

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden mit den Analysen zum Einfluss von Cd(II) auf die Expression von Genen der Cys- und GSH-Biosynthese in *P. patens* erstmals molekularbiologische Untersuchungen an einem Moos unter Schwermetall-Stress durchgeführt. Bisherige Studien wurden ausschließlich an höheren Pflanzen vorgenommen (Schäfer *et al.*, 1998; Xiang & Oliver, 1998; Heiss *et al.*, 1999; Harada *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2005b; Herbet *et al.*, 2006). Da diese unter Schwermetall-Stress Phytochelatine (PC) bilden, war die Untersuchung einer niederen Pflanze, welche von Natur aus keine PC synthetisiert, von großem Interesse.

Bereits in früheren Studien der AG Krauß wurde nachgewiesen, dass schwermetallgestresste Moose einen Anstieg des Glutathion-Spiegels aufweisen (Bruns *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Beobachtungen wird eine entscheidende Rolle von Glutathion als Chelator zur Schwermetall-Detoxifikation bei Bryophyten postuliert. Weil es auch in Cd(II)-behandelten *P. patens* zu einer Erhöhung des GSH-Pools kommt, stand die Charakterisierung der Transkription von Genen der Sulfatassimilation und GSH-Biosynthese im Mittelpunkt der Arbeit. Dafür waren die für *Physcomitrella patens* zur Verfügung stehenden, umfangreichen EST-Datenbanken von größter Wichtigkeit. Da dieses Moos zudem die Besonderheit aufweist, über zwei Wege der Sulfit-Bildung zu verfügen (Koprivova *et al.*, 2002), war die Aufklärung der Bedeutung von APS- bzw. PAPS-Reduktase nach Cd(II)-Stress von besonderem Interesse. Für diesen Zweck wurden auch Δ apr-Mutanten benutzt. Zudem sollten Faktoren untersucht werden, welche bereits in der Literatur mit der Schwermetall-Homöostase in Verbindung gebracht wurden. Hierbei war die Gentranskription von Metallothioneinen (Domenech *et al.*, 2006) und Glutathion-S-Transferasen (Moons, 2003) von großer Bedeutung. Untersuchungen zur Expression von Genen, die Enzyme der Redox-Homöostase kodieren, sollten klären, ob Cd(II) oxidativen Stress verursacht. Die Resultate wurden durch Bestimmung des als Marker für den Redox-Status bezeichneten GSH/GSSG-Verhältnisses ergänzt.

Den Ergebnissen der Transkriptionsstudien wurden Untersuchungen zur Aktivität von Enzymen der Cystein- und Glutathion-Biosynthese bzw. Glutathion-S-Transferasen beigelegt. Dazu wurden Enzymassays für O-Acetylserin(thiol)lyase, γ -Glutamylcystein-Synthetase, Glutathion-Synthetase und Glutathion-S-Transferasen am Rohextrakt durchgeführt. Weil diese (unspezifischen) Analysen die Summe der Aktivität aller potentiell vorhandenen Enzym-Isoformen widerspiegeln, ist eine genaue Zuordnung aufgrund der spezifischen Gentranskriptionsergebnisse nicht möglich.

Da die Ergebnisse zur Genexpression und Enzymaktivität nur auf die intrazellulär wirksame Cd(II)-Konzentration zurückzuführen sind, war eine Bestimmung der Cd(II)-Adsorption und

Cd(II)-Bioakkumulation von *P. patens* notwendig. Die Studien wurden durch Untersuchungen zur Vitalität und zellulären Cd(II)-Verteilung ergänzt.

Aufgrund der Tatsache, dass die in verschiedenen Literaturstellen beschriebenen Ergebnisse durch Experimente gewonnen wurden, welche a) nicht unter einheitlichen Kultivierungsbedingungen erhalten wurden und b) die Art der Schwermetall-Exposition nicht in vergleichbarer Konzentration und Dauer durchgeführt wurde, lassen sich die Resultate nur mit Einschränkungen vergleichen. Hinzu kommt, dass sich die Literaturdaten für Analysen zur Genexpression bzw. Enzymaktivität unter Schwermetallstress mit wenigen Ausnahmen auf höhere Pflanzen beschränken. Da diese unter Schwermetall-Stress Phytochelatine bilden, was zu einer Abnahme des GSH-Spiegels führt, ist eine abweichende Regulation der GSH-Biosynthese in Moosen wahrscheinlich.

5.1 Vitalität von *P. patens* nach Cd(II)-Exposition

Als physiologischer Parameter zur Abschätzung der Vitalität wurden sowohl der Gehalt an Chlorophyll als auch die Photosystem-II-Effizienz gewählt. Beide Parameter sind zur Beurteilung der Auswirkungen biotischer wie abiotischer Stressfaktoren auf pflanzliche Testsysteme etabliert (Mysliwa-Kurziel *et al.*, 2004; Bertrand & Poirier, 2005). Durch lichtmikroskopische Aufnahmen wurden Änderungen der Morphologie von Blättchen und Chloronemata bzw. Caulonemata unter Cd(II)-Einwirkung protokolliert. Die Cd(II)-Verteilung wurde mit Hilfe des Cd(II)-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs BTC-5N untersucht. Elektronenmikroskopie (EDX, EEL) diente zur Aufklärung der intrazellulären Cd(II)-Lokalisation bzw. Identifikation möglicher Cd(II)-Bindungspartner.

5.1.1 Pigmentgehalt und Photosystem-II-Effizienz

Auf Grundlage des Chlorophyllgehaltes und der Photosystem-II-Effizienz (effektive Quantenausbeute) wurden beide Cd(II)-Konzentrationen als qualitativ unterschiedliche Stresstärken identifiziert. So war die Belastung mit 5 μM Cd(II) tolerierbar, während 10 μM Cd(II) deutliche Vitalitätsverluste bewirkte. Der Gesamtchlorophyllgehalt nahm unter Cd(II)-Exposition mit zunehmender Versuchsdauer stetig ab, wobei unter 10 μM Cd(II) eine deutliche Abnahme im Vergleich mit 5 μM festgestellt wurde (Abb. 7). Bereits nach zweitägiger Inkubation mit 10 μM Cd(II) konnte eine signifikante Verringerung ($P < 0,05$) bestimmt werden, welche bei den 5 μM -Cd(II)-Proben erst nach drei Tagen zu verzeichnen war. Die

Ergebnisse der Photosystem-II-Effizienz-Messungen bzw. die Werte des Chlorophyll-Quotienten bestätigten die Resultate der Chlorophyll-Analysen. So waren diese bei unbehandelten und 5 μM Cd(II)-gestressten Kulturen über den gesamten Versuchsverlauf ungefähr gleich, 10 μM Cd(II) bewirkte hingegen einen deutlichen Rückgang dieser Parameter. Gegensätzliche Ergebnisse erhielt Bruns (1998) an mit 100 μM gestressten Kulturen vom aquatischen Moos *Fontinalis antipyretica*. Hierbei zeigten sowohl Kontroll- als auch Cd(II)-behandelte Proben eine nicht-signifikante Abnahme des Chlorophyll a/b-Verhältnisses mit zunehmender Versuchsdauer. Für unbehandelte *P. patens*-Proben wurde ein Chlorophyll-a/b-Quotienten ermittelt, welcher mit in der Literatur aufgeführten Werte für Moose vergleichbar war (Marschall & Proctor, 2004). Hinsichtlich der Gehalte an Chlorophyll a und b konnten keine Unterschiede bei *F. antipyretica* zwischen Kontroll- und Cd(II)-Ansatz beobachtet werden. Da es sich bei den Pflanzen um Freilandmaterial handelte, welches nur zehn Tage unter Laborbedingungen angezogen wurde, hatten die veränderten Licht- bzw. Nährstoffbedingungen anscheinend einen größeren Einfluss auf die Vitalität als die Anzucht unter Cd(II). Im Unterschied dazu untersuchte Sutter (2000) die Vitalität von *F. antipyretica* zwischen 25 μM bis 400 μM Cd(II) anhand der Photosystem-II-Effizienz. Besonders hohe Cd(II)-Konzentrationen wirkten sich hier stark auf diesen Vitalitätsparameter aus. Bereits nach 24 h (400 μM), 48 h (200 μM) und 96 h (100 μM) wurden nur noch 50 % der PS-II-Effizienz der Kontrollansätze beobachtet. Diese Ergebnisse deuten auf eine durch hohe Cd(II)-Mengen hervorgerufene PS-II-Schädigung in *F. antipyretica* hin, was den Ergebnissen Cd(II)-behandelter *P. patens* entspricht. Niedrige Cd(II)-Gehalte (*F. antipyretica*: 25 μM bzw. 50 μM ; *P. patens*: 5 μM) führen bei beiden Moosen zu geringen Abnahmen der Vitalität, während hohe Cd(II)-Konzentrationen (*F. antipyretica*: 100 μM bis 400 μM ; *P. patens*: 10 μM) mit einem signifikanten Vitalitätsverlust verbunden sind.

Hinsichtlich der Beobachtungen zur Vitalität kann das Stress-Modell nach Brunold *et al.* (1996) auf Cd(II)-gestresste *P. patens*-Pflanzen angewandt werden. Demnach wird Stress in drei Phasen, Alarmphase, Widerstandsphase und Erschöpfungsphase, eingeteilt. In der Alarmphase führt die Aktivierung kataboler Stoffwechselwege zu einem anfänglichen Vitalitätsverlust, wobei anschließend durch regenerative Mechanismen eine rasche Rückkehr zur Normalität gewährleistet wird. Bei fortdauernder Stresseinwirkung erreicht der Organismus die Widerstandsphase, welche durch massive Stoffwechseländerungen gekennzeichnet ist. Es kommt in der Folge zu einer Anpassung oder im Fall einer Stress-Abnahme zu einer Normalisierung. Bei zu langer Einwirkzeit oder zu hoher Intensität des Stressfaktors gelangt der betroffene Organismus schließlich in die Erschöpfungsphase, die mit irreversiblen Schäden und

letztendlich dem Tod verbunden ist. Bei einer Applikation von 5 μM Cd(II) kam es bei *P. patens* zu einer kurzen Alarmphase (erster Tag), die durch die Abnahme von Chlorophyll-Konzentration und -Quotient gekennzeichnet ist. In der sich anschließenden Widerstandsphase (zweiter bis fünfter Tag) konnte eine erhöhte Resistenz gegenüber Cd(II) erreicht werden. Dabei wurden hinsichtlich des Chlorophyll-Quotienten wieder Normalwerte erreicht. Im Gegensatz dazu rief eine Cd(II)-Konzentration von 10 μM eine sich an die Widerstandsphase (bis dritter Tag) anschließende Erschöpfungsphase (vierter bis fünfter Tag) hervor, in welcher irreversible Schäden (fortschreitende Chlorophyll-Abnahme, verringerte PS-II-Effizienz) auftraten. Die Abnahme des Chlorophyllgehaltes wurde wahrscheinlich durch eine verringerte Neusynthese und einen gesteigerten Abbau von geschädigtem Chlorophyll hervorgerufen (Vassilev *et al.*, 1997). Dabei sind diese Folgen abhängig von der Konzentration des einwirkenden Stressors. Bei einem niedrigen Cd(II)-Gehalt (5 μM) kam es zu einer schwachen Beeinflussung der Photosynthese, 10 μM Cd(II) verursachte jedoch deutliche Veränderungen. In vergleichbarer Weise wurden auch für *A. thaliana* zwei Cd(II)-Konzentrationsbereiche gefunden, in denen es zu reversiblen bzw. irreversiblen Stressbedingungen kommt. Perfus-Barbeoch *et al.* (2002) stellten nach einer Woche 10 μM Cd(II) keine signifikanten Änderungen fest, hingegen bewirkten Konzentrationen über 50 μM Störungen der CO_2 -Aufnahme und der Transpiration. Es ist allgemein bekannt, dass Cd(II) sowohl die Chlorophyll-Biosynthese als auch die Photosynthese inhibiert (Krupa, 1988; Padmaja *et al.*, 1990; Küpper *et al.*, 1998; Mysliwa-Kurdziel *et al.*, 2004; Balakhnina *et al.*, 2005). Die genauen molekularen Mechanismen, welche letztendlich eine Reduktion der Chlorophyll-Konzentration bewirken, sind dabei jedoch ungeklärt. Wahrscheinlich ist sowohl eine Blockierung funktioneller SH-Gruppen im aktiven Zentrum der δ -Aminolävulinat-Dehydratase, wie bei *Phaseolus vulgaris* gezeigt werden konnte (Padmaja *et al.*, 1990), als auch ein Austausch des zentralen Mg(II)-Ions gegen Cd(II) (Küpper *et al.*, 1998). Eine andere Erklärung für die Abnahme des Chlorophyll-Gehaltes nach Cd(II)-Applikation bieten Barylta *et al.* (2001). Demzufolge sind nicht Chlorosen, sondern die Verringerung der Chloroplasten-Dichte bzw. Veränderungen der Zellgröße Ursachen der Cd(II)-induzierten Chlorophyll-Abnahme. Auch bei *P. patens* konnte eine Änderung der Zellmorphologie durch Cd(II) beobachtet werden. Jedoch waren keine drastischen Änderungen der Chloroplastenanzahl sichtbar. Es wurde durch zahlreiche Studien gezeigt, dass Cd(II) die Photosynthese auf verschiedenen Ebenen beeinflusst (Bishnoi *et al.*, 1993; Balakhnina *et al.*, 2005; Faller *et al.*, 2005). So wurde eine signifikante Verringerung der Photosystem-II-Effizienz bei Sämlingen von *Pisum sativum* nach zweistündiger Behandlung mit 0,1 mM bzw. 1 mM Cd(II) festgestellt (Balakhnina *et al.*, 2005). Ferner verursacht Cd(II) u.a. Schäden am Lichtsammelkomplex

(Rettich, Krupa, 1988), bei der Photoaktivierung von Photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii* (Faller *et al.*, 2005), am Kopplungsfaktor der Chloroplasten (Balakhnina *et al.*, 2005), am sauerstoffbildenden Komplex (van Duijvendijk-Matteoli & Desmeta, 1975), an Plastochinonen (Baszynski *et al.*, 1980) sowie an Ferredoxin und Ferredoxin NADP⁺ Oxidoreduktasen (Siedlecka & Baszynski, 1993). Daneben wurden jedoch in einer Vielzahl von Studien keine Auswirkungen von Cd(II) auf die Lichtreaktion beschrieben (Krupa *et al.*, 1993; Haag-Kerwer *et al.*, 1999). Durch die Vielfalt der verwendeten Pflanzenspezies bzw. der Cd(II)-Applikationswege in den o.g. Studien ist eine abschließende Erklärung erschwert.

Für *P. patens* sind beide Δapr -Mutanten durch einen dem Wildtyp ähnlichen Verlauf der Chlorophyllgehalte nach Cd(II)-Applikation charakterisiert. Im Fall der Δapr -Mutanten 11-3-12 und 12-4-3 ging die Gesamtchlorophyll-Konzentration innerhalb von fünf Tagen auf 70 % (5 μM) bzw. 60 % (10 μM) der Kontrollwerte signifikant zurück ($P < 0,001$; Abb. 12). Jedoch ist schon der Grundgehalt an Chlorophyll bei beiden Mutanten wesentlich niedriger im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 13). Gegensätzliche Ergebnisse erhielten Koprivova *et al.* (2002). In diesem Fall wurde eine erhöhte Cd(II)-Sensitivität der *knock out*-Pflanzen festgestellt. Ein Grund für die Abweichungen könnte in der Art der Moosanzucht liegen. Während *P. patens* in der Studie auf Knop-Agar mit 15 μM CdCl₂ angezogen wurde, erfolgte die Kultivierung in der vorliegenden Arbeit in Flüssigmedium bei 5 μM bzw. 10 μM CdCl₂. Demnach würden im Falle einer Agar-Anzucht nur die Rhizoide mit Cd(II) in Kontakt geraten, was zu ihrer Schädigung und in der Folge zu einer deutlichen Reduktion der Nährstoffaufnahme führen könnte. Im Unterschied dazu ist bei der Flüssig-Kultur die gesamte Pflanze von Cd(II)-haltigen Medium umgeben, wodurch alle Zellen gleichmässig belastet werden. Andererseits könnte auch die Kulturart für die Unterschiede verantwortlich sein. Die Pflänzchen-Kultur (Koprivova *et al.*, 2002) wäre demnach Cd(II)-toleranter als die Protonema-Kultur (vorliegende Arbeit), was durch die mikroskopischen Ergebnisse bestätigt wird (schwächere Verfärbung bzw. weniger morphologische Abnormitäten der Blättchen). Die geringeren Grundgehalte an Chlorophyll der Mutanten hängen vermutlich mit der gegenseitigen Beeinflussung von N- und S-Stoffwechsels zusammen (Hesse *et al.*, 2004; Kopriva & Rennenberg, 2004). Aufgrund der durch APR-Deletierung hervorgerufenen verminderten Sulfatassimilation kommt es wahrscheinlich auch zu einer Verringerung der Nitrat-Reduktion. Da die Produkte des N-Stoffwechsels (Glutamat) jedoch essentiell für die Chlorophyll-Biosynthese sind, kann es somit zu einer Abnahme der Chlorophyll-Biosynthese kommen.

5.1.2 Mikroskopische Untersuchungen

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden parallel zu den biochemischen und molekularbiologischen Analysen durchgeführt. Der Vergleich von Kontroll- mit Cd(II)-belasteten Zellen zeigt, dass Cd(II)-Stress gravierende Auswirkungen auf den Phänotyp bzw. die Morphologie von *P. patens* hat. Dabei zeigte sich als erstes, dass die Braunfärbung (s. 5.1.1) nicht bei allen Zellen von *P. patens* auftrat. Vor allem die Blättchen wiesen im Vergleich mit den Chloronemata einen deutlich niedrigeren Verfärbungsgrad auf. Da die Blättchen nur aus einer Zellschicht bestehen, fällt eine Erklärung aufgrund geringerer Cd(II)-Einwirkung aus. Eine Möglichkeit könnte darin bestehen, dass sich das von Blättchen-Zellen aufgenommene Cd(II) besser im Symplasten verteilen kann. Da die Protonemata-Zellen nur von jeweils zwei bis drei Zellen (mit Ausnahme der apikalen Zelle) umgeben sind, wäre hier eine Cd(II)-Verteilung weniger effektiv. Zumal ist die dem Medium zugewandte Oberfläche im Fall von Protonemata-Zellen erheblich größer, was mit einem höheren Cd(II)-Einstrom verbunden wäre. Weitere morphologische Resultate unterstützen die Vermutung, dass die Cd(II)-Bioakkumulation von Protonemata-Zellen bedeutend größer ist. So wurden hohes Zellteilungswachstum, abnorme Zellformen und Zellwand-Verdickungen (s. Anhang B) überwiegend bei den Chloronemata- bzw. Caulonemata-Zellen beobachtet. Bei Blättchen konnten nur vereinzelte Verdickungen der Zellwand festgestellt werden.

Die Untersuchungen zur Lokalisation von Cd(II) in *P. patens* mittels EDX-Elektronenmikroskopie (*energy dispersive X-ray*) lieferten keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Es konnte kein Cd(II) in zellulären Niederschlägen ermittelt werden (Abb. 14). Als Ursache hierfür kommt eine zu niedrige intrazelluläre Cd(II)-Konzentration in Frage, welche vermutlich unterhalb der EDX-Nachweisgrenze lag. In früheren Untersuchungen am aquatischen Moos *F. antipyretica*, bei denen intrazelluläres Cd(II) ermittelt werden konnte, wurde eine extrazelluläre Konzentration von 100 µM eingesetzt (Bruns *et al.*, 2001). Diese Cd(II)-Konzentration wurde auch bei EDX-Analysen an *A. thaliana* verwendet (Wójcik & Tukiendorf, 2004). Im Falle des Hyperakkumulators *Thlaspi caerulescens* wurden sogar 500 µM Cd(II) verwendet (Wójcik *et al.*, 2005). Da *P. patens* unter diesen Cd(II)-Gehalten nicht überlebensfähig war, ist die Aufklärung der intrazellulären Cd(II)-Verteilung mittels EDX nicht möglich. Bruns *et al.* (2001) konnten anhand von EELS-Spektren (*electron energy loss spectroscopy*) nachweisen, dass der Schwefelgehalt im Cytoplasma nach Cd(II)-Gabe steigt und dass Cd(II) im Cytoplasma von *F. antipyretica* an SH-Gruppen gebunden ist. Daraus zogen die Autoren den Schluss, dass GSH-Cd(II)-Komplexe die Cd(II)-Transportform im Cytoplasma darstellen. Diese könnten in die Vakuole importiert werden, wo es zum Zerfall des Komplexes durch den niedrigen pH-Wert käme.

Cd(II) liegt in der Vakuole an Phosphat gebunden vor (Bruns *et al.*, 2001). Eine analoge GSH-Funktion ist auch für Cd(II)-gestresste *P. patens* denkbar.

Aufgrund der unzureichenden Ergebnisse der EDX-Analysen wurde in der vorliegenden Arbeit der Fluoreszenzfarbstoff BTC-5N zur Visualisierung intrazellulärer Cd(II)-Ionen benutzt. Da der Farbstoff auch positiv auf Ca(II) reagiert, war eine vorhergehende Waschung zur Entfernung extrazellulären Kalziums notwendig. Das intrazelluläre Ca(II) erscheint in den Bildern von Kontroll- und Cd(II)-Proben als sehr schwache Hintergrundfluoreszenz. Es wurden jeweils zwei Fotos (Hellfeld bzw. Fluoreszenzanregung) vom gleichen Bildabschnitt gemacht. Somit konnten die Resultate der Fluoreszenzfärbung den Aufnahmen unter Normallicht gegenübergestellt werden. Dabei fiel eine verstärkte Fluoreszenz in Caulonemata (vereinzelt) und vor allem in den Blättchen auf. Interessanterweise beinhalten die Zellen (5 μ M und 10 μ M Cd(II)) mit fluoreszierenden Niederschlägen keine Chloroplasten oder es erfolgte eine Konzentrierung dieser Organellen an einem Zellpol. Es könnte sich jedoch bei den beobachteten Niederschlägen auch um Ca(II)-Anreicherungen handeln, da BTC-5N auch Ca(II)-sensitiv ist. In den Kontroll-Zellen wurden jedoch keine vergleichbaren Ablagerungen beobachtet.

5.2 Biosorption und Bioakkumulation von Cd(II) in *P. patens*

Den meisten Studien, welche die Auswirkungen von Cd(II)-Stress auf die Expression von Genen der Sulfatassimilation und GSH-Biosynthese untersuchen, mangelt es an der Bestimmung der durch den Organismus tatsächlich aufgenommenen Cd(II)-Menge (Schäfer *et al.*, 1998; Xiang & Oliver, 1998; Harada *et al.*, 2002). Dies ist jedoch von großer Bedeutung, da nur die Menge an intrazellulärem Schwermetall für nachfolgende Adaptionsmechanismen verantwortlich ist. Im Gegensatz dazu werden in der Mehrzahl der Untersuchungen die beobachteten Effekte auf die extrazellulären Cd(II)-Gehalte im Anzuchtmedium zurückgeführt. Dass selbst zwei Arten derselben Gattung große Unterschiede hinsichtlich der Cd(II)-Akkumulation aufweisen können, zeigen Bleuel *et al.* (2005) anhand von zwei *Fontinalis*-Spezies. So nahm *F. antipyretica* ca. 50 % mehr Cd(II) im Vergleich mit *F. dalecarlica* auf, was mit einer unterschiedlichen Zellwand-Zusammensetzung beider Moose begründet wurde. In der Studie wird auch dargestellt, dass es sich bei der Cd(II)-Aufnahme in Moosen um einen biphasischen Prozess handelt. Zunächst kommt es zu einer lokalen Cd(II)-Anlagerung an die Zellwand (Biosorption). Hierbei tragen die auf der Blättchen-Oberfläche befindlichen, potentiellen Cd(II)-Bindestellen entscheidend zur Biosorptionskapazität eines Moooses bei. Ist die Fähigkeit zur Biosorption erschöpft, gelangt das extrazelluläre Cd(II) in die Zelle (Bioakkumulation).

Die Cd(II)-Biosorption und -Bioakkumulation wurde bei *P. patens* über einen Zeitraum von fünf Tagen beobachtet, wobei unterschiedliche Konzentrationen (5 μM bzw. 10 μM CdCl_2) verwendet wurden. Insgesamt wurden im Zuge der Aufarbeitung drei Fraktionen (extrazellulär, adsorbiert, intrazellulär) erhalten. Der extrazelluläre Anteil setzte sich aus dem verbliebenen Medium und dem Filter zusammen, auf dem das Moosmaterial abgesaugt wurde. Der Filter musste analog dem Moos aufgeschlossen werden, da in ihm bis zu 65 % des zugegebenen Cadmiums enthalten war. Offenbar sind die Poren des verwendeten Filters nicht groß genug, um eventuell ausgefallene Cd^{2+} -Salzkomplexe/Niederschläge passieren zu lassen. Eine weitere mögliche Erklärung ist die Verstopfung der Poren durch abgestorbene Zellen. Dies würde eine Abnahme des intrazellulären Anteils zur Folge haben. Bei Filtrierung eines herkömmlichen Versuchsansatzes ohne Biomasse konnte keine signifikante Cd(II)-Adsorption im Filter ermittelt werden. Dies schließt die Möglichkeit einer Bildung schwerlöslicher Cd(II)-Salze oder -Komplexe im Medium aus. Durch Einbeziehung des filtergebundenen Cd(II)-Anteils konnten schließlich Wiederfindungsraten zwischen 90 % und 110 % erhalten werden. Die Fraktion adsorbierten Cadmiums setzte sich aus den beiden Waschschritten mit 20 mM NiCl_2 und einer nachfolgenden Waschung mit Bidest. zusammen. Dabei wird das an die Zellwand gebundene, adsorbierte Cd(II) durch Ni(II) verdrängt und geht in die flüssige Phase über. Da die möglichen Cd(II)-bindenden Gruppen in der Zellwand von *P. patens* unbekannt sind, ist es durchaus möglich, dass bei zu starker Cd(II)-Bindung die Ni(II)-Waschung nicht in der Lage war, eine ausreichende Cd(II)-Desorption zu bewirken. Jedoch bewirkten längere Waschzeiten und höhere Ni(II)-Konzentration keine Erhöhung der Cd(II)-Konzentration im adsorbierten Anteil. Cd(II)-gestresste *P. patens*-Kulturen zeigten im Vergleich mit den bereits erwähnten *Fontinalis*-Spezies nur geringe Biosorptionraten. (Abb. 15). Im Unterschied dazu wurde eine schnelle Akkumulation bis zum maximal möglichen intrazellulären Cd(II)-Gehalt beobachtet (Abb. 16). Nach Fernandez *et al.* (2006) stellt sich bei Moosen schon nach zwei bis vier Tagen ein Sättigungsverhalten bezüglich der Schwermetall-Akkumulation ein. Dies stimmt mit Beobachtungen an *P. patens* überein. Hier wurden nach zwei (10 μM) bzw. drei (5 μM) Tagen keine Zuwächse der Cd(II)-Bioakkumulation mehr erfasst. Im Vergleich mit *F. antipyretica*, welches bei einer Konzentration von 100 μM Cd(II) noch lebensfähig ist (Sutter, 2000), fällt die hohe Sensitivität von *P. patens* gegenüber Cd(II) auf (s. 5.1). Dies mag am Fehlen eines wirkungsvollen Mechanismus liegen, der den schnellen Cd(II)-Einstrom bei diesem Moos verringert. Im Falle von *F. antipyretica* wirkt die Zellwand offenbar als erste Barriere gegen eine schnelle Cd(II)-Akkumulation (Bleuel *et al.*, 2005). Durch die temporäre Speicherung in der Wand hätte das Moos somit mehr Zeit, um effektive *tolerance*-Mechanismen zu aktivieren. Beispielsweise wurde

dem Anteil von Pektinsäuren eine Beeinflussung der Cd(II)-Biosorptionskapazität zugeschrieben (Breuer & Melzer, 1990). Dies würde die erhöhte Cd(II)-Resistenz von *F. antipyretica* im Vergleich mit *P. patens* erklären. Demgemäß tritt im Falle von *P. patens* eine stark verkürzte erste Phase der Cd(II)-Aufnahme auf. Die verminderte Fähigkeit von *P. patens*, Cd(II) an der Zellwand zu adsorbieren, hängt offensichtlich mit deren chemischem Aufbau zusammen. Wenn darin keine geeigneten funktionellen Gruppen (z.B. Carboxyl-Gruppen von Uronsäuren) zur Bindung von Schwermetallkationen existieren, ist auch keine erfolgreiche *avoidance*-Strategie möglich. Die Cd(II)-Biosorption ist unabhängig von Temperatur und Wasserhärte, wird aber durch den pH-Wert des Mediums beeinflusst (Martins *et al.*, 2004). Dies ist verständlich, da durch steigenden pH-Wert die Protonierung von Carboxyl-Gruppen abnimmt und die dabei entstehenden COO⁻-Reste die Anlagerung positiv geladener Metallionen begünstigen sollten. Dies wurde für Moose berichtet (Al-Asheh & Duvnjak, 1997).

5.3 Sequenzvergleiche

Da in den meisten höheren Pflanzen für viele Enzyme der Sulfatassimilation Isoenzyme mit z.T. verschiedener zellulärer Lokalisierung vorliegen, war es wichtig zu wissen, welchen Isoformen die EST-Sequenzen von *P. patens* ähneln (s. Tab. 8). APR und PAPR stellen nach Kopriva *et al.* (2006) chloroplastidäre Proteine dar. Die getestete SiR-Sequenz hat große Ähnlichkeit mit Sequenzen von cytosolischen SiR-Proteinen. Normalerweise stellt die SiR jedoch ein ausnahmslos chloroplastidäres Enzym dar. Jedoch sind SiR-Isoformen in *P. patens* verständlich, da dieses Enzym hier durch zwei Reaktionen (APR, PAPR) mit Sulfit versorgt wird. Die für die Untersuchungen verwendete OAS-TL-Sequenz kodiert mit 100 %-iger Wahrscheinlichkeit ein mitochondriales Enzym. Somit ist die geringe Induktionsrate zu erklären, da in diesem Kompartiment keine Sulfatreduktion erfolgt und die mitochondriale Cys-Produktion hauptsächlich für die mitochondriale Protein-Biosynthese notwendig ist. Es ist auch möglich, dass es sich bei diesem Enzym um eine β -Cyanoalanin-Synthase handelt. Die für die Untersuchungen verwandten EST-Sequenzen der GSH-Biosynthese kodieren chloroplastidäre Enzyme (je 99,7 %). Die EST-Sequenzen der Cys- und GSH-Biosynthese-Enzyme aus *P. patens* weisen sowohl auf Nukleotid- als auch auf Protein-Ebene große Sequenzhomologien mit den entsprechenden Proteinen höherer Pflanzen auf (Tab. 8). Die PAPS-Reduktase aus *P. patens* entspricht der Proteinsequenz des PAPS-Proteins aus dem Moos *Selaginella lepidophylla* zu 70 %. Dies deutet darauf hin, dass für Moose die Koexistenz von APR und PAPR charakteristisch ist, da auch in *S. lepidophylla* eine APS-Reduktase nachgewiesen wurde (Kopriva *et al.*, 2006).

5.4 Einfluss von Cd(II) auf die Transkription

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Expression von Genen der Sulfatassimilation und der GSH-Biosynthese nach Cd(II)-Applikation mittels *real-time* PCR. Außerdem wurde die Gentranskription ausgewählter Enzyme der Redox-Homöostase (Ascorbat-Peroxidase und -Reduktase; GSH-Peroxidase und -Reduktase) und von Glutathion-S-Transferasen analysiert. Weiterhin wurden die mRNA-Gehalte von zwei Metallothioneinen gemessen. Diesen Proteinen wird in der Literatur eine wichtige Funktion bei der Schwermetall-Homöostase zugeteilt.

Es muss erwähnt werden, dass die zitierten Ergebnisse der Expressionsstudien bei sehr hohen Cd(II)-Konzentrationen erzielt wurden. So wurden bei *A. thaliana* Cd(II)-Gehalte von 25-400 μM (Xiang & Oliver, 1998) bzw. bis zu 200 μM (Harada *et al.*, 2002; Sarry *et al.*, 2006) eingesetzt. 100 μM Cd(II) kamen bei der Studie von Cho *et al.* (2006) an *P. patens* zum Einsatz. Im Gegensatz dazu sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Cd(II)-Konzentrationen viel niedriger. Diese geringen Mengen sind mit Umweltbedingungen vergleichbar, mit welchen ein Organismus in einer kontaminierten Umgebung tatsächlich konfrontiert sein könnte.

5.4.1 Referenzgen

Ein Referenzgen für *real-time*-PCR-Analysen darf in seiner Expression nicht durch veränderte Versuchsbedingungen beeinflussbar sein (im vorliegenden Fall durch Cd(II)-Exposition). Die Bestimmung eines solchen Gens in *P. patens* war für die Berechnung der Induktionsraten mittels $\Delta\Delta\text{C}_T$ -Methode notwendig. Die in der Literatur (s. Volkov *et al.*, 2003) häufig als Referenzgene verwendeten Gene von Actin (McDowell *et al.*, 1996), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) und Rubisco (kleinen Untereinheit, kernkodiert) wurden auf eine veränderte Transkription unter Cd(II)-Stress untersucht (Tab. 9). Nur Rubisco war unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht beeinflusst und wurde als Referenzgen gewählt.

5.4.2 Sulfatassimilation

Im Gegensatz zu früheren Studien, welche den Einfluss von Cd(II) nur auf die Transkription von ausgewählten Genen der Sulfatassimilation untersuchten (Schäfer *et al.*, 1998; Heiss *et al.*, 1999; Harada *et al.*, 2002), wurden in der vorliegenden Arbeit alle Enzyme (außer APK) der reduktiven Sulfatassimilation in *P. patens* analysiert (Abb. 20-Abb. 22). Die gesamte Betrachtung führte zu einem umfassenden Bild der Cd(II)-induzierten Veränderungen. Außerdem wurden in vorherigen Untersuchungen höhere Cd(II)-Konzentrationen eingesetzt, wobei die Auswahl an

Modellorganismen von Pilzen (Momose & Iwahashi, 2001; Fauchon *et al.*, 2002) bis zu höheren Pflanzen reichte (Schäfer *et al.*, 1998; Heiss *et al.*, 1999; Harada *et al.*, 2002). Die Enzyme der Teilschritte der Sulfatassimilation, ATP-Sulfurylase (ATPS), APS-Reduktase (APR), PAPS-Reduktase (PAPR), Sulfit-Reduktase (SiR), Serin-Acetyl-Transferase (SAT) bzw. O-Acetylserin(thiol)lyase (OAS-TL) sollen nun nacheinander diskutiert werden.

Cd(II)-Exposition führte in *P. patens* zu einer erhöhten Genexpression von ATPS und APR/PAPR (Abb. 21, Abb. 22). Nach drei Tagen wurden in den mit 10 µM Cd(II) gestressten Kulturen um 4- bis 5-fach signifikant ($P < 0,05$) erhöhte mRNA-Mengen beobachtet. Im Fall von 5 µM Cd(II) fielen die Induktionen etwas geringer aus, wobei die Zunahme an APR-mRNA nach fünf Tagen signifikant war. Auch in *B. juncea* bewirkte Cd(II)-Stress (25 µM) einen deutlichen Zuwachs der Transkripte von ATPS und APR (Heiss *et al.*, 1999). Mit 200 µM Cd(II) versetzte *A. thaliana* Pflanzen zeigten eine 13- bzw. 6- bis 10-fache Induktion der ATPS- und APR-Transkription (Harada *et al.*, 2002). Eine erhöhte Expression einer ATPS-Isoform bzw. von zwei APR-Proteinen aus *A. thaliana* wurde auch von Herbette *et al.* (2006) an mit 5 µM bzw. 50 µM Cd(II) exponierten Wurzeln beobachtet. Vergleichbare APR-Induktionen erhielten Sarry *et al.* (2006). Im Ascomycet *S. cerevisiae* führte eine Konzentration von 1 mM Cd(II) zu einer verstärkten Expression des *MET3*-Gens (ATPS, Fauchon *et al.*, 2002), was von einer 6-fachen Zunahme des Gehaltes an ATPS-Protein begleitet war (Vido *et al.*, 2001). Mit 10 µM Cd(II) gestresste *A. thaliana* zeigten eine Verdopplung an ATPS-Protein (Roth *et al.*, 2006). Außerdem zeigte eine Microarray-Analyse von *S. cerevisiae* (300 µM) eine 21- bzw. 6-fache Induktion von *MET14* (APK) und *MET16* (PAPR) (Momose & Iwahashi, 2001). Offenbar ist die Transkriptionsinduktion der ersten Enzyme der Sulfatassimilation eine verbreitete Reaktion höherer Pflanzen auf Cd(II)-Stress, um den Fluss innerhalb der Cys-Biosynthese zu erhöhen. Der Anstieg des GSH-Präkursors Cys würde die Fähigkeit zur GSH-Bildung verbessern, wodurch mehr Phytochelatine gebildet werden könnten. Da die PC-Synthese für *P. patens* entfällt, käme es zu einer deutlichen Steigerung des GSH-Gehaltes, was tatsächlich festgestellt wurde (4.6.2).

Im Gegensatz zu höheren Pflanzen, bei denen die Sulfitbildung nur durch APR katalysiert und der Metabolit PAPS für die Sulfatierung genutzt wird, koexistieren in *P. patens* zwei Wege zur SO_3^{2-} -Synthese (Koprivova *et al.*, 2002). Zum einen der Pflanzen-typische APR-Weg und zum anderen der für Bakterien und Pilze typische PAPR-Weg. Durch diese Parallelität zweier Wege mit identischem Endprodukt wird vermutlich eine bessere Versorgung bzw. Flexibilität gewährleistet. Andererseits ist es vorstellbar, dass im Lauf der Evolution das Vorhandensein beider Möglichkeiten unnötig wurde, da höhere Pflanzen nur den direkten Weg aufweisen.

Im weiteren Verlauf der Sulfatassimilation wird das Produkt der APR-/PAPR-Reaktion, durch einen Transfer von sechs Elektronen in einem Schritt zu Sulfid reduziert. Das Gen des daran beteiligten Enzyms, SiR, zeigte in *P. patens* die höchsten Induktionsraten unter Cd(II)-Stress gegenüber den anderen SAP-Genen (Abb. 20-Abb. 22). So wurde bereits nach 24 h eine um den Faktor drei erhöhte Transkription ermittelt. Nach drei Tagen betrug die SiR-Genexpression bereits das vier- (5 μM) bzw. fast 10-fache (10 μM , $P < 0,001$) der Kontrolle. Signifikante Werte ($P < 0,01$) wurden für beide Cd(II)-Konzentrationen erst nach fünf-tägiger Cd(II)-Inkubation ermittelt, wobei die Transkriptmenge an SiR-mRNA um den Faktor 8,6 (5 μM) bzw. 9,8 (10 μM) erhöht war. Die hohen Induktionsraten des SiR-Gens sind nicht überraschend; da das Enzym in *P. patens* von zwei Enzymen mit Sulfit versorgt. Beim Sulfit handelt es sich jedoch um ein starkes Oxidationsmittel, welches in höheren Mengen cytotoxisch wirkt (Hell, 2002). Aus diesem Grund muss das unter Cd(II)-Stress vermutlich vermehrt gebildete SO_3^{2-} sofort weiter umgesetzt werden, was offenbar durch eine verstärkte Expression von SiR erreicht wird. Im Unterschied zum in *P. patens* festgestellten, starken Anstieg der SiR-Transkription unter Schwermetall-Stress, fallen die vergleichbaren Literaturdaten für höhere Pflanzen gering aus. So berichteten Harada *et al.* (2002) nur von einer Verdopplung der SiR-Expression in mit 200 μM Cd(II) behandelten *A. thaliana* nach vier Stunden. In einer anderen Studie an *A. thaliana* (Herbette *et al.*, 2006) wurde keine Cd(II)-Wirkung (5 μM bzw. 50 μM) auf die Expression von SiR und nachfolgenden Enzymen ermittelt.

Für die Regulation des nächsten Schrittes der Sulfatassimilation sind in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse verfügbar. So war die OAS-TL-Transkription nicht nur in Cd(II) exponierten *P. patens* sondern auch in *B. juncea* (25 μM CdNO_3) kaum verändert: in beiden Organismen war der mRNA-Gehalt nur schwach erhöht (Schäfer *et al.*, 1998). Im Unterschied dazu zeigten mit 50 μM Cd(II) behandelte Blätter von *A. thaliana* eine 7-fache Erhöhung des OAS-TL-Transkriptes (Dominguez-Solis *et al.*, 2001), während Harada *et al.* (2002) eine durch Cd(II) unbeeinflusste Expression registrierte. In einer OAS-TL überexprimierenden Linie von *A. thaliana* wurde eine gesteigerte Cd(II)-Toleranz (bis 400 μM) festgestellt, wobei die Cd(II)-Konzentration in den Blättern der von Hyperakkumulatoren sehr nahe kam (Domínguez-Solis *et al.*, 2004). Offenbar ist eine verbesserte Cystein-Syntheserate für eine Erhöhung der Schwermetall-Toleranz unerlässlich.

Wie bei der OAS-TL war die Transkription von SAT, dem OAS-bildenden Enzym, in Cd(II)-gestressten *P. patens* kaum verändert. Andererseits stellte Howarth *et al.* (2003) eine erhöhte Expression aller SAT-Gene (fünf Isogene) in *A. thaliana* (50 μM , 24 h) fest.

Die Ergebnisse der Transkriptionsstudien von Genen der Cys-Biosynthese zeigten eine Cd(II)-induzierte Aktivierung der Sulfatassimilation durch Erhöhung der Transkription aller beteiligten Gene. Dies geschah vermutlich zur Bereitstellung größerer Mengen des GSH-Präkursors Cystein. Folglich könnte eine gesteigerte Biosynthese von GSH stattfinden, welches in Moosen als möglicher Cd(II)-Chelator gilt.

5.4.3 Glutathion-Biosynthese

Zur Regulation des Schwefelstoffwechsels und der GSH-Biosynthese liegen in der Literatur zahlreiche Arbeiten vor (Reviews: Leustek *et al.*, 2000; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005; Kopriva, 2006). Viele Studien analysierten den Einfluss von biotischen und abiotischen Stress auf die pflanzliche Sulfatassimilation bzw. GSH-Bildung. 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-Pools bei *A. thaliana*. Hingegen tragen Schwefel-Mangel (Nikiforova *et al.*, 2003) und Schwermetall-Stress, aufgrund der Synthese von Phytochelatinen (PC), zur Verringerung des GSH-Spiegels bei. In vielen höheren Pflanzen wurde nach Zugabe von Cd(II) eine erhöhte Expression von *gsh1* (γ -ECS) beobachtet, was auf eine Aktivierung der GSH-Biosynthese hindeutet (Schäfer *et al.*, 1998; Xiang & Oliver, 1998; Sun *et al.*, 2005b). Da *P. patens* keine nachweisbaren PC-Mengen nach Cd(II)-Applikation bildet sondern mit einem Anstieg des GSH-Pools reagiert, standen Expressionsanalysen der GSH-Biosynthesegene im Vordergrund.

Physcomitrella patens reagiert auf Cd(II)-Belastung mit einer erhöhten Transkription von *gsh1* und *gsh2* (GSHS, s. Abb. 20 bis Abb. 22), wobei insbesondere die Expression des γ -ECS-Gens signifikante Induktionsraten aufwies. Vor allem eine erhöhte Expression des γ -ECS-Gens ist verständlich, da es sich bei dieser Reaktion um den regulierten Schritt der GSH-Synthese handelt (Arisi *et al.*, 1997; Mendoza-Cózatl & Moreno-Sanchez, 2006). Grundsätzlich reagieren Pflanzen auf Cd(II)-Stress mit einer erhöhten γ -ECS-Transkriptmenge (Schäfer *et al.*, 1998; Xiang & Oliver, 1998; Dominguez-Solis *et al.*, 2001). Dies wurde bei mit 30 μ M Cd(II) behandelten *Brassica napus* gezeigt (Sun *et al.*, 2005b). In *A. thaliana* konnten für beide Gene der GSH-Biosynthese erhöhte mRNA-Gehalte nach Cd(II)- bzw. Cu(II)-Exposition gezeigt werden (Xiang & Oliver, 1998) Bei anderen Schwermetallen war dies nicht der Fall. Da GSH Ausgangsstoff für die Synthese von Phytochelatinen ist, sind diese Beobachtungen ein Hinweis für die Beteiligung von PC bei der Detoxifikation von Cd(II) und Cu(II). Eine Konzentration von 200 μ M Cd(II) führte in *A. thaliana* zu einer Verdopplung der GSHS-mRNA (Harada *et al.*, 2002). Vergleichbar bewirkte eine Konzentration von 100 μ M Cd(II) im Medium von

S. cerevisiae eine verstärkte Transkription des *GSH1*-Gens (γ -ECS) (Stephen & Jamieson, 1997), während bei 1 mM Cd(II) von einer Verzehnfachung des Gehaltes an γ -ECS-Protein berichtet wurde (Vido *et al.*, 2001). Nachdem die γ -ECS-Reaktion als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der GSH-Biosynthese identifiziert wurde, schlossen sich zahlreiche Studien an höheren Pflanzen an, welche die Cd(II)-Toleranz durch γ -ECS-Überexpression steigern sollten. In den meisten Arbeiten wurde dieses Ziel erreicht (Noctor *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1999; Peuke & Rennenberg, 2005).

Die verstärkte Expression von *gsb1* und *gsb2* in *P. patens* deutet auf eine Cd(II)-vermittelte Induktion der beiden GSH-Biosynthesereaktionen hin. Hierbei kam es insbesondere zur Erhöhung der γ -ECS-mRNA-Menge. Da diese Reaktion den limitierenden Schritt der GSH-Bildung darstellt, erscheint eine Zunahme der γ -EC-Syntheserate unter Bedingungen gesteigerten GSH-Bedarfs sinnvoll.

5.4.4 Metallothioneine

Zur Auffindung weiterer Mechanismen, die an einer Cd(II)-Detoxifikation beteiligt sein könnten, wurden zwei Metallothionein-Sequenzen (MT A und MT B) mittels *real-time*-PCR untersucht.

Für eine Klassifizierung von pflanzlichen MT steht das phylogenetische System von Binz & Kägi (1999) zur Verfügung. Die pflanzlichen MT mit einer Proteinmasse von 5 bis 9 kDa sind in Familie 15 eingeordnet. Sie weisen meist zwei Cys-reiche Regionen am N- bzw. C-Terminus auf, die durch eine Cys-arme Spacer-Region getrennt sind (Domenech *et al.*, 2006). Erst nach Bindung von Metallionen kommt es zur Ausbildung der MT-typischen, hantelförmigen Struktur (Zimeri *et al.*, 2005).

Die Funktion pflanzlicher MT ist unklar. Zahlreiche Genexpressionsstudien deuten darauf hin, dass MT in einer Vielzahl von Entwicklungs- (Keimung, Seneszenz) und Stressprozessen (Trockenstress, Salzstress) beteiligt sind (Review: Cobbett & Goldsbrough, 2002). Denkbar ist auch eine Aufgabe bei der Sequestrierung intrazellulärer Metallionen. Diese Funktion kommt in Pflanzen zwar hauptsächlich den PC zu. Dennoch gibt es Hinweise, die eine MT-Beteiligung an der Metall-Homöostase vermuten lassen. Beispielsweise bindete ein in *A. thaliana* exprimiertes MT aus *P. sativum* Cd(II)-, Zn(II)- oder Cu(I)-Ionen (Tommy *et al.*, 1991). Im Unterschied dazu konnten MT-Gen-Expressionsstudien an Cd(II)-gestressten *S. vulgaris* keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen MT-Transkription und Schwermetalltoleranz nachweisen (Jack *et al.*, 2007). Für *P. patens* konnte hingegen eine signifikant gesteigerte Expression der beiden putativen MT nach Cd(II)-Gabe beobachtet werden. Cho *et al.* (2006) berichteten von einem

Metallothionein in *P. patens*, dessen Expression nach kurzzeitigem Cd(II)-Stress stark anstieg. Dieses weist aber keine Sequenzhomologie zu den getesteten MT aus *P. patens* auf. Die Cd(II)-Applikation (100 μ M, 24 h) ist zweifelhaft, da in der vorliegenden Arbeit bereits eine Behandlung mit 10 μ M Cd(II) zu deutlichen Vitalitätsverlusten führte (s. 4.1). Das untersuchte MT besitzt homologe Anordnungen der Cys-Reste im Vergleich mit MT höherer Pflanzen. Eine erst seit kurzem in der Datenbank verfügbare MT-EST-Sequenz aus *P. patens* („MT C“) hat ebenfalls Homologien zu den MT von *O. sativa* und *V. faba* (C. Hermsen, unveröffentlichte Ergebnisse).

5.5 Verursacht Cd(II) oxidativen Stress in *P. patens*?

Neben den Schäden essentieller Prozesse wie der Photosynthese sind für Cd(II)-gestresste Pflanzen auch Änderungen des zellulären Oxidationsstatus bekannt (Corticeiro *et al.*, 2006). Da Cd(II) nur in der Oxidationsstufe +II (bzw. 0 für metallisches Cadmium) vorkommt, kann eine direkte Beteiligung an Redox-Reaktionen ausgeschlossen werden (Garnier *et al.*, 2006). Somit kann Cd(II) nur auf indirekten Weg oxidativen Stress bewirken. Als weiche Lewis-Säure wird Cd(II) vorwiegend an die SH-Gruppen von Biomolekülen wie Proteinen, GSH oder PC gebunden. Außerdem wird eine Verdrängung redox-aktiver Metalle wie Fe oder Cu aus aktiven Zentren diskutiert. Da GSH mit einer millimolaren Konzentration das häufigste Thiol der Zelle darstellt, ist eine Störung des GSH-Gleichgewichtes in Pflanzen wahrscheinlich, was mit einer Störung der Redox-Homöostase einherginge. Die daraus resultierende Verringerung der zellulären Antioxidations-Kapazität würde die Erhöhung der Konzentration von ROS (*reactive oxygen species*) wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Superoxid-Anion (O_2^-) verursachen.

Die Zelle verfügt über Metabolite und Enzyme, die zur Aufrechterhaltung der Redox-Balance beitragen (Jacob *et al.*, 2006). Im nicht-enzymatischen ROS-Schutz spielen GSH und Ascorbat als Radikalfänger eine wesentliche Rolle. So führt die ROS-Entgiftung zur Bildung oxidierten Glutathions, GSSG. Auf enzymatischer Seite sind die Enzyme des Ascorbat-GSH-Zyklus, welcher die Rückbildung von reduziertem Ascorbat sicherstellt, von Bedeutung. Dies sind GSH-Reduktase (GR) sowie Ascorbat-Reduktasen (AscR) bzw. -Peroxidase (APX). Darüber hinaus ist die GSH-Peroxidase (GPOX) an der Reduktion von Hydroperoxiden beteiligt. Ein wichtiges Kennzeichen zur Indikation oxidativen Stresses ist eine Veränderung des als Redoxstatus bezeichnete Verhältnisses zwischen GSH:GSSG (Maughan & Foyer, 2006). Eine Steigerung des GSSG-Gehaltes durch oxidativen Stress bewirkt eine Verringerung dieses Quotienten.

Zur Analyse, ob oxidativer Stress durch Cd(II)-Exposition in *P. patens* hervorgerufen wird, wurde die Expression von Genen untersucht, die an der Redox-Homöostase beteiligt sind (AscR, APX, GR bzw. GPOX). Ähnlich den Ergebnissen der Cys-bzw. GSH-Biosynthesegene konnten auch in diesem Fall ab dem dritten Versuchstag signifikante Zunahmen der mRNA-Gehalte beobachtet werden (5 μ M: AscR, GR; 10 μ M: APX, AscR, GR). Dies deutet auf Cd(II)-induzierten oxidativen Stress hin. Sarry *et al.* (2006) berichteten von einer erhöhten Expression der Ascorbat-Peroxidase bzw. -Reduktase in Cd(II)-gestressten *A. thaliana*-Pflanzen. Eine Steigerung der GR- bzw. GPOX-Enzymaktivitäten von Cd(II)-behandelten (0,25 mM bzw. 1 mM) *Rhizobium leguminosarum* ermittelt (Corticeiro *et al.*, 2006). Parallel dazu wurde ein Anstieg des GSSG-Gehaltes beobachtet. In Cd(II)-gestressten Meerrettich (0,1 - 0,5 mM) wurde hingegen eine signifikant verringerte Peroxidase-Aktivität festgestellt (Nepovim *et al.*, 2004).

Neben den Expressionsstudien wurde auch das als Redoxstatus bezeichnete GSH:GSSG-Verhältnis bestimmt. Für *P. patens* wurde eine Zunahme von $\text{GSH}_{\text{red}}/\text{GSSG}$ nach Cd(II)-Applikation festgestellt. Der absolute GSSG-Gehalt stieg zwar leicht an, dennoch fiel der prozentuale GSSG-Anteil an GSH_{ges} aufgrund der starken Zunahme an GSH_{red} . Dieser Anteil verringerte sich von etwa 40 % in den Kontrollproben auf ca. 25 % in den Cd(II)-behandelten Kulturen (5 Tage). Anscheinend ist der GSSG-Anteil an GSH_{ges} bei Moosen generell sehr hoch. Bruns (1998) beobachtete bei *F. antipyretica* einen GSSG-Anteil von $41 \% \pm 18 \%$. Bei höheren Pflanzen liegt dieser Wert unter 5 %. Aufgrund der gegensätzlichen Ergebnisse zu Genexpression und Redoxstatus ist eine endgültige Schlussfolgerung, ob Cd(II) oxidativen Stress in *P. patens* hervorruft, nicht möglich.

5.6 Glutathion-S-Transferasen

Die Analysen zur Cd(II)-induzierten Expression verschiedener GST-Gene zeigten die höchsten Steigerungen aller untersuchten Gene. Dabei wurden bei drei der vier Glutathion-S-Transferasen um den Faktor 20 bis 140 gesteigerte mRNA-Gehalte festgestellt (s. Abb. 24). Von ähnlich hohen Induktionsraten eines GST-Gens (*Bz2*) wurde in Cd(II)-gestressten *Zea mays* berichtet (Marrs & Walbot, 1997). Hier konnten die Autoren sogar die Aktivierung eines alternativen Transkriptions-Startpunktes nachweisen, welcher in ungestressten Pflanzen nicht benutzt wird. Überraschenderweise spiegelt sich bei dieser Studie die vermehrte Expression nicht in einer Erhöhung der Enzymaktivität wieder. Auch bei Cd(II)-exponierten *A. thaliana*-Kulturen wurde eine Erhöhung der GST-Expression bestimmt, was außerdem durch eine Zunahme an GST-Protein untermauert wurde (Sarry *et al.*, 2006). In Wurzeln von *Oryza sativa*

bewirkten schon geringe Cd(II)-Gehalte (20 μ M) eine Induktion der GST-Gene *osgstu3* und *osgstu4* (Moons, 2003). Eine gesteigerte GST-Transkription ist typisch für Schwermetall-gestresste Pflanzen (Schroder *et al.*, 2003). Wahrscheinlich hängt die Zunahme der GST-Expression mit einer vermehrten Bildung oxidierter Zellmetabolite, z.B. Fettsäure-Peroxiden, zusammen. Diese Peroxide werden im Rahmen der Phase II - Entgiftung von den GSH-S-Transferasen an GSH konjugiert und entgiftet.

Die Ergebnisse zur GST-Genexpression unter Cd(II)-Stress spiegeln sich in den GST-Enzymaktivitäten wider (s. Abb. 29). Zwar fielen die Steigerungsraten in *P. patens* weniger hoch aus, als aufgrund der Transkriptionsergebnisse zu vermuten gewesen wäre. Dennoch konnte schon nach 24 h Cd(II)-Exposition eine signifikante Aktivitätszunahme um das vierfache ermittelt werden. Zu späteren Zeitpunkten wurden Zuwächse um den Faktor 6 (3 d) bzw. 10 (5 d) erreicht. Gegensätzliche Ergebnisse wurden für Cd(II)-gestressten *Zea mays* erhalten. In diesem Fall war eine deutliche Transkriptionssteigerung eines GST-Genes nicht von einer Zunahme der Enzymaktivität begleitet (Marrs & Walbot, 1997). Auch bei *Armoracia rusticana* bewirkten relativ hohe Cd(II)-Konzentrationen von 0,1 mM bzw. 0,5 mM keine Änderung der GST-Aktivität (Nepovim *et al.*, 2004). Ferner wird in der Literatur eine Beteiligung von GST-Enzymen an der Bildung/Stabilisierung von GSH-Cd-Chelat-Komplexen in *S. cerevisiae* vorgeschlagen (Adamis *et al.*, 2004). Die beiden GST-Gene aus *S. cerevisiae*, GTT1 und GTT2, besitzen demnach verschiedene Funktionen im Rahmen der Cd(II)-Detoxifizierung, welche durch die Mutanten Δ gtt1 und Δ gtt2 aufgeklärt werden sollten. So soll GTT2 an der Bildung des Cd-GSH-Komplexes beteiligt sein, während GTT1 für die GSH-Homöostase nötig ist. Mit 10 μ M Cd(II) gestresste *A. thaliana* zeigten eine Erhöhung der Protein-Menge verschiedener GST-Enzyme (Roth *et al.*, 2006).

5.7 Enzymaktivitäten unter Cd(II)-Stress

Begleitend zu Untersuchungen der Genexpression von Enzymen der Sulfatassimilation und GSH-Biosynthese wurden auch die Aktivitäten ausgewählter Enzyme unter Cd(II)-Stress analysiert (Review: Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005). Dazu mussten die in der Literatur bekannten Enzymassays für OAS-TL, γ -ECS und GSHS an *P. patens* angepasst werden. So wurde zum einen das Volumen an Rohextrakt optimiert. Zum anderen war eine Abstimmung der Substratkonzentrationen erforderlich, um im Substratsättigungsbereich messen zu können.

Interessanterweise stehen die Ergebnisse der OAS-TL-Aktivitätsbestimmungen nicht im Einklang mit den Resultaten der *real-time* PCR. Während die Expressionsstudien eine schwache Induktion der OAS-TL-Transkription vermuten ließen, wurde im Gegensatz dazu eine Ver-

ringerung der OAS-TL-Enzymaktivität besonders bei längerer Cd(II)-Einwirkung (3 d, 5 d) festgestellt. Für die OAS-TL-Aktivität nach Cd(II)-Applikation finden sich in der Literatur widersprüchliche Daten. So wurde in Cd(II)-gestresstem *Zea mays* (100 μ M) ein Rückgang der OAS-TL-Aktivität beschrieben (Astolfi *et al.*, 2004b), während Enzymassays bei *Avena sativa* (100 μ M, Astolfi *et al.*, 2004a) als auch *A.thaliana* (50 μ M, Dominguez-Solis *et al.*, 2001) eine Aktivitätszunahme aufzeigten.

Die OAS-TL-Aufreinigung aus *P. patens* wurde nach dem für *A. thaliana* optimierten Protokoll durchgeführt. Die Ergebnisse (s. 4.7) bestätigen, dass tatsächlich OAS-TL isoliert werden konnte. Dafür wurde eine Ein-Schritt-Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie verwendet, welche die SAT/OAS-TL-Bindung zum Cystein-Synthase-Komplex ausnutzte. Das rekombinante SAT-Protein wurde dabei über His-Tag an die Ni(II)-Säule immobilisiert (stationäre Phase); die mobile Phase bestand aus dem *P. patens*-Rohextrakt. Die Bindung wurde durch Zugabe von OAS-Lösung aufgehoben, wobei die OAS-TL-Elution erfolgte. Ein erstes Indiz für eine erfolgreiche Reinigung bestand in der Gelbfärbung der Elutionsfraktionen. Diese Färbung ist charakteristisch für Pyridoxalphosphat-haltige Enzyme. Jedoch kam es im Zuge der Isolation zu einem deutlichen OAS-TL-Aktivitätsverlust von über 80 %. Hierfür sind vielfältige Ursachen denkbar. Möglicherweise drang Luft in die Säule ein und führte so zur Inaktivierung bzw. Denaturierung des Enzyms während der Aufarbeitung. Schließlich konnten anhand von 2D-Gelelektrophorese zwei mögliche OAS-TL-Isoformen in *P. patens* gefunden werden. Während die eine, leichtere Isoform offenbar in größerer Konzentration und zahlreichen postrationalen Modifikationen vorkommt, weist die andere ein höheres Molekulargewicht auf und wird weniger modifiziert. Bisher konnten in *A. thaliana* neun Gene identifiziert werden, welche OAS-TL kodieren (Kopriva, 2006). Ob es eine identische Anzahl von Isoformen gibt, ist fragwürdig. Schließlich konnten nur fünf Isoformen, hinsichtlich ihrer Fähigkeit an SAT zu binden bzw. Cys zu bilden, als „echte“ OAS-TL erkannt werden. Eine davon wurde als „falsche“ OAS-TL nachgewiesen (Corinna Heeg, unveröffentlichte Ergebnisse). Die anderen drei könnten β -Cyanoalanin-Synthasen darstellen.

Neben den OAS-TL-Untersuchungen wurden auch die Aktivitäten der GSH-Biosynthese-Enzyme bestimmt. Da die γ -ECS-Reaktion als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der GSH-Bildung betrachtet wird (Arisi *et al.*, 1997), ist eine gesteigerte γ -ECS-Aktivität unter erhöhtem Thiolbedarf wahrscheinlich. Bei Cd(II)-gestressten *P. patens* konnten erhöhte Enzymaktivitäten von γ -ECS (Abb. 27) und GSHS (Abb. 28) gefunden werden, was die Tendenzen der Transkript-Untersuchungen bestätigt. Bei vielen anderen Pflanzen wurde

ebenfalls eine Zunahme des γ -EC-Gehaltes und/oder der γ -ECS-Aktivität nach Cd(II)-Gabe beobachtet (Meuwly & Rauser, 1992; Schneider & Bergmann, 1995). In der Zelllinie *CdR6-0* von *Lycopersicon esculentum* wurde nach einer fünftägigen Behandlung mit bis zu 0,3 mM CdCl₂ eine Verdopplung der γ -ECS-Aktivität berichtet, während für die Cd(II)-sensitivere *CdS*-Linie GSHS-Aktivitäten ermittelt wurden, die mit den entsprechenden Kontrollwerten vergleichbar waren (Chen & Goldsbrough, 1994). Auch konnten zwischen den beiden Zelllinien keine Unterschiede nach Cd(II)-Applikation gefunden werden. Möglicherweise stellt demnach nur die γ -ECS-Reaktion einen Ansatzpunkt zur Verbesserung der Cd(II)-Toleranz von Pflanzen dar. So wurde das *gsbI*-Gen aus *E. coli* in *B. juncea* überexprimiert. Dies hatte eine fünffach erhöhte γ -ECS-Aktivität zur Folge, was schließlich zu einer Verringerung der Cd(II)-Sensibilität führte (Zhu *et al.*, 1999). Jedoch gibt es ebenso Studien, die von einer gesteigerten GSHS-Aktivität in Cd(II)-gestressten Pflanzen berichten. Klapheck *et al.* (1995) stellten unter 20 μ M CdCl₂ (3 d) in *Pisum sativum* eine fünffach erhöhte GSHS-Aktivität in den Wurzeln fest, was die Ergebnisse von früheren Studien (Rüegsegger *et al.*, 1990) untermauerte.

5.8 Thiolgehalte nach Cd(II)-Exposition

Parallel zu den Genexpressions- und Enzymaktivitätsanalysen wurden mittels RP-HPLC die Gehalte an Cys, γ -EC und GSH nach Cd(II)-Gabe ermittelt. Bereits nach 24 h wiesen die Cd(II)-behandelten Kulturen eine höhere Cys-Konzentration als die Kontrollpflanzen auf. Da dies weder auf eine gesteigerte Transkription noch auf eine OAS-TL-Aktivitätserhöhung zurückgeführt werden kann, ist eine Cys-Freisetzung über Protein-Abbau während der ersten Stunden wahrscheinlich. Dies könnte allerdings auch mit dem Abbau geschädigter Proteine zusammenhängen, welche unter Stressbedingungen vermehrt anfallen. Möglicherweise existiert auch ein Mechanismus, durch den Cys-reiche Proteine, welche von Cd(II) leichter geschädigt werden können, durch Cys-ärmere Isoformen ersetzt werden, die weniger Cd(II)-suszeptibel wären, wie für *S. cerevisiae* diskutiert (Fauchon *et al.*, 2002). Zusammenfassend kann man sagen, dass Cd(II)-Stress eine höhere Nachfrage an Cys und GSH bewirkt, was mit der Literaturmeinung im Einklang steht (Xiang & Oliver, 1998; Dominguez-Solis *et al.*, 2001; Mendoza-Cózatl & Moreno-Sanchez, 2006; Rellan-Alvarez *et al.*, 2006).

Frühere Untersuchungen von Bryophyten, die ebenso wie *P. patens* keine Phytochelatine bilden, zeigten grundsätzlich eine Erhöhung der Thiolgehalte unter Cd(II)-Stress (Bruns *et al.*, 2001). In *P. patens* konnte nun eine Anpassung des Metabolismus an Cd(II) festgestellt werden, die in einer gesteigerten Gen- und Enzymaktivität bestand (γ -ECS und GSHS). Dies kann bei diesen Organismen als der zugrunde liegende Mechanismus für eine signifikant höhere Cystein- und

GSH-Konzentration angesehen werden. Entgegengesetzt reagieren PC-synthetisierende, höhere Pflanzen auf Cd(II): bei ihnen wurde eine Abnahme des GSH-Gehaltes nachgewiesen (Sarry *et al.*, 2006). Dies wird durch die GSH-verbrauchende PC-Synthese verursacht (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005; Mendoza-Cózatl & Moreno-Sanchez, 2006). Beispielsweise wurde an Cd(II)-behandeltem *Triticum aestivum* eine verstärkte PC-Bildung dokumentiert (Sun *et al.*, 2005a). Jedoch zeigten Siebröhren von *B. napus* erhöhte GSH-Spiegel nach Cd(II)-Applikation (Nakamura *et al.*, 2005).

Die Korrelation zwischen den Cys- und GSH-Gehalten der Cd(II)-behandelten Ansätze deutet auf eine Anpassung des Cys-Pools an eine erhöhte Nachfrage der GSH-Biosynthese hin. Versuche zum *in vivo*-labeling von GSH mit Monochlorbiman (MCB) zeigen deutlich niedrigere GSH-Werte als die mittels mBBBr-Derivatisierung erhaltenen Resultate bei Cd(II)-gestressten *P. patens*. Dieser Unterschied könnte mit den durch putative Cd(II)-Chelatierung „blockierten“ GSH-Molekülen zusammenhängen, welche nicht für eine MCB-Markierung zur Verfügung stehen würden (C. Bleuel & A. Meyer, unveröffentlichte Ergebnisse).

Die Thiolbestimmung der Mutanten, denen die Fähigkeit fehlt, Sulfit über die APS-Reduktase-Reaktion zu bilden, zeigte überraschende Resultate. Die Konzentrationen an Cys und GSH von Mutante 12-4-3 waren mit denen vom Wildtyp hinsichtlich der Kontrollwerte und dem Anstieg unter Cd(II) annähernd vergleichbar. Jedoch wies Mutante 11-3-12 viel höhere Gehalte an diesen Thiolen auf. Im Vergleich mit dem Wildtyp waren hier Cys und GSH bei Kontroll- und Cd(II)-Proben um ca. 100 % höher. Gemäss Koprivova *et al.* (2002), wonach die Δapr -Mutanten eine Halbierung des Flusses innerhalb der Sulfatassimilation aufweisen, wären stattdessen deutliche niedrigere Thiolgehalte zu erwarten gewesen.

Es ist denkbar, dass im Fall der Mutanten neben dem APS-Gen regulatorische Elemente der PAPR-Reaktion deletiert wurden, was mit einer konstitutiven Aktivität der PAPR verbunden wäre. Demnach könnte auch bei ausreichender Cys-Verfügbarkeit die Hemmung der Sulfat-Assimilation aufgehoben werden. Limitierend wäre dabei nur die Bereitstellung von OAS. Eine Revertierung der Mutation kann durch die kontinuierliche Überprüfung der Mutation mittels RT-PCR ausgeschlossen werden.

5.9 Beeinflussung der Cd(II)-Toleranz durch zusätzliches Sulfat

Mittels erhöhter SO_4^{2-} -Konzentration im Medium sollte der Fluss innerhalb der Sulfat-assimilation gesteigert werden und dadurch mehr Cys zur GSH-Biosynthese zur Verfügung stehen. Die Anzucht in Nährmedium mit erhöhtem Sulfatgehalt führte zu einer vermehrten Cd(II)-Bioakkumulation von *P. patens*. So war die Zunahme der Cd(II)-Bioakkumulation bei

Gabe von MgSO_4 proportional zum Angebot im Medium. Im Unterschied dazu wurde im Fall einer Na_2SO_4 -Applikation von 2 mM schnell eine Sättigung der intrazellulären Cd(II)-Konzentration erreicht, welche sich auch nach Supplement größerer Mengen nicht zusätzlich erhöhte. Im Gegenzug war die gesteigerte Bioakkumulation mit einem deutlichen Rückgang der Biomasse pro Kolben verbunden, so dass nicht mehr genügend Material zur Vitalitätsbestimmung verfügbar war. Vermutlich war die Vitalität sogar stärker beeinträchtigt als bei herkömmlicher Anzucht, da schon bei den mit 5 μM Cd(II) behandelten Kulturen bereits nach kurzer Zeit deutliche Verfärbungen sichtbar waren, deren bräunlicher Ton auf einen Chlorophyll-Abbau deutete. Dabei wirkten die hohen Konzentrationen an Na- bzw. Mg-Ionen offenbar als zusätzlicher Stressfaktor neben Cd(II).

Ähnliche Beobachtungen wie bei *P. patens* sind in der Literatur nicht vorhanden. Außerdem gibt es nur wenige Untersuchungen, die die Schwermetall-Bioakkumulation anhand verschiedener Anzuchtbedingungen analysieren. Eine Beeinflussung der Cd(II)-Biosorption konnte durch einige Kationen (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} oder Ca^{2+}) im Medium oder auf der Moosoberfläche bestätigt werden (Pickering & Puia, 1969; Gjengedal & Steinnes, 1990; Cenci, 2001). Als eine mögliche Erklärung führen Blackwell *et al.* (1998) eine Konkurrenz von bivalenten Kationen um die Bindeplätze der Kationentransporter an, was z.B. bei höheren Mg(II)-Gehalten zu einer geringeren Mn(II)-Aufnahme führt. Studien an *Triticum aestivum* ergaben, dass ein erhöhter Sulfatgehalt den Biomasse-Verlust nach Schwermetall-Stress verringerte und den Sulfatgehalt in Blättern und Wurzeln steigerte (McMahon & Anderson, 1998). Dies war mit einer erhöhten Sulfat-Aufnahme und einer leichten Steigerung des GSH-Spiegels verbunden. In den Kontrollproben war letzteres jedoch sehr viel stärker ausgeprägt. Ähnliche Befunde erhielt Braha bei Untersuchungen am aquatischen Hyphomyceten *Heliscus lugdunensis* (2004). Hierbei konnte eine Sulfatkonzentration von 20 mM die durch 100 μM Cd(II) bzw. 250 μM Zn(II) hervorgerufenen Biomasseverluste halbieren (Cd) oder aufheben (Zn). Parallel dazu wurde eine Steigerung des intrazellulären SO_4^{2-} -Gehaltes um das Achtfache gemessen. Hinsichtlich der Thiole (Gesamtthiolgehalt und GSH) war jedoch das Gegenteil der Fall.

Die Thiolgehalte von *P. patens* unterschieden sich bei den in normalem Medium und den in Medium mit erhöhtem Sulfatgehalt angezogenen Kontrollansätzen nicht. Dasselben Beobachtungen wurden bei *P. patens* gemacht, welche unter Cd(II) und gesteigertem Na_2SO_4 -Spiegel kultiviert wurden. Im Fall der mit Cd(II)- und MgSO_4 -behandelten Moose nahmen die Konzentrationen von Cys und GSH sogar mit zunehmender Versuchsdauer bzw. Sulfatkonzentration ab. Die erhöhte Cd(II)-Bioakkumulation war demnach nicht von einer Steigerung des GSH-Spiegels begleitet. Anscheinend war die Cys- bzw. GSH-Biosynthese bereits bei

herkömmlicher Kultivierung im maximalen Bereich und konnte durch eine gesteigerte Sulfatverfügbarkeit nicht weiter erhöht werden. Es ist denkbar, dass die entsprechenden Präkursoren wie O-Acetylserin (Cys-Biosynthese) bzw. Glutamat und Glycin (GSH-Biosynthese) die limitierenden Faktoren waren, welche zu einer Steigerung der *de novo*-GSH-Biosynthese erforderlich gewesen wären. Die erhöhte Bioakkumulation wäre demnach ein Effekt, welcher auf den hohen Konzentrationen an Na(I) und Mg(II) im Medium beruht.

5.10 Glutathion als Cd(II)-Chelator in Moosen?

In der vorliegenden Arbeit konnte keine eindeutige Funktion von GSH als Schwermetall-Chelator in *P. patens* belegt werden. Einige Indizien lassen diese Rolle jedoch sehr stark vermuten (s. Tab. 12).

Tab. 12 Ergebnisse, die für (pro) bzw. gegen (contra) eine Beteiligung von GSH an der Cd(II)-Detoxifikation in *P. patens* sprechen

| pro | contra |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - Transkription von Genen der Cys- bzw. GSH-Biosynthese ist unter Cd(II) signifikant erhöht - Steigerung der Enzymaktivitäten von γ-ECS und GSHS in den Cd(II)-Proben - Cytoplasmatische Cd(II)-Bindung an SH-Gruppen in <i>F. antipyretica</i> (Bruns <i>et al.</i>, 2001) - Ergebnisse zur <i>in vivo</i>-Markierung von GSH mittels MCB (C. Bleuel & A. Meyer, unveröffentlichte Ergebnisse) | <ul style="list-style-type: none"> - keine Steigerung der Thiolgehalte unter erhöhtem Sulfatgehalt im Medium trotz gesteigerter Cd(II)-Bioakkumulation - Verringerung der OAS-TL-Enzymaktivität unter Cd(II)-Stress |

Leider war ein Nachweis des postulierten $\text{GSH}_2\text{-Cd}^{2+}$ -Komplexes *in vivo* mittels analytischer Elektronenmikroskopie nicht möglich (s. 5.1.2). Im aquatischen Moos *Foninalis antipyretica* konnte jedoch anhand von EEL-Spektren eine cytoplasmatische Cd(II)-Bindung an SH-Gruppen nachgewiesen werden (Bruns *et al.*, 2001). In derselben Studie wurde eine vakuoläre Cd(II)-Präzipitation als Phosphat dokumentiert. Demnach würde der GSH-Cd(II)-Komplex in der Vakuole aufgrund des niedrigen pH-Wertes zerfallen. Eine analoge Funktion von GSH als

vorläufiger Cd(II)-Chelator im Cytoplasma und Cd(II)-Transporter zur Vakuole ist auch für *P. patens* denkbar. Auch in Cd(II)-gestressten, höhere Pflanzen liegt ein Großteil (98 %) des cytosolischen Cd(II) zunächst als Cd-GS₂-Komplex vor (Rea, 2006). Dabei fungieren Cd-GS₂ und GSH als Substrate der Phytochelatin-Synthase. Daraus ließe sich der Schluss ziehen, dass GSH eine Funktion bei der Cd(II)-Detoxifikation in Moosen zukommen könnte, da diese Pflanzen nicht zur PC-Synthese befähigt sind, jedoch einen signifikanten Anstieg des GSH-Gehaltes nach Cd(II)-Applikation aufweisen. Bei der Detoxifikation von Schwermetallen als Bis(glutathionato)-Komplex könnte es sich demnach um eine evolutionär frühe Form der Schwermetall-Entgiftung handeln, die später durch homologe Phytochelatin-Komplexe in höheren Pflanzen ersetzt wurde.