

## 2 Einleitung

### 2.1 Schwermetalle/Cadmium

Schwermetalle sind natürliche Bestandteile von Ökosystemen. Insgesamt gehören rund 70 Elemente zu dieser Gruppe, und somit die Mehrheit der im Periodensystem gruppierten Elemente. Vulkanaktivität und Staubtransport stellen natürliche Quellen von Schwermetallen in der Umwelt dar (Alloway, 1999). Darüber hinaus gewinnt der anthropogene Schwermetall-Eintrag in Boden, Wasser oder Luft seit der industriellen Revolution zunehmend an Bedeutung. So kommt es u.a. durch Klärschlamm, Gülle, Deponien und Düngung zu einem direkten Eintrag von Schwermetallen in die Ökosysteme (McGrath *et al.*, 1999; Lugon-Moulin *et al.*, 2004). Zusätzlich findet ein Transport gelöster bzw. adsorbierter Schwermetalle über Fließwasser statt, welcher mit Ablagerungen in Sedimenten von Flussmündungen oder in Überschwemmungsgebieten verbunden ist (Xue & Sigg, 1998). Der Hauptanteil der vom Menschen verursachten Schwermetallbelastung wird jedoch durch Emissionen hervorgerufen. Über Müllverbrennung und Verkehr gelangen große Mengen als Dämpfe oder Aerosole in die Atmosphäre (Das & Jana, 2004). Gelangen sie in höhere Schichten kommt es zu einer Verteilung und in der Folge zu globalen Problemen.

Aufgrund der Wirkung im Organismus können Schwermetalle in drei Gruppen unterteilt werden. Essentielle Schwermetalle (Biometalle) wie Zn, Fe, Cu, Mn, Mo, Cr sind als Bestandteil enzymatischer Cofaktoren unentbehrlich, wirken aber bei zu hoher Konzentration toxisch. Zu den potentiell toxischen Schwermetallen zählt man z.B. Sb, Sn, Zr, Bi, Th und die Lanthaniden. Aufgrund ihrer mangelnden Bioverfügbarkeit bzw. Seltenheit gelten sie in der Literatur für Lebensprozesse irrelevant. Zu den schon in geringen Dosen toxisch wirkenden Schwermetallen gehören neben Hg, Pb und Metalloxyanionen (z.B. Arsenat, Chromat) auch das im Mittelpunkt dieser Arbeit stehende Cadmium. Bislang wird dieses Metall nur in einem einzigen Fall als essentieller Cofaktor beschrieben. Eine Cd(II)-spezifische Carboanhydrase übernimmt unter Zn(II)-Mangel die Funktion einer Zn(II)-Carboanhydrase in der marinen Diatomee *Thalassiosira weissflogii* (Lane & Morel, 2000; Lane *et al.*, 2005).

Cd(II) kommt in geringer Konzentration in der Umwelt vor. Der Cd(II)-Gehalt unbelasteter Böden beträgt weniger als  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  Trockenmasse. Jedoch führten anthropogene Aktivitäten zur lokalen Anreicherung um das 50-fache (Das *et al.*, 1997). Der in Cd/Zn-Hütten als Abfallprodukt auftretende Sinter kann sogar Cd(II)-Konzentrationen von bis zu  $7,0 \text{ mg kg}^{-1}$  aufweisen (Ernst, 2005). Die Aufnahme von Cd(II) durch die pflanzliche Rhizosphäre hängt von Parametern wie pH-Wert, Temperatur, Durchlüftung sowie Konzentration anderer Makro- und Spurenelemente im Boden ab (Page & Feller, 2005; Worms *et al.*, 2006). Es wird vermutet,

dass die Aufnahme nicht-essentieller Schwermetalle wie Cd(II) und Pb(II) durch Kationen-Transporter mit breiter Substratspezifität erfolgt (Reviews: Yang *et al.*, 2005; Colangelo & Guerinot, 2006). So gibt es Hinweise darauf, dass der Cd(II)-Transport durch ZIP-Proteine (*zinc/iron regulated transporter protein*); z.B. ZNT1 und ZNT2 (Mizuno *et al.*, 2005), Nramp (*natural resistance associated macrophage protein*), wie AtNramp3 (Hall & Williams, 2003), LCT1 (*low-affinity cation transporter*) sowie durch Ca- und K-Kanäle (Perfus-Barbeoch *et al.*, 2002) erfolgt. Außerdem spielen P-Typ-ATPasen (HMA2 und HMA4) und CDF-Proteine (*cation diffusion facilitator*) sowohl bei der Homöostase essentieller Schwermetalle als auch beim Transport von Cd(II) eine wichtige Rolle (Colangelo & Guerinot, 2006).

Die Ursachen der Toxizität von Schwermetallen wie Cd(II) sind vielfältig. Gemäß dem HSAB-Konzept (*hard and soft acids and bases*) von Pearson (1963) wird Cd(II) als weiche Säure (*soft acid*) klassifiziert. Demnach reagiert es aufgrund seiner voluminösen und leicht polarisierbaren d-Orbitale leicht mit den Sulfhydryl-, Amino- und Iminogruppen von Proteinen und führt so zur Protein-Inaktivierung. Ebenso ist Cd(II) in der Lage, essentielle Metalle aus dem aktiven Zentrum von Enzymen zu verdrängen (Van Assche, 1990). So konkurriert Cd(II) mit Zn(II), Cu(II) und Fe(II) um die Bindungsplätze in Metalloproteinen. Hierbei kommt es wiederum zu Aktivitätsänderungen und dem Verlust metabolischer Funktionen. Außerdem wurde beschrieben, dass Cd(II) die Elektrolytgleichgewichte eines Organismus empfindlich stören kann (Mishra *et al.*, 2006).

An Cd(II)-belasteten Pflanzen wurden zahlreiche Schäden beobachtet (Review: Bertrand & Poirier, 2005). In den meisten Publikationen wird hervorgehoben, dass Cd(II) einen Inhibitor schwefelhaltiger Proteine darstellt (Benavides *et al.*, 2005; Hassan *et al.*, 2005). Cd(II) führt in Pflanzen zu einer Verminderung der Photosyntheseleistung und der Transpiration sowie einer Zunahme der Atmungsrate. Makroskopisch kommt es nach Cd(II)-Exposition zu einer Abnahme der Blattfläche und des Wurzelwachstums. Nekrosen, Chlorosen und Verringerung der Keimfähigkeit werden auch in Verbindung mit diesem Schwermetall gebracht (Sanità Di Toppi & Gabbrielli, 1999; Wu *et al.*, 2005). Cd(II) geht Wechselwirkungen mit Chloroplasten (Faller *et al.*, 2005) und Mitochondrien (Hanikenne *et al.*, 2005) ein, die gleichfalls Veränderungen im Stoffwechsel dieser Pflanzenkompartimente hervorrufen. Im Fall der Chloroplasten hemmt Cd(II) die Photoaktivierung des Wasserspaltungsapparates, bei Mitochondrien wirkt es inhibierend auf die oxidative Phosphorylierung. Obwohl es selbst kein redox-aktives Metall ist, kann Cd(II) indirekt über Wechselwirkungen mit dem antioxidativen System oder der Elektronentransportkette oxidativen Stress verursachen (Romero-Puertas *et al.*, 2004; Dietz, 2005; Smeets *et al.*, 2005). Zusätzlich besteht die Möglichkeit, redoxaktive Metalle

wie Cu oder Fe aus ihren natürlichen Bindungsstellen zu verdrängen. Diese katalysieren dann Fenton-Reaktionen. Die dadurch entstehenden, freien ROS-Radikale (*reactive oxygen species*) schädigen pflanzliche Membranlipide, Proteine, Pigmente und Nukleinsäuren, die somit ebenso zum Schadbild unter Cd(II) zählen können (Foyer *et al.*, 1994; Seregin & Ivanov, 2001). Unyayar *et al.* (2006) beschrieben sowohl geno- als auch cytotoxische Cd(II)-Wirkungen an *Allium sativum* und *Vicia faba*.

## 2.2 Mechanismen der Schwermetall-Detoxifikation

Allgemein werden zwei Prinzipien der Schwermetall-Adaptation bei pro- und eukaryotischen Organismen unterschieden. Der verringerte (Restriktion) bzw. inhibierte Import (Exklusion) von Schwermetallen wird unter dem Begriff „*avoidance*“ (Vermeidung) zusammengefasst. Diese Maßnahmen wirken extrazellulär und erschweren bzw. verhindern das Eindringen des Metalls in den intrazellulären Raum. Das „*tolerance*“-Prinzip (Toleranz) umfasst intrazelluläre Mechanismen, die eine Akkumulation bzw. Inaktivierung der Metalle durch Chelatierung an Aminosäuren, Peptiden oder Proteinen bewirken. Dabei wird eine Störung essentieller Prozesse (Photosynthese, Transkription/Translation) durch Verringerung der Konzentration freier Ionen unterbunden. Somit ist deren Gehalt im Cytosol praktisch Null (Finney & O'Halloran, 2003). *Avoidance*- und *tolerance*-Mechanismen sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Tab. 1 Möglichkeiten der *avoidance*- und *tolerance* gegenüber Schwermetallen nach Maywald & Weigel (1997); \* - in der vorliegenden Arbeit untersucht

„ <i>avoidance</i> “-Mechanismen	„ <i>tolerance</i> “-Mechanismen
- Immobilisierung von Schwermetallen in der Zellwand*	- Bildung intrazellulärer Chelatoren (Phytochelatine, Metallothioneine, organische Liganden)*
- Modifikationen der Membranpermeabilität	- Änderungen der subzellulären Metallkompartimentierung
- Sekretion metallbindender Exsudate in das Medium	- Veränderungen im Zellstoffwechsel*, z.B. Aktivierung alternativer Stoffwechselwege

In Tab. 2 sind Beispiele für Mechanismen der Metall-*avoidance* und *-tolerance* dargestellt (Review: Callahan *et al.*, 2006).

Tab. 2 Beispiele für Mechanismen der Metall-*avoidance* und -*tolerance*

	Metall	Mechanismus	Pflanzenspezies	Referenz
<i>avoidance</i>	Al(III)	- Sekretion organischer Säuren (Zitronensäure, Oxalsäure)	<i>Zea mays</i> <i>Triticum aestivum</i>	Ma <i>et al.</i> (2001)
	Ni(II)	- Sekretion von Histidin und Zitronensäure	<i>Thlaspi goesingense</i>	Salt <i>et al.</i> (2000)
	Cu(II)	- Bindung an Proteine der Zellwand	<i>Silene vulgaris</i>	Bringezu <i>et al.</i> (1999)
	Zn(II), Sn(II)	- Immobilisierung als Silikate in der Zellwand	<i>Silene vulgaris</i>	Bringezu <i>et al.</i> (1999)
	Al(III)	- Immobilisierung als Oxalat in der Rhizosphäre	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Ma <i>et al.</i> (1997)
<i>tolerance</i>	Al(III)	- Entgiftung als Oxalat in den Blättern	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Ma <i>et al.</i> (1997)
	Ni(II)	- Bindung an Histidin im Xylem	<i>Thlaspi caerulescens</i>	Kraemer <i>et al.</i> (1996)
	Cd(II), Ni(II)	- Komplexierung durch Citrat und Histidin	<i>Alyssum lesbiacum</i>	Clemens (2002)
	As(III)	- Komplexierung durch Phytochelatine	<i>Holcus lanatus</i> <i>Pteris cretica</i>	Raab <i>et al.</i> (2004)
	Zn(II)	- Komplexierung durch Nicotianamin	<i>Arabidopsis halleri</i>	Weber <i>et al.</i> (2004)
	Cd(II)	- Bindung an Phytochelatine	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clemens (2006)

Im Gegensatz zur *avoidance* wurden für *tolerance*-Mechanismen bedeutend mehr Studien durchgeführt. Dazu zählt die Synthese schwermetallchelatierender Phytochelatine (PC) bzw. organischer Säuren sowie Schwermetall-Transport und -Sequestrierung (Hall, 2002).

Im Fall einer Anpassung an erhöhte Cd(II)-Konzentrationen sind nur wenige Arbeiten zur *avoidance* bei höheren Pflanzen bekannt. Hierunter zählen das Zurückhalten von Cd(II) durch die Wurzel (Punz & Sieghardt, 1993), die Adsorption an der Zellwand von mycorrhizierten Wurzeln (Rivera-Becerril *et al.*, 2005) bzw. die Ablagerung in Trichomen der Blattoberfläche und der Abwurf Cd(II)-enthaltender Blätter (Salt *et al.*, 1995). Zahlreiche Studien liegen zur Cd(II)-*tolerance* vor. Von zentraler Bedeutung sind die cytoplasmatische Komplexierung und Sequestrierung durch organische Säuren (Hall, 2002), Aminosäuren und Peptiden (Clemens, 2002; Clemens, 2006; Sharma & Dietz, 2006). Cystein-reichen schwermetallbindenden Peptiden

kommt in der pflanzlichen Schwermetallstressantwort eine besondere Rolle zu (Sharma & Dietz, 2006). Bei der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe*, welche als Modellsystem zur Untersuchung der Schwermetall-Homöostase in Pflanzen gilt (Clemens & Simm, 2003), wurde der Mechanismus der Cd(II)-Detoxifizierung ausführlich untersucht. Die im Cytosol gebildeten PC-Cd-Komplexe werden als LMW-Komplexe (*low molecular weight*, niedermolekular) bezeichnet und über den tonoplastidären HMT1-Transporter in die Vakuole transportiert. Dort wird schließlich Cd(II) nach Einbau von Sulfid als HMW-Komplex (*high molecular weight*, hochmolekular) gelagert. Auch für Pflanzen ist die Schwermetall-Chelatierung durch PC von größter Wichtigkeit (Reviews: Cobbett & Goldsbrough, 2002; Clemens, 2006). PC haben die allgemeine Formel  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  wobei n Werte von 2 bis 11 annehmen kann (Vatamaniuk *et al.*, 2004). Sie wurden zuerst in *Schizosaccharomyces pombe* entdeckt und als Cadystine bezeichnet (Murasugi *et al.*, 1981). Da zunächst angenommen wurde, dass PC nur von Pflanzen und Hefen, jedoch nicht von Tieren gebildet werden, wurden sie als **Phytochelatine** benannt. Später wurde das an der PC-Synthese beteiligte Enzym in Tieren (*Caenorhabditis elegans* u.a.) nachgewiesen (Clemens *et al.*, 2001; Vatamaniuk *et al.*, 2001). In verschiedenen Pflanzenarten wurden neben „kanonischen“ PC, die sich aus Glutathion ableiten, sogenannte Iso-Phytochelatine nachgewiesen, die in sechs Familien zusammengefasst werden können (Tab. 3).

Tab. 3 Familien der Iso-PC und Beispiele für ihr Vorkommen

Bezeichnung	Struktur	Metall	Pflanzenspezies	Referenz
Homo-PC	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$	Pb(II)	<i>Pisum sativum</i> <i>Vicia faba</i>	Piechalak <i>et al.</i> (2002)
		Cd(II)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Sarry <i>et al.</i> (2006)
Hydroxymethyl-PC	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$	Cd(II)	<i>Oryza sativa</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	Klapheck <i>et al.</i> (1994) Sarry <i>et al.</i> (2006)
Iso-PC mit C-terminalen Glu	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Glu}$	Cd(II)	<i>Zea mays</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	Meuwly <i>et al.</i> (1995) Sarry <i>et al.</i> (2006)
Iso-PC mit C-terminalem Gln	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gln}$	Cd(II)	<i>Armoracia rusticana</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	Kubota <i>et al.</i> (2000) Sarry <i>et al.</i> (2006)
Desglycyl-PC	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$	Cd(II)	<i>Oryza sativa</i> <i>Zea mays</i>	Klapheck <i>et al.</i> (1994) Meuwly <i>et al.</i> (1995)
PC mit fehlendem $\gamma\text{-Glu}$	$\text{Cys}-(\gamma\text{-Glu-Cys})_{n-1}\text{-Gly}$	Cd(II)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Sarry <i>et al.</i> (2006)

Die Synthese der kanonischen PC wird durch das konstitutiv exprimierte Enzym Phytochelatin-Synthase (PCS) katalysiert, wobei  $\gamma$ -Glu-Cys auf das naszierende PC (bzw. GSH bei PC<sub>2</sub>) übertragen wird (Rea, 2006). Dabei kommt es zu einer Abnahme des intrazellulären GSH-Gehaltes, als Funktion von Metallkonzentration und Expositionsdauer. Die PC-Synthese erfolgt erst nach posttranslationaler PCS-Aktivierung durch Schwermetallionen. Dabei ist Cd(II) als effektivster Induktor bekannt. Daneben wirken auch Pb(II), Zn(II), Cu(II), As(V) und Hg(II) PCS-aktivierend (Klapheck *et al.*, 1995). Mittels HPLC-ICP konnten *in vivo* jedoch nur PC-Komplexe mit Cd-, Cu- bzw. As-Ionen nachgewiesen werden (Maitani *et al.*, 1996). PCS-Gene wurden in *A. thaliana* (Ha *et al.*, 1999; Vatamaniuk *et al.*, 1999) und *S. pombe* (Ha *et al.*, 1999) identifiziert. Navaza *et al.* (2006) zeigten anhand von ICP-MS-Analysen, dass Phytochelatine für die Entgiftung von Cd(II) und As(III) in *Brassica juncea* notwendig sind. Eine Überexpression der PCS1 aus *A. thaliana* in *Nicotiana tabacum* führte zu einer signifikant erhöhten Cd(II)-Bioakkumulation und gesteigerten PC-Synthese (Pomponi *et al.*, 2006). Jedoch muss eine Erhöhung der PC-Menge nicht immer mit einer gesteigerten Cd(II)-Toleranz verbunden sein. Dies wurde für *Brassica napus* und *Brassica juncea* gezeigt (Gadapati & Macfie, 2006).

Neben den enzymatisch synthetisierten PC gibt es Cys-reiche (25 - 33 %) Polypeptide, die im Verdacht stehen, an der Schwermetall-Detoxifikation beteiligt zu sein. Diese als Metallothioneine (MT) bezeichneten, niedermolekularen (8 - 10 kDa) Proteine sind genkodiert (Rausser, 1999). Sie weisen nur selten aromatische Aminosäuren auf. In *Triticum aestivum* wurde 1986 das erste pflanzliche MT entdeckt (Kaneta *et al.*, 1986). Durch MT könnten Schwermetalle über die Sulfhydryl-Gruppen des Cysteins chelatiert werden (Domenech *et al.*, 2006). So berichtet Hamer (1986) von bis zu 12 Mol als Mercaptid gebundenen Metallatomen pro Mol Metallothionein. Die Rolle pflanzlicher MT ist weitgehend ungeklärt, diskutiert wird eine Beteiligung an der Cu(II)-Homöostase (van Hoof *et al.*, 2001; Clemens *et al.*, 2003).

### 2.3 Reduktive Sulfatassimilation

Durch die Sulfatassimilation (*sulfate assimilation pathway*, SAP) wird in Pflanzen Cystein bereitgestellt. Diese proteinogene Aminosäure ist auch Präkursor für die Synthese von Methionin und Glutathion (GSH). GSH stellt für Pflanzen die größte Quelle an organischem, nicht-proteinogenem Schwefel dar und ist die wichtigste Transportform reduzierten Schwefels (Foyer *et al.*, 2005). Neben seiner Funktion als zelluläres Antioxidans, ist es für die Regulation des Pflanzenwachstums von großer Bedeutung (Maughan & Foyer, 2006).

Der Hauptteil des pflanzlichen Schwefels stammt vom Sulfat, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Im Gegensatz dazu spielt die Versorgung über SO<sub>2</sub> aus der Luft oder reduzierte S-Verbindungen wie H<sub>2</sub>S eine geringe

Rolle (Leustek *et al.*, 2000). Innerhalb der reduktiven  $\text{SO}_4^{2-}$ -Assimilation werden schrittweise acht Elektronen übertragen und schließlich die Oxidationsstufe von  $\text{H}_2\text{S}$  (-II) erreicht. Die Sulfatassimilation (s. Abb. 1) kann in vier Phasen (Import, Aktivierung, Reduktion, Transfer) eingeteilt werden (Hell, 1997; Leustek & Saito, 1999).

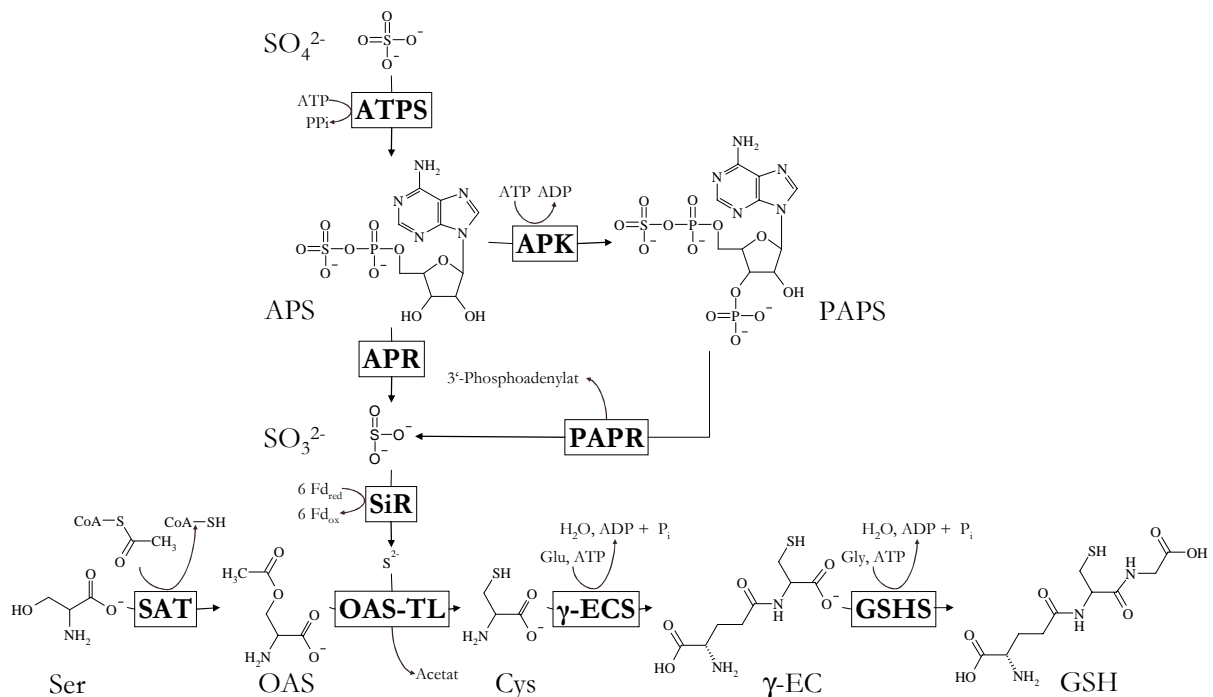


Abb. 1 Sulfat-Assimilation und Glutathion-Biosynthese in *P. patens* modifiziert nach Koprivova *et al.* (2002)

In der ersten Phase wird Sulfat über Sulfat-Transporter der Wurzel aufgenommen und über das Xylem in die Blätter transportiert. Anschließend erfolgt in den Chloroplasten eine ATP-abhängige Aktivierung durch die ATP-Sulfurylase (ATPS). Das Reaktionsprodukt, Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS), kann durch zwei Enzyme weiter umgesetzt werden. Entweder erfolgt ein erneuter Aktivierungsschritt durch die APS-Kinase (APK) zu 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS) oder es wird zu Sulfit ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) über die APS-Reduktase (APR) reduziert. Hinsichtlich der Möglichkeit, Sulfit zu bilden, bilden die Moose *P. patens* (Koprivova *et al.*, 2002) und *Selaginella lepidophylla* (Kopriva *et al.*, 2006) im Pflanzenreich eine Ausnahme. Demnach existieren in diesen Pflanzen zwei Wege zur Sulfit-Bildung. Zum einen die pflanzentypische, direkte Bildung von Sulfit über APR und zum anderen der in Enterobakterien und Pilzen vorherrschende, indirekte Weg über APK/PAPS-Reduktase (PAPR), bei dem das „Zwischenprodukt“ PAPS entsteht. Zwar besitzen auch höhere Pflanzen die Fähigkeit, PAPS über die APK-Reaktion zu bilden, jedoch weisen sie keine PAPR auf. PAPS dient hier, wie bei allen anderen Organismen auch, als Sulfatierungsmittel von Proteinen und Lipiden.

Die dritte Phase der Sulfatassimilation umfasst die schrittweise Übertragung von Elektronen. Die Sulfit-Reduktase (SiR) überträgt ähnlich der strukturell verwandten Nitrit-Reduktase sechs Elektronen auf  $\text{SO}_3^{2-}$ , wobei Sulfid entsteht. Dem SiR-Enzym von *P. patens* bzw. *S. lepidophylla* kommt eine besondere Bedeutung zu, da es, im Gegensatz zu höheren Pflanzen und Enterobakterien, von zwei Enzymen mit Sulfit versorgt wird. Da  $\text{SO}_3^{2-}$  ein starkes Oxidationsmittel und Zellgift ist, werden an die APR/PAPR-Regulation hohe Ansprüche gestellt. Voraussetzung für die Weiterverarbeitung des Sulfids ist die Bereitstellung eines geeigneten Akzeptors, dem O-Acetylserin (OAS). Dieser durch die Serin-Acetyl-Transferase (SAT) gebildete Präkursor wird aus Serin und Acetyl-Coenzym A synthetisiert. Der letzte Schritt der Sulfatassimilation wird durch das Enzym O-Acetylserin(thiol)lyase katalysiert. Bei dieser Reaktion wird  $\text{H}_2\text{S}$  auf O-Acetylserin übertragen, wobei Cystein entsteht. SAT und OAS-TL bilden zusammen einen Multienzymkomplex, der als Cystein-Synthase bezeichnet wird (Hell, 2002). Die biochemischen Charakteristika der Enzyme der Sulfatassimilation und der in Abschnitt 2.4 beschriebenen Glutathion-Biosynthese sind in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4 Eigenschaften der Enzyme der Sulfatreduktion und der Glutathion-Biosynthese in höheren Pflanzen, die Molmasse bezieht sich auf die Molekulargewichte von *A. thaliana*-Enzymen

Enzym	EC-Nr.	Molmasse (kDa) Monomer	Cofaktor bzw. Reduktionsmittel	Typ
ATPS	2.7.7.4	52-54	-	Homotetramer
APR	1.8.99.2	49	Glutathion	Homodimer
SiR	1.8.7.1	65	Ferredoxin Sirohäm	Homodimer
SAT	2.3.1.30	32-34	-	Homotetramer
OAS-TL	4.2.99.8	35	Pyridoxalphosphat	Homodimer
$\gamma$ -ECS	6.3.2.2	51	-	Monomer
GSHS	6.3.2.3	50	-	Homodimer

Die komplette Reaktionsfolge der Sulfatassimilation findet nur in Plastiden statt. Die Bildung von Cystein aus Sulfid und OAS ist in den Mitochondrien und im Cytosol möglich (Leustek *et al.*, 2000). Außerdem wird im Cytoplasma PAPS als Sulfatierungssubstanz gebildet. Eine Übersicht über die subzelluläre Lokalisierung der Sulfatreduktion ist in Abb. 2 dargestellt.



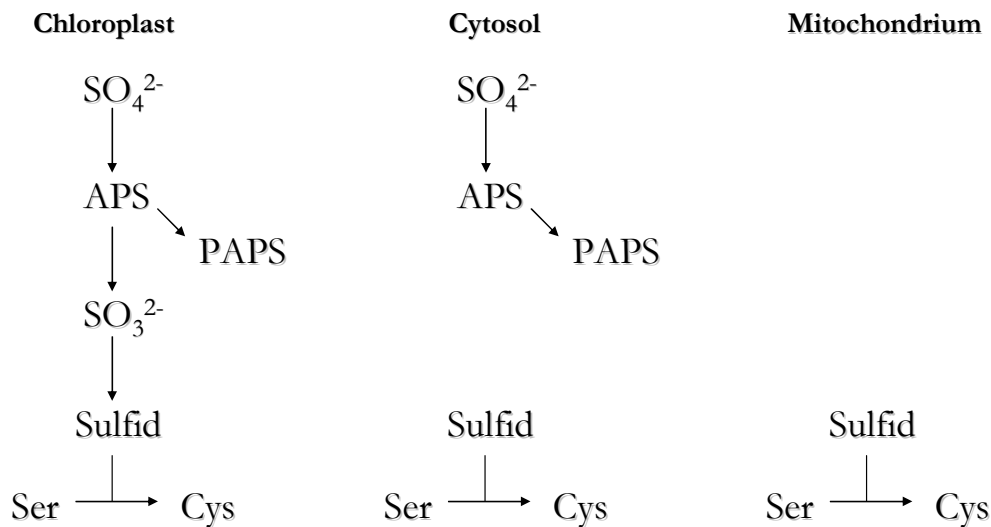


Abb. 2 Subzelluläre Lokalisierung einzelner Schritte der Sulfatassimilation in höheren Pflanzen (nach Kopriva, 2006 unveröffentlichte Ergebnisse)

Zahlreiche Studien an *A. thaliana* trugen zur Aufklärung der generellen Mechanismen der SAP-Kontrolle bei. Hierbei wurde eine enge Vernetzung von Sulfatreduktion mit dem C- und N-Stoffwechsel gezeigt (Kopriva & Rennenberg, 2004). So konnte eine Korrelation zwischen Licht (Kopriva *et al.*, 1999) bzw. Stickstoffversorgung (Koprivova *et al.*, 2000) mit der APR-Aktivität nachgewiesen werden. Für die Regulation der Sulfatassimilation wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen (Neuenschwander *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1997; Lappartient *et al.*, 1999; Hawkesford *et al.*, 2003). Anhand von zahlreichen Experimenten wurde bestätigt, dass die Cys-Biosynthese durch Sulfat-Verfügbarkeit, Regulation der Genexpression und allosterischer Regulation der Enzymaktivitäten gesteuert wird (Review: Hawkesford & De Kok, 2006). Vor allem an unter S-Mangel-Bedingungen angezogenen Pflanzen wurden wichtige Erkenntnisse gewonnen. So wirkt sich eine unzureichende Sulfat-Versorgung stark auf die Aminosäure-Synthese aus (Nikiforova *et al.*, 2006). Unter S-Mangel wird die  $\text{SO}_4^{2-}$ -Aufnahme erhöht, während sie nach ausreichender Sulfatzufuhr wieder verringert wird (Smith *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 2000). Das *de-repression*-Modell beinhaltet die *feedback*-Hemmung durch Endprodukte der Sulfatassimilation (Cys) bzw. Glutathion-Biosynthese (GSH). Herschbach & Rennenberg (1994) konnten in Tabak eine Verringerung von  $\text{SO}_4^{2-}$ -Aufnahme und -Translokation durch Cys und GSH feststellen. In unter S-Mangel angezogenem *Zea mays* hingegen bewirkte nur Cys eine verringerte Expression von Sulfattransportern und ATP-Sulfurylase. Die cytosolische SAT wird bei *A. thaliana* bereits durch einen niedrigen Cystein-Spiegel *feedback*-reguliert. Im Fall der SAT-Isoformen in Mitochondrien und Chloroplasten ist dies nicht der

Fall, was auf eine separate Regulation in diesen Organellen hindeutet (Jost *et al.*, 2000). Glutathion wirkt hemmend auf die frühen Schritte der Sulfatreduktion. Durch eine *feedback*-Inhibierung kontrolliert es die ATPS- und APR-Reaktion (Lappartient & Touraine, 1996; Vauclare *et al.*, 2002). Eine weitere wichtige Rolle bei der Regulation der Sulfatassimilation spielt der Cystein-Präkursor OAS, welcher Gegenstand des OAS-Modells ist. Dieser Metabolit reichert sich unter unzureichender Sulfat-Versorgung an. Die Transkription vieler Gene der Sulfatassimilation wird durch OAS aktiviert, wobei Cystein diese Wirkung teilweise umkehrt (Smith *et al.*, 1997; Brzywczy *et al.*, 2002). Hirai *et al.* (2005) konnten an *A. thaliana* nachweisen, dass die Expression von *atps3*, *apr2* bzw. *apr3* und einigen Sulfattransportern eng an die OAS-Konzentration gekoppelt ist. Jedoch war die mRNA-Menge von APK und SiR unabhängig vom OAS-Gehalt. Anhand von Transkriptom-Studien an *A. thaliana* wurde die Funktion von OAS als universellem Genregulator deutlich. Eine 48-stündige Exposition mit 1 mM OAS beeinflusste die Transkription von 850 Genen (Hirai *et al.*, 2003). Jedoch hängt nicht nur die Genexpression vom OAS-Level ab, OAS beeinflusst auch die Stabilität des Cystein-Synthase-Komplexes. Eine Konzentrationsverdopplung führt bereits zur Dissoziation und somit zur SAT-Inaktivierung (Berkowitz *et al.*, 2002).

## 2.4 Glutathion

Das Tripeptid Glutathion ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly,  $\gamma$ -Glutamylcysteinylglycin, Abb. 3) wird in zwei ATP-abhängigen Reaktionen aus den Aminosäure-Bausteinen gebildet (s. Abb. 1). Die erste Reaktion wird vom Enzym  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase ( $\gamma$ -ECS) katalysiert. Dabei wird aus Glutamat und Cystein das Dipeptid  $\gamma$ -Glutamylcystein ( $\gamma$ -EC) gebildet, welches eine partielle Isopeptidbindung aufweist. Im zweiten Schritt der GSH-Biosynthese verknüpft die GSH-Synthetase (GSHS) Glycin mit dem C-terminalen Ende von  $\gamma$ -EC.

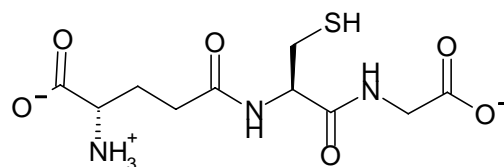


Abb. 3 GSH-Struktur

In *A. thaliana* und *Brassica juncea* wurde eine Kompartimentierung der GSH-Bildung nachgewiesen (Wachter *et al.*, 2005). Die Autoren zeigen eine plastidäre  $\gamma$ -ECS-Lokalisation, während die Bildung von GSH hauptsächlich im Cytosol stattfindet.

Die Regulation der GSH-Biosynthese ist bedarfsabhängig. Die  $\gamma$ -ECS-Reaktion stellt dabei den limitierenden und somit am stärksten regulierten Schritt der GSH-Synthese dar (Noctor *et al.*, 1996). Außerdem wird die GSH-Synthese nicht nur durch die Sulfat- bzw. Substratverfügbarkeit beeinflusst, sondern unterliegt auch einer durch GSH hervorgerufenen *feedback*-Hemmung des  $\gamma$ -ECS-Enzyms (Hell & Bergmann, 1990; Arisi *et al.*, 1997; Jez *et al.*, 2004). Die Transkription der Gene von  $\gamma$ -ECS bzw. GSHS, *gsb1* und *gsb2*, unterliegt einer strikten Regulierung (Schäfer *et al.*, 1998; Harada *et al.*, 2000). Zusätzlich spielen Mechanismen der Translationskontrolle für die Regulation der GSH-Biosynthese eine Rolle (Xiang & Oliver, 1998). Bei Betrachtung der circadianen Rhythmik der GSH-Bildung fällt auf, dass der Großteil an GSH tagsüber gebildet wird, während die *de novo*-Synthese nachts nahezu zum Erliegen kommt. Dies liegt an der Bereitstellung von Gly, welches in Pflanzen hauptsächlich durch die Photorespiration gebildet wird.

GSH ist mit einer millimolaren Konzentration das wichtigste niedermolekulare Thiol der Zelle (Maughan & Foyer, 2006). Aufgrund seiner chemischen Eigenschaften übernimmt es vielfältige Funktionen im Zellstoffwechsel. Die wohl wichtigste Aufgabe von GSH in Pflanzen stellt dessen Wirkung als Redoxpuffer dar. Hierbei kommt dem als Redoxstatus bezeichneten GSH/GSSG-Verhältnis in der Zelle eine besondere Bedeutung zu. Sinkt dieser Quotient unter einen bestimmten Wert kommt es zu einer akuten Schädigung der Zelle durch oxidativen Stress (Noctor, 2006). Dabei wirkt GSH als Reduktionsmittel bei der Beseitigung von ROS (*reactive oxygen species*, reaktive Sauerstoff-Spezies) und anderen oxidierten Substraten, wobei es selbst zum Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert wird. So kann es aufgrund seiner nucleophilen Sulfhydryl-Gruppe direkt mit ROS wie dem Superoxid-Anion  $O_2^-$  reagieren. Die Fähigkeit der Zelle, ROS anhand des GSH-Redox-Systems zu entgiften, hängt schließlich von der Größe des GSH-Pools, dem o.g. Redoxstatus und der Aktivität der GSH-Reduktase zusammen, welche GSH aus GSSG unter NADPH-Verbrauch recycelt (Foyer *et al.*, 2005). Eine weitere wichtige Funktion übernimmt GSH im Ascorbat-GSH-Zyklus bei der Regeneration von Ascorbat. Das daran beteiligte Enzym, Dehydroascorbat-Reduktase (DHAR), katalysiert die Redoxreaktion, bestehend aus der Reduktion von Dehydroascorbat zum Ascorbat bzw. der Oxidation von 2 GSH zu GSSG. Ascorbat ist über die Ascorbat-Peroxidase an der für die Pflanze bedeutsamen Entgiftung von Wasserstoffperoxid involviert. Überdies ist GSH wichtiger Bestandteil der durch Glutathion-S-Transferasen katalysierten Xenobiotika-Entgiftung (Dixon *et al.*, 2002). Andere essentielle Funktionen übernimmt GSH als Substrat von Peroxidasen (GSH-Peroxidase), beim Schutz von Membranen und als Reduktionsmittel von Protein-Disulfid-Bindungen.

Generell führen Stressbedingungen zu einer Veränderung des GSH-Gehaltes bei Pflanzen (Reviews: Mullineaux & Rausch, 2005; Maughan & Foyer, 2006). So führen Licht-Stress (Muller-Moule *et al.*, 2003), Salz-Stress (Borsani *et al.*, 2001) und Phosphormangel (Kandlbinder *et al.*, 2004) zu einem Anstieg des GSH-Spiegels bei *A. thaliana*. Hingegen tragen Schwefelmangel (Nikiforova *et al.*, 2003) und Schwermetall-Stress (PC-Synthese, Xiang & Oliver, 1998) zur Verringerung des GSH-Spiegels bei. Im Unterschied dazu wurde in Schwermetall-belasteten Moosen ein deutlicher Anstieg der GSH-Konzentration beobachtet, wobei keine PC-Synthese nachweisbar war (Bruns *et al.*, 2001). Elektronenmikroskopische Analysen wiesen hierbei auf eine cytoplasmatische Cd(II)-Bindung an Schwefel hin. Auch in Pilzen wird eine Funktion von GSH als Cd(II)-Chelator (s. Abb. 4) vermutet (Review: Bellion *et al.*, 2006). So wurde im aquatischen Hyphomycet *Heliscus lugdunensis* (Jaeckel *et al.*, 2005) und im Basidiomyceten *Paxillus involutus* (Courbot *et al.*, 2004) ein Anstieg des GSH-Gehaltes nach Cd(II)-Applikation festgestellt.

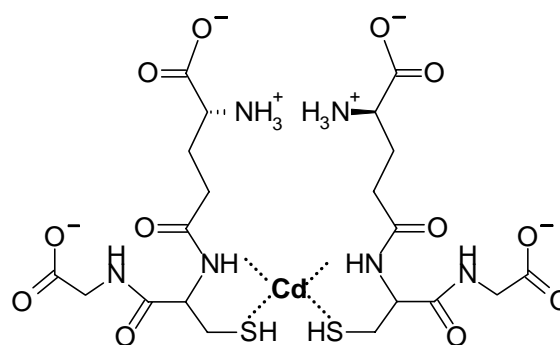


Abb. 4 Hypothetische Struktur des Bis(glutathionato)cadmium-Komplexes nach Li (1997)

## 2.5 Modellorganismus *Physcomitrella patens*

In der vorliegenden Arbeit wurde das terrestrische Moos *Physcomitrella patens* zum Studium Schwermetall-induzierter Veränderungen der Sulfatassimilation und der GSH-Biosynthese verwendet. Diese zur Gruppe der Musci (Laubmoose) gehörende, niedere Pflanze wurde zunächst als Modellorganismus zum Studium der pflanzlichen Ontogenese benutzt (Lorenz *et al.*, 2003; Repp *et al.*, 2004). In den letzten Jahren nahm die Bedeutung von *P. patens* als pflanzlicher Modellorganismus stetig zu (vgl. Rennenberg & Elzenga, Plant Biology, Special Issue *Physcomitrella patens*, Heft 03, Jahrgang 7; Mai 2005). Viele Arbeitsgruppen haben mit Studien an *P. patens* begonnen, was u.a. in der günstigen Anwendung spezieller molekularbiologischer Techniken begründet ist (Heintz *et al.*, 2004; Sarnighausen *et al.*, 2004). Ein Beispiel hierfür ist die gute Transformierbarkeit und die einfache Herstellung von *knockout*-Mutanten

mittels homologer Rekombination (Imaizumi *et al.*, 2002; Schaefer, 2002; Mittmann *et al.*, 2004). Dadurch lässt sich die Funktion der Gene von *P. patens* einfach untersuchen. Die Rate der homologen Rekombination ist um einige Größenordnungen höher im Vergleich mit anderen Modellsystemen (Schaefer & Zryd, 1997). Aufgrund der hohen Sequenzhomologie mit höheren Pflanzen können auch deren Gene am Modellobjekt *P. patens* analysiert werden. So wurde gezeigt, dass 66 % der Gene von *A. thaliana* homologe Vertreter im Gametophyt-Transkriptom von *P. patens* besitzen (Nishiyama *et al.*, 2003). Außerdem sind Moose mit höheren Pflanzen hinsichtlich Gen-Vorkommen, Expression und Regulation vergleichbar (Reski, 1998). Das wachsende Interesse an *Physcomitrella* bewirkte schließlich die Aufnahme von Sequenzierprojekten (Genom, ESTs). Bisher sind über 100.000 frei zugängliche EST-Sequenzen aus *P. patens* verfügbar (Nishiyama *et al.*, 2003).

Bei Gegenüberstellung mit anderen Modellpflanzen besitzt *P. patens* zahlreiche Vorteile (Review: Cove *et al.*, 2006). So ist neben dem einfachen Aufbau eine leichte Kultivierung in anorganischem Medium möglich, ohne dass Wachstumsstoffe wie Vitamine oder Phytohormone notwendig sind (Nishiyama *et al.*, 2000). Außerdem ist es als photoautotrophe Pflanze nicht auf eine reduzierte Kohlenstoffquelle angewiesen und kann sowohl in Flüssigmedium als auch auf Agar angezogen werden. Ein weiterer experimenteller Vorzug von *P. patens* ist die Haploidie des genetischen Materials während des nahezu gesamten Lebenszyklus (s. Abb. 5). Dies ermöglicht das direkte Erkennen von Mutationen am Phänotyp. Der diploide Status tritt nur im Sporophyt als Stadium des Generationswechsels auf. Neben einer sexuellen Fortpflanzung sind Moose auch zur vegetativen Vermehrung fähig. Hierbei kommt es zur Bildung von genetisch identischen Klonen der Mutterzelle.

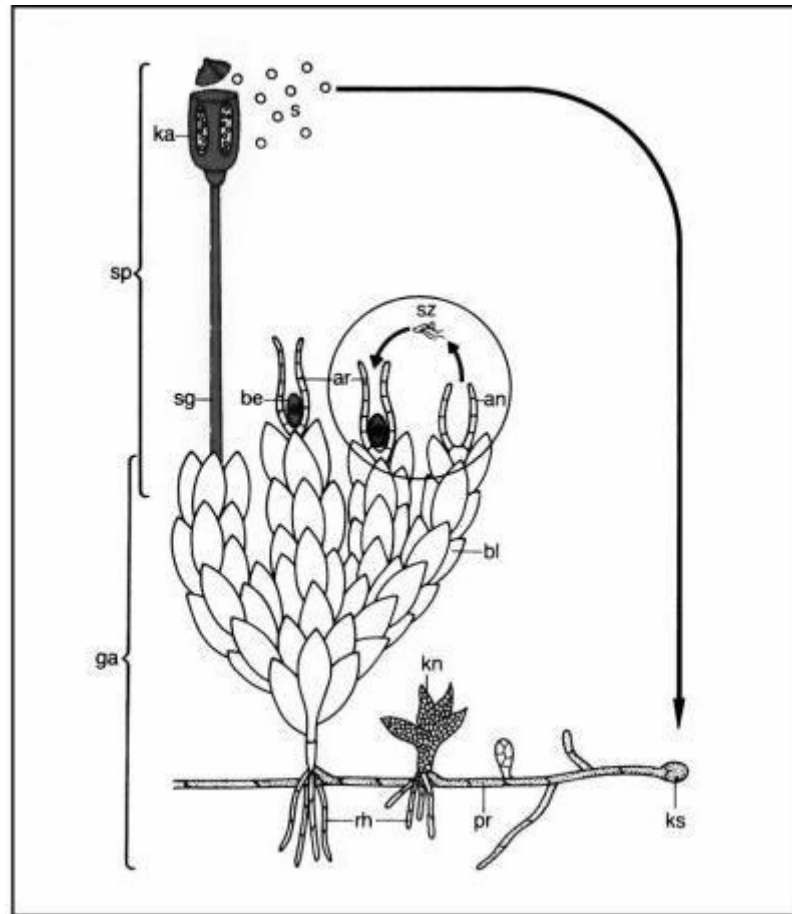


Abb. 5 Darstellung des Generationswechsels bei *P. patens*; an - Antheridien, ar - Archegonien, be - befruchtete Eizelle, bl - Blättchen, ga - Gametophyt, ka - Kapsel, kn - Knospe, ks - keimende Spore, pr - Protonema, rh - Rhizoide, s - Spore, sg - Sporangium, sp - Sporophyt, sz - Spermatozoid; Abbildung modifiziert nach [www2.mpiz-Koeln.mpg.de](http://www2.mpiz-Koeln.mpg.de)

In der Literatur werden zwei Varianten der *P. patens*-Anzucht verwendet: (a) Gametophytkulturen auf Agar-Petrischalen oder (b) Flüssigkulturen (Protonema oder Gametophyt). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die *P. patens*-Anzucht als Protonema-Kultur aus Chloronemata- und Caulonemata-Zellfäden in flüssigem Mineralmedium. Die Differenzierung führte jedoch zur Ausprägung vereinzelter Blättchen. Der Vorteil der Flüssig-Kultivierung liegt für biochemische Experimente im direkten Stoffaustausch aller Zellen mit dem Medium.

## 2.6 Zielstellung der Arbeit

Moose zeigen im Vergleich mit höheren Pflanzen deutliche Abweichungen ihrer zellulären Stressantwort auf Schwermetalle. Dies wurde bereits durch die Arbeitsgruppe Krauß am Wassermoose *Fontinalis antipyretica* gezeigt, welches im Gegensatz zu höheren Pflanzen keine PC nach Schwermetallgabe bildet (Bruns, 1998; Sutter, 2000; Bleuel *et al.*, 2005). EELS-Spektren (Bruns *et al.*, 2001) deuten auf die Bildung eines cytosolischen  $(\text{GSH})_2\text{-Cd(II)}$ -Komplexes hin (s.

Abb. 4). Auch im Forschungsobjekt *P. patens* konnten nach Cd(II)-Exposition keine Phytochelatine nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu steigt der GSH-Pool deutlich an. Aufgrund dieser Ergebnisse wird eine GSH-Beteiligung bei der Cd(II)-Detoxifikation in Moosen vermutet.

Ziel der Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es, das Verständnis Cd(II)-induzierter Veränderungen des Schwefel-Stoffwechsels von *P. patens* zu vertiefen. Dabei sollten o.g. Vorteile dieses Modellorganismus, insbesondere im molekularbiologischen Bereich, zu einem umfassenden Bild der Schwermetall-Stressantwort führen. In diesem Zusammenhang wurden Expressionsmuster der Gene von Sulfat-Assimilation bzw. Glutathion-Biosynthese nach Cd(II)-Gabe erstellt. Bisherige Untersuchungen wurden dabei ausschließlich an höheren Pflanzen durchgeführt. Voraussetzung für die Transkriptions-Studien war eine *in-silico*-Suche nach EST-Sequenzen der beteiligten Enzyme bzw. die PCR-Optimierung zur anschließenden Durchführung von *real-time*-PCR. Dabei sollte speziell die Bedeutung der beiden koexistierenden Wege zur Sulfit-Bildung über APR und PAPR aufgeklärt werden, die bisher nur bei den Moosen *Selaginella lepidophylla* und *P. patens* beschrieben wurden. Die Ergebnisse der Transkriptionsstudien wurden durch Untersuchungen zur Enzymaktivität von OAS-TL,  $\gamma$ -ECS, GSHS und Glutathion-S-Transferasen ergänzt. Im Hinblick auf intrazellulär verfügbare Cd(II)-Ionen wurden Cd(II)-Adsorption und -Bioakkumulation von *P. patens* analysiert. Zur Abschätzung der Vitalität wurden Chlorophyll-Gehalt und Photosystem-II-Effizienz bestimmt.