

6 Zusammenfassung und Ausblick

Da Schwermetalle natürliche Bestandteile der Biosphäre darstellen, mussten Pflanzen Strategien entwickeln, um sich vor deren Vielfalt wirkungsvoll zu schützen. Während einige dieser Elemente (z. B. Zn, Cu, Fe, Mn) essentielle Funktionen als Cofaktoren von Enzymen besitzen, wirken andere (z.B. Cd, Pb, Hg) bereits bei geringen Konzentrationen toxisch. Cd(II) verursacht schwere Schäden des pflanzlichen Metabolismus. Da diese Störungen Einfluss auf die verschiedenen Bereiche des Stoffwechsels haben, wurden in der vorliegenden Arbeit umfassende Analysen zur Wirkung von Cd(II)-Stress auf die Transkription, Enzymaktivität und Metabolitkonzentrationen durchgeführt. Die Untersuchungen wurden durch die Bestimmung der Vitalität, der Cd(II)-Biosorption und -Bioakkumulation bzw. der intrazellulären Cd(II)-Lokalisation ergänzt. Als Modellorganismus wurde das terrestrische Moos *Physcomitrella patens* gewählt, da frühere Studien eine abweichende Reaktion von Moosen gegenüber Schwermetallstress zeigten. Schwermetallexposition bewirkt bei der Mehrzahl der bisher untersuchten Moose nicht die Synthese von Phytochelatinen, wie dies für höhere Pflanzen beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu steigt der GSH-Gehalt signifikant an. Da die Sulfhydryl-Gruppe des Cysteins die entscheidende Rolle für die vielfältigen Funktionen des Tripeptids GSH spielt, lag das zentrale Ziel der Arbeit in der Aufklärung Cd(II)-induzierter Veränderungen der Cys- bzw. GSH-Biosynthese.

Verschiedene Cd(II)-Konzentrationen haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Vitalität von *P. patens*. Anhand der Ergebnisse zum Chlorophyll-Gehalt bzw. -Quotienten bzw. der Photosystem II Aktivität wurde eine Exposition mit 5 µM Cd(II) als tolerierbarer Stress identifiziert. Im Unterschied dazu wurde eine Belastung mit 10 µM Cd(II) als Stress mit Vitalitätsverlust bewertet, der durch eine signifikante Abnahme der Vitalitätsparameter gekennzeichnet ist.

Die Studien zur Cd(II)-Biosorption und -Bioakkumulation von *P. patens* ergaben, dass dieses Moos nur über eine begrenzte Fähigkeit verfügt, Cd(II) an der Zellwand zu adsorbieren. Hingegen konnte eine schnelle Cd(II)-Bioakkumulation beobachtet werden, die im weiteren Versuchszeitraum nur noch geringfügig anstieg. Offenbar besitzt die Zellwand von *P. patens* nur über eine geringe Anzahl von potentiellen Bindestellen, die zur Cd(II)-Adsorption fähig wären. Zukünftige Analysen sollten daher die Bestimmung der Zellwandzusammensetzung von *P. patens* beinhalten, um die Gründe der geringen Biosorptionsfähigkeit im Vergleich mit anderen Moosen aufzuklären.

Mittels Lichtmikroskopie wurden phänotypische bzw. morphologische Änderungen von *P. patens* nach Cd(II)-Gabe festgestellt. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen der Anzucht ohne und mit 10 µM Cd(II) im Medium. Die Cd(II)-gestressten Kulturen waren durch eine bräunliche Verfärbung gekennzeichnet, die im weiteren Versuchsverlauf weiter zunahm. Außerdem war ein gesteigertes Zellteilungswachstum erkennbar, welches sich hauptsächlich in einer hohen Verzweigungsrate der Protonemata niederschlug. Die dabei entstandenen Zellen fielen durch anomale Zellformen und eine geringe Anzahl an Chloroplasten auf. Erst nach längeren Expositionszeiten war eine Verdickung der Zellwand bei einzelnen Zellgruppen ersichtlich.

Die fluoreszenzmikroskopischen Studien zur Cd(II)-Visualisierung wurden mit dem Cd(II)-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff BTC-5N durchgeführt. Es wurden Präzipitate beobachtet, welche hauptsächlich in den Blättchen sichtbar waren und den gesamten Protoplasten ausfüllen. Anhand analytischer EDX-Elektronenmikroskopie sollte die subzelluläre Cd(II)-Verteilung bestimmt werden. In zellulären Niederschlägen konnte jedoch kein Cd(II) nachgewiesen werden, da die lokale Cd(II)-Konzentration vermutlich unterhalb der Nachweisgrenze lag.

Die Untersuchungen zur Gentranskription wurden mittels *real-time*-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse für Transkripte der Enzyme von Cys- und GSH-Biosynthese zeigten eine zeit- und konzentrationsabhängige Induktion der Genexpression. Während einen Tag nach Cd(II)-Zugabe nur geringe Veränderungen erkennbar waren, war eine dreitägige Exposition mit 10 µM Cd(II) von einer signifikanten Zunahme der mRNA-Gehalte aller Enzyme begleitet. 5 µM Cd(II) bewirkte zu diesem Zeitpunkt nur signifikante Induktionsraten beim γ -ECS-Transkript. Am fünften Versuchstag waren die Expressionssteigerungen von mit 5 µM - bzw. 10 µM-behandelten Kulturen annähernd gleich.

Die Ergebnisse der Expressionsstudien lassen den Schluss zu, dass es unter Cd(II)-Stress zu einer Induktion der Expression von Genen der Sulfatassimilation und GSH-Biosynthese kommt. Aufgrund der Tatsache, dass für die meisten der untersuchten Enzyme Isoformen in Cytoplasma, Mitochondrien und Chloroplasten existieren, sollten künftige Untersuchungen die Bedeutung der einzelnen Isoformen für die Cys- bzw. GSH-Biosynthese in *P. patens* klären. In diesem Zusammenhang ist die Erzeugung von Mutanten mittels *knockout*-Konstrukten bestimmter Isoformen sinnvoll.

Eine erhöhte Expression unter Cd(II)-Stress zeigen auch die Gene putativer Metallothioneine. Hierbei konnten für beide Sequenzen signifikante Steigerungen nach dreitägiger Inkubation mit 10 μ M Cd(II) bestimmt werden.

Weiterführende Untersuchungen sollten die Aufklärung der kompletten Gensequenzen beinhalten, um später mittels Überexpression genügend MT-Protein für Bindungsstudien bereitzustellen. Zusätzlich könnte die Herstellung von Δ MT-Mutanten die Bedeutung von MT für die Cd(II)-Toleranz von *P. patens* herausstellen.

Der Einfluss von Cd(II) auf GSH-S-Transferasen wurde sowohl auf Transkript- als auch auf Enzymaktivitätsebene untersucht. Für die Expressionsstudien wurden vier EST-Sequenzen verwendet. Die GST-Induktionsraten spiegelten die höchsten Werte wider, die anhand der *real-time* PCR-Messungen berechnet wurden. Bereits nach dreitägiger Applikation mit 10 μ M Cd(II) waren bei drei GSTs signifikante Transkriptionssteigerungen um das 40- bis 130-fache der Kontrolle feststellbar. Die Analysen zur GST-Aktivität bestätigten die Ergebnisse der Expressionsstudien. Bereits einen Tag nach Cd(II)-Zugabe wurden für 5 μ M bzw. 10 μ M Cd(II) signifikante erhöhte GST-Aktivitäten gemessen, die mit zunehmender Versuchsdauer auf ein Vielfaches der Kontrollwerte anstiegen.

Zukünftige Arbeiten sollten die Bedeutung der GST-Induktion unter Cd(II)-Stress aufklären. Dafür bieten sich Einzel- und Mehrfach-*knockouts* in *P. patens* an. Mittels Überexpressionsstudien könnte eine mögliche Erhöhung der Cd(II)-Toleranz überprüft werden.

Neben den Untersuchungen zur Transkription wurden die Aktivitäten von Enzymen der Cys- und GSH-Biosynthese durchgeführt. Hierbei kamen Enzymassays von OAS-TL, γ -ECS und GSHS am Rohextrakt von *P. patens* zum Einsatz. Die Ergebnisse bestätigten die für γ -ECS und GSHS erhaltenen Befunde der *real-time*-Analysen. Es konnten signifikant erhöhte Enzymaktivitäten unter Cd(II)-Stress beobachtet werden. Die Resultate der OAS-TL-Messungen stehen jedoch im Widerspruch zur Transkriptionsinduktion nach Cd(II)-Gabe. Bei diesem Enzym wurde eine Verringerung der Aktivität in den Cd(II)-belasteten Kulturen festgestellt.

P. patens reagiert auf Cd(II)-Belastung mit einer Erhöhung der Thiolgehalte. Der Cys-Gehalt stieg bereits einen Tag nach Cd(II)-Gabe signifikant an und erreichte am fünften Tag das 2- bis 2,5-fache der Kontrollwerte. Ähnlich verhielt sich die Konzentration von GSH_{ges}. Bei diesem Thiol wurden nach zwei Tagen Cd(II)-Stress signifikante Zunahmen beobachtet. Nach fünf Tagen betrug der GSH_{ges}-Gehalt der Cd(II)-Proben mehr als das Doppelte der unbelasteten

Kulturen. 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.

Zur Differenzierung der einzelnen GSH-Spezies, GSH_{red} und GSSG, aus denen sich der GSH_{ges} -Gehalt zusammensetzt, wurden enzymatische Bestimmungen mittels GSH-Reduktase durchgeführt. Dieser Ansatz zeigte im Vergleich mit der HPLC-Bestimmung zwar etwas höhere Werte. Dennoch konnten die Tendenzen der HPLC-Analyse hinsichtlich der GSH_{ges} -Konzentration bestätigt werden. Die differenzierte Betrachtung der beiden GSH-Formen zeigte einen deutlich höheren Anstieg von GSH_{red} im Vergleich mit GSSG.

Für einen Einblick in den Redox-Status wurde das $\text{GSH}_{\text{red}}/\text{GSSG}$ -Verhältnis berechnet. Dieser Quotient stieg bei Cd(II)-gestressten *P. patens* leicht an.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Ebenen der Cd(II)-Stressantwort einer nicht zur Phytochelatin-Synthese befähigten Pflanze untersucht. Die Ergebnisse der Studien zur Gentranskription, Enzymaktivität bzw. Metabolitkonzentration deuten auf eine Aktivierung der Cys- bzw. GSH-Biosynthese auf den verschiedenen Regulationsebenen hin. Dies lässt auf eine Cd(II)-Detoxifikation durch Glutathion schließen. Der unmittelbare Nachweis des Glutathion-Cadmium-Komplexes für Moose steht noch aus.