500	2,94	1,72	1,27	0,14				

**Tab. 21 Intrazellulärer Sulfidgehalt von *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)-Belastung in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 3-6)**

Cd-Konz. [ $\mu$ M]	H4-2-4				H8-2-1			
	Sulfid-Gehalt [ $\mu$ mol/g TM]				Sulfid-Gehalt [ $\mu$ mol/g TM]			
	Log. P.	SD	Stat. P.	SD	Log. P.	SD	Stat. P.	SD
0	0,57	0,32	0,22	0,05	0,32	0,15	0,25	0,11
25	1,38	0,52	0,70	0,06	0,54	0,14	0,33	0,08
50	2,31	0,96	1,32	0,18	1,08	0,63	0,54	0,28
100	4,75	1,38	3,31	1,72	2,72	0,67	2,18	0,71
150	8,49	3,28	9,87	5,50	7,27	1,11	9,46	5,41

**Tab. 22 Phytochelatin 2 Gehalte in *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)-Belastung in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 4)**

Cd-Konz. [ $\mu$ M]	H4-2-4				H8-2-1			
	PC <sub>2</sub> [ $\mu$ mol GSH-Äquivalent /g TM]				PC <sub>2</sub> [ $\mu$ mol GSH-Äquivalent /g TM]			
	Log. P.	SD	Stat. P.	SD	Log. P.	SD	Stat. P.	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
25	0,18	0,02	0,16	0,01	0,00	0,00	0,12	0,04
50	0,45	0,12	0,44	0,20	0,07	0,03	0,32	0,14
100	1,31	0,53	1,33	0,62	1,15	0,25	1,17	0,15
150	1,20	0,47	1,66	0,38	3,97	1,12	3,49	1,21

**Tab. 23 MT1\_HL in *H. lugdunensis* H4-2-4 und H8-2-1 unter Cd(II)- Belastung in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase (14 °C, 120 U/min, dunkel) (n = 4)**

Cd-Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	H4-2-4				H8-2-1			
	MT1_HL [Peakfläche/100000/g TM]				MT1_HL [Peakfläche/100000/g TM]			
	Log. P.	SD	Stat. P.	SD	Log. P.	SD	Stat. P.	SD
0	24,41	7,95	0,00	0,00	58,50	24,60	0,00	0,00
25	58,90	30,10	126,10	31,40	526,50	99,50	203,50	99,70
50	82,90	27,50	206,70	75,40	608,20	337,40	286,20	102,40
100	155,60	58,40	280,10	177,90	612,80	195,30	237,40	25,70
150	191,40	91,60	220,70	29,80	429,00	28,60	244,20	63,30

**Tab. 24 Beeinflussung der Biomasseproduktion von *H. lugdunensis* H4-2-4 unter 100  $\mu\text{M}$  Cd(II)- und 250  $\mu\text{M}$  Zn(II)-Stress in Abhängigkeit von der  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Konzentration in der logarithmischen Wachstumsphase (n=4-5)**

$\text{SO}_4^{2-}$ -Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	Trockenmasse [mg/ mL]					
	Kontrolle + $\text{SO}_4^{2-}$		Cd(II) + $\text{SO}_4^{2-}$		Zn(II) + $\text{SO}_4^{2-}$	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
0	2,14	0,06	0,69	0,17	0,82	0,21
0,5	2,19	0,10	0,78	0,17	1,45	0,36
1	2,18	0,04	0,84	0,17	1,84	0,17
2	2,23	0,07	0,86	0,18	2,13	0,02
5	2,29	0,05	0,97	0,15	2,23	0,05
10	2,29	0,04	1,14	0,05	2,31	0,06
20	2,31	0,06	1,30	0,11	2,41	0,06

**Tab. 25 Beeinflussung der Biomasseproduktion von *H. lugdunensis* H4-2-4 unter 100  $\mu\text{M}$  Cd(II)- und 250  $\mu\text{M}$  Zn(II)-Stress in Abhängigkeit von der  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  -Konzentration in der logarithmischen Wachstumsphase (n=3)**

$\text{Mg}^{2+}$ -Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	Trockenmasse [mg/ mL]					
	Kontrolle + $\text{Mg}^{2+}$		Cd(II) + $\text{Mg}^{2+}$		Zn(II) + $\text{Mg}^{2+}$	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
0	2,21	0,06	0,69	0,17	0,52	0,11
0,5	2,29	0,04	0,69	0,03	0,78	0,06
1	2,29	0,05	0,76	0,03	0,94	0,03
2	2,23	0,07	0,78	0,04	1,11	0,11
5	2,18	0,04	0,94	0,02	1,18	0,10
10	2,19	0,10	1,06	0,08	1,17	0,07
20	2,14	0,06	1,24	0,06	1,30	0,14

**Tab. 26** Beeinflussung der Biosorption von 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) und 250  $\mu\text{M}$  Zn(II) in Abhängigkeit von der  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  - und  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  -Konzentration im Medium durch *H. lugdunensis* H4-2-4 in der logarithmischen Wachstumsphase ( $\text{Mg}^{2+}$ : n=3;  $\text{SO}_4^{2-}$ : n=4-5)

Zusatz-Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	Biosorption [ $\mu\text{mol/g TM}$ ]							
	$\text{Cd(II)} + \text{SO}_4^{2-}$		$\text{Zn(II)} + \text{SO}_4^{2-}$		$\text{Cd(II)} + \text{Mg}^{2+}$		$\text{Zn(II)} + \text{Mg}^{2+}$	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
0	27,33	11,27	42,62	5,93	27,33	11,27	42,62	5,93
0,5	25,42	2,86	35,76	3,56	25,47	1,38	42,49	4,58
1	24,34	4,97	21,85	2,16	19,23	1,12	40,49	3,24
2	21,10	3,59	16,63	2,07	17,73	2,84	32,33	5,33
5	17,34	1,73	14,21	2,07	13,98	1,85	20,11	6,69
10	8,58	1,05	10,95	1,32	12,29	1,04	12,42	2,26
20	3,74	1,32	4,05	2,44	10,69	0,58	8,49	1,32

**Tab. 27** Beeinflussung der Akkumulation von 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) und 250  $\mu\text{M}$  Zn(II) in Abhängigkeit von der  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  - und  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  -Konzentration im Medium durch *H. lugdunensis* H4-2-4 in der logarithmischen Wachstumsphase ( $\text{Mg}^{2+}$ : n=3;  $\text{SO}_4^{2-}$ : n=4-5)

Zusatz-Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	Akkumulation [ $\mu\text{mol/g TM}$ ]							
	$\text{Cd(II)} + \text{SO}_4^{2-}$		$\text{Zn(II)} + \text{SO}_4^{2-}$		$\text{Cd(II)} + \text{Mg}^{2+}$		$\text{Zn(II)} + \text{Mg}^{2+}$	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
0	23,39	2,96	46,76	14,57	23,39	2,96	46,76	14,57
0,5	23,32	2,00	46,79	0,24	23,69	3,16	44,52	6,72
1	21,32	3,92	36,15	3,31	20,60	1,78	44,36	4,61
2	15,29	3,81	24,39	2,40	15,13	1,05	35,69	8,24
5	11,61	2,86	17,01	1,87	13,04	3,49	34,14	4,59
10	8,31	1,76	12,39	2,36	12,48	0,83	29,14	6,34
20	2,44	1,05	11,99	3,36	11,19	1,11	25,71	6,00

## I. Sequenzinformation zur Analyse der 18S rDNA

Nachfolgend sind die erhaltenen partiellen 18S rDNA Sequenzen für die *Heliscus lugdunensis* Stämme H4-2-4, H8-2-1 und H6-06-10 aufgeführt.

### *Heliscus lugdunensis* H4-2-4

GGAAGGGATGTATTTATTAGATTAAAAACCAATGCCCTTCGGGGCTCCTTGGTGATTTCATGATAACTCCTCGAAT  
 CGCATGGCCTTGTGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTTCCCTATCAACTTTCGATGTTTGGGTATTGGCCAAA  
 CATGGTTGCAACGGGTAACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAACGGCTACTACATCCAA  
 GGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAAATACTGATACAGGGCTCT  
 TTTGGGTCTTGTAATTGGAATGAGTACAATTTAAATCCCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA  
 GCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGTGGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGG  
 GCCTGGCTGGCCGGTCCGCTCACCGCGTGTACTGGTCCGGCCGGGCTTTCCCTCTGTGGAACCCCATGCCCTT  
 CACTGGGTGTGGCGGGGAAACAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGCTCCAGGCAGGCCTATGCTCGAATA  
 CATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTGTGGTTCATTTTGTGGTTTCTAGGACCGCCGTAATGATTAATAG  
 GGACAGTCGGGGGCATCAGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTTATTGAAGACTAACTACTGCGAAA  
 GCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAGGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTC  
 TTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGACGATGTTATTTTTTGACTCGTTCGGCACCTTACGAGAAATCAA  
 AGTGCTTGGGCTCCAGGGGGAGTATGGTGCAGAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGG  
 GTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACAGGTCCAGACACAATGAGGATTGACAGATTG  
 AGAGCTCTTTCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTG  
 CGATAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATAGCCCGTATTGCTTTGGCAGTACGCTTCCCTTAGAGGGACTA  
 TCGGCTCAAGCCGATGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTATGGGCCGACGCGCGC  
 TACACTGACGGAGCCAGCGAGTACTCCCTTGACCGAAGGTCCGGGTAATCTTGTAAACTCCGTCGTGCTGGGG  
 ATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATCCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTGATTACGT  
 CCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCTGCTACTACACGATTGAATGGCTCAGTGAGGCGTCCGGACTGGCCAGA  
 GAGGTGGGCAACCACCACTCAGGGCCGGAAAGCTTCCAAACCTTGGTCATTAGAGGGAA

### *Heliscus lugdunensis* H8-2-1

GGAAGGGAGTATTTATTAGATTAAAAACCAATGCCCTTCGGGGCTCCTTGGTGATTTCATGATAACTCCTCGAATC  
 GCATGGCCTTGTGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTTCCCTATCAACTTTCGATGTTTGGGTATTGGCCAAAC  
 ATGGTTGCAACGGGTAACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAACGGCTACTACATCCAAG  
 GAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAAATACTGATACAGGGCTCTT  
 TTGGGTCTTGTAATTGGAATGAGTACAATTTAAATCCCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAG  
 CAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGTGGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGGG  
 CCTGGCTGGCCGGTCCGCTCACCGCGTGTACTGGTCCGGCCGGGCTTTCCCTCTGTGGAACCCCATGCCCTTC  
 ACTGGGTGTGGCGGGGAAACAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGCTCCAGGCAGGCCTATGCTCGAATAC  
 ATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTGTGGTTCATTTTGTGGTTTCTAGGACCGCCGTAATGATTAATAGG  
 GACAGTCGGGGGCATCAGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTTATTGAAGACTAACTACTGCGAAAG  
 GAtTTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAGGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACCATCAGATaCCCTCGTAGtC  
 TTAACCATAAACTTATCCCGACTAGGGATCGGACGATGTTATTTtTGGACTCGTTCGGCaCCTTACGAgAAAtCA  
 AAGTGCtTGGgCtCCAGGGGACTATGTTCCCAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGG  
 GTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACAGGTCCAGACACAATGAGGATTGACAGATTG  
 AGAGCTCTCTTCCCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGCAtGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGTTAATT  
 GCGATAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATAGCCCGTATTGCTTTGGCAGTACGCTGGCTTCTTAGAGGGACT  
 ACTCGGTCAAGCCGAATGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTaGATGTTCTGGGCCGACGCGC  
 GCTACACTGACGGAGCCAGCGAGTACTCCCTTGACCGAAGGTCCGGGTAATCTTGTAAACTCCGTCGTGCTGG  
 GGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATCCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTGATTAC  
 GTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCTGCTACTACCGATTGAATGGCTCAGTGAGGCGTCCGGACTGGCCAG  
 AGAGGTGGGCAACCACCACTCAGGGCCGGAAAGCTTCCAAACCTTGGTCATTTAGAGGA

***Heliscus lugdunensis* H6-06-10**

GGAAGGGATGATTTTATTAGATTAAGAACCAATGCCCTTCGGGGCTCCTTGGTGATTCATGATAACTCCTCGAAT  
CGCATGGCCTTGTGCCGGCGATGGTTCATTCAAAATTTCTTCCCTATCAACTTTCGATGTTTGGGTATTGGCCAAA  
CATGGTTGCAACGGGTAACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAAACGGCTACTACATCCAA  
GGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATACTGATACAGGGCTCT  
TTTGGGTCTTGTAATTGGAATGAGTACAATTTAAATCCCTTAACGAGGAACAATTTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA  
GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGTGGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGG  
GCCTGGCTGGCCGGTCCGCCTCACCGCGTTACTGGTCCGGCCGGGCCCTTCCCTCTGTGGAACCCCATGCCCTTC  
ACTGGGTGTGGCGGGGAAACAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAAAGTGCTCCAGGCAGGCCATGCTCGAATAC  
ATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTGTGGTCTATTTTGTGGTTTCTAGGACCGCCGTAATGATTAATAGG  
GACAGTCGGGGGCATCAGTATTCAATTGTCAGAGTGTGAAATTTCTTGgATTTATTGAAGACTAACTACTGcGAAA  
GCAtTtgCCAAGGATGtTTtCATTAAATCAGGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGAtCAGATACCGTCGTAGTC  
TTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGACGATGTTATTTTTTACTCGTTCGGCACCTTACGAGAAAtCAA  
AGTGCTTGGGCTCCAGGGGAGTATGGTCCGCAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGG  
GTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGGAAACTCACCAGGTCCAGACACAATGAGGATTGACAGATT  
GAGAGCTCTTTCTTGATTTtGnGGGtGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGGGGAGTGATTTGTCTGTTAATTG  
CGATAACGAACGAGCCTTAACCTGCTAAATAGCCGTATTGCTTTGGCAGTACGCTGGCTTCTTAGAGGGACTAT  
CGGCTCAAGCCGATGGAAGTTTGGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCT  
ACACTGACGGAGCCAGCGAGTACTCCCTTGACCGGAAGGTCCGGGTAATCTTGTTAAACTCCGTCGTGCTGGGGA  
TAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATCCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCGTTGATTACGTC  
CCTGCCCTTTGTACaCACCGCCcGTCgCCGCACCG

## II. Informationen zur Molekularbiologie von Glutathion- und g-Glutamylcysteinsynthetase

1. Multiples CLUSTAL W (1.81) Teilsequenz-Alignement der Glutathionsynthetase von *Pichia angusta* (*Hansenula polymorpha*) AF397211, *Schizosaccharomyces pombe* AF448236 und *Saccharomyces cerevisiae* Y13804. Die schraffierten Bereiche geben konservierte Bereiche an, aus denen primer-Sequenzen abgeleitet wurden.

<i>Pichia angusta</i>	GCGACGACGTGAGACTTGTGGTCGGGAACAAGGATCCGATGCCAGAAGACG-TGCCATG	72
<i>S.pombe</i>	ATGTAAAAGCAATTCTTTTGATCTT--ACTTGGTTTCTTAGTAAATATTTGATATCTTTG	238
<i>S.cerevisiae</i>	-----ACAATATAACCTAA	14
	* * * *	
<i>Pichia angusta</i>	GATAACGCGGCATTTCGTA-TATCTTGCAGCC-CTTCTTTTCTGAAGCTC-----GGTCA	124
<i>S.pombe</i>	CTTACCAATACATCATTACTAGTTTACCACCACCAACTTCGTATATCTTTGTACAAGCGA	298
<i>S.cerevisiae</i>	TCTAGCTTTTATCCAATGGACTTGACTATCATCAGTACTAGAAAGTGT-----CA	65
	* * * * * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	CCTCGAGCTT--GGTTTCCTTTTTCGTGTCGACAGGAGCC-CCAAATCCCAGCACCTGGC	181
<i>S.pombe</i>	AATCGAACGTTGGAGTTCCTTGTCTAACATTAAGTATT-AGACTTCTAAGTGTAACT	357
<i>S.cerevisiae</i>	TTTCCATCAGTACGCTTTTTTGGCCGGGTTAGCTAGTGCTGACAAATAGTTGAACCTTCT	125
	* * * * * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	CAAAA-TGAACAGACAT---GGCAAAGAGTG---AAGAACGAGAAGTGTTTTGTGTTTGA	233
<i>S.pombe</i>	TAAAGGTTTACATTTATTTTGGTAATAGTAGTTTGACGCTGTGAAC TAATTTCTTTC--	415
<i>S.cerevisiae</i>	TGAAT-TATCTAAATGCTCCCAAATCAACC-----ACATCCATATACGATCCTC-----	174
	* * * * * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	TTAAAATTTTGTACTAGCCGGG-TAAACTATTGCGAAATATTTAAAATTACAAATCAATTT	292
<i>S.pombe</i>	TCCAGCATATATATGCGTTAAT-CGTGTTCTAGCAGTATATTTAAATGCTTTTGGGGTT	474
<i>S.cerevisiae</i>	-CAAAGTAGCAAAGTGCACCTTCAAGCAATATAGGAAG---AAAGCACTACTCCTATA	230
	* * * * * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	AGACACCCATGGCTCTCTCTTTTCCA---GATCTATCGGGGGCTGCCTTAGATGACCTTG	349
<i>S.pombe</i>	TTATTTTAGTAGATGTATTTATCACAATGGAAATTGAGAAGTATACACCGGAGCAAATTG	534
<i>S.cerevisiae</i>	AAATATGGCACACTATCCACCTTCCA-----AGGATCAATTGAATGAATTGA	277
	* * * * * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	TGGAG-----AAGCTCAC-ACACTACGCCATTTCCAATGGCCTGGTGATCTATCCAC	400
<i>S.pombe</i>	AAGAGCTTGAAAAGGCGCACGAGACTTTGCATTTGCCATGGGGTAGT-ATTCACCGAG	593
<i>S.cerevisiae</i>	TCCAG-----GAAGTTAAC--CAATGGGCTATCACTAATGGATTATCCATGTATCCTC	328
	* * * * * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	C---CGGCTTCAAGGCTTACCAG----C-CGTCGGTGGCA--CCGGTTACCCTTTATCC	449
<i>S.pombe</i>	CTGTCTAGTTTCAAGGAGGGGAGGAATAT-TGCTACTCAAATTCCTATTACATTATTTCC	652
<i>S.cerevisiae</i>	C---TAAATTCGAGGAGAACCATCAAATGCATCGGTGTCA--CCAGTAACTATCTATCC	383
	* * * * * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	CACG-CCGTTTCCCAGAGCCCAATTTCTCAAAGGAATTGCCATCTCGACGAAATTCAACG	508
<i>S.pombe</i>	CTCGGTCAATCCTCATGGTGCATTTGTGCGA-GGCTGTCTCTGTACAGAAGGCATACAACA	711
<i>S.cerevisiae</i>	AACC-CCAATTCCTAGGAAATGTTTGTAGTGGCCGTTCAAATACAACCGGTATTCAATG	442
	* * * * * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	AATTGTATAGTCGTGTGTGGTGGACAAGAGCTGGCTCAAAC-----AAGTGA	556
<i>S.pombe</i>	AACTTTACGCTAAAATTGCAAACGACTATGAATTTCTTAGACTTCATTTAC---AATCGA	768
<i>S.cerevisiae</i>	AATTATACGCCCGTATTACCCAAGATATGGCCCAACCTGATTTCTATTATACATAAAACAA	502
	* * * * * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	TTGCAGA-TCTCTCGAAAT-ACGACCGCAATTTACAGGCATGTTGCA-----CAAGACA	609
<i>S.pombe</i>	TTACAAAGTATGATGAGTTTATGAACAACTTTGGAATCTGTATCAAAAGCATCGCGAAG	828
<i>S.cerevisiae</i>	CTGAAGCGTTAGCTCTATCAGATTCCGAGTTTACTGGAAAACCTGTGGTCTCTATACCTTG	562
	* * * * * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	TACTTGGAGGCAGAGCCCAAGATTG--TACAACCGGTGTCGCTGGGGCTGTTTAGGTCCG	667
<i>S.pombe</i>	CTGTTGCTCACTTAAAGGAAAATCAATTTCAACCCTTAAGCTTGGGAGTTT TAGGTCCG	888
<i>S.cerevisiae</i>	CTACCTTAAAATCTGCACAGTACAAAAGCAGAATTTTAGGCTAGGTATATTAGATCAG	622
	* * * * * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	ACTACATGTTGGAT---ACGGTATCCAACCTCGAT--CAACAGGTTGAGTTCAACACAG	721
<i>S.pombe</i>	ATTATACGGTCCATCAAGACGATAGTTTATTGGTTGTAACAGGTTGAATTTAATACGA	948
<i>S.cerevisiae</i>	ATTATTTGATTGATAAGAAAAAGGGTACTGAACAGATTAAAGCAAGTCG-GTTTAATACAG	681
	* * * * * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	TTAGCGTTTCCTTTGGTGGTCTTTTCGCGGAAAGTGGGCCAGCTACATAGCTTTTCTCAACT	781
<i>S.pombe</i>	TTTCTGTGTCCTTTTGGAGGTGTTTCAAAGCCGTATCCAATTTGCACGCTACTGTTCCC	1008
<i>S.cerevisiae</i>	TGTCAGTGTCAATTTGCAGGCCTTAGCGAGAAAGTTGATAGATTGCACTCTTATTTAAATA	741
	* * * * * * * *	

<i>Pichia angusta</i>	CCCAGGGTCTCTACGG-CAGACCGCAGTACTACCAAGAGGCTGACTTGCCAACCAGCCAG	840
<i>S.pombe</i>	AATCGGGTTTGTATCG-AAAGCCTCT-TACTACAAATTATTTAACA-GTGAACACGTCTG	1065
<i>S.cerevisiae</i>	GGGCAACAAGTACGATCCTAAAGGACCAATTTATAATGATCAAATATGGTCAATTTCTG	801
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	TCTATGGA---TGGACT----TGCCAA-----GGGGCTTCTTGAAGCGGT-----GAA	881
<i>S.pombe</i>	TCTCTGGAATTTGCACTGGTATATCAAATGCTGTAGATGCCTACCGTGATTACGTTAAAA	1125
<i>S.cerevisiae</i>	ATTCAGGA---TACCTTT---TGCTAA----GGCATTGGCCAAAGCTGT-----GGA	844
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	ATACTACGAAACAAGCGAAAA-----AACAGCGTCCA--CCATTGTTCTCTTTGTGTTG	931
<i>S.pombe</i>	ACATTACAAGCAAAAATGAATATTGCTTCTGATAACACGAAACCCATTGTTTATTGTTG	1185
<i>S.cerevisiae</i>	ATCGTATAAGTCACAACAAAGTT-CTTCTACAAC TAGTGATCCTATTGTCGCATTCAATG	903
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	TTCAGCCTGGAGAAAGAAACGTGTTTGACCAGCGGCCATTGAATACAGCTTGTTTGCCA	991
<i>S.pombe</i>	TGAAGGGCGGAGAACGAAACATTACGGACCAACGCACCCTGGAATATGAGTTGCTTAATC	1245
<i>S.cerevisiae</i>	TGCAAAGAAACGAGAGAAATGTGTTTGATCAAAGGCTCTTGGAAATGAATCTGTTGGAAA	963
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	AA--GGAGTTAAATCGGAGCGAGTCAAAATTTGACAAGGTCACTTCT---TCAGTGAAGG	1045
<i>S.pombe</i>	GATTCCATGTGATATCCAAACGTATTGACATTGCTGAACTCAATTCC---CTCATACATG	1302
<i>S.cerevisiae</i>	AATTCGGTACCAAATCTGTTAGGTTGACGTTTGATGATGTTAACGATAAATTGTTTCATG	1023
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	TGCCTCCTCCAGTAAAGCTTTTCTACAAGGAACAG-----GAGGTGGCCGTG	1092
<i>S.pombe</i>	ATAAATCATCCAACAACTTTAC-ATGAAACTAGTTTTACCACTTATGAAGTTGCAGTC	1361
<i>S.cerevisiae</i>	ATGATAAAACGGGAAAGCTTTTC-ATTAGGGACACA-----GAGCAGGAAATAGCGGTG	1076
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	GTGTACTATCGTTCAGCATACGCTCCTAGTGAGTACAACCATCCAGATTCTGGAAAGCA	1152
<i>S.pombe</i>	GTTTATTATCGAGTCGTTTATGCATTGGATGATTACCCCTTCTCAAGAAGCATGGGATATG	1421
<i>S.cerevisiae</i>	GTTTATTACAGAACGGGTTACACAACCACTGATTACACGTCGAAAAGGACTGGGAGCA	1136
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	CGCCTGCTACTTGAAACAATAAGCGGTCAAGTGCCCGTCTTGTGGTCCAACCTGAGT	1212
<i>S.pombe</i>	CGTTTAACTATTGAGAATACGTTGGCTATAAAAATGCCCTTCTATTTCAACGCATTTAGCT	1481
<i>S.cerevisiae</i>	AGACTATTCTCGAAAAAAGTTTCGCAATAAAGGCCCCAGATTTACTCACTCAATTATCT	1196
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	GGTGCCAAGAAAGTGAACAACCTTCTGACTGACCGGGCGGTGCTGCAGAAA---TACGG	1268
<i>S.pombe</i>	GGCTCGAAGAAAATTCACAAGTACTTGTGAAAAGTAATGCATTAGAAAAGATTTTATAGAG	1541
<i>S.cerevisiae</i>	GGTCCAAGAAAATTCAGCAATTTGTTGACAGATGAGGGCGTATTAGGTAATAACATCTCC	1256
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	ATTTTTGG-ACGAGGAAC--TTCTCTCCA--CGTTCGTGCGAATCTACCCACTGGATTTCG	1323
<i>S.pombe</i>	GGTGACGA-ATTACAAGCAGTACGTTCTA--CCTTCGCTGATATGTATCCACTTGATGAT	1598
<i>S.cerevisiae</i>	GATGCTGAGAAAAAGAGTAGTTTGTAAAAACTTTTGTCAAATATATCCCTTGGATGAT	1316
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	AGCGAGCAGGGCCAGATTGCAAAAAAGCTTGTGTTTCGAGCATTGGAACGGTTTGTGTTG	1383
<i>S.pombe</i>	ACACCTCGAGGAAAGGAAGGTATTAACCTCGCATTGCAAAAACCCGAGACTTTGTCTTA	1658
<i>S.cerevisiae</i>	ACGAAGCTTGGCAGGGAAGGCAAGGCTGGCATTAAAGTGAGCCCTCTAAATACCTGTTA	1376
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	AAGCCCCAGAGAGAAGCGGCGGAAACAATATCTACAAGCAGGACATTCTGGCTTTTTTG	1443
<i>S.pombe</i>	AAGCCTCAACGAGAGGGTGGTGGAAACAATACGTATGGAAAAGACATCCCTGGTTTACTC	1718
<i>S.cerevisiae</i>	AAACCACAGCGGGAAGGTGGGCGGAAACAATGTTTATAAAGAAAATATTCTAATTTTTTG	1436
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	CGCAGCTTGGACGAGAAGGAATGGGAGCGTACATTTTGATGGAGCTATTGTTCCCTG--	1501
<i>S.pombe</i>	AGCAAAAATGCCTCAGGAAGAATGGGACTCTTACATTTTAAATGCGCTATATAAATGCCG--	1776
<i>S.cerevisiae</i>	AAAGGTATCGAAGAACGTCACCTGGGATGCATATATTCTCATGGAGTTGATTGAACCAGAG	1496
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	CTGT-TCACGACAACCACATTCTGAGGAATGGCGAAGTTCTCGACGAGAGTATTGTGAGC	1560
<i>S.pombe</i>	TTCCATCACAA-AACTATATTTTGAAGGGAGAAAAGACCTGAAAAGTTTGTATGTCGTCGAC	1835
<i>S.cerevisiae</i>	TTGAATGAAAATAATATATATTACGTGATAACAAATCTTACAACGAACCAATCATCAGT	1556
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	GAGCTGGGGATGTTTGGCAGCTGCTCTTCAACGAGACAGACGGCACGATCCTCCACAAT	1620
<i>S.pombe</i>	GAAATGGTATTTTAGGTACGATCGTTTGGAAACATCAAGACTGACGAAGTCGTTCAAAAT	1895
<i>S.cerevisiae</i>	GAACTAGGAATTTATGTTGCGTTCTATTTAACGA-----CGAGCAAGTTTATCGAAC	1610
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	GACTATGCCGGCTACCTGCTGCGGTCCAAAAC TAGCACGTCCAACGAGGGAGGGTTGCT	1680
<i>S.pombe</i>	GGACAGTCGGGTTTCAATTTGCTGACCAAAACCCAAAAAACTAATGAAGGTGGTGTGCA	1955
<i>S.cerevisiae</i>	GAATTTAGTGGCTCATTACTAAGATCCAAATTAATACTTCAAATGAAGGTGGAGTGGCG	1670
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	GCTGGGTTTGGCTGCGTGGACAGTTTGTATCTACACGA-----TTAGA-----AG	1725
<i>S.pombe</i>	ACAGGCTATGCTTCTTATCTAGTATTGAACCTTCTGA-----ATAAATTTTGTGTAT	2008
<i>S.cerevisiae</i>	GCAGGATTCGGATGTTTGGACAGTATTATTCTTTACTAGGTGTACATGTACTATACACAT	1730
	* * * * *	

```

Pichia angusta  AGAACATATCAAAACGAGGCG-----GTGAAACGAG-AGT--ACCTCTCGTCGG--CA 1773
S.pombe         CAGTTACACCAGGTCAAAGGTATTTAATGTGAGACAAA-CGTGAAGATGTTGATAA--AA 2065
S.cerevisiae    AGATGCTAGGAAGATGATGCTAGAACTTGATTAACAATTAGTTAAGGAATATATAATCAC 1790
                * * * * * * * * * *
Pichia angusta  GTCGCCAT-TGGAATTGGTCTCGCATTCAACGCGCCAATTGGCGGCGTGC----- 1822
S.pombe         TTTTTGATCTGAAACACGTTGCTACTTCAAGATATCAATAGACATGATAGACAAGATGCG 2125
S.cerevisiae    ACTTCTACATAAATTTGCTGTTTTAGGCTCATTCCTTCTTTTCCACCTTTAGTAGCG 1850
                * * * * * * *

```

**2. Multiples CLUSTAL W (1.81) Teilsequenz-Alignent der g-Glutamylcysteinsynthetase von *Pichia angusta* (*Hansenula polymorpha*) AF435121, *Candida albicans* AF176677.1, *Saccharomyces cerevisiae* D90220 und *Schizosaccharomyces pombe* D55676. Farbig markiert sind konservierte Bereiche**

```

Pichia angusta  -----
C.albicans      TTGAGTAATTTTCATTTTATTAACACATGAATATTGGTCAATTGGAAAAACAAAAAATAGG 77
S.cerevisiae    TGCGTTATCGGGTTCTTACTTTTACAGTGATCTTGCTCATCACGGAAGTGAACCAATCG 300
S.pombe         CAAAAAAGTAAACAAGGAAAGAAGCTCACCTAGATTAGTAGGTGAGAATACCGAAGT 75

Pichia angusta  -----
C.albicans      GGACCATACAGATAGTCCAAGAAATGGGGAAAGAGAGGGATAGGGAGG-GATAGGGAGAG 136
S.cerevisiae    TAGCTGTTCCAACTATCTTCTGGTGAGGATTTACGGTATGATCATGCTGGTAAGCTTCG 360
S.pombe         GCTGCTATTATGGGTATTAGTAGCTTTGGCTCAACTAATTTATAAGA-----AATCAAA 130

Pichia angusta  -----
C.albicans      GCTCAAAAAAATAAATACTCATGTGGCTAGTAACCAAATCTTTTCAAG-----ACAAG 189
S.cerevisiae    TTACTCATGCTTTGGTTGGCTTCTTGAAAGTGTCTAGTTCACCTTTATGCCCGTTATAAA 420
S.pombe         AATTTGATATTTCTATATTTTTTTTCGTTAATATTTTGAATATTGTGTTTACACATATCCA 190

Pichia angusta  -----
C.albicans      AAGAAGATTGTGTAGTGATCCAGTAGAATACATATATAATAA---TAATTTGTTTGTGCT 246
S.cerevisiae    CATAAACTTTTACAGGGTTCTTCTTTGATCACCCTTTTGTTTAATCTTATGAATCCAAGGG 480
S.pombe         ATTAGTGTTTTGGGTTTTACGAAAGCGCAAGGAATTCGTTAAAGGTGTTTAAATGCGTCAA 250

Pichia angusta  -----
C.albicans      ATAGTGACAAT-ATAGCAATAGTAAAAAAGAAAATAGTAAACTTGAATCAAATCTACCA 305
S.cerevisiae    ATTTTATCGGTCAAAGGGGAAATCAATGCGAAAGACAGTAATGATGAGAGAAAACTCTC 540
S.pombe         CACTTCTGAGTTTACACTGTCAAGTTTCATGTGCTTAGAAGGGAGGAATATATTTTTTCAC 310

Pichia angusta  -----
C.albicans      ACTACTAGATAAAT--AATTGATTCAATTGCTATGTGCGTATACAAGGGAAGTTGTTAGC 363
S.cerevisiae    CGTAACCACCAAGTTTGGTTTCAAGCGCAGCAGGATTTTATCGATTATCGAGAAAAATACC 600
S.pombe         AATGATTAGTAGCATAAAGCAAAATTAATAAGATCATGAATCTACAGAGGAATAAATACC 370

Pichia angusta  -----
C.albicans      TGATTAT--ACCACGATATGTTTGTGATTGTACTATTGTGTTATTTTAAATGGTAGAA 421
S.cerevisiae    TGTATATCTACATTTCTATGTCAGTGATATATACTTCTTAGATAAGTTATGCCACCAGTG 660
S.pombe         TGCTTGG--TTCACACGGCATAAGTTTTGTTACAATACTATATCAACGTTCAACCTCCAAA 428

Pichia angusta  -----
C.albicans      ATCAGTTCCCGAAAAGATTGGTTTATTCCGGTACGAG-ACGAAAAGAGGGAGAAGGAGG 480
S.cerevisiae    CATAACGCTTACGCACACACAGTATTCTTGTGCACACG-CCTGTTACTTCTTGCAGACAT 719
S.pombe         TGCGGCGGTAATATCCGTATTTGCGATACCGTACGAGGACTGTTAGTAATATAAGCGAA 488

Pichia angusta  -----
C.albicans      GAAAGAAAAGATTTGGCATTG-TGTTGGAAAGATTTTATTACCGTAGATTAATTGTGTTG 539
S.cerevisiae    CAGACATACTATTGTAATTCA-AAAAAAGCGAATCTTCCCATGCCTGTTGCTGCTC 778
S.pombe         GTAATTTTTCGATGGTACATAGCTCACGTAATCATTTCATATATGATTTTAAATTCCTTC 548

Pichia angusta  -----TCTAGA-----ATCAGCCTCCACATA--AGCCAGCGAGCAC 34
C.albicans      T-----AGTATTTTGATACCAGA-----AGAATTTGACCAATA--ATTTTGTCTTTT 585
S.cerevisiae    T-----TGAATGGCGACAGCCTATTGCCCCAGTGTTCCCTCAACA--ACCTTGGTAGTTG 831
S.pombe         ACTTAGATTATTTGAACAGTTACATTACAAACTACTGCTTCAGTATCAAGTGGATGGAAG 608
                * * * * *

```

<i>Pichia angusta</i>	GGGCG----CCTGCGT-CTGCACAAGGTATCCTGCAGTCGTGCGG-CTGGCAGTGTACC	88
<i>C.albicans</i>	AATCCTTATCTTGTGT-TAAAATACTTTGTCTTTTATTAAGAGAG-GAAACAATTTTACT	643
<i>S.cerevisiae</i>	GAGCGCAA-TTAGCGTATCCTGTACCATACTAATTCCTTCTGCC-CAACGACGGCTGCC	889
<i>S.pombe</i>	AAACCTGGAATTGAAGTGTGCAAACTTACTAAACCGTTACTGCTTCAAACCTTTTGTACT	668
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	GC-T-----TGTCTGCAAG-TT----GGGGCCCA-----	111
<i>C.albicans</i>	GTAT-----TATATCTATT-TTCTATAAAAACTCATCAATAGTGAA-----	682
<i>S.cerevisiae</i>	AT-T-----AGTCAGCATG-GCGCGCACGTGACTACAACCTGTGGC-----	927
<i>S.pombe</i>	ATTTGTAAGATTACAATGGGTTTATTAGTACTCGGGACTCCTTTAGATTGGCCAGAATCT	728
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	-GAACAAGCTCGGATCCTGCCTCCAGCGT-----AAATTGGTC-T-CCGGGAAGTAACGA	163
<i>C.albicans</i>	AGNGTAATATGTTAACCTCTCTTACAAATAACAAAATTGCTC-CACTATAAAGTTCAAT	741
<i>S.cerevisiae</i>	TGGAAACCTTTTCTGCTCCCGGTTTTTTCAGTGAGCCGACTC-TACTACAATGCTTTTT	986
<i>S.pombe</i>	AAAAAATATTGTGATTATGTCGCTGAAAATGGTATAATGGTACGTGTCATTAGTAATGAA	788
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	TAGACATGG--CAGGTAGCAA--AAAAAAAAAAAAATGGAGCGGAAAAAATTGTACAGATC	219
<i>C.albicans</i>	TCAATTTAATTCAGCTCACAAACCAACGTATGTATACTTGTGATTGAATTGT---GACA	798
<i>S.cerevisiae</i>	CATTTTTCACTCAG-----AAAAACCTGCAAT-TTGCCAAAATTGGCCATGCTCTGT	1036
<i>S.pombe</i>	CAGCTAGTGGGCATTTGACATCTGAGTGCATTGATTATTTGAAAGCAAAATAGACGAGC	848
	** * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	AGACGCGTCGATCGACGCCACTCGCTGATAACCAAGCACCCGATGTAGTCA-----	271
<i>C.albicans</i>	AAACTATTTGGCAGATGCT-GCTTACAAATCCACTTGCATCACATTTAATAAAAATTTCTT	857
<i>S.cerevisiae</i>	GCCTCCCTTGACAAAGGACATCTTCCCTGTTTATAAACGGCG-GCTTACCAAAAAGTTGAA	1095
<i>S.pombe</i>	ATAACAATAAATGCTTCATTTCTTTCCGATCCTTCTTCCACTCTGATTGGATGTTTGT	908
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	----TTATTTGCTTGATCACCGAAATCAAGTGAGTGTACGACAACACCCAAACATGTG	327
<i>C.albicans</i>	TTTTTTTTTTTTTGTCTTCTTCTTTCATCTTCTTTCATTATATATATATATATCCACA	917
<i>S.cerevisiae</i>	GCTTGTCTTGCCTCTTATGAGTGGAGCAATCGATTATATTGAATCGTTGTGCTGGAGTA	1155
<i>S.pombe</i>	ATTTTTTAAATATGTCAAATAGTTTTGCGATTGTTTTATACTGTGATTGTTCAACTTTATG	968
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	GACAGCGGCCA-CCCGCG-CCTGAATGCGGATTTGTTAGCCGACT--TAAAAATGCAGC	383
<i>C.albicans</i>	GTTGAAAGTTAATCTTCT-AATTGATACTTACTTCTTT-CTTCCG--TCCCTTTCATCCT	973
<i>S.cerevisiae</i>	GTTGGATCTTTCACGTGGTCTCGAGTCACTTGTAGAAGCTGAAAA-TTGAGCAGATTTA	1214
<i>S.pombe</i>	A--AATTGTTGAAATTTTTTACGATCGCTTGTAGCTAAGTCTTTTTTATCTTTAGCAATTT	1026
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	ATTGCTTGTACGTGCTGACAATAAATTGAGAAAGGAAAA-ACTTTCCT--GAAAAACCT	440
<i>C.albicans</i>	ATTCACTCTTTC--TCTTTTAAATATTCAAGAAAATAATTCAAAAAAGAG--GAACCACTG	1029
<i>S.cerevisiae</i>	GTATAGGGCTAC--ATTGTAGGGTGGTTTATAGATATCGAAAATATACAT--ATAGAAGAA	1270
<i>S.pombe</i>	TTGCACATGTATG-ATACTTATATATCTAAAAAGCAAGATGTTCTACTTTGGGGGACGA	1085
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	TATCGACCATGGGTCTGCTCTCTGGGT-ACGCCTCTACATTGGAACGACTCCCCTCTC	499
<i>C.albicans</i>	TATT-ATCATGGGTCTTTTATCTATTGGT-ACACCTTTAAGTTGGGATGAATCGAAAAAG	1087
<i>S.cerevisiae</i>	TAAA----ATGGGACTCTTAGCTTTGGGC-ACGCCTTTCAGTGGTTTGGAGTCTAGGACG	1325
<i>S.pombe</i>	AATTGAATGTATAGTTG-TGTCTATGGATGATAAGAGTAAAAAGGCGCGAGT-GAGTCTC	1143
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	TATGCTGATCATGTGCGCACAAACGGTATCATTGAGCTGATAAACTGTTTCAACGCGGCA	559
<i>C.albicans</i>	TATAATAATCATGTTAGAACCATGGGATAACTCAATTGATTAACATTTTCAA-ACAACA	1146
<i>S.cerevisiae</i>	TACAAATGAACACATAAGGGATGAAGGTATCGAGCAGTTGTTGTATATTTTCCAAGCTGC-	1384
<i>S.pombe</i>	CGTCAGGAAGATATTT--TGAACGCCCTCGGTAATATGAGGAGACATTTAG----GCA	1196
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	CGAG-ACCGCAAGAATG-ACCCGTTTTTGTGGGGAGACGAAGTGG-----AATATATGCT	612
<i>C.albicans</i>	TGGATATCGTGAAGATG-ATGATATTTTATGGGGAGATGAAGTTG-----AATATATGTT	1200
<i>S.cerevisiae</i>	TGGTAAAAGAGACAATG-ACCCCTTTTTTGGGGAGACGAGCTTG-----AGTACATGGT	1438
<i>S.pombe</i>	TGTAGATTTTGGACCTGTATATGCCGCTTTGAGGAATGAAACCTGCCCAAAGAATATAGA	1256
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	GGTGAAGCT--GGACAGGGAGCACAAAGTTGCTCGTCTTGCATCAACA-AGGACCATC	668
<i>C.albicans</i>	AGTTGATTT--TGATGAAACCAAAAAACCTGCTAGATTATCAATTGATA-AAGATTATA	1256
<i>S.cerevisiae</i>	TGTAGATTT--TGATGATAAGGAGAGAAATCTATGCTCGACGTTTGCC-ATGACAAGA	1494
<i>S.pombe</i>	CGCCATTTTATCTGAAGTGGCTAAAAACCCGGCTGATTATGTGCAACGCATAGGAGGAAA	1316
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	TTTTGAAAGACCTTG-GCGAGAATGGCTCATCCTTTCAGGTTGGCGGTGAGTAATAATG--	725
<i>C.albicans</i>	TTATTAATGATTTAA-ATGACCCTGATAAATATTGCCAATAGCTGAAAAACAAGATG--	1313
<i>S.cerevisiae</i>	TACTCACTGAGCTTA-ATATGGAGGATTCGCCCTTTGTGAGGC-----TAACGATG--	1545
<i>S.pombe</i>	TTCAAACAAGATACTATAGAAATTACGAGTTCCACCAAAACCATGCGCAGAACCGGTT	1376
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	--TGGTGTCCACCCCGAGTACGGCAGATACATGATAGAAGCAACTCCGCTCCGGCCCTA	783
<i>C.albicans</i>	--TTAGTTATCATCCAGAATATGGTAGATTATGGTAGAAGCAACCCCGGCAAAACCATA	1371
<i>S.cerevisiae</i>	--TGAGTTTTACCCTGAGTATGGCCGGTATATGTTAGAGGCAACACCAGCTTCTCCATA	1603
<i>S.pombe</i>	CCCTACTTTCCATCCAGAATATGGTCTTATATGTTGAAAGTACACCAGGTGCGCCTTA	1436
	* * * * *	

<i>Pichia angusta</i>	CG-----ATGGGACGAAA-GTGAAG--AGTTTGAATA-----TGTTGAGCA	822
<i>C.albicans</i>	TA-----ATGGGAATTTA-TTACTGG--ATTATTTATA-----TATTGAAAA	1410
<i>S.cerevisiae</i>	TTTGAATTACGTGGGTAGTTACGTTGAGGTTAACATGCAAAAAGACGTGCCATTGCAGA	1663
<i>S.pombe</i>	TG-----GTTCCACTTTA----AAGG--ATTTTACTTT-----TGTAGAGTA	1472
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	TAACATGAGAACTAGA----CGGCAGATTGC-CACACAGGAGCTTG-----GAGAAGAAG	872
<i>C.albicans</i>	AAATATGATAAATTCGA----CGTCA-ATTAT-GTGAAGATAATTT-----ACCTTCTC	1457
<i>S.cerevisiae</i>	ATATAAGCTATCTGAATATGCGAGACAAGATAGTAAAAATAACTTGCATGTGGGCTCCAG	1723
<i>S.pombe</i>	CAATATGCGATTAAGA----AGAAAAATTAT--TGAAAACCATTT-----ACTACCCA	1519
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	ATATGTTGCCATTGACACTCACTTCTTTTCCGCGAATGGGCGTTGAGATTTTTACA----	928
<i>C.albicans</i>	ATATCAAATTATTAACATTGACTACATTCCCAAGAATGGGATGTAATATTTTTACT----	1513
<i>S.cerevisiae</i>	GTCTGTC-CCTTTGACGCTGACTGTCTTCCGAGGATGGGATGCCCGACTTTATTAACA	1782
<i>S.pombe</i>	ATGAGCTACCTTTAACAATTACTAATTTCTTTCGTCTTGAACACCAGGCTTTACG----	1575
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	-TATCCGGCCCGGAGCC-TAACGGTGAAGCGTCCAAGTCTCTCTCTTCCGGACGAGA	986
<i>C.albicans</i>	-TCACCACCATCAAAACC-TGATGGTATTGCATCACAATCATTATTTTACCTGATGAAA	1571
<i>S.cerevisiae</i>	TTAAGGATCCGTGGAATCATAAAAAATGCCGCTTCCAGGTCTCTGTTTTTACCCGATGAAG	1842
<i>S.pombe</i>	-GATCCAGAAGTCGAAGC-CAATGGTGAATTTCCGCGATCTTTTTTCTTACCCGACGATG	1633
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	TCATCAACCGCCACTTCCGTTTTCACCGTGCACAGCCAACATTCTGTCGAGAAGGGACC	1046
<i>C.albicans</i>	TCATAAATCGTCATGCTAGATTCCCAACTTTAACGGCCAATATTAGGAAAAGAAAGGGTC	1631
<i>S.cerevisiae</i>	TCATTAACAGACATGTCAGGTTTCCCTAATTGACAGCATCCATCAGGACCAGGCGTGTTG	1902
<i>S.pombe</i>	TTATCAACACACATGTTTCGTTTCCCGACCTTGACTGCTAATATTCGTCAAAAGGCGCGGA	1693
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	AGAAGGTGAGTATCAACATCCCTCTGTACAAAGACGAGAAAAGTGTGGCTTCAGGAATTG	1106
<i>C.albicans</i>	ATAAAGTGGCAATTAATTTACCAATTTATCCTGATAAATCCACTAAACTTTTAGA---TG	1688
<i>S.cerevisiae</i>	AAAAAGTTTGCATGAATGTTCCCATGTATAAAGATATAGCTACTCCAGAAACGGA---TG	1959
<i>S.pombe</i>	GAAAAGTGGCCATGAATGTTCCGATTTTCTTCGATAAAAATACAATTAACCATTTCACG	1753
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	ATCCGTCCATTCTCGAAGGAAGTGTTCGCCGATCAGGACGAAGAACCATTTTTGGGGG	1166
<i>C.albicans</i>	ATACG--ATACCTCAAATCGTGAATTATTTGATAGTGATAAAGAACCTTGGATAGGTG	1745
<i>S.cerevisiae</i>	ACTCC---ATCTACGATCGAGATTGGTTTTTACCAGAAGACAAAGAGGCGAAACTGG---	2013
<i>S.pombe</i>	ATCCTACCGTTCTTGGGATAGAAAATTTGTTTCTGAAAGATGCAATGCACGAGATGGTG	1813
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	CCGCAAGAAGGGCTACATATACATGGACTCGATGGGCTTTGGCATGGCTCGTGTGTC	1226
<i>C.albicans</i>	CTTCCAAACCAGGTTTATATATATGGATTCTATGGGATTGGAATGGGCTCAAGTTGTT	1805
<i>S.cerevisiae</i>	CTTCCAAACCAGGTTTTCATTTATATGGATTCCATGGGTTTGGCATGGCTGTTCGTGCT	2073
<i>S.pombe</i>	CAGCGTTAGACAATCATATTTACATGGACAGTATGGGTTTCGGTATGGGATGCTGTTGTC	1873
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	TGCAAGTAACGATGCAGGCCCCAGATGTGGCTCATGTAGATTCTGTACGACTCTCTGG	1286
<i>C.albicans</i>	TACAAATCACCATGCAAACGAAAAACATTAGTCAAGCACGTTATTTATATGATAGTTTAG	1865
<i>S.cerevisiae</i>	TACAAGTGACCTTTCAGGCACCCAATATCAACAAGGCACGTTACCTGTACGATGCATTAG	2133
<i>S.pombe</i>	TACAAATTACATTTCCAAGCTAAAAGTTGTGATGAAGCTAGACTTTTATACGATCAGTTGA	1933
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	TCAACATCGCTCCATTGATGTGGCTGTGACAGCTGCGGCTCCGATTTTCCGGGGCCATC	1346
<i>C.albicans</i>	CACCAATTGCCCCATAATGTTGAGTTTATCAGCGGCAGCACCAATTTTAAAGGATTTT	1925
<i>S.cerevisiae</i>	TGAATTTTGCACCTATAATGCTAGCCTTCTCTGCGCTGCGCTGCTTTTAAAGGTTGGC	2193
<i>S.pombe</i>	CTCCTATTACCCCTTGTAGCTGGCATTATCTGCCGGAATCCAGCATTTTCGAGGCTATT	1993
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	TTGCTGATCAGGACGTTAGATGGAATGTGATTGCCGACGAGTTGATGATCGGACCCCCT	1406
<i>C.albicans</i>	TAGTTGATCAAGATGTTAGATGGAATGTGTTAGTGGTGCAGTTGATGATCGTACATTTA	1985
<i>S.cerevisiae</i>	TAGCCGACCAAGATGTTTCGTTGGAATGTGATATCTGGTGCAGTTGGACGACCGTACCCGA	2253
<i>S.pombe</i>	TGGCTGATCAAGATGTTAGATGGAATGTGATTGCTGGTGTCTGATGATCGAAC----	2049
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	ATGAGCGCGGAGA-----GCCGCAATT-----GAAGGTCA-----	1437
<i>C.albicans</i>	TTGAAAAGGGACAAGAACCCTTATTCTGGTTATCATTATTTGGAGGATTAGATATTGATG	2045
<i>S.cerevisiae</i>	AGGAAAGAGGTGTTGC-----GCCATTACTACCCAATACAACA-----	2292
<i>S.pombe</i>	-----	
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	-----CAAAGAGA-----GAGGGAACACTTTGGAC-	1462
<i>C.albicans</i>	CTCAAGATAAATTGAGAATTAATAATCATCAAATAAATCAACAAGGGGATTTATTGGATT	2105
<i>S.cerevisiae</i>	-----AGAACGGATTG-GAGGCATTGCCAAGACG	2322
<i>S.pombe</i>	-----GAGGAA-	2055
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	---ACAGCAGAGCTGTGCGC-----ATACCAAAGTCACGGTATGACTCGGTGG	1508
<i>C.albicans</i>	TATACTAAAGATGGTAAACCAATTCAAAGAGTTCCCTCAATCAAGATATGATTCAATTG	2165
<i>S.cerevisiae</i>	TACAAGATAAAGTCCTTGAA-----ATACCAAAGTCAAGATATAGTTCCGGTTG	2370
<i>S.pombe</i>	---GAAATGAAAACGTGTG-----CCAAAATCAAGGTATGATTCTGTTG	2095
	* * * * *	

<i>Pichia angusta</i>	ACCAGTACCTGGGTGACTTGGATTCTTCCGGCAGATTCTCTATTTTCAGAAAAGAGTACA	1568
<i>C.albicans</i>	ATAATTATTTAAATGAT---AATTATTATGATACAAAAT---ATTTCCAAGATGAATATA	2219
<i>S.cerevisiae</i>	ATCTTTTCTGGGTGGGTGCGAAATTTTCAATAGGACTTATAACGACACAAATGTACCTA	2430
<i>S.pombe</i>	A-----CTTATATCTCGAATGACA--AGCGCAATTT-----ACCGCATATA	2137
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	ATGACATCGAATCTCCGAAAAATAGCAAGGTTTACGAAAAAATTGTTTCCAATGG---GT	1625
<i>C.albicans</i>	ATGATCTTAATGCACCAATAAATGAACAAGTTTATCAACGATTAATGATGAAGGTAAAC	2279
<i>S.cerevisiae</i>	TTAAT---GAA-----AAAGTATTAGGACGACTACTAGAGAATGAT----AAGGCACCAC	2478
<i>S.pombe</i>	ATGACGTCCCGGTCTGTTATAAATCAAGATTGCTACGATAAGCTAATA---AAAGATTGCA	2194
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	TTGACGAAACACTGGCGGGCCATTTGCGCACACCTGTTTTCATCCGGGACCCTATCGTCATTT	1685
<i>C.albicans</i>	TCGACAAGTATATGGCCAATCATTTTGCTCATTTATTTATTCGTGATCCATTAGTCATTT	2339
<i>S.cerevisiae</i>	TGGACTATGATCTTGCTAAACATTTTGCGCATCTCTACATAAGAGATCCAGTATCTACAT	2538
<i>S.pombe</i>	TTGATGAAAAGATTGGCTAAGCACATGGCTCACATATTCTCTCGTGATCCTTTGGTTATTT	2254
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	TCACCGAATCCATAGAGCAGGACAACACCGTCGAGACCGACCATTTCGAAAACATCCAGT	1745
<i>C.albicans</i>	TCAGTGAAAAGAATAAATCAAGATAAATAAATTTAGAAAATGATCATTTTGAAAATATTCAAA	2399
<i>S.cerevisiae</i>	TCGAAGAACTGTTGAATCAGGACAACAAAACGTCTTCAAATCACTTTGAAAACATCCAAA	2598
<i>S.pombe</i>	TCAGTGACAGCATTTTACAAGACAACAGTGTATCCAATGCTCATTTTGAGAACCCTAAACT	2314
	** ** *	
<i>Pichia angusta</i>	CTACAAACTGGCAGACACTGCGTTTCAAGCCTCCAAAACAGTCTGCTG----TGCCGGAA	1801
<i>C.albicans</i>	GTACAAATTGGCAAACCTTACGATTTAAACCTCCAGCATTATATACTAAAGATACTGATT	2459
<i>S.cerevisiae</i>	GTACAAATTGGCAGACACTGCGTTTAAACCCCCACACAACAAGCAA----CCCCGGAC	2654
<i>S.pombe</i>	CAACTAACTGGCAATCTATGCGCTTTAAACCTCCGCCACAGGTAGTG-----	2362
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	AGGCACGATGTTCCGGGGTGGAGAGTTGAGCTCCGGCCAATGGAAATTTCTTTGACAGAT	1861
<i>C.albicans</i>	TGAC-TACTAAACCAGGTTGGAGAGTTGAAATTTAGACCCATGGAAATTC AATTGACGGAT	2518
<i>S.cerevisiae</i>	AAAAAGGATTCTCTGTTGGAGAGTGGAAATTCAGACCATTGGAAGTGCAACTATTAGAT	2714
<i>S.pombe</i>	-----ATATTGGTTGGCGTGTAGAAATTTAGATCAATGGAAATTC AATAACTGAT	2412
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	TTGAAAACGCTGCGTATGCAAACCTTTTCC-GTCCTGCTCTCGCTAGCGGTGCTCAAATA	1920
<i>C.albicans</i>	TTTGAAAATGCGGCTTATTCATCATTTATA-ACCTTTATTATCTAAAGCAATTTTGAAATT	2577
<i>S.cerevisiae</i>	TTTGAGAACGCTGCGTATGCGTCTCATATACTTGATTGTCGATAGCATTTTGACCTTT	2774
<i>S.pombe</i>	TTTGAAAATGCGGCATATTC AATTTTGTGTT-GTGATGCTTCTCGTCAATTCTATCCTT	2471
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	TAGACCAA-----ACTTCTACTCCCTATTTTCGTATGTGGAGGCTAATATGAAGACGGCG	1975
<i>C.albicans</i>	TCAACCAA-----ATTTTTATATCCCATTACTGAAAGTAGAAATTAATATGAAATTTGGCT	2632
<i>S.cerevisiae</i>	TCCGATAATATTAACGCATATATTCATATGTCCAAAGTATGGGAAAATATGAAGATAGCC	2834
<i>S.pombe</i>	CAATTTGA-----ATCTGTACATGCCGATATCGCTAGTGGATGAAAACATGAAAGCTGCT	2526
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	CATCGCCGGAATGCCATAGTGGAGCAGACATTCCACTTCCGAACCAATGTGTGGGAGGCA	2035
<i>C.albicans</i>	CATAAAGTTGATTC AACTTTAAAAGATAAATTTTGGTTTAGATC-----ATTTGAATTA	2686
<i>S.cerevisiae</i>	CATCACAGAGATGCTATCCTATTTGAAAAATTTCAATGGAAAAA-----ATCATTTCG	2887
<i>S.pombe</i>	CATGCTCGTGATGCCATTATCGTAAAAAGTTTGGTTCCGTTG-----CAATCCA	2577
	** * * *	
<i>Pichia angusta</i>	GGAGAGGCAATTGTGGAGCAGCTGAGTCTTGAAGAGGTTTTCACGGATCCGGCTCTTTC	2095
<i>C.albicans</i>	TGGAA-----TATTGATCCACAAGAATTTGATGA-----TTATGGATTTGAATGGTTT	2734
<i>S.cerevisiae</i>	CAACGA-----CACCGATG---TGGAACTGAAGA---TTATTCTATAAGCGAGATTTTC	2936
<i>S.pombe</i>	TT-----TCCTGACG---CAAGTACTGATGA-----TGAATCTGGTCAAGTTTC	2616
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	GAGGGACTTCTATCTCTAGTTTACCATAACATCAAAGAGACATGGGGAGAACCCTCTTCCC	2155
<i>C.albicans</i>	GACCAATTT--ATTAATGGTA-ACCAACA-ACAAAATGGTCACGTGAACAA-----TAAC	2785
<i>S.cerevisiae</i>	CATAATCCA--GAGAATGGTATATTTCC--TCAATTTGTTACGCCAATC-----CTAT	2985
<i>S.pombe</i>	CGTCAACTT--ACAATTGACGAGTTATTT--AATGGTGAGCACCGTGAAAACGGATTTCC	2672
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	GCAAAGCTTGAGGCGTACCTCAAGCTGGTGGAGCTTTAGAGCTTCGGC AAAAATCCCATCC	2215
<i>C.albicans</i>	AATAACAATGACAAGAAAACCAA--AATGATCC---AATAATTGTTAATGGTTCTACTA	2840
<i>S.cerevisiae</i>	GCCAAAAGGGTTTGTAAACCAAAG--ATTGGA-----AAGAATTAA-AGCATTCTTCAA	3037
<i>S.pombe</i>	AGGTTTAATTACCATTGTTTCAAGCTATTTATACTCTTGTAAATCCT-GATGCCAAAACATA	2731
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	ACAGCGCAATACATACGGAATTTTGTGCTGAGTCATCCAGATTACAAGAAGGACAGTATT	2275
<i>C.albicans</i>	CTACTACTAATGGTACAAATAGTGGCAGTGGTATAACGGAA--ACAAATGGTACAATGTT	2898
<i>S.cerevisiae</i>	ACACGAGAGACTATACTATTATTTAAAGCTAATTTCTGATAGAGCAACGGGTGAATTGCC	3097
<i>S.pombe</i>	TTTGCCATAATTGAACGTTATATTCG--CTAATTTCTCAAAGAGCAAATGGCCAATGCTT	2789
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	GTCAGCGACCAAATAAATACGACCTGCTGGAGATGGCGCCAAACTGTCCACATACGAT	2335
<i>C.albicans</i>	ACCTAAAGGATGTGAAGGTAAGACA-GTGGAAAGAGATTAATGATGTTGATGATA-ATGGT	2956
<i>S.cerevisiae</i>	AACAACAGCAAATTTCTTTAGAAATTTTGTACTACAACATCCAGATTACAACATGATTC	3157
<i>S.pombe</i>	GACTGCTGCTTCGTGGATACGCAATTTCACTAACAATCATCCTTCTTATAAGCAAGACAG	2849
	* * * * *	



<i>Pichia angusta</i>	ATATAAATATCA-CTCGATAAGCCACCAAATAAGCATATTCCAAAACGGGCTTCCCAA	3225
<i>C.albicans</i>	TTAGTATTGTAAACACGAAAACTAA-AAACAGGTCGTGTCC---ATGTACTT--GAAA	3791
<i>S.cerevisiae</i>	TTCTCCATATCGGAATATTCAATATTGAACTCACCCCTCCCTTGCAGATAAGCTCC-TTAG	3972
<i>S.pombe</i>	ATGGACGCGTCCTCTAAATGATTGACGGTATTAACCAAATAT---AGGAACTT--GGGT	3674
	* * * * *	
<i>Pichia angusta</i>	CGCATTGAATCACCGAATAAAATTTTTGGCAAAGCCCGATGACATAAATATTACAATCCG	3285
<i>C.albicans</i>	TATATATGCA---GGCACAAGAATTCAAGTGA---CCATT--TTTTTCTTTTAATTGG	3842
<i>S.cerevisiae</i>	CTTATTGGTG---TAGGTGGTAATTTCCCTTAGTGGCACT--TTCGCTTTTATAATTTT	4026
<i>S.pombe</i>	TCCATTTACGCGTGGGGTCGAC-----	3696
	**	
<i>Pichia angusta</i>	AGGCTGACAAACGCGCTTGGCAAGGCAGGAGGGTTCCGGATGGGACCTAAGCAAGTGTGTG	3345
<i>C.albicans</i>	TGGTG-----CTGGTGGTGGAGTGGGGTGGAGGTAGAAAAAAGAGGG-----	3885
<i>S.cerevisiae</i>	TTTTACATTAGAA---CTGGT--CTCTTGAGTGTTTTTTTTATCTTTGGTTGCGTGT---	4078
<i>S.pombe</i>	-----	
<i>Pichia angusta</i>	AGCGCCTCATAGGGCTATCACCGATAAGTCTTCGTCCAATCGCACATCTGAGCATTTTCA	3405
<i>C.albicans</i>	-----AACTACTACCGTTAAAATGCTGGTATTTTGTAAAGTAGTAGCAACAAC	3934
<i>S.cerevisiae</i>	-----AGGGTTGTAACAGC---ATCAGAGGGAATATATATCTTATTGCTGTTCTC	4125
<i>S.pombe</i>	-----	
<i>Pichia angusta</i>	GAAGTAAGCTGCTGTGACACTGTGTGACTACTTGACTATTTGACTTGGGTACAAG-GCCC	3464
<i>C.albicans</i>	GGAAGAA-----TAATA---ATAATAAAGGTGACTCAGCAAAAATAGAATCGGTA	3983
<i>S.cerevisiae</i>	TGGAGAA-----TTACAA---GTGGATGCGCCAGAATTTGACACGCTTG--ATTCTG	4173
<i>S.pombe</i>	-----	
<i>Pichia angusta</i>	CTAAACTAAGTAAGCA-GCAGTCTTCCAGACTCCTTTTCTGCATATAGGCAAT---CTTAT	3520
<i>C.albicans</i>	CTAAATTAAGAGTGTTTACATTTCTCCGTAATA--TTGGTCATTCAAAAAAT---CCTAC	4038
<i>S.cerevisiae</i>	TTCAATAGACAGAAATTTGAGCCTTTCTTGCTCCTGTTAGATCTTGTAACACCGTACCAAC	4233
<i>S.pombe</i>	-----	
<i>Pichia angusta</i>	ACGAACTAGCACACTTTTTTGCATATATGGTTGGTGTACAGATGTCGAATATTTATTTTT	3580
<i>C.albicans</i>	AATAAATTTAAACGTTGATATTAAGTGAACTTTCGTCTTTA-ATACTAACTAATAAAAA	4097
<i>S.cerevisiae</i>	ATCAGATTGAGGGATTGTT---AGATCAAGATTCATGATGGGTTCCAGAAGGTTCTATTT	4290
<i>S.pombe</i>	-----	
<i>Pichia angusta</i>	CAAGATTTTTCCCCAGTCGATTGACTTTTCTTATGTATCGACCCTCAACTGGTCTGCTCA	3640
<i>C.albicans</i>	AACTACAATAGAAAAGTGTAGAGAAACAATATAAGTAATTATTAG-AAAAAAGAGTAAA	4156
<i>S.cerevisiae</i>	TTCAGGTTTTAAGTCATTGAGAG-CTTTAAAAAATTAAGTTTCTAGTAATTTTTAAGATTT	4349
<i>S.pombe</i>	-----	
<i>Pichia angusta</i>	ATCAGCGTTCAGTGCCGTTATTTGCCCTCGCTTTTATTCATCAGCTTGCAGAAAATATG	3700
<i>C.albicans</i>	AATGAAACACAAAAGAATTAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT	4214
<i>S.cerevisiae</i>	CTTGTGGAGTTTTCAATATCAGGTGGGACTGACCAATCGCTATTGATTTTGTATGGAGCATG	4409
<i>S.pombe</i>	-----	
<i>Pichia angusta</i>	GGACAGCGAC-ACAGCAAATCCGGATTTTCTTTCCCCACCAGAACCTCAAAATTGGTAC	3759
<i>C.albicans</i>	GGACGACGACGACGACGACGATGGAAAAACTTTTTAATTTTTTATTTTTTGGTATCTTAT	4274
<i>S.cerevisiae</i>	C-----	4410
<i>S.pombe</i>	-----	
<i>Pichia angusta</i>	GCACTTCTAACCAAACCACCTTCCCAAATAAACATCGCTTAGCCAATTTCCAAAAGGAG	3819
<i>C.albicans</i>	ACACTACTAACTAATTAAGTACG---AATTTACATAACTGAAAAAGAAGAAAGACAAA	4331
<i>S.cerevisiae</i>	-----	
<i>S.pombe</i>	-----	

### 3. Teilsequenz der Glutathionsynthetase von *Heliscus lugdunensis* Stamm H4-2-4 (785 Basenpaare) (AY 297429) und davon abgeleitete Aminosäuresequenz

785 Basenpaare

```

TTATTGTTTC CACCACCTTC CCGCTGCGGT TTGAGCACGT ACGCCTGGCA AAGCTTAGGA
TCAAGCGCCT TCTTTCGGGC CTCTAGTCCCT GCATCGCTCG TGTCCATCGG GTAGATGTTG
GTAAACGTGC GCCAGAGCTC CGCCACATCT TCAGTGTTCGT CTCTGATAAA CTTGCTGAGG
GCTGATGGAA CAGATGGCGA CTTTGGTGTG GTGAGGATTT GCTGCACCTT CTTTGTTCCTA
GCGAGCTGGG TCAAGACGGT GGGGCACTTA ATGGCATGGG AGCGCTCCAG GTGGTACCGA
GCGTCCCAAG CCTCCTGGCC TGGGTAGTCA CTAGGGTTCGT AGCCCCACCG CATGTAGATC
ACGGCAACTT CGTAGACCTT TGATTGGTTT CGGGGCAGAC GGTAAAAGCA GCTGGCGCTT
GGAGGTGCTT GCGAGGCTGG TGTGTTTAGG ACATCCGCAT ACCGTAGTCG GAAGACTGGG
ATGGAGGGCG AGCCCTTGGC AATTGGTAC TCCAGATGGC GCTGGTCGAA GAGTTTCTCT
CGCCGCCCTG GACGAGGAAG ATGATGGCCT TTTACATACT TGAGGTCTGA CTCGGGGTAA
CGCATGGTAA AGCCGACTCG AATACCAGCA GCCAAGCCGT GCGCAGTCGT GTTTCCGGGA
AGATCCAGGG AACCTTCGGC TATGGGAGTG TCGAGGAGAG AATATTCCTG TTTGGCAAGA
TATCTGCCGG CGTTAGAAAAG TTCGATCTTT GGAGGGTAGG GTTCATGCGA CTTACTTATG
TAACA

```

Reverse und komplementäre Sequenz

```

TGTTACATAA GTAAGTCGCA TGAACCTAC CCTCCAAAGA TCGAACTTTC TAACGCCGGC
AGATATCTTG CCAAAACGGA ATATTCTCTC CTCGACACTC CCATAGCCGA GGGTTCCTTG
GATCTTCCCG GAAAACAGAC TGCGCACGGC TTGGCTGCTG GTATTTCGAGT CGGCTTTACC
ATGCGTTACC CCGAGTCAGA CCTCAAGTAT GTAAAAGGCC ATCATCTTCC TCGTCCAGGG
CGGCGAGAGA AACTCTTCGA CCAGCGCCAT CTGGAGTACC AAATTGCCAA GGCGTCGCCC
TCCATCCCAG TCTTCCGACT ACGGTATGCG GATGTCCTAA ACACACCAGC CTCGCAAGCA
CCTCCAAGCG CCAGCTGCTT TTACCGTCTG CCCCAAAACC AATCAAAGGT CTACGAAGTT
GCCGTGATCT ACATGCGGTC GGGCTACGAC CCTAGTGACT ACCCAGGCCA GGAGGCTTGG
GACGTCGGT ACCACCTGGA GCGCTCCAT GCCATTAAGT GCCCACCGT CTTGACCCAG
CTCGCTGGAA CAAAGAAGGT GCAGCAAATC CTCACAACAC CAAAGTCGCC ATCTGTTCCA
TCAGCCCTCA GCAAGTTTAT CAGAGACGAC ACTGAAGATG TGGCGGAGCT CTGGCGCAGC
TTTACCAACA TCTACCCGAT GGACACGAGC GATGCAGGAC TAGAGGCCCG AAAGAAGGCG
CTTGATCCTA AGCTTTGCCA GCGGTACGTG CTCAAACCGC AGCGGGAAGG TGGTGAAAC
AATAA

```

Translatierte Aminosäuresequenz dieses Teilstückes

```

CYISKSHEPYPPKIELSNAGRYLAKTEYSLLDTPIAEGSLDLPGNNTAHH
LAAGIRVGFTMRYPESDLKYVKGHHLPRPGRREKLFDRHLEYQIAKASP
SIPVFRLRYADVLNTPASQAPPSASCFYRLPRNQSKVYEVAVIYMRSGYD
PSDYPGQEAWDARYHLERSHAIKCPVLTQLAGTKKVQQILTPKSPSPV
SALSKFIRDDTEDVAELWRTFTNIYPMDTSDAGLEARKKALDPKLCQAYV
LKPQREGGNN

```

### III. Informationen zu massenspektrometrischen Analysen

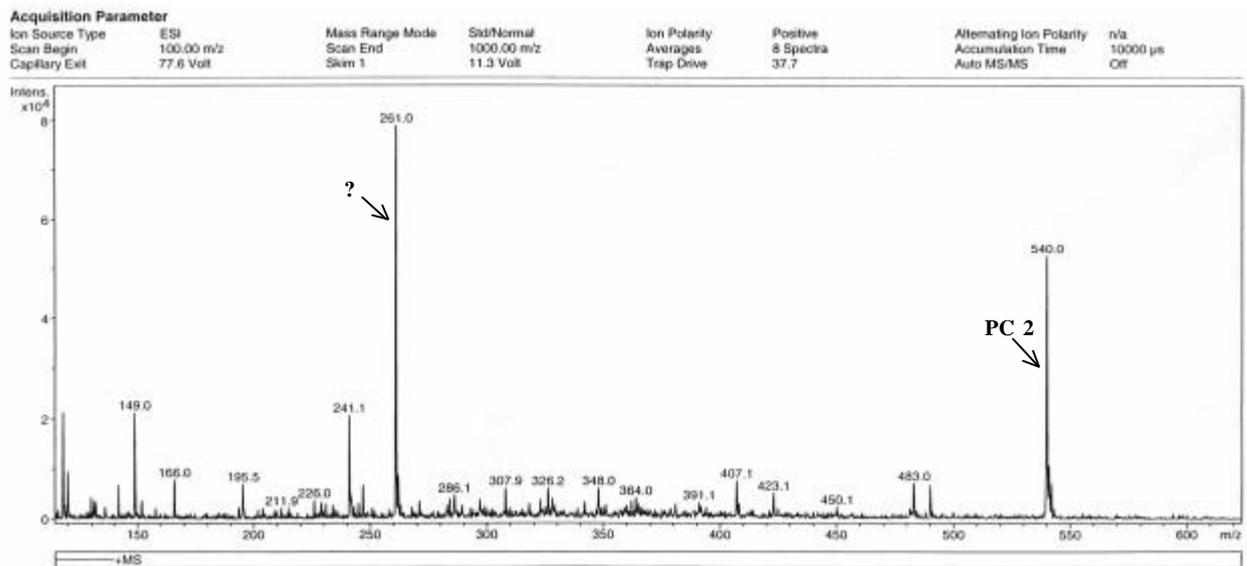


Abb. I ESI-Massenspektrum der PC 2-Fraktion aus *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4

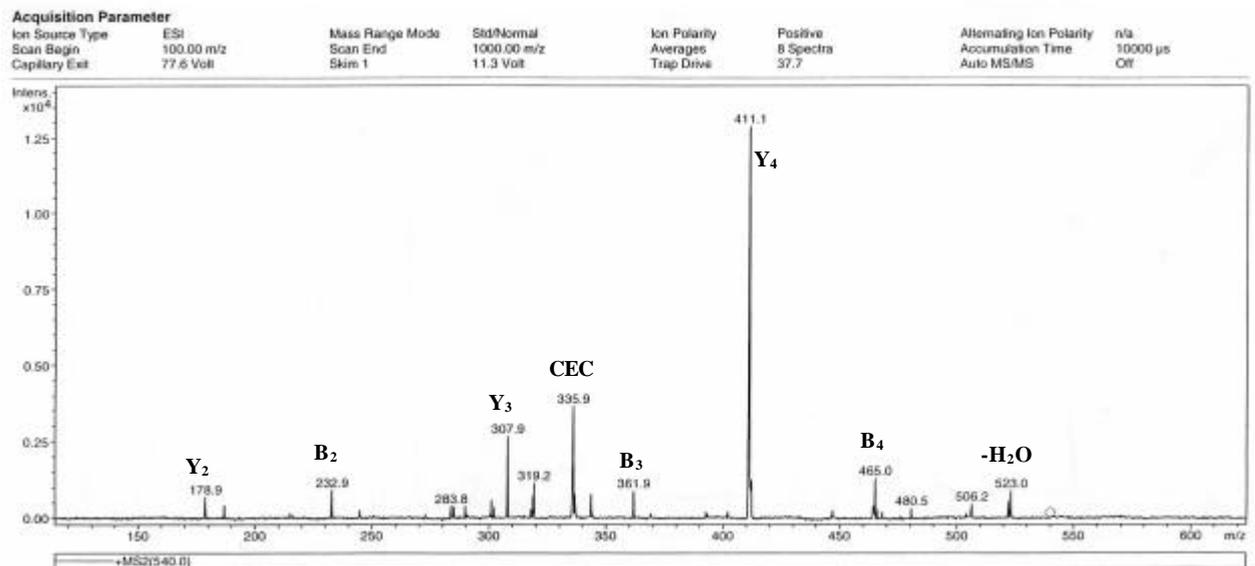


Abb. II ESI-MS/MS Spektrum des Molekülpeaks  $m/z$  540 von PC 2 aus *H. lugdunensis* Stamm H4-2-4 nach Cd(II)-Exposition mit Fragmentbeschriftung nach Roepstorff und Fohlman (1984)



## **Danksagung**

Ich möchte Prof. Dr. habil. G.J. Krauß für die Überlassung des unerschöpflichen, spannenden Themas und so manche klärende Diskussion und Unterstützung danken.

Vielen Dank Herbert für die Unterstützung, die Diskussionen und all die vielen Aufbaumomente. Danke Erika Hoffart für die immer freundliche Unterstützung im Labor und die unendlich vielen Kolben Medium.

Frau Dr. Krauß, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle gilt mein Dank für die Bereitstellung der Stämme, ihre Unterstützung sowie ihr Interesse am Fortgang der Arbeit.

Traudel und Sieglinde, danke für Eure Hilfe und Einweisung in die Analytik im kleinen und im Großen und so manche Hilfestellung.

Viel Unterstützung bei der Sulfidbestimmung erhielt ich durch Frau R. Baumbach und Frau Funke.

Die radioaktiven Arbeiten wurden dankender Weise im Labor von S. Clemens, Leibnitz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle/S. durch Frau C. Simm durchgeführt. Ihr gilt auch mein Dank bei die Unterstützung bei vielen molekularbiologischen Fragestellungen.

Unterstützung bei der Isolierung der 18S rDNA erhielt ich von den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Dr. U. Lechner, Mikrobiologie, M.-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Erste Einblicke in das Thema der Phylogenie und der Biostatistik konnte ich im Labor von F. Bärlocher, Mt. Allison University, Sackville, Kanada sammeln.

Die Stammbaumanalysen wurden freundlicherweise am UFZ Leipzig-Halle mit Unterstützung von Frau Magali Solè ausgeführt.

Die Untersuchungen zur Zellwandzusammensetzung durfte ich in der Arbeitsgruppe von Prof. Moerschbacher, Universität Münster durchführen.

Für die vielen massenspektroskopischen Untersuchungen und Versuche zur Identifizierung danke ich Frau Dr. Schierhorn.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Ökologische und Pflanzenbiochemie des Fachbereiches Biochemie/Biotechnologie, bzw. allen Mitgliedern der Frühstücksrunde, deren Hilfe zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, sei an dieser Stelle ganz herzlich gedankt.

Mein besonderer Dank gilt Arwed für die endlose computertechnische (☺) aber auch moralische Unterstützung (IP) und meiner Familie, die mit ihrer Unterstützung all das erst ermöglicht hat.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Freunden (Claude, Matthias, Lisa, Kerstin....) danken, die mich immer wieder aufgemuntert und mich zum Weitermachen bewegt haben.

Sollte ich jemanden vergessen haben.....DANKE EUCH ALLEN!

## LEBENS LAUF

Bianca Braha  
Calbesche Str. 19  
39240 Brumby

### Persönliche Daten

geboren am 22.06.1975 in Schönebeck/E.  
verheiratet (geb. Pierau)

### Schulbildung

1982 – 1986      Grundschule „Ernst Thälmann“, Brumby  
1986 – 1989      POS “Ernst Thälmann”, Calbe/S.  
1989 – 1994      Gymnasium „Friedrich Schiller“, Calbe/S.  
Abitur 07/94 (1,5)

### Studium

10/94 – 07/99      Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-  
Wittenberg  
Abschluss: Diplom-Biochemikerin (sehr gut)  
Thema der Diplomarbeit:  
„Charakterisierung von zwei Stämmen des aquatischen  
Hyphomyceten *Heliscus lugdunensis* (Sacc. et Thèry) unter  
Schwermetallstress“

### Promotion

12/99 – 01/04      Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Abt. Ökologische und Pflanzenbiochemie  
Thema: „Physiologisch-biochemische Charakterisierung  
schwermetallinduzierter Reaktionen des aquatischen Hyphomyceten  
*Heliscus lugdunensis* (Sacc. et Thèry)“

### Beruflicher Werdegang

Seit März 04      Biochemikerin am Institut Kirchhoff Berlin GmbH

### Auslandsaufenthalte

09-10/99      1. Aufenthalt an der Mt. Allison, University, Sackville, Kanada  
09-10/00      2. Aufenthalt an der Mt. Allison, University, Sackville, Kanada

Halle/Saale, den 10.03.04

Bianca Braha

### Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe sowie die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, Saale, den 10.03.04

---

(Bianca Braha )