



**Abschlussbericht zum BMBF-Verbundprojekt:
Lyophilisierte pflanzliche Membranthylakoide als Träger der Zielstruktur
zur Kopplung von Herbiziden**

**Teilprojekt I: Pflanzliche Membranthylakoide als Träger der Zielstruktur zur
Kopplung von Herbiziden: Analyse des D1-Protein-Herbizid-Komplexes**

Dipl. Biologin Carmen Schulten

Staatl. gepr. Lebensmittelchemiker Budi Muktiono

Dr. Claudio Cerboncini

Prof. Dr. Heide Schnabl (Projektleitung und Koordination)

Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen (IMBIO)

Vormals: Institut für Landwirtschaftliche Botanik (ILB)

Universität Bonn

Karlrobert Kreiten Str. 13, D-53115 Bonn

**Teilprojekt II: Wirkungsbezogene Identifizierung photosynthesehemmender
Substanzen**

– Chemische Analyse von Liganden und deren D1-Protein-Komplexe –

Dr. rer. nat. Olaf Heemken

Dipl.-Ing. Jürgen Gandraß (Projektleitung)

Prof. Dr. Andreas Prange

GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH

Institut für Küstenforschung - Marine Bioanalytische Chemie

Max-Planck-Str.1, D-21502 Geesthacht

Förderkennzeichen: 02WU0328

Laufzeit des Vorhabens: 01.09.2002 bis 30.04.2006

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 02WU0328 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1 KURZE DARSTELLUNG	6
1.1 Aufgabenstellung	6
1.1.1 Teilprojekt IMBIO/vormals ILB	7
1.1.2 Teilprojekt GKSS	7
1.2 Voraussetzungen, unter denen das Projekt durchgeführt wurde.....	8
1.3 Planung und Ablauf des Projektes	9
1.4 Wissenschaftlich technischer Stand, an dem angeknüpft wurde.....	15
1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen	19
2 EINGEHENDE DARSTELLUNG	20
2.1 Erzielte Ergebnisse Teilprojekt IMBIO.....	20
2.1.1 Isolierung photosynthetisch aktiver Thylakoide aus verschiedenen Pflanzenspezies.....	20
2.1.2 Vergleich verschiedener Pflanzenspezies für die Isolierung und Charakterisierung von Thylakoiden über 2D-Gelelektrophorese	22
2.1.3 Thylakoidisolation aus den Blattmaterialien sowie die Extraktion der Photosystem-II-Proteinkomplexe aus den gewonnenen Thylakoiden	24
2.1.4 Aufreinigung des D1-Proteins aus den PS-II-Proteinkomplex-Extrakten mit der Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)	27
2.1.4.1 Aufreinigung des D1-Proteins über Reversed-Phase-(RP)-Chromatographie	27
2.1.4.1.1 Aufreinigung des D1-Proteins über Reversed-Phase-(RP)Chromatographie nach Sharma et al. (1997a)	28
2.1.4.1.2 Aufreinigung des D1-Proteins über Reversed-Phase-(RP)Chromatographie nach Piletskaya et al. (1997)	33
2.1.5 Nachweis der Bindefähigkeit des isolierten D1-Proteins über Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analysen mit dem Simazinderivat-Chip.....	36
2.1.5.1 Synthese eines Herbizidliganden für biomolekulare Interaktionsanalysen	36
2.1.5.2 Erarbeitung einer mit Herbizidderivaten gekoppelten Chipoberfläche zur Detektion von D1-Proteinen.....	36
2.1.5.3 Nachweis der Bindefähigkeit des isolierten D1-Proteins über Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analysen mit dem Simazinderivat-Chip.....	37
2.1.6 Nachweis des D1-Proteins über Oberflächen-Plasmon-Resonanz mit einem anti-D1-Antikörper-Chip mit dem Biacore 3000	38

2.1.7	Einsatz des D1-Proteins für den biosensorischen Nachweis von Herbiziden mit der Methode der Oberflächen-Plasmon-Resonanz	40
2.1.8	Vergleich der Bindungsspezifität von Diuron, Atrazin und Metribuzin über den biosensorischen Nachweis mit D1-Protein mittels SPR.....	42
2.1.9	Zusammenfassung	43
2.1.10	BIACORE-MS-Kopplung.....	43
2.1.11	Untersuchung anderer Analyte mit der Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometrie.....	45
2.2	Erzielte Ergebnisse Teilprojekt GKSS	47
2.2.1	Analytik von photosynthesehemmenden Liganden	47
2.2.1.1	Auswahl von photosynthesehemmenden Liganden als Zielsubstanzen.....	47
2.2.1.2	Quantitativer Nachweis von photosynthesehemmenden Liganden.....	49
2.2.1.3	Untersuchung von Wasserproben der Elbe	56
2.2.2	Analytik von D1-Proteinen	58
2.2.2.1	Messungen von Proteinen im Off-Line Nano-ESI-TOF Modus.....	59
2.2.2.2	Messung von Proteinen mittels zweidimensionaler Nano-LC-ESI-TOF	62
2.2.2.3	Messung von Proteinen in Extrakten unterschiedlicher Pflanzenspezies.....	71
2.2	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des Verwertungsplanes	76
2.3	Bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Projektes bei anderen Stellen.....	76
2.4	Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen	76
3	ZUSAMMENFASSUNG	78
	LITERATUR	80
	ANHANG	86
	ANLAGE: ERFOLGSKONTROLLBERICHT	1
1	Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen	1
2	Wissenschaftlich/Technische Ergebnisse	1
3	Fortschreibung des Verwertungsplanes	1
4	Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben.....	1
5	Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer	1
6	Einhaltung der Kosten und Zeitplanung	2

Abkürzungsverzeichnis

1D-SDS-Page	Eindimensionale-Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
2D	Zweidimensional
caesar	center of advanced european studies and research
CE	Kapillarelektrophorese
DAD	Diodenarray-Detektor
ECD	Elektroneneinfangdetektor
ESI	Elektrospray-Ionisierung
FPLC	Fast protein liquid chromatography
GC	Gaschromatographie
GC	Gaschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
LC	Flüssigchromatographie
LDS	Lithium-Dodecyl-Sulphate
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation
MDL	Method definition language
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
NPD	Stickstoff-/Phosphorselektiver Detektor
Page	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	Puls-Amplituden-Fluorometrie
PS II	Photosystem II
Q	Quadrupol (Analysator)
q	Quadrupol (Stoßzelle)
RP	Reversed Phase
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulphate
SPR	Oberflächen-Plasmon-Resonanz
TOF-MS	Time-of-Flight-MS (Flugzeitmassenspektrometer)
UV	Ultraviolett
GFC	Gelfiltrations-Chromatographie

1 Kurze Darstellung

Der ständig höhere Ertrag an landwirtschaftlichen Erzeugnissen weltweit ist mit der stets wachsenden Anwendung von Pflanzenschutzmitteln verbunden. Den größten Anteil bilden die Herbizide mit einem Marktanteil von 44% (Jahresumsatz von 14,3 Mrd. US\$, Quelle: EPA, 2001). Die wichtigste Herbizidgruppe stellen hier die Wirkstoffe dar, die gezielt zur Hemmung des Photosystems II in den pflanzlichen Chloroplasten eingesetzt werden.

Zur Bestimmung dieser PS-II-Herbizide und weiterer persistenter Metabolite in natürlichen Wasserproben haben in den letzten Jahren die chemischen Analysemethoden durch Flüssigchromatographie mit sensitiven Detektionsverfahren wie Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) allgemein an Bedeutung gewonnen (Substanzbezogene Analytik). Eine alternative Methode zu der chemischen Schadstoffanalytik stellt die immunologische Detektion mit spezifischen Antikörpern dar, die aufgrund der aufwendigen Gewinnung der jeweiligen Antikörper sehr kostspielig sein kann.

Der Einsatz des pflanzlichen Photosyntheseapparates bzw. des darin enthaltenen D1-Proteins für die biosensorische Analytik von Herbiziden und deren Metaboliten stellt nun einen neuen innovativen Ansatz dar, der die chemische Analytik mit den spezifischen Herbizidwirkungen auf biologische Zielstrukturen kombiniert (sog. wirkungsbezogene Analytik). Die chemische Wechselwirkungsuntersuchung wird hierdurch gezielt auf die molekulare Ebene verlagert, wobei nicht nur die einzelne Substanz, sondern die gesamte natürliche Toxizität für biologische Systeme im Vordergrund steht (Summe der potentiellen photosynthetischen Hemmwirkung).

1.1 Aufgabenstellung

Das Verbundprojekt „*Lyophilisierte pflanzliche Membranthylakoide als Träger der Zielstruktur zur Kopplung von Herbiziden*“ umfaßte zwei Teilprojekte:

Teilprojekt 1 des Instituts für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen (IMBIO) der Universität Bonn (ehemals Institut für Landwirtschaftliche Botanik (ILB)) mit der Thematik „Pflanzliche Membranthylakoide als Träger der Zielstruktur zur Kopplung von Herbiziden: Analyse des D1-Protein-Herbizid-Komplexes“ und

Teilprojekt 2 des GKSS Forschungszentrums Geesthacht GmbH (GKSS) mit der Thematik „Wirkungsbezogene Identifizierung photosyntheseinhibierender Substanzen - Chemische Analyse von Liganden und deren D1-Protein-Komplexe“.

Die Aufgaben des IMBIO umfassten vor allem die Isolierung der biologischen Zielstruktur aus pflanzlichen Chloroplastenmembranen (D1-Protein des Photosynthese-II-Systems) und dessen biochemische Charakterisierung. Die Integration der biologisch/biomolekular ausgerichteten Methoden (IMBIO) und der chemischen Analytik (GKSS) sollten den Nachweis der spezifischen Wirkung auf die D1-Zielstruktur als Rezeptor für Herbizide, bei gleichzeitiger Identifizierung und Quantifizierung der zugrunde liegenden Wasserinhaltsstoffe (z. B. Herbizide) erlauben.

1.1.1 Teilprojekt IMBIO/vormals ILB

Ziel des Teilprojektes war es, die Einsetzbarkeit des pflanzlichen Photosynthesezentrums II (PS II) und des darin enthaltenen D1-Proteins für die biosensorisch erfassbare wirkungsbezogene Analytik von PS-II-Inhibitoren, wie Herbiziden und ihre Metaboliten, in Wasser zu untersuchen.

Dabei sollte das D1-Protein als Target für die wirkungsbezogene Analytik eingesetzt werden, d.h. die D1-Zielstruktur, ihre Stabilität und ihre Kopplungsfähigkeit, die für den Grad der phytotoxischen Wirkung bestimmend ist, sollten über Bindungsstudien mittels optischer Detektion biomolekularer Interaktionen anhand der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technik charakterisiert werden. Der innovative Lösungsansatz lag dabei in der neuartigen Kombination von Herbiziddetektion anhand der Hemmwirkung auf den Elektronentransport und der damit gekoppelten Charakterisierung des D1-Proteins als Rezeptorstelle.

In diesem Rahmen sollte das D1-Protein aus pflanzlichen Membranthylakoiden isoliert und seine Wechselwirkung mit Photosystem-II-(PS II)Inhibitoren über Oberflächen-Plasmon-Resonanz(SPR)-Messungen charakterisiert werden. Unter Photosystem-II-Inhibitoren versteht man Substanzen, die am D1-Protein des Photosystems II angreifen und dabei eine Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports bewirken, wie z. B. PS-II-Herbizide. Zur Erfüllung dieser Aufgabenstellung war es im ersten Teil des Teilprojektes notwendig, eine geeignete Aufreinigungsmethode für das D1-Protein aus der pflanzlichen Thylakoidmembran zu entwickeln, bei der die Zielstruktur funktional bindefähig erhalten bleibt. Zusätzlich sollte eine Methode entwickelt werden, die die Erhaltung der Bindefähigkeit über indirekte und direkte Nachweismethoden mit der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-(SPR)Technologie, erbringt. Im zweiten Teil des Teilprojektes sollte die isolierte Zielstruktur als biologische Einheit in einem SPR-Biosensor zum Nachweis von PS-II-Inhibitoren in Gewässerproben eingesetzt werden.

Die wissenschaftliche und technische Herausforderung seitens des ILB/IMBIO lag demnach im ersten Teil in der Entwicklung einer schonenden Aufreinigungsmethode, bei der die Bindefähigkeit der Q_B -Bindenische des D1-Proteins an Herbizide nicht zerstört wird. Im zweiten Teil des Teilprojektes lag die Herausforderung somit im Einsatz des D1-Proteins als biologische Einheit für einen SPR-Biosensor zum direkten Nachweis von kleinen Molekülen, zu denen die PS-II-Herbizide zählen.

Die Entwicklung einer Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Methode zum Nachweis eines herbizidbindefähig isolierten D1-Proteins stellte sich als weitere Herausforderung dar, bei der die Messung kleiner Moleküle (< 300 Da) als besondere Problematik im Kernpunkt des Teilprojektes stand.

Für die Durchführung des Vorhabens waren diese Entwicklungen und Optimierungen erforderlich, um das Ziel des Gesamtvorhabens in der Kooperation mit der GKSS zu erfüllen.

1.1.2 Teilprojekt GKSS

Ziel dieses Teilprojektes war es, photosynthesehemmende Wasserinhaltsstoffe mittels spezifischer Bindungen an D1-Proteine des pflanzlichen Photosynthesezentrums PS II zu identifizieren, zu charakterisieren und zu bewerten. Unter *photosynthesehemmenden Wasserinhaltsstoffen* werden Substanzen verstanden, die durch Bindung an D1-Proteine eine Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports bewirken, wie z.B. Herbizide.

Zur Umsetzung dieser Aufgabenstellung war es erforderlich, geeignete chemisch-analytische Verfahren zu entwickeln und mit der biomolekularen Erkennung (Bindung an D1-Proteine) zu koppeln. Durch eine Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen den isolierten D1-Proteinen und photosynthesehemmenden Stoffen in synthetischen sowie realen Wasserproben sollten die Grundlagen für den Einsatz eines Testsystems zur wirkungsbezogenen Analytik von photosynthesehemmenden Wasserinhaltsstoffen bereit gestellt werden.

Die wissenschaftliche und technische Herausforderung seitens der GKSS lagen in der Entwicklung und dem Einsatz einer ausreichend empfindlichen und hinreichend spezifischen Spurenanalytik, um auf dem Konzentrationsniveau der durchzuführenden Bindungsstudien an den isolierten D1-Proteinen die vorliegenden Wechselwirkungen zu charakterisieren sowie das Testsystem an realen Wasserproben zu evaluieren. Hierzu waren dem neuesten Stand der Technik entsprechende massenspektrometrische Methoden einzusetzen und zu optimieren. Die Verknüpfung der biomolekularen Erkennung mit der chemischen Analytik erforderte zudem die Entwicklung bzw. Optimierung entsprechender Probenvorbereitung- sowie Kopplungsmethoden für die Flüssigchromatographie (LC) mit der Massenspektrometrie (MS) für Mikroproben. Massenspektrometrische Verfahren wurden ebenfalls optimiert und eingesetzt für die chemisch-analytische Charakterisierung der Zielstrukturen (D1-Proteine). Die Durchführung des Vorhabens erforderte die Entwicklung einer leistungsfähigen chemische Analytik (Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie, LC-MS/MS) mit dem Ziel,

1. isolierte D1-Proteine, die biologische Zielstruktur, zu charakterisieren;
2. eine qualitative und quantitative Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen photosynthesehemmenden Substanzen und der biologischen Zielstruktur durchzuführen; sowie
3. an realen Wasserproben eine wirkungsbezogene Identifizierung und Bewertung vorliegender photosynthesehemmender Wasserinhaltsstoffe vorzunehmen.

1.2 Voraussetzungen, unter denen das Projekt durchgeführt wurde

Das IMBIO besass zu Beginn des Projektes eine Grundausstattung nach modernsten Kriterien der Pflanzenphysiologie, Biochemie, Molekularbiologie und Biotechnologie mit S1-Ausstattung und Phytotronen. Ebenso waren Methoden zur chemischen Analytik, wie HPLC mit unterschiedlichen Detektionsmöglichkeiten (UV, DAD), Kapillarelektrophoresetechniken und GC, PAM-Techniken (Water-, ToxY-PAM), Sauerstoffelektroden u. a. vorhanden.

Diese Ausstattung konnte durch die Kooperation mit dem Forschungszentrum caesar (center of advanced european studies and research) seit dem 01.07.2003 und den damit zusätzlich verfügbaren Mitteln erweitert werden (Biacore-Recovery-upgrade-Paket, sowie Verfügbarkeit eines Bruker-Reflex-II-Massenspektrometers).

Die Beschaffung des Biacore 3000-Gerätes erfolgte im Dezember 2002 und wurde nach Einweisung durch die Firma Biacore AB in Betrieb genommen.

Die beiden Personalstellen BAT Ila (wissenschaftlicher Mitarbeiter) und BAT Ila/2 (Doktorandenstelle) begleiteten das Vorhaben.

Seitens GKSS war die technische Infrastruktur, instrumentelle Ausstattung sowie die notwendige Expertise zur Durchführung des Teilprojektes bei Projektbeginn vorhanden. Die Zuwendungsmittel wurden benötigt für Personal, Verbrauchsmaterial und Dienstreisen. Kurzfristig nach Eingang des Zuwendungsbescheids am 20.09.2002 wurde die wissenschaftliche Mitarbeiterstelle zum 15.10.2002 besetzt.

1.3 Planung und Ablauf des Projektes

Die wesentlichen Arbeitspakete des Verbundprojektes sowie die Vernetzung der Kooperationspartner IMBIO und GKSS sind dem Projektstrukturplan (Abb. 1-1) zu entnehmen. Die ursprüngliche Zeitplanung der Arbeitspakete und Meilensteine der beiden Teilprojekte ist in den Abbildungen 1-2 und 1-3 dargestellt.

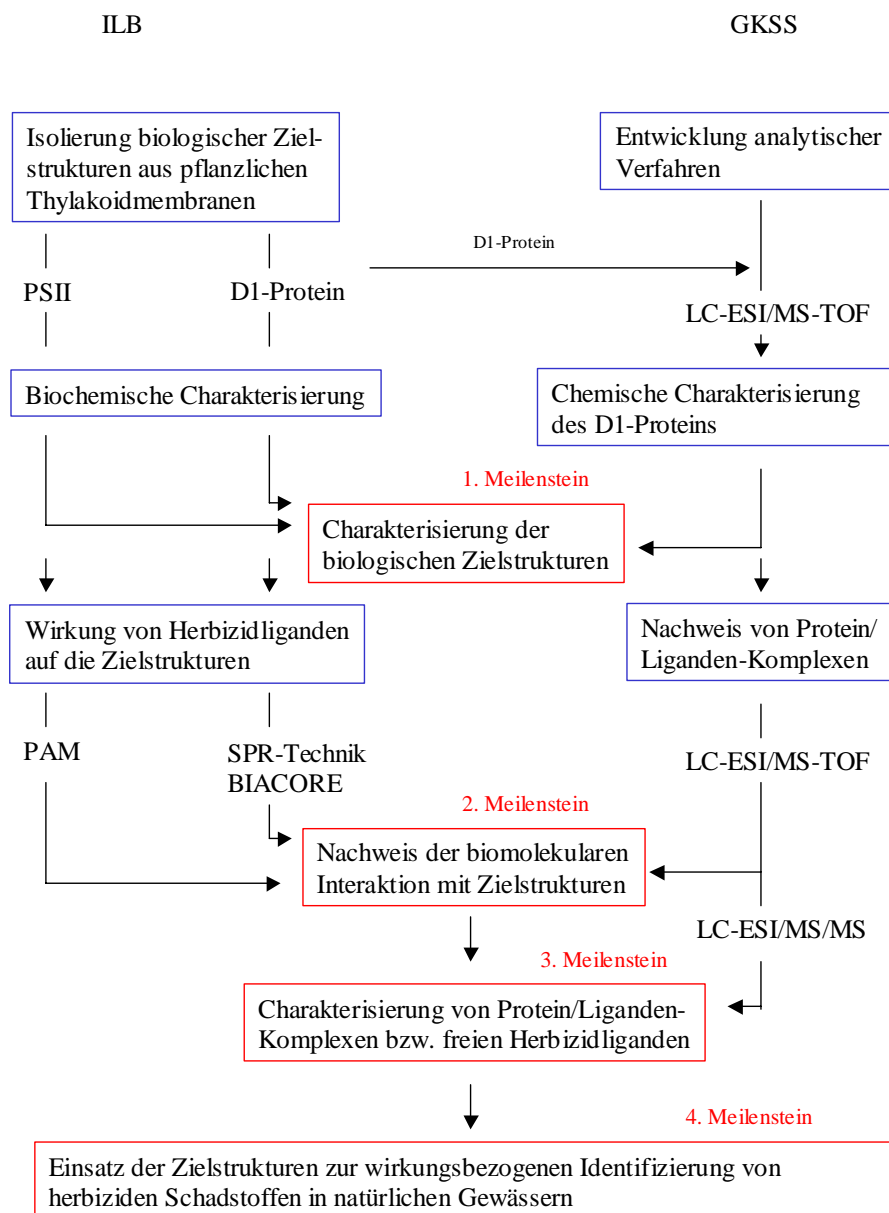


Abb. 1-1: Gesamtprojekt-Strukturplan

Zeitplan (Arbeitspakete und Meilensteine)

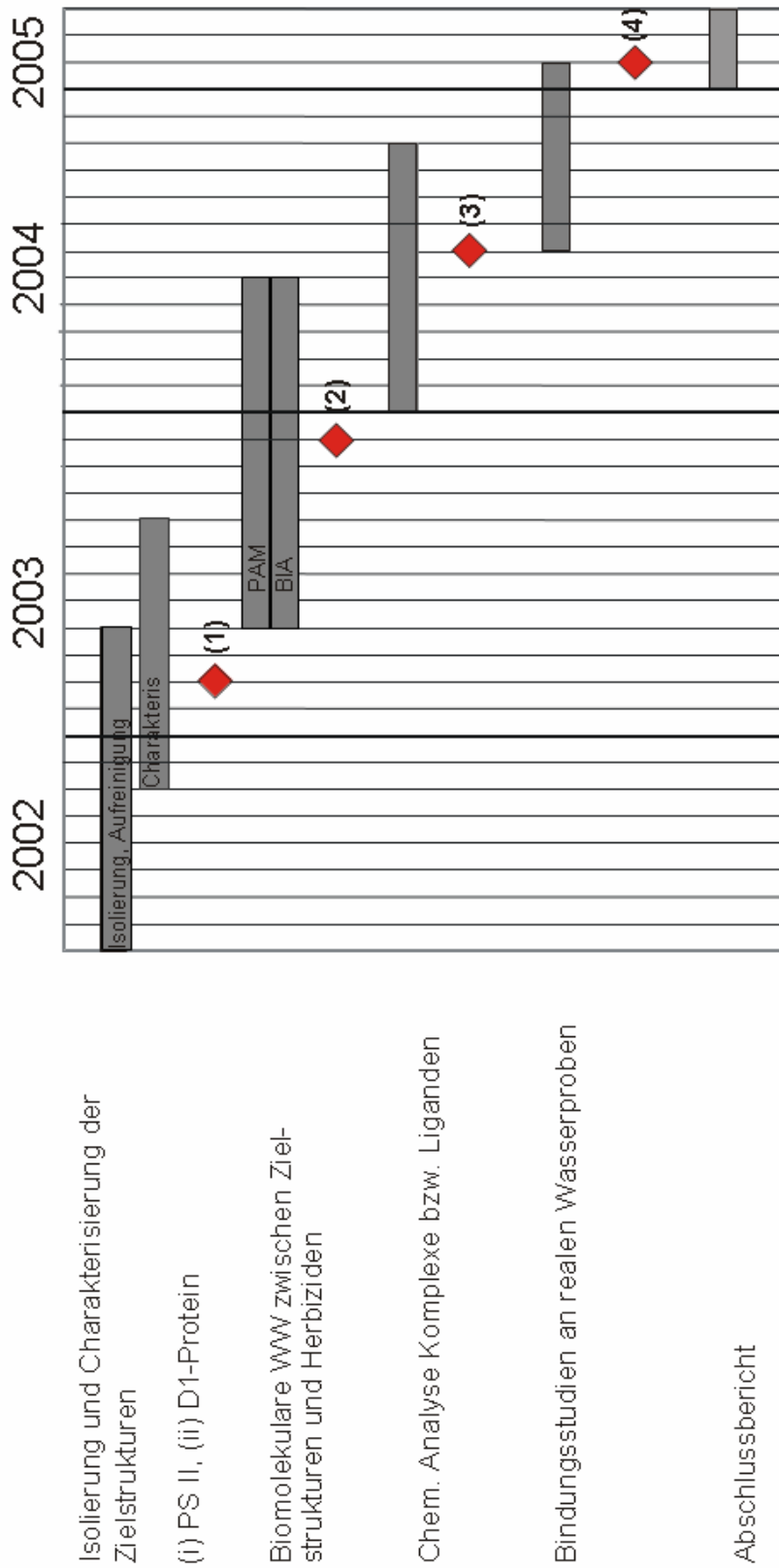


Abb. 1-2: Zeitplan (Arbeitspakete und Meilensteine) Teilprojekt IMBIO

Arbeitspakete Teilprojekt IMBIO

Die Arbeitspakete und Meilensteine sind im folgenden dargelegt :

Isolierung und biochemische Charakterisierung der Zielstrukturen (i) PS II und (ii) D1-Protein:

Der PS-II-Proteinkomplex bzw. das D1-Protein sollten als Zielstrukturen für die biomolekulare Erkennung von Herbiziden in Wasserproben charakterisiert werden. Dazu werden Thylakoidmembranen isoliert und aus Chloroplasten von *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Lactuca sativa* aufgearbeitet. Die Isolierung der PS-II-Proteinkomplexe aus den Thylakoiden erfolgt über eine Butanolextraktionsmethode, der Grad der Aufreinigung wird über Gelelektrophorese und Western Blotting überprüft, die funktionelle Charakterisierung erfolgt über Inhibierung des Elektronentransportes mit PAM-Fluorometrie.

Das D1-Protein wird somit als Zielprotein aus der funktionellen Einheit des PS II isoliert. Es soll eine biosensorgestützte Methode zur Proteinaufreinigung der potentiellen Bindungsstelle der Photosyntheseherbizide über Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analysen (Biacore 3000) erarbeitet werden. Dazu soll die Bindungsaktivität der Proteinfractionen an herbizidmodifizierten Chipoberflächen charakterisiert werden. Die Präparation geeigneter Oberflächen erfolgt mit Simazinhexansäurederivaten. Die D1-Protein-Aufreinigung aus der Rohfraktion soll über Reversed-Phase-Chromatographie erfolgen. Der Nachweis der Bindefähigkeit des D1-Proteins wird über die Methode der SPR mittels Simazinderivatchip durchgeführt werden. Dabei wird angestrebt, nach Lyophilisierung funktionsfähige biologische Einheiten mit einer hohen Langzeitstabilität zu erhalten. Für eine gezielte Optimierung der Reinigungsmethoden soll die Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technik (Biacore 3000) eingesetzt werden. Die biochemische Charakterisierung des aufgereinigten Proteins erfolgt über Gelelektrophorese und Western Blotting. Strukturanalytische Arbeiten am aufgereinigten D1-Protein sollen in Kooperation mit der GKSS durchgeführt werden. (*Meilenstein 1: D1-Protein isoliert und charakterisiert*).

Charakterisierung der biomolekularen Wechselwirkungen zwischen den biologischen Zielstrukturen und Herbiziden:

In biomolekularen Interaktionsanalysen zwischen dem isolierten D1-Protein und Herbiziden werden Bindungsstudien an D1-Protein-Herbizid-Addukten über SPR-Analysen (Biacore 3000) durchgeführt. Der innovative Charakter liegt insbesondere auch in kinetischen Informationen und Bindungsaffinitäten von Herbiziden, die über derartige markierungsfreie Realzeituntersuchungen zugänglich gemacht werden. (*Meilenstein 2: Nachweis von spezifischen Wechselwirkungen zwischen dem D1-Protein und Herbiziden*).

(Bio-)chemische Analyse der D1-Protein-Herbizid-Komplexe bzw. freier Herbizidliganden:

In Kooperation mit der GKSS Geesthacht sollen massespektrometrische Analysen der D1-Protein-Herbizid-Komplexe bzw. freier Herbizidliganden durchgeführt werden. Im ersten Teil werden D1-Protein-Herbizid-Komplexe entsprechend der Ergebnisse der biomolekularen Interaktionsanalysen (s.o.) im Batchverfahren hergestellt und mit massespektrometrischen Methoden charakterisiert. Ziel der Analyse ist es, strukturelle Unterschiede der Komplexe für verschiedene definierte Herbizidliganden zu bestimmen. Nachfolgend wird versucht, eine direkte Kopplung der SPR-Technologie mit massespektrometrischen Analysen zu ermöglichen. Damit kann der Anspruch einer wirkungsbzogenen Analytik erfüllt werden.

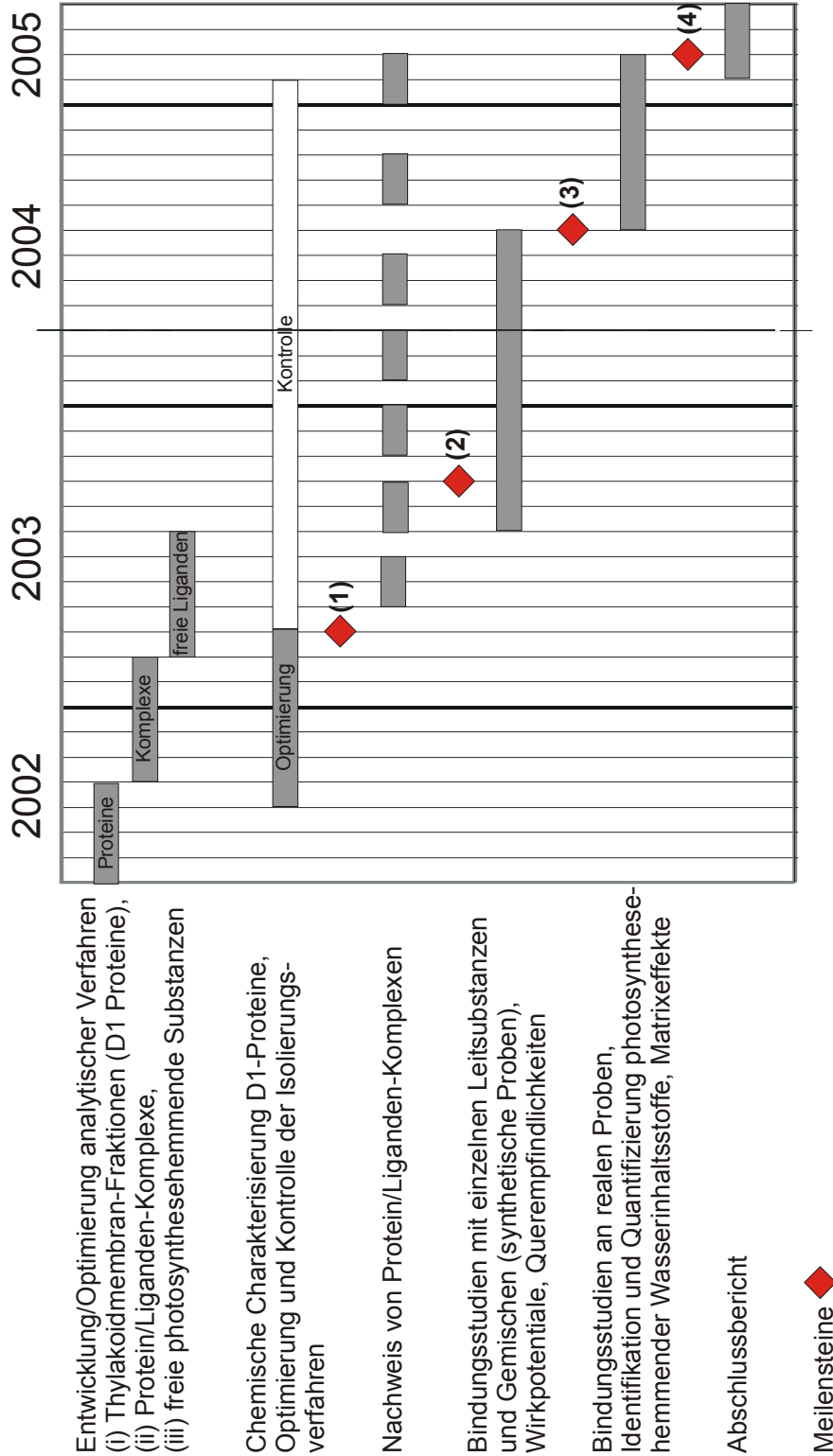
Parallel dazu sollen Methoden erarbeitet werden, um den Rezeptor-Ligandenkomplex in geeigneter Weise für eine nachfolgende chemische Analytik der Herbizidliganden zu

trennen. Dazu soll ebenfalls die SPR-Technologie eingesetzt werden. Die Analyse der Photosyntheseherbizide soll nach der Entkopplung des D1-Protein-Ligandenkomplexes durchgeführt werden. Dieses Konzept stellt einen innovativen Ansatz zur Kopplung des Nachweises der Photosyntheseinhibierung und der chemischen Identifizierung und Quantifizierung verursachender Substanzen dar. Dabei können auch aktive Metabolite der Herbizide erfasst werden. Zur geeigneten Auftrennung der herbizidhaltigen Analyseproben ist der Einsatz moderner Flüssigchromatographie- und Kapillarelektrophorese-Techniken erforderlich. Für die Detektion der Liganden kommen sensitive Verfahren wie Thermospray- und Elektrospray-Massespektrometrie (MS) zur Anwendung. Diese Arbeiten werden vom Kooperationspartner GKSS Geesthacht durchgeführt (s. Strukturplan GKSS). (*Meilenstein 3: Charakterisierung von D1-Protein-Herbizid-Ligandenkomplexen bzw. freien Herbizidliganden*).

Einsatz der Zielstrukturen für die wirkungsbezogene Identifizierung herbizider Schadstoffe in natürlichen Gewässern:

Die isolierten biologischen Zielstrukturen (D1-Protein, PS-II-Proteinkomplexe) aus pflanzlichen Thylakoidmembranen sollen zur Analyse von Proben natürlicher Gewässer eingesetzt werden. Im Anschluss an den Nachweis einer phytotoxischen Wirkung über biomolekulare Interaktionsanalysen mit dem D1-Protein bzw. PS-II-Proteinkomplexen über SPR-Messungen sollen die potentiellen Schadstoffliganden mit den von dem Kooperationspartner entwickelten Analysemethoden identifiziert werden (s. u.). (*Meilenstein 4: Einsatz der biologischen Zielstrukturen für die wirkungsbezogene Analyse realer Wasserproben*).

Zeitplan (Arbeitspakete und Meilensteine)



Entwicklung/Optimierung analytischer Verfahren
 (i) Thylakoidmembran-Fractionen (D1 Proteine),
 (ii) Protein/Liganden-Komplexe,
 (iii) freie photosynthesehemmende Substanzen

Chemische Charakterisierung D1-Proteine, Optimierung und Kontrolle der Isolierungsverfahren

Nachweis von Protein/Liganden-Komplexen

Bindungsstudien mit einzelnen Leitsubstanzen und Gemischen (synthetische Proben), Wirkpotentiale, Querempfindlichkeiten

Bindungsstudien an realen Proben, Identifikation und Quantifizierung photosynthesehemmender Wasserinhaltsstoffe, Matrixeffekte

Abschlussbericht

Meilensteine ◆

- (1) Chemische Charakterisierung von D1-Proteinen: D1-Proteine isoliert und charakterisiert
- (2) Nachweis der biomolekularen Interaktion mit Zielstrukturen: D1-Protein/Liganden-Komplexe nachgewiesen
- (3) Charakterisierung von Protein/Liganden-Komplexen bzw. freien Liganden: Testsystem (D1-Proteine) bezüglich photosynthesehemmender Leitsubstanzen validiert
- (4) Testsystem (D1-Proteine) bezüglich realer Wasserproben evaluiert

Abb. 1-3: Zeitplan (Arbeitspakete und Meilensteine) Teilprojekt GKSS

Arbeitspakete Teilprojekt GKSS

Es sollten chemisch-analytische Verfahren entwickelt/optimiert werden zur Charakterisierung (i) der D1-Proteine, (ii) der Protein/Liganden-Komplexe und (iii) freier Liganden (photosynthesehemmende Substanzen) sowie im Anschluss das Verfahren mit realen Wasserproben evaluiert werden. Damit ergaben sich die folgenden Arbeitspakete:

Chemische Charakterisierung der D1-Proteine: Vom Kooperationspartner (ILB) werden Verfahren zur Isolierung von D1-Proteinen aus Chloroplasten unterschiedlicher pflanzlicher Spezies entwickelt und isolierte D1-Proteine bzw. D1-Protein-haltige Extrakte oder Fraktionen zur Verfügung gestellt. Zur Charakterisierung der D1-Proteine bzw. der Extrakte/Fraktionen werden höher auflösende massenspektrometrische Methoden (Time-of-Flight MS, TOF-MS) optimiert und eingesetzt. Die Ionisierung erfolgt über Elektrospray (ESI). Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Mengen wird eine Nanospray-Quelle eingesetzt. Je nach Komplexität der D1-Proteinfraktion erfolgt eine LC-Trennung, die direkt mit dem MS-TOF gekoppelt wird. Um bei der LC bzw. bei der Ionisierung störende Begleitstoffe (Salze, Reagenzien aus den Isolierungsverfahren etc.) abzutrennen, wird ein vorgeschalteter Mikro-Cleanup entwickelt werden. Die chemische Charakterisierung wird eingesetzt, um (i) die Optimierung der Isolierungsverfahren der D1-Proteine zu unterstützen und (ii) um im Projektverlauf sicher zu stellen, dass für die Bindungsstudien "quasi-standisierte", d.h. vergleichbare Zielstrukturen eingesetzt werden (*Meilenstein:* D1-Proteine isoliert und charakterisiert).

Nachweis von Protein/Liganden-Komplexen: Nachdem die D1-Proteine biochemisch (IMBIO) und chemisch-analytisch (GKSS) charakterisiert zur Verfügung stehen, werden Vorversuche zu den Bindungsstudien durchgeführt. Hierbei geht es um den Nachweis von Protein/Liganden-Komplexen. Mit der zur Verfügung stehenden Massenauflösung (TOF-MS) kann über die Massendifferenzen zwischen auftretenden Quasi-Molekülonen (D1-Protein, freie Liganden, Komplexe) ermittelt werden, inwieweit Protein/Liganden-Komplexe gebildet werden. Die Ionisierung erfolgt ebenfalls über ESI und die Trennung über LC. Je nach Konzentrationsniveau der Vorversuche muss gegebenenfalls ein Anreicherungs/Cleanup-Schritt zwischengeschaltet werden. Diese Methodik wird auch begleitend zu den Bindungsstudien eingesetzt (*Meilenstein 2:* D1-Protein/Liganden-Komplexe nachgewiesen).

Bindungsstudien mit synthetischen Proben: Bindungsstudien werden mit synthetischen Proben, d.h. einzelnen photosynthesehemmenden Substanzen bzw. Gemischen, durchgeführt. Die Quantifizierung der Bindung einzelner Ligandenspezies an die Zielstruktur (D1-Proteine) erfolgt nach Entkopplung der Protein/Liganden-Komplexe durch ILB bzw. durch Differenzbildung (eingesetzte Stoffmenge des Liganden abzüglich der frei verbleibenden Stoffmenge des Liganden nach Komplexbildung).

Falls die Bestimmungsgrenzen der chemischen Analytik ausreichen, wird diese mit der vom IMBIO eingesetzten SPR-Technik gekoppelt. Andernfalls werden Versuche auf höherem Konzentrationsniveau durchgeführt. Die Quantifizierung der Liganden (photosynthesehemmende Substanzen) erfolgt mittels Tandem-Massenspektrometrie gekoppelt mit LC. Entsprechende Anreicherungs/Cleanup-Schritte müssen gegebenenfalls entwickelt werden. Mit der beschriebenen Vorgehensweise wird das Testsystem für ausgewählte Leitsubstanzen validiert: wirkungsbezogenes Ranking (dose/response), Querempfindlichkeiten zwischen mehreren Leitsubstanzen (kompetitive Bindung), Einfluss von Matrixbestandteilen wie z.B.

Huminstoffe. Als Leitsubstanzen kommen ausgesuchte Herbizide in Betracht (*Meilenstein 3*: Testsystem bezüglich photosynthesehemmender Leitsubstanzen validiert).

Bindungsstudien mit realen Wasserproben: Die Bindungsstudien mit realen Wasserproben werden in Analogie zu den Versuchen mit synthetischen Proben durchgeführt. Eingesetzt werden natürliche Oberflächengewässerproben sowie aufgestockte Proben. Hinzukommen folgende Aspekte die ebenfalls untersucht werden: (i) Querempfindlichkeiten in realen Proben, (ii) Einfluss von nicht-herbiziden Substanzen und realer Matrix, (iii) Aufklärung eventuell unbekannter photosynthesehemmender Substanzen (Herbizidmetabolite und andere Wasserinhaltsstoffe). Zur Strukturaufklärung unbekannter Wasserinhaltsstoffe wird die Tandem-Massenspektrometrie mit Hochauflösung (Quadrupol-Time-of-Flight, QqTOF) eingesetzt (*Meilenstein 4*: Testsystem bezüglich realer Wasserproben evaluiert).

1.4 Wissenschaftlich technischer Stand, an dem angeknüpft wurde

Photosynthesehemmende Wirkstoffe werden gezielt als Herbizide in der Landwirtschaft, zur Vegetationskontrolle auf Gleisanlagen und anderen Frei- und Verkehrsflächen und als Bestandteile in Schiffsanstrichen (Antifoulingmittel) eingesetzt. Die nachhaltige Nutzung von Wasserressourcen erfordert in dieser Hinsicht den Schutz und die Überwachung von Oberflächengewässern und Grundwasser. Schutzgüter sind u.a. die Trinkwassergewinnung und die aquatische Lebensgemeinschaft (Claussen et al., 1999).

Die Überwachung von Oberflächenwässern bzw. Rohwässern (Grundwasser, Uferfiltrat) zur Trinkwassergewinnung erfolgt i.d.R. durch chemische Einzelstoffanalyse. Für eine Reihe von Pestiziden, insbesondere auch Herbizide, wurden Immunoassays entwickelt und für einige Wirkstoffe sind bereits Test-Kits kommerziell erhältlich. Diese werden meist als Screeningverfahren eingesetzt und sind, eine hohe Spezifität vorausgesetzt, eine Alternative zur chemischen Target-Analytik. Die genannten Methoden erlauben die Identifizierung und Quantifizierung bekannter photosynthesehemmender Wasserinhaltsstoffe.

Biotests mit Organismen (z.B. Algen-Tests) erlauben Aussagen über toxische Wirkungen, sind aber unspezifisch, d.h. Wirkmechanismus sowie Art und Menge der ursächlichen Wasserinhaltsstoffe kann nicht ermittelt werden.

Der Einsatz isolierter PS II Komplexe bzw. D1-Proteine des pflanzlichen Photosynthesystems erlauben wirkungsbezogene Aussagen.

Der Photosyntheseapparat grüner Pflanzen und Algen ist ein hoch komplexes System, das aus einer Zahl von Komplexen aus Proteinuntereinheiten besteht, die an die Thylakoidmembranen der Chloroplasten gebunden sind. Ein Kernelement dieses Systems ist das Photosystem II (PS II), welches die Nutzung der Lichtenergie zur Reduktion von Plastochinon, für die Oxidation von Wasser und zur Bildung des Transmembran-pH-Gradienten ermöglicht. Das PS II besteht aus mindestens 25 verschiedenen Proteinuntereinheiten, von denen ein großer Teil direkt an die Thylakoidmembran gebunden ist (Hankamer *et al.*, 1997a und 1997b). Diese Untereinheiten sind für die Absorption der Sonnenenergie, die Regulation des energetischen Flusses sowie den Ablauf der photochemischen Prozesse einschließlich der Oxidation von Wasser zu molekularem Sauerstoff verantwortlich.

Den zentralen Teil des PS II bildet der Kernkomplex mit den Proteinen D1 und D2 als Reaktionszentren und den Antennenproteinen CP47 und CP43 als grösste und wichtigste Komponenten. Diese Struktur ist für die Elektronentransferprozesse und die Bildung des molekularen Sauerstoffs verantwortlich. Der dimere Kernkomplex ist von peripheren Antennen umgeben, die aus light-harvesting complex (LHC II) Proteinen bestehen und eine große Menge an Chlorophyll a und b sowie Xanthophyll binden. Gerade in den Jahren vor Beginn dieses Projektes wurden entscheidende Fortschritte bei der Charakterisierung und strukturellen Analyse des PS-II-Systems erzielt (Zheleva *et al.*, 1998; Boekema *et al.*, 1999 und 1995; Kuhl *et al.*, 2000; Zouni *et al.*, 2001). Strukturinformationen, die über elektronenkristallographische Untersuchungen am intakten, aktiven PS II mit einer Auflösung von 15 bis 30 Å (Nield *et al.*, 2000) und an D1-D2-CP47-Fragmenten ohne wasseroxidierende Aktivität von 8 Å (Rhee *et al.*, 1998) gewonnen wurden, konnten 2001 durch Kristallstrukturanalysen des Photosystems II von *Synechococcus elongatus* unter Erhalt der Aktivität zur Wasseroxidation mit einer Auflösung von 3,5 Å verfeinert werden (Zouni *et al.*, 2001). Die Voraussetzungen für derartige Untersuchungen wurden durch die Entwicklung geeigneter Methoden zur Isolierung und Aufreinigung des PS-II-Komplexes aus Chloroplasten geschaffen. Hankamer *et al.* (1997b) beschrieben eine effektive Methode zur Isolierung des PS II aus Spinatchloroplasten unter Einsatz milder Detergenzien. Die Aktivität zur Sauerstoffentwicklung blieb dabei nur teilweise erhalten, was durch die Abspaltung der extrinsischen 23-kDa- und 16-kDa-Proteine aus dem Komplex bedingt wurde. Eine Optimierung der Aufreinigungsmethoden über eine einstufige Detergentienbehandlung macht den PS-II-LHCII-Komplex-Erhalt der extrinsischen Proteine (33-kDa, 23-kDa und 16-kDa) mit wesentlich höheren Aktivitäten zur Sauerstoffentwicklung von 1630 $\mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ zugänglich (Eshagi *et al.*, 1999). Eine weiterführende Analyse dieser Komplexe ergab Hinweise auf eine Modifizierung von ca. 40% der Q_B -Bindungsstellen (Eshagi *et al.*, 2000). Der Einsatz chromatographischer Aufreinigungsverfahren ermöglichte die Isolierung des PS II aus dem thermophilen Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* in einer hohen Reinheit mit einer sehr hohen Ausbeute (10 mg Protein in 2 Tagen) und extrem hohen Aktivitäten zur Sauerstoffentwicklung (5000-6000 $\mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$). 70-80 % dieser Aktivität konnten auch noch nach 7 Tagen Lagerung auf Eis und im Dunkeln nachgewiesen werden (Kuhl *et al.*, 2000).

Vergleichende Untersuchungen zur Aufreinigung des PS-II-Reaktionszentrums aus Spinat über Kurzzeit- (15 min) und Langzeitbehandlungen (15 h) mit Triton X-100 sowie mit LiClO_4 und Dodecylmaltosid wurden von Eijkelhoff *et al.* (1996) durchgeführt. Dabei wurden effektive Reinigungsmethoden über Gelfiltration erarbeitet.

Herbizide, die den photosynthetischen Elektronentransport hemmen (z. B. Simazin, Atrazin, Diuron u. a.), binden an spezifische Bindungsstellen des D1-Proteins. Obwohl diese Inhibitoren mit dem nativen Plastochinon um Bindungsstellen der Q_B -Bindungsstellen konkurrieren, müssen die Herbizide bezüglich der Bindungsmuster stark differenziert werden (Oettmeier, 1999). Dabei unterscheiden sich insbesondere die „klassischen“ Herbizide (Triazine, Tiazinone, Harnstoffe) von den phenolischen Herbiziden (Bromoxynil, Ioxynil, BNT, Dinoseb). Während man für die „klassischen Herbizide“ von einer Bindung an Ser264 ausgeht, orientieren sich die phenolischen Herbizide an His215 (Trebst, 1987).

Es wurden verschiedene Methoden für Biosensorsysteme entwickelt, die auf einer umweltanalytischen Detektion von Herbiziden auf der Basis der Hemmung des

Photosystems II beruhen (Peters *et al.*, 1997; Koblizek *et al.*, 1998; Piletskaya *et al.*, 1999b). Dabei werden Nachweisgrenzen bis zu 5×10^{-10} M Diuron allerdings nach Anreicherung angegeben (Koblizek *et al.*, 1998).

Bindungsstudien für die neue Herbizidklasse der Triazine unter Einsatz von [^{14}C]-Atrazin ergaben eine kompetitive Interaktion und analoge Bindungsmuster der Herbizide. In diesem Zusammenhang wurden K_i -Werte zwischen 0,18 und $1,08 \times 10^{-7}$ M bestimmt, die Inhibierungen des photosynthetischen Elektronentransfers pI_{50} zwischen 5,95 und 7,21 entsprechen (Ohki *et al.*, 1999). Aufgrund der selektiven Bindung der Photosyntheseherbizide an das D1-Protein wurde dieses Protein auch als Ersatz für Herbizidantikörper in modifizierten enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) vorgeschlagen (Piletskaya *et al.*, 1999a). Grundlage dafür ist die Isolierung des D1-Proteins aus Thylakoidmembranen über Butanolextraktion und Reversed-Phase-Chromatographie (Wildner *et al.*, 1987). Nach Lyophilisierung wurden biologische Einheiten mit einer Funktionsfähigkeit von mindestens zwei Jahren erhalten (Piletskaya *et al.*, 1999a).

Realzeituntersuchungen des Bindungsvorganges von Herbiziden an Antikörper und das D1-Protein wurden unter Anwendung moderner optischer Transducer in Form von Mikrorfraktometern und Mirkoreflektometern durchgeführt (grating coupler, channel waveguide interferometer, waveguide surface plasmon resonance, thin film reflectometry) (Brecht *et al.*, 1997; Chegel *et al.*, 1998).

Der Einsatz der reflektometrischen Interferenz-Spektroskopie gestattet dabei den Nachweis von Atrazin in natürlichen Wasserproben bis zu einer Nachweisgrenze von 0,19 $\mu\text{g/l}$ (Mouvet *et al.*, 1996 und 1997). Die Bestimmung von Simazin über die Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse ist mit einer Nachweisgrenze von 0,2 $\mu\text{g/l}$ möglich (Mouvet *et al.*, 1997). Da die nachzuweisenden kleinen Herbizidmoleküle bei diesen optischen Messverfahren nur kleine Signale hervorrufen, werden sie in indirekter Form über kompetitive Wechselwirkungen an herbizid-modifizierten Oberflächen bestimmt.

In den letzten Jahren vor Projektbeginn konnten die chemischen Analysemethoden zur Bestimmung von Herbiziden und persistenten Metaboliten in natürlichen Wasserproben durch die technischen Entwicklungen der Analysegeräte entscheidend verbessert werden. In Kombination mit geeigneten Anreicherungsverfahren wie der Festphasenextraktion (SPE) wurden dabei Nachweisgrenzen im Bereich weniger ng/l erreicht (D'Ascenzo *et al.*, 1998). Durch die Einführung sensitiver Detektionsverfahren wie Thermospray (TS)- und Elektrospray (ES)-Massenspektrometrie (MS) hat besonders die Flüssigchromatographie für die Herbizidanalytik an Bedeutung gewonnen (Schröder, 1997; Marek, 2000). Auf der Basis derartiger Analysetechniken wurden in den letzten Jahren zahlreiche Methoden für die Analyse von Herbiziden unterschiedlicher Substanzklassen beschrieben (Kambhampati *et al.*, 1994; Nelieu *et al.*, 1994; Crescenzi *et al.*, 1995; Bossi *et al.*, 1996; Di Corcia *et al.*, 1997; Vahl *et al.*, 1998).

Die Kopplung der biomolekularen Erkennung (Zielstruktur: D1-Proteine) mit einer leistungsfähigen chemischen Analytik auf dem Konzentrationsniveau (pmol-fmol) von Bindungsstudien sowie unter Einbeziehung realer Wasserproben ist bisher noch nicht durchgeführt worden. Mit diesem Ansatz, der im vorliegenden Vorhaben verfolgt wird, sollen photosynthesehemmende Substanzen identifiziert und quantifiziert und gleichzeitig einem Wirkpotential zugeordnet werden.

Über die D1-Proteine als Zielstruktur können eine Reihe gebräuchlicher herbizider Wirkstoffe erfasst werden. Hierzu zählen Triazine, Triazinone, Phenylharnstoffe, Carbamate und Phenolderivate (Oettmeier, 1999). Die photosynthesehemmende Wirkung dieser Stoffklassen beruht auf der Hemmung des Elektronentransports im PS II Komplex. D1-Proteine aus PSII Komplexen variieren für unterschiedliche pflanzliche Spezies. Darüber hinaus können Mutationen der D1-Proteine vorliegen (Oettmeier, 1999). Für die Optimierung der Isolierungsverfahren für D1-Proteine ist eine chemische Charakterisierung der D1-Protein-Fraktion hilfreich. Zudem ist die chemische Charakterisierung notwendig, um über längere Versuchsreihen sicher zu stellen, dass vergleichbare „quasi standardisierte“ Zielstrukturen eingesetzt werden.

D1-Proteine, andere Untereinheiten des PS II Komplexes sowie Membranproteine werden durch massenspektrometrische (MS) Verfahren charakterisiert (Whitelegge et al., 1998a; Whitelegge et al., 1999; Szabo et al., 2001; Sharma et al., 1997a; Sharma et al., 1997b). Hierzu werden Quadrupol- sowie 'Time-of-flight (TOF)'-Geräte eingesetzt, wobei letztere eine höhere Massenauflösung bis ca. 10.000 erlauben und zudem einen höheren Massenbereich aufweisen. Von den Ionisierungsverfahren werden überwiegend ‚Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)‘ und ‚Electrospray Ionisation‘ (ESI) verwendet. MALDI erzeugt im Gegensatz zu ESI einfach geladene Ionen, weshalb es zur Untersuchung größerer Proteine (D1-Protein: 38 kDa) in Verbindung mit Quadrupolgeräten nicht geeignet ist. ESI erlaubt die direkte Kopplung mit flüssigkeitschromatographischen (LC) Trennverfahren sowie mit der Kapillarelektrophorese (CE) oder der Gelpermeationschromatographie (GPC) (Whitelegge et al., 1998a).

Nach wie vor werden standardisierte Verfahren wie HPLC/DAD (Hochleistungsflüssigchromatographie/Diodenarray-Detektor) oder GC/ECD (Gaschromatographie/Elektroneneinfangdetektor), GC/NPD (GC/ Stickstoff-/Phosphorselektiver Detektor) zur Bestimmung von Herbiziden und anderen Wirkstoffen eingesetzt. Um eine eindeutige also sichere Identifizierung der Wirkstoffe zu gewährleisten, d.h. falsch-positiv-Befunde zu vermeiden, setzt sich der Einsatz massenspektrometrischer Verfahren gekoppelt mit GC- bzw. LC-Trennung jedoch zunehmend durch. Eine hohe Spezifität zur sicheren Identifizierung und Quantifizierung kann hierbei durch Tandem-MS Techniken sowie zusätzlich durch eine hohe Auflösung der eingesetzten Massenspektrometer erreicht werden.

Üblicherweise eingesetzte Multi-Methoden, welche die parallele Bestimmung einer Vielzahl von Wirkstoffen unterschiedlicher Substanzklassen erlauben, schränken grundsätzlich eine umfassende Abtrennung von Probenbegleitstoffen (Matrix) stark ein. Dies kann insbesondere bei der gaschromatographischen Trennung zu sogenannten "Matrixeffekten" führen, wodurch die Messunsicherheit bei der Quantifizierung erhöht wird (Gandraß, 1999). Matrixeffekte treten, wenn auch in geringerem Umfang, ebenso bei der LC/MS Analyse auf durch Suppression der Ionisierungsausbeute im Interface (Barceló & Hennion; 1997; Roos, 2003).

Dem Stand der Technik entsprechende Multi-Methoden für die Bestimmung von Herbiziden und anderen Wirkstoffen z.B. in Oberflächengewässern erlauben unter Einsatz von GC- und LC-MS/MS-Verfahren Bestimmungsgrenzen im untersten ng/L-Bereich, teilweise auch darunter (Gandraß, 1999; Roos, 2003).

An die Analyse von Herbiziden in Oberflächengewässern werden je nach Wirkstoff und dessen Effektkonzentrationen bzw. Qualitätsziele in Bezug auf die aquatische

Lebensgemeinschaft unterschiedliche Anforderungen gestellt. Für Diuron beispielsweise wurde ein Qualitätsziel von 6 ng/L festgelegt (vorläufiges Beurteilungskriterium, Internationale Kommission zum Schutz des Rheins, 1997). Für viele Herbizide, die relativ unkritische Effektkonzentrationen aufweisen, wird als Qualitätsziel der Grenzwert der Europäischen Trinkwasserrichtlinie (0,1 µg/L) herangezogen. Dieser Grenzwert wurde pragmatisch festgelegt und ist toxikologisch nicht begründet.

Eine ausführliche Diskussion des Standes der Technik der chemischen Analyse insbesondere mit massenspektrometrischen Methoden von Herbiziden und Pestiziden im allgemeinen und entsprechende Referenzen finden sich u.a. in Barceló & Hennion (1997) und Hogendoorn & van Zoonen (2000).

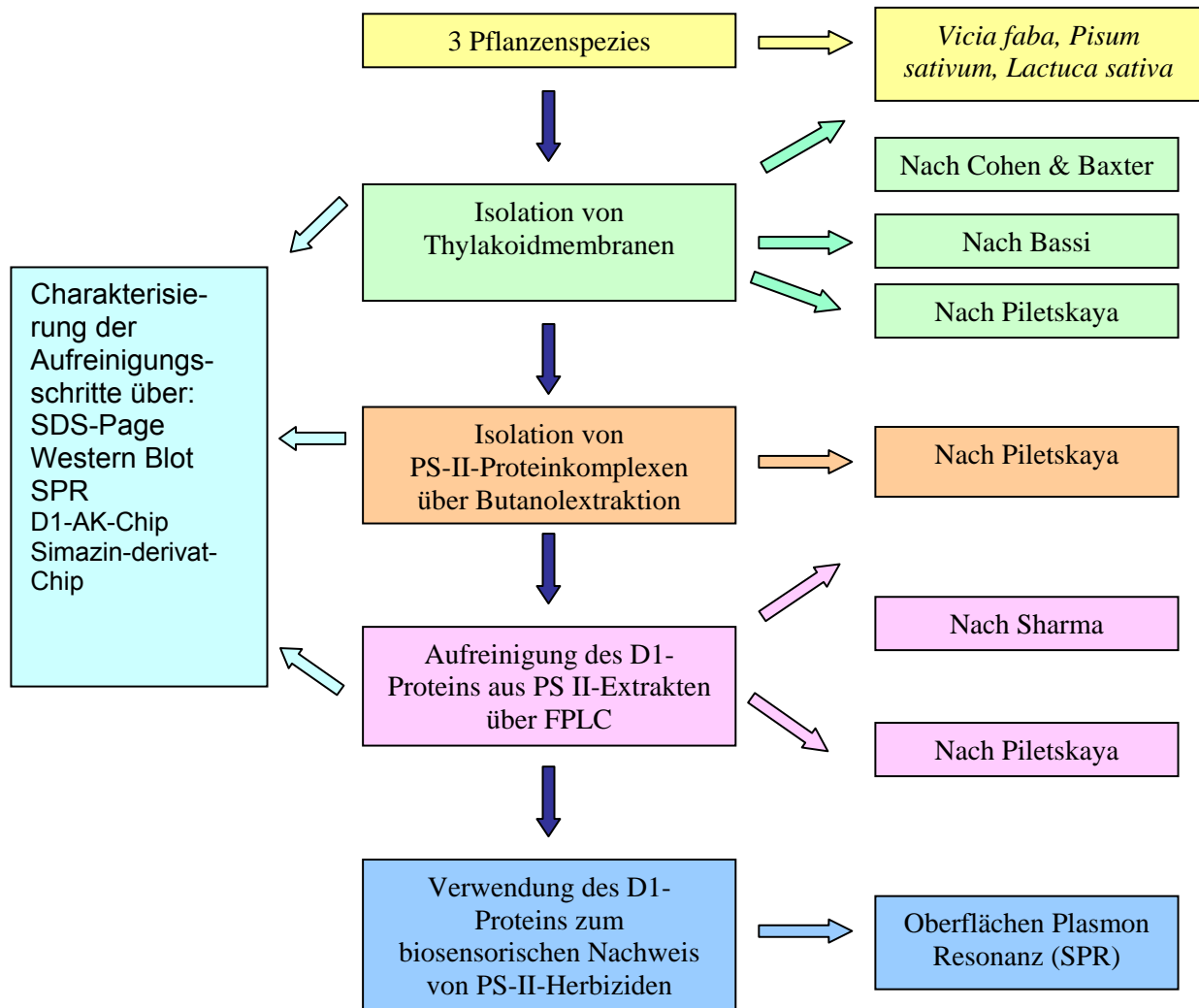
1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Es sollte in der Zukunft eine strategische Zusammenarbeit mit der Firma Biacore AB bezüglich der biomolekularen Interaktionsanalysen mit der biologischen Zielstruktur erfolgen.

2 Eingehende Darstellung

2.1 Erzielte Ergebnisse Teilprojekt IMBIO

Das folgende Flussdiagramm gibt eine Übersicht über die einzelnen Schritte der D1-Proteinaufreinigung, sowie der verwendeten Isolationsmethoden und der zu ihrer Charakterisierung verwendeten Methoden.



2.1.1 Isolierung photosynthetisch aktiver Thylakoide aus verschiedenen Pflanzenspezies

Auf der Basis etablierter Protokolle aus Vorarbeiten (Cohen und Baxter, 1990) am IMBIO wurden aus *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Lactuca sativa* und *Spinacia oleracea* Thylakoidmembranen isoliert und lyophilisiert. Die funktionelle Charakterisierung erfolgte über Messungen des Elektronentransportes mittels Puls-Amplituden-Modulations (PAM)-Fluorometrie.

Ergänzend wurden Thylakoidmembranen der ausgewählten Pflanzenspezies nach einer alternativen Methode des MPI Köln (Bassi *et al.*, 1985) isoliert. Der wesentliche Unterschied

dieser Methode besteht in der Wahl des Resuspensionsmediums (EDTA- und HEPES-haltig) und der Vorbereitung zur Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (glycerinhaltiger Puffer).

Es konnte gezeigt werden, daß durch die Wahl der Isolationspuffer mit der Thylakoidisolationmethode nach dem MPI eine bessere Aufreinigung der Membranen von der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase erreicht werden konnte (s. Abb. 2.1-1). Nachteilig für diese Isolationsmethode ist jedoch, daß durch die Aufnahme der Thylakoidmembranen in einer 50 prozentigen Glycerollösung eine Gefrietrocknung und damit eine längere Konservierung der Membranen nicht möglich ist.

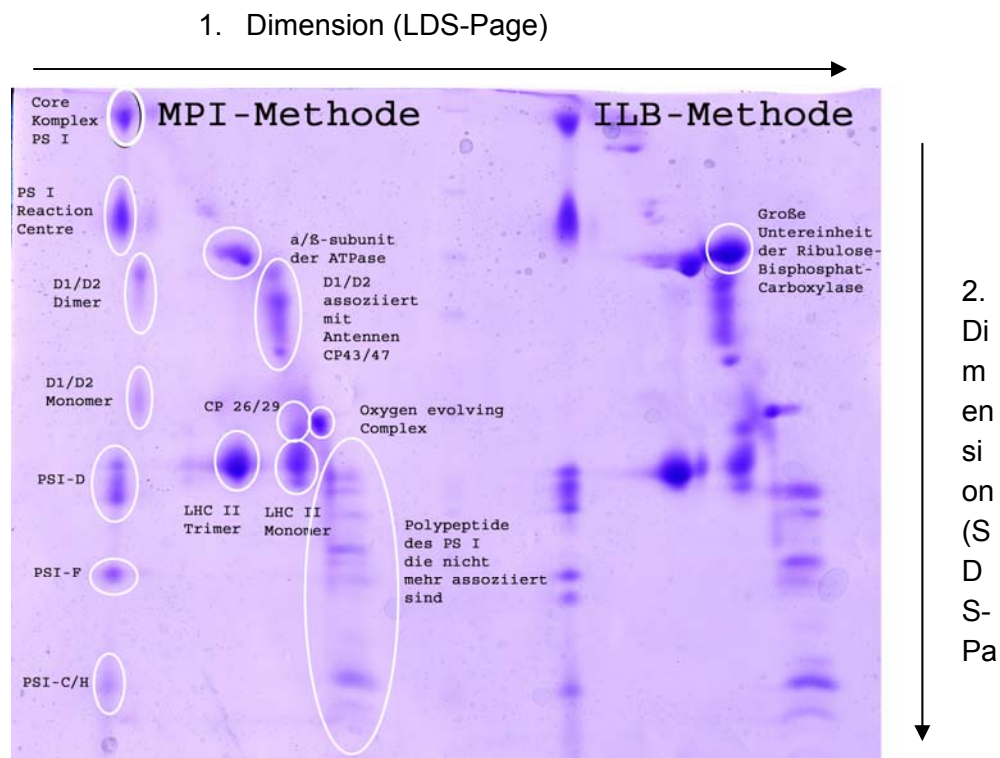


Abb. 2.1.1: 2-dimensionale Protein-Gelelektrophorese von Thylakoidmembranen. Die Auftrennung in der 1. Dimension erfolgte über ein nicht denaturierendes LDS-PA Gradientengel und die Auftrennung in der 2. Dimension über ein denaturierendes SDS-PA Gradientengel. Einkreist sind die einzelnen Untereinheiten des Photosyntheseapparates dargestellt. Links von nach MPI-Methode isolierten, rechts von nach ILB-Methode isolierten Thylakoidmembranen.

Die Charakterisierung der Qualität der beiden durchgeführten Isolationsmethoden wurde mittels 2 D-Gelelektrophorese durchgeführt (s. Abb. 2.1-1). Die erste Dimension wurde nach (Peter und Thornber, 1991) durchgeführt. Dabei wurden die isolierten Thylakoidmembranen, die auf einen Chlorophyllgehalt von $2000\text{ }\mu\text{g/ml}$ eingestellt wurden, über ein natives 4-12% Gradientengel bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 50 V aufgetrennt.

Für die 2. Dimension wurden nach (Schägger und Jagow, 1987) die Gelbahnen mit den aufgetrennten Thylakoidproben ausgeschnitten, denaturiert und auf ein 10-16% SDS-Page aufgelegt und bei Raumtemperatur und 100 V weiter aufgetrennt.

Anhand der durchgeführten 2 D-Gelelektrophoresen (Peter und Thornber, 1991; Schägger und Jagow, 1987) der nach den verschiedenen Methoden isolierten Thylakoide konnte die höhere Aufreinigung der Thylakoidmembranen nach der Isolationsmethode nach Bassi *et al.* (1985) belegt werden. Bei den nach der Methode von Cohen & Baxter (1990) isolierten

Thylakoiden lag das gesuchte D1-Protein hauptsächlich assoziiert mit dem D2-Protein sowie den Antennenkomplexen CP43/47 vor. Im Gegensatz dazu lag bei den nach der Methode von Bassi *et al.* (1985) isolierten Thylakoiden ein Teil des D1-Proteins als D1/D2-Monomere bzw. Dimere vor. Zusätzlich findet sich bei den nach der Methode von Cohen & Baxter (1990) isolierten Thylakoiden ein hoher Anteil an dem Enzym Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase, das die weitere Aufreinigung des D1-Proteins behindert.

Zu diesem Zeitpunkt der Untersuchungen, ließ sich jedoch noch keine Aussage darüber machen, welche der oben genannten Pflanzenspezies für die Isolierung des D1-Proteins als biosensorische Zielstruktur am geeignetsten war.

2.1.2 Vergleich verschiedener Pflanzenspezies für die Isolierung und Charakterisierung von Thylakoiden über 2D-Gelelektrophorese

Als Standard PS-II-Hemmstoff für die Aktivitäts- und Sensibilitätsüberprüfung der Thylakoidisolate wurde Diuron (DCMU) verwendet. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Pflanzenspezies bzw. Isolationsmethoden gefunden werden.

Die Charakterisierung der beiden durchgeführten Isolationsmethoden bei den verschiedenen Pflanzenspezies wurde mittels 2 D-Gelelektrophorese durchgeführt (s. Abb. 2.1-2 bis 2.1-4). Die 2D-Gelelektrophorese wurde wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben durchgeführt.

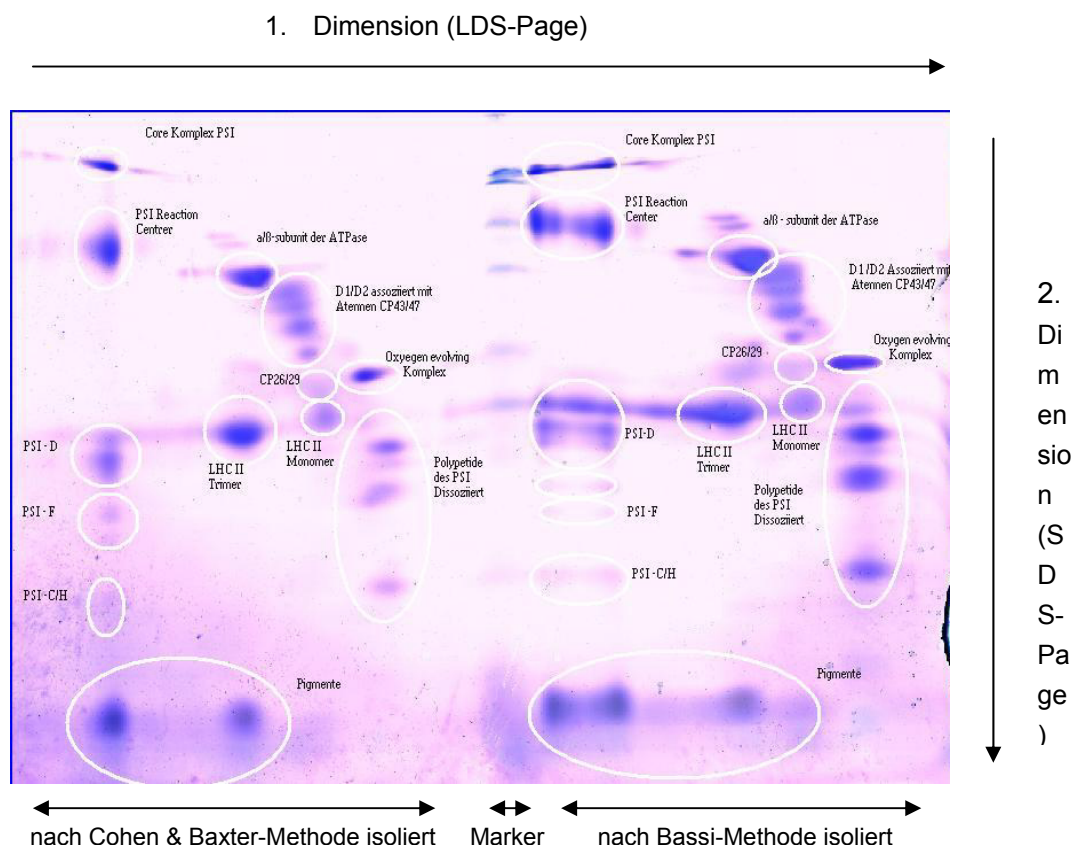


Abb. 2.1.2: 2-dimensionale Protein-Gelelektrophorese von Thylakoidmembranen aus *Pisum sativum*. Die Auftrennung in der 1. Dimension erfolgte über ein nicht denaturierendes LDS-PA Gradientengel und die Auftrennung in der 2. Dimension über ein denaturierendes SDS-PA Gradientengel. Einkreist sind die einzelnen Untereinheiten des Photosyntheseapparates dargestellt. Links von nach Cohen & Baxter-Methode isolierten, rechts von nach Bassi-Methode isolierten Thylakoidmembranen.

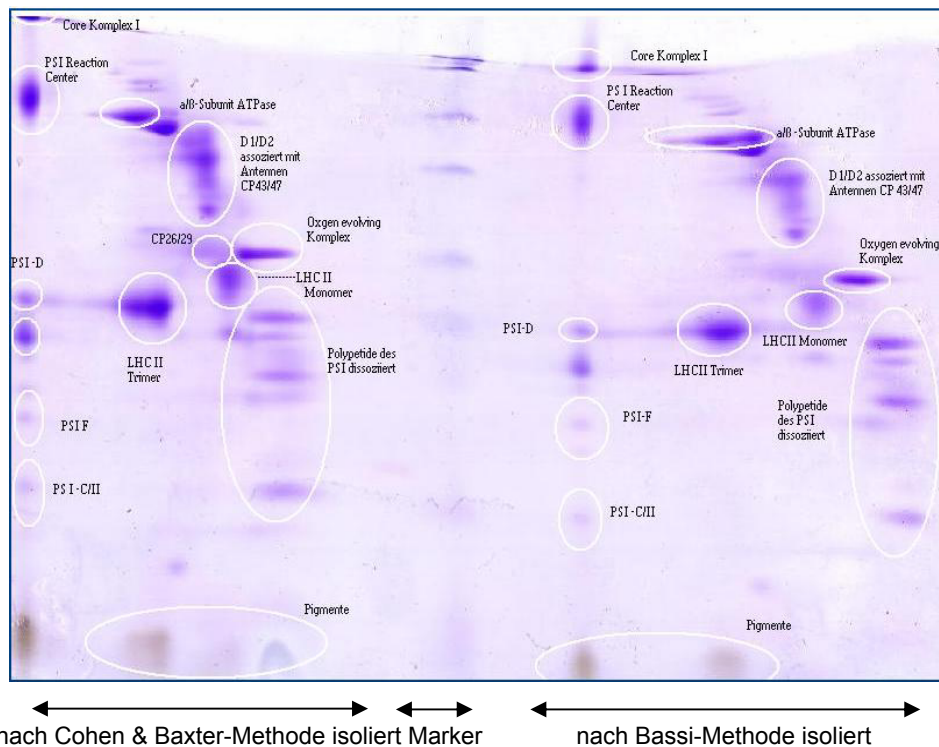


Abb. 2.1.3: 2-dimensionale Protein-Gelelektrophorese von Thylakoidmembranen aus *Lactuca sativa*. Die Auftrennung in der 1. Dimension erfolgte über ein nicht denaturierendes LDS-PA Gradientengel und die Auftrennung in der 2. Dimension über ein denaturierendes SDS-PA Gradientengel. Eingezeichnet sind die einzelnen Untereinheiten des Photosyntheseapparates dargestellt. Links von nach ILB-Methode isolierten, rechts von nach MPI-Methode isolierten Thylakoidmembranen.

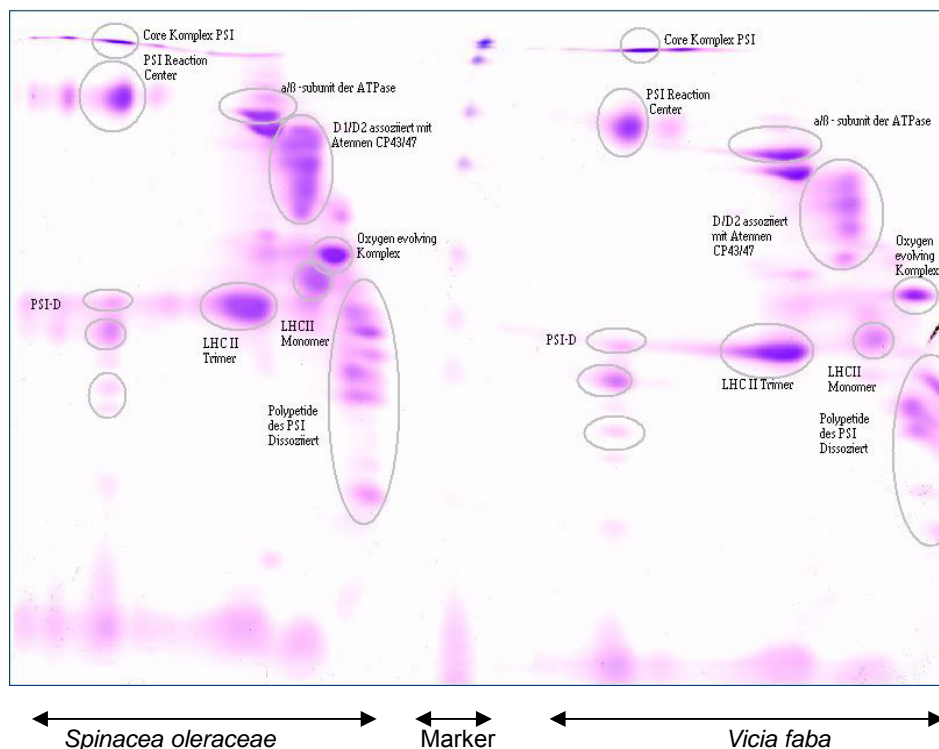


Abb. 2.1.4: 2-dimensionale Protein-Gelelektrophorese von Thylakoidmembranen links aus *Spinacea oleraceae* und rechts aus *Vicia faba* von nach Cohen & Baxter-Methode isolierten Thylakoidmembranen. Die Auftrennung in der 1. Dimension erfolgte über ein nicht denaturierendes LDS-PA Gradientengel und die Auftrennung in der 2. Dimension über ein denaturierendes SDS-PA Gradientengel. Eingezeichnet sind die einzelnen Untereinheiten des Photosyntheseapparates dargestellt.

Anhand der durchgeführten 2 D-Gelelektrophoresen (Peter und Thornber, 1991; Schägger und Jagow, 1987) der nach den verschiedenen Methoden isolierten Thylakoidmembranen konnten keine charakteristischen Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der Extrakte der verschiedenen Pflanzenspezies sowie durch die verschiedenen Isolationsmethoden gezeigt werden (s. Abb. 2.1-2 bis 2.1-4). Erste Hinweise deuten darauf, dass der Anteil an PS II im Vergleich zu PS I bei der Methode nach Cohen & Baxter (1990) höher ist als bei der Methode nach Bassi *et al.* (1985) (Abb. 2.1-2 und 2.1-3). Bei allen Thylakoiden der verschiedenen Pflanzenspezies sowie verschiedenen Isolationsmethoden liegt das gesuchte D1-Protein hauptsächlich assoziiert mit dem D2-Protein sowie den Antennenkomplexen CP43/47 vor.

Im Gegensatz zu den zuvor durchgeführten methodischen Versuchen (s. Absch. 2.1.1) konnte kein D1-Protein, das als unassoziertes Monomer bzw. D1/D2-Dimer vorlag, gefunden werden. Ebenso konnte die erwähnte höhere Aufreinigung der Thylakoidmembranen von Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (RUBISCO) durch die Isolationsmethode nach Bassi *et al.* (1985), die die weitere Aufreinigung des D1-Proteins behindert, mit der nun vorliegenden Vielzahl an Messungen für verschiedene Pflanzenspezies nicht belegt werden. Nach beiden Isolationsprotokollen wurden bei allen untersuchten Spezies Membranen isoliert, die frei von Verunreinigungen an RUBISCO waren.

Somit konnte aufgrund dieser Experimente keine Präferenz für die weitere Verwendung einer bestimmten Pflanzenspezies getroffen werden.

2.1.3 Thylakoidisolation aus den Blattmaterialien sowie die Extraktion der Photosystem-II-Proteinkomplexe aus den gewonnenen Thylakoiden

Mit den isolierten Thylakoidextrakten wurde im weiteren eine Extraktion des Photosystem II-Komplexes (PS II) nach der Butanolextraktionsmethode von Piletskaya *et al.* (1997 und 1999a) durchgeführt. Nach dieser Methode wurde der frisch isolierte Thylakoidextrakt einer nachfolgenden n-Butanolextraktion unterzogen. Dadurch wurde eine Isolierung der PSII-Proteinkomplexproteine aus den Thylakoidmembranen und eine Aufreinigung von Pigmenten und Lipiden erzielt.

Zur Charakterisierung der Thylakoidextrakte, der PS-II-Proteinkomplex-Extrakte und des D1-Proteins kam die denaturierende 1D-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D-SDS-PAGE) bei den durchgeführten Isolierungen zum Einsatz. Dabei wurden die isolierten Strukturen über einen denaturierenden 10-16% Polyacrylamid-Gradientengel bei Raumtemperatur zunächst für 2 h bei 50 V und dann über Nacht bei 100 V aufgetrennt (Schägger und Jagow, 1987).

Zum spezifischen Nachweis des D1-Proteins in den Thylakoidextrakten und PS-II-Proteinkomplexen wurde die Methode des Western Blottings mit einem spezifischen anti-D1-Antikörper erarbeitet. Der Western Blot Transfer der Proteine fand nach Towbin *et al.* (1997) statt. Der Transfer der Proteine wurde bei 4°C und 300 mA über Nacht auf eine PVDF-Blotting-Membran durchgeführt. Die Detektion der D1-Proteine erfolgte mit einem primären polyklonalen IgY-anti-D1-Antikörper aus Hühnereiern (Agrisera, Uppsala, S), die Sichtbarmachung über einen mit HRP-gekoppelten anti-IgY-Antikörper aus Kaninchen, über eine Chemilumineszenzreaktion.

Zu Beginn des Projektes wurden die zwei Isolationsmethoden nach Cohen & Baxter (1990) und Bassi *et al.* (1985) parallel untersucht, mit denen die Thylakoidmembranen aus den Blattmaterialien gut gewonnen werden konnten, die jedoch im Laufe weiterer Untersuchungen kaum Zielproteine in nachweisbarer Menge lieferten. Das D1-Protein konnte zwar in den nach o. g. Methoden isolierten Thylakoidmembranen sowohl über SDS-Page als auch über Western Blot nachgewiesen werden. Ein Nachweis in den Extrakten der Photosystem-II-Proteinkomplexe, die aus nach diesen beiden Methoden hergestellten Thylakoiden isoliert worden waren, war demgegenüber nur über SDS-Page möglich. Ein immunologischer Nachweis von D1-Protein in den PS-II-Proteinkomplex-Extrakten nach Cohen & Baxter (1990) über Western-Blotting als auch über Massenspektrometrie konnte nicht erbracht werden.

Die Isolate der vier Pflanzenspezies *Pisum sativum* (Lane 1), *Lactuca sativa* (Lane 2), *Vicia faba* (Lane 3) und *Spinacea oleracea* (Lane 4) wurden nach Cohen & Baxter (1990) getestet, um die am besten geeignete für die weitere Aufreinigung von D1-Protein zu finden.

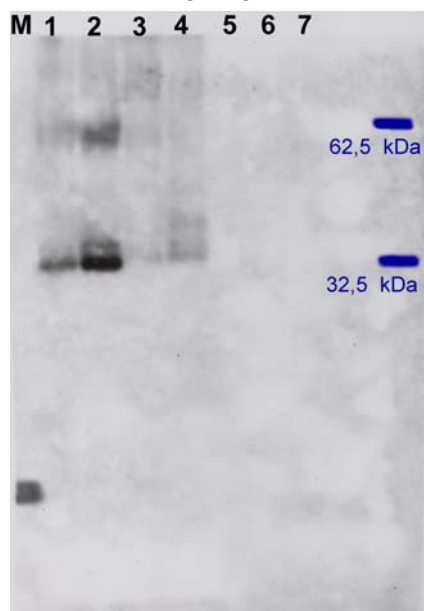


Abb. 2.1.5: Western Blot von Thylakoidextrakten und PS II-Extrakten verschiedener Pflanzenspezies. 1-4 Thylakoide, 5-7 PS II-Extrakte, 1 = *Pisum sativum*, 2 = *Lactuca sativa*, 3 = *Vicia faba*, 4 = *Spinacea oleraceae*, 5 = *Lactuca sativa*, 6 = *Vicia faba*, 7 = *Pisum sativum*, 32,5 kDa D1-Monomere, 62,5 kDa D1/D2-Dimere

Der Western Blot (s. Abb. 2.1-5) zeigte den besten Nachweis von D1-Proteinen durch den verwendeten polyklonalen D1-Antikörper bei Thylakoidextrakten von *Lactuca sativa* und *Pisum sativum*. Bei Thylakoiden von *Vicia faba* konnte bisher kein erfolgreicher Nachweis von D1-Protein erbracht werden.

In den PS-II-Proteinkomplex-Extrakten die aus noch Cohen & Baxter isolierten Thylakoiden hergestellt worden waren war keine Detektion von D1-Proteinen möglich. Da bei dieser Methode PS-II-Proteinkomplex-Extrakte verwendet wurden, die in BSA-haltigem Puffer zum Abblocken von Proteasen vorlagen, ist der Extrakt wahrscheinlich zu verdünnt aufgetragen worden. Da die BSA-Proteinmenge in mehrfachen Überschuss zu den gesuchten Proteinen vorliegt, war keine korrekte Bestimmung der Proteinkonzentration der gesuchten Proteine im Bradford-Assay möglich.

Erst durch die Einführung einer dritten Thylakoidisolationsmethode nach Piletskaya (1997, 1999a) konnten zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden (s. Abb. 2.1-6 und 2.1-7). Nach dieser Methode konnten nicht nur die Thylakoidmembranen und die PS-II-Proteinkomplexe in genügend großer Menge gewonnen werden, sondern auch das D1-Protein in den Photosystem-II-Proteinkomplex-Extrakten aus verschiedenen Pflanzenspezies nachgewiesen werden (s. Abb. 2.1-6 und 2.1-7). Hierbei wurden die drei verschiedenen Pflanzenspezies - Bohne (*Vicia faba*), Erbse (*Pisum sativum* var. *Feltham first* und var. *Maiperle*) und Kopfsalat (*Lactuca sativa*) - unter zwei verschiedenen Lichtbedingungen (unter normalem Tageslicht und unter künstlicher Zusatzbelichtung) im Gewächshaus angezchtet und untersucht.

Nach Isolation der Thylakoidmembranen erfolgte die funktionelle Überprüfung wie bei den nach Cohen & Baxter (1990) und Bassi *et al.* (1985) isolierten Thylakoiden mittels Puls-Amplituden-Modulations(PAM)-Fluorometrie (Schreiber *et al.*, 2002).

Neben dem erfolgreichen Nachweis des D1-Proteins über SDS-Page und Western Blot (s. Abb. 2.1-6 und 2.1-7: die 32,5 kDa Proteinbanden) wurden nur bei Bohne zusätzlich auch D1-/D2-Dimere bei ca. 62 kDa gefunden, die nicht durch SDS denaturiert worden waren. Ein Mengenunterschied dieser Dimere zeigte sich abhängig von verschiedenen Lichtbedingungen während des Pflanzenwachstums (Schulten *et al.*, 2005).

Bei den beiden parallel zueinander isolierten PS-II-Extrakten PS II 37 BL und 37 B (s. Abb. 2.1-6 und 2.1-7) zeigte sich die D1-/D2-Dimer Bande bei dem PS-II-Extrakt 37 B, der aus unter Ausschluss von künstlicher Zusatzbelichtung angezogenen Pflanzen hergestellt wurde, deutlich stärker, als bei dem Extrakt belichteter Pflanzen (PS II Extrakt 37 BL). Insgesamt wiesen alle PS-II-Extrakte von unbelichtet angezogenen *Vicia faba*-Pflanzen (PS II 37B, 39B, 48 B, 41 B, 41 B, 51 B, 52 B) deutliche Proteinbanden auf der Höhe der D1-/D2-Dimere bei ca. 63 kDa auf.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in den weiteren Versuchen ausschließlich die Thylakoidisolationmethode nach Piletskaya *et al.* (1997) zur Isolierung des D1-Proteins verwendet.

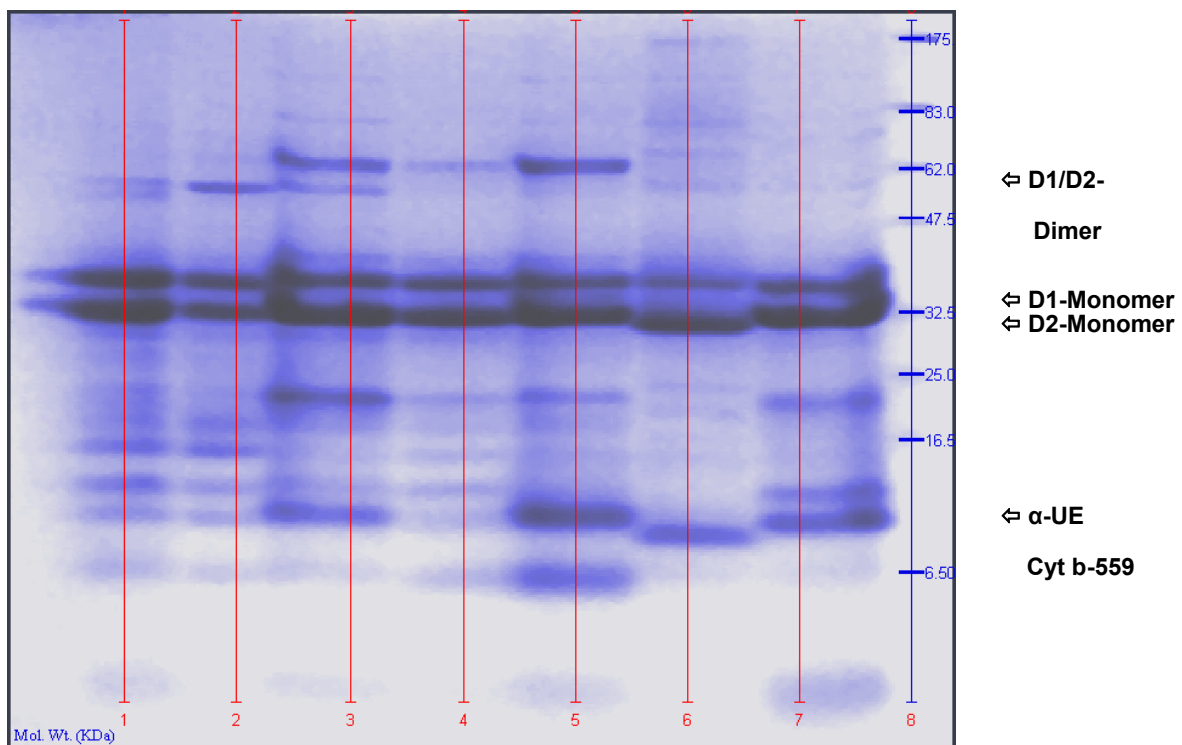


Abb. 2.1.6: SDS-Page der PS-II-Proteinkomplex-Extrakte von:

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8
	33 E1L= <i>Pisum sativum</i> var. <i>Feltham first</i>	33 E2L= <i>Pisum sativum</i> var. <i>Maiperle</i>	37 B = <i>Vicia faba</i> ohne künstliche Zusatzbelichtung	37 BL = <i>Vicia faba</i> mit künstlicher Zusatzbelichtung	41 B = <i>Vicia faba</i> ohne künstliche Zusatzbelichtung	42 K = <i>Lactuca sativa</i>	43 E1 = <i>Pisum sativum</i> var. <i>Feltham first</i>	Marker (kDa)

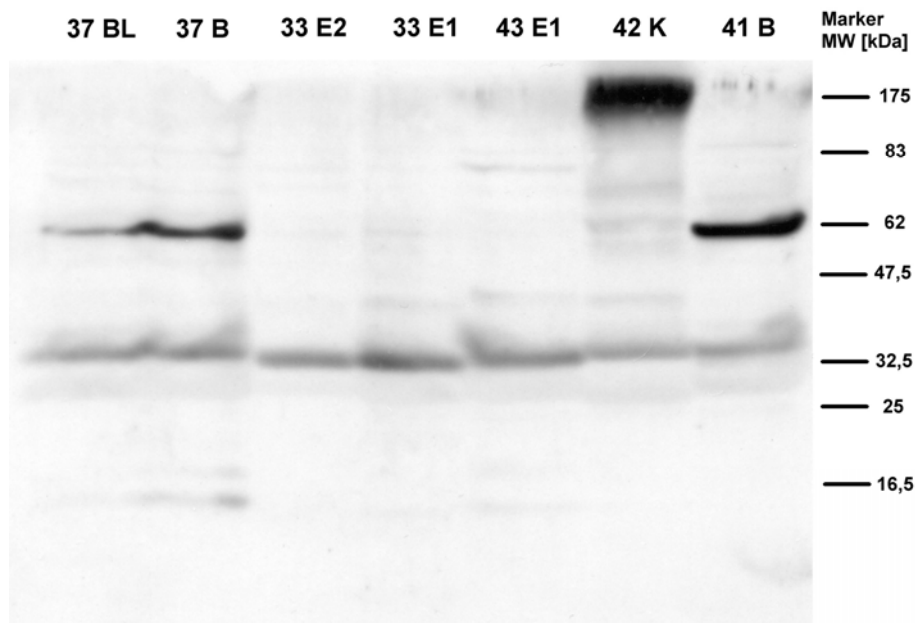


Abb. 2.1.7: Western Blot der PS-II-Extrakte: 37 BL = *Vicia faba* mit künstlicher Zusatzbelichtung, 37 B = *Vicia faba* ohne künstliche Zusatzbelichtung, 33 E2 = *Pisum sativum* var. *Maiperle*, 33 E1 = *Pisum sativum* var. *Feltham first*, 43 E1 = *Pisum sativum* var. *Feltham first*, 42 K = *Lactuca sativa*, 41 B = *Vicia faba* ohne künstliche Zusatzbelichtung, Marker MW = Molekulargewicht (kDa).

2.1.4 Aufreinigung des D1-Proteins aus den PS-II-Proteinkomplex-Extrakten mit der Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Zur weiteren Aufreinigung der Zielstruktur aus den nach der beschriebenen Butanol-extraktion gewonnenen PS-II-Proteinkomplex-Extrakten wurden verschiedene chromatographische Auftrennungsmethoden erarbeitet. Die Charakterisierung der dabei aufreinigten Proteine erfolgte auch in diesem Schritt durch die o. g. 1D-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese sowie anschließendem Western-Blotting mit dem polyklonalen anti-D1-Antikörper. Folgende chromatographische Techniken wurden getestet und optimiert:

- (1) Reversed-Phase-(RP)Chromatographie mit C4- bzw C18-Säule nach Sharma *et al.* (1997a)
- (2) Reversed-Phase-(RP)Chromatographie mit C4- bzw C18-Säule nach Piletskaya *et al.* (1997)
- (3) Gelfiltrationschromatographie kombiniert mit einem Salzgradienten

2.1.4.1 Aufreinigung des D1-Proteins über Reversed-Phase-(RP)-Chromatographie

Die Auftrennung der PS-II-Proteinkomplex Proteine erfolgte mit C4- und C18-RP-Säulen (C4: 214TP15204 und C18: 218TP104, Grace Vydac, Hesperia, USA; C4: RP-304 und C18: RP318, BioRad, München, D), die stationäre Phasen aus Kieselgel mit Alkylresten in der Länge von C4 (Butyl) bzw. C18 (Octadecyl) besaßen. Da mit einer Fast protein liquid chromatography-Anlage gearbeitet wurde, die zur präparativen Aufreinigung ausgelegt war, und die daher nur bis zu einem Druck von 3.000 psi arbeiten konnte, wurden Säulen mit einer Partikelgröße von 10 bzw. 15-20 µm verwendet, was allerdings zu einer Verminderung der Auflösung führte. Es wurden Säulen mit einer Porengröße von 300 Å ausgewählt, da diese zum Auftrennen von großen Molekülen, wie Proteinen besser geeignet sind. Es

wurden Säulen mit einer Dimension von 250 x 4,6 mm verwendet. Als Vorsäulen dienten C4- und C18-Materialien mit einer Partikelgröße von 10-30 µm (Grace Vydac, Hesperia, USA).

Die Fast protein liquid chromatography (FPLC) wurde mit einer bioinerten FPLC-Anlage (BioLogic Duo Flow, Bio-Rad, München, D) im Kühlschrank bei 4 °C durchgeführt. Die Chromatogramme wurden mit einem Quad-Tec-Detektor (BioLogic Quad Tec, Bio-Rad, München, D) bei vier verschiedenen Wellenlängen, zwischen 214 und 360 nm aufgenommen. Eine Detektion im Maximum der UV-Absorption der Peptidbindung bei 195 nm konnte aufgrund der Spezifikationen des Detektors und aufgrund der Verwendung von Propanol, das eine Detektion unterhalb von 230 nm wegen der Eigenabsorption des Lösungsmittels nicht ermöglicht, nicht durchgeführt werden (Lottspeich und Zorbas, 1998). Stattdessen konnte nur eine wesentlich unempfindlichere Detektion der Tyrosin/Tryptophan-Seitengruppen bei ca. 280 nm erfolgen. Fraktionen wurden in Intervallen von 1 min mit einem Fraktionssammler (BioLogic, Bio-Frac, Bio-Rad, München, D) ebenfalls bei 4 °C im Kühlschrank gesammelt.

2.1.4.1.1 Aufreinigung des D1-Proteins über Reversed-Phase-(RP)Chromatographie nach Sharma et al. (1997a)

Zur weiteren Aufreinigung der Zielstruktur aus den über Butanolextraktion PS-II-Proteinkomplex-Extrakten wurde eine FPLC-Methode modifiziert nach Sharma *et al.* (1997a) erarbeitet und weiter entwickelt.

Als mobile Phase wurde ein Gradient von 100 % 5%iger Essigsäure zu 100 % 1-Propanol, bei einer Flussrate von 0,3-0,5 ml/min verwendet. Es wurden dazu verschiedene Gradienten der mobilen Phase getestet (s. Tab. 2.1-1), um die Auftrennung der PS-II-Proteinkomplex-Proteine zu optimieren. Dabei konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen den verschiedenen getesteten Gradienten festgestellt werden.

Tabelle 2.1-1 Übersicht über die durchgeführten Gradientenauftrennungen nach der Sharma Methode. Angegeben sind jeweils der Prozentsatz an 1-Propanol und in Klammern die Laufzeit in min.

Auftrennungsgradient	Linear (% 1-Propanol)	Isokratisch (% 1-Propanol)	Linear (% 1-Propanol)	Isokratisch (% 1-Propanol)
1	0-100 % (60 min)	100 % (5 min)		
2	0-43 % (15 min)	auf 43 % (20 min)	43-80 % (15 min)	80 % (5 min)
3	0-46 % (15 min)	auf 46 % (20 min)	46-80 % (15 min)	80 % (5 min)
4	0-30 % (15 min)	auf 30 % (10 min)	30-80 % (15 min)	80 % (5 min)

Durch diese Methode ließ sich eine Auftrennung des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes in seine einzelnen Komponenten erreichen.

Die FPLC-Fraktionen wurden in Intervallen von 1 min über den gesamten Lauf gesammelt und über SDS-Page und Western Blot, sowie über den Simazinderivat-Chip und den anti-D1-Antikörper-Chip mit dem Biacore 3000 auf den Nachweis von D1-Protein untersucht. In den SPR-Experimenten mit dem Simazinhexansäure-Chip konnte die Funktionskontrolle der einzelnen Fraktionen über biomolekulare Interaktionsanalysen durchgeführt werden (s. Absch. 2.1.17).

Das D1-Protein konnte bei den drei untersuchten Pflanzenspezies *Vicia faba*, *Pisum sativum* und *Lactuca sativa* im gleichen Bereich, bei einem Prozentsatz von 41-75 % 1-Propanol, eluiert werden (s. Abb. 2.1-8 bis 2.1-13), und stand damit in Übereinstimmung mit Werten aus der Literatur (Sharma *et al.*, 1997a). Eine Trennung des D1-Proteins von dem D2-Protein war bei allen drei Pflanzenspezies, wie bei Sharma *et al.* (1997a) beschrieben, nicht möglich.

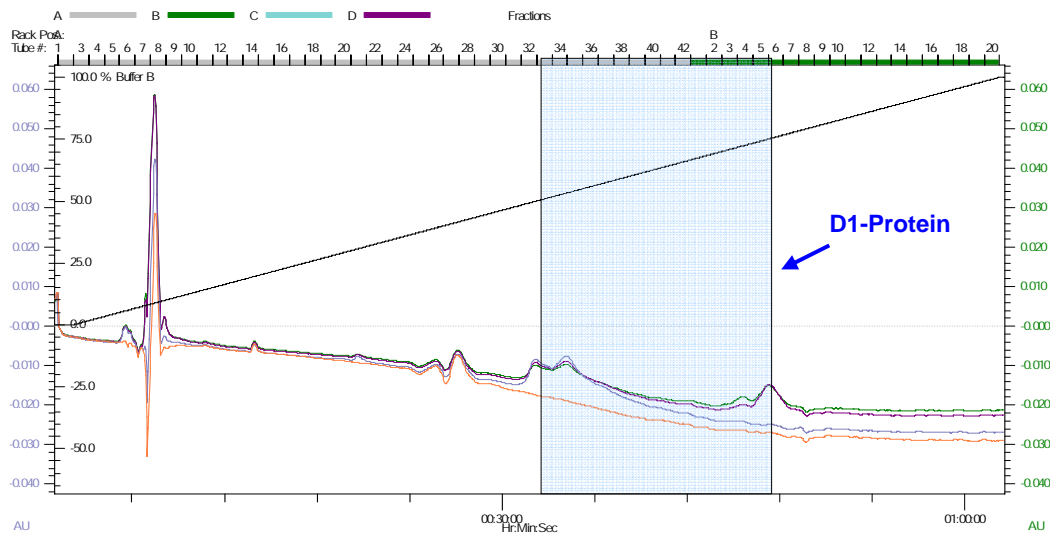


Abb. 2.1.8: FPLC-Chromatogramm eines Chromatographie-Laufes eines PS-II-Extraktes von *Vicia faba* (PS II 53 BL), mit einer RP-C18-Säule (Vydac, US) und einem linearen Gradienten von 5 % Essigsäure zu 1-Propanol, nach Sharma (1997a), y-Achse rechts: Absorption (AU) bei 254 nm, y-Achse links: Absorption (AU) bei 280 nm, x-Achse unten: Zeit in h:min:s, x-Achse oben: gesammelte Fraktionsnummer, schwarze Linie: Gradient in % 1-Propanol.

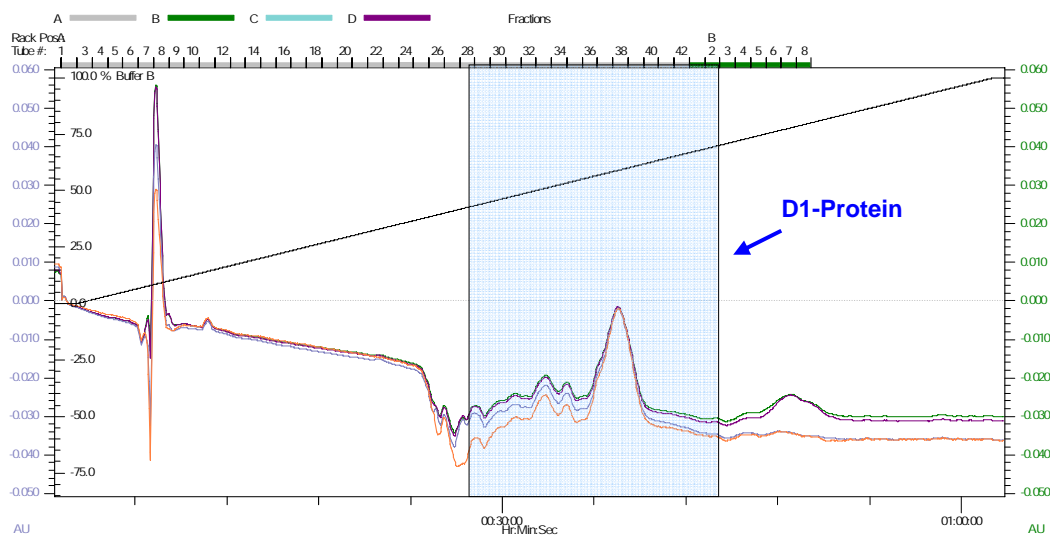


Abb. 2.1.9: FPLC-Chromatogramm eines Chromatographie-Laufes eines PS-II-Extraktes von *Pisum sativum* (PS II 55 E1) mit einer RP-C18-Säule (Vydac, US) und einem linearen Gradienten von 5 % Essigsäure zu 1-Propanol, nach Sharma, y-Achse rechts: Absorption (AU) bei 254 nm, y-Achse links: Absorption (AU) bei 280 nm, x-Achse unten: Zeit in h:min:s, x-Achse oben: gesammelte Fraktionsnummer, schwarze Linie: Gradient in % 1-Propanol.

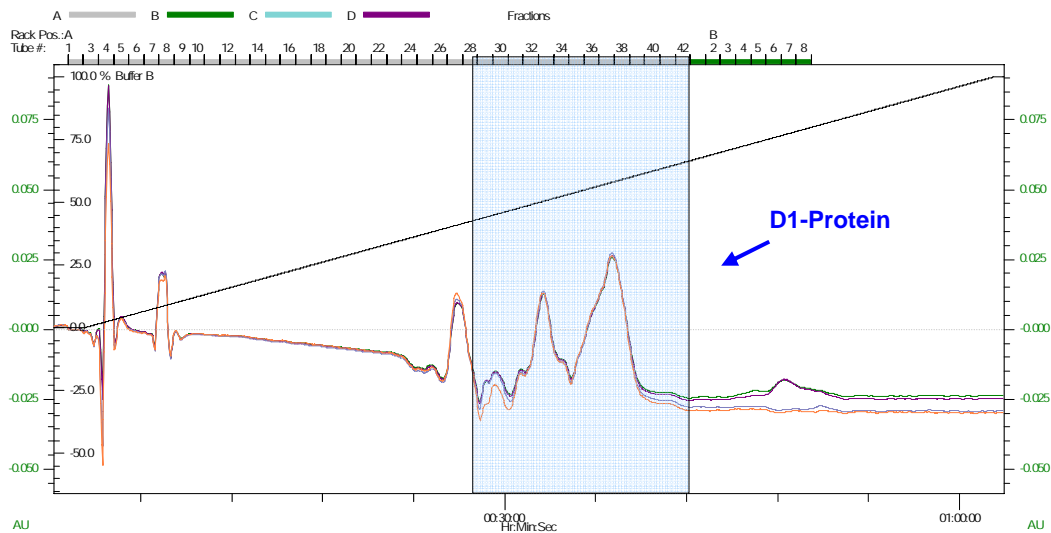


Abb. 2.1.10: FPLC-Chromatogramm eines Chromatographie Laufes eines PS-II-Extraktes von *Lactuca sativa* (PS II 54 KL) mit einer RP-C18-Säule (Vydac, US) und einem linearen Gradienten von 5 % Essigsäure zu 1-Propanol, nach Sharma, y-Achse rechts: Absorption (AU) bei 254 nm, y-Achse links: Absorption (AU) bei 280 nm, x-Achse unten: Zeit in h:min:s, x-Achse oben: gesammelte Fraktionsnummern, schwarze Linie: Gradient in % 1-Propanol.

Als auffallende Besonderheit zwischen den drei untersuchten Pflanzenspezies ist der Nachweis von D1/D2-Dimeren bei der Pflanzenpezies *Vicia faba* hervorzuheben. Bei keiner der durchgeführten FPLC-Aufreinigungen der PS-II-Proteinkomplex-Extrakte von *Pisum sativum* und *Lactuca sativa* konnten Dimere gefunden werden.

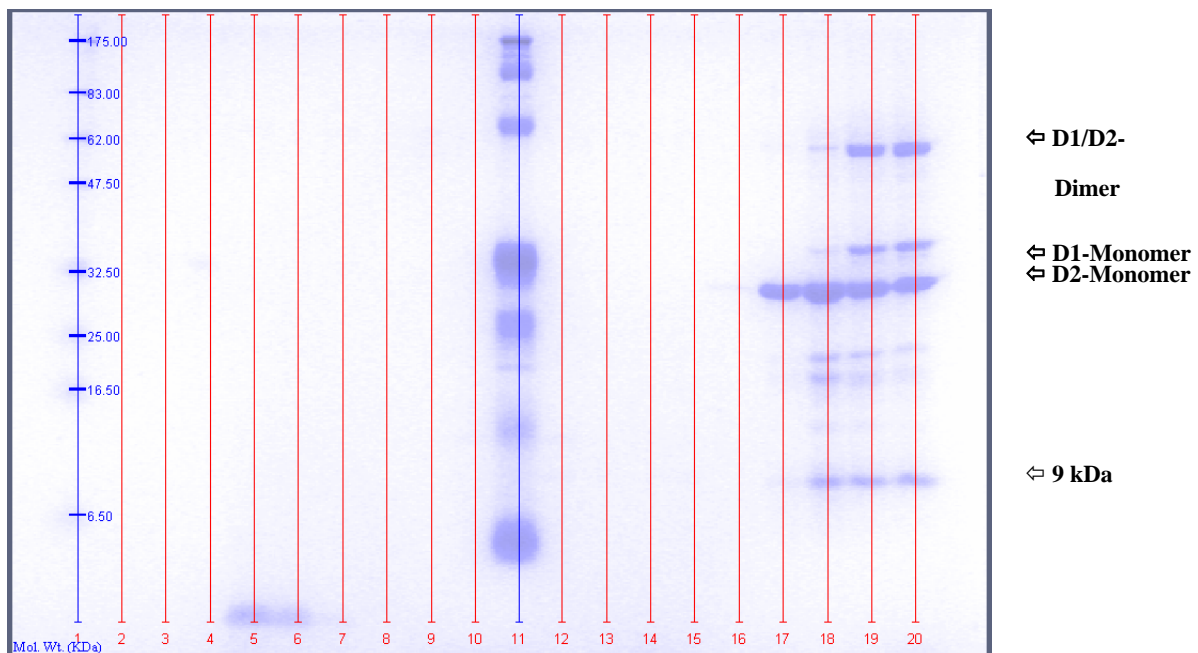


Abb. 2.1.11: SDS-Page von FPLC-Fractionen eines nach Sharma aufgetrennten PS-II-Extraktes von *Vicia faba* (PS II 53 BL). Färbung Coomassie, Beschriftung: Molekulargewicht der detektierten Banden in kDa, rote Striche: Markierung der Lanes.

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Marker	psbA 1 µl =0,25pmol	psbA 5 µl =1,25pmol	psbA 10µl =2,5pmol	F 22	F 23	F 24	F 25	F 26	F 27
Lane	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	Marker	F 28	F 29	F 30	F 31	F 32	F 33	F 34	F 35	F 36

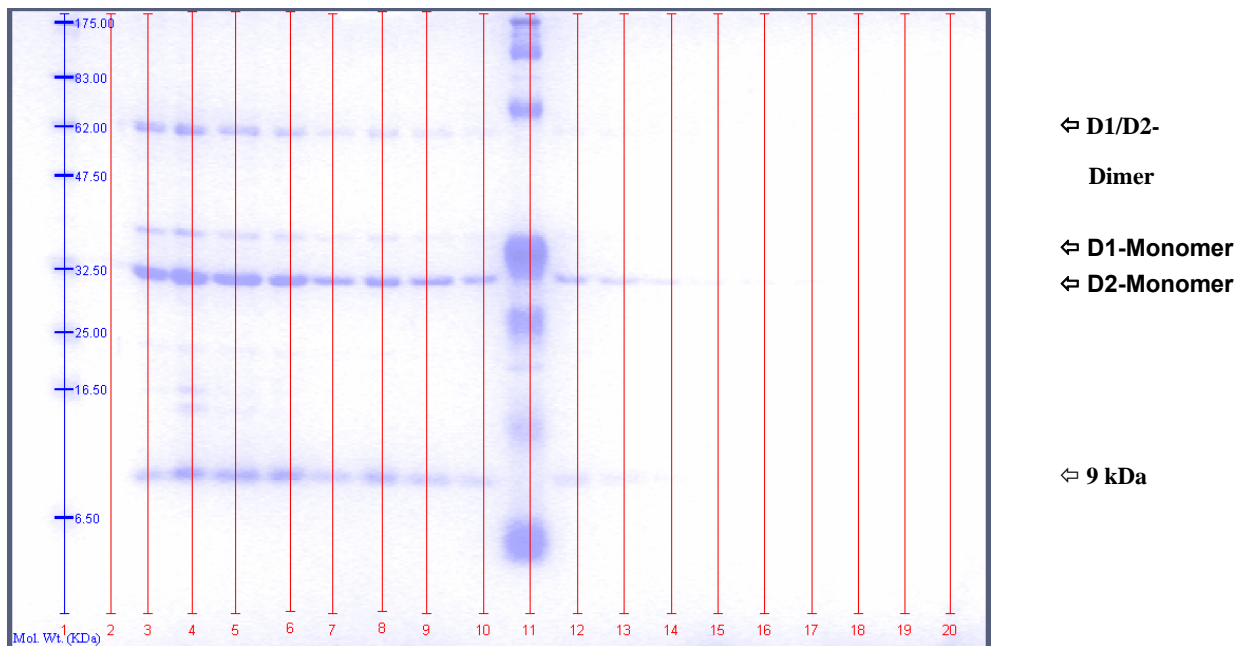


Abb. 2.1.12: SDS-Page von FPLC-Fractionen eines nach Sharma aufgetrennten PS II Extraktes von *Vicia faba* (PS II 53 BL). Färbung Coomassie, Beschriftung: Molekulargewicht der detektierten Banden in kDa, rote Striche: Markierung der Lanes.

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Marker	psbA 5 μ l =1,25pmol	F 37	F 38	F 39	F 40	F 41	F 42	F 43	F 45
Lane	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	Marker	F 46	F 47	F 48	F 50	F 51	F 52	F 53	F 54	F 55

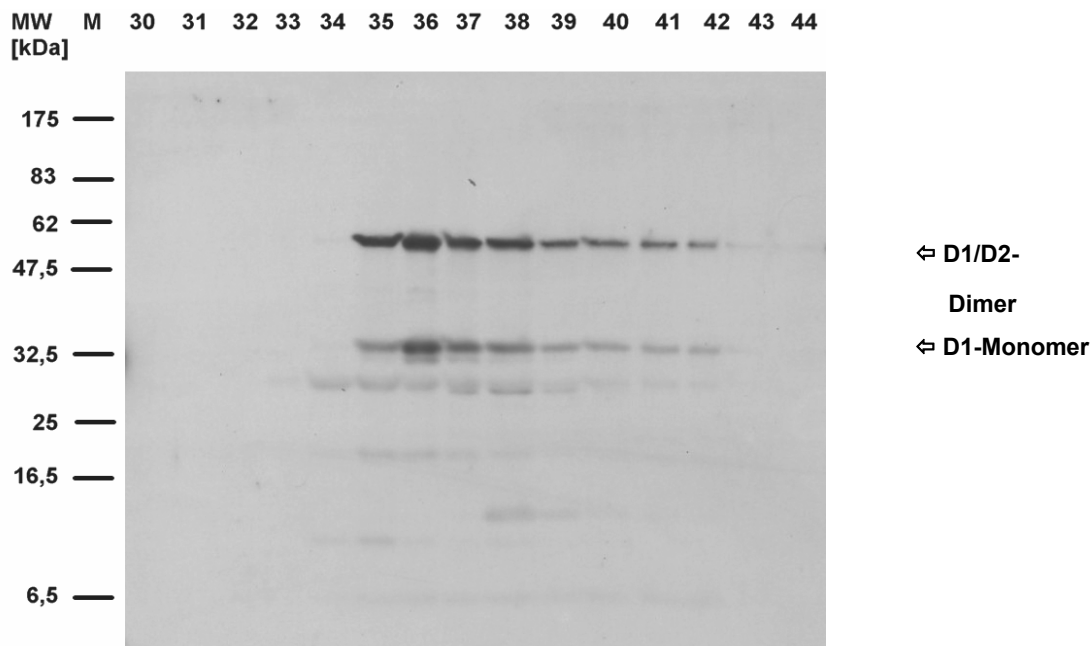


Abb. 2.1.13: Western Blot von FPLC-Fractionen eines nach Sharma aufgetrennten PS-II-Extraktes von *Vicia faba* (PS II 53 BL). 30-44 = FPLC-Fractionen 30-44, MW = Molekulargewicht [kDa], M = Marker.

Bei allen FPLC-Auftrennungen von *Vicia faba* eluierte reproduzierbar das D1-Monomer in einem 1-Propanol Konzentrationsbereich von ca. 52-68 %. Die D1/D2-Dimere koeluierten mit dem D1-Monomer in einem breiteren Konzentrationsbereich von ca. 50-75 % 1-Propanol.

Damit konnten die D1-Monomere und die D1/D2-Dimere nicht voneinander getrennt werden. Das D2-Protein koeluierte mit dem D1-Protein in einem 1-Propanolprozentbereich von 48-75 %, und darüber hinaus bis zu einer Konzentration von 83 % 1-Propanol.

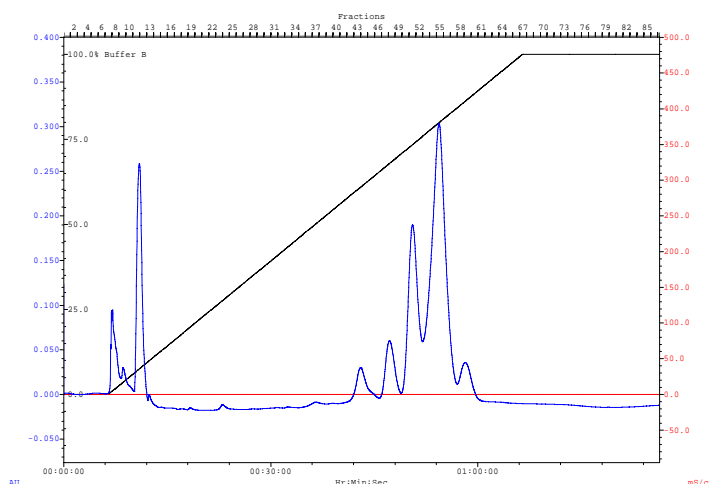
Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem bei Sharma *et al.* (1997a) beschriebenen. Dort eluierte das D1-Protein deutlich später und damit bei einem höheren 1-Propanol-Prozentsatz wie das D2-Protein.

Bei *Pisum sativum* konnte das D1-Protein in einem ähnlichen Bereich wie bei *Vicia faba* detektiert werden. Es eluierte etwas eher als bei *Vicia faba* und über einen breiteren 1-Propanol-Gradienten von 43-70 %. Auch hier kam es zu keiner ausreichenden Auftrennung des D1-Proteins von dem im PS-II-Proteinkomplex mit ihm eng assoziierten D2-Protein. Das D2-Protein koeluierte im Konzentrationsbereich von 42-70 % 1-Propanol mit dem D1-Protein.

Bei der FPLC-Aufreinigung der PS-II-Proteinkomplex-Extrakte von *Lactuca sativa* konnte das D1-Protein ebenfalls bei einem 1-Propanol Gradient von 43-67 % eluiert werden. Hier kam es zu einer ganz strikten Koelution des D2-Proteins in genau demselben Bereich.

Die höchste quantitative Ausbeute des D1-Proteins konnte im Vergleich der drei Pflanzenspezies bei *Vicia faba* erzielt werden. Hier konnte eine deutlich höhere Menge an D1-Monomeren als bei den beiden anderen Pflanzenspezies gefunden werden. Zusätzlich dazu zeigten die PS-II-Proteinkomplex-Extrakte von *Vicia faba* auch noch einen starken Nachweis an D1/D2-Dimeren, was den Gehalt an D1-Protein bei dieser Pflanzenspezies insgesamt noch erhöhte. *Lactuca sativa* besaß von allen drei Pflanzenspezies den geringsten Gehalt an D1-Protein. Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich auch hier *Vicia faba* als die am besten geeignete Pflanzenspezies für die Aufreinigung von D1-Protein heraus.

Im Unterschied zu den bei *Vicia faba* und *Pisum sativum* im Elutionsbereich von D1 im Chromatogramm beobachteten Doppelpeaks, war bei *Lactuca sativa* immer nur eine Multipeakauftrennung zu finden (s. Abb. 2.1-8 bis 2.1-10). Insgesamt zeigte sich bei allen drei Pflanzenspezies nur eine sehr geringe Absorption der Proteine von ca. 10-50 mAU sowohl bei 254 wie auch bei 280 nm bei den FPLC-Auftrennungen.



Die erarbeitete Methode war auch geeignet für die direkte Auftrennung von Thylakoidmembranen. Die in den Abbildungen 2.1-8 bis 2.1-10 und 2.1-14 dargestellten Chromatogramme belegen eine erfolgreiche Aufreinigung des PS-II-Proteinkomplexes aus den Thylakoidmembranen durch Butanolextraktion nach Piletskaya *et al.* (1997 und 1999a).

Abb. 2.1.14: FPLC-Chromatogramm eines Thylakoidextraktes von Erbse

2.1.4.1.2 Aufreinigung des D1-Proteins über Reversed-Phase-(RP)Chromatographie nach Piletskaya *et al.* (1997)

Es wurden verschiedene Methoden der FPLC-Aufreinigung durchgeführt, um die für das D1-Protein schonendste Isolationsmethode herauszufinden, bei der das Protein nicht nur aufgereinigt wird, sondern auch noch funktionell bindefähig vorliegt.

Parallel zu der FPLC-Auftrennung nach Sharma *et al.* (1997a) wurde als weitere Reversed-Phase-Chromatographie-Aufreinigungsmethode für das D1-Protein die Methode nach Piletskaya *et al.* (1997) getestet. Die bei Piletskaya *et al.* (1997) beschriebene chromatographische Aufreinigung führte zu einer sauberen Auftrennung des D1-Proteins von den anderen Proteinen des PS-II-Proteinkomplexes. Mit der durchgeführten FPLC-Auftrennung des D1-Proteins aus PS-II-Proteinkomplex-Extrakten modifiziert nach der Methode nach Piletskaya *et al.* (1997), mit einer stationären C18- wie auch C4-Phase und einem Gradienten der mobilen Phase von 50 mM Tris pH 8,0 zu 2-Propanol, wurde versucht, das D1-Protein auf einem schonenderen Weg als bei der Methode nach Sharma, aufzureinigen. Über die Durchführung der Auftrennung bei einem dem physiologischen pH-Wert des D1-Proteins sehr nahe kommenden pH-Wert von 8,0 sollte erreicht werden, dass die Tertiärstruktur des Proteins und damit seine Bindefähigkeit für Herbizide besser erhalten bleibt, als bei den nach Sharma bei pH 3,0 aufgereinigten Proteinen.

Mit der durchgeführten FPLC-Auftrennung des D1-Proteins nach Piletskaya konnten im Gegensatz zur Literatur (Piletskaya, 1997) die PS-II-Proteinkomplex-Extrakte weder bei *Vicia faba* noch bei *Pisum sativum* oder *Lactuca sativa* aufgetrennt werden. Die PS-II-Proteinkomplex-Extrakte adsorbierten an die stationäre Phase der Säule und konnten über die mobile Phase nicht wieder von der Säule eluiert werden. Dabei wurden ohne Erfolg diverse Gradienten der mobilen Phase mit und ohne Stufen getestet (s. Tab. 2.1-4), sowie die zwei stationären Phasen C4 und C18.

Tabelle 2.1-2 Übersicht über die durchgeführten Gradientenauftrennungen nach der Piletskaya Methode. Angegeben sind jeweils der Prozentsatz an 1-Propanol und in Klammern die Laufzeit in min.

Auftrennungs- gradient	Linear (% 2-Propanol)	Isokratisch (% 2-Propanol)	Linear (% 2-Propanol)	Isokratisch (% 2-Propanol)
1	0-100 % (30 min)	100 % (10 min)		
2	0-100 % (60 min)	100 % (25 min)		
3	0-100 % (60 min)	100 % (10 min)		
4	0-30 % (30 min)	30 % (20 min)		
5	0-30 % (30 min)	30 % (30 min)	30-100 % (20 min)	100 % (10 min)
6	0-43 % (10 min)	43 % (10 min)	43-100 % (15 min)	100 % (5 min)

Die Fraktionen wurden in Intervallen von 1 min über den gesamten Lauf gesammelt und über SDS-Page und Western Blot, sowie über den anti-D1-Antikörper-Chip auf den Nachweis von D1-Protein untersucht. Es war weder ein Nachweis von D1-Protein über SDS-Page, noch über Western Blot, noch über den anti-D1-Antikörper-Chip, in den entsprechend der Methode nach Piletskaya aufgetrennten FPLC-Fraktionen möglich.

2.1.4.2 Aufreinigung des D1-Proteins über Gelfiltrationschromatographie mit einem Salzgradienten

Eine weitere chromatographische Proteinaufreinigung wurde entwickelt, die im Gegensatz zu der Sharma-Methode ohne den Zusatz eines organischen Lösungsmittels oder eines stark sauren Elutionsmittels arbeitet. Da die alleinige Trennung durch isokratische Elution mit TrisHCl-Puffer in der Gelfiltrationschromatographie eine nicht hinreichende Auflösung der PS-II-Proteine lieferte, wurde die Gelfiltrationschromatographie in Kombination mit einem Ammoniumsulfat-Salzgradienten als hydrophobe Interaktionschromatographie getestet und optimiert.

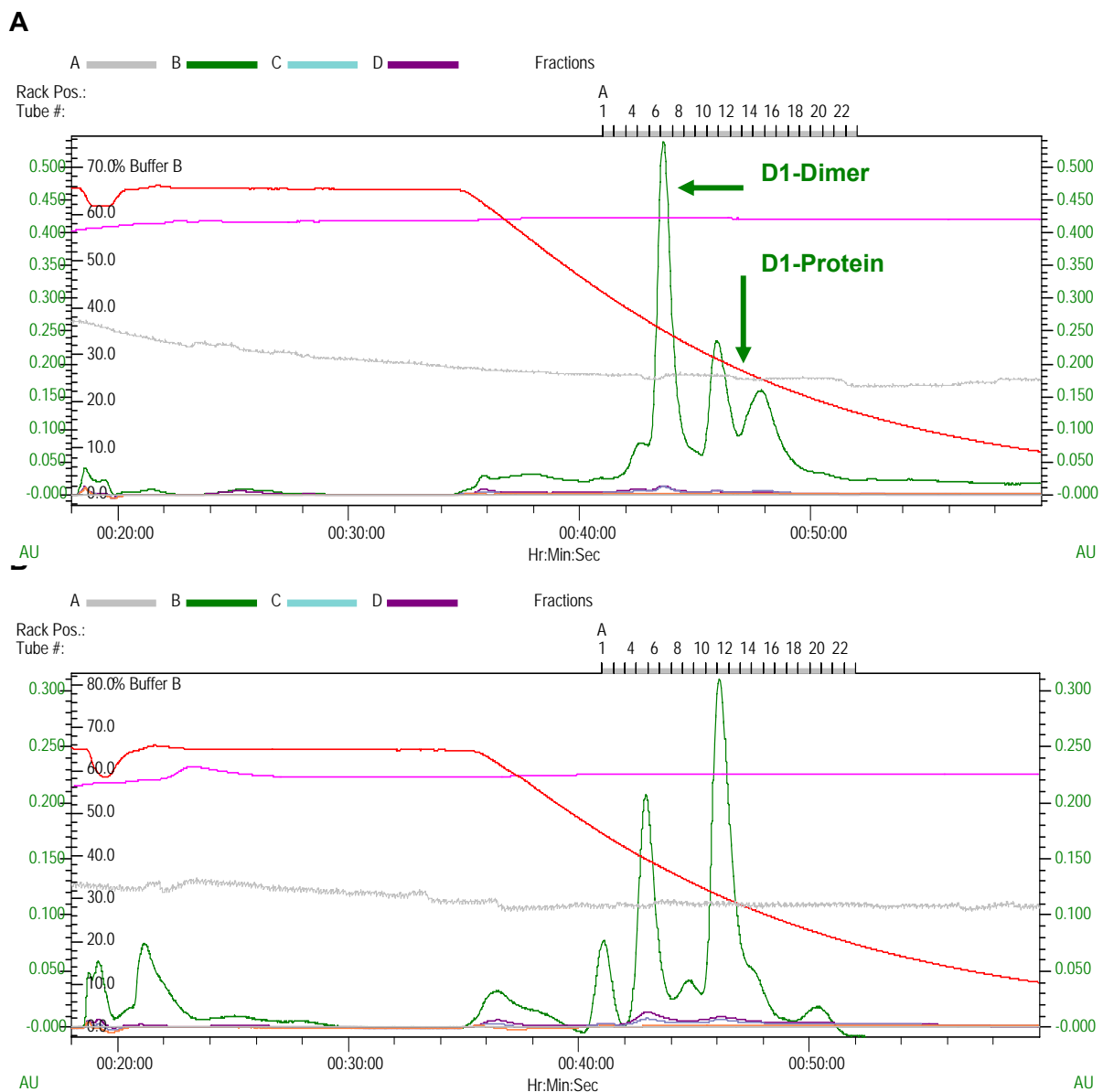


Abb. 2.1.15: FPLC-Chromatogramm des Bohnen-PS-II-Proteinextraktes (A) und des Kopfsalat-PS-II-Extraktes (B) nach Trennung mit GFC und Salzgradient. Detektion durch UV bei 214 nm (grüne Linie) und Leitfähigkeit (roter Linie; D1-Protein eluierte bei 120 mS/cm)

Die Experimente zeigten, dass eine Anfangselution mit Ammoniumsulfat (6 M in 50 mM TrisHCl pH 8,0) die Mehrheit der Proteine in der GFC-Säule zurückhielt, die sich dann durch abnehmende Ammoniumsulfatkonzentrationen (Salzgradient gegen 50 mM TrisHCl pH 8,0) nach ihrer Ladung und Größe auftrennten. Mindestens 3 Hauptpeaks konnten bei Bohnen und Erbse, bzw. 4 bei Kopfsalat getrennt werden (s. Abb. 2.1-15).

Die stark salzhaltigen FPLC-Fractionen wurden vor der SDS-PAGE-Untersuchung mit 10 kDa Filtereinheiten (Microcon YM-10) ultrafiltriert, um das Ammoniumsulfat zu entfernen. Nach der Entwicklung der Gele und dem Western-Blot konnte bestätigt werden, dass das Bohnen-D1-Protein aus den Proteindoppelbanden und das D1-Protein-Dimer entsprechend seinem Chromatogramm aufgetrennt werden konnten (s. Abb. 2.1-16). Zur Bindungsuntersuchung der Herbizide boten sich somit zwei weitere Möglichkeiten an Proteinliganden an, die als Zielstruktur dienen können.

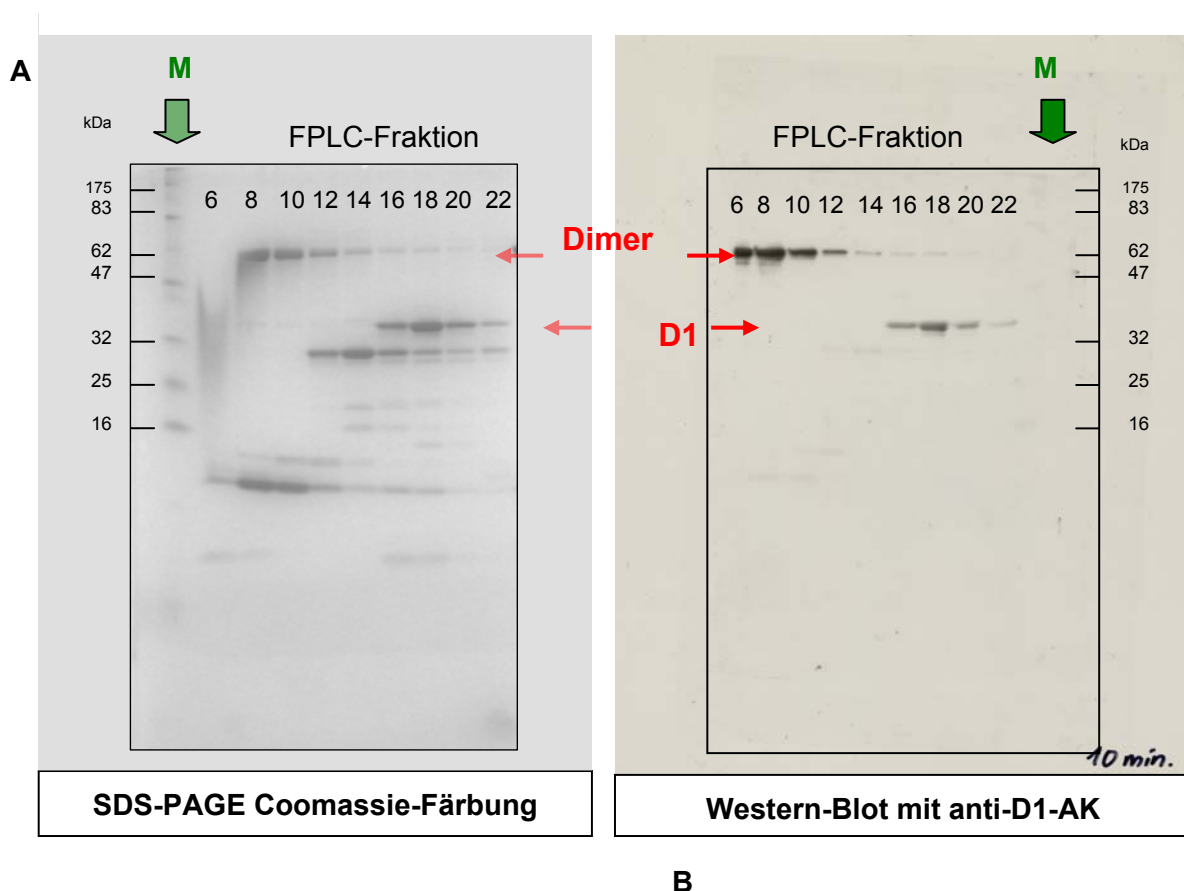


Abb. 2.1.16: SDS-PAGE der FPLC-Fractionen (A.) eines Bohnen-PS-II-Proteinextraktes nach der Trennung mit Gelfiltrationschromatographie und Salzgradient. Trennung des D1-Protein-Dimer von dem D1-Protein-Monomer wurde im Western-Blot bestätigt (B.)

Das Chromatogramm des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes aus Erbse zeigte ein nahezu ähnliches Elutionsverhalten (nicht abgebildet). Jedoch konnte im ersten großen Peak kein Erbsen-D1-/D2-Dimer nachgewiesen werden, wie es bei Bohnen-PS-II-Proteinkomplexen der Fall war. Zu den beiden o. g. Bohnen-D1-Proteinen kommt also nur das Erbsen-D1-Proteinmonomer mit in die engere Auswahl, das für die spätere Untersuchung der Herbizidbindung in größeren Mengen gewonnen werden soll.

2.1.5 Nachweis der Bindefähigkeit des isolierten D1-Proteins über Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analysen mit dem Simazinderivat-Chip

2.1.5.1 Synthese eines Herbizidliganden für biomolekulare Interaktionsanalysen

Für biomolekulare Interaktionsanalysen über Surface Plasmon-Resonanz (SPR) mit dem Biacore 3000 wurde ein Herbizidligand nach (Goodrow *et al.*, 1990) mit einem Spacer zur besseren Kopplung an die Oberfläche des SPR-Chips synthetisiert.

Durch Reaktion von Cyanurchlorid mit Ethylamin und N,N-Diisopropylethylamin wurde 4,6-Dichloro-N-ethyl-1,3,5-triazin-2-amin hergestellt, welches nachfolgend mit 6-Aminohexansäure umgesetzt wurde. Nach Aufreinigung wurde die Struktur des Endproduktes 6-[4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]amino-hexansäure durch massespektrometrische und NMR-spektroskopische Messungen belegt.

2.1.5.2 Erarbeitung einer mit Herbizidderivaten gekoppelten Chipoberfläche zur Detektion von D1-Proteinen

Das nach Goodrow *et al.* (1990) mit einem Spacer synthetisierte Simazinderivat wurde in der Surface-Plasmon-Resonanzanalyse mit dem Biacore 3000 für die funktionelle Kontrolle der D1-Isolierung eingesetzt. Dazu wurde das synthetisierte Derivat über eine reversible Oberflächen-Thiolkopplung an einen C1-Sensorchip, der eine flache carboxymethylierte Oberfläche ohne Dextranmatrix besitzt, gebunden (Schlecht *et al.*, 2002), um den Erhalt der Funktionalität des D1-Proteins nach der Isolation zu überprüfen. In parallelen Experimenten mit PAM wurde ein inhibierender Einfluß des entsprechenden Linkerderivates nachgewiesen, wobei eine deutliche Reduktion des Effektes gegenüber freiem Simazin gemessen wurde (s. Abb. 2.1-22).

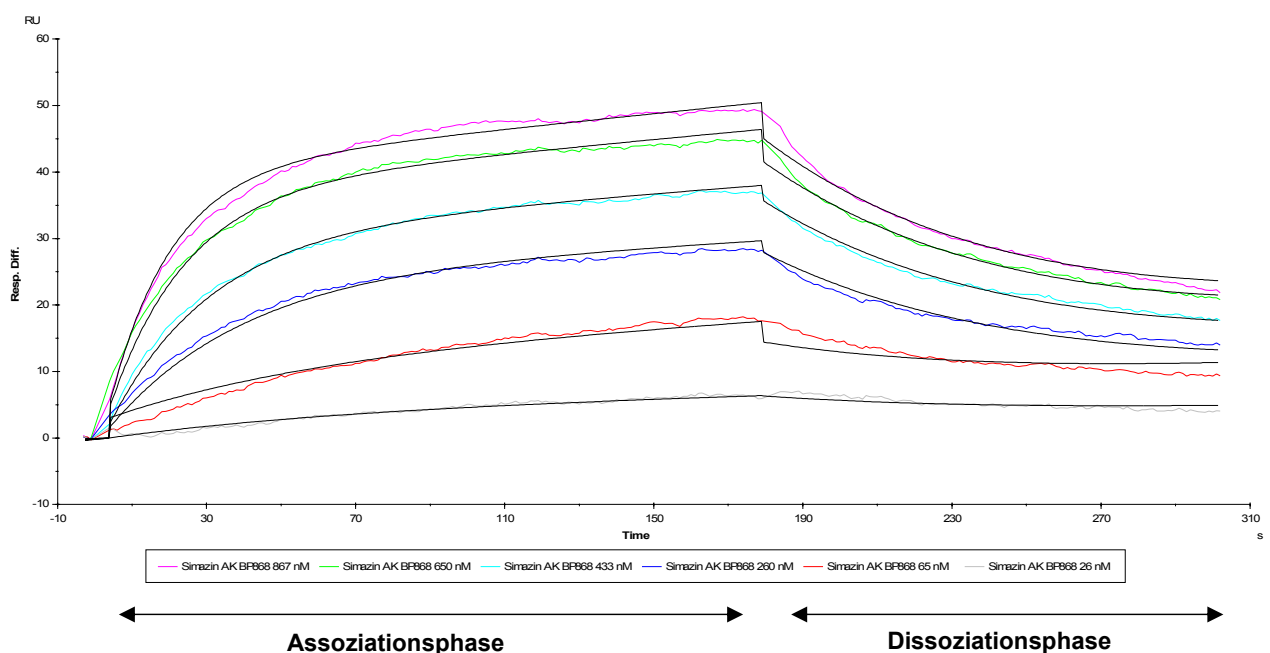


Abb. 2.1.17: Kinetische Auswertung der Triazin-AK-Simazinderivat-Bindung an eine mit einem Simazinderivat gekoppelte C1-Chipoberfläche. Sensorgramm der 6 Triazin-AK-Konzentrationen: 867 nM, 650 nM, 433 nM, 260 nM, 65 nM und 26 nM. x-Achse: Zeit in (s), y-Achse: SPR-Response in (RU). Fit 1:1 binding (Langmuir model) with drifting baseline (schwarze Linien).

Die erfolgreiche Kopplung des Simazinderivates an die Chipfläche konnte mit einem polyklonalen anti-Triazin-Antikörper nachgewiesen werden (Schlecht *et al.*, 2002) (s. Abb. 2.1-17). Eine Regeneration der Chipfläche konnte mit 0,1 M HCl erzielt werden, wobei die Simazinderivate ohne Aktivitätsverlust nutzbar für weitere Bindungsexperimente (Interaktionsanalysen) bleiben.

Durch die erfolgreiche reversible Thiolkopplung ist es möglich, den Liganden von der Chipoberfläche zu entfernen und somit die Oberfläche für weitere Experimente nutzbar zu machen. Zusätzlich sollten mit dieser Methode auch weitere andere Herbizidderivate gekoppelt werden.

2.1.5.3 Nachweis der Bindefähigkeit des isolierten D1-Proteins über Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analysen mit dem Simazinderivat-Chip

Bei biomolekularen Interaktionsanalysen mittels SPR von aufgereinigten Fraktionen der PS-II-Proteinkomplex-Extrakte nach der Sharma *et al.* (1997a) konnten Anbindungen von D1-Proteinen bei allen drei untersuchten Pflanzenspezies (*Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Lactuca sativa*) an das an die Chipoberfläche immobilisierte Simazinderivat nachgewiesen werden (s. Abb. 2.18 bis 2.1-19).

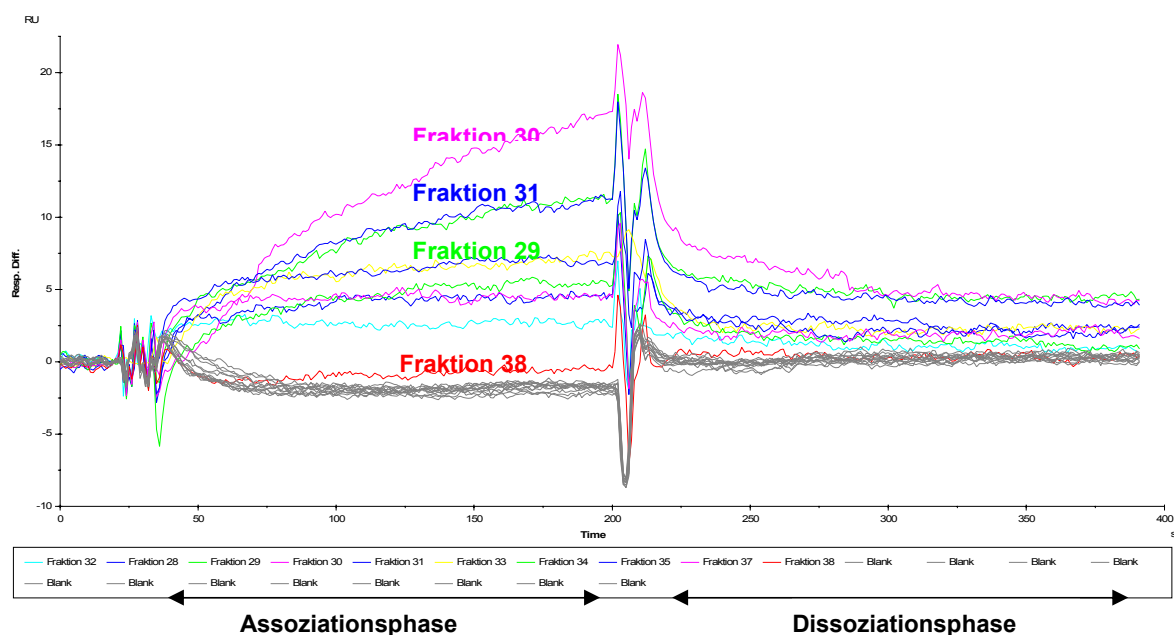


Abb. 2.1.18: Sensorgramm der FPLC-Fraktionen 28-38 eines PS-II-Extraktes von *Vicia faba* (PS II 53 BL) an einem Simazinderivatchip. "Double referenced"-Kurven gegen einen Realblank aus einem FPLC-Blanklauf. x-Achse: Zeit in (s), y-Achse: SPR-Response in (RU). FC 3-1, schwarze Kurven HBS-EP Blanks.

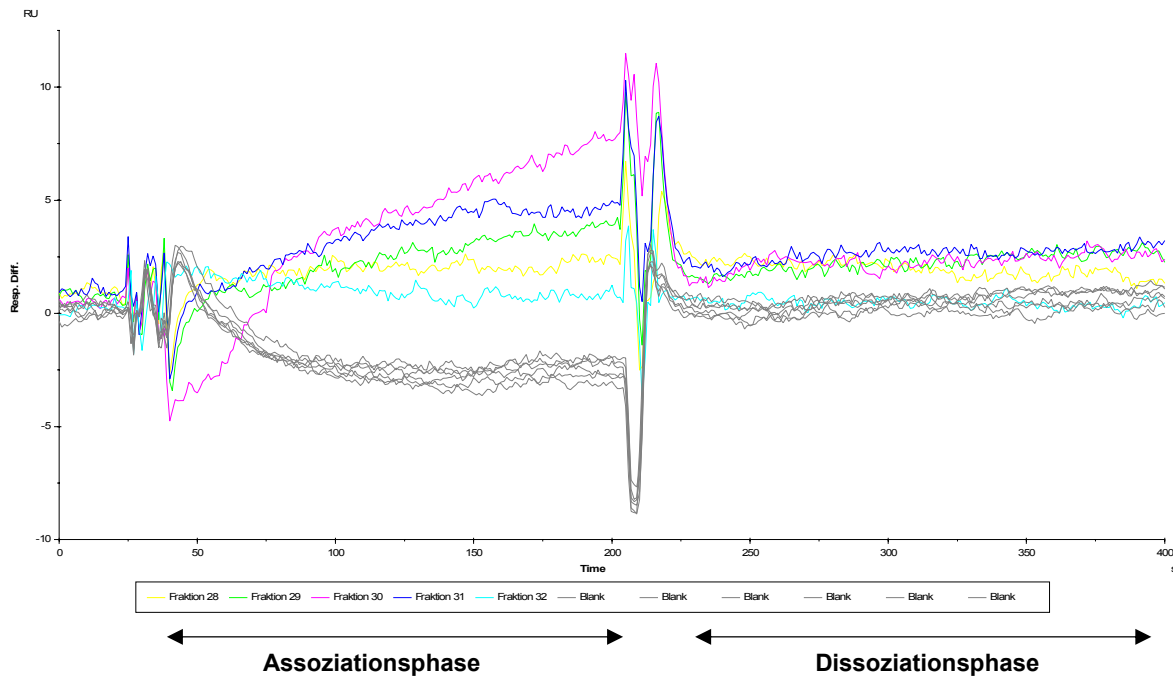


Abb. 2.1.19: Sensorgramm der FPLC-Fraktionen 28-32 eines PS-II-Extraktes von *Vicia faba* (PS II 53 BL) an einem Simazinderivatchip. "Double referenced"-Kurven gegen einen Realblank aus einem FPLC-Blanklauf. x-Achse Zeit in (s), y-Achse SPR-Response in (RU). FC 4-1, schwarze Kurven HBS-EP-Blanks.

Mit der Entwicklung der Methode zum qualitativen Nachweis von bindefähigem D1-Protein konnte die Erhaltung der Bindefähigkeit der Q_B-Bindenische des D1-Proteins zu Simazin bestätigt werden. Damit wurde gezeigt, dass nicht nur D1-Protein in den Aufreinigungen zu finden war, sondern, dass es darüber hinaus noch in einem funktionell bindefähigen Zustand vorlag. Damit konnte erstmalig die Funktionalität eines isolierten D1-Proteins mit der SPR nachgewiesen werden.

Die mit dem Simazinderivatchip nachgewiesenen Konzentrationsbereiche der D1-Protein-Elution in der FPLC-Aufreinigung deckten sich mit dem Nachweisbereich des D1-Proteins in den SDS-Page-, Western Blot- und D1-Antikörper-Chip-Untersuchungen (Konzentrationsbereich von 41-75 % 1-Propanol).

Im Vergleich der drei Pflanzenspezies zeigte sich auch bei dem Nachweis von bindefähigem D1-Protein über den Simazinderivatchip, *Vicia faba* als die Pflanzenspezies mit dem höchsten Gehalt an D1-Protein. Damit liegt ein Ergebnis vor, das die Beobachtungen aus den zuvor beschriebenen Nachweismethoden bestätigte.

2.1.6 Nachweis des D1-Proteins über Oberflächen-Plasmon-Resonanz mit einem anti-D1-Antikörper-Chip mit dem Biacore 3000

Zur Charakterisierung der Aufreinigung des D1-Proteins aus den Thylakoidmembranen wurde ein polyklonaler anti-D1-Antikörper (Agrisera, Uppsala, S) in der Surface-Plasmon-Resonanzanalyse mit dem Biacore 3000 eingesetzt. Dazu wurde der anti-D1-Antikörper über eine Aminkopplung an einen CM5-Sensorchip, der eine Dextranmatrix besitzt, gebunden, um die Qualität der Aufreinigung des D1-Proteins zu überprüfen.

Mit der so gestalteten Oberfläche konnte bei biomolekularen Bindungsexperimenten mit FPLC-Fraktionen nach der Sharma Methode (1997a) ein Bindungsnachweis von D1-Proteinen erbracht werden (s. Abb. 2.1-20).

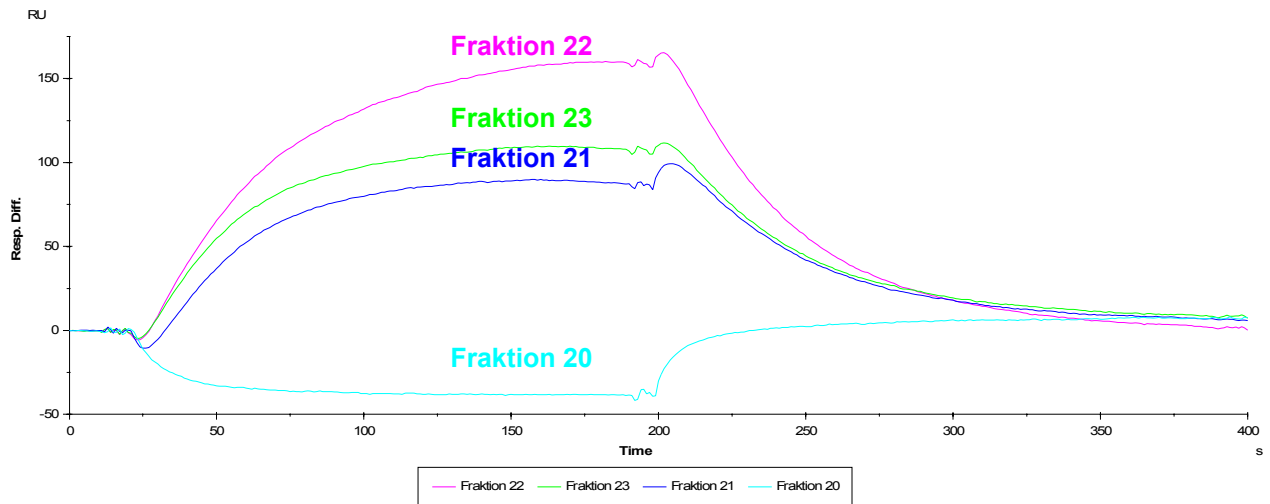


Abb. 2.1.20: Anbindung von D1-Proteinen an eine mit D1-Antikörper gekoppelte CM5-Chipfläche. SPR-Messungen mit dem Biacore 3000. Sensorgramm der FPLC-Fractionen 20-23 des PS-II-Extraktes PS II 48 B, an einem anti-D1-Antikörper-Chip. "Double referenced"-Kurven. x-Achse Zeit in Sekunden, y-Achse SPR-Response in Resonance Units (RU).

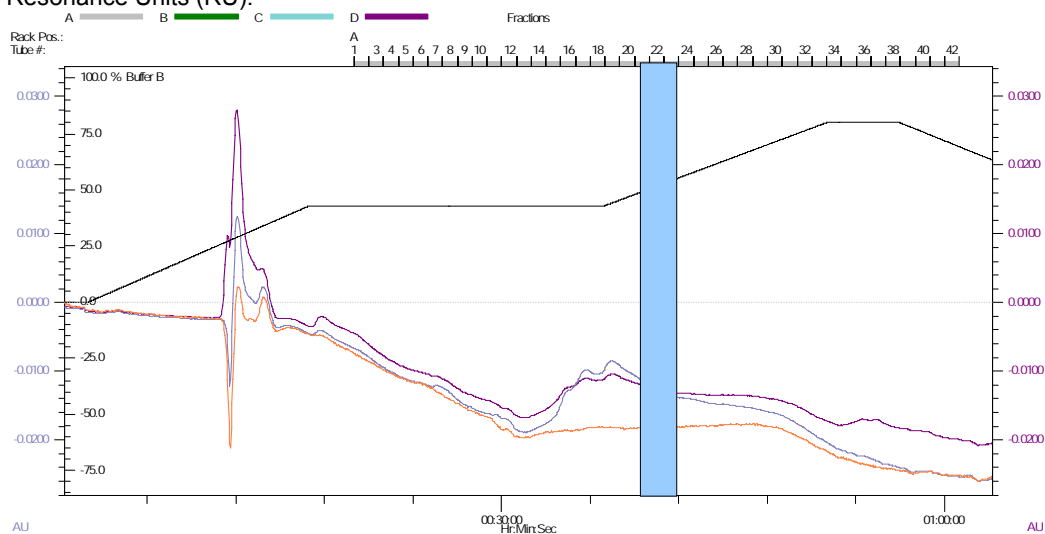


Abb. 2.1.21: FPLC-Chromatogramm des PS-II-Extraktes PS II 48 B, und einem Gradienten von 5 % Essigsäure zu 1-Propanol, nach Sharma, y-Achse rechts: Absorption (AU) bei 254 nm, y-Achse links: Absorption (AU) bei 280 nm, x-Achse unten: Zeit in h:min:s, x-Achse oben: gesammelte Fraktionsnummern, schwarze Linie: Gradient in % 1-Propanol. Blauer Balken, Markierung der Fraktionen mit Anbindung im Biacore 3000

Dabei wurden hauptsächlich in FPLC-Fractionen der PS-II-Proteinkomplexe von *Vicia faba*, mit dem SPR-D1-Antikörper-Assay D1-Proteine nachgewiesen. Nur in FPLC-Fractionen von zwei PS-II-Proteinkomplexen von *Pisum sativum*, PS II 12 E1 und PS II 19 E2 konnte ein schwacher Nachweis von D1-Protein erbracht werden. Das D1-Protein konnte immer in einem Konzentrationsbereich zwischen 43-60 % 1-Propanol detektiert werden (s. Abb. 2.1-21).

Es wurden zwei verschiedene RP-Säulenmatrices getestet, C4 und C18 (s. Absch. 2.5.). Dabei zeigte sich, dass beide Materialien für die Aufreinigung geeignet waren. Sowohl bei der Aufreinigung mit der stationären C4-Phase, als auch mit der C18-Phase konnte in den FPLC-Fractionen der verschiedenen PS-II-Proteinkomplexe D1-Protein nachgewiesen werden.

Ebenso verhielten sich die Ergebnisse unabhängig von der Aufkonzentrierungsmethode der PS-II-Proteinkomplex-Extraktionen, die vor der Aufgabe auf die Säule über verschiedene Methoden aufkonzentriert wurden (Lyophilisation, Vakuumzentrifugation). Sowohl bei Aufreinigungen aus dem mit der Vakuumzentrifugation aufkonzentrierten PS-II-Extrakten, als auch bei lyophilisierten PS-II-Extrakten war, unabhängig von der Methode D1-Protein nachzuweisen.

Damit war an diesem Punkt die biochemische Charakterisierung des D1-Proteins und damit der 1.Meilenstein beendet.

2.1.7 Einsatz des D1-Proteins für den biosensorischen Nachweis von Herbiziden mit der Methode der Oberflächen-Plasmon-Resonanz

Im nächsten Schritt (Meilenstein 2 und 3) wurde das aufgereinigte D1-Protein als biologische Einheit für den biosensorischen Nachweis von PS-II-Herbiziden mittels der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR)-Technologie eingesetzt. Über die Messmethode der Oberflächen-Plasmon-Resonanz sollte damit der spezifische, direkte Bindenachweis von verschiedenen PS-II-Herbiziden an die Q_B -Bindenische des D1-Proteins erfolgen. In diesem Fall wurde das nach der chromatographischen Methode nach Sharma *et al.* (1997a) aufgereinigte D1-Protein an einen SPR-Chip immobilisiert, um damit den direkten biosensorischen Nachweis von PS-II-Herbiziden in wässrigen Lösungen zu ermöglichen.

Als zusätzlicher Vergleich wurden teilweise auch PS-II-Proteinkomplexe von *Vicia faba* und *Pisum sativum* über Aminkopplung auf einzelne Flusszellen eines Chips gekoppelt.

Die Messungen wurden mit einem selbstentwickelten Small molecules screening assay mit einer selbst geschriebenen MDL-Methode (s. Anhang A I-2) durchgeführt.

Als PS-II-Herbizide wurden exemplarisch die drei Herbizide Diuron, Atrazin und Metribuzin ausgewählt, da diese bei den Fluoreszenzmessungen mit der Puls-Amplituden-Modulation (PAM) von verschiedenen getesteten PS-II-Herbiziden die stärkste Anbindung an die Q_B -Bindenische aufwiesen (s. Abb. 2.1-26, Schnabl *et al.*, 2000; Schnabl und Trapmann, 2001). Die Herbizide wurden dabei in einem Konzentrationsbereich von 10-100 $\mu\text{g/ml}$ auf eine Anbindung an das am SPR-Chip immobilisierte D1-Protein getestet.

Um die Methode zu etablieren und zu optimieren, wurden diverse Bindungsexperimente mit mehreren D1-Protein-Chips und verschiedenen Isolaten von D1-Proteinen, sowie PS-II-Proteinkomplexen durchgeführt. Es wurden nur D1-Protein-Aufreinigungen von *Vicia faba* als Liganden für die Bindungsexperimente am SPR-Chip ausgewählt, da sich diese aufgrund der vorhergehenden Ergebnisse als für die Bindungsexperimente am besten geeignet herausgestellt hatten.

Nach der Methodenetablierung und -optimierung stand genügend Material zur Verfügung, um Einzelbestimmungen mit zwei verschiedenen mit D1-Protein immobilisierten Chips vorzunehmen, diese sind nachfolgend aufgeführt. Bei den durchgeführten Experimenten konnte unabhängig voneinander auf den zwei verschiedenen Chips eine Anbindung von PS-

II-Herbiziden an das immobilisierte D1-Protein von *Vicia faba* bzw. einen PS-II-Proteinkomplex von *Vicia faba* nachgewiesen werden. Bei den untersuchten D1-Protein-Isolaten konnte ein Bindungsnachweis mit Herbiziden nur bei einem aus *Vicia faba* isoliertem D1-Protein (PS II 57 B) erbracht werden, das nach der PS-II-Extraktion gegen 5 % Essigsäure dialysiert und nach der Sharma Methode (1997a) in der FPLC aufgereinigt worden war. Nach einer Lösungsmittel- und Molekulargewichts-Korrektur, sowie nach einem durchgeführten „double referencing“ konnte ab einer Konzentration von 40 µg/ml Atrazin, eine Anbindung von Atrazin an das D1-Protein von 2,66 RU nachgewiesen werden (s. Abb. 2.1-22). Die Bindungsmenge stieg mit zunehmender Konzentration an Atrazin proportional an und zeigte bei einer Konzentration von 60 µg/ml 6,55 RU Anbindung, bei 80 µg/ml 9,93 RU Anbindung und bei 100 µg/ml 20,54 RU Anbindung (s. Abb. 2.1-22).

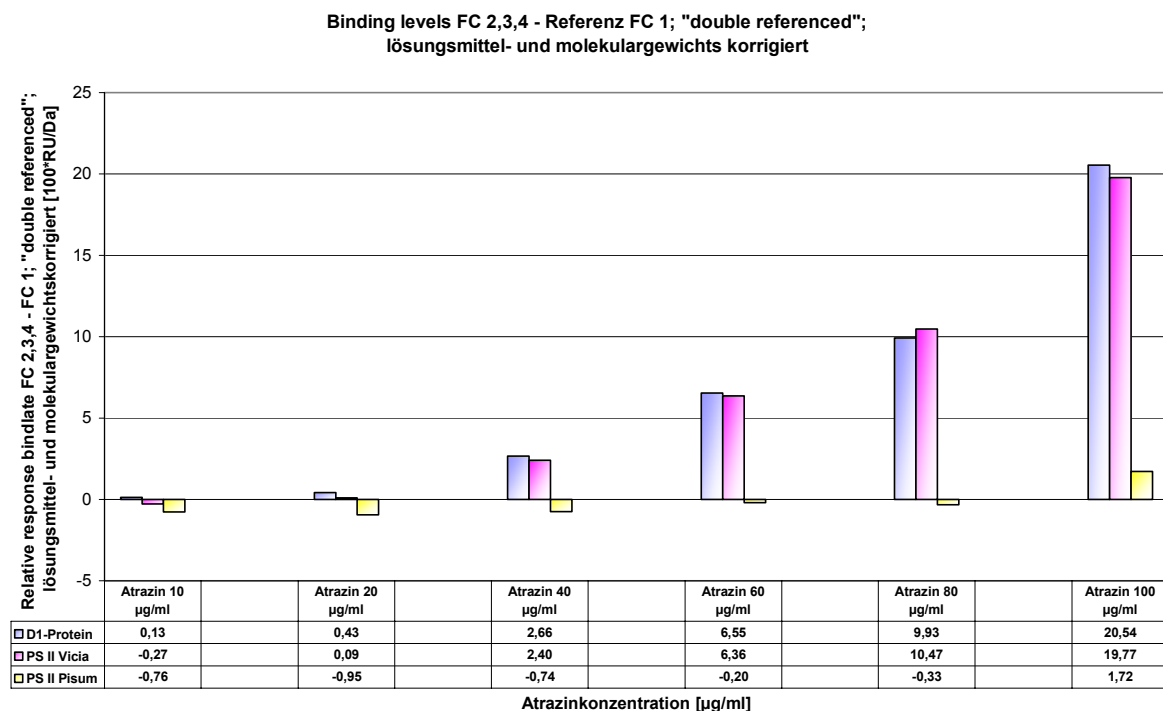


Abb. 2.1.22: Binding levels FC 2,3,4- FC 1 von 10-100 µg/ml Atrazin, „double referenced“, lösungsmittel- und molekulargewichtskorrigiert. x-Achse: Probenname mit Datentabelle der lösungsmittel- und molekulargewichtskorrigierten Messwerte von FC 2,3,4 – FC 1. y-Achse: Relative response von FC 2,3,4 – FC 1 am report point bindlate, lösungsmittel- und molekulargewichtskorrigiert (RU).

Ebenso konnte eine Anbindung des Atrazins an die PS-II-Proteinkomplexe von *Vicia faba* (PS II 53 BL) nachgewiesen werden (s. Abb. 2.1-22). Auch hier war eine proportionale Zunahme der Bindungsmenge mit steigender Atrazinkonzentration zu verzeichnen. Die Anbindungshöhe stieg von 2,4 RU bei 40 µg/ml Atrazin auf 19,77 RU bei 100 µg/ml Atrazin (s. Abb. 2.1-23). Es war, wie bei kleinen Molekülen üblich, keine Regeneration der Oberflächen mit Detergenzien oder Lösungsmitteln zwischen den verschiedenen Injektionszyklen notwendig. Die Regeneration der Messflächen erfolgte mit Laufpuffer, durch den die gebundenen Herbizide vom immobilisierten D1-Protein abgewaschen werden konnten.

Bei den PS-II-Proteinkomplexen von *Pisum sativum* (PS II 55 E1) konnte hingegen kein Bindungsnachweis von Atrazin erbracht werden. Lediglich bei einer Konzentration von 100 µg/ml Atrazin war ein Signal von 1,72 RU zu messen (s. Abb. 3.39.). Die PS-II-

Proteinkomplexe von *Pisum sativum* waren damit hier als Negativ-Kontrolle zu dem D1-Protein und den PS-II-Proteinkomplexen von *Vicia faba* zu sehen. Bei diesen PS-II-Proteinkomplexen handelte es sich um die gleiche funktionelle Einheit mit der identischen Größe und den gleichen physikalischen Eigenschaften wie bei den PS-II-Proteinkomplexen von *Vicia faba*. Damit können sie als Negativ-Kontroll-Proteine angesehen werden.

Somit zeigte sich sowohl bei den PS-II-Proteinkomplexen als auch bei den aufgereinigten D1-Proteinen von *Vicia faba* die erhalten gebliebene Bindungsfähigkeit der Q_B-Bindenische, unabhängig von der Struktur, in der das D1-Protein vorlag. Sowohl im Verbund des PS-II-Proteinkomplexes, als auch als einzeln vorliegendes D1-Monomer bzw. D1/D2-Dimer war die gleiche funktionelle Bindefähigkeit an Atrazin nachzuweisen. Da die D1-Monomere und D1/D2-Dimere durch die hier verwendete FPLC-Auftrennungsmethode nicht voneinander getrennt werden konnten (s. Absch. 2.1.4.1.1), wurden bei den D1-Proteinen von *Vicia faba* sowohl D1-Monomere wie auch D1/D2-Dimere an der Chipoberfläche immobilisiert. Zu welchem Prozentsatz die D1-Proteine von *Vicia faba* auf der Chipoberfläche aus D1-Monomeren oder D1-/D2-Dimeren bzw. aus beiden bestanden, konnte nicht bestimmt werden, da sich aufgrund der Aufreinigungsmethode die beiden Konformationszustände nicht voneinander trennen ließen.

2.1.8 Vergleich der Bindungsspezifität von Diuron, Atrazin und Metribuzin über den biosensorischen Nachweis mit D1-Protein mittels SPR

Auf einem weiteren Chip mit gekoppeltem D1-Protein aus der gleichen D1-Protein-Aufreinigung von *Vicia faba* konnte ein deutlicher Unterschied in der Bindungsspezifität zwischen den drei PS-II-Herbiziden Diuron, Atrazin und Metribuzin gefunden werden.

Nach einer durchgeführten Lösungsmittelkorrektur und „double referencing“ zeigte sich bei Diuron deutlich der höchste Bindungsnachweis im Vergleich der drei Herbizide (s. Abb. 2.1-23).

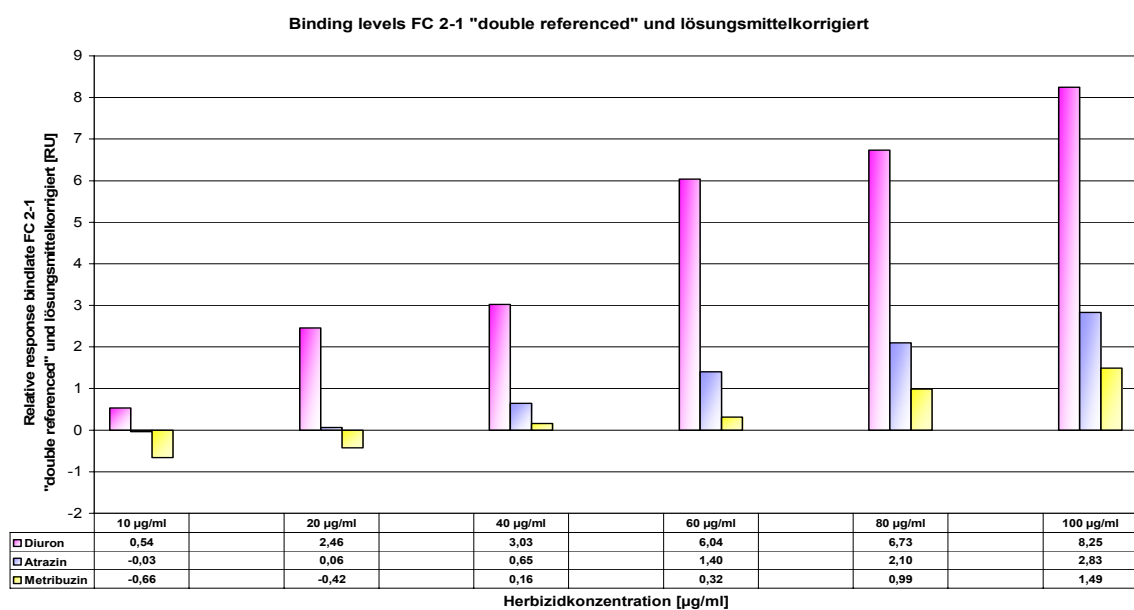


Abb. 2.1.23: Binding levels FC 2-1 von 10-100 µg/ml Diuron, Atrazin und Metribuzin, „double referenced“ und lösungsmittelkorrigiert. x-Achse: Herbizidkonzentrationen mit Datentabelle der „double referenced“ und lösungsmittelkorrigierten Messwerte von FC 2-1. y-Achse: Relative response von FC 2-1 am report point bindlate, „double referenced“ und lösungsmittelkorrigiert (RU).

Bei einer Konzentration von 10 µg/ml war eine Antwort von 0,54 RU zu verzeichnen (s. Abb. 2.1-23). Die Bindungsmenge stieg mit zunehmender Konzentration kontinuierlich auf 8,25 RU bei einer Konzentration von 100 µg/ml Diuron an. Atrazin wies die zweitgrößte Bindungsaffinität der drei getesteten Herbizide auf. Hier war erst ab einer Konzentration von 40 µg/ml ein Bindungssignal von 0,65 RU zu verzeichnen, das deutlich unter dem von Diuron mit 3,03 RU lag. Bei einer Erhöhung der Konzentration stieg das Bindungssignal proportional auf 2,83 RU bei einer Atrazinkonzentration von 100 µg/ml an. Metribuzin zeigte nur eine sehr schwache Bindungsaffinität zu dem immobilisierten D1-Protein. Hier war erst bei einer Konzentration von 60 µg/ml eine Antwort von 0,32 RU zu verzeichnen, die auf maximal 1,49 RU bei einer Konzentration von 100 µg/ml Metribuzin anstieg.

Die hier gefundene Abstufung in der Bindungsspezifität der drei untersuchten PS-II-Herbizide entsprach der, die auch mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor nachgewiesen werden konnte (s. Absch. 2.1.11; Schnabl *et al.*, 2000; Schnabl und Trapmann, 2001). Auch dort zeigte sich der Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor am sensitivsten gegenüber Diuron, gefolgt von Atrazin und am wenigsten sensitiv gegenüber Metribuzin.

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass das aufgereinigte D1-Protein sowie PS-II-Proteinkomplexe von *Vicia faba* prinzipiell für den biosensorischen Nachweis von PS-II-Herbiziden und anderen Photosystem-II-Inhibitoren mit der Oberflächen-Plasmon-Resonanz geeignet sind. Den nachweisbaren Konzentrationsbereich der Herbizide gilt es jedoch noch zu optimieren.

2.1.9 Zusammenfassung

Auf der Basis dieser umfangreichen Optimierungsansätze zur Isolierung der Thylakoidmembranen aus verschiedenen Pflanzenspezies und zur Aufreinigung des D1-Proteins als Target für die Liganden (PS-II-Herbizide) kann man somit zusammenfassen, dass ausschliesslich das aufgereinigte D1-Protein (bzw. PS-II-Proteinkomplex) aus *Vicia faba* Interaktionen mit den PS-II-Herbiziden zeigt. Beim Vergleich der verschiedenen Pflanzenspezies wurde *Vicia faba* mit der höchsten Ausbeute an D1-Protein und mit der höchsten Bindungsfähigkeit zu PS-II-Herbiziden gegenüber den anderen untersuchten Pflanzenspezies identifiziert.

Damit konnte erstmalig nicht nur eine Methode zur Isolation von D1-Protein entwickelt werden, sondern es konnte auch die erhalten gebliebene Bindefähigkeit und damit die Funktionalität des D1-Proteins aufgezeigt werden.

2.1.10 BIACORE-MS-Kopplung

Die Kopplung der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) mit der Massenspektrometrie (MS) in pflanzlichen Systemen stellt einen innovativen Ansatz dar. Die offline Kopplung der Recovery-Technik mit der Massenspektrometrie kann in der wirkungsbezogenen Analytik als Identifizierung dienen, um die einzelnen in den Wasserproben enthaltenen Photosystem-II-hemmenden Substanzen zu charakterisieren, deren Bindung an D1-Proteine im Biacore nachgewiesen wird.

Als Modellsystem für die Applikation der SPR-Recovery-Technik auf pflanzliche Systeme wurde pflanzliche Peroxidase als Analyt und monoklonaler Peroxidase-Antikörper als Ligand, immobilisiert an eine Biacore CM5-Chipoberfläche, ausgewählt. Die Messungen der

zurückgewonnen Peroxidase mit der MALDI-TOF-MS (BRUKER Reflex III, Bruker Daltonics, D) erfolgten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Functional Peptides (caesar) .

Die Peroxidase konnte erfolgreich an den, an die Sensoroberfläche immobilisierten monoklonalen anti-Peroxidase-Antikörper gebunden werden, und nachfolgend über die Methode des Microrecovery von der Chipoberfläche eluiert („recovert“) werden, sowie über die Massenspektrometrie identifiziert und qualifiziert werden (s. Abb. 2.1-24 und 2.1-25). Dabei wurde gezeigt, dass die über die Bindungssignale im Biacore ermittelten Quantitäten mit den über MS gemessenen Quantitäten übereinstimmten. Damit konnte die erfolgreiche Durchführung der Kopplung des biosensorischen Nachweises über SPR mit der klassischen chemischen Methode der MS, nachgewiesen werden.

Mit diesem anti-Peroxidase-Antikörper ↔ Peroxidase-Testsystem, konnte die erfolgreiche offline Kopplung des biosensorischen Nachweises über das Biacore 3000 mit der chemischen Analyse über MS nachgewiesen werden und die zurückgewonnene Peroxidase an der Nachweisgrenze gemessen werden (s. Abb. 2.1-25).

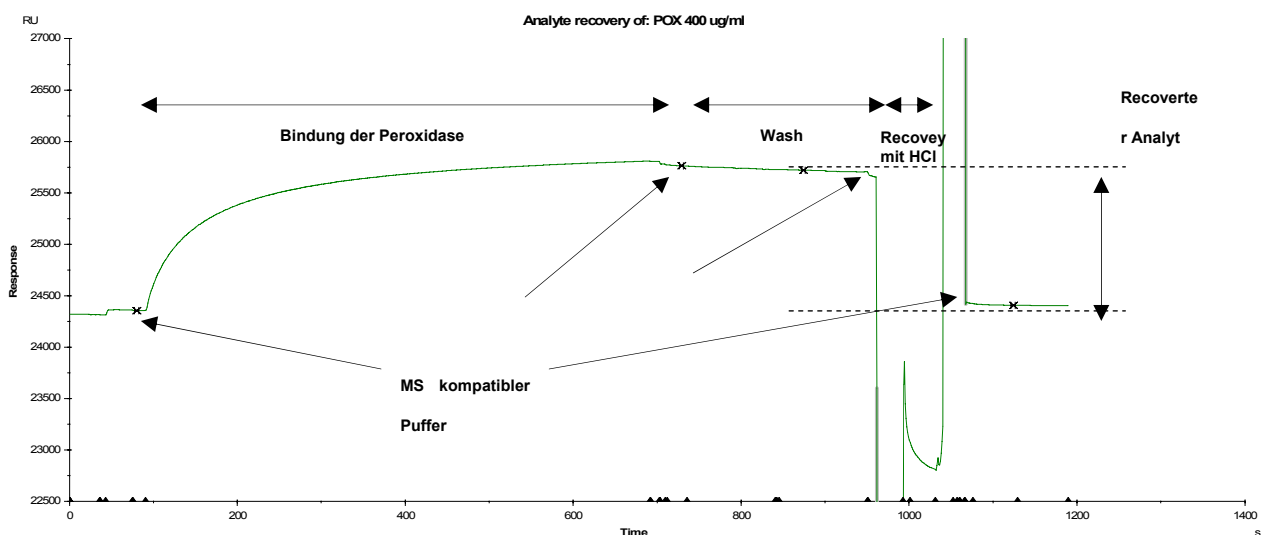


Abb. 2.1.24: Sensorgramm des Analyt-Recoverys von 400 µg/ml Peroxidase von einem mit anti-Peroxidase-Antikörper immobilisierten CM5-Chip. x-Achse: Zeit in (s), y-Achse: SPR-Antwort in (RU).

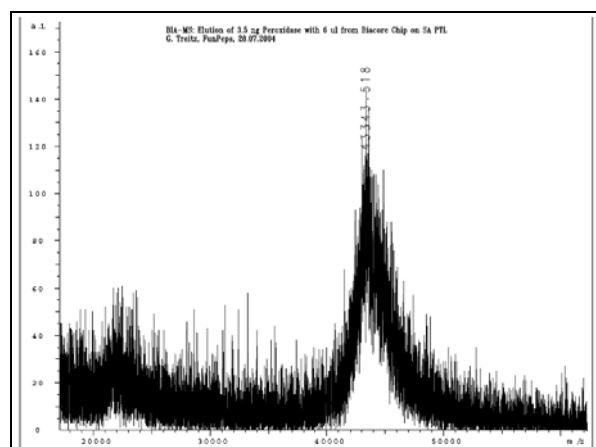


Abb. 2.1.25: Massenspektrum von ca. 3,5 ng (80 fmol) Peroxidase, eluiert vom Biacore-Chip mit 6 µl 10 mM HCl, auf einer Sinapinsäurematrix mittels der Biacore-Analyt-Recovery-Methode, $[Peroxidase + H]^+ = 43.343$ Da. x-Achse: Masse (m/z), y-Achse: Intensität.

Dieser Ansatz der SPR-MS-Kopplung mit pflanzlichen Systemen war neuartig. Eine Anwendung der Kopplung der Oberflächen-Plasmon-Resonanz mit dem direkten massenspektrometrischen Nachweis konnte mit pflanzlichen Systemen in der Literatur bisher noch nicht gefunden werden.

Dieses Testsystem wurde für die zukünftige Kopplung des biosensorischen Nachweises von PS-II-Inhibitoren (z. B. Herbizide) über die biologische Einheit des D1-Proteins mit deren Identifizierung über MS entwickelt.

Mit einem solchen System kann damit der Ansatz der wirkungsbezogenen Analytik verfolgt werden, bei der die wirkungsbezogene Quantifizierung der Schadstoffe über die Biosensorik, mit der Identifizierung über klassische chemische Methoden gekoppelt wird.

Die wirkungsbezogene Analytik verbindet dabei die biomolekulare Erkennung über den Wirkungsbezug, mit der chemischen Analyse, und vereint damit die Information über den Effekt auf die biologische Einheit, mit der chemischen Strukturanalyse und Konzentrationsbestimmung an aktiven Substanzen in der Probe (Hock und Scheller, 2001).

2.1.11 Untersuchung anderer Analyte mit der Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometrie

Neben den PS-II-Herbiziden Metribuzin, Atrazin, Simazin, Diuron und der Simazinhexansäure wurde als zusätzlicher Analyt der in der Schiffsindustrie als „anti-fouling Mittel“ bekannte Wirkstoff Irgarol getestet. Dieser Wirkstoff ist daher als potentieller Schadstoff in Oberflächengewässern von besonderer Bedeutung.

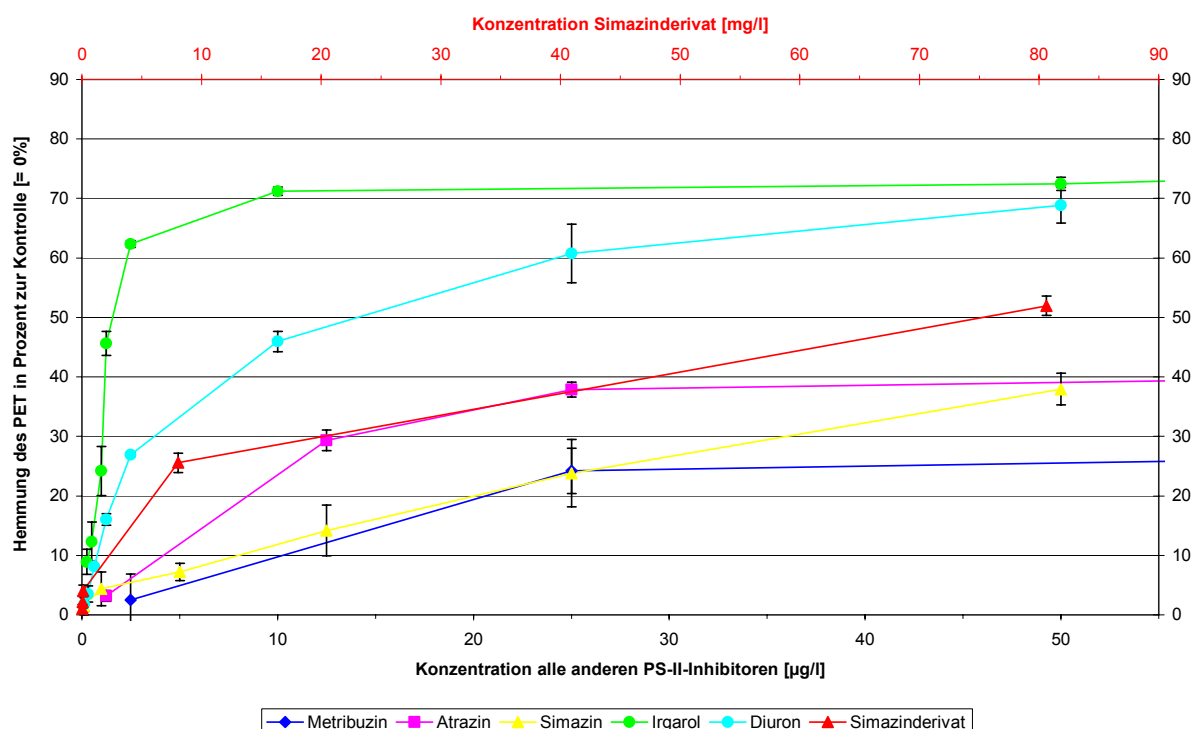


Abb. 2.1.26: Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes (%) durch Simazin, Atrazin, Metribuzin, Diuron, Irgarol und Simazinhexansäure (rot). y-Achse: Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes in Prozent zur Kontrolle (= 100%). x-Achse oben: Konzentration Simazinderivat (µg/l), x-Achse unten: Konzentration alle anderen PS-II-Inhibitoren (µg/l), Fehlerindikator: ± Standardabweichung, Anzahl der Messwiederholungen = 4.

Bei Irgarol wurde mittels der Puls-Amplituden-Modulations Fluorometrie ein Einfluß auf den photosynthetischen Elektronentransport des Photosystems II nachgewiesen werden. Bei einer Konzentration von 0,5 µg/l, was dem Maximalwert an Verunreinigungen durch Herbizide nach der Trinkwasserverordnung entspricht (Trinkwasserverordnung Deutschland, 1980), konnte eine deutliche Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes von 12,3 % gemessen werden (s. Abb. 2.1-26 und Anhang A I-1). Bei höheren Konzentrationen trat ein Sättigungseffekt ein.

Gleichzeitig gibt Abbildung 2.1-26 einen Vergleich der Hemmung des PET durch die verschiedenen PS-II-Herbizide Diuron, Atrazin, Metribuzin und Simazin wieder. Die höchste Hemmwirkung auf den PET innerhalb der PS-II-Herbizide zeigte, übereinstimmend mit der Literatur (Trapmann, 1999; Schnabl *et al.*, 2000; Trapmann *et al.*, 2000; Schnabl und Trapmann, 2001), Diuron, gefolgt von Atrazin, Simazin und Metribuzin. Das Antifoulingmittel Irgarol wies noch eine signifikant höhere Hemmwirkung auf den PET auf als Diuron (s. Anhang A I-1).

2.2 Erzielte Ergebnisse Teilprojekt GKSS

Die Analytik von photosynthesehemmenden Liganden wurde entwickelt, validiert und an Oberflächenwasserproben erprobt (Kapitel 2.2.1). Für die Analytik von Proteinen in Mikroproben wurde ein Off-Line Nano-ESI-TOF sowie ein zweidimensionales Nano-LC-ESI-TOF Verfahren entwickelt und optimiert (Kapitel 2.2.2). Vom Kooperationspartner ILB erhaltene Extrakte und Fraktionen aus unterschiedlichen Pflanzenspezies wurden analysiert, um das Extraktions- bzw. Fraktionierungsverfahren zu optimieren. In Extrakten konnten Proteine des PS II Komplexes nachgewiesen werden, darunter auch vermutliche Teilstrukturen des D1-Proteins (34797 Da (Erbsen), 35098 Da (Bohne) und 34938 Da (Kopfsalat). Extrakte, in denen diese Proteine nachweisbar waren, zeigten eine positive Reaktionen mit D1-Antikörpern in Western-Blots und in einigen Fällen zudem eine positive Bindungsreaktion (SPR) (vergl. Kapitel 2.1.6-2.1.8). Da bis Ausscheiden von Herrn Dr. Olaf Heemken im Oktober 2005 keine isolierten D1-Proteine bzw. Teilstrukturen vorlagen, konnten die abschließenden Meilensteine (vergl. Kapitel 1.1.2 nicht mehr erreicht werden).

2.2.1 Analytik von photosynthesehemmenden Liganden

2.2.1.1 Auswahl von photosynthesehemmenden Liganden als Zielsubstanzen

Für spätere Bindungsstudien der D1-Proteine mit photosynthesehemmende Liganden wurde eine Auswahl an entsprechenden Zielsubstanzen getroffen. Diese zunächst vorläufige Auswahl von Verbindungen ist in Tabelle 2.2-1 aufgelistet und erfolgte unter Berücksichtigung folgender Überlegungen:

1. die Herbizide besitzen eine photosynthesehemmende Wirkung am D1-Protein des PSII und
2. die Herbizide sind in Deutschland als Wirkstoff zugelassen oder
3. die Herbizide sind im Parameterumfang der Wasserrahmenrichtlinie 76/464/EWG bzw. der Prioritären Stoffliste 2000/60/EG enthalten oder
4. die Herbizide besitzen eine Relevanz für die Elbe als einem der größten europäischen Flüsse (Positivbefunde in der Elbe bzw. Anwendung und/oder Produktionsstätten in Tschechien oder in der ehemaligen DDR).

Für die Bindungsstudien wird zunächst eine eingeschränkte Auswahl an Leitsubstanzen eingesetzt werden (Atrazin und Metribuzin), während für die Evaluierung des Testsystems bezüglich realer Wasserproben die relevanten Verbindungen möglichst umfassend identifiziert und quantifiziert werden müssen. Durch die angewandten Auswahlkriterien ist davon auszugehen, dass ein erheblicher Anteil der aufgelisteten Herbizide in deutschen Oberflächenwässern nachweisbar sein wird.

Tabelle 2.2-1 Auswahl an Substanzen mit photosynthesehemmender Wirkung (aus: Herbicide Resistance Action Committee, Stand Januar 2002).

Verbindung	Chem. Familie	CAS Nr.	Zugel. BRD ^a	EU WRRL 76/464 ^b	Prior. St. 2000/60 ^c	Elbe relevant ^{d-g}
Ametryne	Triazin	834-12-8				x
Atrazine	Triazin	1912-24-9			x	x
Bentazon	Benzothiadiaz.	25057-89-0	x			x
Bromacil	Uracil	314-40-9				x
Bromofenoxim	Nitril	13181-17-4				x
Bromoxynil	Nitril	1689-84-5				x
Chloridazon	Pyridazinones	1698-60-8	x	x		
Chlorobromuron	Ureas	13360-45-7				x
Chlorotoluron	Ureas	15545-48-9				x
Cyanazine	Triazin	21725-46-2				x
Desmedipham	Phenylcarbam.	13684-56-5	x			
Desmetryne	Triazin	1014-69-3				x
Dimefuron	Ureas	34205-21-5	x			x
Diuron	Ureas	330-54-1	x		x	x
Fenuron	Ureas	101-42-8				x
Hexazinone	Triazinon	51235-04-2				x
Ioxynil	Nitril	1689-83-4	x			
Irgarol	Triazin	28159-98-0				x
Isoproturon	Ureas	34123-59-6	x		x	x
Lenacil	Uracil	2164-08-1				x
Linuron	Ureas	330-55-2		x		x
Metamitron	Triazinon	41394-05-2	x			x
Methabenzthiazuron	Ureas	18691-97-9				x
Metobromuron	Ureas	3060-89-7	x			x
Metoxuron	Ureas	19937-59-8				
Metribuzin	Triazinon	21087-64-9	x			x
Monolinuron	Ureas	1746-81-2		x		
Neburon	Ureas	555-37-3				x
Pentachlor	Amid	2307-68-8				x
Phenmedipham	Phenylcarbam.	13684-63-4				x
Prometryne	Triazin	7287-19-6				x
Propanil	Amid	709-98-8		x		
Propazine	Triazin	139-40-2				x
Pyridate	Phenylpyridaz.	55512-33-9	x			x
Simazine	Triazin	122-34-9			x	x
Terbacil	Uracil	5902-51-2				x
Terbumeton	Triazin	33693-04-8				x
Terbutylazine	Triazin	5915-41-3	x			x
Terbutryne	Triazin	886-50-0				x

^a BVL (2003), ^b 76/464/EWG (1976), ^c 2000/60/EG (2000), ^d ARGE-Elbe (2002), ^e Gandraß (1998), ^f Schwarzbauer et al. (2004), ^g Götz et al. (1998)

2.2.1.2 Quantitativer Nachweis von photosynthesehemmenden Liganden

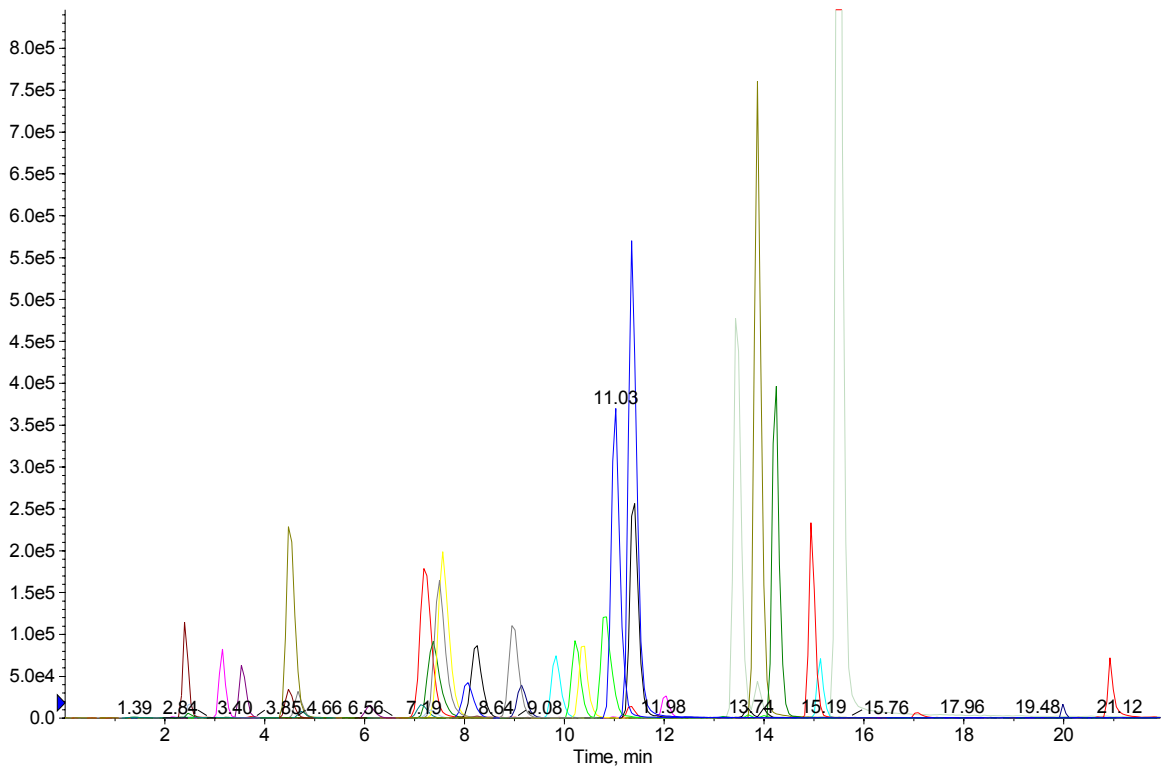
Um wirkbezogene Rankings zwischen Testsystem (D1-Protein) und Zielsubstanz (photosynthesehemmenden Ligand) vornehmen zu können (Dose/Response-Abhängigkeit), war es notwendig, für die entsprechenden Verbindungen eine quantitative Analytik zu entwickeln. Die Quantifizierung der in Tabelle 2.2-1 genannten Zielsubstanzen erfolgte mittels Tandem-Massenspektrometrie gekoppelt mit Flüssigchromatographie (LC-MS/MS). Ziel war es, einen selektiven, substanzspezifischen Nachweis mit extrem niedrigen Nachweisempfindlichkeiten für die einzelnen Zielsubstanzen zu erreichen. Der Grund hierfür besteht darin, dass die vorgestellten Zielsubstanzen üblicherweise in unteren ng/L-Bereich in Oberflächenwässern vorliegen. Die Notwendigkeit der Selektivität für den Nachweis ergibt sich daraus, dass reale Oberflächenwässer komplexe Substanzgemische darstellen, in denen der Nachweis andernfalls durch interferierende Matrixbestandteile beeinträchtigt werden kann. Eine Abtrennung interferierender Matrixbestandteile erfolgte zudem durch die Flüssigchromatographie, wobei hier die chromatographischen Bedingungen zu optimieren waren (Auswahl der Trennsäule, Lösemittelzusammensetzung, Temperatur, Flussrate u.a.). Infolge der zu erwartenden niedrigen Konzentrationen der Zielsubstanzen in realen Wasserproben war zudem davon auszugehen, dass ein entsprechender Anreicherungsschritt zu implementieren war. Insgesamt erfasste die Methodenerstellung somit die Entwicklung eines Anreicherungsschrittes, die Optimierung der Chromatographie und die Auswahl geeigneter Ionenspuren für die Massenspektrometrie, wie sie in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben werden.

Chromatographie. Für die Chromatographie wurde eine LC-Anlage der Serie 1100 von Agilent verwendet. Sie bestand aus Degasser (G1322A), binärer Gradientenpumpe (G1312A), Autosampler (G1313A) und Säulenofen (G1314A). Als analytische Trennsäule wurden eine Zorbax Eclipse XDB C-18 mit 2,1 mm ID und 150 mm Länge (Agilent) und eine ODS-Hypersil in den Dimensionen 2,1 mm ID x 100 mm Länge (Agilent) erprobt, wobei die Zorbax Eclipse Säule eine deutlich bessere Performance hinsichtlich Peakform und Trennverhalten aufwies. Das Injektionsvolumen betrug in beiden Fällen 5 µL, die Flussrate lag bei 250 µL/min und die Ofentemperatur betrug 20 °C. Als Lösemittel wurden Wasser (A) und Methanol (B) verwendet, die als 0,5 mM Ammoniumacetat-Lösungen vorlagen. Der Gradient für die chromatographischen Läufe im positiven MRM-Modus war: 2 min 45/55 (A/B), in 12 min auf 100/0 (A/B), dann für 8 min halten, anschließend wieder auf den Anfangsgradienten und 6 min equilibrieren. Die LC-Methode im negativen MRM-Modus war: 2 min 50/50 (A/B), in 12 min auf 100/0 (A/B), dann für 6 min halten, anschließend wieder auf den Anfangsgradienten und 6 min equilibrieren. Chromatogramme beider Methoden finden sich in Abb. 2.2-1.

Massenspektrometrie. Für die Quantifizierung der photosynthesehemmenden Liganden wurde ein Massenspektrometer API 3000, Model 018444 V, der Firma Applied Biosystems/MDS Sciex (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Ionisierung erfolgte mittels Electrospray-Ionenquelle (Turbo-Ionspray). Das Massenspektrometer wurde im Multiple-Reaction-Monitoring (MRM) Modus betrieben. Die Messungen erfolgt dabei in zwei Modi, eine im positiven und die andere im negativen Ionisierungsmodus (Chromatogramme der beiden Messmodi siehe Abb. 2.2-1). Die Einstellungen für die Ionenquelle sind in Tabelle 2.2-2 enthalten, substanzabhängige Parameter sind in Tabelle 2.2-3 und 2.2-4 aufgelistet.

■ XIC of +MRM (36 pairs): 228.2/186.3 amu from Sample 32 (Probe_2 dot) of 031211_Pos.wiff (Tu...

Max. 3.7e5 cps.



■ XIC of -MRM (21 pairs): 215.9/159.8 amu from Sample 29 (Probe_2 dot) of 031211_Neg.wiff (Tu...

Max. 3.6e5 cps.

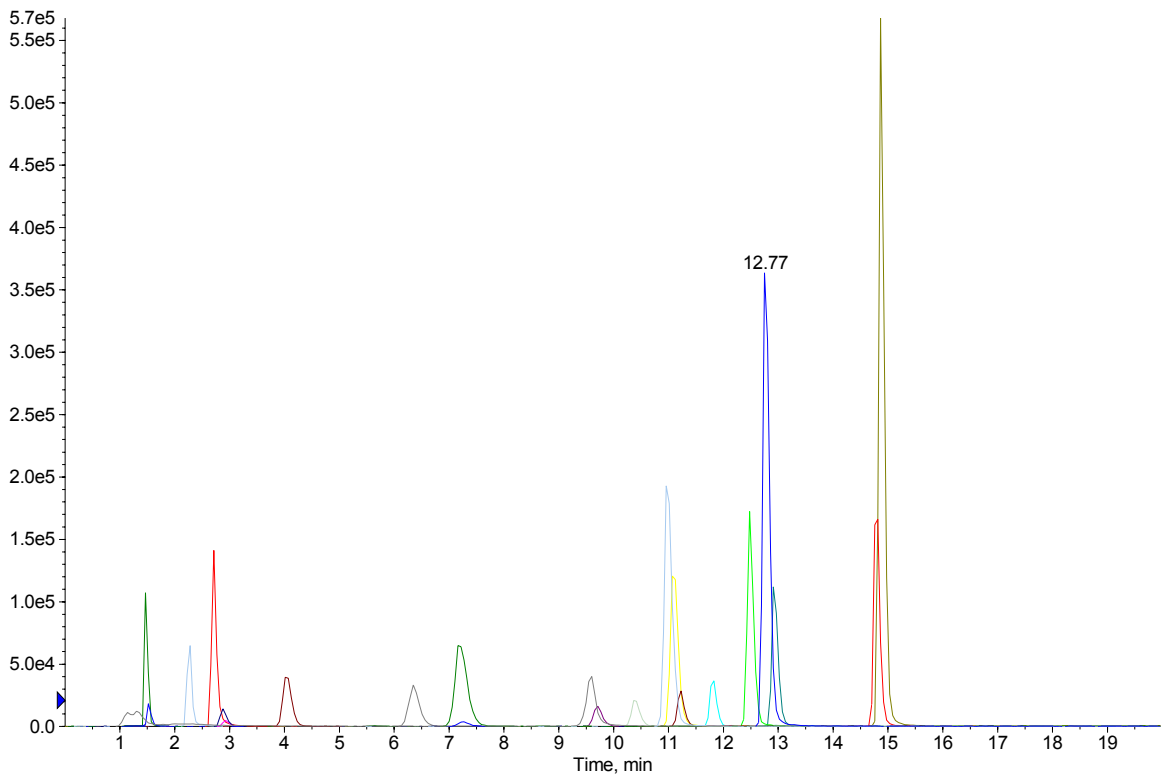


Abb. 2.2.1: Chromatogramm von mit Testsubstanzen dotierten Wasserproben der Elbe im positiven ESI-MS/MS (oben) und im negativen ESI-MS/MS Modus (unten).

Tabelle 2.2-2 Einstellungen der Ionenquelle im positiven und negativen MRM-Messmodus.

Parameter		Messmodus	
		Positiv	Negativ
Nebulizer Gas	[psi]	10	10
Curtain Gas	[psi]	10	12
CAD Gas	[psi]	4	4
Temperatur	[°C]	350	350
Ionisierungsenergie	[V]	5000	-4200

Tabelle 2.2-3 Substanzabhängige Parameter für den negativen MRM-Messmodus.

Verbindung	Precursor Ion	Product Ion	Declustering Potential	Focusing Potential	Collision Energy	CXP
Bentazon	239,0	132,1	-16	-70	-38	-15
Bromacil	259,0	202,7	-10	-80	-28	-15
Bromoxynil	275,8	78,8	-25	-70	-52	-15
Chloridazon	220,0	74,9	-15	-85	-40	-15
Chlorobromuron	292,9	205,5	-10	-60	-20	-15
Chlorotoluron	211,1	166,0	-15	-80	-24	-15
Dimefuron	337,2	210,0	-10	-80	-21	-15
Diuron	231,0	185,8	-10	-70	-24	-15
Ioxynil	369,8	126,7	-15	-85	-48	-19
Lenacil	233,1	150,7	-15	-80	-34	-15
Linuron	246,9	159,8	-10	-74	-18	-9
Metamitron	201,1	116,9	-6	-75	-30	-19
Metoxuron	227,2	211,7	-20	-64	-18	-13
Neburon	273,0	159,7	-10	-80	-30	-15
NPPB	299,0	254,9	-31	-130	-22	-15
Pentanochlor	238,0	139,9	-8	-89	-30	-12
Propanil	215,9	159,8	-26	-80	-26	-15
Terbacil	215,0	158,9	-8	-80	-24	-15

Tabelle 2.2-4 Substanzabhängige Parameter für den positiven MRM-Messmodus.

Verbindung	Precursor Ion	Product Ion	Declustering Potential	Focusing Potential	Collision Energy	CXP
Ametryn	228,2	186,3	11	100	27	12
Atrazine	216,1	174,2	11	130	27	12
Atrazine (D5)	221,1	179,2	21	80	27	12
Bromacil	261,0	205,0	6	60	19	14
Chloridazon	222,1	104,2	11	160	33	8
Chlorbromuron	294,9	205,9	6	70	33	14
Chlortoluron	213,1	46,3	1	90	31	6
Cyanazine	241,0	214,2	11	80	25	14
Desmedipham	301,1	182,2	11	70	13	12
Desmetryn	214,1	172,2	1	90	27	18
Diazinon (D10)	315,2	170,1	31	50	35	10
Dimefuron	339,2	167,2	1	130	29	10
Diuron	233,1	72,1	11	130	41	6
Fenuron	165,1	72,1	6	80	35	6
Hexazinone	253,2	171,2	21	50	27	12
Irgarol	254,1	198,0	51	120	27	12
Isoproturon	207,2	72,1	6	140	37	6
Lenacil	235,2	153,0	6	70	29	10
Linuron	249,0	160,0	16	140	27	10
Metamitron	203,2	175,4	21	110	25	14
Methabenzthiazuron	222,1	165,2	1	50	27	10
Metobromuron	259,0	170,1	6	150	25	12
Metoxuron	229,2	72,1	1	80	43	4
Metribuzin	215,1	187,2	6	140	27	14
Monolinuron	215,0	126,2	11	140	27	10
Neburon	275,0	88,2	11	70	23	4
Pentanochlor	240,1	142,1	11	110	25	12
Phenmedipham	301,1	168,0	1	70	13	10
Prometryn	242,1	158,2	6	100	35	10
Propazine	230,2	188,2	26	70	27	12
Pyridate	379,1	207,2	16	130	23	14
Simazine	202,2	124,2	11	140	27	8
Terbumeton	226,2	170,4	6	90	27	12
Terbutylazine	230,2	174,2	11	110	25	12
Terbutryn	242,1	186,2	6	80	27	12

Festphasenextraktion. Für die Festphasenextraktion (SPE) zur Anreicherung der Zielanalyten wurden verschiedene Adsorber erprobt. Zur Anwendung kamen SPE Kartuschen der Hersteller Chromabond (C18, HPR und Easy), Phenomenex (Strata C18, X und Phenyl), Waters (Oasis HLB) und Bakerbond (Polar Plus C). Neben den Adsorbentmaterialien mussten zudem der Einfluss von pH-Wert, Spülschritten und Auswahl des Elutionslösemittels überprüft und optimiert werden. Die besten Resultate ließen sich mit Oasis HLB Kartuschen (500 mg, 6 mL) erreichen. Diese Kartuschen wurden daher für alle nachfolgenden Anreicherungen benutzt.

Da diese Anreicherungs-methode letztlich für die Extraktion von Oberflächenwässern gedacht war, erfolgte die Methodenentwicklung mit realen Wasserproben der Elbe. Auf diese Weise ließen sich durch coextrahierbare Begleitstoffe verursachte Matrixeffekte (zumeist Signalsuppressionen) erfassen und entsprechend kompensieren.

Die Methode in ihrer endgültigen Form sah vor, dass Wasserproben von 1 L Volumen nach Ansäuern mit 30 %iger Salzsäure auf pH 1,5 zunächst mittels anliegendem Vakuum über 0,45 µm Polycarbonat Membranfilter filtriert wurden. Dem Filtrat wurden die isoto-penmarkierten Verbindungen Atrazin (D₅) und Diuron (D₆) in einer Konzentration von 100 ng absolut als interne Standards zugesetzt. Nachdem die Festphasenadsorber (Oasis HLB, 500 mg, 6 mL, Firma Waters) mit jeweils 5 mL Aceton, Methanol und Wasser konditioniert wurden, erfolgte die Extraktion der Wasserproben bei einem anliegenden Vakuum von ca. 400 mbar. Nach der Extraktion wurden die Kartuschen mit 10 mL Wasser (Milli Q) gespült und anschließend durch anliegendes Vakuum für ca. 30 min getrocknet. Die Elution der Säulen erfolgte mit 4 mL Aceton, woraufhin das Eluat im Stickstoffstrom auf ca. 50 µL eingengt wurde. Nach Zugabe von 100 ng der isoto-penmarkierten Verbindung Diazinon (D₁₀) als Surrogatstandard wurde das Eluat mit einem Methanol/Wasser-Gemisch (1:1) auf 1 mL aufgefüllt und der LC-MS/MS Messung entsprechend der zuvor beschriebenen Methodik zugeführt.

Methodenvalidierung und Qualitätssicherung. Eine Validierung der Methodik erfolgte hinsichtlich Anwendungsbereich, Bestimmungsgrenzen (BG), Linearität sowie Richtigkeit und Präzision. Die Richtigkeit der Methode wurde mittels Wiederfindungsraten (WFR) von dotierten Realproben ermittelt, die Präzision mittels relativer Standardabweichungen bei Mehrfachbestimmungen (RSD). Die BG wurden als der 10-fache Wert des Signal/Rausch-Verhältnisses auf dem entsprechenden MRM-Übergang in einer mit 10 ng dotierten Realprobe interpoliert. Zur Ermittlung der Linearität wurden 10-Punkt-Matrixkalibrierungen im Konzentrationsbereich von 10 bis 100 ng/µL in Wasserproben der Elbe vorgenommen. Der Anwendungsbereich wurde ebenfalls durch Standard-addierte Proben ermittelt. Hierzu wurden Wasserkörper unterschiedlichster Prägung (fluvial bis marin) nach Zugabe einer definierten Menge an Zielanalyten extrahiert. Die WFR dieser Untersuchung zeigen, dass die Methode für die hier betrachteten Wasserkörper gut geeignet ist.

Die ermittelten Verfahrenskenn-daten finden sich in Tabelle 2.2-5, Ergebnisse zur Linearität der Methode in Abbildung 2.2-2. Die BG lagen mit wenigen Ausnahmen unterhalb von 1 ng/L. Für die meisten Analyten fanden sich zufriedenstellende Ergebnisse hinsichtlich der WFR, bei realen Proben wurden die Konzentrationen jedoch immer mit den WFR abgeglichen. Weitere qualitätssicherende Maßnahmen bestanden in der Verwendung von isoto-penmarkierten internen Standards und der fortschreibenden Überwachung von Blanks und der WFR.

Tabelle 2.2-5 Verfahrenskenndaten für die quantitative Bestimmung von photosynthesehemmenden Liganden und Konzentrationsbereiche in Wasserproben der Unterelbe (Längsschnitt Geesthacht – Nordsee vom November 2003 mit 19 Proben).

Verbindung	Verfahrenskenndaten			Wasserproben Elbe [ng/L]			
	WFR [%]	RSD [%]	BG [ng/L]	Positiv- befunde	Minimal- Wert	Mittelwert	Maximal- Wert
Ametryne	95,1	19,4	0,4	16	1,1	1,5	1,7
Atrazine	108,4	8,1	0,7	19	1,5	11,4	16,8
Bentazon	47,5	10,2	0,1	19	2,1	25,2	83,8
Bromacil	98,0	4,4	0,1	15	0,2	0,8	3,2
Bromoxynil	53,9	6,4	0,8	19	0,2	0,4	0,5
Chloridazon	53,3	10,8	0,1	19	0,7	1,8	3,1
Chlorobromuron	110,2	3,6	1,4	0	< BG	< BG	< BG
Chlorotoluron	106,8	3,2	1,9	19	1,2	3,7	5,5
Cyanazine	71,2	12,7	0,2	16	0,2	0,8	1,5
Desmedipham	105,5	5,5	0,02	19	0,0	0,1	0,1
Desmetryne	90,8	28,9	0,3	0	< BG	< BG	< BG
Dimefuron	119,5	5,1	0,1	19	0,1	0,7	1,1
Diuron	104,0	8,2	1,6	19	10,2	23,4	36,7
Fenuron	62,0	14,8	0,2	19	0,3	1,7	2,9
Hexazinone	88,0	6,6	0,2	19	0,3	4,4	11,2
Ioxynil	65,4	7,0	0,1	19	0,1	0,2	0,3
Irgarol	105,7	7,2	0,5	19	0,7	2,9	4,4
Isoproturon	111,9	13,1	0,5	19	3,1	21,6	30,6
Lenacil	116,9	4,1	0,5	19	0,9	13,7	20,4
Linuron	116,9	9,1	0,2	19	0,2	1,0	1,8
Metamitron	29,4	14,1	13,9	0	< BG	< BG	< BG
Methabenzthiazuron	111,7	5,6	0,1	19	0,2	0,3	0,6
Metobromuron	115,6	5,8	0,8	0	< BG	< BG	< BG
Metoxuron	70,4	11,6	1,2	0	< BG	< BG	< BG
Metribuzin	33,8	3,7	7,0	0	< BG	< BG	< BG
Monolinuron	119,9	5,3	0,1	4	0,1	0,2	0,2
Neburon	96,5	14,4	0,1	18	0,1	0,2	0,3
NPPB	102,1	8,6	0,1	0	< BG	< BG	< BG
Pentachlor	110,2	9,3	0,1	0	< BG	< BG	< BG
Phenmedipham	106,2	4,4	0,1	19	0,1	0,1	0,2
Prometryne	97,1	11,3	0,2	19	0,2	2,9	3,9
Propanil	122,9	6,5	0,1	11	0,1	0,1	0,1
Propazine	103,3	8,2	0,1	19	0,0	0,8	1,2
Pyridate	31,6	27,4	0,1	0	< BG	< BG	< BG
Simazine	99,1	3,9	0,5	19	0,6	3,0	4,5
Terbacil	131,5	8,1	0,1	3	0,1	0,1	0,2
Terbumeton	94,1	24,6	0,2	18	0,2	0,6	1,4
Terbuthylazine	108,4	6,6	0,3	18	1,1	3,2	4,6
Terbutryne	98,5	13,6	0,1	18	1,2	4,6	6,3

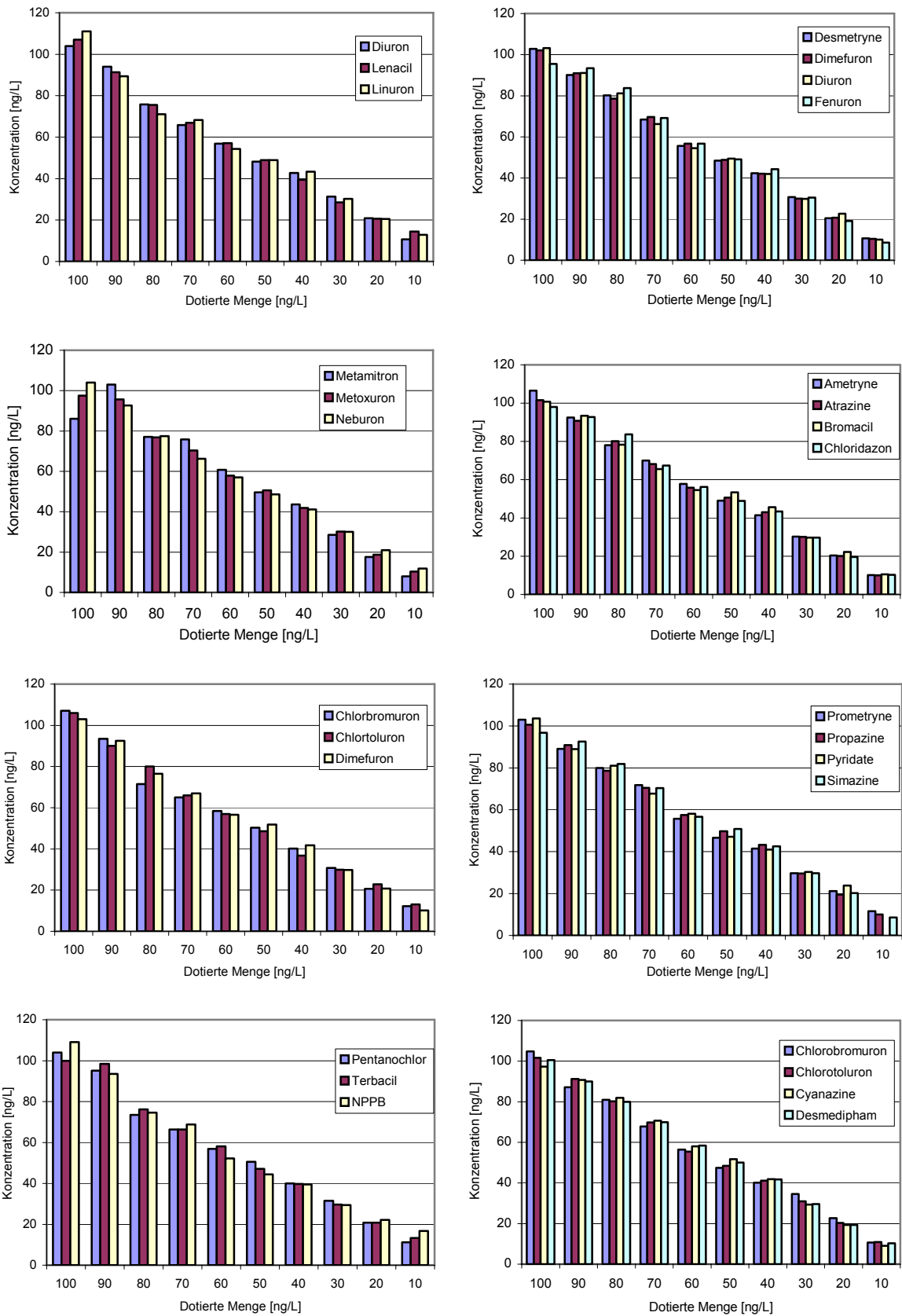


Abb. 2.2.2: Beispiele für 10-Punkt-Matrixkalibrierungen von photosynthesehemmenden Liganden in dotierten Elbewasserproben entsprechend DIN 32645.

2.2.1.3 Untersuchung von Wasserproben der Elbe

Die Untersuchung von Wasserproben der Elbe sollte neben der Methodvalidierung zugleich ein orientierendes Screening der Zielanalyte darstellen und zeigen, ob diese Verbindungen für deutsche Oberflächengewässer von Relevanz sind. Die Auswahl der Unterelbe von Geesthacht bis in den äußeren Ästuarbereich als Beprobungsareal ermöglichte darüber hinaus, die Analysenmethode für Proben unterschiedlichster Salinität, Analytkonzentration u.a. hydrographischer Parameter zu überprüfen. Proben für diese Untersuchung sind freundlicherweise von der Wassergütestelle Elbe der Umweltbehörde Hamburg (ARGE Elbe) zur Verfügung gestellt worden. Sie wurden am 26. November 2003 mittels Helikopter genommen und nach der in Kapitel 2.2.1.2 beschriebenen Methode aufgearbeitet und gemessen. Ergebnisse dieser Untersuchung finden sich in Form von Konzentrationsbereichen in Tabelle 2.2-5. Von den 39 untersuchten Zielanalyten wurden in den 19 untersuchten Proben für 31 Verbindungen Positivbefunde erzielt. Die Konzentrationen reichten hierbei bis zu 85 ng/L. Lediglich acht Verbindungen lagen unterhalb der Bestimmungsgrenze.

Neben diesem Screening der Unterelbe wurde ein jährliches Monitoring der Elbe bei Geesthacht durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde im Zeitraum von September 2003 bis August 2004 zu Beginn jeden Monats eine Wasserprobe der Elbe am Stauwehr Geesthacht genommen und ebenfalls entsprechend Kapitel 2.2.1.2 bearbeitet.

Abbildung 2.2-3 zeigt exemplarisch am Beispiel von Atrazin und Lenacil im oberen Bild den räumlichen Konzentrationsverlauf und im untern Bild den jährlichen Konzentrationsgang dieser beiden Verbindungen in der Elbe. Eine detaillierte Auflistung aller im Rahmen dieses Projektes gewonnenen Daten zum Vorkommen der untersuchten photosynthesehemmenden Liganden findet sich in den beiden Tabellen AII-1 und AII-2 im Anhang.

Insgesamt kann die Auswahl der Zielanalyte als weitestgehend umweltrelevant für deutsche Oberflächengewässer betrachtet werden. Die Verwendung dieser Verbindungen als photosynthesehemmende Liganden für Bindungsstudien mit D1-Proteinen erscheint daher sinnvoll. Die hier entwickelte Methode erwies sich als hinreichend leistungsstark für Messungen bis in den sub-ng/L Konzentrationsbereich.

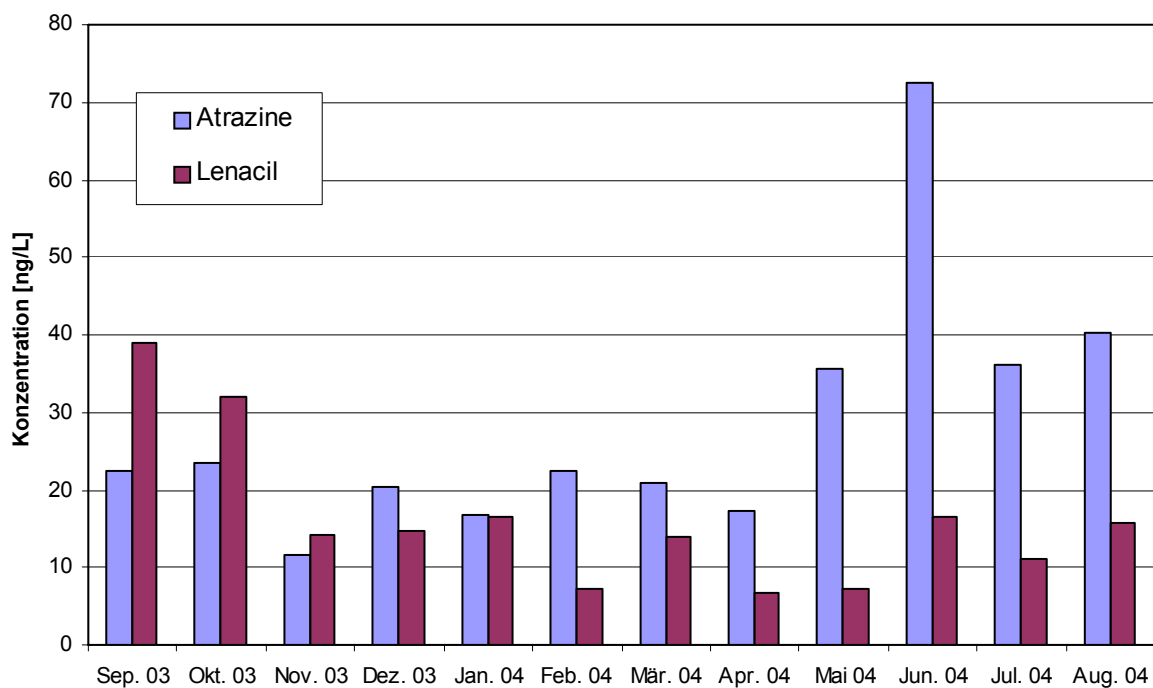
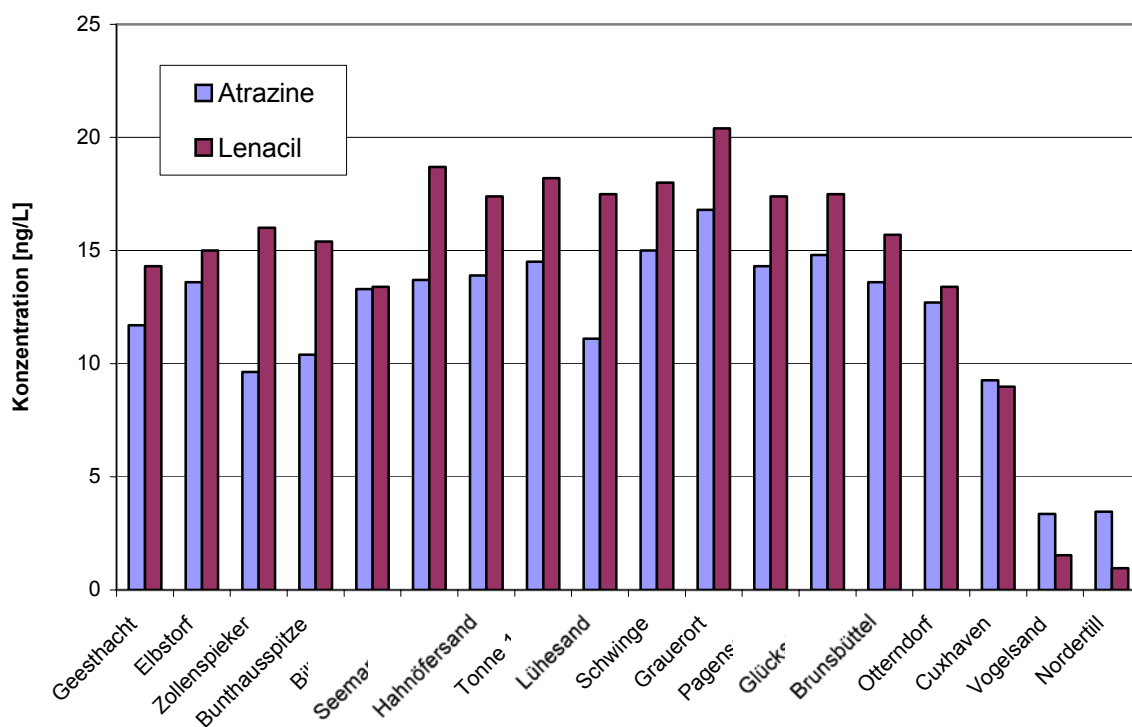


Abb. 2.2.3: Mittels LC-MS/MS ermittelter Konzentrationsverlauf von Atrazin und Lenacil als Beispiel für zwei photosynthesehemmende Liganden in der Unterelbe (oberes Bild) und der jährliche Konzentrationsverlauf in der Elbe bei Geesthacht (unteres Bild).

2.2.2 Analytik von D1-Proteinen

Für die massenspektrometrische Charakterisierung der D1-Proteine wurde ein Flugzeit-Massenspektrometer (TOF-MS) eingesetzt. Die Eignung solcher Geräte für exakte Massenbestimmungen im Bereich der Molekülmassen von D1-Proteinen (ca. 38 kDa) geht auf das hohe Auflösungsvermögen von bis zu ca. 10.000 zurück. Hierdurch wird eine exakte Massenbestimmung und somit Charakterisierung von D1-Proteinen unterschiedlicher Pflanzen ermöglicht. Chemisch/physikalische Modifikationen, Mutationen oder Alterungen der D1-Proteine während der Aufarbeitung und Lagerung können ebenfalls erfasst werden.

Die Entwicklung und Optimierung der massenspektrometrischen Messtechnik und der chromatographischen Bedingungen erfolgte hinsichtlich Performance der Chromatographie und Intensität der Messsignale zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit für zwei unterschiedliche Anwendungsbereiche. Zum einen war es notwendig, bereits durch ein LC-System fraktionierte Proben von Thylakoid- und PSII-Extrakten zu vermessen (s. Kap. 2.1.2.1). Daneben mussten Thylakoid- und PSII-Gesamtextrakte vermessen werden, die zuvor noch nicht fraktioniert wurden. Um diese Proben ebenfalls der Messung zuzuführen, war eine HPLC Trennung erforderlich. Durch diesen Schritt werden interferierende Begleitstoffe abgetrennt, die ansonsten die Messung beeinträchtigen (s. Kap. 2.1.2.2).

In beiden Fällen bedurfte es einer Miniaturisierung der Ionenquelle, da die Isolierung von Proteinen im Labormaßstab meist nur sehr geringe Probemengen ergibt (häufig im Bereich von wenigen pmol). Um bei derartig geringen Probemengen eine hinreichende Messempfindlichkeit zu erreichen, bedurfte es der Verwendung einer miniaturisierten Ionenquelle. Dies konnte durch die Verwendung einer Nano-Elektrospray Ionenquelle (Nano-ESI) erreicht werden.

Die Verwendung der Nano-ESI erfordert ebenfalls die Miniaturisierung des Chromatographischen Systems (Nano-LC), auch in diesem Fall mit dem Ziel bei geringsten Probemengen eine maximale Empfindlichkeit zu erreichen. Hierzu erfolgten umfangreiche Recherchen, welches Nano-LC System die bestmöglichen Voraussetzungen für eine leistungsfähige apparative Anbindung an das bestehende TOF-Massenspektrometer bietet. Entscheidende Kriterien für die Auswahl waren:

- ⇒ Die Möglichkeit einer Probenvoranreicherung auf einer Vorsäule infolge der geringen Probenmenge.
- ⇒ Die Möglichkeit, auf der Vorsäule angereicherte Proben in einem Spülschritt von organischen Co-Solventien, anorganischen Salzen und sonstigen Verbindungen (entsprechend den angewandten Extraktionsvorschriften) zu befreien, die zu Signal-Suppressionen oder zum völligen Ausbleiben von Messsignalen führen können.

Sämtliche zuvor beschriebene Anforderungen an die chromatographischen Bedingungen konnten in einer Gerätezusammenstellung der Firma Agilent realisiert werden. Es handelte sich um eine LC der Serie 1100 bestehend aus Nano-Pumpe (G2226A) mit Entgaser, Kapillar-Pumpe (G1376A) mit Entgaser, Multi-Wellplate-Autosampler (G1377A) mit Thermostat (G1330B), Säulenofen mit Schaltventil (G1316A) und UV/VIS-Detektor (G1315A). Alle Bau- und Geräteteile wurden auf Flussraten im Bereich von ca. 250 nL/min hin optimiert.

2.2.2.1 Messungen von Proteinen im Off-Line Nano-ESI-TOF Modus

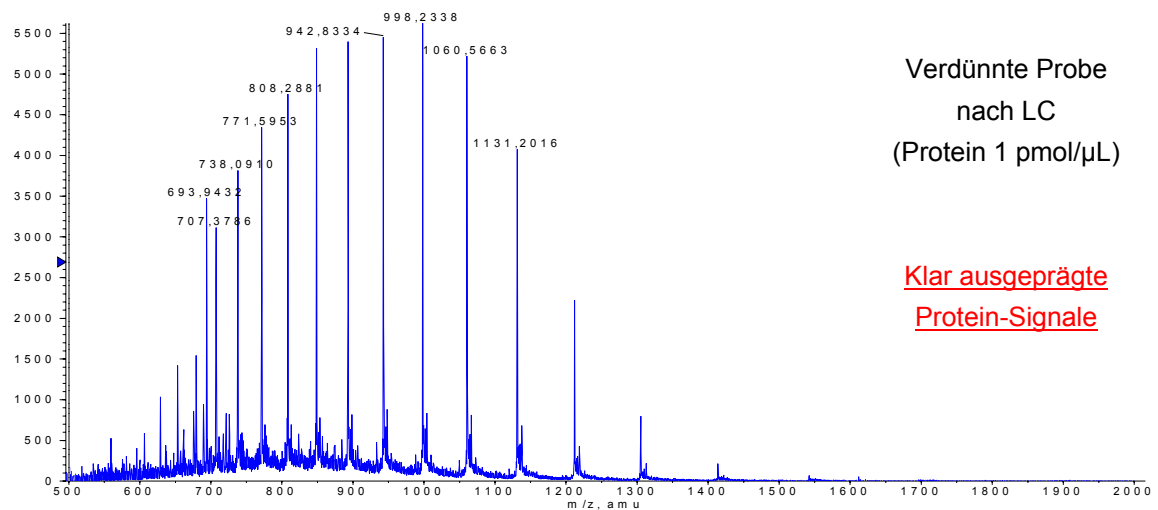
Bei Messungen mittels LC-MS kann es durch gelöste anorganische Salze, Puffer, organische Co-Solventien, extrahierte Matrixbestandteile u.a. Verbindungen zu Signal-Suppressionen kommen, die bis zum vollständigen Ausbleiben der Messsignale führen können. Um im Rahmen der Aufarbeitung von Pflanzenextrakten eine Beurteilung der Fraktionierung und der Reinheit der einzelnen LC-Fraktionen treffen zu können, müssen daher Messbedingungen bestehen, die einen weitestgehend ungestörten Nachweis ermöglichen. Durch die Zugabe einer definierten Menge an Protein-Standard (Myoglobin, ca. 17 kDa, in einer Konzentration der Messlösung von 1 pmol/ μ L) zu den entsprechenden Proben wurden im Rahmen der Qualitätssicherung beständig die Messbedingungen auf Suppressionseffekte hin überprüft.

Massenspektren von solchen Protein-dotierten Extrakte sind in Abbildung 2.2-4 dargestellt. Die besten Messbedingungen für LC-Fraktionen ließen sich bei einer Verdünnung der Probe um den Faktor 10 erhalten, wie aus dem oberen Bild deutlich wird. Es zeigt ein für Proteine typisches (weitestgehend ungestörtes) Signalmuster, das durch unterschiedlich geladene Moleküle derselben Spezies hervorgerufen wird. Die Nachweisgrenze für dieses Protein wurde unter diesen Bedingung bei ca. 500 fmol/ μ L ermittelt (10-faches Signal zu Rausch-Verhältnis). Bleibt die Probe dagegen unverdünnt, kommt es infolge von Addukt-Bildungen zu einer Verminderung der Signal-Intensität (mittleres Bild). Zum völligen Ausbleiben der Protein-Signale führte es, wenn ein Gesamtextrakt ohne vorherige Fraktionierung gemessen wird (unteres Bild). In diesem Fall waren nur die Massen der dominierenden Co-Solventien sichtbar.

Im Rahmen des Projektes wurden LC-Fraktionen von PSII- und Thylakoid-Extrakten folgender Proben gemessen: CEL1, CEL2+, CSL6 (Fraktionen 24 - 38), CSL4+ (Fraktionen 8 - 61), PSII1, PSII5 (Fraktionen 32 - 35) und PSII14 (Fraktionen 1 - 87). D1-Proteine ließen sich in diesen Proben jedoch nicht nachweisen, möglicherweise infolge von zu geringen Konzentrationen oder Adsorptionseffekten während der Aufarbeitung oder Fraktionierung. Eine Übersicht der gemessenen Probe findet sich zudem in Tabelle 2.2-6.

+TOF MS: 50 MCA scans from Sample 5 (PSII5(unfiltr_F35+Myoglobin (1 pmol/yL)) of PSII_Q...

Max. 2,7e4 counts.

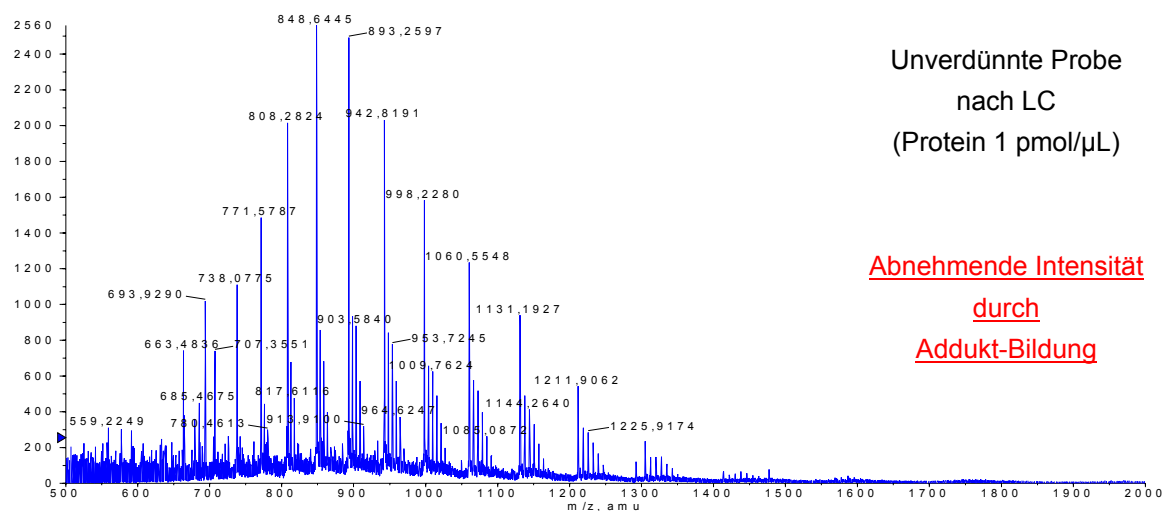


Verdünnte Probe
nach LC
(Protein 1 pmol/ μ L)

Klar ausgeprägte
Protein-Signale

+TOF MS: 50 MCA scans from Sample 10 (Faktion 35 unverdünnt + Myoglobin (1 pmol/yL)) ...

Max. 2560,0 counts.

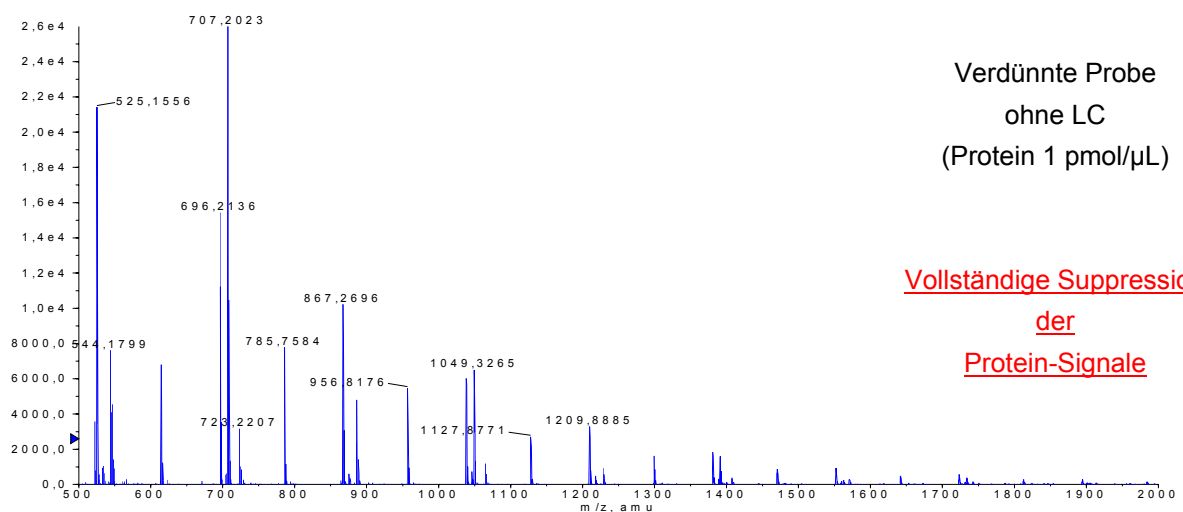


Unverdünnte Probe
nach LC
(Protein 1 pmol/ μ L)

Abnehmende Intensität
durch
Addukt-Bildung

+TOF MS: 50 MCA scans from Sample 5 (PSII3 (Erbse), verd. + Myoglobin (1 pmol/yL)) of PSII...

Max. 2,6e4 counts.



Verdünnte Probe
ohne LC
(Protein 1 pmol/ μ L)

Vollständige Suppression
der
Protein-Signale

Abb. 2.2.4: Spektren von Protein-dotierten Extrakten im Off-line Nano-ESI-TOF Modus.

Tabelle 2.2-6 LC-Fraktionen unterschiedlicher Thylakoid- und PSII-Extrakte, die Off-line mittels Nano-ESI-TOF vermessen wurden.

PS II 1	PS II 1	PS II 5	PS II 5	CEL 1	CEL2+	CSL 4+	CSL 6
9	1	4	7	7	8	8	7
10	2	5	8	8	9	9	8
11	3	6	9	9	10	10	9
12	4	7	10	10	11	11	10
13	5	8	11	11	12	12	11
14	6	9	12	12	13	13	12
15	8	10	13	23	14	14	13
16	9	11	14	24	15	20	24
17	10	12	15	26	24	21	25
19	11	13	16	37	25	22	26
21	12	14	21	38	37	23	36
22	13	15	22	42	38	24	37
23	14	22	23	43	39	26	38
24	15	23	25	44	40	27	39
25	21	24	26	45	42	28	40
34	22	25	27	46	43	29	41
35	23	26	28	47	44	30	42
36	24	31	29	48	45	35	43
37	32	32	30	49	46	36	44
38	35	33	31	50	47	37	45
39	36	34	32	51	48	38	46
40	37	35	33	52	49	39	47
	38	36	34	53	50	40	48
	71	37	35	54	51	41	49
	72	38	37	55	52	42	50
	74	44	38	56	53	43	51
		45	40	57	54	44	52
				58	55	45	53
				59	56	46	54
				60	57	47	55
					58	48	58
					59	49	59
					60	50	60
					61	51	61
					62	52	
						53	
						54	
						55	
						56	
						57	
						58	
						59	
						60	
						61	

2.2.2.2 Messung von Proteinen mittels zweidimensionaler Nano-LC-ESI-TOF

Eine direkte Messung von nicht fraktionierten PSII- oder Thylakoidextrakten mittels Massenspektrometrie war nicht möglich (Kapitel 2.2.2.1, Abb. 2.2-4, unteres Bild). Aus diesem Grund wurde das Massenspektrometer mit einem LC-System gekoppelt. Hierbei wurde eine Nano-LC verwendet, um bei geringsten Probemengen eine maximale Empfindlichkeit zu erreichen. Zudem wurde bei dem bestehenden System eine Vorsäule integriert, die es ermöglicht, Proben anzureichern und in einem Spülschritt von organischen Co-Solventien, anorganischen Salzen und sonstigen Verbindungen zu befreien, die andernfalls zu Signal-Suppressionen oder zum völligen Ausbleiben von Messsignalen führen können.

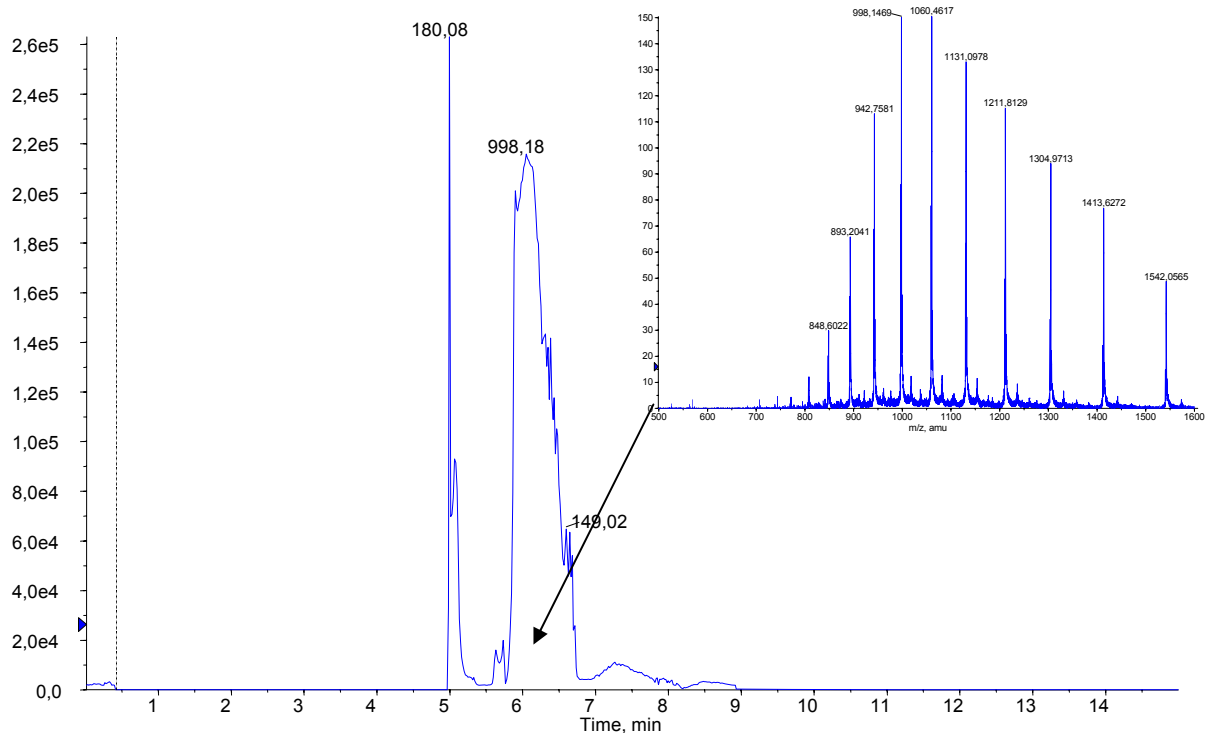
Um aus unterschiedlichen Aufbereitungsverfahren hervorgegangene Thylakoid- und PSII-Extrakte vermessen zu können, bedurfte es verschiedener Optimierungsschritte der Nano-LC. Zu diesen Schritten zählten (1) apparative Modifikationen der LC zur Verringerung von Totvolumina, (2) Anreicherung und Spülung der D1-Proteine auf der Vorsäule und (3) die Chromatographie der Proteine auf der Trennsäule.

Apparative Modifikationen. Hierzu zählte die Installation von Filtersystemen zum Schutz vor Partikeln, die Reduktion von Totvolumina durch den Austausch und Ausbau vermeidbarer Bestandteile und die Entwicklung eines Interfaces, das ein stabiles Ionen-Spray im Nano-Flow ermöglichte und zudem erlaubte, während der Messung von Proben kontinuierlich Kalibrierlösung einzuspeisen.

Anreicherung auf der Vorsäule. Hier waren Dauer, Flussrate und Lösemittelzusammensetzung zu optimieren sowie die Beladbarkeit der Vorsäule zu optimieren. Versuche mit einer Protein-dotierten Realprobe haben gezeigt, dass eine Beladung der Vorsäule mit dem maximalen Injektionsvolumen von 8 μL möglich war, was für eine für eine Empfindlichkeitssteigerung wichtig ist. Als Dauer für die Beladung der Vorsäule hat sich bei einem Fluss von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ die Zeit von 4 – 6 min als ausreichend erwiesen, um die in der Probe enthaltenen Co-Solventien vom Protein abzutrennen, wie aus Abbildung 2.2-5 (oberes Bild) hervorgeht. Eine Beladungsdauer von 2 min dagegen war zu kurz und führte zu einer beständigen Kontamination über die gesamte Dauer des Chromatogramms (Abb. 2.2-5, unteres Bild). Infolge der hohen Salz- und Pufferkonzentration ergab sich ein instabiles Spray, was sich ebenfalls nachteilig auf die Nachweisempfindlichkeit auswirkt.

Chromatographie. Erste Versuche zur Chromatographie erfolgten mit einer C-8 Phase der Fa. Agilent (75 μm x 10 cm, ID x L). Neben Fragen der chromatographischen Bedingungen ging es im wesentlichen um die Ermittlung der Empfindlichkeit bei der Messung von Proteinen. Eng verbunden damit war die Frage, ob an der bestehenden Nano-LC Anlage mit Adsorptionseffekten für Proteine zu rechnen war. Daher wurden unterschiedliche Mengen eines Myoglobin Standards (Konzentration 5 pmol/ μL) auf der Vorsäule angereichert und über die C-8 Phase chromatographiert. Die Injektion von 0,25 μL dieses Standards führte zum dem in Abb. 2.2-6 gezeigten Chromatogramm (1,25 pmol Protein absolut), aus dem deutlich wird, dass auch mit geringeren Mengen an Protein ausreichende Signalintensität im fmol-Bereich zu erreichen ist. Mit der Nano-LC konnte also eine Messempfindlichkeit realisiert werden, die in guter Übereinstimmung mit der zuvor genannten Bestimmung von 500 fmol/ μL steht, die sich für den off line Nano-ESI-MS Modus erzielen ließ.

TIC of +TOF MS: from Sample 5 (CSL6+ Myo (1:1)) of 040301b.wiff



TIC of +TOF MS: from Sample 6 (CSL6+ Myo (1:1)) of 040301b.wiff

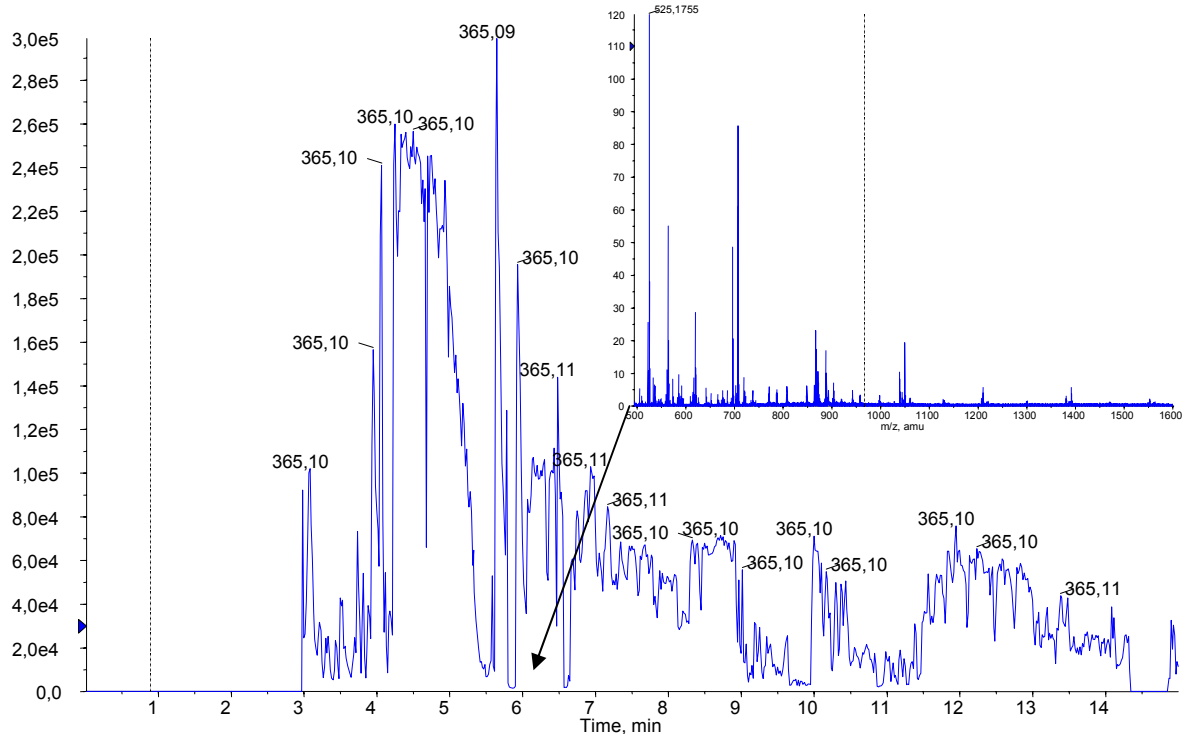
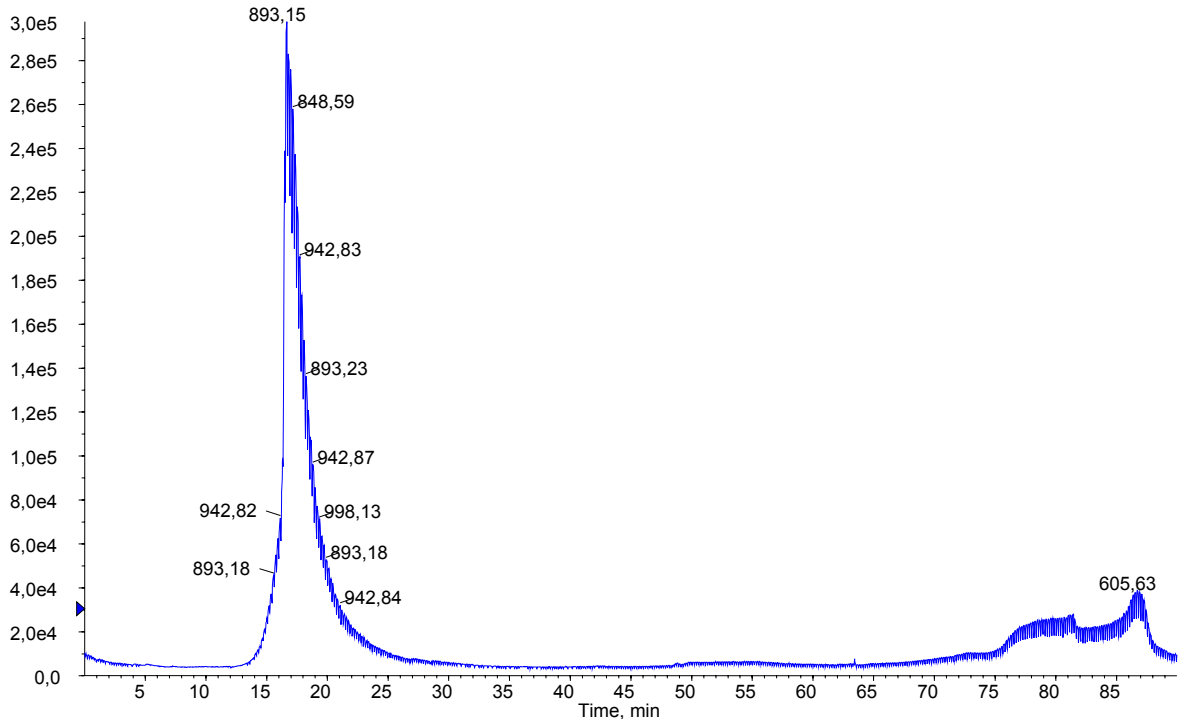


Abb. 2.2.5: Einfluss der Beladungs- und Spüldauer auf Chromatogramm und spektrale Reinheit, oben Spülzeit von 4 min, unten Spülzeit von 2 min.

TIC of +TOF MS: from Sample 10 (Apo 06 0.25 μ L) of 040408.wiff, Smoothed

Max. 3,0e5 cps.



+TOF MS: 16,898 to 17,182 min from Sample 10 (Apo 06 0.25 μ L) of 040408.wiff

Max. 76,1 counts.

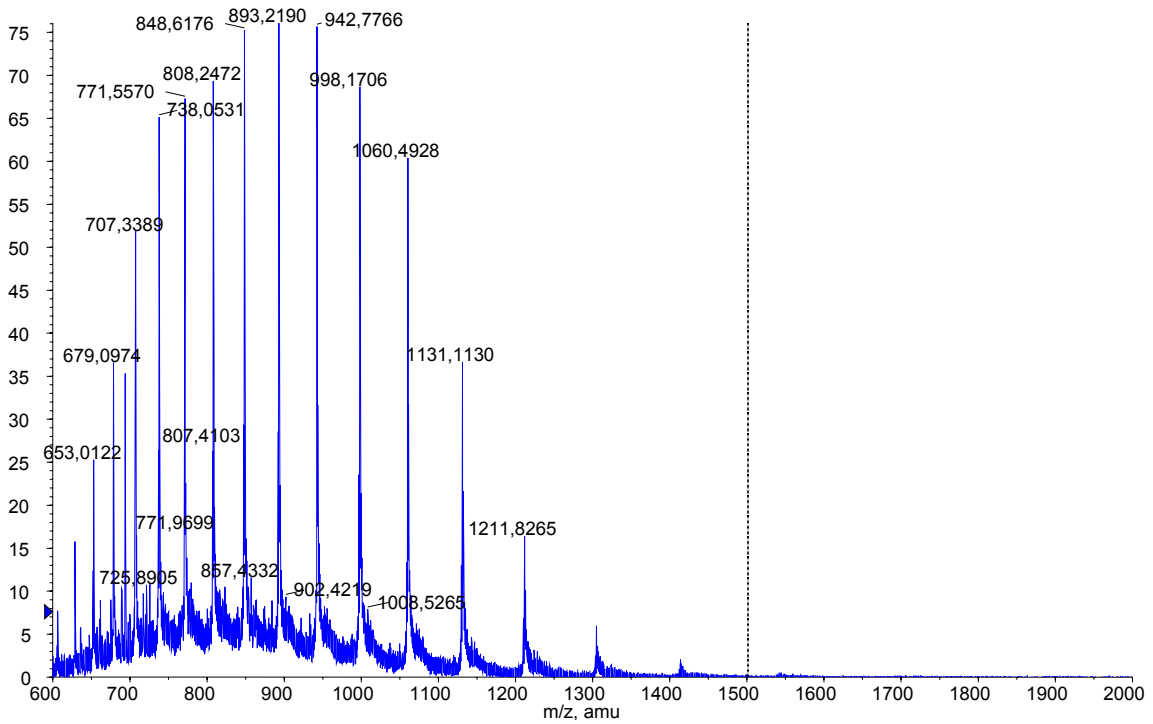


Abb. 2.2.6: Chromatogramm (oben) und Massenspektrum von Myoglobin (unten) nach Anreicherung und zweidimensionaler Chromatographie mittels Nano-LC über eine C-8 Phase.

Auswahl der Trennsäule. Zur Beurteilung der chromatographischen Performance wurden Säulen verschiedenster Packungsmaterialien und unterschiedlicher Säulendimensionen getestet. Eine Übersicht dieser Säulen findet sich in Tabelle 2.2-7.

Tabelle 2.2-7 Charakteristika der unterschiedlicher getesteten LC-Säulen.

Säule	Packung	Dimension	Partikelcharakt.	Hersteller
Vydac	C-18	75 µm x 150 mm	5 µm, 300 A	Dionex
Monolytic	PS-DVB	200 µm x 50 mm	k.A.	Dionex
Zorbax SB	C-18	500 µm x 150 mm	5 µm, 300 A	Agilent
Zorbax 300 SB	C-8	75 µm x 150 mm	3,5 µm, 300 A	Agilent
Jupiter	C-4	300 µm x 150 mm	5 µm, 300 A	Phenomenex

Bei der Auswahl einer zur Proteintrennung geeigneten Säule zeigte sich, dass nicht alle Säulen in den für die Nano-LC typischen Dimensionen erhältlich waren. Es wurden daher auch Kapillar-Säulen in die Untersuchung einbezogen. Kapillar-Säulen besitzen infolge der größeren Säulendimensionen gegenüber Nano-Säulen (300 µm vs 70 µm Innendurchmesser) eine geringere Nachweisempfindlichkeit. Dies ließ sich jedoch durch ein deutlich größeres Aufgabevolumen (bis zu 40 µL) an Probe kompensieren. Anders als in der Nano-LC konnte somit auf eine Anreicherungssäule verzichtet werden, was die Methodik vereinfachte und die Chromatographie erheblich schneller werden ließ. Ein Entsalzen der Probe und die Trennung von weiteren organischen Co-Solventien wurde dabei durch Anfangsgradienten mit einem hohen Wassergehalt zu Beginn der chromatographischen Läufe erreicht. Die Probe wurde dabei auf der Säule retardiert, während Salze, Puffer und andere Lösevermittler die Säule passierten. Mit steigendem Gehalt an organischen Lösemitteln wurden anschließend die Proteine eluiert. Der Nachteil gegenüber der zweidimensionalen LC besteht allerdings darin, dass auch Salze, Puffer und Lösevermittler dem Massenspektrometer zugeführt werden. Demgegenüber stand jedoch der Vorteil von höheren Flussraten und somit kürzen Analysezeiten.

Die vergleichende Messung eines PSII-Extraktes (PSII 35B*) auf drei der in Tabelle 2.2-7 vorgestellten Säulen ist in Abbildung 2.2-7 dargestellt. Aus den Chromatogrammen ist ersichtlich, dass sich die beste Auflösung mit der Jupiter-Säule erzielen ließ, während die Monolytic- und die Zorbax-Säule eine erheblich schlechtere chromatographische Leistung zeigten. In Tabelle 2.2-8 sind die Proteine zusammengefasst, die sich mit den jeweiligen Trennsäulen nachweisen ließen.

Während die Jupiter C-4 Säule den Nachweis von 17 Proteinen erlaubte, ließen sich mit der Zorbax SB C-18 Säule drei und mit der Monolytic PS-DVB vier Proteine messen. Mögliche Ursachen für das Ausbleiben der Proteine auf diesen beiden Säulen könnten in einer irreversiblen Adsorption von Proteinen in der Säule liegen oder aber auf Signal-Suppressionen zurückgehen, die ihrerseits durch koeluiierende Substanzen bedingt wurden.

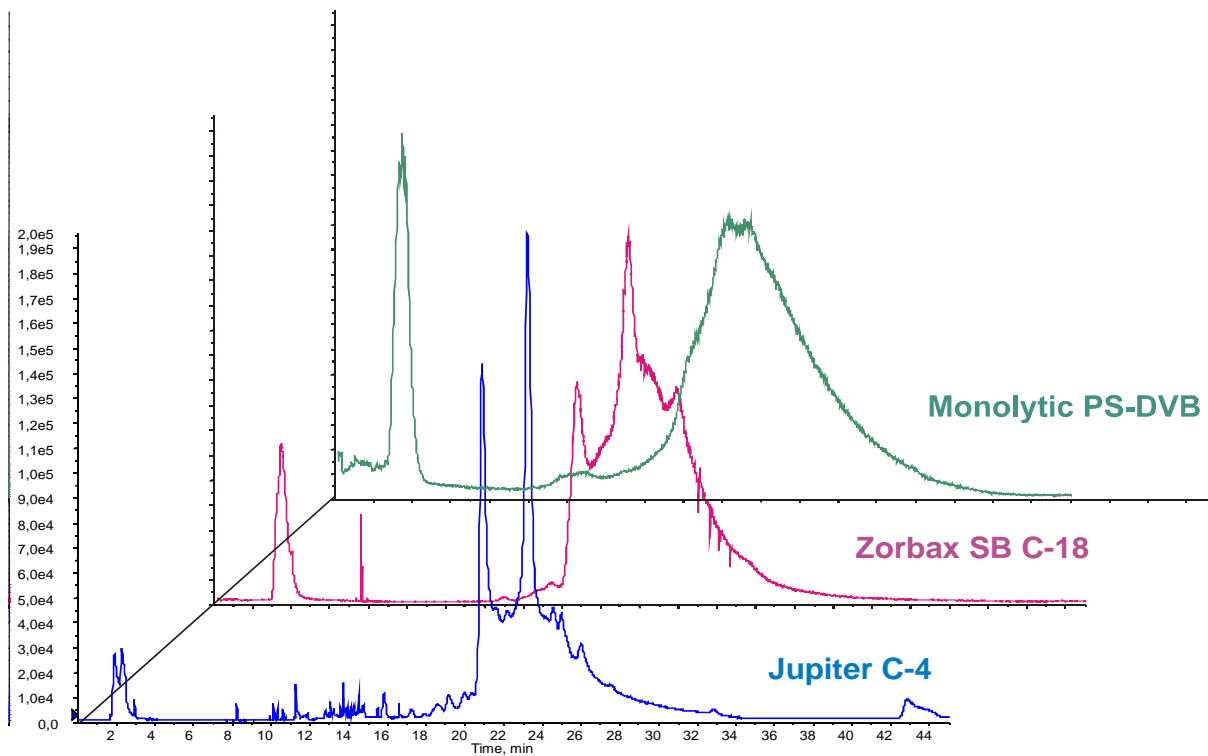


Abb. 2.2.7: Vergleichende Messung eines PSII-Extraktes auf verschiedenen Trennsäulen.

Tabelle 2.2-8 Mit unterschiedlichen Säulen nachgewiesene Proteine in einem PSII-Extrakt.

Jupiter C-4		Zorbax SB C-18		Monolytic PS-DVB	
Rt [min]	Masse [Da]	Rt [min]	Masse [Da]	Rt [min]	Masse [Da]
14,28	3485	12,90	3185	24,80	26541
15,83	3187	12,90	3487	24,80	20279
17,23	10031	20,43	26542	28,35	35099
17,23	8814			31,65	52887
19,15	29323				
19,98	8165				
19,98	8921				
20,35	26557				
20,88	26540				
20,88	20279				
21,62	18455				
21,62	18668				
23,23	35098				
24,57	27152				
24,98	13472				
26,02	32000				
32,84	9882				

Nachweisempfindlichkeit. Die Optimierung und Ermittlung der Nachweisempfindlichkeit erfolgte mit Hilfe eines Proteins, das in zwei wichtigen chemisch-physikalischen Eigenschaften in enger Übereinstimmung mit denen des nachzuweisenden D1-Protein steht. Bei diesen Eigenschaften handelt es sich um den isoelektrischen Punkt (pI) und die Molekülmasse (MW). Als ein Protein, das für diese Zwecke in Frage kommt, wurde Recombinase A (Sigma Aldrich) gewählt. Zu den Eigenschaften dieser Proteine siehe Tabelle 2.2-9.

Tabelle 2.2-9 Eigenschaften von D1-Protein und Recombinase A (Quelle SwissProt)

Protein	MW [Da]	pI
D1-Protein (Spinat)	37978	5,21
Recombinase A	37842	5,09

Ein Chromatogramm und ein Massenspektrum von Recombinase A ist in Abbildung 2.2-8 dargestellt. Die Konzentration der gemessenen Lösung betrug 1 pmol/μL, das Injektionsvolumen lag bei 5 μL. Ein Signal/Rauschverhältnis im Massenspektrum von ca. 20 lässt erkennen, das sich die Konzentration der Proteine problemlos bis in den mittleren **fmol/μL-Bereich** verringern ließen. Durch ein Erhöhen des Injektionsvolumen auf 8 μL lässt sich die Nachweisgrenze ebenfalls noch weiter herabsetzen.

Die Deconvolution der Molekülmasse aus dem Massenspektrum ergab **37845,5 +/- 0,2 Da**, was in exakter Übereinstimmung mit Literaturangaben steht. Die bestehende Messanordnung erlaubt somit die Charakterisierung von Proteinen im Massenbereich des D1-Proteins mit hoher Präzision bei zugleich überaus geringen Protein-Konzentrationen.

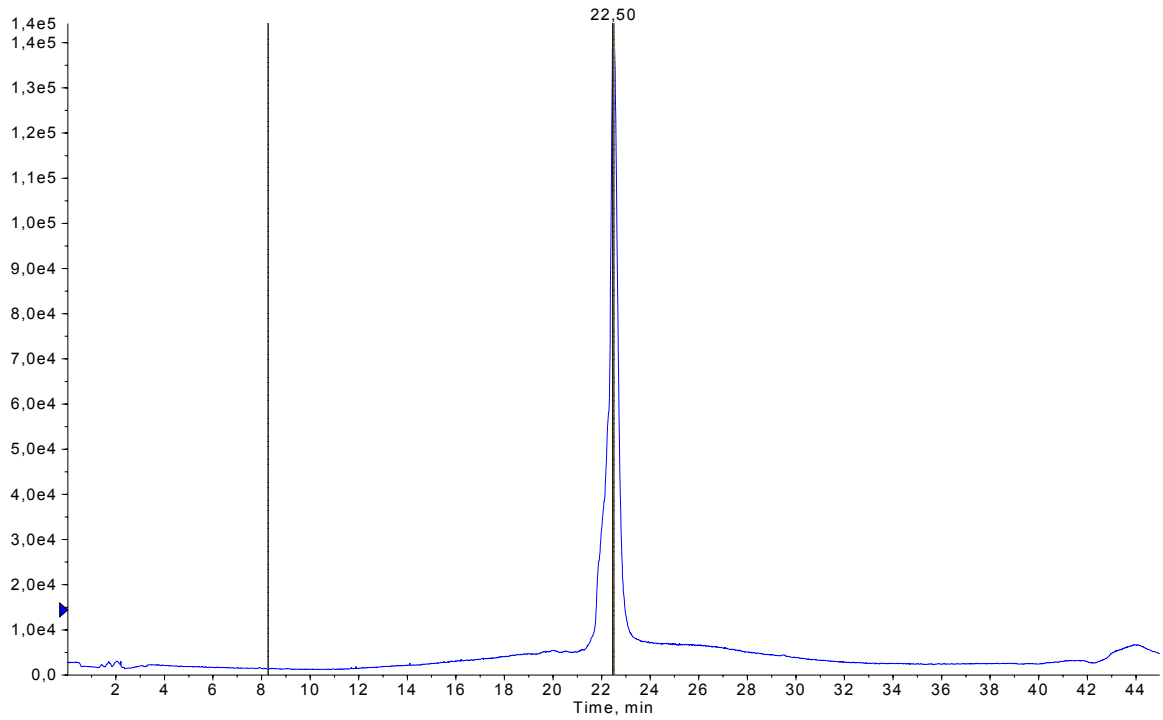
Die Messbedingungen, mittels derer alle nachfolgenden Untersuchungen durchgeführt wurden, sind im Folgenden zusammengefasst:

HPLC: Agilent 1100 Series, Injektion 5 bis 40 μL, Temperatur 4 °C
 Gradient: Lösemittel A Acetonitril, B Wasser, 0,1 % Trifluoressigsäure
 3 min A:B (5:95), in 27 min auf A:B (95:5), von 30 bis 38 min A:B (95:5),
 bis 45 min A:B (5:95), Fluss 10 μL/min
 Säule: Jupiter C4, 5 μm, 300 Å, 150 x 0,32 mm (Phenomenex)
 Detektor: QSTAR Pulsar i (Applied Biosystems/MSD Sciesx, Darmstadt, Deutschland)
 TOF-Scan Modus positiv, Massenbereich 500 – 2000 amu
 Ionisierungsenergie 5000 V, Declustering Potential 35, Focusing Potential 240
 Nebulizer Gas 40 psi, Curtain Gas 40 psi
 Software Analyst QS

Einzelheiten zu den Messbedingungen des Massenspektrometers finden sich in der nachfolgenden Tabelle 2.2-10.

TIC of +TOF MS: from 041013_02.wiff

Max. 1,4e5 cps.



+TOF MS: 22,468 to 22,551 min from 041013_02.wiff

Max. 56,3 counts.

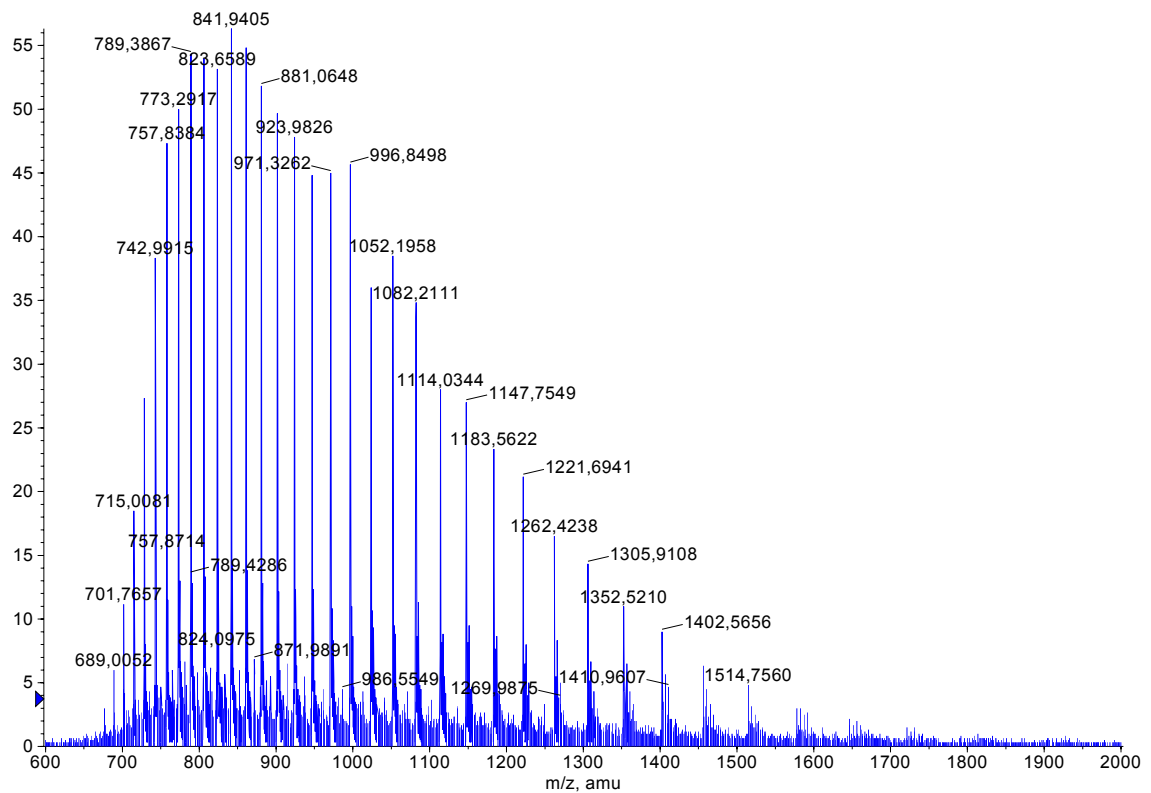


Abb. 2.2.8: Chromatogramm (oben) und Massenspektrum (unten) eines 38 kDa Proteins.

Tabelle 2.2-10 Aufnahmeparameter des Massenspektrometers QSTAR Pulsar i.

L o g In fo r m at io n	Mass Spectrometer: Config Table Ver: Firmware Ver: Component Name: Component ID: Manufacturer: Model: S/N: Software Version:	API QStar Pulsar i 00 M401300 B4T0301 M3L1303 B3T0300 Hybrid Quadrupole-TOF LC/MS/MS Mass API QStar Pulsar PE Sciex Instruments 026026 -7 K0420012 Analyst QS
A c q ui si ti o n In fo	Duration: Number Of Scans Acquired: Periods In File: Synchronization Mode: Auto-Equilibration: Sample Name: Sample ID: Comments:	45min0sec 2700 1 No Sync Off PSII 9B+, Lauf 1 TuneSampleID TFA5_95A.M, Inj 8 yL, Jup. C4, S5
A c q ui si ti o n P ar a m et er s	Duration: Cycle Time: # Cycles: Period Delay: Scan Mode: Scan Type: Intensity Thres.: Settling Time: MR Pause: MCA: GS1 (Nebulizer gas): GS2: CUR (Curtain gas): IS (Ionisierungsspannung [V]): TOF Masses (amu): Accumulation Time (sec): Pulser Frequency (kHz): Pulse 1 Duration (us): Time Bins to Sum: Channels: Q1 Mass (amu):	45.003 mins 1.0001 secs 2700 0.00 secs None Positive TOF MS 1 counts 0.000 ms 5.007 ms No 30.00 0.00 40.00 5000.00 Min = 500.000 Max = 2000.0000 1.0001 6.991 13 1 1 2 3 4 480

	% Time:	100
	Declusteringpotential 1 (DP):	35.00
	Focusingpotential (FP):	240.00
	Declusteringpotential 2 DP2):	15.00
	Gas f. Collision Activated Dissociation (CAD):	3.00
	Ion Release Delay (IRD):	6.00
	Ion Release Width (IRW):	5.00
R	Quad 1	Positive, Unit Resolution
e	Last Modification Date Time:	April 15, 2002 14:30:07
s	Ion energy 1 (IE1)	2.000
o	Collision cell rod offset (R02):	10.000
l	Grid voltage (GR):	-15.000
u	Einzel lens focusing voltage(TFO):	0.700
t	Einzel lens steering voltage (TST):	0.400
i		
n		
T		
a	Mass (amu)	Offset Value
b	59.050	0.045
e	175.133	0.110
s	906.673	0.440
	2010.469	0.933
C	Quad 1	Positive, Unit Resolution
a	Last Modification Date Time:	September 18, 2002 16:49:48
i		
r	Mass (amu)	Dac Value
a	59.050	1100
t	175.133	3307
i	906.673	17230
o	2010.469	38236
n	2997.182	57028
T		
a		
b	Polarity	Slope
e	Positive:	3.559030945626493500e-004
s	Negative:	3.559057934034819100e-004

2.2.2.3 Messung von Proteinen in Extrakten unterschiedlicher Pflanzenspezies

Tabelle 2.2-11 enthält eine Übersicht der Pflanzenextrakte (Erbse, Bohne, Kopfsalat), die vom IMBIO aufgearbeitet und von GKSS gemessen wurden. Zu den Bedingungen der Aufarbeitung und der biologischen Charakterisierung der Extrakte mittels weiterer Verfahren siehe Kapitel 2.1. Eine Zusammenfassung der in diesen Extrakten gemessenen Proteine ist in Tabelle 2.2-12 enthalten, dargestellt jeweils exemplarisch für eine Probe jeder Pflanzenspezies. Zusätzlich enthalten ist in dieser Tabelle eine Zuordnung der ermittelten Proteine zu bekannten Untereinheiten des Photosynthesesystems I und II (PSI und PSII). Basis für die Zuordnung dieser Untereinheiten waren aus der Literatur entnommene Molekülmassen (Barber, 2003; Huber et al., 2004; Piletskaya et al., 1999a; Zolla et al., 2000). Die mit Psa A bis X bezeichneten Proteine stellen Untereinheiten des PSI, die mit Psb A bis X benannten Proteine stellen Untereinheiten des PSII dar. Bei den Bezeichnungen Lhca und Lhcb handelt es sich um Antennenproteine des PSI und PSII.

Tabelle 2.2-11 Übersicht der mittels LC-QTOF gemessenen Pflanzenextrakte.

Probe	Spezies	Probe	Spezies
PSII 6+	Spinat	THYL 36 E1	Erbse
PSII 7	Spinat	THYL 36 E1L	Erbse
CEL 1	Erbse	PSII 8	Bohne
PSII 3	Erbse	PSII 9B+	Bohne
PSII 4	Erbse	PSII 35 B*	Bohne
PSII 5	Erbse	PSII 37 B*	Bohne
PSII 12E	Erbse	PSII 37 BL*	Bohne
PSII 13E	Erbse	PSII 39 B*	Bohne
PSII 31 E2*	Erbse	PSII 39 BL*	Bohne
PSII 31 E2L*	Erbse	PSII 59 B	Bohne
PSII 32 E2*	Erbse	THYL 37 BL	Bohne
PSII 33 E1*	Erbse	THYL 35 B	Bohne
PSII 33 E2*	Erbse	THYL 37 B	Bohne
PSII 36 E1*	Erbse	PSII 14K	Kopfsalat
PSII 36 E1L*	Erbse	PSII 34 K*	Kopfsalat
PSII 38 E1*	Erbse	PSII 42 KW*	Kopfsalat
PSII 43 E1T*	Erbse	PSII 42 KT*	Kopfsalat
PSII 43 E1W*	Erbse	PSII 61 KC	Kopfsalat
PSII 60 E1	Erbse		

Abbildung 2.2-9 enthält die Chromatogramme der untersuchten Pflanzenextrakte. Dargestellt sind die zeitlichen Ausschnitte, in denen Proteine eluiert wurden, wiederum exemplarisch für jeweils eine Probe jeder Pflanzenspezies. Zudem sind die Massen der nachgewiesenen Proteine enthalten. Unterstrichen sind im Falle von Koelutionen die Massen derjenigen Proteine, die in höheren Konzentrationen vorlagen.

Tabelle 2.2-12 **Ermittelte Massen und identifizierte Proteine in Extrakten unterschiedlicher Spezies (Erbsen, Bohne, Kopfsalat).**

PS II 36 E1			PS II 37 BL			PS II 42 KT		
Rt [min]	Masse [Da]	Identif.	Rt [min]	Masse [Da]	Identif.	Rt [min]	Masse [Da]	Identif.
14,19	3485		14,18	3485		14,88	3450	
15,90	3187	Psb X	15,78	3187	Psb X	18,92	10320	
17,13	9824	M	17,15	8814	Psa C	19,48	10320	K
17,13	9894	Psa E	17,15	10031	K	19,48	15182	K
18,85	30272		18,53	28500		20,15	10319	K
19,85	17922	Psa D	19,02	29324		20,15	20094	K
20,35	26539	Psb O	19,78	8923		20,15	26409	Psb O
20,88	26524		20,70	20279	K	20,15	26444	+M
21,30	20215		20,70	26540	Psb O	21,18	10320	K
22,13	16102	+M	21,42	18457	+M	21,18	17388	K
22,92	11320	+M	21,98	16133	+M	21,18	19457	K
23,23	14706	+M	22,70	11320	+M	22,48	10319	K
23,23	34797	K	23,05	15966	K	22,48	34938	K
24,12	15807	+M	23,05	35098	K	23,78	27771	
24,70	15181	+M	23,58	15880	+M	25,05	13753	K
24,88	13399	+M	24,40	27152		25,05	31892	K
			24,62	13472	K			
			24,62	15181	+M			
	+M	Modifikationen			K		Koelutionen	

Erkennbar ist, dass alle Chromatogramme im wesentlichen von zwei Peaks dominiert werden. Der ersten Peak mit Retentionszeiten von 20,2 min bis 20,9 min wird durch ein Protein ausgemacht, das im Fall der Erbse eine Masse von 26524 Da, bei der Bohne 26540 Da und beim Kopfsalat 26408 Da besitzt. Es wurde davon ausgegangen, dass es sich um das Protein Psb O handelt, welches zur Stabilisierung des Mangangehaltes im PS II verantwortlich ist.

Der zweite Peak mit Retentionszeiten von ca. 22,5 bis 23,2 min wird durch ein Protein verursacht, das die Masse von 34797 Da (Erbsen), 35098 Da (Bohne) und 34938 Da (Kopfsalat) besitzt. Extrakte, in denen dieses 35 kDa Protein nachweisbar war, zeigten eine positive Reaktionen mit D1-Antikörpern in Western-Blots und in einigen Fällen zudem eine positive Bindungsreaktion im Biacore (siehe Kapitel 2.1).

Es wird daher vermutet, dass es sich um Teilstrukturen der D1-Proteine aus den entsprechenden Pflanzen handelt. In der Literatur wird im Fall von Spinat für den Precursor des D1 Proteins, bestehend aus 352 Aminosäuren, eine mittlere Masse von 38819 Da genannt (SwissProt Eintrags-Nr. P69560). Nach Studien von Whitelegge et al. (1998b) kommt es bei der Isolierung des D1-Proteins zur Abspaltung von 9 Aminosäuren vom Precursor. Nach einer Acetylierung bleibt das D1-Protein mit 243 Aminosäuren und einer mittleren Masse von 38022 Da zurück. Die Differenz zwischen theoretischer Masse des D1-

Proteins und der hier ermittelte Masse von 35 kDa könnte durch eine zusätzliche oder andere als in der Literatur beschriebene Bindungsspaltung des Precursors entstanden sein.

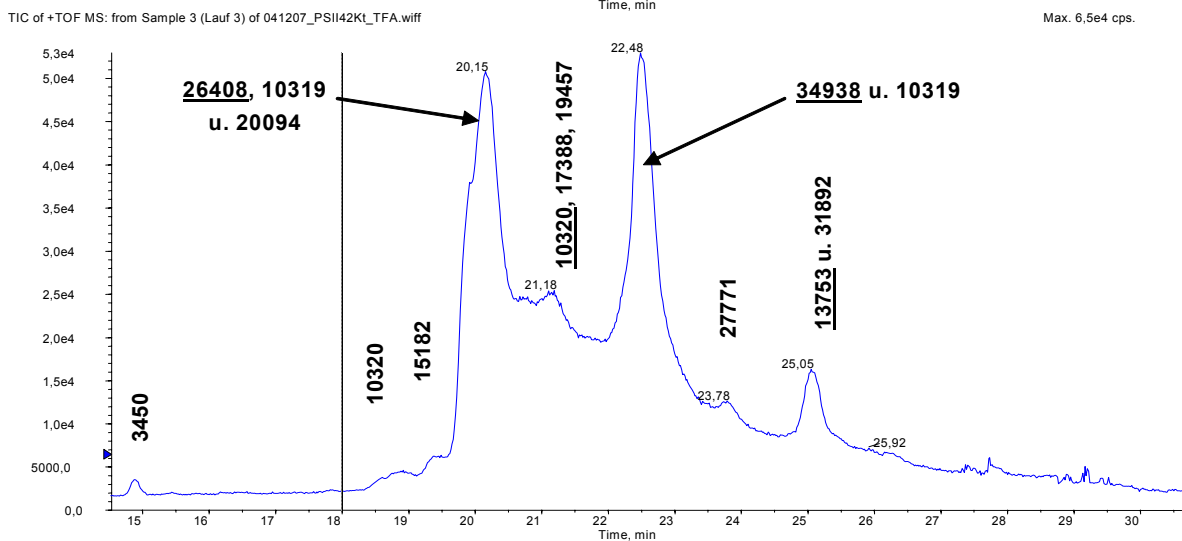
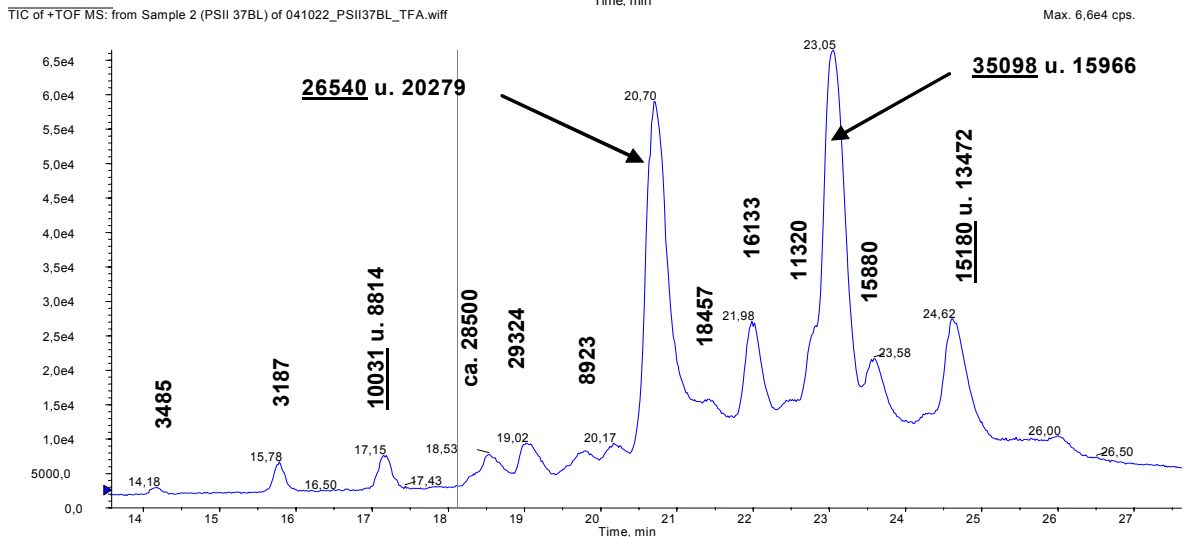
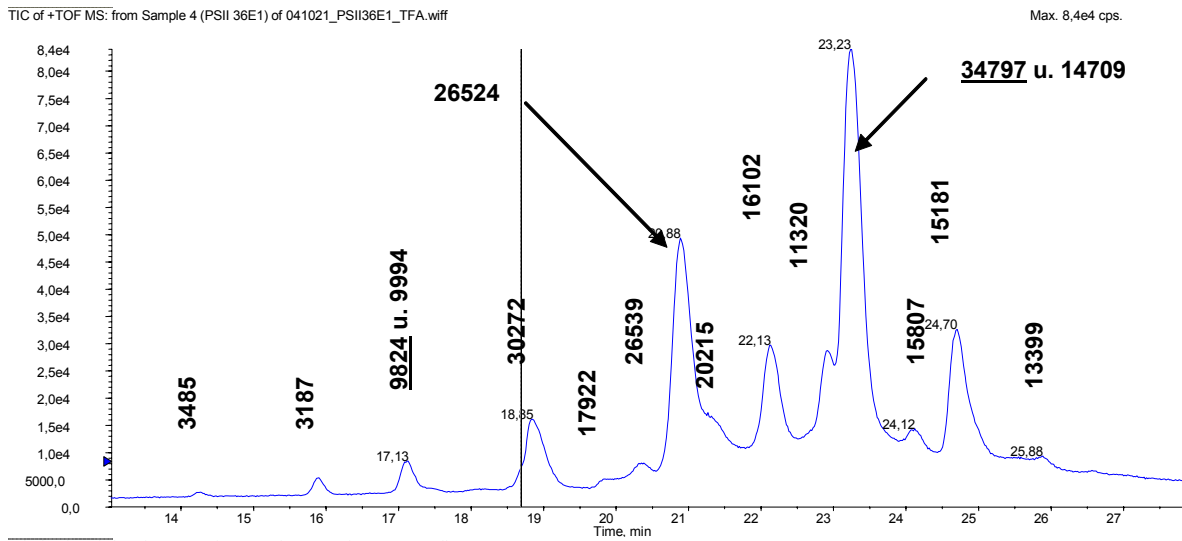


Abb. 2.2.9: Chromatogramme von Pflanzenextrakten unterschiedlicher Spezies nach Isolierung von PSII (oben Erbse - Mitte Bohne - unten Kopfsalat).

Ebenso sind weitere co- bzw. posttranslationale Modifikationen des Proteins möglich. So ergab beispielsweise ein Abgleich der Proteinmasse 35098 Da im Bohnenextrakt mit der Aminosäuresequenz des D1-Precursors der Sojabohne (SwissProt Eintrags-Nr. P02957) eine exakte Übereinstimmung in der Molekülmasse, wenn N-terminal eine Bindungsspaltung nach 28 und C-terminal eine Bindungsspaltung nach 347 Aminosäuren stattfindet. Zurück bleibt ein D1-Fragment mit 320 Aminosäuren und der Masse von 35098 Da. Wie aus Abbildung 2.2-10 hervorgeht, wäre zudem damit zu rechnen, dass bei einer solchen Modifikationen des Proteins die Bindungsnischen für Liganden zudem noch intakt bleiben.

10	20	30	40	50	60
TAILERRESE	SLWGRFCNWI	TSTENRLYIG	WFGVLMIPTL	LTATSVFIIA	FIAAPPVDID
70	80	90	100	110	120
GIREPVSGSL	LYGNNISGA	IPTSAAIGL	HFYPIWEAAS	VDEWLYNGGP	YELIVLHFL
130	140	150	160	170	180
GVACYMGREW	ELSFRLGMRP	WIAVAYSAPV	AAATAVFLIY	PIGQGSFSDG	MPLGISGTFN
190	200	210	220	230	240
FMIVFQAEHN	ILMHPFHMLG	VAGVFGGSLF	SAMHGSLVTS	SLIRETTENE	SANEGYRFGQ
250	260	270	280	290	300
EEETYNIVAA	HGYFGRLIFQ	YASFNNSRSL	HFFLAAWPVV	GIWFTALGIS	TMAFNLNQFN
310	320	330	340	350	
FNQSVVDSQG	RVINTWADII	NRANLGMEVM	HERNAHNFP	DLAAIDAPSI	NG

Abb. 2.2.10: Aminosäuresequenz des D1-Proteins der Bohne.

Intaktes D1-Protein: 352 Aminosäuren Masse 38.817 amu (grau)

D1-Protein Teilstruktur: 320 Aminosäuren Masse 35.098 amu (blau)

Bindungsnische für photosynthesehemmenden Liganden im Bereich Aminosäuren 252 – 272 (grün)

Auch in nahezu allen anderen nach Piletskaya et al. (1999a) aufgearbeiteten Pflanzenextrakten waren das 26,5 kDa und das 35 kDa Protein diejenigen mit den höchsten Konzentrationen. Eine semiquantitative Abschätzung dieser beiden Peaks zeigt, dass die beiden Proteine in vergleichbaren Konzentrationen vorliegen. Im PSII liegen die Proteine Psb O und Psb A ebenfalls äquimolar vor, so dass dieser Befund neben dem Nachweis durch Bindungsstudien mit D1-Antikörpern in Western-Blots und mittels Biacore als weiteres Indiz für das Vorhandensein des modifizierten D1-Proteins gedeutet werden kann.

Eine Absicherung dieser Hypothese kann jedoch nur durch eine Sequenzanalyse der D1-Protein (-Teilstruktur) oder durch den positiven Nachweis einer Bindung von D1-Protein (-Teilstruktur) mit photosynthesehemmenden Liganden erfolgen. Innerhalb des Teilprojektes des GKSS wurden abschließende Versuche unternommen, die mit Herbiziden komplexierte D1-Teilstruktur massenspektrometrisch zu erfassen. Eine direkte Off-Line Nano-ESI-TOF Messung ohne vorherige LC ließ einen Nachweis von Proteinen jedoch nicht zu. In diesem

Fall wurden die Messungen durch eine massive Signal-Suppression gestört, die durch die in den Extrakten enthaltenen Lösevermittler verursacht wurde. Es war daher ein chromatographischer Trennlauf erforderlich. Hierbei war allerdings zu befürchten, dass ein zuvor bestandener Komplex aus D1-Protein (-Teilstruktur) und PSII-inhibierendem Liganden durch den Einfluss des organischen Lösemittels wieder dissoziiert werden würde. LC-TOF Messungen des zuvor mit Metribuzin und Atrazin dotierten PSII-Extraktes ergaben tatsächlich die Masse des nicht komplexierten D1-Teilstruktur von 35.098 Da (vergleiche Tab. 2.2-12, mittlere Spalte). Sollte aus Gründen der Löslichkeit des D1-Proteins nicht auf die Verwendung von Lösevermittlern verzichtet werden können, bleibt letztlich nur die Möglichkeit, den intakten Komplex aus D1-Protein (-Teilstruktur) und Ligand mittels Biacore oder MALDI-TOF nachzuweisen.

2.3 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des Verwertungsplanes

In dem Kooperationsprojekt zwischen IMBIO Uni Bonn und GKSS, Geesthacht wurde erstmals gezeigt, dass es möglich ist, eine sinnvolle umweltbezogene Analytik als Kooperation zwischen substanzbezogener Analytik (GKSS) unter Einbeziehung chemischer Analyseverfahren wie Flüssigchromatographie mit sensitiven Detektionsverfahren wie Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) bzw. Nano-LC-ESI-TOF und wirkungsbezogener Analytik (IMBIO) unter Etablierung eines biochemisch charakterisierten pflanzlichen Rezeptors mit geeigneten Bindungsstudien zu entwickeln. Als Folge des begrenzten Zeitrahmens von drei Jahren mußte die Bearbeitung des 4. Meilensteins (Einsatz der Zielstrukturen zur wirkungsbezogenen Identifizierung von herbiziden Schadstoffen in natürlichen Gewässern) und damit die Umsetzung in die Praxis unterbrochen werden. Zur Bearbeitung dieses Meilensteins wären aber sicherlich noch zwei weitere Jahre zu veranschlagen gewesen. Da es sich aber bei der Isolierung des so wichtigen Ankerproteins D1 um eine neuartige und risikoreiche Zielsetzung handelte, die auch in der Literatur unter dieser Fragestellung als innovativ bezeichnet werden kann, konnte nicht unbedingt von einem sich schneller einstellenden Erfolg ausgegangen werden. Außerdem sind auch die SPR-Techniken bezüglich ihrer Bindungsaffinitätsmessungen gegenüber kleinen Molekülen (unter 300Da) nur begrenzt einsatzfähig, so dass auch in diesem Bereich von seiten des Biacore-Managements Grenzen in der Beratung gesetzt waren. Da aber nun sämtliche Daten zur Verfügung stehen – wie Erstellung der quantitativen Analytik für die PSII-Herbizide mit Tandem-MS (GKSS; siehe Anhang Tab.A II-1), Isolierung, Reinigung und (bio-)chemische Charakterisierung des bindefähigen Rezeptorproteins sowie der Nachweis seiner biomolekularen Interaktion mit photosyntheseinhibierenden Schadstoffen mittels SPR-Technologie (Nachweis der Messung auch mit kleinen Molekülen mit Molmassen unter 300 Da) sollten unbedingt Maßnahmen ergriffen werden, die eine Weiterführung dieser Zielsetzung einbeziehen. Beachtenswert in diesem Zusammenhang sind auch die Veröffentlichungen, die in diesem Bereich von beiden Kooperationspartnern bereits erstellt bzw. noch geplant sind.

2.4 Bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Projektes bei anderen Stellen

Beide Projektgruppen schätzen übereinstimmend ein, dass entsprechend aktuellen Literaturrecherchen keine Ergebnisse von dritter Seite bekannt geworden sind, die Fortschritte anderer auf dem Gebiet des Projektes beschreiben.

2.5 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen

Teilprojekt IMBIO

Erfolgte Veröffentlichung:

Schulten C., Friebe A., Brandt A., Muktiono B. and Schnabl H. (2005): Characterization of thylakoid membranes and PSII extracts isolated from different plant species. In: Est A. van der und Bruce D. (Eds.): Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives,

Proceedings of the 13th International Congress on Photosynthesis. *International Society of Photosynthesis Research*, Montreal: 269-272.

Zwei weitere Veröffentlichungen befinden sich von seiten der Teilprojektgruppe IMBIO in Vorbereitung:

Muktiono B., Schulten C., Cerboncini C. und Schnabl H.: „Isolation and characterization studies of *ex-vivo* photosystem II D1-protein from different plant species“

Muktiono B., Schulten C., Heemken O., Gandraß J., Cerboncini C. und Schnabl H.: „Studies of *ex-vivo* photosystem II D1-protein isolated from plant leaves in interaction with herbicides using SPR technology“

Teilprojekt GKSS

Gegenwärtig befinden sich von Seiten der Teilprojektgruppe GKSS die beiden folgenden peer-reviewed Artikel in Vorbereitung:

O.P. Heemken, J. Gandraß und A. Prange: "Characterization of photosystem II reaction center subunits in different plant species by electrospray ionisation mass spectrometry".

O.P. Heemken, M. Plaßmann, J. Gandraß und A. Prange: "PSII inhibition class Herbicides in the river Elbe – Analysis by solid phase extraction followed by liquid chromatography / tandem mass spectrometry".

3 Zusammenfassung

Der Einsatz des pflanzlichen Photosyntheseapparates bzw. des in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten lokalisierten D1-Proteins für die biosensorische Analytik von Photosynthese-inhibierenden Schadstoffen und deren Metaboliten in der Gewässeranalytik bietet einen neuen innovativen Ansatz, der die chemische Analytik (substanzbezogene Spurenanalytik) mit den spezifischen Schadstoffwirkungen auf biologische Zielstrukturen kombiniert (wirkungsbezogene Analytik). Die chemische Wechselwirkungsuntersuchung wird hierdurch gezielt auf die molekulare Ebene verlagert, wobei nicht nur die einzelne Substanz, sondern die gesamte Toxizität für biologische Systeme im Vordergrund steht (Summe der potentiellen photosynthetischen Hemmwirkung).

Auf Grund massenspektrometrischer Untersuchungen der GKSS konnte gezeigt werden, daß photosynthesehemmende Liganden als Zielanalyte eine umweltrelevante Rolle für deutsche Oberflächengewässer (z.B. Wasserproben der Elbe) spielen und sie somit für Bindungsstudien mit D1-Proteinen sinnvoll sind (2.2.1.3). Die Qualifizierung und Quantifizierung von in Gewässern vorkommenden photosyntheseinhibierenden Schadstoffen soll im vorliegenden Projekt auf der biomolekularen Erkennung des D1-Proteins als Zielstruktur basieren, das zum Erhalt seiner Funktionalität mit einer für PSII-Herbizide bindefähigen Q_B -Bindenische ausgestattet sein muß. Um die molekularen Interaktionen zwischen den Schadstoffen und dem D1-Ankerprotein zu messen, sollten Rezeptor-Liganden-Bindungsstudien mittels der optischen Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technologie (surface-plasmon-resonance, SPR) durchgeführt werden.

Im Fokus des Interesses stand das D1-Protein als Herbizidrezeptor, das in ein hochkomplexes System von mindestens 25 Proteinuntereinheiten in die pflanzliche Thylakoidmembran von Chloroplasten eingelagert ist und das zur Durchführung der Bindungsstudien isoliert, unter Erhalt seiner Bindungsfähigkeit aufgereinigt und biochemisch charakterisiert werden mußte. In umfangreichen und zeitaufwendigen Arbeiten im IMBIO gelang es – wenn auch erst in der letzten Phase des Projektes – ein aufgereinigtes D1 - Protein aus *Vicia faba* (und zwar nur aus dieser Pflanze, nicht dagegen aus Erbse, Kopfsalat und Spinat) unter Erhalt der Bindefähigkeit der Q_B -Bindenische zu isolieren, den Reinheitsgrad biochemisch zu charakterisieren und den Nachweis der Bindefähigkeit erstmals über SPR mit einem Simazinderivat-Chip zu erbringen (1./2. Meilenstein). Da das D1-Protein, wie erwähnt, erst relativ spät im Projektverlauf verfügbar war, verglich die GKSS-AG im Vorfeld die Eigenschaften des D1 mit einem Rekombinase-Protein mit identischer Molmasse (38kDa), indem sie Methoden der Nano-LC-ESI-TOF einsetzten. Die chemische Charakterisierung des D1-Proteins gelang der GKSS insofern, dass sie Molmassen von Proteinen verschiedener vom IMBIO gelieferten Pflanzenextrakte mit 26.5 und 35 kDa in vergleichbaren Konzentrationen bestimmen konnten. Sie kamen zu der Aussage (2.2.2.3), dass diese Hypothese nur durch eine Sequenzanalyse des D1-Proteins abgesichert werden kann oder durch den positiven Nachweis einer Bindung des D1-Proteins mit photosynthesehemmenden Liganden. Letzteres konnte von der AG des IMBIO inzwischen geliefert werden (2.1.7 und 2.1.8), indem erstmals auf einen Chip gekoppeltes D1-Protein aus *Vicia faba* auf die Bindungsspezifität von drei PS-II-Herbiziden – Diuron, Atrazin und Metribuzin – mittels SPR überprüft wurde (Meilenstein 3). Die drei Herbizide zeigten unterschiedliche Bindungsspezifitäten, Diuron ließ sich in einer Menge von 10 ug/ml nachweisen, Atrazin in einer von 40 ug/ml und Metribuzin von 60 ug/ml. Anhand dieser

erstmaligen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass das speziell aufgereinigte D1-Protein sowie auch der PS-II-Proteinkomplex von *Vicia faba* für den biosensorischen Nachweis von PS-II-Herbiziden mit der SPR-Technologie geeignet ist, wenn auch der Sensitivitätsnachweis noch weiter zu optimieren ist (3. Meilenstein). Auf Grund des abgelaufenen Zeitrahmens für das Projekt der wirkungsbezogenen Analytik mussten die Untersuchungen beendet werden, so dass leider zur Erfüllung des 4. Meilensteins (Einsatz der Zielstrukturen zur wirkungsbezogenen Identifizierung von herbiziden Schadstoffen in natürlichen Gewässern) keine Ressourcen mehr zur Verfügung standen.

Literatur

- 2000/60/EG (2000): Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft (L 327/1).
- 76/464/EWG (1976): Richtlinie 76/464/EWG vom 4. Mai 1976 betreffend die Verschmutzung infolge der Ableitung bestimmter gefährlicher Stoffe in die Gewässer der Gemeinschaft, Rat der Europäischen Gemeinschaften, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft (L 129).
- ARGE Elbe (2003): Bericht "Hochwasser August 2002", Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe, Eigendruck, Hamburg.
- Barber J. (2003) Quart. Rev. Biophys. 36.
- Barceló D. and Hennion M.-C. (1997): Trace determination of pesticides and their degradation products in water. Techniques and instrumentation in analytical chemistry, Vol. 19. Elsevier, Amsterdam.
- Bassi R., dal Belin Peruffo A., Barbato R. and Ghisi R. (1985): Differences in chlorophyll-protein complexes and composition of polypeptides between thylakoids from bundle sheaths and mesophyll cells in maize. Eur J Biochem, 146: 589-595.
- Boekema E. J., Hankamer B., Bald D., Kruij J., Nield J., Boonstra A. F., Barber J. und Rögner M. (1995): Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 175-179.
- Boekema E. J., Roon H. van, Clakoen F., Bassi R. und Dekker J. P. (1999): Multiple Types of Association of Photosystem II and Its Light-Harvesting-Antenna in Partially Solubilized Photosystem II Membranes. Biochemistry 38 (8): 2233-2239.
- Bossi R., Spliid N. H., Streibig J. C., Capri E., Evans S. P. and Trevisan M. (1996): Analysis of sulfonyleurea herbicides at ppt levels by liquid chromatography-mass spectrometry. Proceedings of the 10th Symp. Pesticide Chemistry. Catelnuovo Fogliani, Piacenza, Italy, 30. Sept. - 2. Oct. 1996: 483-488.
- Brecht A. and Gauglitz G. (1997): Label free optical immunoprobes for pesticide detection. Anal. Chim. Acta. 347: 219-233.
- BVL (2003): Verzeichnis der in der BRD zugelassener Pflanzenschutzmittel (Stand 10.02.2003) Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.
- Chegel V. I., Shirshov Yu. M., Piletskaya E. V. und Piletsky S. A. (1998): Surface plasmon resonance sensor for pesticide detection. Sensors and Actuators B 48: 456-460.
- Claussen U., et al. (1999): Umweltqualitätsziele- und Umwelthandlungsziele im Gewässerschutz. Umweltbundesamt-Texte 91/99. Umweltbundesamt, Berlin.
- Cohen W.S. and Baxter D.R. (1990): Sulfhydryl reagents and energy-linked reactions in monocot thylakoids. Plant Physiology, 93: 1005-1010.
- Crescenzi C., Di Corcia A., Marchese S. and Samperi R. (1995): Determination of acidic pesticides in water by a benchtop electrospray liquid chromatography mass spectrometer. Anal. Chem. 67: 1968-21975.

- D'Ascenzo G., Gentili A., Marchese S., Marino A. and Perret D. (1998): Multiresidue method for determination of post-emergence herbicides in water by HPLC/ESI/MS in positive ionization mode. *Environ. Sci. Technol.* 32: 1340-1347.
- Di Corcia A., Crescenzi C., Guerriero E. and Samperi R. (1997): Ultratrace determination of atrazine and its six major degradation products in water by solid-phase extraction and liquid chromatography – electrospray/mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 31: 1658-1663.
- Eijkelhoff C., van Roon H., Groot M.-L., van Grondelle R. and Dekker J. P. (1996): Purification and spectroscopic characterization of photosystem II reaction centre complexes isolated with or without Triton X-100. *Biochemistry* 35: 12864-12872.
- Eshaghi S., Andersson B. and Barber J. (1999): Isolation of a highly active PSII-LHCII supercomplex from thylakoid membranes by a direct method. *FEBS Letters* 446: 23-26.
- Eshaghi S., Turcsányi E., Vass I., Nugent J., Andersson B. and Barber J. (2000): Functional characterization of the PS II-LHC II supercomplex isolated by a direct method from spinach thylakoid membranes. *Photosynthesis research* 64: 179-187.
- Gandraß J. (1998): Erfassung und Beurteilung der Belastung der Elbe mit ökosystemrelevanten Organika. Teil I: Schwerflüchtige Chlorkohlenwasserstoffe in Sedimenten und Pestizide in der Wasserphase. Abschlußbericht UBA FuE 102 05 216. GKSS Forschungszentrum Geesthacht, April 1998.
- Gandraß J. (1999): Erfassung und Beurteilung der Belastung der Elbe mit ökosystemrelevanten Organika. Teil II: Pestizide mit niedrigen Effektkonzentrationen im aquatischen Bereich – Entwicklung eines Ion Trap GC/MS² Verfahrens. Abschlußbericht UBA FuE 293 24 216. GKSS Forschungszentrum Geesthacht, Dezember 1999.
- Goodrow M. H., Harrison R. O. and Hammcock B. D. (1990): Hapten Synthesis, Antibody Development, and Competitive Inhibition Enzyme Immunoassay for s-Triazine Herbicides. *J. Agric. Food Chem.*, 38: 990-996.
- Götz R., Bauer O. H., Friesel P. and Roch K. (1998): Organic trace compounds in the water of the River Elbe near Hamburg part II, *Chemosphere* 36 (9): 2103-2118.
- Hankamer B., Barber J. and Boekema E. J. (1997a): Structure and Membrane Organization of Photosystem II in Green Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 641-671.
- Hankamer B., Nield J., Zheleva D., Boekema E., Jansson S. and Barber J. (1997b): Isolation and biochemical characterisation of monomeric and dimeric photosystem II complexes from spinach and their relevance to the organisation of photosystem II in vivo. *Eur. J. Biochem.* 243: 422-429.
- Hock B. and Scheller F. (2001): Conclusions and Outlook. In: Bahadir M., Collins H.-J. and Hock B. (Eds.): *Bioresponse-Linked Instrumental Analysis*. B. G. Teubner GmbH, Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden: 187-189.
- Hogendoorn E. and van Zoonen P. (2000): Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis. *J. Chromatogr. A*, 892 (1-2): 435-453.
- Huber C.G., Walcher W., Timperio A.M, Troiani S., Porceddu A. and Zolla L. (2004): *Proteomics* 4: 3909-3920.

- Kambhampati I., Roinestad K. S., Hartman T. G., Rosen J. D., Fukuda E. K., Lippincott R. L. and Rosen R. T. (1994): Determination of diquat and paraquat in water using high-performance liquid chromatography with confirmation by liquid chromatography-particle beam mass spectrometry. *J. Chromatography* 688: 67-73.
- King R. et al. (2000): Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *American Society for mass spectrometry*, 11: 942-950.
- Koblizek M., Masojidek J., Komenda J., Kucera T., Pilloton R., Mattoo A. K. und Giardi M. T. (1998): A Sensitive Photosystem II-Based Biosensor for Detection of a Class of Herbicides. *Biotechnology and Bioengineering* 60 (6): 664-669.
- Kuhl H., Kruij J., Seidler A., Krieger-Liszkay A., Bünker M., Bald D., Scheidig A. J. und Rögner M. (2000): Towards Structural Determination of the Water-splitting Enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (27): 20652-20659.
- Marek L. J., Koskinen W. C. and Bresnahan G. A. (2000): LC/MS analysis of cyclohexandione oxim herbicides in water. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2797-2801.
- Mouvet C., Amalric L., Broussard S., Lang G., Brecht A. and Gauglitz G. (1996): Reflectometric interference spectroscopy for the determination of atrazine in natural water samples. *Environ. Sci. Technol.* 30: 1846-1851.
- Mouvet C., Harris R. D., Maciag C., Luff B. J., Wilkinson J. S., Piehler J., Brecht A. and Gauglitz G. (1997): Determination of simazine water samples by waveguide surface plasmon resonance. *Anal. Chim. Acta.* 338: 109-117.
- Nanba O. und Satoh K. (1987): Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 109-112.
- Nelieu S., Stobiecki M., Sadoun F., Virelizier H., Kerhoas L. and Einhorn J. (1994): Solid phase extraction and LC-MS or SFC-MS for the analysis of atrazine metabolites in water. *Analysis* 22: 70-75.
- Nield J. N., Orlova L., Morris E. P., Gowen B., van Heel M. and Barber J. (2000): Three-dimensional structure of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synechococcus elongatus* photosystem II complexes allow for comparison of their oxygen-evolving complex organisation. *J. Biol. Chem.* 275: 27940.
- Oettmeier W. (1999): Herbicide resistance and supersensitivity in photosystem II. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55: 1255-1277.
- Ohki A., Kuboyama N., Koizumi K., Tanaka A., Sato Y., Kohno H., Böger P. und Wakabayashi K. (1999): Mode of Action of Novel 2-(Benzylamino)-4-methyl-6-(trifluoromethyl)-1,3,5-triazine Herbicides: Inhibition of Photosynthetic Electron Transport and Binding Studies. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4398-4402.
- Peter G.F. and Thornber J.P. (1991): Biochemical composition and organisation of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *J Biol Chem*, 266:16745-16754.
- Peters H., Schmidt-Dannert C. and Schmid R. D. (1997): The photoreaction center of *Rhodobacter sphaeroides*: a 'biosensor protein' for the determination of photosystem-II herbicides?. *Mat. Sci. Eng. C4*: 227-232.

- Piletskaya E. V., Piletsky S. A., El'skaya A. V., Sozinov A. A., Marty J.-L. and Rouillon R. (1999a): D1 protein-an effective substitute for immunoglobulins in ELISA for the detection of photosynthesis inhibiting herbicides. *Analytica Chimica Acta* 398: 49-56.
- Piletskaya E. V., Piletsky S. A., Sergeyeva T. A., El'skaya V. A., Sozinov A. A., Marty J.-L. and Rouillon R. (1999b): Thylakoid membranes-based test system for detecting of trace quantities of the photosynthesis-inhibiting herbicides in drinking water. *Anal. Chim. Acta* 391: 1-7.
- Piletskaya E.V., Piletsky S.A., Lavrik N.F. and Sozinov A.A. (1997): Opredelenie koncentrazii fotosintezingibirujuschich gerbizidow ispolsowanem chloroplastnich membran i ich komponentow. *Fiz. Biochim, Kult. Rast.* 29: 234-240.
- Rhee K.-H., Morris E. P., Barber J. and Kühlbrandt W. (1998): Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 Å resolution. *Nature* 396: 283-286.
- Roos C. (2003): Bestimmung von Pestiziden in Flusswasser im ng/L- und sub-ng/L-Bereich mittels Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) – Verfahrensentwicklung, Validierung und Anwendung für die Untersuchung der Elbe, Eigendruck des GKSS Forschungszentrum Geesthacht.
- Schägger H. and von Jagow G. (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166: 368-379.
- Schlecht U., Nomura Y., Bachmann T. and Karube I. (2002): Reversible Surface Thiol Immobilization of Carboxyl Group Containing Haptens to a BIAcore Biosensor Chip Enabling Repeated Usage of a Single Sensor Surface. *Bioconjugate Chem.*, 13: 188-193.
- Schnabl H. and Trapmann S. (2001): Biomonitor systems derived from thylakoids for the detection of phytotoxic substances. In: Hock, B., M. Bahadir, H.-J. Collins (Eds.): *Bioresponse-linked instrumental analysis*. Teubner Reihe Umwelt, B.G. Teubner Verlag, Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden: 153-168.
- Schnabl H., Helfrich P. and Trapmann S. (2000): Plant thylakoid membranes and protoplasts as biological units for detection of phytotoxic compounds in water, air, soil and compost. *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. In: Persoone G., Janssen C. und De Coen W. (Eds.): *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: 177-184.
- Schreiber U., Muller J. F., Haugg A. and Gademann R. (2002): New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests. *Photosynthesis Research* (74) 3, 317-330.
- Schröder H. F. (1997): Mass spectrometric detection and identification of polar pesticides and their degradation products – a comparison of different ionisation methods. *Environ. Monitoring Assessment* 44: 503-513.
- Schulten C., Friebe A., Brandt A., Muktiono B. and Schnabl H. (2005): Characterization of thylakoid membranes and PSII extracts isolated from different plant species. In: Est A. van der und Bruce D. (Eds.): *Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global*

- Perspectives, Proceedings of the 13th International Congress on Photosynthesis. International Society of Photosynthesis Research, Montreal: 269-272.
- Schwarzbauer J., Ricking M. and Littke R. (2004): Quantitation of Nonextractable Anthropogenic Sediments after Chemical Degradation, *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 31 (6): 469-481
- Sharma J., Panico M., Barber J. and Morris H. R. (1997a): Purification and Determination of Intact Molecular Mass by Electrospray Ionization Mass spectrometry of the Photosystem II Reaction Center Subunits, *Journal of Biological Chemistry*. 272: No. 52: 33153-33157.
- Sharma J., Panico M., Shipton C.A., Nilsson F., Morris H. R. and Barber J. (1997b): Primary structure characterization of the photosystem II D1 and D2 subunits, *Journal of Biological Chemistry*. 272: No. 52: 33158-33166.
- SwissProt <http://us.expasy.org/>
- Szabo I. et al. (2001): Determination of photosystem II subunits by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(17): 13784-13790.
- Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350
- Trapmann S. (1999): Bestimmung von Herbizid-Kontaminationen durch einen Thylakoidsensitivitätsassay: Optimierung und Charakterisierung der biologischen Einheit. Dissertation am Institut für Landwirtschaftliche Botanik, Universität Bonn.
- Trapmann S., Grobecker K. H., Pauwels J. and Schnabl H. (2000): Characterisation of lyophilized thylakoids as a biological tool to detect herbicides. In: Persoone G., Jansson C., De Coen W. (Eds.): *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: 191-196.
- Trebst A. (1987): The three-dimensional structure of the herbicide binding niche on the reaction center polypeptides of photosystem II. *Zeitung für Naturforschung* 42c: 742-750.
- Trinkwasserverordnung Deutschland (1990): Verordnung über das Trinkwasser und Wasser für Lebensmittelbetriebe (Trinkwasserverordnung-TrinkV). Mai 1986: BGB1. I S. 760, Fassung der Bekanntmachung vom 5. Dezember 1990: BGB1. S. 2612, ber. 1991 I S. 227, BGB1 III 2126-1-7.
- Vahl M., Graven A. and Juhler R. K. (1998): Analysis of chlormequat residues in grain using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). *Fres. J. anal. Chem.* 361: 817-820.
- Whitelegge J.P. et al. (1998a): Electrospray-ionization mass spectrometry of intact intrinsic membrane proteins. *Protein Science*, 7: 1423-1430.
- Whitelegge J.P. et al. (1999): Toward the bilayer proteome, electrospray ionization-mass spectrometry of large, intact transmembrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 10695-10698.

- Whitelegge J.P., Gundersen C.B. and Faull K.F. (1998b): *Protein Science* 7: 1423-1430.
- Wildner G. F., Berzborn R., Dedner N., Dmoch R., Fiebig C. and Meyer H. E. (1987): In: Biggens J. (Ed.): *Progress in photosynthesis research*, Vol. 3. Kluwer Academic Press, Dordrecht, Netherlands: 787.
- Zheleva D, Sharma J., Panico M, Morris H. R. and Barber J. (1998): Isolation and characterization of monomeric and dimeric CP47-reaction center photosystem II complexes. *J. Biol. Chem.* 273: 16122-16127.
- Zolla L. and Timperino A.M. (2000): *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 41: 398-406.
- Zouni A., Witt H.-T., Kern J., Fromme P., Krauß N., Saenger W. and Orth P. (2001): Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature* 409: 739-743.

Anhang

Anhang I: Teilprojekt ILB

- A I-1: Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes in % zur Kontrolle durch verschiedene PS-II-Inhibitoren.
- A I-2 Small molecules Biacore MDL-Methode

Anhang II: Teilprojekt GKSS

- A II-1: Konzentrationen von photosynthesehemmenden Liganden in Wasserproben der Elbe (Längsschnitt Geesthacht – Nordsee vom November 2003).
- A II-2: Konzentrationen von photosynthesehemmenden Liganden in Wasserproben der Elbe bei Geesthacht in Zeit von September 2003 bis August 2004.

Tab. A I-1: Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes (PET) in Prozent zur Kontrolle durch verschiedene PS-II-Inhibitoren

Konzentration [µg/l]	Diuron Hemmung PET [%] (Stabw [%])	Atrazin Hemmung PET [%] (Stabw [%])	Metribuzin Hemmung PET [%] (Stabw [%])	Simazin Hemmung PET [%] (Stabw [%])	Simazinderivat Hemmung PET [%] (Stabw [%])	Irgarol Hemmung PET [%] (Stabw [%])
80600					51,94 (1,63)	
8060					25,55 (1,66)	
500						75,27 (1,35)
250		48,80 (0,34)	35,97 (3,32)			
100					4,00 (0,98)	76,77 (0,65)
75					2,17 (1,01)	
50	68,87 (2,98)			37,95 (2,66)	1,04 (0,70)	72,44 (1,10)
25	60,73 (4,91)	37,86 (1,24)	24,20 (3,82)	23,80 (5,66)		
12,5		29,30 (1,74)		14,17 (4,24)		
10	45,95 (1,72)					71,19 (0,68)
5				7,23 (1,44)		
2,5	26,93 (0,30)		2,5 (4,40)			62,35 (0,54)
1,25	16,00 (0,97)	3,17 (0,89)				45,63 (1,99)
1				4,36 (2,83)		24,17 (4,11)
0,625	8,14 (0,27)					
0,5						12,29 (3,28)
0,3125	3,50 (1,34)					
0,25						8,90 (2,12)
0,125	1,70 (1,12)					
0,1				1,56 (1,57)		

A I-2: Small Molecules MDL-Methode

DEFINE APROG SolventCorrection_1

PARAM %c1 %c2 %c3 %c4 %c5 %c6 %c7 %c8

CAPTION SolventCorrection

FLOW 30

* QUICKINJECT %c1 15

-10 RPOINT -b baseline

22 RPOINT solvcorr_1

* QUICKINJECT %c2 15

-10 RPOINT -b baseline

22 RPOINT solvcorr_1

* QUICKINJECT %c3 15

-10 RPOINT -b baseline

22 RPOINT solvcorr_1

* QUICKINJECT %c4 15

-10 RPOINT -b baseline

22 RPOINT solvcorr_1

* QUICKINJECT %c5 15

-10 RPOINT -b baseline

22 RPOINT solvcorr_1

* QUICKINJECT %c6 15

-10 RPOINT -b baseline

22 RPOINT solvcorr_1

* QUICKINJECT %c7 15

-10 RPOINT -b baseline

22 RPOINT solvcorr_1

* QUICKINJECT %c8 15

-10 RPOINT -b baseline

22 RPOINT solvcorr_1

END

DEFINE APROG SolventCorrection_2

PARAM %c1 %c2 %c3 %c4 %c5 %c6 %c7 %c8

CAPTION SolventCorrection

FLOW 30

* QUICKINJECT %c1 15

-10 RPOINT -b baseline

22 RPOINT solvcorr_2

* QUICKINJECT %c2 15

-10 RPOINT -b baseline

22 RPOINT solvcorr_2

* QUICKINJECT %c3 15

-10 RPOINT -b baseline

22 RPOINT solvcorr_2

* QUICKINJECT %c4 15

-10 RPOINT -b baseline

22 RPOINT solvcorr_2

* QUICKINJECT %c5 15

-10 RPOINT -b baseline

22 RPOINT solvcorr_2

* QUICKINJECT %c6 15

-10 RPOINT -b baseline

22 RPOINT solvcorr_2

* QUICKINJECT %c7 15

-10 RPOINT -b baseline

22 RPOINT solvcorr_2

* QUICKINJECT %c8 15

-10 RPOINT -b baseline

22 RPOINT solvcorr_2

END

DEFINE APROG Screening

PARAM %pos %comp %conc %mw

KEYWORD comp %comp

KEYWORD mw %mw

FLOW 30

* KINJECT %pos 30 300 !injection of compound

-10 RPOINT -b Baseline

15 RPOINT bindearly

50 RPOINT bindlate

65 RPOINT stabearly

115 RPOINT stablate

WASHPOS s rr2 !wash solution 50%DMSO

WASH s

WASHPOS n rr2 -v100 !wash solution 50%DMSO

WASH n

* QUICKINJECT rr4 30 !carry-over control

-10 RPOINT -b co_Baseline

15 RPOINT co_bindearly

50 RPOINT co_bindlate

65 RPOINT co_stabearly

115 RPOINT co_stablate

END

DEFINE LOOP Screening

LPARAM %pos %comp %conc %mw

TIMES 1

r2a1 startup 0 0 !running buffer

r2a2 startup 0 0 !running buffer

r2a3 startup 0 0 !running buffer
r2a4 startup 0 0 !running buffer
r2a5 startup 0 0 !running buffer
r2c1 negcontrol 0 0
r2b1 Atrazin1 10u 215
r2c2 negcontrol 0 0
r2b2 Atrazin2 20u 215

r2c3 negcontrol 0 0

r2b3 Atrazin3 40u 215
r2c4 negcontrol 0 0
r2b4 Atrazin4 60u 215
r2c5 negcontrol 0 0
r2b5 Atrazin5 80u 215
r2c6 negcontrol 0 0
r2b6 Atrazin6 100u 215
r2c7 negcontrol 0 0
r2c8 negcontrol 0 0

END

MAIN

RACK 1 thermo_C
RACK 2 thermo_B
RACK r REAG_A

temp 25

prime

detection 2-1,3-1,4-1

APROG SolventCorrection_1 r1a1 r1a2 r1a3 r1a4 r1a5 r1a6 r1b1 r1b2

LOOP Screening STEP

APROG Screening %pos %comp %conc %mw

ENDLOOP

APROG SolventCorrection_2 r1c1 r1c2 r1c3 r1c4 r1c5 r1c6 r1d1 r1d2

APPEND standby

END

Tab. A II-1: Konzentrationen von photosynthesehemmenden Liganden in Wasserproben der Elbe (Längsschnitt Geesthacht – Nordsee vom November 2003).

	Geest- hacht	Elbs- torf	Zollen- spieker	Bunthaus- spitze	Bill- werder	Seemanns- höft
Ametryne	1,2	1,4	1,6	1,5	1,6	1,5
Atrazine	11,7	13,6	9,6	10,4	13,3	13,7
Bentazon	83,8	80,4	39,7	18,5	23,1	25,6
Bromacil	< BG	0,31	0,30	0,17	0,84	0,5
Bromoxynil	0,39	0,44	0,28	0,27	0,46	0,4
Chloridazon	1,53	1,64	1,26	2,1	1,61	2,0
Chlorobromuron	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Chlorotoluron	3,5	4,4	4,4	5,5	4,0	4,7
Cyanazine	0,72	0,7	0,2	0,4	0,8	0,7
Desmedipham	0,04	0,11	0,08	0,04	0,06	0,08
Desmetryne	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Dimefuron	0,72	0,9	1,1	0,8	0,8	0,6
Diuron	15,5	16,1	13,5	13,1	13,3	31,1
Fenuron	1,7	2,9	1,4	1,8	2,0	1,8
Hexazinone	10,1	11,0	6,0	6,6	11,2	6,5
Ioxynil	0,16	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1
Irgarol	2,2	2,1	2,5	2,8	2,5	3,3
Isoproturon	27,4	29,9	29,1	27,1	26,3	30,6
Lenacil	14,3	15,0	16,0	15,4	13,4	18,7
Linuron	1,3	1,8	1,5	1,4	0,9	1,2
Metamitron	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Methabenzthiazuro	0,22	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4
Metobromuron	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Metoxuron	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Metribuzin	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Monolinuron	< BG	< BG	0,2	< BG	< BG	< BG
NPPB	0,42	0,7	0,3	0,3	< BG	0,2
Neburon	0,30	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2
Pentanochlor	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Phenmedipham	0,11	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Prometryne	2,7	3,0	3,5	3,2	3,4	3,4
Propanil	< BG	< BG	< BG	0,1	< BG	0,1
Propazine	0,76	1,1	0,8	0,8	0,8	1,0
Pyridate	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Simazine	4,0	3,8	2,4	3,3	3,9	3,5
Terbacil	< BG	0,2	< BG	< BG	< BG	< BG
Terbumeton	0,23	0,2	1,4	1,2	0,2	0,4
Terbuthylazine	4,1	4,6	3,7	3,6	4,6	3,4
Terbutryne	3,9	4,2	4,4	4,4	4,7	5,1

Tab. A II-1: Fortsetzung

	Hahnöfersand	Tonne	Lühe-	Schwinge	Grauerort	Pagensand
Ametryne	1,6	1,4	1,7	1,5	1,4	1,7
Atrazine	13,9	14,5	11,1	15,0	16,8	14,3
Bentazon	24,8	30,8	17,9	21,2	20,8	14,1
Bromacil	0,4	0,6	3,2	0,5	2,1	0,6
Bromoxynil	0,5	0,3	0,2	0,5	0,4	0,5
Chloridazon	2,4	1,8	1,9	2,3	2,8	2,1
Chlorobromuron	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Chlorotoluron	4,0	3,7	4,2	4,5	4,8	4,5
Cyanazine	0,8	0,8	0,5	0,9	1,5	1,3
Desmedipham	0,06	0,08	0,14	0,09	0,05	0,05
Desmetryne	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Dimefuron	0,8	1,0	0,8	0,8	1,1	1,1
Diuron	33,2	36,7	31,3	34,5	34,0	27,1
Fenuron	2,0	1,9	2,0	2,4	2,7	2,1
Hexazinone	3,9	4,1	1,9	3,7	4,4	3,7
Ioxynil	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2
Irgarol	3,7	3,6	3,9	4,4	4,3	3,9
Isoproturon	28,3	26,9	26,7	26,9	26,7	24,2
Lenacil	17,4	18,2	17,5	18,0	20,4	17,4
Linuron	1,8	1,2	1,7	1,3	0,3	0,4
Metamitron	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Methabenzthiazuron	0,4	0,3	0,4	0,3	0,4	0,3
Metobromuron	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Metoxuron	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Metribuzin	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Monolinuron	< BG	0,1	< BG	< BG	< BG	< BG
NPPB	0,7	0,6	0,3	0,1	0,2	0,3
Neburon	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2
Pentachlor	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Phenmedipham	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1
Prometryne	3,3	3,7	3,6	3,7	3,9	3,4
Propanil	< BG	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Propazine	1,0	1,0	0,7	1,2	1,0	0,9
Pyridate	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Simazine	3,4	3,2	2,8	3,4	4,5	3,9
Terbacil	< BG	< BG	0,1	0,1	< BG	< BG
Terbumeton	0,30	0,2	1,1	0,5	0,3	0,5
Terbuthylazine	3,2	3,3	2,7	3,3	3,5	3,3
Terbutryne	4,9	5,1	5,1	5,4	5,3	5,9

Tab. A II-1: Fortsetzung

	Glückstedt	Brunsbüttel	Otterndorf	Cuxhaven	Vogelsand	Nordertill
Ametryne	1,6	1,5	1,5	1,1	< BG	< BG
Atrazine	14,8	13,6	12,7	9,3	3,4	3,5
Bentazon	18,8	15,3	18,2	13,6	3,9	2,1
Bromacil	< BG	0,3	< BG	0,5	< BG	0,6
Bromoxynil	0,4	0,4	0,4	0,3	0,4	0,2
Chloridazon	3,1	1,7	1,7	1,6	1,0	1,5
Chlorobromuron	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Chlorotoluron	3,9	3,7	4,3	1,9	1,2	1,8
Cyanazine	1,4	0,8	0,9	0,7	< BG	< BG
Desmedipham	0,04	0,10	0,06	0,12	0,06	0,10
Desmetryne	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Dimefuron	1,0	0,7	0,7	0,3	0,1	0,2
Diuron	26,7	30,2	31,7	25,0	10,2	10,7
Fenuron	2,1	1,3	1,1	0,9	0,3	0,6
Hexazinone	3,6	2,4	2,1	1,2	0,3	0,3
Ioxynil	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
Irgarol	3,7	3,5	3,8	2,9	0,7	1,1
Isoproturon	21,0	14,3	12,6	7,9	3,1	5,1
Lenacil	17,5	15,7	13,4	9,0	1,5	1,0
Linuron	1,3	0,7	0,4	0,5	0,6	0,2
Metamitron	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Methabenzthiazuron	0,4	0,4	0,6	0,5	0,2	0,3
Metobromuron	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Metoxuron	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Metribuzin	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Monolinuron	< BG	0,2	< BG	0,2	< BG	< BG
NPPB	0,04	0,7	0,2	< BG	< BG	< BG
Neburon	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1
Pentanochlor	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Phenmedipham	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Prometryne	3,5	3,5	3,3	2,2	0,3	0,2
Propanil	0,1	0,1	< BG	0,1	< BG	< BG
Propazine	0,8	0,7	0,8	0,5	0,1	0,2
Pyridate	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Simazine	4,1	3,8	3,2	1,8	1,0	1,3
Terbacil	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Terbumeton	0,3	0,7	1,3	1,1	0,4	< BG
Terbutylazine	3,2	3,2	3,1	2,5	1,1	< BG
Terbutryne	4,7	4,4	4,2	2,9	1,2	< BG

Tab. A II-2: Konzentrationen von photosynthesehemmenden Liganden in Wasserproben der Elbe bei Geesthacht in Zeit von September 2003 bis August 2004.

	Sep. 03	Okt. 03	Nov. 03	Dez. 03	Jan. 04	Feb. 04
Ametryne	6,4	3,3	1,2	3,3	1,5	0,9
Atrazine	22,4	23,4	11,7	20,3	16,8	22,5
Bentazon	< BG	0,2	83,8	< BG	23,0	21,6
Bromacil	< BG	< BG	< BG	< BG	0,2	< BG
Bromoxynil	< BG	< BG	0,4	< BG	1,1	0,6
Chloridazon	4,6	3,1	1,5	0,7	1,9	0,5
Chlorobromuron	< BG	< BG	< BG	< BG	0,3	0,1
Chlorotoluron	19,4	11,6	3,5	5,6	9,1	7,4
Cyanazine	12,0	8,9	0,7	2,8	5,8	0,6
Desmedipham	< BG	< BG	0,04	< BG	0,0	< BG
Desmetryne	< BG	< BG	< BG	< BG	0,1	0,2
Dimefuron	1,1	7,5	0,7	1,8	2,2	1,2
Diuron	12,1	18,7	15,5	12,9	15,3	7,7
Fenuron	5,9	4,4	1,7	4,3	2,8	1,7
Hexazinone	10,7	6,8	10,1	6,2	6,0	4,9
Ioxynil	< BG	< BG	0,2	< BG	0,7	0,7
Irgarol	6,1	2,4	2,2	< BG	2,3	2,4
Isoproturon	14,2	13,3	27,4	16,1	17,3	16,0
Lenacil	39,0	32,0	14,3	14,8	16,4	7,2
Linuron	10,2	6,1	1,3	< BG	1,4	0,5
Metamitron	< BG	< BG	< BG	13,6	13,8	1,3
Methabenzthiazuron	4,1	< BG	0,22	< BG	0,2	0,0
Metobromuron	< BG	< BG	< BG	< BG	0,5	0,6
Metoxuron	< BG	< BG	< BG	< BG	0,4	0,4
Metribuzin	< BG	< BG	< BG	< BG	1,4	1,5
Monolinuron	< BG	< BG	< BG	< BG	0,3	0,4
Neburon	< BG	< BG	0,30	< BG	0,2	0,2
NPPB	< BG	< BG	< BG	< BG	0,4	< BG
Pentachlor	< BG	< BG	< BG	< BG	0,1	< BG
Phenmedipham	< BG	< BG	0,1	< BG	0,1	< BG
Prometryne	7,6	5,4	2,7	4,2	2,6	2,2
Propanil	< BG	< BG	< BG	< BG	0,1	0,2
Propazine	6,2	2,3	0,8	< BG	1,4	1,2
Pyridate	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Simazine	11,0	8,2	4,0	3,4	3,4	2,2
Terbacil	< BG	< BG	< BG	< BG	0,1	< BG
Terbumeton	< BG	< BG	0,2	< BG	0,2	0,1
Terbutylazine	8,8	6,2	4,1	2,6	2,7	2,4
Terbutryne	8,4	4,5	3,9	< BG	3,6	2,4

Tab. A II-2: Fortsetzung

	Mär. 04	Apr. 04	Mai 04	Jun. 04	Jul. 04	Aug. 04
Ametryne	1,4	1,1	1,1	1,3	1,7	1,6
Atrazine	20,9	17,3	35,6	72,6	36,2	40,2
Bentazon	17,3	41,2	28,7	25,2	19,6	27,4
Bromacil	< BG	< BG	0,2	1,0	3,1	2,1
Bromoxynil	2,0	2,1	0,3	0,9	0,7	2,4
Chloridazon	1,9	< BG	6,6	12,4	5,6	2,0
Chlorobromuron	0,3	< BG	0,3	< BG	< BG	< BG
Chlorotoluron	5,5	9,7	9,0	8,1	4,5	49,0
Cyanazine	0,7	14,2	3,2	1,8	0,6	0,9
Desmedipham	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Desmetryne	< BG	< BG	0,1	0,1	< BG	0,1
Dimefuron	0,4	0,3	0,4	0,6	0,7	0,6
Diuron	14,4	17,4	16,7	17,7	19,4	14,7
Fenuron	2,5	3,5	3,1	4,4	5,2	4,4
Hexazinone	4,8	4,9	7,0	6,1	13,2	5,2
Ioxynil	1,1	< BG	0,2	0,1	< BG	0,3
Irgarol	1,0	< BG	2,1	7,6	4,9	3,3
Isoproturon	21,0	18,0	11,2	9,5	11,4	9,2
Lenacil	14,1	6,6	7,2	16,5	11,0	15,9
Linuron	0,4	0,3	2,6	6,5	0,5	0,5
Metamitron	5,8	2,4	0,4	0,1	18,9	0,02
Methabenzthiazuron	0,3	< BG	0,4	0,4	0,3	0,1
Metobromuron	0,5	< BG	0,4	1,1	1,0	< BG
Metoxuron	0,3	0,3	0,2	0,2	< BG	0,1
Metribuzin	< BG	< BG	< BG	< BG	1,6	2,3
Monolinuron	< BG	< BG	0,1	0,2	0,3	0,7
Neburon	0,1	0,2	0,2	0,2	< BG	< BG
NPPB	< BG	< BG	5,0	4,2	0,6	< BG
Pentachlor	0,1	< BG	< BG	< BG	0,2	0,4
Phenmedipham	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	0,1
Prometryne	2,7	2,7	3,2	3,7	4,3	2,8
Propanil	< BG	< BG	0,1	0,1	< BG	0,1
Propazine	1,1	1,0	1,5	1,7	1,4	2,0
Pyridate	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	0,5
Simazine	3,4	3,1	6,2	8,6	11,9	8,3
Terbacil	0,1	< BG	< BG	0,3	< BG	< BG
Terbumeton	< BG	< BG	< BG	< BG	0,2	0,2
Terbuthylazine	1,5	2,7	8,9	32,3	33,3	25,5
Terbutryne	3,6	2,3	5,0	4,7	5,9	4,3

Anlage: Erfolgskontrollbericht

1 Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen

In dem Kooperationsprojekt zwischen IMBIO Uni Bonn und GKSS /Geesthacht wurde gezeigt, dass es sinnvoll ist, eine aussagekräftige Wasseranalytik mit innovativen Ansätzen zu liefern. Auf der Basis einer substanzbezogenen Analytik (GKSS), die mit einer chemischen sensitiven Schadstoffanalysetechnik im Spurenbereich Detektionsverfahren erarbeitet und einer wirkungsbezogenen Analytik (IMBIO Uni Bonn), die über die Erstellung von biologischen Rezeptor-Liganden Interaktionsstudien photosyntheseinhibierende Substanzen in Gewässern messen kann, ist eine solche Wasseranalytik mit innovativen Ansätzen – wie im vorliegenden Gesamtprojekt gezeigt wurde - durchaus realisierbar. Die Datenlage liefert weitreichende Erkenntnisse darüber, dass diese Zielsetzung bei Verlängerung des Projektes durchaus erreichbar gewesen wäre.

2 Wissenschaftlich/Technische Ergebnisse

Siehe Punkt 3 des Schlussberichtes – Zusammenfassung, S.77.

3 Fortschreibung des Verwertungsplanes

Siehe Punkte 1 und 2 des Erfolgskontrollberichts.

Nach Verlängerung des Projektes um ca. 2 Jahre zur Erreichung des Meilensteins 4 wären die Erfolgsaussichten hinsichtlich wirtschaftlicher Einschätzungen konkretisierbar.

4 Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Teilprojekt IMBIO

Da die isolierten D1-Proteine erst ab Ende 2005 vorlagen, konnte der 4. Meilenstein: „Einsatz der Zielstrukturen für die Analyse realer Wasserproben“ nicht mehr durchgeführt werden.

Teilprojekt GKSS

Da bis Beschäftigungsende (September 2005) von Herrn Dr. Olaf Heemken keine isolierten D1-Proteine bzw. Teilstrukturen vorlagen, konnte der abschließende Meilenstein „Einsatz der Zielstrukturen zur wirkungsbezogenen Identifizierung von herbiziden Schadstoffen in Gewässer“ nicht erreicht werden.

5 Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer

Anwenderkonferenzen, Photosynthese-Kongresse.

6 Einhaltung der Kosten und Zeitplanung

Der Zeitplan (s. Absch. 1.3) musste flexibel gehandhabt werden; er wurde angepasst und modifiziert. Das erste Arbeitspaket „Isolierung und Charakterisierung der Zielstrukturen (i) PS II, (ii) D1-Protein nahm mehr Zeit in Anspruch als eigentlich geplant und wurde erst am Ende des Jahres 2004 erreicht. Zwischenzeitlich lagen positive experimentelle Ergebnisse vor, die darauf hinwiesen, dass in einzelnen Experimenten das membrangebundene D1-Protein erfolgreich isoliert werden konnte. Die Isolationsprotokolle wurden jedoch über die gesamte Projektdauer immer wieder modifiziert, um die Zielstruktur des D1-Proteins reproduzierbar in ausreichenden Ausbeuten zu gewinnen. Aus diesem Grund waren im Laufe des Projektes immer wieder weitere Arbeiten zur Optimierung der Isolationsprotokolle notwendig.

Das 2. Arbeitspaket: „ Biomolekulare Wechselwirkungen zwischen Zielstrukturen und Herbiziden“ konnte früher als im Zeitplan veranschlagt erfüllt werden. Schon im Jahre 2003 konnten wesentliche Fortschritte bei der Erarbeitung von Methoden zum Nachweis der Wechselwirkungen von der D1-Zielstruktur und phytotoxischen Substanzen erreicht werden. Dazu zählte insbesondere die Entwicklung herbizidmodifizierter Chipoberflächen für die SPR-Technologie. Der Stand der wissenschaftlichen Arbeiten in diesem Bereich hatte einen deutlichen Vorlauf zur Zielsetzung des Projektes. Damit konnte der 2. Meilenstein noch vor der Planung erreicht werden.

Das 3. Arbeitspaket: „ Chemische Analyse Komplexe bzw. Liganden“ konnte wie im Zeitplan angegeben begonnen werden. Aufgrund der stetigen Optimierung der Isolationsprotokolle für die Zielstruktur des D1-Proteins bis am Ende des Jahres 2004 verlagerte sich damit auch das vom 1. Arbeitspaket/Meilenstein abhängige 3. Arbeitspaket und damit die Bearbeitung des 3. Meilensteins bis Mitte des Jahres 2005.

Das 4. Arbeitspaket: „ Bindungsstudien an realen Wasserproben“ und damit der 4. Meilenstein konnten aus Zeitgründen nicht mehr bearbeitet werden. Erste biomolekulare Interaktionsanalysen mit künstlich hergestellten Wasserproben konnten mit erfolgversprechenden Ergebnissen mit den isolierten Zielstrukturen des PS-II-Proteinkomplexes und des D1-Proteins durchgeführt werden.