

Untersuchungen zur assimilatorischen Sulfatreduktion in
Physcomitrella patens: Analyse von Transkripten,
Metaboliten und Enzymaktivitäten unter
Schwermetallstress



Dissertation

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

vorgelegt der

**Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von Diplom-Biochemiker Michael Rother
geb. am 19. April 1978
in Halle/Saale

Eingereicht: 18. Dezember 2006
Verteidigt: 03. Mai 2007

Gutachter: Prof. Dr. G.-J. Krauß
Prof. Dr. R. Hell
PD Dr. habil. S. Kopriva

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis.....	iv
1 Vorwort.....	7
2 Einleitung.....	8
2.1 Schwermetalle/Cadmium.....	8
2.2 Mechanismen der Schwermetall-Detoxifikation.....	10
2.3 Reduktive Sulfatassimilation	13
2.4 Glutathion	17
2.5 Modellorganismus <i>Physcomitrella patens</i>	19
2.6 Zielstellung der Arbeit	21
3 Materialien und Methoden	23
3.1 Modellorganismus und Anzucht.....	23
3.1.1 Blasenmützenmoos <i>Physcomitrella patens</i>	23
3.1.2 ABC-Medium	23
3.1.3 Kultivierung	24
3.2 Biochemische und analytische Methoden.....	24
3.2.1 Zellaufschluss.....	24
3.2.2 Vitalitätsbestimmung.....	24
3.2.3 RP-HPLC-Analyse von Thiolen mittels Monobromimanderivatisierung	25
3.2.4 Enzymatische Bestimmung von GSH und GSSG	26
3.2.5 Bestimmung der Biosorption und Akkumulation von Cd(II).....	28
3.2.6 Aufreinigung von OAS-TL-Protein	29
3.3 Bestimmung von Enzymaktivitäten	32
3.3.1 O-Acetylserin(thiol)lyase.....	32
3.3.2 γ -Glutamylcystein-Synthetase und Glutathion-Synthetase	33
3.3.3 Glutathion-S-Transferasen (GST)	34
3.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford	34
3.4 Molekularbiologische Methoden	34
3.4.1 Datenbankrecherche	34
3.4.2 Primerdesign	35
3.4.3 RNA-Isolation	36
3.4.4 cDNA-Synthese	36
3.4.5 Real-time-PCR	36
3.4.6 Überprüfung der Δ apr-Mutanten.....	37
3.4.7 Agarose-Gelelektrophorese.....	37
3.4.8 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	37
3.4.9 DNA-Sequenzierung.....	38

3.5	Statistik.....	38
3.6	Mikroskopische Dokumentation.....	39
3.6.1	Lichtmikroskopische Untersuchung	39
3.6.2	Fluoreszenzmikroskopie zur Lokalisierung von Cd(II).....	39
3.6.3	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	39
4	Ergebnisse.....	41
4.1	Charakterierung der Vitalität und des Phänotyps.....	41
4.1.1	Chlorophyllgehalt.....	41
4.1.2	Lichtmikroskopische Dokumentation	45
4.1.3	Elektronenmikroskopische Analysen.....	46
4.2	Untersuchungen zur Biosorption und Bioakkumulation von Cd(II)	46
4.2.1	Biosorption und Bioakkumulation in herkömmlichen ABC-Medium	46
4.2.2	Bioakkumulation unter erhöhtem Sulfat-Gehalt.....	48
4.3	Datenbank-Recherche	49
4.4	Analysen zur Genexpression	50
4.4.1	Bestimmung eines Referenzgens.....	52
4.4.2	Gene der Sulfatassimilation und der Glutathionbiosynthese	53
4.4.3	Gene, deren Produkte an der Redox-Homöostase beteiligt sind	55
4.4.4	Glutathion-S-Transferasen.....	56
4.4.5	Metallothioneine.....	57
4.5	Untersuchungen zur Enzymaktivität	58
4.5.1	OAS-TL.....	58
4.5.2	γ -ECS und GS HS	59
4.5.3	Glutathion-S-Transferasen.....	60
4.6	Untersuchungen der Thiolgehalte unter Cd(II)-Stress	61
4.6.1	Cystein und γ -Glutamylcystein.....	61
4.6.2	Glutathion	62
4.6.3	Konzentrationen von Cys und GSH der Δ apr-Mutanten.....	66
4.6.4	Thiolkonzentrationen unter erhöhtem Sulfat-Gehalt	67
4.7	OAS-TL-Reinigung	70
5	Diskussion	75
5.1	Vitalität von <i>P. patens</i> nach Cd(II)-Exposition.....	76
5.1.1	Pigmentgehalt und Photosystem-II-Effizienz	76
5.1.2	Mikroskopische Untersuchungen	80
5.2	Biosorption und Bioakkumulation von Cd(II) in <i>P. patens</i>	81
5.3	Sequenzvergleiche.....	83
5.4	Einfluss von Cd(II) auf die Transkription	84
5.4.1	Referenzgen.....	84
5.4.2	Sulfatassimilation.....	84
5.4.3	Glutathion-Biosynthese	87
5.4.4	Metallothioneine.....	88
5.5	Verursacht Cd(II) oxidativen Stress in <i>P. patens</i> ?	89

5.6	Glutathion-S-Transferasen.....	90
5.7	Enzymaktivitäten unter Cd(II)-Stress	91
5.8	Thiolgehalte nach Cd(II)-Exposition.....	93
5.9	Beeinflussung der Cd(II)-Toleranz durch zusätzliches Sulfat.....	94
5.10	Glutathion als Cd(II)-Chelator in Moosen?.....	96
6	Zusammenfassung und Ausblick	98
7	Literatur.....	102
Anhang A - Rohdaten.....		i
	Chlorophyll- bzw. Carotinoid-Gehalte und Vitalität.....	i
	Biosorption und Bioakkumulation	iii
	Genexpression	v
	Enzymaktivitäten	vii
	Thiolgehalte.....	viii
Anhang B - Mikroskopische Dokumentation		xiii
	Lichtmikroskopie	xiii
	Fluoreszenzmikroskopie mit BTC-5N	xv
	Elektronenmikroskopie	xvi
	Lebenslauf	xviii
	Erklärung.....	xix

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ABC-Transporter	<i>ATP-binding cassette transporter</i>
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AcOH	Essigsäure
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	<i>base pairs</i> (Basenpaare)
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
BSO	Buthioninsulfoximin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzen
CHES	2-(Cyclohexylamino)ethansulfonsäure
C-Terminus	Carboxyterminus, carboxylendständiger AS-Rest
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphat
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoësäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethyldiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EST	<i>expressed sequence tag</i>
EtOH	Ethanol
FM	Frischmasse
GSSG	Glutathion (oxidiert)
GST	Glutathion-S-Transferase (Proteinfamilie)
GR	Glutathion-Reduktase, GSH-Reduktase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-3-propansulfonsäure
HMW	<i>high molecular weight</i>
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LMW	<i>low molecular weight</i>
mBBr	Monobrombiman
MeOH	Methanol

MES	N-Morpholinoethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MT	Metallothionein
MW	Mittelwert
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduziert)
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduziert)
N-Terminus	Aminoterminus, aminoendständiger AS-Rest
OD _x	optische Dichte bei x nm
PC	Phytochelatin
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PCS	Phytochelatinsynthase
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Photosystem
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RP-HPLC	<i>Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
Rubisco	Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
ssDNA	<i>single strand</i> DNA
SULTR	Sulfat-Transporter
TAE	Tris-Aacetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-HCl/EDTA
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Trockengewicht
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Vol.	Volumen
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
WT	Wildtyp
x g	-fache Erdbeschleunigung

Enzyme und Metabolite der reduktiven Sulfatassimilation
und der Glutathion-Biosynthese

APK	Adenosin-5'-Phosphosulfat-Kinase, APS-Kinase
APR	Adenosin-5'-Phosphosulfat-Reduktase, APS-Reduktase
APS	Adenosin-5'-Phosphosulfat
ATPS	Adenosintriphosphat-Sulfurylase, ATP-Sulfurylase
Cys	Cystein
γ -EC	γ -Glutamylcystein, γ -Glu-Cys
γ -ECS	γ -Glutamylcystein-Synthetase, γ -EC-Synthetase
GSH	Glutathion (reduziert), γ -Glu-Cys-Gly
GSHS	Glutathion-Synthetase, GSH-Synthetase
OAS	O-Acetylserin
OAS-TL	O-Acetylserin(thiol)lyase
PAPR	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat-Reduktase, PAPS-Reduktase
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
SAT	Serin-Acetyl-Transferase
SiR	Sulfit-Reduktase

1 Vorwort

Die vorliegende Dissertation enthält die Ergebnisse von Experimenten, die am Lehrstuhl für Ökologische und Pflanzen-Biochemie im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs 416 „Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe“ finanziert wurden.

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 & Gabbielli, 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>	Ma <i>et al.</i> (2001)
	Ni(II)	- Sekretion von Histidin und Zitronensäure	<i>Triticum aestivum</i>	Salt <i>et al.</i> (2000)
	Cu(II)	- Bindung an Proteine der Zellwand	<i>Thlaspi goesingense</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>	Raab <i>et al.</i> (2004)
	Zn(II)	- Komplexierung durch Nicotianamin	<i>Pteris cretica</i>	Weber <i>et al.</i> (2004)
	Cd(II)	- Bindung an Phytochelatine	<i>Arabidopsis thalleri</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 Spalthefe *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 & Goldsborough, 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>	Piechalak <i>et al.</i> (2002)
		Cd(II)	<i>Vicia faba</i> <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>	Klapheck <i>et al.</i> (1994)
			<i>Arabidopsis thaliana</i>	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>	Meuwly <i>et al.</i> (1995)
			<i>Arabidopsis thaliana</i>	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>	Kubota <i>et al.</i> (2000)
			<i>Arabidopsis thaliana</i>	Sarry <i>et al.</i> (2006)
Desglycyl-PC	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$	Cd(II)	<i>Oryza sativa</i>	Klapheck <i>et al.</i> (1994)
			<i>Zea mays</i>	Meuwly <i>et al.</i> (1995)
PC mit fehlendem $\gamma\text{-Glu}$	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 γ -Glu-Cys auf das naszierende PC (bzw. GSH bei PC₂) 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 (Rauser, 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 Prädiktor 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, SO₄²⁻. Im Gegensatz dazu spielt die Versorgung über SO₂ aus der Luft oder reduzierte S-Verbindungen wie H₂S eine geringe

Rolle (Leustek *et al.*, 2000). Innerhalb der reduktiven SO_4^{2-} -Assimilation werden schrittweise acht Elektronen übertragen und schließlich die Oxidationsstufe von H_2S (-II) erreicht. Die Sulfatassimilation (s. Abb. 1) kann in vier Phasen (Import, Aktivierung, Reduktion, Transfer) eingeteilt werden (Hell, 1997; Leustek & Saito, 1999).

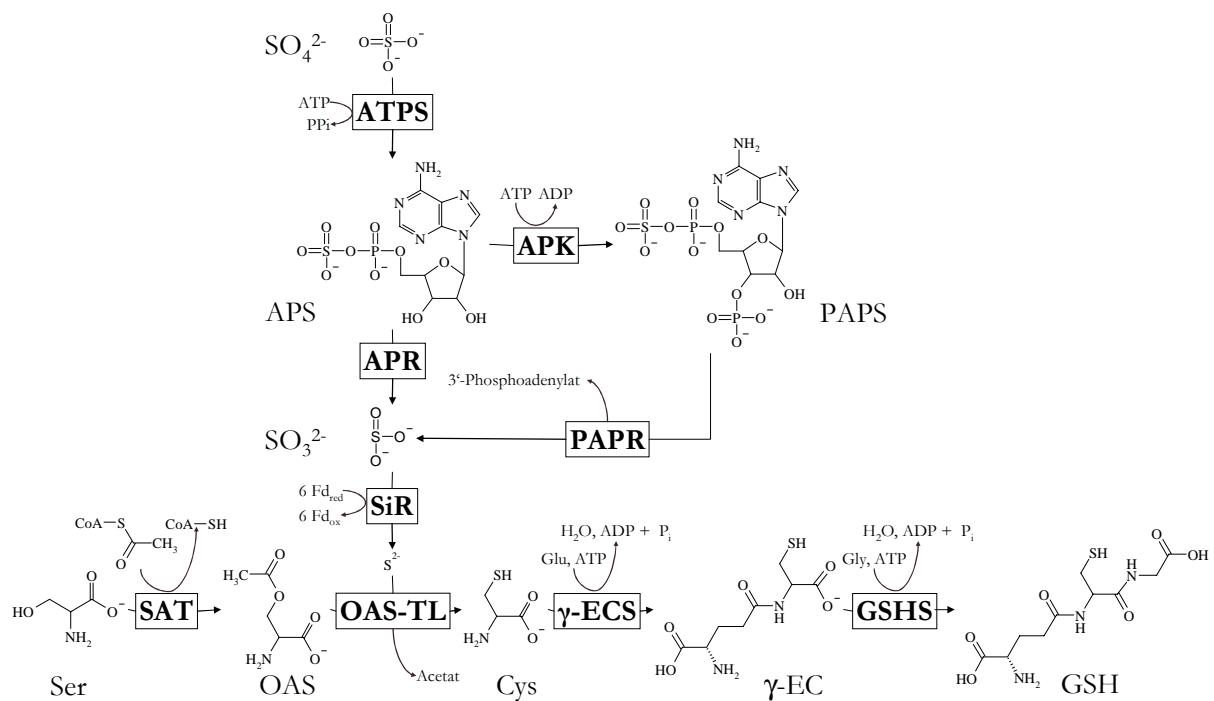


Abb. 1 Sulfat-Assimilation und Glutathion-Biosynthese in *P. patens* modifiziert nach Koprivova *et al.* (2002)

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 (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 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 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 H_2S 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
γ -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.

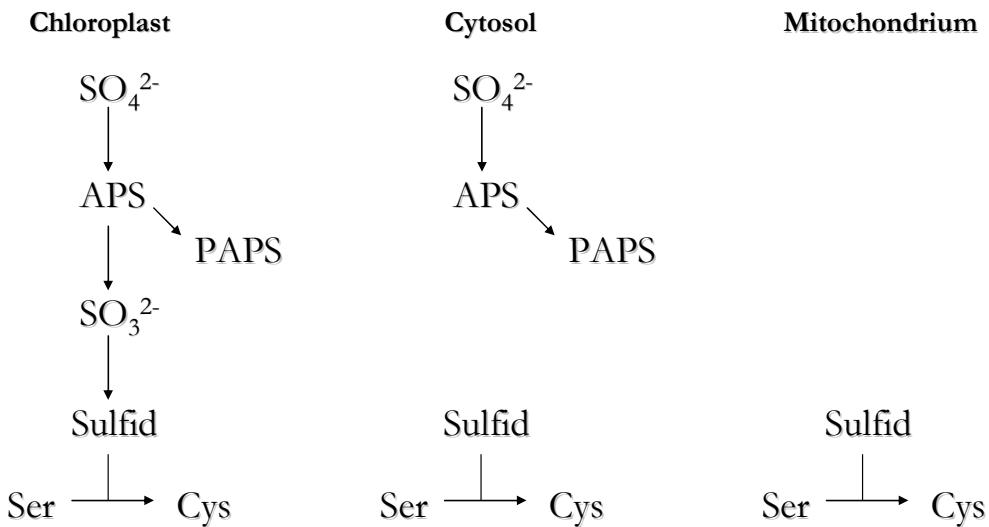


Abb. 2 Subzelluläre Lokalisierung einzelner Schritte der Sulfatassimilation in höheren Pflanzen (nach Kopriva, 2006 unveröffentlichte Ergebnisse)

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 ein 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; Lappatent *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 SO₄²⁻-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 SO₄²⁻-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-Präcursor 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; Brzywczycy *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 (γ -Glu-Cys-Gly, γ -Glutamylcysteinylglycin, Abb. 3) wird in zwei ATP-abhängigen Reaktionen aus den Aminosäure-Bausteinen gebildet (s. Abb. 1). Die erste Reaktion wird vom Enzym γ -Glutamylcystein-Synthetase (γ -ECS) katalysiert. Dabei wird aus Glutamat und Cystein das Dipeptid γ -Glutamylcystein (γ -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 γ -EC.

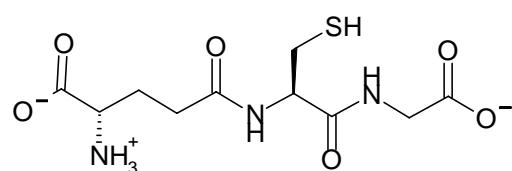


Abb. 3 GSH-Struktur

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

Die Regulation der GSH-Biosynthese ist bedarfsabhängig. Die γ -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 γ -ECS-Enzyms (Hell & Bergmann, 1990; Arisi *et al.*, 1997; Jez *et al.*, 2004). Die Transkription der Gene von γ -ECS bzw. GSHS, *gsh1* und *gsh2*, 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 aufrund 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 Schwefel-Mangel (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.

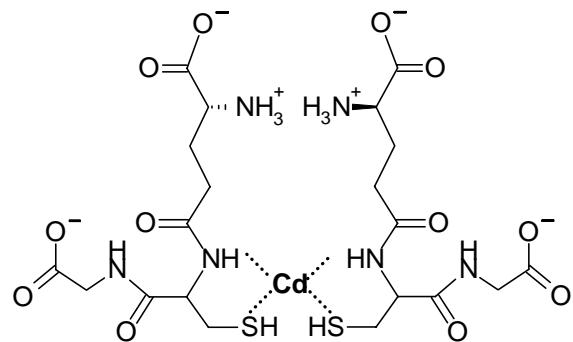


Abb. 4 Hypothetische Struktur des Bis(glutathionato)cadmium-Komplexes nach Li (1997)

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 molekulär-biologischer 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 Wuchsstoffe 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 Haplloidie 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.

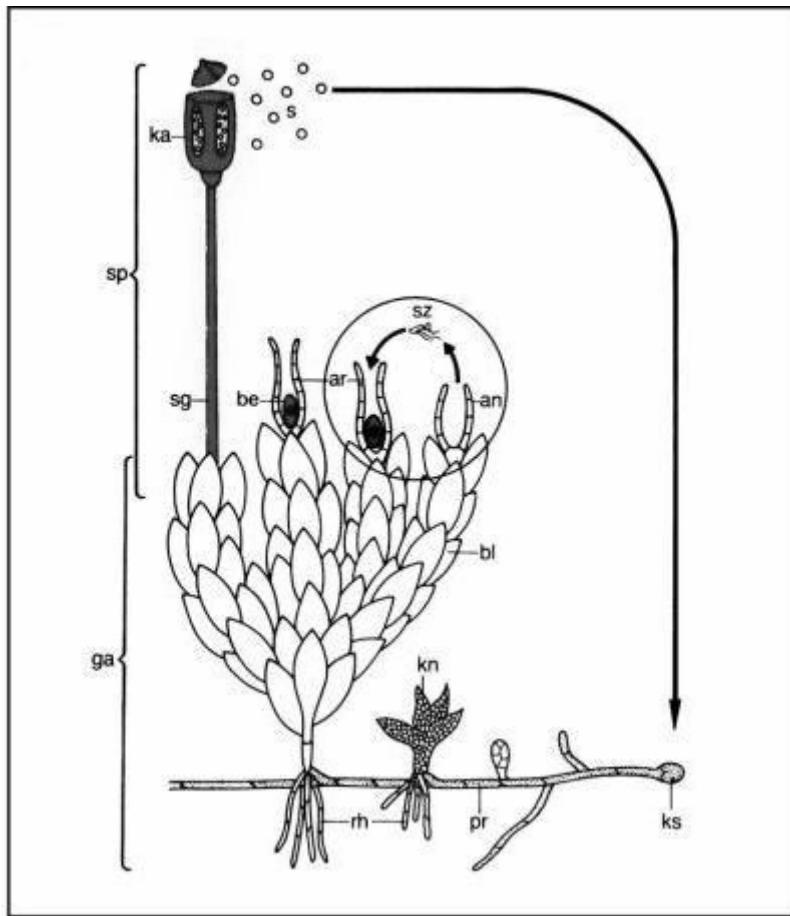


Abb. 5 Darstellung des Generationswechsels bei *P. patens*; an - Antheridien, ar - Archegonien, be - befruchtete Eizelle, bl - Blättchen, ga - Gametophyt, ka - Kapsel, kn - Knospe, ks - keimende Spore, pr - Protonema, rh - Rhizoide, s - Spore, sg - Sporangium, sp - Sporophyt, sz - Spermatozoid; Abbildung modifiziert nach www2.mpi-z-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 Wassermoos *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 $(GSH)_2\text{-Cd(II)}$ -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, γ -ECS, GS HS 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.

3 Materialien und Methoden

3.1 Modellorganismus und Anzucht

3.1.1 Blasenmützenmoos *Physcomitrella patens*

Das terrestrische Moos *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. (Stamm s. Reski *et al.*, 1994) war das Untersuchungsobjekt der vorliegenden Arbeit. Nach Frey *et al.* (1995) wird es wie folgt klassifiziert:

Reich	Plantae
Abteilung	Bryophyta
Unterabteilung	Musci
Klasse	Bryopsida
Unterklasse	Bryidae
Ordnung	Funariales
Familie	Funariaceae
Gattung	<i>Physcomitrella</i>
Art	<i>Physcomitrella patens</i>

3.1.2 ABC-Medium

Die Kultivierung von *P. patens* erfolgte in ABC-Medium. Dieses Medium enthält nach Knight *et al.* (1988) in 1 L:

Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	1,18 g
KH ₂ PO ₄	240 mg
MgSO ₄	240 mg
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	12,5 mg
H ₃ BO ₃	614 µg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	389 µg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	55 µg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	55 µg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	55 µg
KI	28 µg
LiCl	28 µg
SnCl ₂	28 µg

Vor dem Autoklavieren wurde das Medium mit konzentrierter KOH auf pH 10 eingestellt. Nach dem Autoklavieren betrug der pH-Wert ca. 6,4.

3.1.3 Kultivierung

Die Kulturen (Wildtyp und Δ apr-Mutanten) wurden in 250-mL-Erlenmeyer-Kolben (75 mL ABC-Medium) bei 25 °C, 110 rpm unter Langtagbedingungen (16 h, 40 μ E s⁻¹ m⁻²; 8 h dunkel) angezogen. Als Δ apr-Mutanten wurden die Stämme 11-3-12 und 12-4-3 aus Koprivova *et al.* (2002) verwendet.

Alle Stammkulturen wurden einmal pro Woche mittels Ultra-Turrax homogenisiert. Nach 14 Tagen wurde die Biomasse in neues Medium überführt. Hierzu wurde die Biomasse eines Kolbens auf zwei 250-mL-Erlenmeyerkolben aufgeteilt und anschließend homogenisiert. Auf etwaige Verunreinigungen wurde regelmäßig durch Ausstrich der Kulturlösung auf LB-Platten (Luria-Bertani; 5 g L⁻¹ Hefeextrakt, 10 g L⁻¹ Bacto-Trypton, 10 g L⁻¹ NaCl, 15 g L⁻¹ Agar) geprüft. Für Experimente wurden die Kulturen nach vier Kulturtagen Vorinkubation verwendet. Durch Zugabe von autoklavierter 20 mM CdCl₂-Stammlösung wurden Cd(II)-Konzentrationen von 5 μ M bzw. 10 μ M eingestellt. Für Versuche unter erhöhtem Sulfatgehalt wurde vor dem Autoklavieren 1 M Na₂SO₄- bzw. 1 M MgSO₄ x 7 H₂O-Lösung zugegeben. Alle verwendeten Kulturgefäße wurden vor den Experimenten für mindestens 24 h mit 0,5 % (v/v) HNO₃ gespült, um an der Glasoberfläche adsorbierte Metallionen zu entfernen.

3.2 Biochemische und analytische Methoden

3.2.1 Zellaufschluss

Für alle Experimente wurde gefrorenes Material (-80 °C) von *P. patens* verwendet und in flüssigen Stickstoff mittels Mörser und Pistill zu homogenem Pulver zerrieben, wobei durch stetige N₂-Zugabe ein Auftauen verhindert wurde. Mörser, Pistill und Spatel wurden für Nukleinsäure-Extraktionen autoklaviert.

3.2.2 Vitalitätsbestimmung

Als Vitalitätsparameter wurde der Gehalt an Chlorophyll gewählt, welches mittels ammoniakalischer Acetonlösung (80 % v/v; 0,125 % v/v NH₃ in H₂O) extrahiert wurde. Dazu wurde das Pflanzenmaterial im Verhältnis 50 mg : 1 mL Acetonlösung versetzt, 1 min kräftig gevortext und 15 min bei 4 °C unter Schütteln extrahiert. Anschließend wurde zentrifugiert (4 min,

14000 g, 4 °C). Der Überstand wurde mit Acetonlösung 1:10 verdünnt. Die Absorption wurde bei 480 nm (Carotinoide), 647 nm und 664 nm (Chlorophyll a und b) gegen Acetonlösung gemessen. Die Chlorophyll-Gehalte in mg L⁻¹ wurden nach folgenden Formeln berechnet:

$$c \text{ (Chl. a)} = 11,78 \times E_{664} - 2,29 \times E_{647}$$

$$c \text{ (Chl. b)} = 20,05 \times E_{647} - 4,77 \times E_{664}$$

Die Bestimmung der Photosystem-II-Effizienz wurde mit Hilfe einer nach Humbeck *et al.* (1996) modifizierten Methode durchgeführt. Dazu wurde Biomasse von *P. patens* auf einen Filter (Macherey-Nagel, d = 55 mm, Dicke = 0,2 mm) abgesaugt und 15 min im Dunkeln inkubiert. Die Messung erfolgte anhand eines Chlorophyll-Fluorometers (Mini PAM, Walz, Effeltrich).

3.2.3 RP-HPLC-Analyse von Thiolen mittels Monobrombimanderivatisierung

Nach Sutter (2000) wurden die Thiole Cys, γ-EC und GSH mit Monobrombiman (mBBr) markiert (Abb. 6). Anschließend wurden die fluoreszierenden Derivate an einer RP-Phase getrennt. Die HPLC-Anlage (Merck-Hitachi LaChrom, Merck, Darmstadt) bestand aus einem Fluoreszenz-Detektor (L-7480), einem Autosampler (L-7200), einer Pumpe (L-7100) und einem Interface (D-7000). Zur HPLC-Steuerung wurde die Software D 7000 HPLC-System-Manager verwendet.

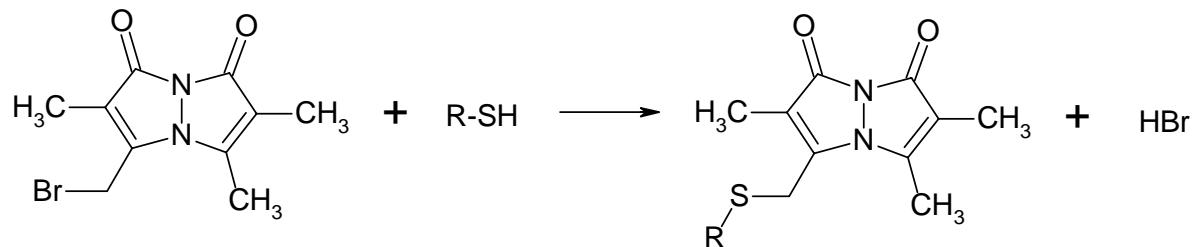


Abb. 6 Reaktionsschema von Thiolen mit Monobrombiman

Das Probenmaterial (ca. 50 mg FM) wurde mit 1 mL 0,1 M HCl versetzt und bis zur Homogenität gevortext. Anschließend wurde zentrifugiert (20 min, 12000 g, 4 °C) und 120 µL Überstand mit 180 µL CHES (0,2 M pH 9,3) und 30 µL 6 mM DTT vermischt. Während der nachfolgenden Inkubation auf Eis (1 h) kam es zur Reduktion der Thiole. Im Anschluss wurde der

Ansatz mit 10 µL mBBr (30 mM in Methanol) versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln derivatisiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 250 µL 5 % Eisessig (v/v) zugegeben.

Bis zur HPLC-Analyse wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Vor der Auf trennung wurden die Proben zentrifugiert (RT, 5 min, 14000 g). Die Konzentrationen von Cys, γ-EC und GSH wurden anhand von Eichgeraden im Bereich 0,1-2 µg mL⁻¹ ermittelt.

HPLC-Bedingungen:

Stationäre Phase:	LiChrospher 60 RP Select B (5 µm, 250x4 mm)	
Mobile Phase:	A)	2 % MeOH/0,25 % AcOH (v/v) pH 4,3 mit 10 N NaOH
	B)	90 % MeOH/0,25 % AcOH (v/v) pH 3,9 mit 0,1 N NaOH
Fluss:	0,9 mL/min	
Injektionsvolumen:	50 µL	
Detektion:	Fluoreszenz $\lambda_{\text{exc}} = 420 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$	
Gradient:		

Zeit (min)	A (%)	B (%)
0.0	97	3
15.0	93	7
30.0	0	100
35.0	0	100
35.1	97	3
45.0	97	3

3.2.4 Enzymatische Bestimmung von GSH und GSSG

Der enzymatische Test mittels Glutathion-Reduktase (Anderson, 1985) wurde zur Bestimmung von Gesamt-Glutathion (GSH_{ges}) und oxidiertem Glutathion (GSSG) verwendet. Zur GSSG-Bestimmung wurde zunächst das reduzierte Glutathion durch 2-Vinylpyridin (2-VP) blockiert. Anschließend wurde das oxidierte GSSG durch die Glutathion-Reduktase mit NADPH zu zwei Molekülen GSH reduziert (Reaktion 1). Danach erfolgte die Oxidation des gebildeten GSH mit DTNB [5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoësäure)] unter Freisetzung von TNB

(5-Thio-2-Nitrobenzoësäure, Reaktion 2). TNB wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 410$ nm detektiert. Für die Bestimmung des Gesamt-GSH-Gehaltes entfiel die Blockierung mit 2-VP.



Lösungen:

Puffer A:	143 mM NaH ₂ PO ₄
Puffer B:	143 mM Na ₂ HPO ₄
Puffer C:	Na-Phosphatpuffer (A:B = 1:5,25) + 6,3 mM Na ₂ -EDTA, pH 7,5
Puffer D:	0,248 mg/mL NADPH in Puffer C
DTNB:	6 mM DTNB in Puffer C (Lagerung bei -20 °C)
GSSG-Reduktase (Hefe):	auf 266 U/mL in Puffer C verdünnen (4 °C)
2-Vinylpyridin:	unverdünnt (-20 °C)
5-Sulfosalicylsäure:	5 % (w/v)
Triethanolamin:	unverdünnt
GSSG Standards:	aus 50 mM GSSG-Lösung (-20 °C) in 5 % 5-Sulfosalicylsäure

Das Probenmaterial (50 mg) wurde mit 250 µL 5 % 5-Sulfosalicylsäure versetzt und zentrifugiert (RT, 5 min, 10000 g). Anschließend wurden 100 µL Überstand abgenommen und mit je 2 µL 2-VP bzw. Triethanolamin vermischt, kräftig gevortext und der pH-Wert durch pH-Papier überprüft (pH 6 bis pH 7). Nach 60 min Inkubation wurde der GSSG-Reduktase-Test durchgeführt.

GSSG-Reduktase-Test:

Puffer C:	700 µL
DTNB:	100 µL
Bidest:	165 µL
Probe (oder Standard)	25 µL
GSSG-Reduktase	10 µL

→ Start der Reaktion durch Zugabe von GSSG-Reduktase

3.2.5 Bestimmung der Biosorption und Akkumulation von Cd(II)

Mit Hilfe eines Flammen-Atomabsorptionspektrometers (ATI Unicam, England) wurde die Cd(II)-Verteilung bestimmt. Dabei wurden extrazellulärer, an die Oberfläche gebundener und intrazellulärer Anteil gemessen. Der extrazelluläre Anteil setzte sich aus dem Medium, den Waschschritten mit Bidest (unspezifisch gebundenes Cd(II)) und dem aufgeschlossenen Rundfilter (Macherey-Nagel, d = 55 mm, Dicke = 0,2 mm) zusammen. Zur Messung des spezifisch an die Zellwand gebundenen Cd(II) erfolgte dessen Verdrängung durch Ni(II)-Ionen. Der intrazelluläre Anteil konnte nach mikrowellengestütztem Aufschluss ermittelt werden.

Das Probenmaterial wurde über einen Filter (45 µm) mittels Absaugvorrichtung abgesaugt und dann folgenden Schritten unterworfen:

- Abfüllen des abgetrennten Mediums (M)
- Zugabe von 25 mL Bidest, kurz aufschütteln, absaugen (W1)
- Zugabe von 25 mL 20 mM NiCl₂, 5 min schütteln lassen, absaugen (Ni1)
- Zugabe von 25 mL 20 mM NiCl₂, 5 min schütteln lassen, absaugen (Ni2)
- Zugabe von 25 mL Bidest, kurz aufschütteln, absaugen, verwerfen

Danach wurde über Nacht getrocknet (65 °C) und die Trockenmasse (TM) bestimmt. Die getrocknete Biomasse bzw. der getrocknete Filter wurde mittels Mikrowelle (MARS 5, CEM, Kamp-Lintfort) aufgeschlossen. Dazu wurden die Proben in einem Aufschlussgefäß mit 2 mL 30 % (v/v) H₂O₂ (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 4 mL 65 % (v/v) HNO₃ (Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt und einer zweistufigen Aufschlussmethode (Tab. 5) bei 1200 W zugeführt. Danach wurde die klare Flüssigkeit mit Bidest auf 25 mL aufgefüllt. Zur Reinigung der Mikrowellengefäße wurden diese erneut mit 2 mL H₂O₂ und 4 mL HNO₃ versetzt und mittels *clean*-Programm (Tab. 5) gesäubert.

Tab. 5 Parameter für den Mikrowellenaufschluss

	Stufe 1	Stufe 2	clean
% Power	100	100	100
Ramp	5 min	5 min	5 min
Pressure	3 bar	10 bar	3 bar
Temperature	120 °C	175 °C	120 °C
Hold	2 min	15 min	2 min

Die Lösungen wurden mittels AAS analysiert. Dabei konnten die Cd(II)-Gehalte von Medium (M), Waschen (W1), Nickel1 (Ni1), Nickel2 (Ni2) und aufgeschlossenem Filter (MW Filter) aus den unverdünnten Flüssigkeiten ermittelt werden. Die Lösung der aufgeschlossenen Biomasse wurde mit Bidest 1:10 verdünnt. Die Cd(II)-Konzentrationen wurden mittels Eichgerade im Bereich von 0,0625 mg L⁻¹ bis 1 mg L⁻¹ berechnet. Dazu wurde eine 1 g L⁻¹ Cd(II)-Standardlösung (Merck) benutzt.

3.2.6 Aufreinigung von OAS-TL-Protein

Für die Gewinnung von OAS-TL aus *P. patens* wurde das für *A. thaliana* etablierte Protokoll (AG Hell, Heidelberg) verwendet. Dazu wurde rekombinante, His-getagte SAT an eine Hi-Trap-Säule über Ni(II) gebunden. Anschließend wurde der aus *P. patens* gewonnene Proteinextrakt auf die Säule gegeben, wobei die OAS-TL-Bindung erfolgen sollte. Schließlich wurde mittels OAS eluiert. Zur Aufreinigung wurden ca. 150 g Biomasse von ungestresstem Wildtyp verwendet.

- Extraktion von Proteinen

Das gefrorene Material (-80 °C) wurde in flüssigen Stickstoff mittels Mörser und Pistill zu homogenem Pulver zerrieben. Das Puder wurde portionsweise in 530 mL eiskalten SAT-W Puffer (50 mM Tris, 250 mM NaCl, 80 mM Imidazol, pH 8,0), welcher zusätzlich 0,5 mM PMSF und 1 mM DTT enthielt, gelöst. Anschließend wurde auf Eis gerührt und die homogene Flüssigkeit durch Miracloth filtriert. Das Filtrat wurde nun für 20 min bei 27500 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Bestimmung des Volumens wurde der Überstand in ein Becherglas gefüllt und auf Eis schrittweise mit Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 20 % (w/v) versetzt. Danach wurde die Mischung 10 min auf Eis gerührt, wonach sich eine erneute 20-minütige Zentrifugation bei 27500 g und 4 °C anschloss. Im zweiten Schritt der Ammoniumsulfat-Fällung wurde der Überstand auf eine Konzentration von 75 % (w/v) (NH₄)₂SO₄ eingestellt. Da sich das Salz schwer löste, wurde zusätzlich 1 h auf Eis gerührt. Anschließend wurde erneut 20 min bei 27500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 15 mL modifizierten SAT-W Puffer (s.o.) gelöst. Die Lösung wurde nun in SS34-Zentrifugenrührchen gegeben und 10 min bei 27500 g bzw. 4 °C zentrifugiert. Zur Entsalzung wurden jeweils 2,5 mL Überstand auf mit SAT-W Puffer äquilibrierte PD10-Säulen gegeben. Nach Elution des Extraktes wurde dieser in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufreinigung bei -80 °C gelagert.

- Affinitätschromatographie von OAS-TL

Zur Affinitätschromatographie wurden Bakterien verwendet, welche eine His-getagte SAT überexprimieren (*E. coli*-Stamm HMS 174, F⁻ recA hsdR(r_{K12}-m_{K12}⁺) rif^r (DE3)). Das Pellet von 800 mL Bakterienkultur wurde in 10 mL SAT-B Puffer (50 mM Tris, 250 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0), der zusätzlich 0,5 mM PMSF enthielt, auf Eis resuspendiert. Danach wurde die Lösung für 7 min bei 40 % Aktivität auf Eis sonifiziert (Bandelin Sonoplus GM 70) und für 10 min bei 47000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Rohextrakt wurde erneut mit 25 µL PMSF versetzt und durch einen 0,45 µm-Filter filtriert, wonach ein Aliquot von 200 µL entnommen wurde. Später wurde die an einer Pumpe (IKA Schlauchpumpe PA-SF) angeschlossene Hi-Trap Säule (Amersham HiTrapTM Chelating HP) mit Bidest bei einer Flussrate von 1 mL/min gespült. Danach wurden 10 mL 50 mM NiCl₂ bzw. 5 mL SAT-B Puffer durch die Säule gepumpt. Der Bakterien-Rohextrakt wurde 40 min über die Säule zirkuliert und später nochmals vollständig durchgepumpt. Danach wurde ein 500 µL-Aliquot vom Durchfluss entnommen. Die Säule konnte nun mit 10 mL SAT-W Puffer gewaschen werden. Anschließend erfolgte die Elution der aus den Bakterien stammenden, rekombinanten OAS-TL mit 5 mL einer frisch hergestellten 10 mM OAS-Lösung in SAT-W Puffer.

Der aus *P. patens* gewonnene Proteinextrakt (s.o.) wurde vor der OAS-TL-Aufreinigung nochmals bei 27500 g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand zirkulierte anschließend 40 min über die mit rekombinanter SAT beladene Säule. Vom Durchfluss wurde ein Aliquot entnommen. Die Säule wurde nochmals mit 10 mL SAT-W Puffer gewaschen. Die Elution der OAS-TL aus *P. patens* erfolgte nun mittels 10 mM OAS (in SAT-W Puffer) und wurde in 500 µL-Fraktionen gesammelt. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschschritt mit 10 mL SAT-W Puffer. Die an der Säule gebundene, bakterielle SAT wurde mit 5 mL SAT-E Puffer (400 mM Imidazol) eluiert und in 1 mL-Fraktionen aufgefangen. Zur Entfernung des Nickels wurde die Säule mit 10 mM EDTA gespült. Nach Waschung mit 0,25 M NaOH wurde die Säule zur Aufbewahrung mit 10 mL 0,02 % NaN₃ gespült und konnte dann bei 4 °C gelagert werden.

Anschließend erfolgte eine Proteinbestimmung nach Bradford (s. 3.3.4) und eine OAS-TL-Aktivitäts-Bestimmung (s. 3.3.1) der nach jedem Schritt entnommenen Aliquots.

- 1D-PAGE der Fraktionen

Für die Überprüfung der Fraktionen bzw. der einzelnen Chromatographie-Schritte wurden die entnommenen Aliquots einer SDS-PAGE nach Laemmli (1970) zugeführt. Dazu wurden zwei Minigels (4 % Sammelgel, 12,5 % Trenngel) für die Coomassie-Färbung bzw. für den Western-Blot verwendet.

- Coomassie-Färbung

Dazu wurde das Gel mit einer Lösung aus 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250 in 40 % MeOH (v/v) und 10 % Essigsäure (v/v) für 45 min gefärbt. Die Hintergrundfärbung wurde anschließend mit Entfärbelösung (20 % EtOH, 10 Essigsäure) entfernt.

- Western Blot

Für den Western Blot wurde das Gel nach SDS-PAGE mit kaltem Transfer-Puffer äquilibriert. Der Transfer der Proteine erfolgte mit einer Elektroblot-Apparatur (Biometra Fastblot B44) über Nacht auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schuell Transfer Membran Protan). Nach dem Blotten wurde die Membran mit Ponceau-S-Lösung (1 % Ponceau S, 5 % (v/v) Essigsäure) gefärbt und die Markerproteine gekennzeichnet. Anschließend wurde das Ponceau-S mit Bidest entfernt. Danach wurde die Membran 2 h mit 5 % (w/v) BSA in TBS (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl) behandelt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach dem Waschen mit TBS für 5 min wurde die Membran mit einem Gemisch der spezifischen Antikörper für OAS-TL A und C aus *A. thaliana* (jeweils 1:8000 in TBS und 0,5 % BSA) für 90 min inkubiert. Danach schloss sich ein dreimaliges Waschen für je 10 min in TBS an. Anschließend wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (anti-Kaninchen, 1:10000 in TBS und 0,5 % BSA), der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war, 1 h lang inkubiert. Nach zwei Waschschritten (5 min in TBS) wurde die Membran für 5 min mit AP-Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂) behandelt. Die Detektion erfolgte durch in AP-Puffer gelöstem NBT (4-Nitroblautetrazoliumchlorid) bzw. BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat).

- 2D-PAGE

Zur Vorbereitung der 2D-PAGE wurden die OAS-TL-Fraktionen einer Aufarbeitung unterzogen. Dazu wurde 1 g Probe mit dem 10-fachen Volumen an TCA-Aceton-Lösung, bestehend aus 10 % (w/v) TCA; 0,07 % (v/v) β-Mercaptoethanol, resuspendiert. Diese Mischung wurde anschließend in flüssigem Stickstoff ca. 30 s abgekühlt und 2 h bei -20 °C inkubiert, wobei drei kurze Mischschritte nach 5, 10 und 15 min durchgeführt wurden. Danach erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 25000 g und 4 °C. Die Pellets wurden nun in 1,5 mL Waschlösung (0,07 % (v/v) β-Mercaptoethanol in Aceton) mittels Ultraschall resuspendiert. Danach wurden die Proben erneut in flüssigem Stickstoff gekühlt (30 s) und die darin enthaltenen Proteine für 30 min bei -20 °C gefällt. Nach der Zentrifugation (15 min, 25000 g, 4 °C) wurde das Proteinpellet erneut in Waschlösung aufgenommen, sonifiziert und

gefällt (s.o.). Anschließend wurde das Aceton in einer Vakuum-Zentrifuge entfernt (10 min); die Proteine wurden bis zur Isoelektrischen Fokussierung (IEF) bei -20 °C gelagert.

Die getrockneten Proben wurden zur IEF-Vorbereitung in Rehydratisierung-Lösung (8 M Harnstoff; 2 % (w/v) CHAPS; 0,005 % (w/v) Bromphenolblau; 20 mM DTT; 0,5 % IPG-Puffer) gelöst. Anschließend wurde gevortext, resuspendiert (5 min, Ultraschalbad) und kurz zentrifugiert. Nach 1 h Schütteln (37 °C) wurde nochmals zentrifugiert (15800 g, 15 min). Die mit Rehydratisierung-Lösung gemischte Probe wurde nun durch die Rehydratisierung des IPG(*immobilized pH gradient*)-Streifens in das Gel transferiert. Der IPG-Streifen wurde mit Mineralöl überschichtet. Die Rehydration erfolgte über Nacht in einer IPGphor-Aparatur (Amersham Biosciences). Anschließend wurden die Streifen für die Trennung in der zweiten Dimension präpariert. Dazu erfolgte eine zweimalige Equilibrierung in Equilibrierungs-Stammlösung mit 65 mM DTT bzw. 25 mg/mL Iodacetamid. Danach wurde das Trenn- bzw. Sammelgel (4 % Sammelgel, 12,5 % Trenngel) hergestellt. Schließlich wurden die IPG-Streifen kurz mit Elektrodenpuffer gespült und dicht auf das Sammelgel gedrückt. Der Gellauf erfolgte bei 75 V (ca. 30 min, Sammelgel) und 150 V (ca. 60 min, Trenngel). Anschließend wurde das Gel coomassiegefärbt.

3.3 Bestimmung von Enzymaktivitäten

3.3.1 O-Acetylserin(thiol)lyase

Die Aktivität des Enzyms O-Acetylserin(thiol)lyase (OAS-TL, EC 2.5.1.47) wurde photometrisch über das Ninhydrin-Derivat von Cystein gemessen (Gaitonde, 1967). OAS-TL katalysiert die Bildung von Cystein aus O-Acetylserin und Sulfid. Zur Extraktion wurden 10 mg gemörserte Frischmasse mit 300 µL 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 versetzt und gevortext. Anschließend wurde 10 min bei 12000 g zentrifugiert und der Überstand als Rohextrakt verwendet.

Ein 100 µL-Ansatz enthielt:

100 mM DTT:	5 µL
100 mM OAS:	12,5 µL
100 mM Na ₂ S:	15 µL
Puffer (s.o.):	67,5 µL
Extrakt:	10 µL

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Rohextraktes gestartet und nach 10 min bei 25 °C mit 50 µL 20 % (v/v) Trichloressigsäure gestoppt. Danach wurde 10 min bei 12000 g zentrifugiert und der Überstand mit 100 µL Eisessig und 200 µL Ninhydrin-Reagenz (250 mg Ninhydrin in 10 mL AcOH:HCl, 6:4) versetzt. Schließlich wurde die Mischung 10 min bei 100 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Nach Verdünnung mit 500 µL 95 % (v/v) EtOH wurde die Extinktion bei 560 nm gemessen. Als Referenz wurde ein Ansatz mit Extraktionspuffer ohne Rohextrakt verwendet. Für die Quantifizierung wurde eine Eichgerade mit Cystein-Konzentrationen von 0,05 mM bis 0,35 mM erstellt. Zur Überprüfung der Linearität wurden die Substratkonzentrationen und die Reaktionsdauer variiert. Zur Überprüfung, ob die Aktivität *in vitro* durch Cd(II) beeinflußt wurde, wurde im Ansatz eines unbelasteten Rohextraktes eine Cd(II)-Konzentration eingestellt, welche der des Cd(II)-exponierten Materials entsprach.

3.3.2 γ -Glutamylcystein-Synthetase und Glutathion-Synthetase

Die Aktivitäten von γ -Glutamylcystein-Synthetase (γ -ECS, EC 3.2.3.3) und Glutathion-Synthetase (GSHS, EC 3.2.3.2) wurden nach Noctor *et al.* (1997) bestimmt. Die Reaktionsprodukte, γ -EC und GSH, wurden als Monobrombiman-Derivate detektiert (s. 3.2.3).

Zur Gewinnung des Rohextraktes wurden 100 mg gemörserte Frischmasse mit 250 µL Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM MgCl₂; 1 mM Na₂EDTA) versetzt und gevortext. Anschließend wurde 15 min bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde als Rohextrakt eingesetzt. Der Reaktionspuffer setzte sich aus 100 mM Hepes pH 8,0 und 50 mM MgCl₂ (γ -ECS) bzw. 100 mM Tris/HCl pH 8,4; 50 mM KCl und 20 mM MgCl₂ (GSHS) zusammen.

Der γ -ECS-Ansatz enthielt in 250 µL: 20 mM Glu, 1 mM Cys, 5 mM ATP, 5 mM PEP, 5 mM DTE, 10 U Pyruvat-Kinase und 75 µL Reaktionspuffer. Der GSHS-Ansatz (250 µL) setzte sich aus 1 mM γ -EC, 2 mM Gly, 5 mM ATP, 5 mM PEP, 5 mM DTE, 10 U Pyruvat-Kinase und 75 µL Reaktionspuffer zusammen. Die Enzymassays wurden durch Zugabe von 25 µL Rohextrakt gestartet und bei einer Temperatur von 30 °C durchgeführt. Nach 5 min (Nullprobe, beide Enzyme), 35 min (GSHS) bzw. 65 min (γ -ECS) wurden 120 µL Reaktionsansatz entnommen. Anschließend erfolgte die Thiolderivatisierung, HPLC-Trennung und Quantifizierung wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben. Zur Überprüfung der Linearität wurden die Substratkonzentrationen und die Reaktionsdauer variiert. Schließlich wurde analog der OAS-TL-Messung kontrolliert, ob die Enzymaktivitäten durch Cd(II) beeinflussbar waren.

3.3.3 Glutathion-S-Transferasen (GST)

Die Aktivität der Glutathion-S-Transferasen wurde photometrisch über die GSH-Konjugation mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzen (CDNB) gemessen (Habig *et al.*, 1974). Der 1-mL-Testansatz enthielt 200 mM KH₂PO₄ pH 6,4; 1 mM CDNB (Merck) und 1 mM GSH. Die Reaktion wurde bei 25 °C im Zweistrahl-Photometer durchgeführt und durch Extraktzugabe gestartet (Blindwert ohne Extrakt). Die Zunahme der Extinktion wurde 5 min bei 340 nm verfolgt. Die Quantifizierung erfolgte durch Bestimmung des Konjugates ($\epsilon_{340\text{nm}}=9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität war es notwendig, die Proteinkonzentration im Rohextrakt zu bestimmen. Dazu wurde die Methode nach Bradford (1976) verwendet. Dabei wurden 1 mL Bradford-Reagenz (Merck) und 20 µL Extrakt gemischt und bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Zur Quantifizierung wurde eine Eichreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) benutzt.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Datenbankrecherche

Die EST-Sequenzen der mittels *real-time*-PCR untersuchten Gentranskripte wurden durch Datenbanksuche auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> erhalten. Dabei wurden mehrere Einträge für dasselbe Enzym gefunden. Ein Alignment ergab, dass viele EST-Sequenzen eines Enzyms 100 % Übereinstimmung aufwiesen. Schließlich wurde die EST-Sequenz zum Primerdesign verwendet, welche die längste *high quality*-Sequenz aufwies. Die entsprechenden Zugangsnummern für die Sulfatassimilation bzw. GSH-Biosynthese sind in Tab. 6, weitere in Tab. 7 ersichtlich.

Tab. 6 Zugangsnummern der ESTs für Enzyme der Cystein- bzw. GSH-Biosynthese

Gen	Zugangsnummer (NCBI)
<i>ATPS</i>	BU052122
<i>APR</i>	BQ827272
<i>PAPSR</i>	AJ489220
<i>SiR</i>	BQ827026
<i>SAT</i>	AW599682
<i>OAS-TL</i>	BU052293
γ <i>ECS</i>	BU052092
<i>GSHS</i>	BQ827502

Tab. 7 Zugangsnummern weiterer ESTs

Gen	Zugangsnummer (NCBI)
<i>Rubisco</i>	AB120708
<i>Actin</i>	BQ041112
<i>GAP-DH</i>	BU052519
<i>Ascorbat-Peroxidase</i>	AJ493275
<i>Ascorbat-Reduktase</i>	BQ041084
<i>GSH-Peroxidase</i>	BQ826943
<i>GSH-Reduktase</i>	BQ041226
<i>GST 1</i>	BQ826624
<i>GST 2</i>	BQ826649
<i>GST 3</i>	BU051851
<i>GST 4</i>	BU051918
<i>MTA</i>	BJ203094
<i>MTB</i>	BG409213

Der Vergleich der EST-Sequenzen mit anderen DNA-Sequenzen (blastn) sowie die Übersetzung in eine Proteinsequenz und der anschließende Vergleich mit Proteindatenbanken (blastx) fand auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> statt. Zur Abschätzung der zellulären Lokalisation wurde die EST-Sequenz auf www.expasy.org/tools/dna.html in die möglichen Proteinsequenzen umgeschrieben und auf <http://pasub.cs.ualberta.ca:8080/pa/Subcellular> die mögliche Lokalisation des putativen Proteins ermittelt.

3.4.2 Primerdesign

Mittels Fast PCR Software, (V. 3.6.28, Ruslan Kalendar, Helsinki Universität, Finnland) wurden spezifische Primer für die EST-Sequenzen (Tab. 6 und Tab. 7) entworfen. Als erstes wurden Sequenzen für mögliche forward- bzw. reversed Primer angegeben. Diese wurden

anschließend mit dem „Oligonucleotide Properties Calculator“ (www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html) auf Hairpin-Strukturen und Primer-Dimer-Bildung überprüft. Die Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) bezogen.

3.4.3 RNA-Isolation

Gesamt-RNA wurde aus *P. patens* mittels RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend dem Herstellerprotokoll extrahiert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt ($n = 9$). Zur Vermeidung von Produkten genommischer DNA wurden 0,75 µg RNA mit DNase I (MBI Fermentas, Burlington, Canada) behandelt.

3.4.4 cDNA-Synthese

Die DNA-freie RNA (0,5 µg) wurde durch Verwendung von SuperScript II Reverse Transkriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA) gemäß Herstellerprotokoll in cDNA umgeschrieben.

3.4.5 Real-time-PCR

Die Ausgangsmenge an cDNA wurde mittels Real-time-PCR ermittelt (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Qiagen). Die Bedingungen wurden nach Bustin (2002) optimiert. Die Analysen wurden mit cDNA durchgeführt, die aus RNA dreier unabhängiger Mooskulturen erhalten wurde.

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes (20 µL):

cDNA (<i>template</i>)	0,5 µL
2 × QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	10 µL
forward primer (10 µM)	0,6 µL
reverse primer (10 µM)	0,6 µL
Bidest, steril	8,3 µL

Die Real-time-PCR wurde in einem iCycler (Biorad, München, Deutschland) durchgeführt. Das PCR-Programm bestand aus folgenden Schritten:

Schritt 1 (1x): 15 min 95 °C

Schritt 2 (50x): 15 s 94 °C

	15 s	60 °C
	20 s	72 °C (Datenaufnahme)
Schritt 3 (1x):	1 min	95 °C
Schritt 4 (72x):	10 s	57 °C (je Zyklus +0,5 °C, Schmelzkurve)
Schritt 5 (1x):	∞	4 °C

Zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte beinhaltete das Programm die Erstellung einer Schmelzkurve (Gachon *et al.*, 2004). Dadurch konnte sichergestellt werden, dass keine unspezifischen PCR-Produkte in die Kalkulation einbezogen wurden.

Die Ct-Werte wurden durch die iCycler-Software berechnet. Zur relativen Quantifizierung wurde die $\Delta\Delta Ct$ – Methode verwendet (Livak & Schmittgen, 2001).

3.4.6 Überprüfung der Δapr-Mutanten

Die Δapr-Mutanten wurden regelmässig auf ihre Mutation mittels RT-PCR überprüft. Dabei wurden die in Koprivova *et al.* (2002) angegebenen Primer R11 und R14 verwendet.

3.4.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Größentrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels horizontaler Agarose-Gel-elektrophorese. Die Gele enthielten 1,5 % (w/v) Agarose (Roth, Karlsruhe, Deutschland), welche in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris; 0,5 mM Na-Aacetat; 0,01 mM Na₂-EDTA, pH 8,0) unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst wurde. Nach Abkühlen des Gels wurden 2 µl Ethidiumbromid (0,1 mg mL⁻¹) pro 100 ml Gel zugefügt. Die DNA-Proben wurden nach der PCR mit 6-fach konzentrierterem DNA-Ladepuffer versehen. Dieser setzte sich aus 30 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau und 0,25 % (w/v) Xylencyanol zusammen. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet. Eine 50 bp DNA-Leiter (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) diente als DNA-Größenstandard.

3.4.8 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen) gemäß Hersteller-Protokoll verwendet.

3.4.9 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzier-PCR der extrahierten PCR-Produkte wurde BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK) verwendet.

Reaktionsansatz (10 µL):

extrahierte DNA	3 µL
5 × BigDye Master Mix	2 µL
forward primer (10 µM)	1 µL
reverse primer (10 µM)	1 µL
Bidest, steril	3 µL

Die Sequenzier-PCR wurde in einem PCR Sprint (Hybaid, Ashford, UK) durchgeführt. Das PCR-Programm bestand aus folgenden Schritten:

Schritt 1 (1x):	10 sec	96 °C
Schritt 2 (35x):	10 s	96 °C
	4 min	47 °C
Schritt 3 (1x):	∞	4 °C

Die Sequenzierreaktion wurde mit 2,5 µL 125 mM Na₂-EDTA und 30 µL EtOH (100 %) versetzt und die DNA 15 min lang bei RT gefällt. Anschließend wurden die Proben 20 min bei 14000 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen. Danach wurde erneut 5 min bei RT und 14000 g zentrifugiert und das Pellet 2 min bei 90 °C getrocknet. Dieses wurde später mit einem Sequenziergerät vom Typ ABI Prism™ 370 DNA-Sequencer (Applied Biosystems) sequenziert. Für die Auswertung der Sequenzierdaten kam die Software „Chromas“, Version 1.43 (Conor McCarthy, Griffith Universität, Brisbane, Australien) zur Anwendung.

3.5 Statistik

Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde Microsoft Excel 2003 verwendet. Mittels One-way ANOVA (analysis of variance) und anschließendem Tukey-Kramer-Test wurden Signifikanzen ermittelt. Dazu wurde GraphPad InStat 3.05 (GraphPad Software San Diego California USA) genutzt. Die Signifikanz-Stufen sind durch folgende Symbolik in den Diagrammen dargestellt: * - P<0,05 ; ** - P<0,01 ; *** - P<0,001.

3.6 Mikroskopische Dokumentation

3.6.1 Lichtmikroskopische Untersuchung

Zur lichtmikroskopischen Dokumentation der Versuche wurden Proben entnommen und unter dem Mikroskop (Axiovert, Zeiss Jena) mit angeschlossener CCD-Kamera (*charge coupled device*) ausgewertet.

3.6.2 Fluoreszenzmikroskopie zur Lokalisierung von Cd(II)

Zur Untersuchung der Cd(II)-Verteilung innerhalb der *P. patens*-Kultur wurde der Fluoreszenzfarbstoff BTC-5N verwendet. Da der Farbstoff auch Ca(II)-sensitiv ist, wurde das Material 3x mit Ca(II)-freiem ABC-Medium gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit 100 µM BTC-5N (Stammlösung: 10 mM in DMSO) für 90 min im Dunkeln. Anschließend wurde erneut 3x mit Ca(II)-freiem ABC-Medium gewaschen. Danach wurde die Cd(II)-Lokalisation in einem Fluoreszenz-Mikroskop (Axiovert/Zeiss Jena, Filter FS09, Xenon-Lichtquelle) beobachtet. Es wurden jeweils zwei Bilder von einem Bildausschnitt gemacht, eines unter Normallicht und eines nach Fluoreszenzanregung.

3.6.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

- Gefrierfixierung

Das Material wurde zwischen zwei Trägerplättchen aus Kupfer gelegt und im Kryojet (JFD 030, Balzers, Liechtenstein) von zwei Seiten mit einem Strahl des Kühlmittels (flüssiges Propan) beschossen. Danach wurden die Proben in flüssigem Stickstoff bis zur anschließenden Gefriersubstitution aufbewahrt.

- Gefriersubstitution

Die Proben wurden in ein Substitutionsgerät (Csauto, Leica, Deutschland) mit gekühltem Aceton über einen Zeitraum von 3 Tagen bei -80 °C substituiert. Nach Ablauf der Substitutionszeit wurden die nun wasserfreien Objekte langsam erwärmt (5°C min⁻¹) und nach Erreichen der RT mit Epoxidharz (ERL) nach folgendem Schema infiltriert:

Aceton/ERL 2:1 30 min

Aceton/ERL 1:2 30 min

ERL 100% 60 min

ERL 100% 14 h

Anschließend wurden die Proben in Einbettungsgefäß überführt und 48 Stunden bei 60 °C polymerisiert.

- EDX-Messungen

Ultradünne Schnitte des gefriersubstituierten Materials wurden am Ultramikrotom mit einem Diamantmesser hergestellt und auf Trägernetze aufgenommen. Die Messungen erfolgten unter folgenden Bedingungen:

- Mikroskop: Transmissionselektronenmikroskop EM 912 OMEGA (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), ausgestattet mit einem Energiefilter (OMEGA-Filter; Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

- EDX-Analyse

Gerät: EDX-System Link exl II (Oxford Instruments, High Wycombe; Bucks, U.K.)

Spotgröße: 100 nm

Beschleunigungsspannung: 80 keV

Emissionsstrom: 18-20 µA

- Kontrastierung der Ultradünnnschnitte

Für Strukturaufnahmen erfolgte zur Erhöhung des Kontrastes eine Kontrastierung der Proben mit Blei und Uranylacetat.

Bleicitratlösung: 1,5 g Bleiacetat

1,76 g Na-citrat

→ in 30 ml H₂O schütteln, nach ca. 30 min 8 ml NaOH (frisch zubereiten) dazugeben

Uranylacetatlösung: 5 % (w/v) Uranylacetat in H₂O

4 Ergebnisse

4.1 Charakterierung der Vitalität und des Phänotyps

4.1.1 Chlorophyllgehalt

Zur Charakterisierung der Vitalität unter Cd(II)-Stress wurde die Chlorophyllkonzentration bestimmt. In Abb. 7 ist der Gesamtchlorophyllgehalt dargestellt.

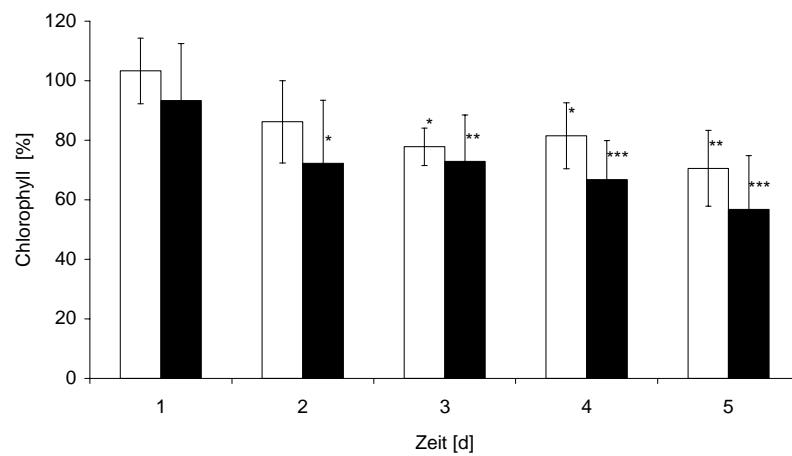


Abb. 7 Einfluss verschiedener Cd(II)-Konzentrationen auf den Gesamtchlorophyllgehalt in *P. patens* (% der Kontrolle, □ - 5 μ M, ■ - 10 μ M; n=4)

Die Chlorophyll-Konzentration in *P. patens* nahm nach Cd(II)-Exposition mit zunehmender Versuchsdauer kontinuierlich ab. Im Vergleich mit unbehandelten Proben war der Gehalt bereits zwei (10 μ M) bzw. drei Tage (5 μ M) nach Beginn des Experiments signifikant geringer. Unter 10 μ M Cd(II) wurde eine stärkere Abnahme des Chlorophyllgehaltes beobachtet als in mit 5 μ M Cd(II) exponierten Proben. Die Auswirkungen auf Chlorophyll a und b sind in Abb. 8 dargestellt.

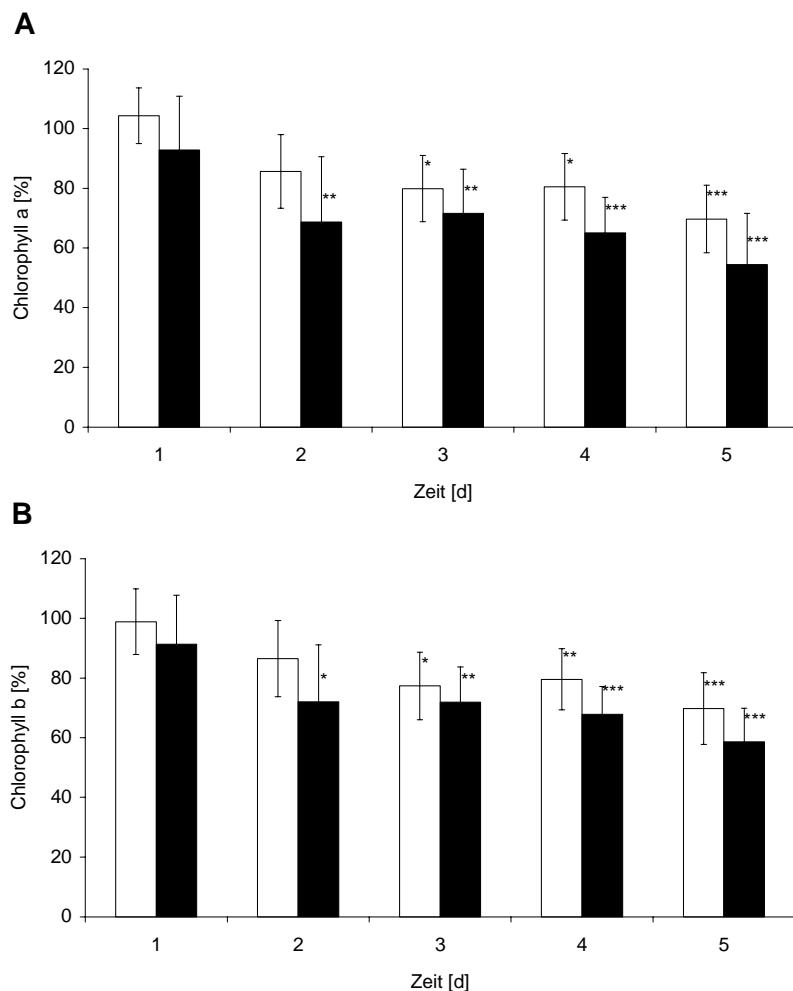


Abb. 8 Einfluss von Cd(II) auf den Gehalt von Chlorophyll a (A) und b (B) in *P. patens* (% der Kontrolle, □ - 5 μM, ■ - 10 μM; n=4)

Von der Abnahme waren sowohl Chlorophyll a als auch Chlorophyll b betroffen. Der Anteil an Chlorophyll b verringert sich bei den 10 μM-Cd(II)-Proben etwas stärker im Vergleich mit Chlorophyll a. Dies wird besser durch den Quotienten aus Chlorophyll a und Chlorophyll b verdeutlicht (Abb. 9).

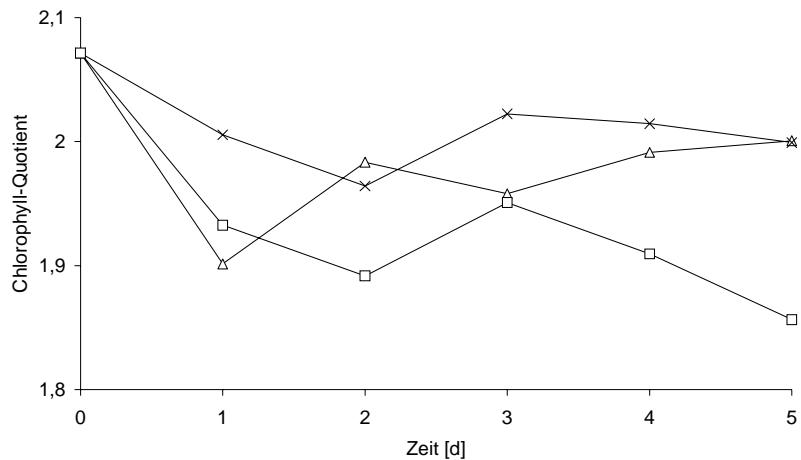


Abb. 9 Einfluss von Cd(II) auf den Chlorophyll-Quotienten in *P. patens* (X - Kontrolle, Δ - 5 μ M, □ - 10 μ M; n=4)

In *P. patens* wurde ein Absinken des Chlorophyll-Quotienten bei 10 μ M Cd(II) im Medium beobachtet.

In Abb. 10 ist der Carotinoid-Gehalt dargestellt.

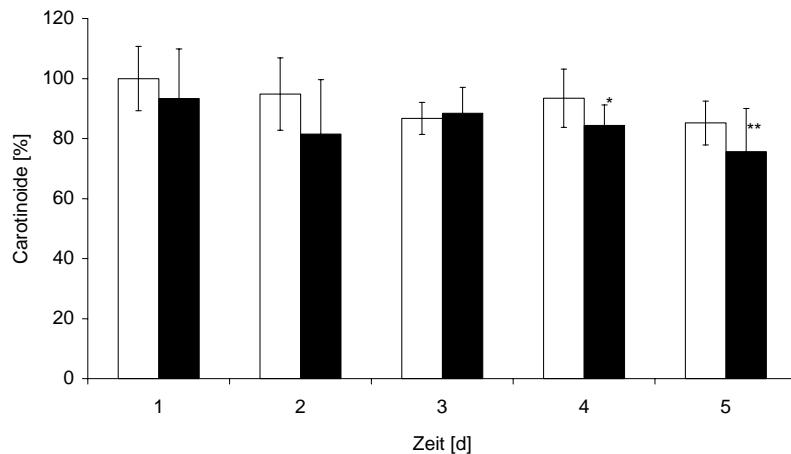


Abb. 10 Einfluss von Cd(II) auf den Gehalt an Carotinoiden in *P. patens* (% der Kontrolle, □ - 5 μ M, ■ - 10 μ M; n=4)

Im Vergleich mit Chlorophyll verringerte sich der Carotinoid-Gehalt in *P. patens* weniger stark. Erst nach vier Tagen 10 μ M Cd(II) wurde eine signifikante Abnahme auf etwa 80 % des Kontrollwertes ermittelt.

Als weiterer Vitalitätsparameter wurde die Photosystem-II-Effizienz gewählt. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 dargestellt.

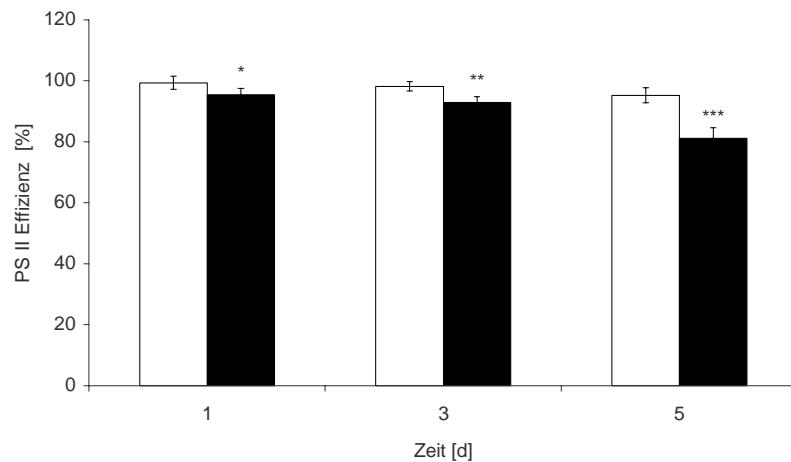


Abb. 11 Einfluss von Cd(II) auf die Photosystem-II-Effizienz in *P. patens*
(% der Kontrolle, □ - 5 µM, ■ - 10 µM; n=3)

Die Photosystem-II-Effizienz nahm in den Cd(II)-Kulturen proportional zur Veruchsdauer und Cd(II)-Konzentration kontinuierlich ab. Im Gegensatz zu den mit 5 µM Cd(II) gestressten Kulturen war die Abnahme bei den 10 µM-Cd(II)-Proben signifikant.

Der Gesamtchlorophyllgehalt der Δapr-Mutanten ist in Abb. 12 dargestellt.

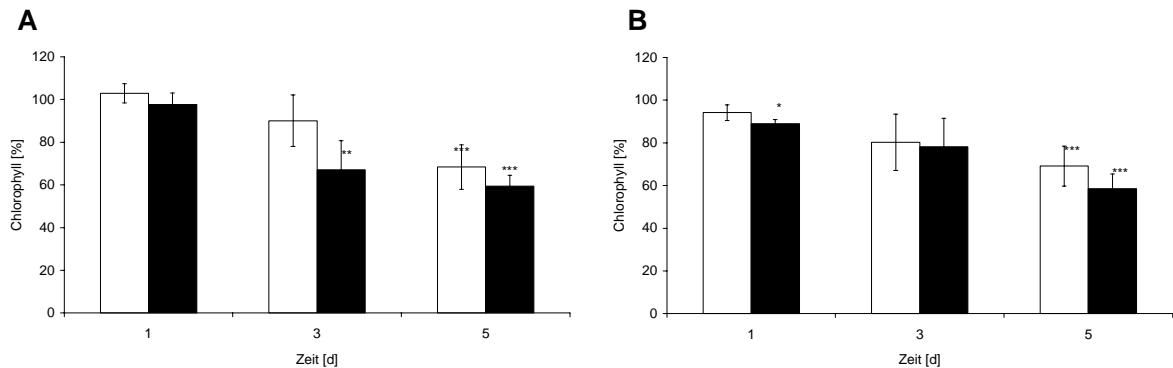


Abb. 12 Auswirkungen von Cd(II) auf den Gesamtchlorophyllgehalt bei Mutante 11-3-12 (A) bzw. Mutante 12-4-3 (B) (% der Kontrolle, □ - 5 µM, ■ - 10 µM; n=4)

Bei den Δapr-Mutanten wurde ein dem Wildtyp vergleichbarer Rückgang der Chlorophyll-Konzentration unter Cd(II)-Stress beobachtet. Der Gesamtchlorophyllgehalt der ungestressten Kulturen von Wildtyp und Mutanten ist in Abb. 13 dargestellt.

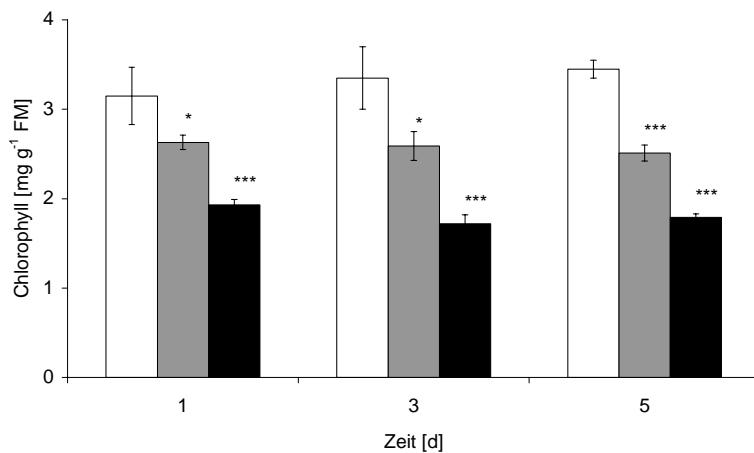


Abb. 13 Gesamtchlorophyllgehalt von Wildtyp (□), Mutante 11-3-12 (■) und Mutante 12-4-3 (■) in Abhängigkeit der Kulturzeit

Im Vergleich zum Wildtyp war die Chlorophyll-Konzentration der Mutanten-Kulturen signifikant niedriger. Während Mutante 11-4-3 noch etwa 80 % des Wildtyp-Gehaltes aufwies, betrug dieser Wert bei Mutante 12-4-3 nur ca. 50 %.

4.1.2 Lichtmikroskopische Dokumentation

Lichtmikroskopische Beobachtungen dienten zur Feststellung Cd(II)-bedingter Veränderungen morphologischer bzw. physiologischer Natur. Die Cd(II)-behandelten Kulturen wiesen eine bräunliche Verfärbung auf, die mit Expositionsdauer und Konzentration weiter zunahm. Die Verfärbung war nicht gleichmäßig ausgeprägt: während die einzelnen Moosblättchen noch dunkelgrün und vital erschienen, zeigten die Zellen der Chloronemata deutliche Verfärbungen. Hinsichtlich der Zellteilung wurden weitere Unterschiede zwischen unbehandelten und Cd(II)-gestressten Kulturen gefunden. Dabei offenbarten letztere eine auffallend höhere und unregelmässigere Verzweigungsrate im Vergleich zur Kontrolle. Außerdem waren die daraus entstandenen Zellen abnorm und verkümmert, häufig besaßen sie eine anomale Zellform. Fortgesetztes Längenwachstum blieb an diesen Verzweigungsstellen meistens aus (Anhang B, S. xiii, Abb. 1). Erst nach längerer Cd(II)-Einwirkung konnte eine Verdickung der Zellwand beobachtet werden. Sie ist durch eine bräunliche Auflagerung auf die ursprüngliche Wand gekennzeichnet und tritt nur vereinzelt bei Chloronemata-Zellen auf. Diese Veränderung kann jedoch auch extrem Ausmaße erreichen, wobei die ursprüngliche Zelldicke überschritten werden kann (Anhang B, S. xiv, Abb. 2).

Die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes BTC-5N ermöglichte die Untersuchung der Cd(II)-Verteilung in *P. patens*. Neben einer schwachen Hintergrundfluoreszenz (Kontroll- und

Cd(II)-Proben), welche von einer Ca(II)-Bindung des Farbstoffes herröhrt, konnten in den Cd(II)-gestressten Zellen Niederschläge entdeckt werden, die den gesamten Protoplasten ausfüllen. Zudem wiesen die BTC-5N-positiven Zellen keine Chloroplasten auf (Anhang B, S. xv, Abb. 3-Abb. 5).

4.1.3 Elektronenmikroskopische Analysen

Zur Bestimmung der Cd(II)-Lokalisation in *P. patens* wurde die EDX-Elektronenmikroskopie (*energy dispersive X-ray*, s. 3.6.3) benutzt. Wie man den Spektren (Abb. 14) entnehmen kann, konnte kein Cd(II) nachgewiesen werden. Der Cd(II)-Peak hätte sich zwischen Cl- und Sn-Peak befunden. Es wurden mehrere Messungen durch gezielte Punktanalysen durchgeführt.

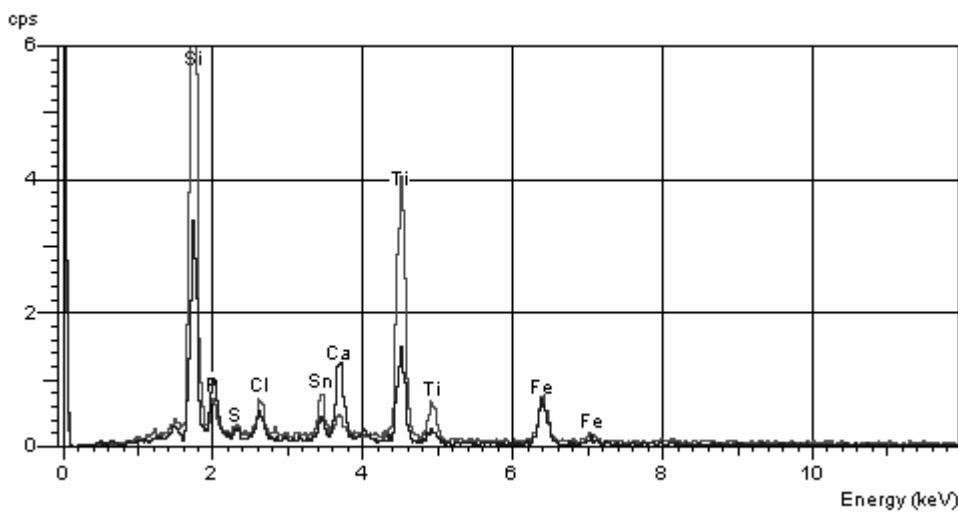


Abb. 14 EDX-Spektren von Niederschlägen in mit $10 \mu\text{M}$ Cd(II) gestressten *P. patens*

4.2 Untersuchungen zur Biosorption und Bioakkumulation von Cd(II)

4.2.1 Biosorption und Bioakkumulation in herkömmlichen ABC-Medium

Die Cd(II)-Biosorption und -Bioakkumulation in *P. patens* wurde gemäss 3.2.5 bestimmt. Die Wiederfindungsraten lagen im Bereich von 90 % bis 110 % (s. Anhang A, S. iii). In Abb. 15 ist die Biosorption von *P. patens* dargestellt.

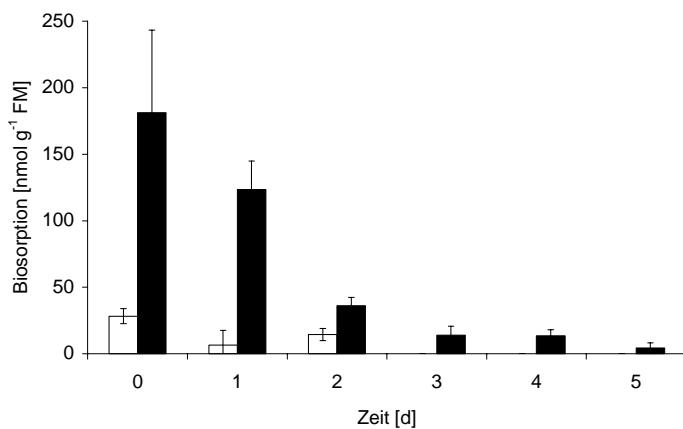


Abb. 15 Biosorption durch *P. patens* in Abhängigkeit von der Cd(II)-Konzentration unter normalen Kultivierungsbedingungen (\square - 5 μM , \blacksquare - 10 μM ; n=3) Null Tage stellen dabei die Ergebnisse nach einminütiger Inkubation mit Cd(II) dar

Die Cd(II)-Biosorption nahm stetig ab. Bei Exposition mit 10 μM Cd(II) wurde deutlich mehr Cd(II) biosorbiert als bei mit 5 μM Cd(II) behandelten Kulturen. Bereits nach drei Tagen fiel die adsorbierte Menge der 5 μM -Cd(II)-Proben unter die Nachweisgrenze.

Die Ergebnisse der Cd(II)-Bioakkumulation von *P. patens* sind in Abb. 16 dargestellt.

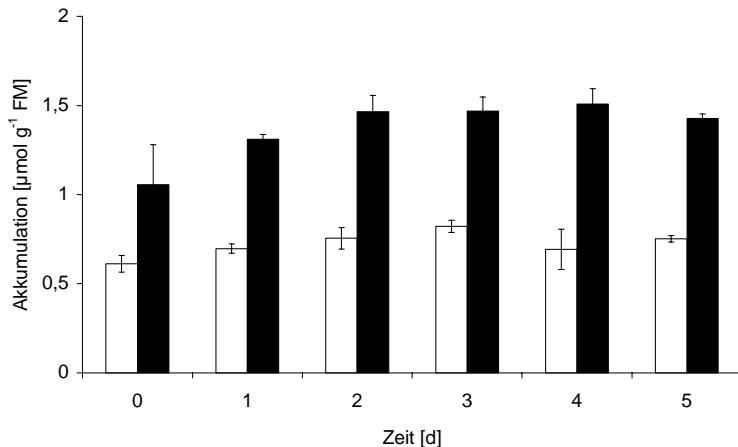


Abb. 16 Bioakkumulation durch *P. patens* in Abhängigkeit von der Cd(II)-Konzentration (\square - 5 μM , \blacksquare - 10 μM ; n=3)

Im Gegensatz zur Biosorption stellt die Bioakkumulation einen wesentlichen Anteil der Cd(II)-Verteilung in *P. patens* dar. Dabei akkumulierten die mit 10 μM Cd(II) behandelten Kulturen etwa die doppelte Cd(II)-Menge im Vergleich mit den 5 μM -Cd(II)-Proben. Sehr schnell wurde ein Maximum erreicht (10 μM : 2 d; 5 μM : 3 d), welches sich auch nach längerer Inkubation nicht änderte.

4.2.2 Bioakkumulation unter erhöhtem Sulfat-Gehalt

Zur Überprüfung, ob die Bioakkumulation (4.2.1) durch zusätzliche Sulfatgabe beeinflussbar war, wurden Mooskulturen in Medium mit erhöhter Sulfatkonzentration und 10 µM Cd(II) kultiviert. Als Sulfatsalze wurden Natrium- und Magnesiumsulfat zur Differenzierung zwischen mono- und bivalenten Kationen verwendet. Die Ergebnisse wurden statistisch mit den unter herkömmlichen Anzuchtbedingungen (1 mM MgSO₄) erhaltenen Werten verglichen und sind in Abb. 17 dargestellt.

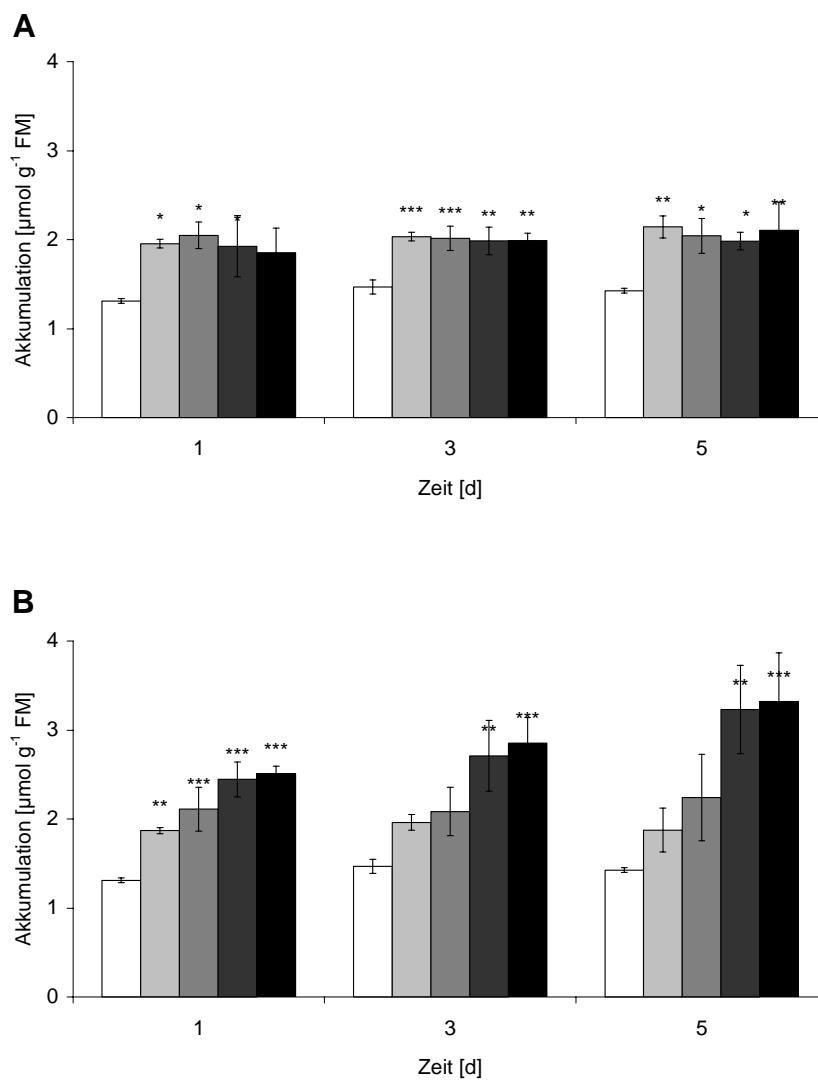


Abb. 17 Cd(II)-Akkumulation durch *P. patens* in Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration im Medium, (A – Na₂SO₄, B – MgSO₄) (□ - ABC-Medium, ■ - 2 mM, ■ - 4 mM, ■ - 6 mM, ■ - 8 mM; n=3)

P. patens akkumulierte in Medium mit erhöhter Sulfatkonzentration signifikant mehr Cd(II) als bei Anzucht in nicht-modifiziertem Medium. Bereits 24 h nach Cd(II)-Gabe wurde eine um ca. 50 % höhere Aufnahme beobachtet. Während die akkumulierte Cd(II)-Menge bei den

verschiedenen Na_2SO_4 -Konzentrationen konstant blieb, wurde bei Erhöhung der MgSO_4 -Gehalte eine kontinuierliche Steigerung der intrazellulären Cd(II)-Menge erreicht.

4.3 Datenbank-Recherche

Mit Ausnahme der APK konnten für alle Enzyme der Cys- bzw. GSH-Biosynthese frei zugängliche EST-Sequenzen von *P. patens* ermittelt werden. Zum Zeitpunkt der Experimente wurde je eine Sequenz für ATPS, APR, PAPR, SAT, γ -ECS bzw. GSHS gefunden. Für SiR bzw. OAS-TL waren zwei Sequenzen verfügbar, jedoch wurde nur für jeweils eine Sequenz das PCR-Produkt erhalten. Zusätzlich wurde getestet, ob die verwendeten Primerpaare an neuere EST-Sequenzen des gleichen Enzyms binden. Dies war nicht der Fall. Demzufolge handelt es sich bei den Induktionsraten nicht um einen summarischen Parameter aller möglichen Isoformen. Anhand von *in silico*-Analysen (s. 3.4.1) wurde überprüft, ob die EST-Sequenzen von *P. patens* Homologien mit den in Datenbanken verfügbaren Sequenzinformationen aufweisen. Dies geschah sowohl auf DNA- als auch auf Protein-Ebene. Außerdem wurde die mögliche zelluläre Lokalisierung der aus den EST-Daten abgeleiteten Proteine ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8 Mögliche Lokalisierung (in %) der aus den EST-Sequenzen abgeleiteten Proteine sowie Homologien (in %) mit Datenbankeinträgen entsprechender Enzyme auf DNA-(blastn) bzw. Protein-Ebene (blastx)

	Lokalisierung [%]	blastn [%]	Organismus	blastx [%]	Organismus	
ATPS	- -	88 79 78	<i>Allium cepa</i> <i>Brassica napus</i> <i>A. thaliana</i>	82 82 79	<i>A. thaliana</i> <i>Brassica juncea</i> <i>Glycine max</i>	
APR	Chloroplast	99,7	90 89	<i>A. thaliana</i> <i>Glycine max</i>	59 58	<i>Glycine max</i> <i>A. thaliana</i>
PAPR	Chloroplast	99,7	- -		70	<i>Selaginella lepidophylla</i>
SiR	Cytoplasma	99,9	88 85	<i>Glycine max</i> <i>Oryza sativa</i>	71 71	<i>Glycine max</i> <i>A. thaliana</i>
SAT	- -	- -			67 62	<i>Nicotiana tabacum</i> <i>Glycine max</i>
OAS-TL	Mitochondriu m	100	82 79 78	<i>Oryza sativa</i> <i>Brassica juncea</i> <i>A. thaliana</i>	77 76	<i>Oryza sativa</i> <i>A. thaliana</i>
γ-ECS	Chloroplast	99,7	86 84	<i>Triticum aestivum</i> <i>Oryza sativa</i>	72 71	<i>Nicotiana tabacum</i> <i>A. thaliana</i>
GSHS	Chloroplast	99,7	90	<i>Pisum sativum</i>	61 58	<i>Zea mays</i> <i>A. thaliana</i>
GST3	Cytoplasma	100			56 55	<i>Glycine max</i> <i>A. thaliana</i>
GST4	Cytoplasma	100	93	<i>A. thaliana</i>	43	<i>A. thaliana</i>

4.4 Analysen zur Genexpression

Mit Hilfe der *real-time*-PCR wurde die cDNA-Menge einer unbekannten Probe bestimmt. Dabei wird ein fluoreszierendes Reportersignal im PCR-Reaktionsansatz detektiert, welches proportional zur Menge an PCR-Produkt ist. Im vorliegenden Fall wurde der in doppelsträngige DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR®-Green I benutzt. Ein typischer Amplifikationsgraph nach *real-time* PCR ist in Abb. 18 dargestellt. Dabei ist auf der Abszisse die Zyklenzahl dargestellt, die Ordinate gibt die Fluoreszenzeinheiten nach Basislinien-Subtraktion

in logarithmischer Form wieder. Aufgrund dieser Darstellungsweise erscheint die exponentielle Phase der PCR-Reaktion linear. Anschließend wird bei einer bestimmten Fluoreszenzintensität (horizontaler Balken) das Lot gefällt und der entsprechende Ct-Wert ermittelt. Die verwendete Intensität wurde optimiert und betrug bei der Datenermittlung immer 100,9. Der Ct-Wert (*threshold cycle*, Schwellenwert) ist durch denjenigen Zyklus innerhalb einer PCR-Reaktion gekennzeichnet, bei dem die Konzentration eines PCR-Fragmentes eine bestimmte Schwellenkonzentration überschreitet. Je früher diese erreicht wird, desto größer war die Menge an DNA zu Beginn der PCR, d.h. Ct-Wert und DNA-Menge sind umgekehrt proportional.

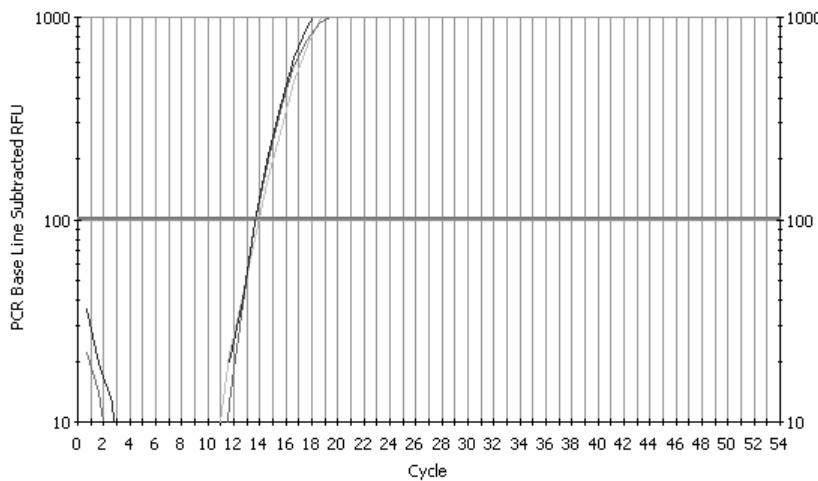


Abb. 18 real-time PCR-Amplifikationsgraph, Rubisco, Kontrolle 3 Tage (n=3)

Am Ende des *real-time* PCR-Programms wurde eine Schmelzkurve zur Überprüfung der Produktspezifität aufgenommen (s. Abb. 19). Zur Optimierung wurden die Ergebnisse der Schmelzkurven zusätzlich durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

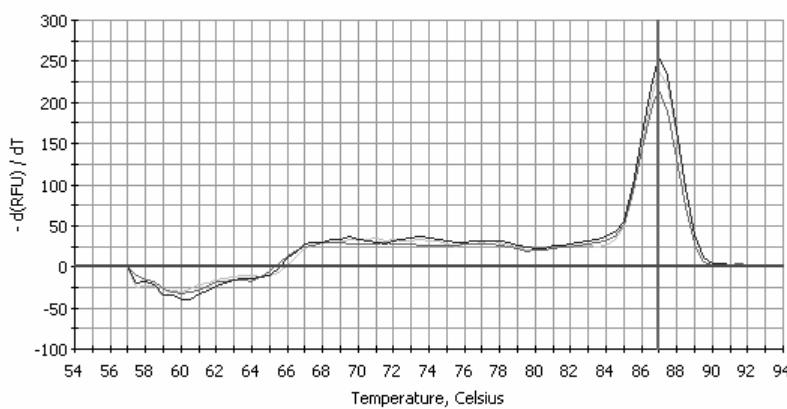


Abb. 19 Schmelzkurve nach *real-time* PCR, Rubisco, Kontrolle 3 Tage (n=3)

Ein einziger scharfer Peak bei Temperaturen von 80-90 °C stellte dabei das gewünschte PCR-Produkt dar. Ein breiter Peak bei niedrigeren Temperaturen war ein Indiz für die Bildung von Primerdimeren. In diesem Fall, sowie bei Erhalt mehrerer Peaks in der Schmelzkurve oder bei Bildung von spezifischen Produkten in der Negativkontrolle, wurden die Ergebnisse nicht verwendet.

4.4.1 Bestimmung eines Referenzgens

Zu Beginn der Untersuchungen zur Expression bestimmter Gene musste ein Gen ermittelt werden, welches auf Transkriptionsebene nicht durch Cd(II)-Stress beeinflussbar war. Die Bestimmung dieses, im Nachfolgenden als Referenzgen bezeichneten Gens, war schwierig, da Schwermetallstress die Transkription vieler Gene beeinflusst. Als Kandidaten wurden die in der Literatur häufig verwendeten Gene von Aktin, GAP-DH und Rubisco (kleine Untereinheit, kernkodiert) gewählt. Die Ergebnisse sind in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9 Ct-Werte (Mittelwerte \pm Standardabweichung) möglicher Referenzgene bei unterschiedlicher Inkubationsdauer und verschiedenen Cd(II)-Konzentrationen in *P. patens* (n = 3)

Zeit [d]		Kontrolle	5 µM CdCl ₂	10 µM CdCl ₂
1	Aktin	23,9 ± 0,2	22,8 ± 0,1	22,9 ± 0,3
		23,6 ± 0,3	21,3 ± 0,3	20,5 ± 0,6
		23,9 ± 0,4	22,0 ± 0,2	21,7 ± 0,4
3	GAP-DH	25,7 ± 0,2	23,1 ± 0,8	23,1 ± 0,3
		25,0 ± 0,4	21,4 ± 0,7	20,7 ± 0,2
		26,2 ± 0,8	22,8 ± 0,1	22,1 ± 0,6
5	Rubisco	14,1 ± 0,2	13,9 ± 0,3	14,2 ± 0,5
		13,8 ± 0,1	13,9 ± 0,5	14,4 ± 0,2
		14,2 ± 0,5	15,0 ± 0,3	15,0 ± 0,3

Aktin und GAP-DH kamen als Referenzgene nicht in Frage, da die Befunde auf eine Induktion der Transkription hinwiesen. Im Gegensatz dazu wurde die Transkription des *Rubisco*-Gens

unter Cd(II)-Stress kaum verändert. Aus diesem Grund wurde *Rubisco* als Referenzgen für die Berechnungen der Transkriptionsinduktion bzw. -repression verschiedener Gene ausgewählt.

4.4.2 Gene der Sulfatassimilation und der Glutathionbiosynthese

Zur Quantifizierung der Transkription mittels *real-time* PCR wurde die Methode der relativen Quantifizierung verwendet. Diese beinhaltet die im Vergleich zu einem Referenzgen ermittelte Induktion bzw. Repression der Transkription. Für die Berechnungen wurde die $\Delta\Delta Ct$ -Methode verwendet. Voraussetzung für deren Anwendung ist eine identische PCR-Effizienz der untersuchten Gene, welche durch gleiche Anstiege im exponentiellen Teil des Amplifikationsgraphs gegeben ist. Die Produktlänge betrug 100-150 bp und als Primer wurden Oligonukleotide verwendet, welche keine Sekundärstrukturen und keine Primerdimere bilden (einzelne Primer und Primerpaare).

Transkriptionsstudien wurden von folgenden Genen der Cys- bzw. GSH-Biosynthese durchgeführt: ATP-Sulfurylase (ATPS), APS-Reduktase (APR), PAPS-Reduktase (PAPR), Sulfit-Reduktase (SiR), Serin-Acetyl-Transferase (SAT), O-Acetylserin(thiol)lyase (OAS-TL), γ -Glutamylcystein-Synthetase (γ -ECS) und Glutathion-Synthetase (GSHS). Die Ergebnisse für einen Tag Cd(II)-Inkubation sind in Abb. 20 dargestellt.

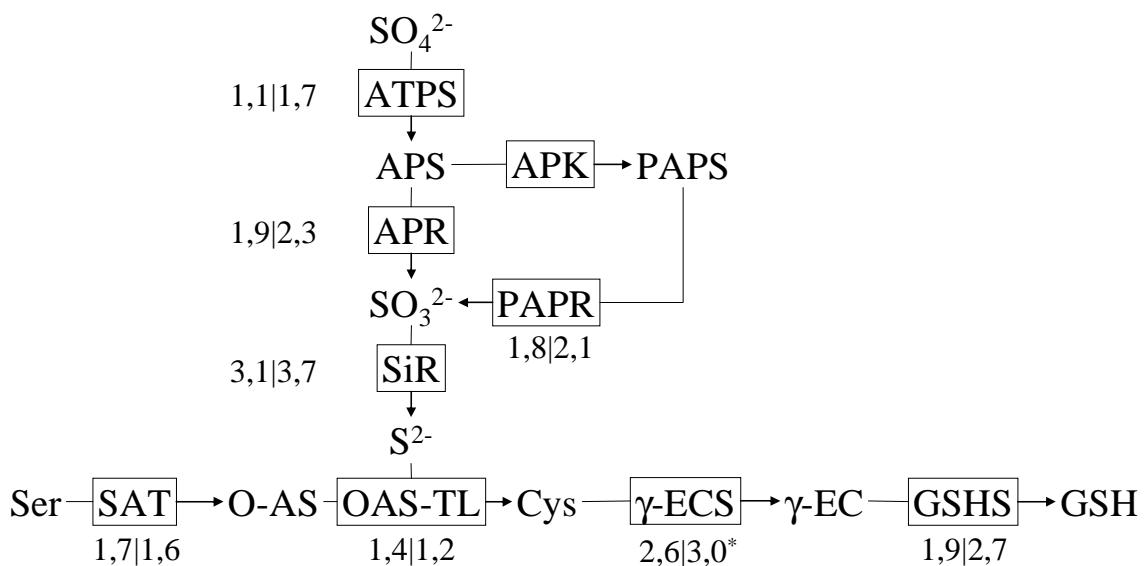


Abb. 20 Veränderung der Transkriptmengen von Enzymen der Sulfatassimilation und der Glutathionbiosynthese in *P. patens* unter Cd(II)-Stress im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle nach einem Tag Inkubationsdauer (5 μ M Cd(II) | 10 μ M Cd(II), n=3)

Nach einem Tag Cd(II)-Exposition wurde bei den Genen von Enzymen der Sulfatassimilation nur eine geringe, nicht-signifikante Transkriptionsinduktion festgestellt. Im Fall der Sulfit-

Reduktase wurde mit einer 3,1- (5 µM) bzw. 3,7- (10 µM) fachen Erhöhung der mRNA-Menge das Maximum erreicht. Die Induktionsraten der GSH-Biosyntheseenzyme waren denen der Cysteinbiosynthese ähnlich. Die Transkriptmenge der γ -EC-Synthetase war unter 10 µM Cd(II) signifikant erhöht.

Die Resultate für den dritten Tag nach Cd(II)-Zugabe sind in Abb. 21 dargestellt.

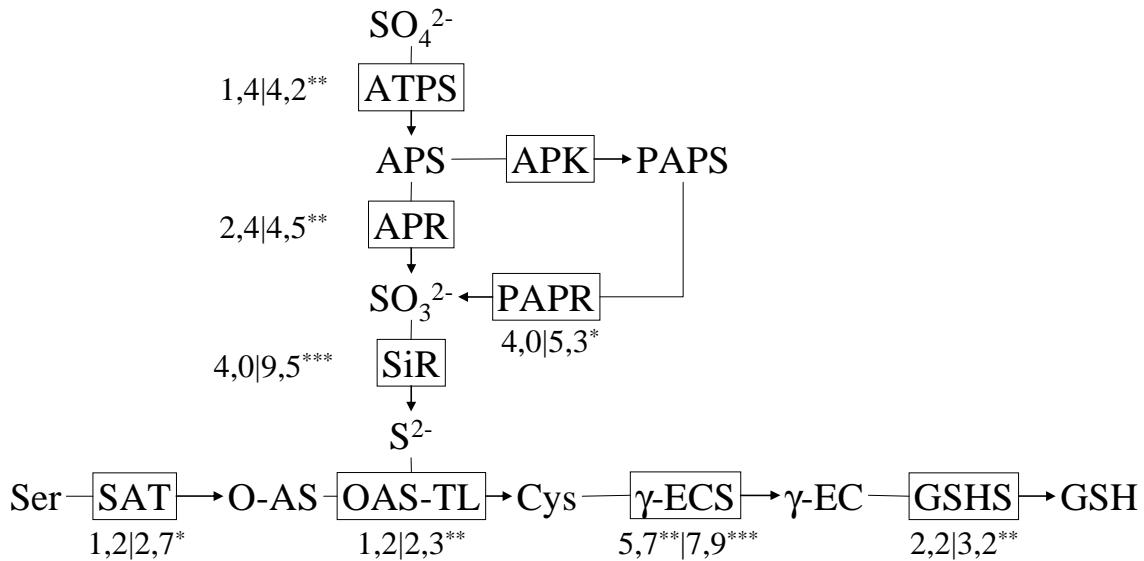


Abb. 21 Veränderung der Transkriptmengen von Enzymen der Sulfatassimilation und der Glutathionbiosynthese in *P. patens* unter Cd(II)-Stress im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle nach drei Tagen Inkubationsdauer (5 µM Cd(II) | 10 µM Cd(II), n=3)

Nach drei Tagen war die Transkription aller getesteten Gene der Cystein- bzw. Glutathionbiosynthese in den mit 10 µM Cd(II) behandelten Kulturen signifikant induziert. Die höchsten Induktionsraten von 9,5 und 7,9 wiesen die Sulfit-Reduktase bzw. die γ -EC-Synthetase auf, während die mRNA-Mengen von SAT, OAS-TL und GSHS vergleichsweise geringe Anstiege zeigten. Im Gegensatz dazu sind die Ergebnisse der 5 µM Cd(II)-Proben den Resultaten ähnlich, welche nach einem Tag unter 10 µM Cd(II) erzielt wurden. Analog dazu konnte nur bei der γ -ECS eine signifikante Erhöhung der Transkriptmenge um das 5,7-fache festgestellt werden, wobei die anderen Enzyme mit Ausnahme von PAPR und SiR (jeweils 4-fach) kaum Veränderungen der mRNA-Mengen aufwiesen.

In Abb. 22 sind die Ergebnisse nach fünftägiger Cd(II)-Belastung dargestellt.

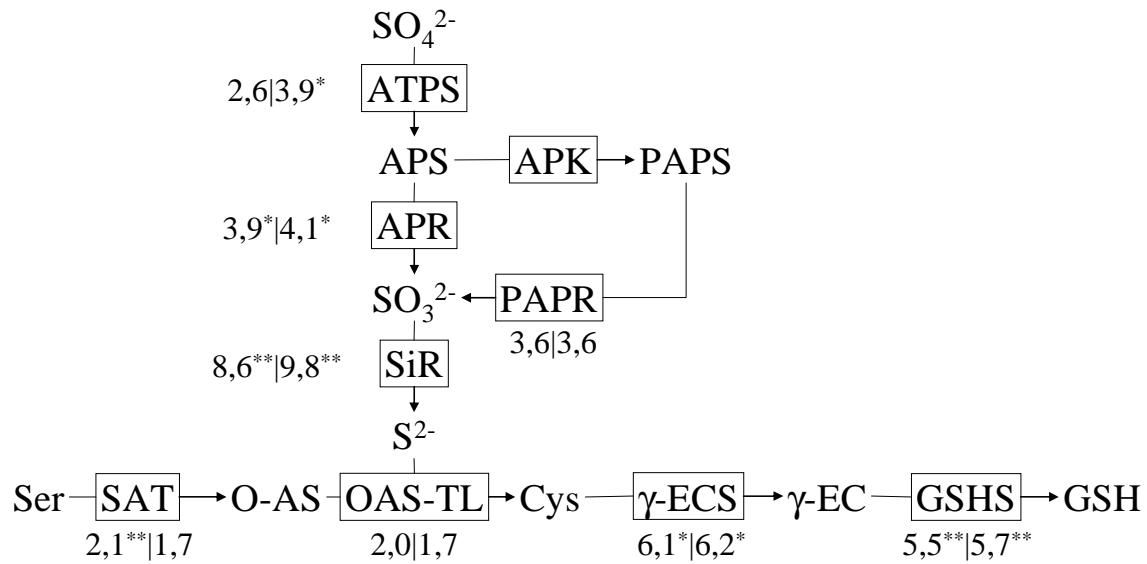


Abb. 22 Veränderung der Transkriptmengen von Enzymen der Sulfatassimilation und der Glutathion-biosynthese in *P. patens* unter Cd(II)-Stress im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle nach fünf Tagen Inkubationsdauer (5 μM Cd(II) | 10 μM Cd(II), n=3)

Die Induktionsraten waren nach fünf Tagen Versuchsdauer bei beiden Cd(II)-Konzentrationen annähernd gleich. Zu diesem Zeitpunkt stellten erneut die Sulfit-Reduktase und die γ -EC-Synthetase die am stärksten induzierten Enzyme dar. Verglichen mit früheren Zeitpunkten zeigte die Glutathion-Synthetase einen auffälligen Anstieg des Transkriptlevels.

4.4.3 Gene, deren Produkte an der Redox-Homöostase beteiligt sind

Zur Analyse der Transkription von Genen, deren Produkte an der Redox-Homöostase beteiligt sind, wurden EST-Sequenzen von Genen verwendet, die Ascorbat-Peroxidase, Ascorbat-Reduktase, Glutathion-Peroxidase bzw. Glutathion-Reduktase kodieren (s. Tab. 7). In Abb. 23 sind die Ergebnisse dargestellt.

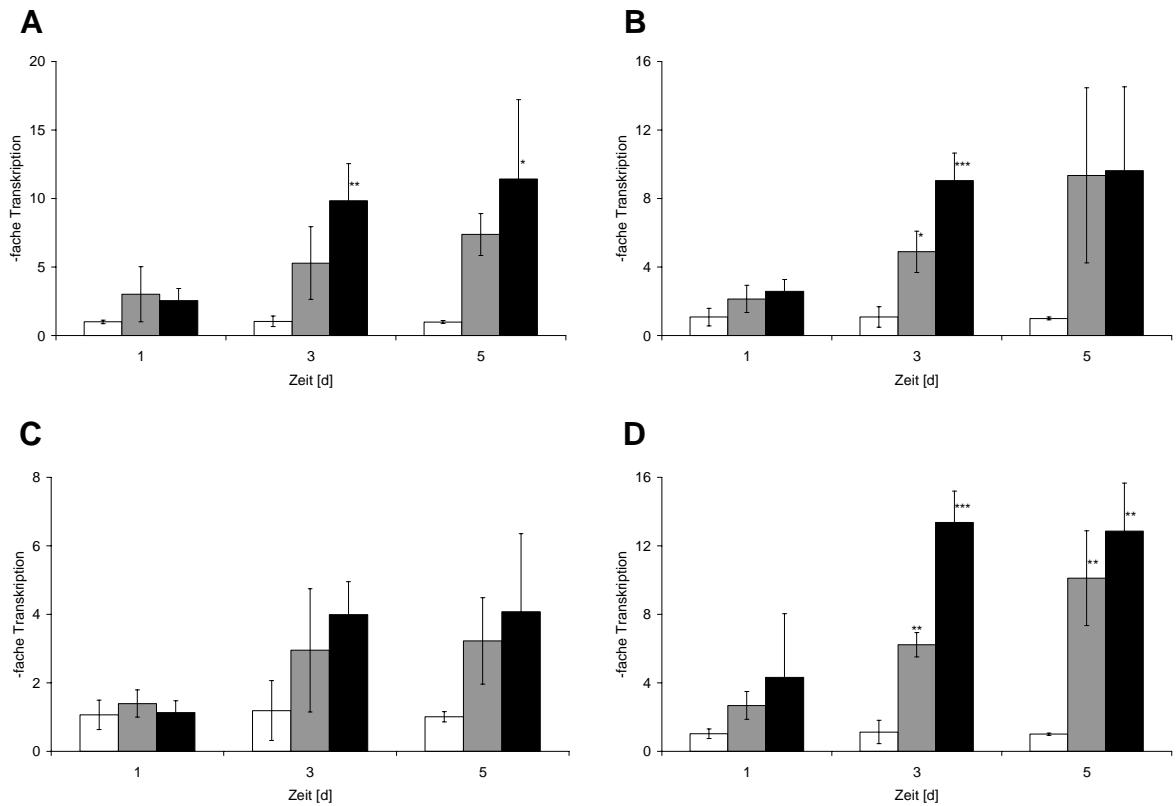


Abb. 23 Veränderung der Transkriptmengen von Genen, deren Produkte an der Redox-Homöostase beteiligt sind in *P. patens* unter Cd(II)-Stress im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (A – Ascorbat-Peroxidase, B – Ascorbat-Reduktase, C – GSH-Peroxidase, D – GSH-Reduktase, □ - Kontrolle, ■ - 5 µM Cd(II), ■ - 10 µM Cd(II), n=3)

Im Fall der GSH-Peroxidase war die Genexpression der Cd(II) nur leicht erhöht: bei diesem Enzym konnten nur geringe, nicht-signifikante Induktionen ab dem dritten Tag beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten die anderen Redox-Enzyme eine konzentrations- und zeitabhängige Erhöhung der Transkriptmenge. Während 24 h nach Cd(II)-Gabe nur schwache Anstiege der mRNA-Gehalte feststellbar waren, konnten nach längerer Expositionsdauer signifikante Unterschiede beobachtet werden. So war die Transkriptmenge von Ascorbat-Peroxidase bzw. Ascorbat-Reduktase um das Zehnfache höher (10 µM CdCl₂) als die der Kontrollproben. Bei der GSH-Reduktase wurde eine 6- bis 14-fache Steigerung der Genexpression in den Cd(II)-gestressten Kulturen ermittelt.

4.4.4 Glutathion-S-Transferasen

Zur Untersuchung der Transkription von Glutathion-S-Transferasen wurden vier EST-Sequenzen (GST1 - GST4) verwendet (s. Tab. 7), die keine Sequenzübereinstimmung untereinander aufwiesen. Die Ergebnisse sind in Abb. 24 dargestellt.

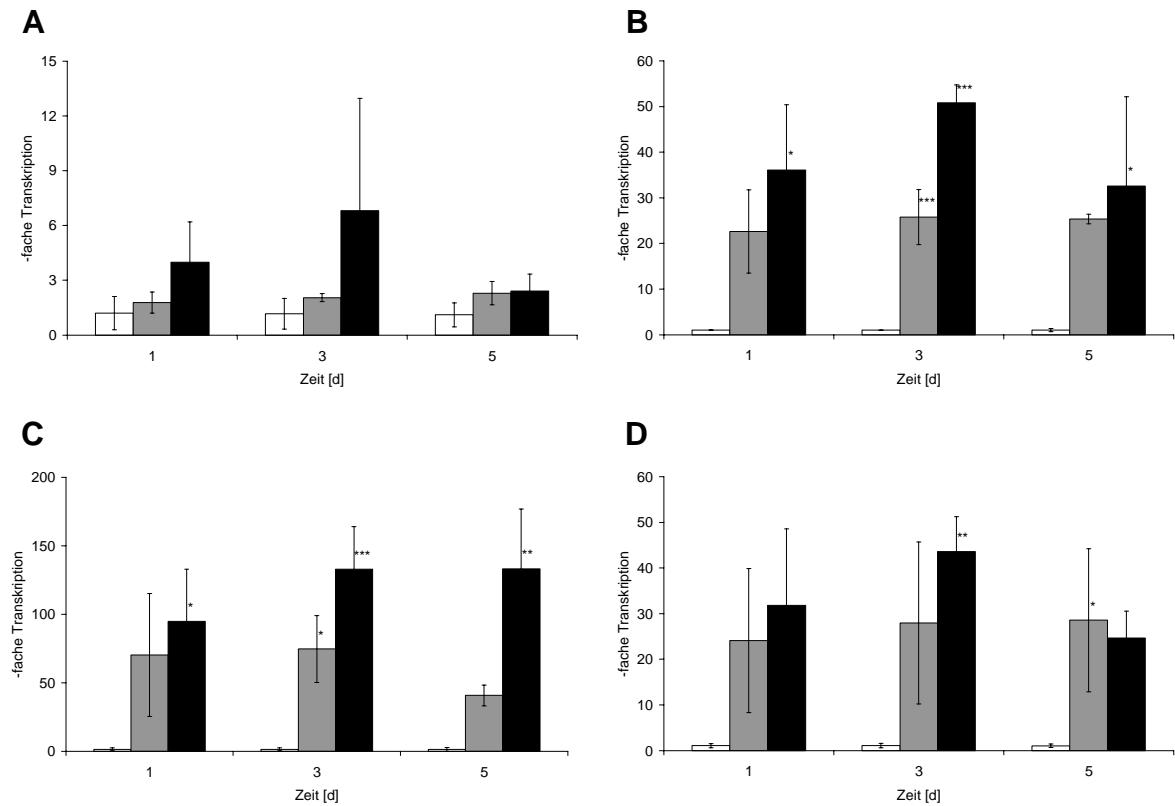
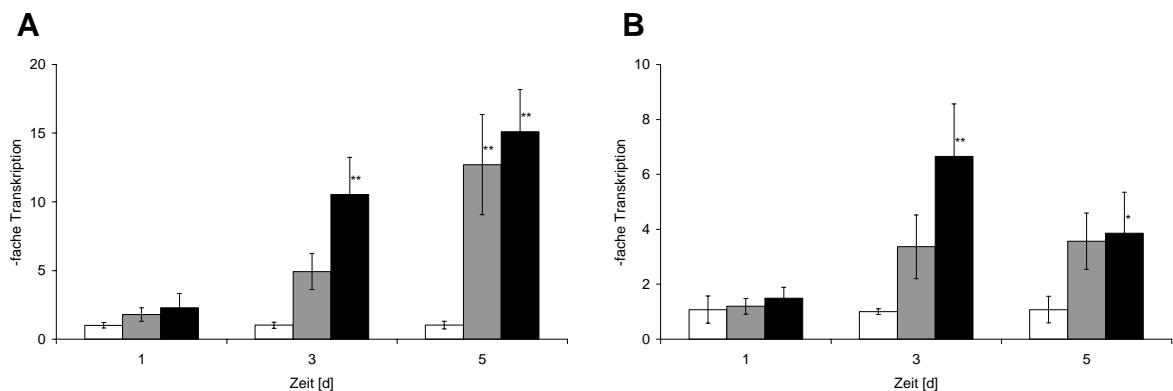


Abb. 24 Veränderung der Transkriptmengen von Glutathion-S-Transferasen in *P. patens* unter Cd(II)-Stress im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (A - GST1, B – GST2, C – GST3, D – GST4, □ - Kontrolle, ■ - 5 μ M Cd(II), ■■ - 10 μ M Cd(II), n=3)

Die Analysen zur Messung der GST-Transkription zeigten die höchsten Werte, die anhand der real-time-PCR-Messungen ermittelt wurden. Bereits einen Tag nach Cd(II)-Zugebe wurden Raten von 20- bis 100-facher Induktion (GST2, GST3, GST4) festgestellt. Nach drei Tagen wurden die höchsten Induktionsraten berechnet: bei den mit 10 μ M Cd(II) behandelten Kulturen war die mRNA-Menge bis zu 140-fach (GST3) erhöht. Im Fall von GST2 und GST3 waren die Werte signifikant. Im Gegensatz dazu zeigte GST1 keine signifikanten Änderungen im Versuchszeitraum.

4.4.5 Metallothioneine

Zur Analyse der Transkription von Genen, deren Produkte an der Cd(II)-Detoxifizierung beteiligt sein könnten, wurden EST-Sequenzen für ein Metallothionein-ähnliches Protein (*metallothionein-like protein*) „MT A“ und ein Metallothionein „MT B“ verwendet (s. Tab. 7). In Abb. 25 sind die Ergebnisse dargestellt.



MT A und MT B zeigten signifikante Steigerungen ihrer Expression. So betrug die Transkriptmenge von MT A nach fünf Tagen das 13- (5 μ M) bzw. 15-fache (10 μ M) der Kontrollwerte. Im Fall von MT B wurden nach drei Tagen Zuwächse um das vier- (5 μ M) bzw. siebenfache (10 μ M) erreicht.

4.5 Untersuchungen zur Enzymaktivität

Aufgrund der Schlüsselstellung innerhalb des Cys- bzw. GSH-Stoffwechsels wurden die Aktivitäten von OAS-TL, γ -ECS und GSHS durch *in vitro*-Enzymassays gemessen.

4.5.1 OAS-TL

Das Enzym O-Acetylserin(thiol)lyase (OAS-TL) katalysiert den letzten Schritt der Sulfatassimilation (s. 3.3.1). Es überträgt Sulfid auf O-Acetylserin, wobei Cystein entsteht. Die Ergebnisse des OAS-TL-Enzymassays sind in Abb. 26 dargestellt.

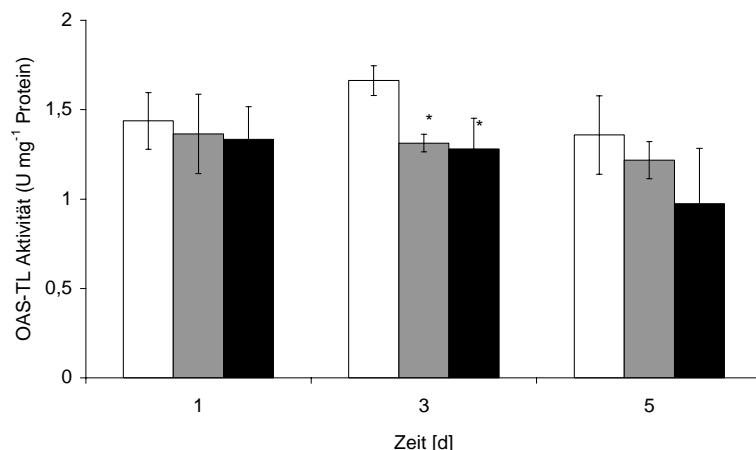
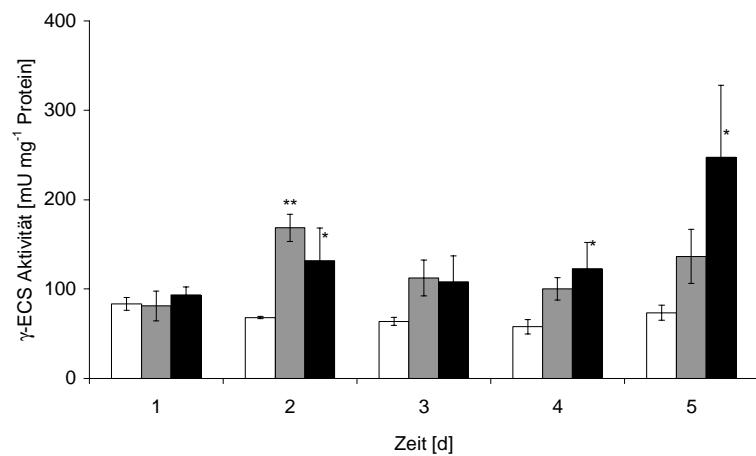


Abb. 26 OAS-TL-Aktivität von *P. patens* (□ - Kontrolle, ■ - 5 µM Cd(II), ■ - 10 µM Cd(II); n=3)

Die OAS-TL-Aktivität war in den Cd(II)-exponierten Kulturen niedriger als unter Kontrollbedingungen. Am dritten Tag des Experimentes konnte eine signifikante Abnahme festgestellt werden.

4.5.2 γ -ECS und GS HS

Die γ -Glutamylcystein-Synthetase (γ -ECS) katalysiert den ersten Schritt der GSH-Biosynthese. Die γ -ECS-Aktivitäten von Kontroll- und Cd(II)-Proben sind in Abb. 27 dargestellt.

Abb. 27 γ -ECS-Aktivität von *P. patens* (□ - Kontrolle, ■ - 5 µM Cd(II), ■ - 10 µM Cd(II); n=3)

Die Proben wiesen bereits nach zwei Tagen deutliche Unterschiede auf. Hierbei war die γ -ECS-Aktivität unter Cd(II)-Stress höher im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen, die konstante Werte im Untersuchungszeitraum aufwiesen. Während am zweiten bzw. dritten Tag die Aktivität bei 5 µM Cd(II) noch höher war als unter 10 µM Cd(II), kehrte sich dieser Trend nach vier Tagen Versuchsdauer um, wobei die höchste Aktivität nach fünf Tagen und 10 µM Cd(II) erreicht wurde.

Außerdem wurde die Aktivität der Glutathionsynthetase (GS HS) bestimmt, die den letzten Schritt der GSH-Biosynthese ausführt. Dabei wird ein Glycinrest auf γ -Glutamylcystein unter Bildung von Glutathion übertragen, wobei wieder ATP erforderlich ist. In Abb. 28 sind die GS HS-Aktivitäten ersichtlich.

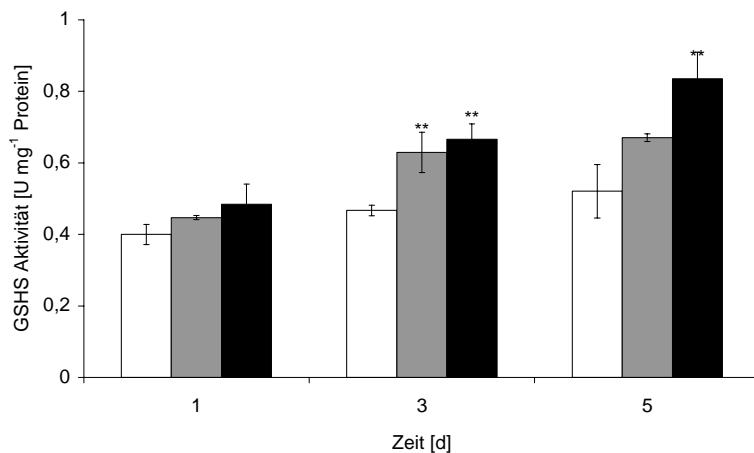


Abb. 28 GSHS-Aktivität von *P. patens* (□ - Kontrolle, ■ - 5 µM Cd(II), ▒ - 10 µM Cd(II); n=3)

Auch die Aktivität der Glutathionsynthetase stieg in den Cd(II)-behandelten Proben an. Diese Erhöhung war proportional zur Cd(II)-Konzentration und Expositionsdauer. Bereits nach drei Tagen wurden signifikante Steigerungen festgestellt.

4.5.3 Glutathion-S-Transferasen

Zur Bestimmung der Aktivität von Glutathion-S-Transferasen (GST) wurde ein Enzymassay verwendet, welcher die photometrische Bestimmung des CDNB-GSH-Konjugates beinhaltet. In Abb. 29 sind die Ergebnisse dargestellt.

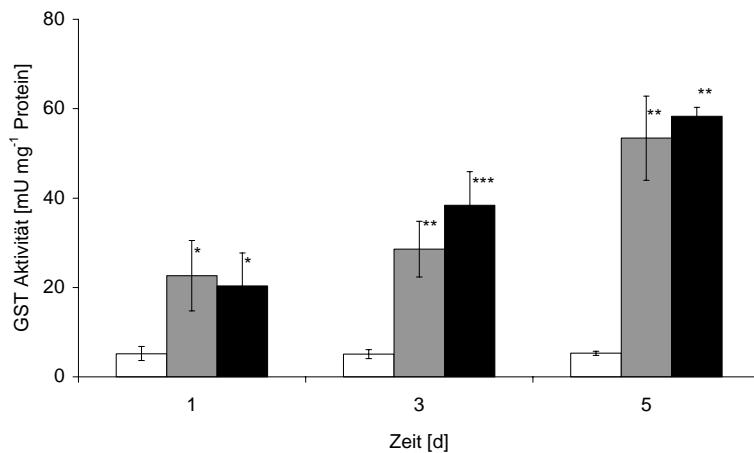


Abb. 29 GST-Aktivität von *P. patens* (□ - Kontrolle, ■ - 5 µM Cd(II), ▒ - 10 µM Cd(II); n=3)

Die GST-Aktivität war in den Cd(II)-belasteten Proben bereits nach einem Tag signifikant erhöht. Mit längerer Versuchsdauer nahm diese weiter zu: nach drei bzw. fünf Tagen betrug die

GST-Aktivität in den mit 5 µM Cd(II) versetzten Kulturen das Sechs- bzw. Zehnfache der Kontrolle. Durch Exposition mit 10 µM Cd(II) wurden Aktivitätszunahmen um das Acht- bzw. Zwölffache erreicht. Bei keinem der übrigen Enzyme wurden vergleichbar hohe Werte erhalten.

4.6 Untersuchungen der Thiolgehalte unter Cd(II)-Stress

Auf Metabolit-Ebene wurden die Konzentrationen von Cystein (Cys), γ -Glutamylcystein (γ -EC) und Glutathion (GSH) bestimmt. Cys, γ -EC und Gesamt-GSH (GSH_{ges}) wurden nach 3.2.3 ermittelt. Für die Bestimmung von GSSG und GSH_{red} wurde der enzymatische GSH-Reduktase-Test (s. 3.2.4) verwendet.

4.6.1 Cystein und γ -Glutamylcystein

Cystein stellt das Endprodukt der assimilatorischen Sulfatreduktion dar. In Abb. 30 ist der Cys-Gehalt von *P. patens* dargestellt.

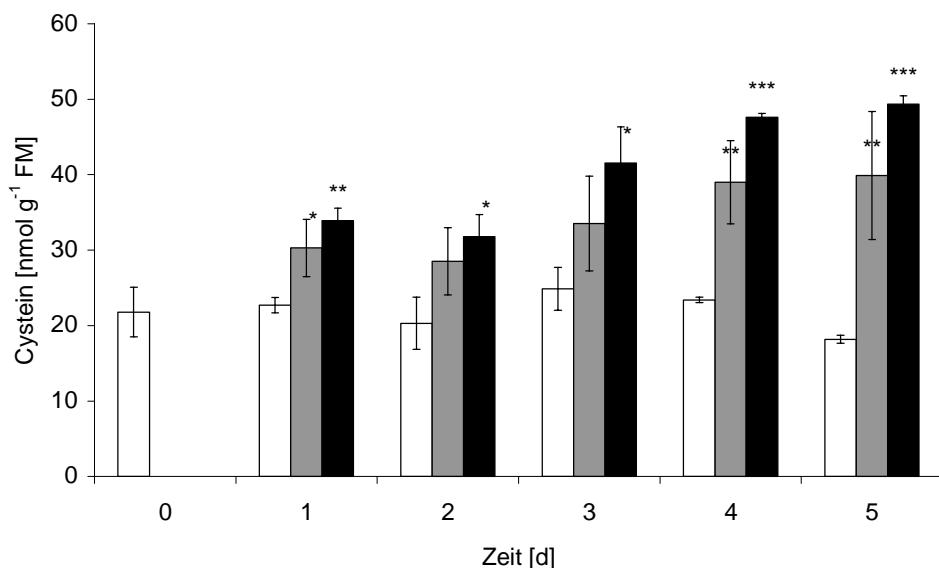


Abb. 30 Cystein-Gehalt von *P. patens* (□ - Kontrolle, ■ - 5 µM Cd(II), ▒ - 10 µM Cd(II); n=3)

Unter Cd(II)-Stress stieg die intrazelluläre Cystein-Konzentration im Vergleich zu unbelasteten Proben kontinuierlich an. So war der Cystein-Pool in den Mooskulturen bereits 24 h nach Exposition mit 10 µM Cd(II) signifikant erhöht. Die Werte nach vier Tagen Cd(II)-Inkubation zeigten eine Verdopplung an. Für mit 5 µM Cd(II) behandelte *P. patens*-Kulturen zeichnete sich ein ähnlicher Verlauf ab. In diesem Fall wurden jedoch erst nach vier Tagen signifikante

Unterschiede zur Kontrolle erkennbar, nach fünf Tagen konnte auch hier eine Verdopplung der Cys-Konzentration festgestellt werden.

Neben Cys wurde der γ -EC-Gehalt von *P. patens* ermittelt. Dieser ist in Abb. 31 dargestellt.

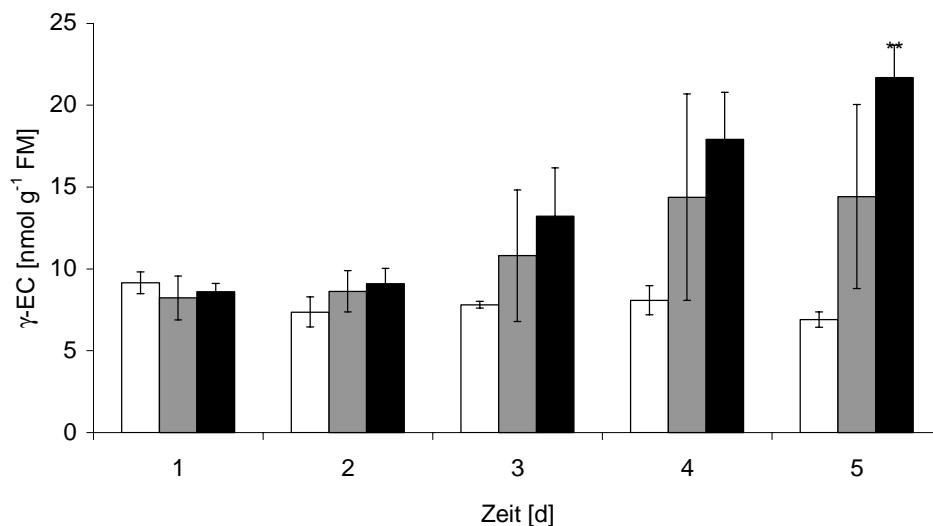


Abb. 31 γ -EC-Gehalt von *P. patens* (□ - Kontrolle, ■ - 5 μ M Cd(II), ▒ - 10 μ M Cd(II); n=3)

Auch γ -EC wies einen Anstieg in den Cd(II)-behandelten Proben auf. Auffällig sind die hohen Standardabweichungen der Cd(II)-Ansätze. Nach fünf Tagen 10 μ M Cd(II) wurde eine signifikante Erhöhung festgestellt.

4.6.2 Glutathion

Die Bestimmung des GSH-Gehaltes erfolgte sowohl durch mBBr-Derivatisierung/HPLC als auch mittels GSH-Reduktase. Der enzymatische Test war notwendig, da die GSSG-Bestimmung mittels HPLC keine reproduzierbaren Ergebnisse lieferte.

Der GSH_{ges}-Gehalt (HPLC-Bestimmung) ist in Abb. 32 dargestellt.

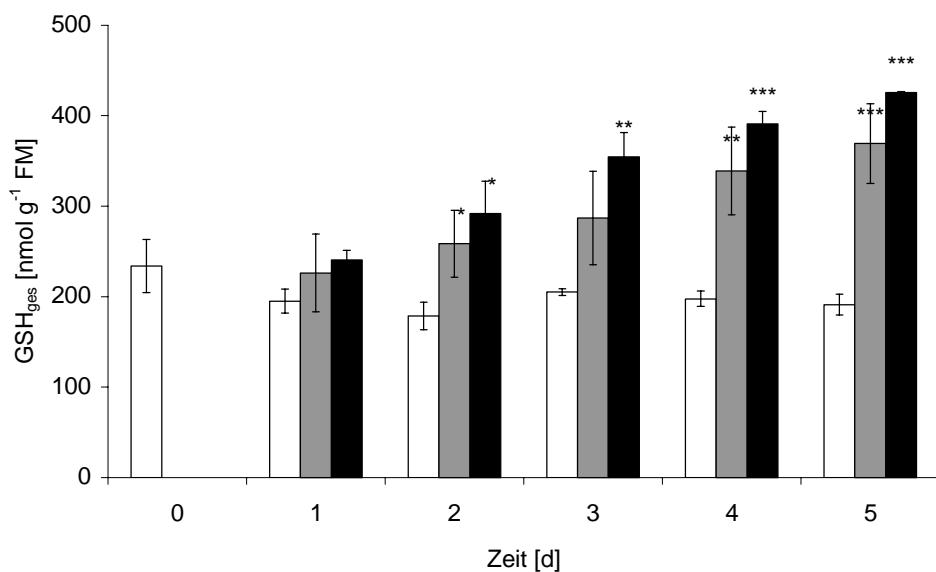


Abb. 32 Gehalt an Glutathion (gesamt) von *P. patens*, HPLC-Bestimmung (□ - Kontrolle, ■ - 5 μ M Cd(II), ■ - 10 μ M Cd(II); n=3)

Die Konzentration von GSH_{ges} in *P. patens* war etwa um das Zehn- bzw. Zwanzigfache höher im Vergleich mit den Gehalten an Cys bzw. γ -EC. Nach Cd(II)-Belastung wurde eine Erhöhung des GSH-Pools festgestellt. Dies war sowohl durch HPLC-Analyse als auch mittels enzymatischer Bestimmung (Abb. 33) erkennbar. Bei einer Belastung mit 10 μ M Cd(II) wurde bereits nach zwei Tagen eine signifikante Erhöhung des GSH-Gehaltes ermittelt. Mit zunehmender Versuchsdauer stieg die GSH-Konzentration weiter an. Wie im Fall des Cysteins war auch hier eine Verdopplung nach vier Tagen zu beobachten. Auch die 5 μ M-Cd(II)-gestressten Kulturen reagierten mit einem Anstieg des GSH-Gehaltes. Hier zeigten sich erst ab dem vierten Tag signifikante Werte.

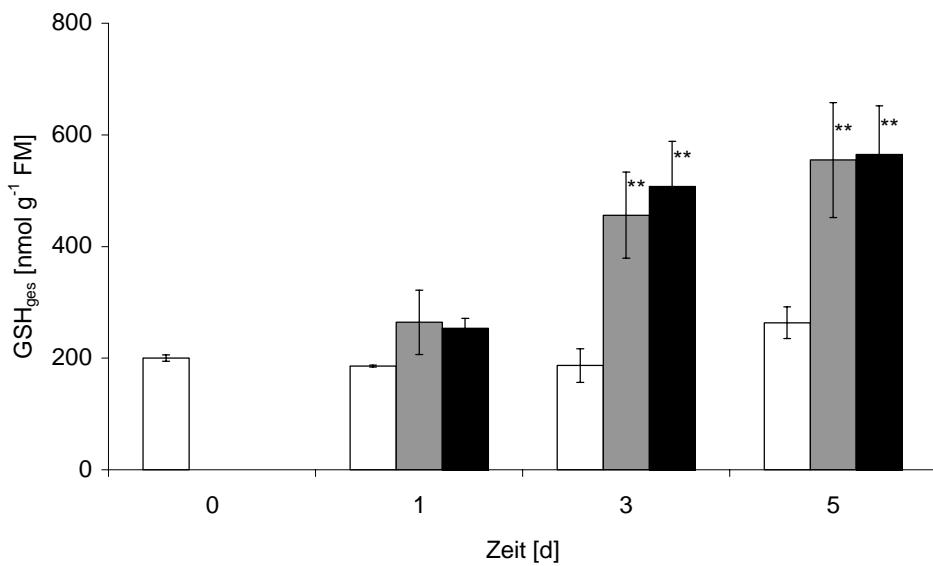


Abb. 33 Gehalt an Glutathion (gesamt) von *P. patens*, enzymatische Bestimmung (□ - Kontrolle, ■ - 5 µM Cd(II), ■ - 10 µM Cd(II); n=3)

Die Bestimmung des oxidierten (GSSG) bzw. reduzierten Glutathions (GSH_{red}) war durch Verwendung des Glutathion-Reduktase-Tests möglich. Die GSH_{red} -Konzentration wurde als Differenz von Gesamt- und oxidiertem GSH bestimmt. In Abb. 34 sind die Ergebnisse für GSSG dargestellt; Abb. 35 zeigt die Werte für reduziertes GSH.

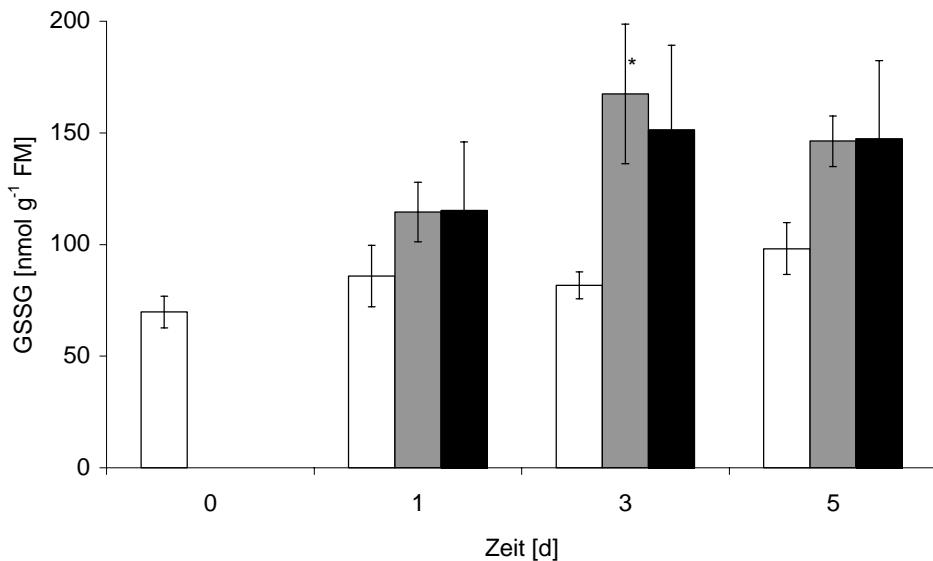


Abb. 34 Gehalt an Glutathion (oxidiert) von *P. patens* (□ - Kontrolle, ■ - 5 µM Cd(II), ■ - 10 µM Cd(II); n=3)

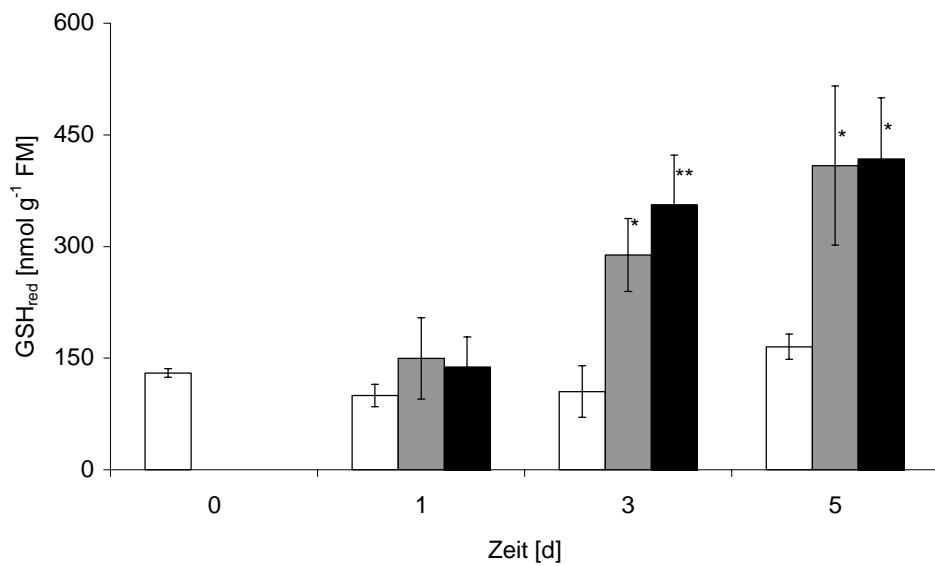


Abb. 35 Gehalt an Glutathion (reduziert) von *P. patens* (□ - Kontrolle, ■ - 5 µM Cd(II), ▒ - 10 µM Cd(II); n=3)

Der GSH_{red}-Gehalt war in ungestressten Kulturen von *P. patens* höher als der GSSG-Gehalt. Unter Cd(II)-Stress stiegen beide Metabolite an, GSH_{red} jedoch stärker als GSSG. Bei beiden Cd(II)-Konzentrationen wurden nach drei Tagen signifikante Erhöhungen festgestellt. Die Konzentrationen von GSH_{red} und GSSG wurden zur Berechnung des GSH_{red}/GSSG-Verhältnisses verwendet. Der Verlauf dieses Quotienten ist in Abb. 36 dargestellt.

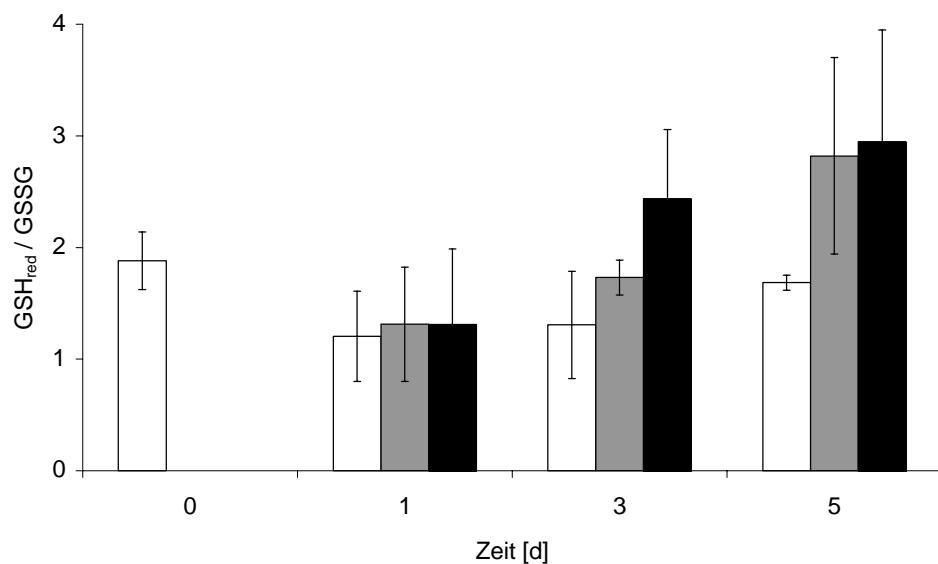


Abb. 36 GSH_{red}/GSSG-Verhältnis in *P. patens* (□ - Kontrolle, ■ - 5 µM Cd(II), ▒ - 10 µM Cd(II); n=3)

In *P. patens* wurde ein Anstieg des GSH_{red}/GSSG-Verhältnisses nach drei Tagen Cd(II)-Einwirkung beobachtet. Der prozentuale GSSG-Anteil am GSH_{ges}-Gehalt ist in Abb. 37 dargestellt.

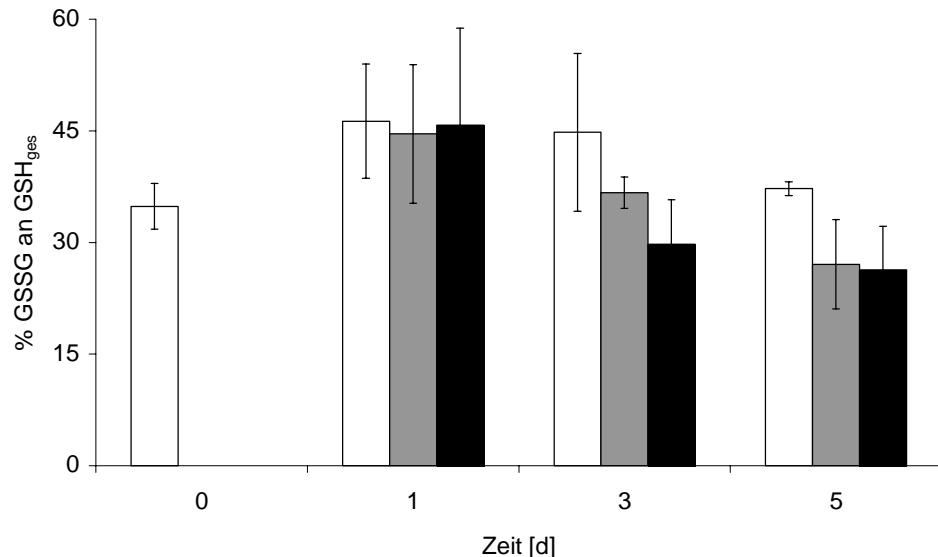


Abb. 37 Prozentualer GSSG-Anteil an GSH_{ges} in *P. patens* (□ - Kontrolle, ■ - 5 μ M Cd(II), ■ - 10 μ M Cd(II); n=3)

Bei dieser Auftragungsweise war eine Abnahme des GSSG-Anteils am GSH_{ges} bei Cd(II)-Stress erkennbar, die sich im Laufe des Experiments weiter verstärkt, aber keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle zeigt.

4.6.3 Konzentrationen von Cys und GSH der Δapr-Mutanten

Neben dem Wildtyp wurden die Cys- bzw. GSH_{ges}-Gehalte auch für die Δapr-Mutanten bestimmt. Abb. 38 zeigt die Ergebnisse für Mutante 11-3-12.

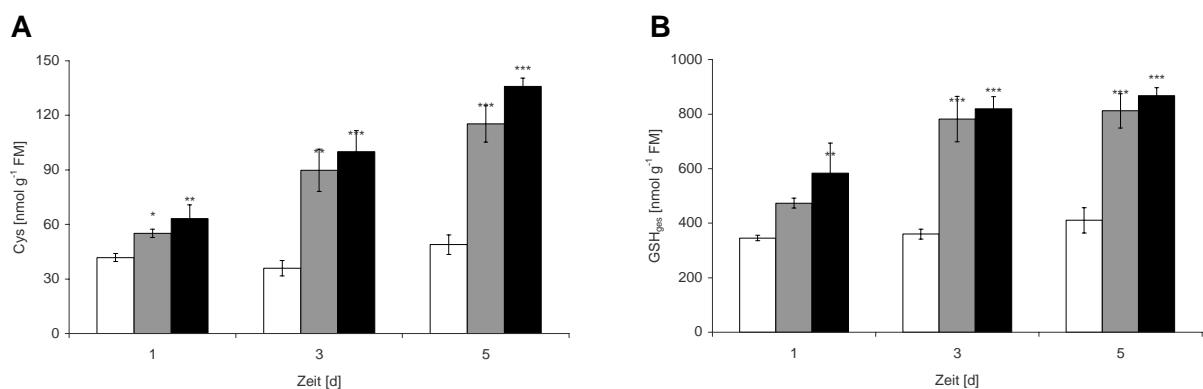


Abb. 38 Gehalt an Cystein (A) bzw. Glutathion (gesamt, B) von Δapr-Mutante 11-3-12, HPLC-Bestimmung (□ - Kontrolle, ■ - 5 μ M Cd(II), ■ - 10 μ M Cd(II); n=3)

Die Konzentrationen an Cys und GSH der 11-3-12-Mutante waren nach drei Tagen Cd(II)-Applikation mehr als doppelt so hoch im Vergleich mit den Cd(II)-freien Kontrollen. Für Cys (GSH) wurden bereits nach einem (drei) Tag(en) signifikante Unterschiede für beide Cd(II)-Konzentrationen ermittelt.

In Abb. 39 sind die Konzentrationen an Cys und GSH_{ges} für Mutante 12-4-3 dargestellt.

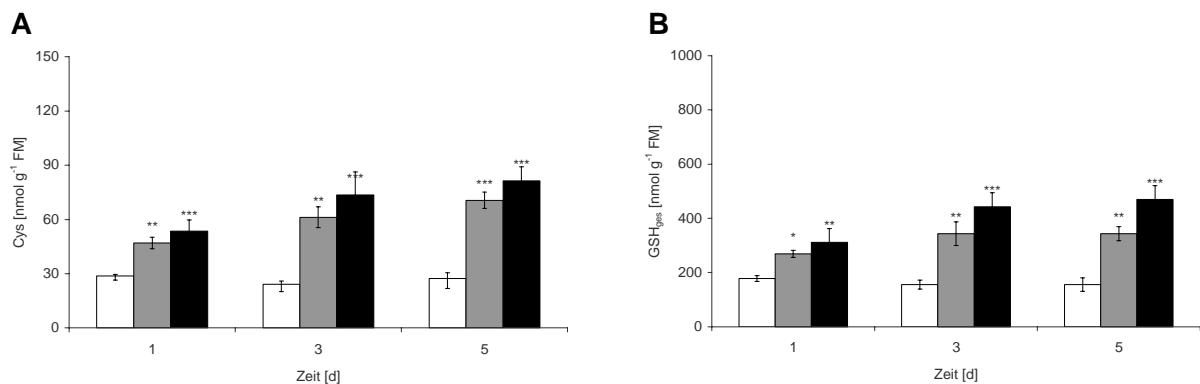


Abb. 39 Gehalt an Cystein (A) bzw. Glutathion (gesamt, B) von Δ apr-Mutante 12-4-3, HPLC-Bestimmung (□ - Kontrolle, ■ - 5 μ M Cd(II), ■■ - 10 μ M Cd(II); n=3)

Mutante 12-4-3 weist ebenfalls erhöhte Thiolgehalte nach Inkubation mit Cd(II) auf. Die Konzentrationen von Cys und GSH sind jedoch deutlich niedriger verglichen mit Mutante 11-3-12. Auch in diesem Fall wurden doppelt (5 μ M) bis dreifach (10 μ M) erhöhte Werte nach drei Tagen Cd(II)-Behandlung beobachtet.

4.6.4 Thiolkonzentrationen unter erhöhtem Sulfat-Gehalt

Da *P. patens* in Medium mit erhöhter Sulfatmenge größere Mengen Cd(II) akkumuliert als unter herkömmlichen Anzuchtbedingungen (s. 4.2.2), war die Bestimmung der Cys- bzw. GSH-Konzentrationen von Interesse. Die Cys-Werte sind in Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42 dargestellt.

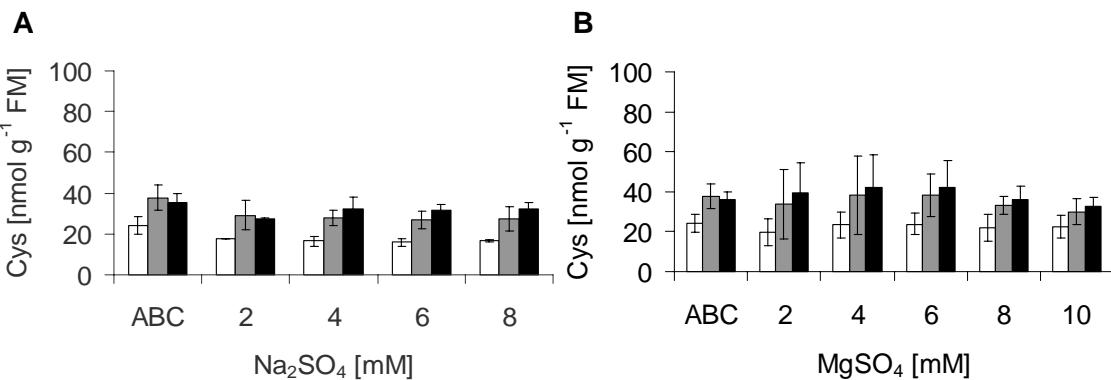


Abb. 40 Cys-Gehalte in *P. patens* in Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration im Medium nach einem Tag, (A – Na_2SO_4 , B – MgSO_4 ; □ - 0 μM Cd(II), ■ - 5 μM Cd(II); ▨ - 10 μM Cd(II); n=3)

Nach eintägigem Wachstum in Medium mit erhöhtem Sulfatgehalt waren nur geringe Unterschiede der Cys-Konzentration beim jeweiligen Vergleich der un- bzw. Cd(II)-behandelten Kulturen feststellbar (Abb. 40). Sowohl zusätzliches Na_2SO_4 als auch MgSO_4 führten nicht zu einer weiteren Zunahme des Cys-Gehaltes.

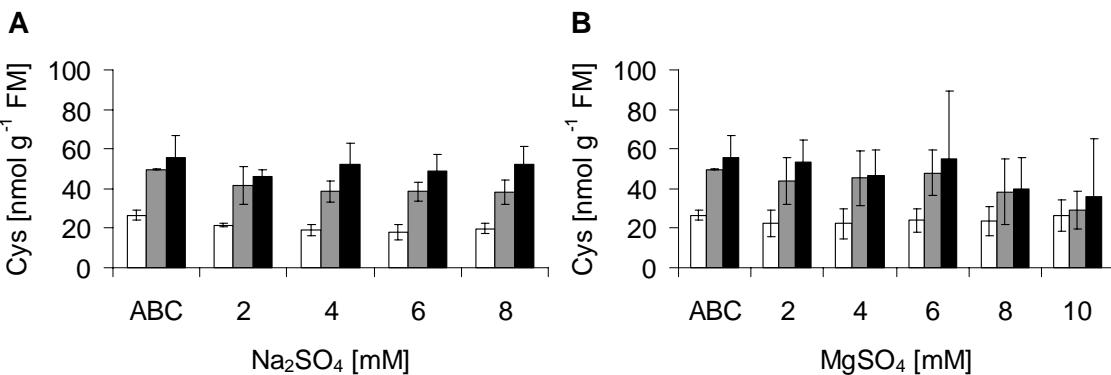


Abb. 41 Cys-Gehalte in *P. patens* in Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration im Medium nach drei Tagen, (A – Na_2SO_4 , B – MgSO_4 ; □ - 0 μM Cd(II), ■ - 5 μM Cd(II), ▨ - 10 μM Cd(II); n=3)

Auch nach drei Tagen waren kaum Differenzen zwischen den Verlauf der Cd(II)-Ansätze untereinander erkennbar (Abb. 41). Im Vergleich mit unbehandelten Kulturen war der Cys-Gehalt um etwa das Doppelte erhöht. Im Unterschied dazu wurde eine abnehmende Cys-Konzentration in den unter 8 mM bzw. 10 mM MgSO_4 angezogenen Cd(II)-Proben beobachtet.

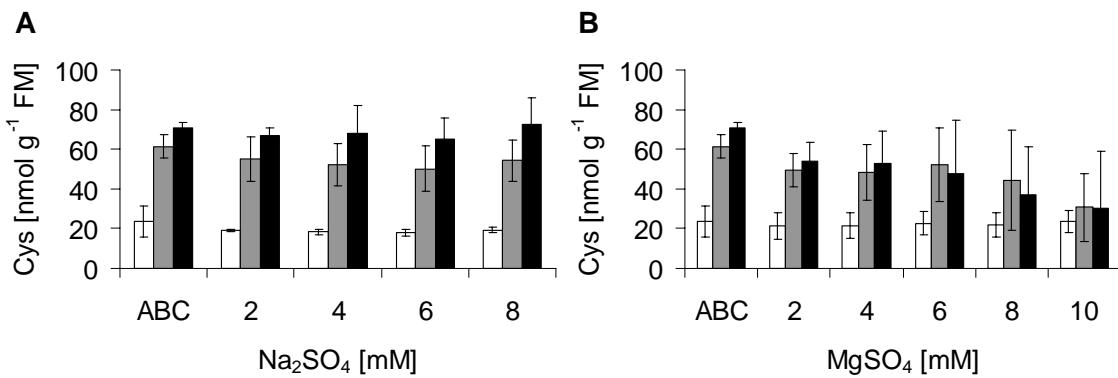


Abb. 42 Cys-Gehalte in *P. patens* in Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration im Medium nach fünf Tagen, (A – Na₂SO₄, B – MgSO₄; □ - 0 μM Cd(II), ■ - 5 μM Cd(II), ■■ - 10 μM Cd(II); n=3)

Nach fünf Tagen Versuchsdauer waren Abweichungen zwischen Na₂SO₄- und MgSO₄-Kulturen ersichtlich (Abb. 42). Während der Cys-Pool der Na₂SO₄-Proben über den gesamten Konzentrationsbereich für die Verläufe von 5 μM Cd und 10 μM konstant war, wurde bei den Cd(II)-behandelten Mg(II)-Ansätzen ein Rückgang mit zunehmender Sulfatmenge beobachtet. Bei Inkubation mit 10 mM MgSO₄ sanken die Werte auf Kontrollniveau ab.

Neben Cys wurde auch der GSH-Gehalt bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 43, Abb. 44 und Abb. 45 dargestellt.

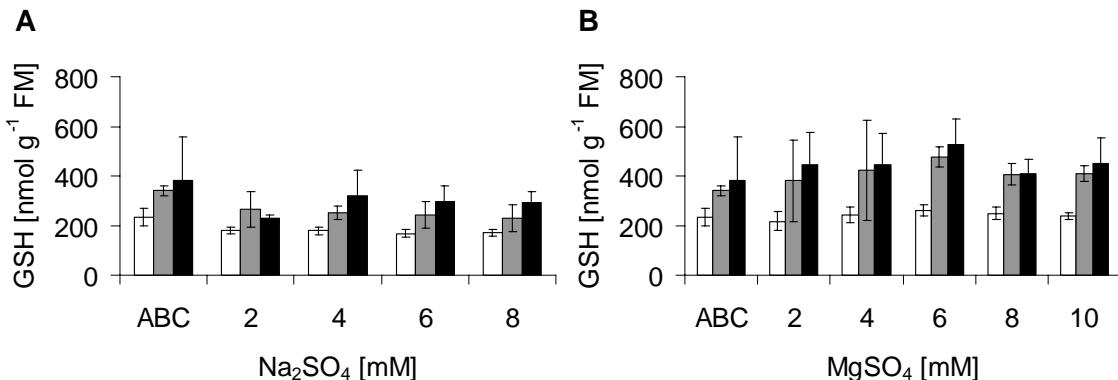


Abb. 43 GSH-Gehalte in *P. patens* in Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration im Medium nach einem Tag, (A – Na₂SO₄, B – MgSO₄; □ - 0 μM Cd(II), ■ - 5 μM Cd(II), ■■ - 10 μM Cd(II); n=3)

Im Fall von GSH waren bereits nach einem Tag Unterschiede zwischen Na₂SO₄- und MgSO₄-Behandlung sichtbar (Abb. 43). Der Verlauf des GSH-Gehaltes der Na₂SO₄-Proben blieb bei K, 5 μM Cd(II) bzw. 10 μM Cd(II) nahezu konstant. Jedoch wurde bei den mit Cd(II) behandelten MgSO₄-Ansätzen ein geringer Anstieg des GSH-Pools beobachtet, der bei 6 mM ein Maximum erreichte.

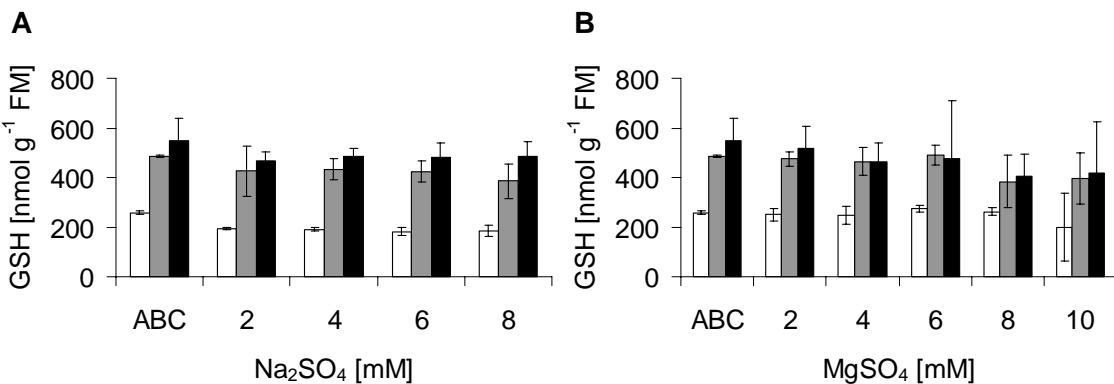


Abb. 44 GSH-Gehalte in *P. patens* in Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration im Medium nach drei Tagen, (A – Na₂SO₄, B – MgSO₄; □ - 0 µM Cd(II), ■ - 5 µM Cd(II), ■ - 10 µM Cd(II); n=3)

Nach dreitägigem Wachstum unter erhöhtem Sulfatgehalt waren nur geringe Unterschiede im Verlauf der GSH-Konzentration von K- und Cd(II)-Ansätzen erkennbar (Abb. 44).

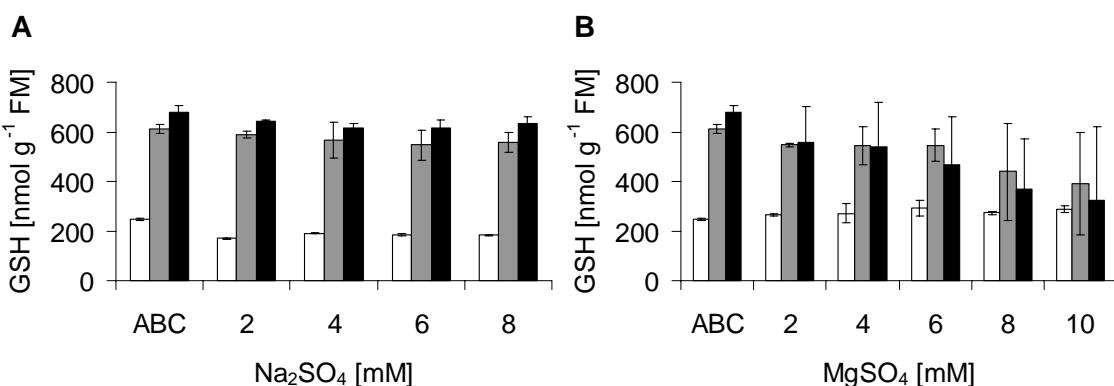


Abb. 45 GSH-Gehalte in *P. patens* in Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration im Medium nach fünf Tagen, (A – Na₂SO₄, B – MgSO₄; □ - 0 µM Cd(II), ■ - 5 µM Cd(II), ■ - 10 µM Cd(II); n=3)

Hingegen wurde fünf Tage nach Versuchsbeginn ein Rückgang des GSH-Gehaltes der Cd(II)-Kulturen mit steigender MgSO₄-Konzentration beobachtet (Abb. 45). Der Verlauf des GSH-Pools der Na₂SO₄-Ansätze war über den Konzentrationsbereich für K, 5 µM Cd(II) und 10 µM Cd(II) konstant.

4.7 OAS-TL-Reinigung

Die für *A. thaliana* etablierte Methode zur OAS-TL-Aufreinigung wurde auch bei *P. patens* angewandt. Während der Säulenelution wurde in den Fraktionen 1 bis 4 eine gelbliche Färbung beobachtet, was auf ein Vorhandensein des OAS-TL-Cofaktors Pyridoxalphosphat hindeutete.

Aufgrund der Farbstärke wurden die Fraktionen 1 und 4 bzw. 2 und 3 zu den Fraktionen 1-4 bzw. 2-3 vereint.

Zunächst wurde eine Proteinbestimmung (Tab. 10) bzw. OAS-TL-Aktivitätsanalyse (Tab. 11) von Aliquots der Aufreinigungsschritte durchgeführt.

Tab. 10 Proteinbestimmung von Aliquots der OAS-TL-Aufreinigungsschritte aus *P. patens*
BR–Bakterien-Rohextrakt, BD–Bakterien-Durchfluss, OAS-Bakt.–Elutionsfraktion der bakteriellen
OAS-TL, PR–*P. patens*-Rohextrakt, PD–*P. patens*-Durchfluss, OAS X–OAS-TL-Elutionsfraktion

	BR	BD	OAS- Bakt.	PR	PD	OAS 1-4	OAS 2-3	OAS 5	OAS 6
Protein [$\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$]	6,46	6,28	0,15	10,08	8,93	0,1	0,33	0,06	0,03

Der Proteingehalt vom Bakterien- bzw. *P. patens*-Durchfluss war geringer als der des Rohextraktes. Dies deutete auf eine Bindung von rekombinanter SAT bzw. OAS-TL-Protein aus *P. patens* an die Säule hin. Die OAS-Elutionsfraktionen 1-4 und 2-3 wiesen mit $0,1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ bzw $0,33 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ die höchste Protein-Konzentration auf.

Tab. 11 OAS-TL-Aktivitätsbestimmung von Aliquots der OAS-TL-Aufreinigungsschritte aus *P. patens* (n=3)

Fraktion	Spezifische Aktivität [U mg ⁻¹]	Gesamt-Aktivität [U]
<i>Physcomitrella</i> -Rohextrakt	$1,85 \pm 0,36$	$476,4 \pm 92,8$
<i>Physcomitrella</i> -Durchfluss	$0,42 \pm 0,02$	$105,8 \pm 4,1$
Fraktion 1-4	$203,10 \pm 9,19$	$21,5 \pm 1,0$
Fraktion 2-3	$129,45 \pm 12,88$	$46,6 \pm 4,6$

Während der Aufreinigung kam es zu einem deutlichen Verlust an OAS-TL-Enzymaktivität. Dies fällt beim Vergleich der Differenz von Rohextrakt und Durchfluss mit der Summe der Aktivität der Elutionsfraktionen auf. So betrug die Restaktivität nur noch 18,4 %, d.h. über vier Fünftel Enzymaktivität ging während der Aufarbeitung verloren.

- 1D-PAGE

Mittels 1D-PAGE (Abb. 46) war ein Überblick über den Verlauf der OAS-TL-Reinigung möglich.

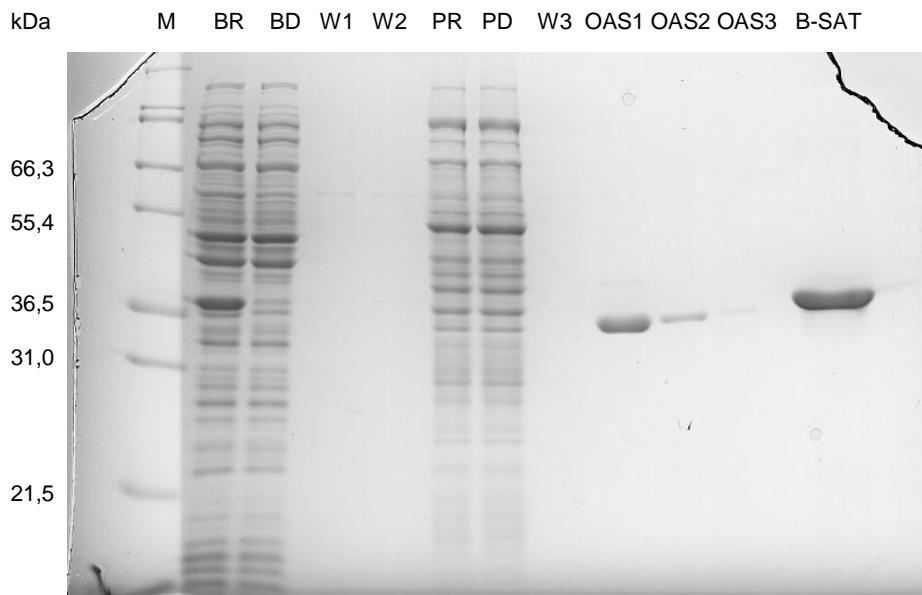


Abb. 46 Coomassie-gefärbtes 1D-Gel (11,25 %) von OAS-TL-Aufreinigungsstufen aus *P. patens*
M-Marker; BR-Bakterien-Rohextrakt, BD-Bakterien-Durchfluss, W1-3-Waschschrifte, PR-*P. patens*-Rohextrakt, PD-*P. patens*-Durchfluss, OAS1-3-OAS-TL-Elutionsfraktion 2-3 (1=1 µg, 2=200 ng, 3=50 ng), B-SAT-bakterielle SAT

Bei Gegenüberstellung des Bandenmusters von bakteriellem Rohextrakt (BR) und bakteriellem Durchfluss (BD) ist eine Intensitätsabnahme der Proteinbande über der 36,5 kDa-Markerbande ersichtlich. Dies wird durch die His-Tag-Bindung des rekombinanten SAT-Proteins an die Ni(II)-Säule verursacht. Im Gegensatz dazu ist der Vergleich von *P. patens*-Rohextrakt mit *P. patens*-Durchfluss weniger aufschlussreich. Die Färbung der OAS-TL-Elutionsfraktion 2-3 nimmt entsprechend ihrer Proteinkonzentration ab. Der Großteil von OAS-TL-Protein aus *P. patens* besitzt würdig demnach ein Molekulgewicht von ca. 34 kDa aufweisen.

- Western Blot

Mittels Western-Blot (Abb. 47) sollte untersucht werden, ob der spezifische Antikörper gegen OAS-TL A bzw. OAS-TL C aus *A. thaliana* auf die aus *P. patens* isolierten Proteine reagiert.

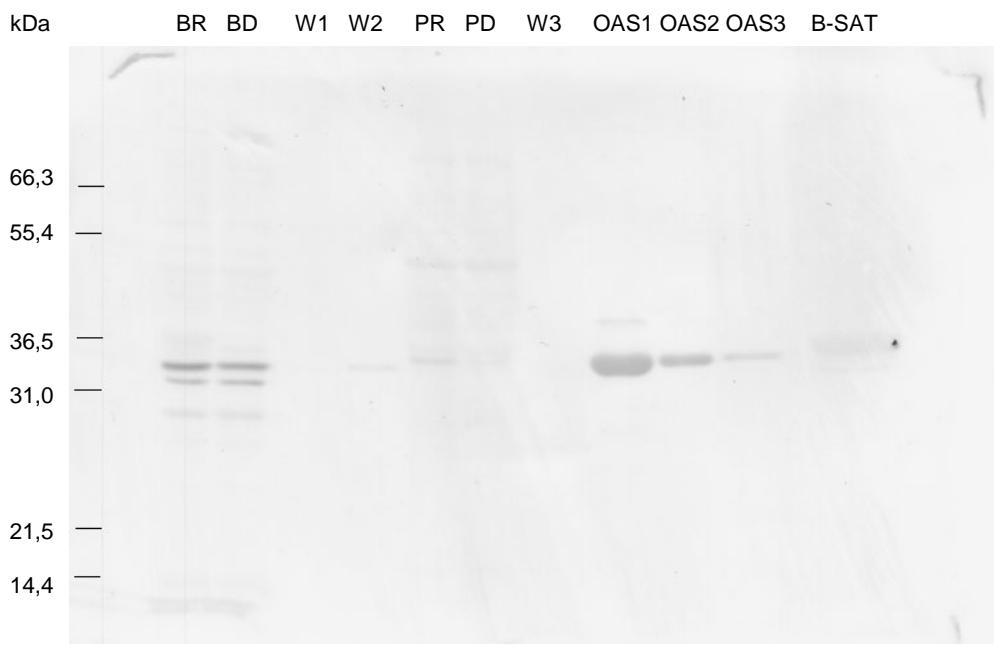


Abb. 47 Western-Blot von Aufreinigungsschritten der OAS-TL-Extraktion aus *P. patens*
BR-Bakterien-Rohextrakt, BD-Bakterien-Durchfluss, W1-3-Waschschrifte, PR-*P. patens*-Rohextrakt,
PD-*P. patens*-Durchfluss, OAS1-3-OAS-TL-Elutionsfraktion 2-3 (1=1 µg, 2=200 ng, 3=50 ng),
B-SAT-bakterielle SAT

Im Unterschied zum Coomassie-gefärbten 1D-Gel ist beim Western-Blot die Abnahme einer Proteinbande (zwischen 31 kDa- und 36,5 kDa-Marker) bei Vergleich von Rohextrakt und Durchfluss von *P. patens* erkennbar. Diese liegt auf der Höhe des Proteins, welches in der OAS-TL-Elutionsfraktion erkennbar ist. Anscheinend reagiert der Antikörper gegen AtOAS-TL A und C mit den aus *P. patens* isolierten Proteinen.

- 2D-PAGE

Die Durchführung der 2D-PAGE (Abb. 48) der Elutionsfraktion 2-3 sollte nun das Vorhandensein potentieller OAS-TL-Isoformen in *P. patens* untersuchen. Isoformen sind meist durch ein ähnliches Molekulargewicht und Unterschiede im isoelektrischen Punkt charakterisiert.

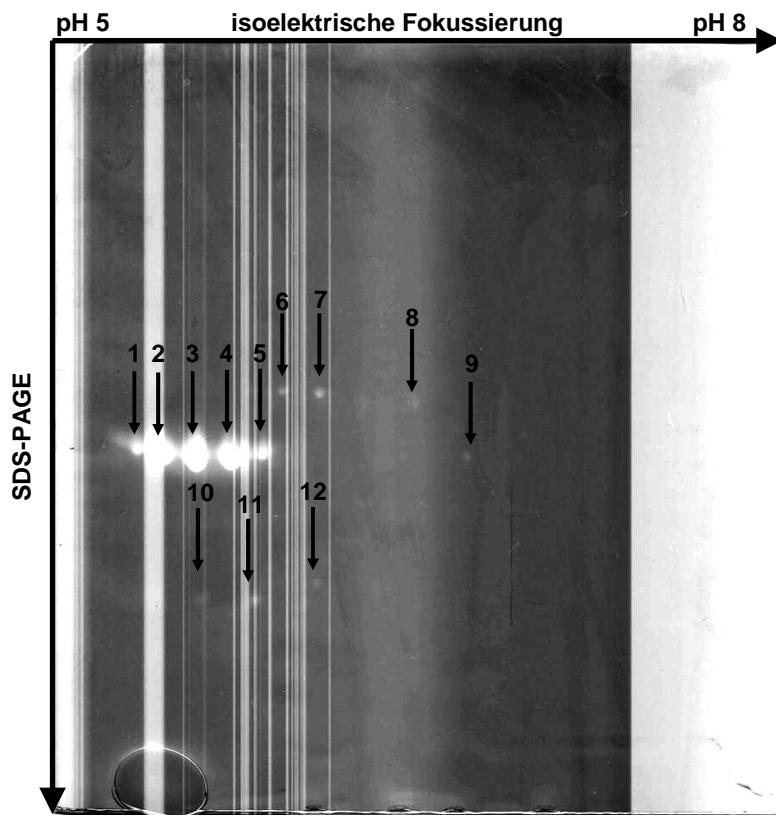


Abb. 48 Negativ eines Silber-gefärbten 2D-Gels der OAS-TL-Elutionsfraktion 2-3 aus *P. patens*, die Helligkeit und der Kontrast wurden verändert, um die schwachen Spots (8-12) besser sichtbar zu machen

Die Proteinspots 1 bis 5 könnten einer Isoform entsprechen, welche unterschiedlich modifiziert wird. Die obere Reihe (6-8) zeigt wahrscheinlich eine andere Isoform, die offenbar in geringerer Konzentration vorhanden ist. Einen Abbau von OAS-TL-Protein stellen möglicherweise die Spots 10 bis 12 dar.

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; Herbette *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 besonderen Interesse. Für diesen Zweck wurden auch Δapr-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 Glutation-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 (Mysiwa-Kurdziel *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 Stressstärken 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 fünter 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 CO₂-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 Baryla *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 & Desmet, 1975), an Plastochinonen (Baszynski *et al.*, 1980) sowie an Ferredoxin und Ferredoxin NADP⁺ Oxido-reduktasen (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 Gesamchlorophyll-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 Aufnahme 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 µM und 10 µM 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 Adoptionsmechanismen verantwortlich ist. Im Gegensatz dazu werden in der Mehrzahl der Untersuchungen die beobachteten Effekte auf die extrazellulären Cd(II)-Gehalte im Anzuchtmittel 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 Mooses 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 CdCl₂) verwendet wurden. Insgesamt wurden im Zuge der Aufarbeitung drei Fraktionen (extrazellulär, adsorbiert, intrazellulär) erhalten. Der extrazellulare 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 Cd²⁺-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 Waschschriften mit 20 mM NiCl₂ 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 erst 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. Diese Proteine werden 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 $\Delta\Delta C_T$ -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* (APR) 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-Präursors 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 SO₃²⁻ 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 CdNO₃) 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-Solís *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-Sánchez, 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 *gsh1* und *gsh2* 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* exprimierte 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 µM, 24 h) ist zweifelhaft, da in der vorliegenden Arbeit bereits eine Behandlung mit 10 µM 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 bezeichneten 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 µM: AscR, GR; 10 µM: 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 GSH_{red}/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 % ± 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 ($20 \mu\text{M}$) 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 oxidiertener 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 $0,1 \text{ mM}$ bzw. $0,5 \text{ mM}$ 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 $\Delta\text{gtt}1$ und $\Delta\text{gtt}2$ aufgeklärt werden sollten. So soll GTT2 an der Bildung des Cd-GSH-Komplexes beteiligt sein, während GTT1 für die GSH-Homöostase nötig ist. Mit $10 \mu\text{M}$ 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 GS HS 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-

ringering 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 µM) ein Rückgang der OAS-TL-Aktivität beschrieben (Astolfi *et al.*, 2004b), während Enzymassays bei *Arena sativa* (100 µM, Astolfi *et al.*, 2004a) als auch *A.thaliana* (50 µM, 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 Gelfärbung 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 posttranslationalen 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 GS HS (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 *gstI*-Gen aus *E. coli* in *B. juncea* überexprimiert. Dies hatte eine fünfach 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 µM CdCl₂ (3 d) in *Pisum sativum* eine fünfach 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-ärzmere 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-Sánchez, 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-Sánchez, 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 mBBr-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 Bindepunkte 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 (Gesamt-thiolgehalt 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. Diesselben 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 vakuolare 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.

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. Schwermetalexposition 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 ein 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 µM 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 ΔMT-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 µM 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 µM bzw. 10 µM 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 GS HS am Rohextrakt von *P. patens* zum Einsatz. Die Ergebnisse bestätigten die für γ-ECS und GS HS 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.

7 Literatur

- ADAMIS, P. D., GOMES, D. S., PINTO, M. L., PANEK, A. D. & ELEUTHERIO, E. C. (2004). The role of glutathione transferases in cadmium stress. — *Toxicology Letters* 154, 81-88.
- AL-ASHEH, S. & DUVNJAK, Z. (1997). Adsorption of metal ions by moss. — *Advances in Environmental Research* 1, 194-212.
- ALLOWAY, B. J. (1999). Vorgänge in Böden und das Verhalten von Schwermetallen. — In: Schwermetalle in Böden: Analytik, Konzentration, Wechselwirkungen (B. J. Alloway, Hrsg.), Berlin, Heidelberg, New York.
- ANDERSON, M. E. (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. — *Methods in Enzymology* 113, 548 - 555.
- ARISI, A.-C. M., NOCTOR, G., FOYER, C. H. & JOUANIN, L. (1997). Modification of thiol contents in poplars (*Populus tremula* × *P. alba*) overexpressing enzymes involved in glutathione synthesis. — *Planta* 203, 362-372.
- ASTOLFI, S., ZUCHI, S. & PASSERA, C. (2004a). Effects of cadmium on the metabolic activity of *Avena sativa* plants grown in soil or hydroponic culture. — *Biologia Plantarum* 48, 413-418.
- ASTOLFI, S., ZUCHI, S. & PASSERA, C. (2004b). Role of sulphur availability on cadmium-induced changes of nitrogen and sulphur metabolism in maize (*Zea mays* L.) leaves. — *Journal of Plant Physiology* 161, 795-802.
- BALAKHNINA, T. I., KOSOBRYUKHOV, A. A., IVANOV, A. A. & KRESLAVSKII, V. D. (2005). The effect of cadmium on CO₂ exchange, variable fluorescence of chlorophyll, and the level of antioxidant enzymes in pea leaves. — *Russian Journal of Plant Physiology* 52, 15-20.
- BARYLA, A., CARRIER, P., FRANCK, F., COULOMB, C., SAHUT, C. & HAVAUX, M. (2001). Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. — *Planta* 212, 696-709.
- BASZYNSKI, T., WAJDA, L., KROL, M., WOLINSKA, D., KRUPA, Z. & TUKENDORF, A. (1980). Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. — *Physiologia Plantarum* 48, 365-370.
- BELLION, M., COURBOT, M., JACOB, C., BLAUDEZ, D. & CHALOT, M. (2006). Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. — *FEMS Microbiology Letters* 254, 173-181.
- BENAVIDES, M. P., GALLEGOS, S. M. & TOMARO, M. L. (2005). Cadmium toxicity in plants. — *Brasilian Journal of Plant Physiology* 17, 21-34.
- BERKOWITZ, O., WIRTZ, M., WOLF, A., KUHLMANN, J. & HELL, R. (2002). Use of biomolecular interaction analysis to elucidate the regulatory mechanism of the cysteine synthase complex from *Arabidopsis thaliana*. — *Journal of Biological Chemistry* 277, 30629-30634.
- BERTRAND, M. & POIRIER, I. (2005). Photosynthetic organisms and excess of metals. — *Photosynthetica* 43, 345-353.
- BINZ, P.-A. & KÄGI, J. H. R. (1999). Metallothionein: Molecular evolution and classification. — In: Metallothionein IV (C. Klaasen, Hrsg.). Birkhäuser, Basel, S. 7-13.
- BISHNOI, N. R., SHEORAN, I. S. & SINGH, R. (1993). Influence of Cadmium and Nickel on Photosynthesis and Water Relations in Wheat Leaves of Different Insertion Level. — *Photosynthetica* 28, 473-479.
- BLACKWELL, K. J., TOBIN, J. M. & AVERY, S. V. (1998). Manganese toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: dependence on intracellular and extracellular magnesium concentrations. — *Applied Microbiology and Biotechnology* 49, 751-757.
- BLEUEL, C., WESENBERG, D., SUTTER, K., MIERSCH, J., BRAHA, B., BÄRLOCHER, F. & KRAUSS, G.-J. (2005). The use of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. as a bioindicator for heavy metals: 3. Cd²⁺ accumulation capacities and biochemical stress response of two *Fontinalis* species. — *Science of The Total Environment* 345, 13-21.

- BORSANI, O., VALPUESTA, V. & BOTELLA, M. A. (2001). Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. — *Plant Physiology* 126, 1024-1030.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. — *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- BRAHA, B. (2004). Physiologisch-biochemische Charakterisierung schwermetallinduzierter Reaktionen des aquatischen Hyphomyceten *Heliscus lugdunensis* (Teleomorph: *Nectria lugdunensis*). — Dissertation, Martin-Luther-Universität.
- BREUER, K. & MELZER, A. (1990). Heavy metal accumulation (lead, cadmium) and ion exchange in three species of *Sphagnaceae* I. Main principles of heavy metal accumulation in *Sphagnaceae*. — *Oecologia* 82, 461-467.
- BRINZEZU, K., LICHTENBERGER, O., LEOPOLD, I. & NEUMANN, D. (1999). Heavy metal tolerance of *Silene vulgaris*. — *Journal of Plant Physiology* 154, 536-546.
- BRUNOLD, C., RÜEGSEGGER, A. & BRÄNDLE, R., Hrsg. (1996). Stress bei Pflanzen: Ökologie, Physiologie, Biochemie, Molekularbiologie. — UTB Verlag für Wissenschaft, Bern, Stuttgart, Wien.
- BRUNS, I. (1998). Induktion thiolhaltiger Peptide im Wassermos *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. unter Schwermetalleinfluß und deren Nutzung als Biomarker für Schwermetallbelastungen aquatischer Systeme. — Dissertation, Martin-Luther-Universität.
- BRUNS, I., SUTTER, K., MENGE, S., NEUMANN, D. & KRAUSS, G.-J. (2001). Cadmium lets increase the glutathione pool in bryophytes. — *Journal of Plant Physiology* 158, 79-89.
- BRZYWCZY, J., SIENKO, M., KUCHARSKA, A. & PASZEWSKI, A. (2002). Sulphur amino acid synthesis in *Schizosaccharomyces pombe* represents a specific variant of sulphur metabolism in fungi. — *Yeast* 19, 29-35.
- BUSTIN, S. A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. — *Journal of Molecular Endocrinology* 29, 23-39.
- CALLAHAN, D. L., BAKER, A. J. M., KOLEV, S. D. & WEDD, A. G. (2006). Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. — *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 11, 2-12.
- CENCI, R. M. (2001). The use of aquatic moss (*Fontinalis antipyretica*) as monitor of contamination in standing and running waters: limits and advantages. — *Journal of Limnology* 60, 53-61.
- CHEN, J. & GOLDSBROUGH, P. B. (1994). Increased Activity of γ -Glutamylcysteine Synthetase in Tomato Cells Selected for Cadmium Tolerance. — *Plant Physiology* 106, 233-239.
- CHO, S., HOANG, Q., KIM, Y., SHIN, H., OK, S., BAE, J. & SHIN, J. (2006). Proteome analysis of gametophores identified a metallothionein involved in various abiotic stress responses in *Physcomitrella patens*. — *Plant Cell Reports* 25, 475-488.
- CLEMENS, S. (2002). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. — *Planta* 212, 475-486.
- CLEMENS, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. — *Biochimie* 88, 1707-1719.
- CLEMENS, S., SCHROEDER, J. I. & DEGENKOLB, T. (2001). *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. — *European Journal of Biochemistry* 268, 3640-3643.
- CLEMENS, S. & SIMM, C. (2003). *Schizosaccharomyces pombe* as a model for metal homeostasis in plant cells: The phytochelatin-dependent pathway is the main cadmium detoxification mechanism. — *New Phytologist* 159, 323-330.
- CLEMENS, S., SIMM, C. & MAIER, T. (2003). Heavy metal-binding proteins and peptides. — In: Polyamides and complex proteinaceous materials II (S. Fahnstock & A. Steinbüchel, Hrsg.). Wiley-VCH, Weinheim, S. 255-288.

- COBBETT, C. & GOLDSBROUGH, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. — Annual Review of Plant Biology 53, 159-182.
- COLANGELO, E. P. & GUERINOT, M. L. (2006). Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. — Current Opinion in Plant Biology 9, 322-330.
- CORTICEIRO, S. C., LIMA, A. I. G. & FIGUEIRA, E. M. D. A. P. (2006). The importance of glutathione in oxidative status of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* under Cd exposure. — Enzyme and Microbial Technology 40, 132-137.
- COURBOT, M., DIEZ, L., RUOTOLO, R., CHALOT, M. & LEROY, P. (2004). Cadmium-responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. — Applied and Environmental Microbiology 70, 7413-7.
- COVE, D., BEZANILLA, M., HARRIES, P. & QUATRANO, R. (2006). Mosses as Model Systems for the Study of Metabolism and Development. — Annual Review of Plant Biology 57, 497-520.
- DAS, P., SAMANTARAY, S. & ROUT, G. R. (1997). Studies on cadmium toxicity in plants: A review. — Environmental Pollution 98, 29-36.
- DAS, S. & JANA, B. B. (2004). Distribution pattern of ambient cadmium in wetland ponds distributed along an industrial complex. — Chemosphere 55, 175-185.
- DIETZ, K.-J. (2005). Plant thiol enzymes and thiol homeostasis in relation to thiol-dependent redox regulation and oxidative stress. — In: Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants (N. Smirnoff, Hrsg.). Blackwell Publishing Ltd., Oxford, S. 25-52.
- DIXON, D. P., LAPTHORN, A. & EDWARDS, R. (2002). Plant glutathione transferases. — Genome Biology 3, 3004.1-3004.10.
- DOMENECH, J., MIR, G., HUGUET, G., CAPDEVILA, M., MOLINAS, M. & ATRIAN, S. (2006). Plant metallothionein domains: functional insight into physiological metal binding and protein folding. — Biochimie 88, 583-593.
- DOMINGUEZ-SOLIS, J. R., GUTIERREZ-ALCALA, G., ROMERO, L. C. & GOTOR, C. (2001). The cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance. — Journal of Biological Chemistry 276, 9297-9302.
- DOMÍNGUEZ-SOLÍS, J. R., LÓPEZ-MARTÍN, M. C., AGER, F. J., YNSA, M. D., ROMERO, L. C. & GOTOR, C. (2004). Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*. — Plant Biotechnology Journal 2, 469-476.
- ERNST, W. H. O. (2005). Phytoextraction of mine wastes - Options and impossibilities. — Chemie Der Erde-Geochemistry 65, 29-42.
- FALLER, P., KIENZLER, K. & KRIEGER-LISZKAY, A. (2005). Mechanism of Cd²⁺ toxicity: Cd²⁺ inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca²⁺ site. — Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics 1706, 158-164.
- FAUCHON, M., LAGNIEL, G., AUDE, J. C., LOMBARDIA, L., SOULARUE, P., PETAT, C., MARGUERIE, G., SENTENAC, A., WERNER, M. & LABARRE, J. (2002). Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. — Molecular Cell 9, 713-723.
- FERNANDEZ, J. A., VAZQUEZ, M. D., LOPEZ, J. & CARBALLEIRA, A. (2006). Modelling the extra and intracellular uptake and discharge of heavy metals in *Fontinalis antipyretica* transplanted along a heavy metal and pH contamination gradient. — Environmental Pollution 139, 21-31.
- FINNEY, L. A. & O'HALLORAN, T. V. (2003). Transition metal speciation in the cell: Insights from the chemistry of metal ion receptors. — Science 300, 931-936.
- FOYER, C. H., GOMEZ, L. D. & HERDEN, P. D. R. v. (2005). Glutathione. — In: Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants (N. Smirnoff, Hrsg.). Blackwell Publishing Ltd., Oxford, S. 1-24.
- FOYER, C. H., LELANDAIS, M. & KUNERT, K. J. (1994). Photooxidative stress in plants. — Physiologia Plantarum 92, 696-717.

- FREY, W., FRAHM, J.-P., FISCHER, E. & LOBIN, W. (1995). Moos- und Farnpflanzen. — In: Kleine Kryptogamenflora (H. Gams, Hrsg.). Fischer-Verlag, Stuttgart.
- GACHON, C., MINGAM, A. & CHARRIER, B. (2004). Real-time PCR: what relevance to plant studies? — *Journal of Experimental Botany* 55, 1445-1454.
- GADAPATI, W. R. & MACFIE, S. M. (2006). Phytochelatins are only partially correlated with Cd-stress in two species of *Brassica*. — *Plant Science* 170, 471-480.
- GAITONDE, M. K. (1967). A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. — *Biochemical Journal* 104, 627-633.
- GARNIER, L., SIMON-PLAS, F., THULEAU, P., AGNEL, J. P., BLEIN, J. P., RANJEVA, R. & MONTILLET, J. L. (2006). Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. — *Plant Cell and Environment* 29, 1956-1969.
- GJENGEDAL, E. & STEINNES, E. (1990). Uptake of metal ions in moss from artificial precipitation. — *Environmental Monitoring and Assessment* 14, 77-87.
- HA, S.-B., SMITH, A. P., HOWDEN, R., DIETRICH, W. M., BUGG, S., O'CONNELL, M. J., GOLDSBROUGH, P. B. & COBBETT, C. S. (1999). Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. — *Plant Cell* 11, 1153-1164.
- HAAG-KERWER, A., SCHAFER, H. J., HEISS, S., WALTER, C. & RAUSCH, T. (1999). Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. — *Journal of Experimental Botany* 50, 1827-1835.
- HABIG, W. H., PABST, M. J. & JAKOBY, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. — *Journal of Biological Chemistry* 249, 7130-7139.
- HALL, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. — *Journal of Experimental Botany* 53, 1-11.
- HALL, J. L. & WILLIAMS, L. E. (2003). Transition metal transporters in plants. — *Journal of Experimental Botany* 54, 2601-2613.
- HAMER, D. H. (1986). Metallothionein. — *Annual Review of Biochemistry* 55, 913-951.
- HANIKENNE, M., MOTTE, P., WU, M. C. S., WANG, T., LOPPES, R. & MATAGNE, R. F. (2005). A mitochondrial half-size ABC transporter is involved in cadmium tolerance in *Chlamydomonas reinhardtii*. — *Plant Cell and Environment* 28, 863-873.
- HARADA, E., KUSANO, T. & SANO, H. (2000). Differential expression of genes encoding enzymes involved in sulfur assimilation pathways in response to wounding and jasmonate in *Arabidopsis thaliana*. — *Journal of Plant Physiology* 156, 272-276.
- HARADA, E., YAMAGUCHI, Y., KOIZUMI, N. & HIROSHI, S. (2002). Cadmium stress induces production of thiol compounds and transcripts for enzymes involved in sulfur assimilation pathways in *Arabidopsis*. — *Journal of Plant Physiology* 159, 445-448.
- HASSAN, M. J., SHAO, G. S. & ZHANG, G. P. (2005). Influence of cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activity in rice cultivars with different grain cadmium accumulation. — *Journal of Plant Nutrition* 28, 1259-1270.
- HAWKESFORD, M. J., BUCHNER, P., HOPKINS, L. & HOWARTH, J. R. (2003). Sulphate uptake and transport. — In: *Sulphur in Plants* (Y. P. Abrol & A. Ahmad, Hrsg.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, S. 71-86.
- HAWKESFORD, M. J. & DE KOK, L. J. (2006). Managing sulphur metabolism in plants. — *Plant Cell and Environment* 29, 382-395.
- HEINTZ, D., WURTZ, V., HIGH, A. A., VAN DORSEL, A., RESKI, R. & SARNIGHAUSEN, E. (2004). An efficient protocol for the identification of protein phosphorylation in a seedless plant, sensitive enough to detect members of signalling cascades. — *Electrophoresis* 25, 1149-1159.

- HEISS, S., SCHAFER, H. J., HAAG-KERWER, A. & RAUSCH, T. (1999). Cloning sulfur assimilation genes of *Brassica juncea* L.: cadmium differentially affects the expression of a putative low-affinity sulfate transporter and isoforms of ATP sulfurylase and APS reductase. — Plant Molecular Biology 39, 847-857.
- HELL, R. (1997). Molecular physiology of plant sulfur metabolism. — Planta 202, 138-148.
- HELL, R. (2002). Der assimilatorische Schwefelstoffwechsel in Pflanzen. — Biospektrum 3, 248-251.
- HELL, R. & BERGMANN, L. (1990). γ -Glutamylcysteine synthetase in higher plants: Catalytic properties and subcellular localization. — Planta 180, 603-612.
- HERBETTE, S., TACONNAT, L., HUGOUIVIEUX, V., PIETTE, L., MAGNIETTE, M. L., CUINE, S., AUROY, P., RICHAUD, P., FORESTIER, C., BOURGUIGNON, J., RENOU, J. P., VAVASSEUR, A. & LEONHARDT, N. (2006). Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots. — Biochimie 88, 1751-1765.
- HERSCHBACH, C. & RENNENBERG, H. (1994). Influence of Glutathione (Gsh) on Net Uptake of Sulfate and Sulfate Transport in Tobacco Plants. — Journal of Experimental Botany 45, 1069-1076.
- HESSE, H., NIKIFOROV, V., GAKIERE, B. & HOEGEN, R. (2004). Molecular analysis and control of cysteine biosynthesis: Integration of nitrogen and sulphur metabolism. — Journal of Experimental Botany 55, 1283-1292.
- HIRAI, M. Y., FUJIWARA, T., AWAZUHARA, M., KIMURA, T., NOJI, M. & SAITO, K. (2003). Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA macroarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. — The Plant Journal 33, 651-663.
- HIRAI, M. Y., KLEIN, M., FUJIKAWA, Y., YANO, M., GOODENOWE, D. B., YAMAZAKI, Y., KANAYA, S., NAKAMURA, Y., KITAYAMA, M., SUZUKI, H., SAKURAI, N., SHIBATA, D., TOKUHISA, J., REICHELT, M., GERSHENZON, J., PAPENBROCK, J. & SAITO, K. (2005). Elucidation of gene-to-gene and metabolite-to-gene networks in *Arabidopsis* by integration of metabolomics and transcriptomics. — Journal of Biological Chemistry 280, 25590-25595.
- HOWARTH, J. R., DOMÍNGUEZ-SOLÍS, J. R., GUTIÉRREZ-ALCALÁ, G., WRAY, J. L., ROMERO, L. C. & GOTOR, C. (2003). The serine acetyltransferase gene family in *Arabidopsis thaliana* and the regulation of its expression by cadmium. — Plant Molecular Biology 51, 589-598.
- HUMBECK, K., QUAST, S. & KRUPINSKA, K. (1996). Functional and molecular changes in the photosynthetic apparatus during senescence of flag leaves from field-grown barley plants. — Plant Cell and Environment 19, 337-344.
- IMAIZUMI, T., KADOTA, A., HASEBE, M. & WADA, M. (2002). Cryptochrome light signals control development to suppress auxin sensitivity in the moss *Physcomitrella patens*. — Plant Cell 14, 373-386.
- JACK, E., HAKVOORT, H. W. J., REUMER, A., VERKLEIJ, J. A. C., SCHAT, H. & ERNST, W. H. O. (2007). Real-time PCR analysis of metallothionein-2b expression in metallocolous and non-mettocolous populations of *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. — Environmental and Experimental Botany 59, 84-91.
- JACOB, C., KNIGHT, I. & WINYARD, P. G. (2006). Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways. — Biological Chemistry 387, 1385-1397.
- JAECKEL, P., KRAUSS, G., MENGE, S., SCHIERHORN, A., RÜCKNAGEL, P. & KRAUSS, G.-J. (2005). Cadmium induces a novel metallothionein and phytochelatin 2 in an aquatic fungus. — Biochemical and Biophysical Research Communications 333, 150-155.
- JEZ, J. M., CAHOON, R. E. & CHEN, S. X. (2004). *Arabidopsis thaliana* glutamate-cysteine ligase - Functional properties, kinetic mechanism, and regulation of activity. — Journal of Biological Chemistry 279, 33463-33470.

- JOST, R., BERKOWITZ, O., WIRTZ, M., HOPKINS, L., HAWKESFORD, M. J. & HELL, R. (2000). Genomic and functional characterization of the OAS gene family encoding O-acetylserine (thiol) lyases, enzymes catalyzing the final step in cysteine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. — *Gene* 253, 237-247.
- KANDLBINDER, A., FINKEMEIER, I., WORMUTH, D., HANITSCH, M. & DIETZ, K.-J. (2004). The antioxidant status of photosynthesizing leaves under nutrient deficiency: redox regulation, gene expression and antioxidant activity in *Arabidopsis thaliana*. — *Physiologia Plantarum* 120, 63-73.
- KANETA, M., HIKICHI, H., ENDO, S. & SUGIYAMA, N. (1986). Chemical Form of Cadmium (and Other Heavy-Metals) in Rice and Wheat Plants. — *Environmental Health Perspectives* 65, 33-37.
- KLAPHECK, S., FLIEGNER, W. & ZIMMER, I. (1994). Hydroxymethyl-phytochelatins [γ -glutamylcysteine]_n-serine] are metal-induced peptides of the Poaceae. — *Plant Physiology* 104, 1325-1332.
- KLAPHECK, S., SCHLUNZ, S. & BERGMANN, L. (1995). Synthesis of phytochelatins and homo-phytochelatins in *Pisum sativum* L. — *Plant Physiology* 107, 515-521.
- KNIGHT, C. D., COVE, D. J., BOYD, P. J. & ASHTON, N. W. (1988). *Methods in Bryology*, Mainz, Germany.
- KOPRIVA, S. (2006). Regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis* and beyond. — *Annals of Botany* 97, 479-495.
- KOPRIVA, S., MUHEIM, R., KOPRIVOVÁ, A., TRACHSEL, N., CATALANO, C., SUTER, M. & BRUNOLD, C. (1999). Light regulation of assimilatory sulphate reduction in *Arabidopsis thaliana*. — *The Plant Journal* 20, 37-44.
- KOPRIVA, S. & RENNENBERG, H. (2004). Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: Interaction with N and C metabolism. — *Journal of Experimental Botany* 55, 1831-1842.
- KOPRIVA, S., WIEDEMANN, G. & RESKI, R. (2006). Sulfur assimilation in lower plants: Surprising lessons from *Physcomitrella*. — Vortrag, Symposium 4th - 7th October, Sulfur-containing defence compounds: Pivotal players in plant stress tolerance.
- KOPRIVOVÁ, A., MEYER, A. J., SCHWEEN, G., HERSCHBACH, C., RESKI, R. & KOPRIVA, S. (2002). Functional knockout of the adenosine 5'-phosphosulfate reductase gene in *Physcomitrella patens* revives an old route of sulfate assimilation. — *Journal of Biological Chemistry* 277, 32195-32201.
- KOPRIVOVÁ, A., SUTER, M., DEN CAMP, R. O., BRUNOLD, C. & KOPRIVA, S. (2000). Regulation of sulfate assimilation by nitrogen in *Arabidopsis*. — *Plant Physiology* 122, 737-746.
- KRÄMER, U., COTTER-HOWELLS, J. D., CHARNOCK, J. M., BAKER, A. J. M. & SMITH, J. A. C. (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. — *Nature* 379, 29-35.
- KRUPA, Z. (1988). Cadmium-induced changes in the composition and structure of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex-II in radish cotyledons. — *Physiologia Plantarum* 73, 518-524.
- KRUPA, Z., OQUIST, G. & HUNER, N. P. A. (1993). The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* - A fluorescence analysis. — *Physiologia Plantarum* 88, 626-630.
- KUBOTA, H., SATO, K., YAMADA, T. & MAITANI, T. (2000). Phytochelatin homologs induced in hairy roots of horseradish. — *Phytochemistry* 53, 239-245.
- KÜPPER, H., KÜPPER, F. & SPILLER, M. (1998). In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. — *Photosynthesis Research* 58, 123-133.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. — *Nature* 227, 680-685.

- LANE, T. W. & MOREL, F. M. M. (2000). A biological function for cadmium in marine diatoms. — Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 4627-4631.
- LANE, T. W., SAITO, M. A., GEORGE, G. N., PICKERING, I. J., PRINCE, R. C. & MOREL, F. M. M. (2005). A cadmium enzyme from a marine diatom. — Nature 435, 42.
- LAPPARTIENT, A. G. & TOURAIN, B. (1996). Demand-driven control of root ATP sulfurylase activity and SO_4^{2-} uptake in intact canola (The role of phloem-translocated glutathione). — Plant Physiology 111, 147-157.
- LAPPARTIENT, A. G., VIDMAR, J. J., LEUSTEK, T., GLASS, A. D. M. & TOURAIN, B. (1999). Inter-organ signaling in plants: Regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound. — Plant Journal 18, 89-95.
- LEUSTEK, T., MARTIN, M. N., BICK, J.-A. & DAVIES, J. P. (2000). Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. — Annual Review of Plant Biology 51, 141-165.
- LEUSTEK, T. & SAITO, K. (1999). Sulfate transport and assimilation in plants. — Plant Physiology 120, 637-644.
- LI, Z.-S., LU, Y.-P., ZHEN, R.-G., SZCZYPKA, M., THIELE, D. J. & REA, P. A. (1997). A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. — Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 42-47.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. — Methods 25, 402-408.
- LORENZ, S., TINTELNOT, S., RESKI, R. & DECKER, E. L. (2003). Cyclin D-knockout uncouples developmental progression from sugar availability. — Plant Molecular Biology 53, 227-236.
- LUGON-MOULIN, N., ZHANG, M., GADANI, F., ROSSI, L., KOLLER, D., KRAUSS, M. & WAGNER, G. J. (2004). Critical review of the science and options for reducing cadmium in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and other plants. — Advances in Agronomy, Vol 83 83, 111-180.
- MA, J. F., RYAN, P. R. & DELHAIZE, E. (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. — Trends in Plant Science 6, 273-278.
- MA, J. F., ZHENG, S. J., MATSUMOTO, H. & HIRADATE, S. (1997). Detoxifying aluminium with buckwheat. — Nature 390, 569-570.
- MAITANI, T., KUBOTA, H., SATO, K. & YAMADA, T. (1996). The composition of metals bound to class III metallothionein (Phytochelatin and Its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. — Plant Physiology 110, 1145-1150.
- MARRS, K. A. & WALBOT, V. (1997). Expression and RNA splicing of the maize glutathione S-transferase Bronze2 gene is regulated by cadmium and other stresses. — Plant Physiology 113, 93-102.
- MARSCHALL, M. & PROCTOR, M. C. F. (2004). Are bryophytes shade plants? Photosynthetic light responses and proportions of chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids. — Annals of Botany 94, 593-603.
- MARTINS, R. J. E., PARDO, R. & BOAVENTURA, R. A. R. (2004). Cadmium(II) and zinc(II) adsorption by the aquatic moss *Fontinalis antipyretica*: Effect of temperature, pH and water hardness. — Water Research 38, 693-699.
- MAUGHAN, S. & FOYER, C. H. (2006). Engineering and genetic approaches to modulating the glutathione network in plants. — Physiologia Plantarum 126, 382-397.
- MAYWALD, F. & WEIGEL, H. J. (1997). Zur Biochemie und Molekularbiologie der Schwermetallaufnahme und -speicherung bei höheren Pflanzen (Biochemistry and Molecular Biology of Heavy Metal Accumulation in Higher Plants). — Landbauforschung Volkenrode 47, 103-126.

- MCDOWELL, J. M., HUANG, S. R., MCKINNEY, E. C., AN, Y. Q. & MEAGHER, R. B. (1996). Structure and evolution of the actin gene family in *Arabidopsis thaliana*. — Genetics 142, 587-602.
- MCGRATH, S. P., KNIGHT, B., KILLHAM, K., PRESTON, S. & PATON, G. I. (1999). Assessment of the toxicity of metals in soils amended with sewage sludge using a chemical speciation technique and a lux-based biosensor. — Environmental Toxicology and Chemistry 18, 659-663.
- MCMAHON, P. J. & ANDERSON, J. W. (1998). Preferential allocation of sulphur into γ -glutamylcysteinyl peptides in wheat plants grown at low sulphur nutrition in the presence of cadmium. — Physiologia Plantarum 104, 440-448.
- MENDOZA-CÓZATL, D., LOZA-TAVERA, H., HERNÁNDEZ-NAVARRO, A. & MORENO-SÁNCHEZ, R. (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. — FEMS Microbiology Reviews 29, 653-671.
- MENDOZA-CÓZATL, D. G. & MORENO-SÁNCHEZ, R. (2006). Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. Pathway modeling for plants. — Journal of Theoretical Biology 238, 919-936.
- MEUWLY, P. & RAUSER, W. E. (1992). Alteration of thiol pools in roots and shoots of maize seedlings exposed to cadmium. Adaptation and developmental cost. — Plant Physiology 99, 8-15.
- MEUWLY, P., THIBAUT, P., SCHWAN, A. L. & RAUSER, W. E. (1995). Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. — Plant Journal 7, 391-400.
- MISHRA, S., SRIVASTAVA, S., TRIPATHI, R. D., GOVINDARAJAN, R., KURIAKOSE, S. V. & PRASAD, M. N. V. (2006). Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. — Plant Physiology and Biochemistry 44, 25-37.
- MITTMANN, F., BRUCKER, G., ZEIDLER, M., REPP, A., ABTS, T., HARTMANN, E. & HUGHES, J. (2004). Targeted knockout in *Physcomitrella* reveals direct actions of phytochrome in the cytoplasm. — Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 13939-13944.
- MIZUNO, T., USUI, K., HORIE, K., NOSAKA, S., MIZUNO, N. & OBATA, H. (2005). Cloning of three ZIP/NRAMP transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their Ni²⁺-transport abilities. — Plant Physiology and Biochemistry 43, 793-801.
- MOMOSE, Y. & IWASHI, H. (2001). Bioassay of cadmium using a DNA microarray: Genome-wide expression patterns of *Saccharomyces cerevisiae* response to cadmium. — Environmental Toxicology and Chemistry 20, 2353-2360.
- MOONS, A. (2003). Osgtu3 and osgtu4, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots. — FEBS Letters 553, 427-432.
- MULLER-MOULE, P., HAVAUX, M. & NIYOGI, K. K. (2003). Zeaxanthin deficiency enhances the high light sensitivity of an ascorbate-deficient mutant of *Arabidopsis*. — Plant Physiology 133, 748-760.
- MULLINEAUX, P. M. & RAUSCH, T. (2005). Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. — Photosynthesis Research 86, 459-474.
- MURASUGI, A., WADA, C. & HAYASHI, Y. (1981). Cadmium-binding peptide induced in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. — Journal of Biochemistry 90, 1561-1564.
- MYSLIWA-KURDZIEL, B., PRASAD, M. N. V. & STRZALKA, K. (2004). Photosynthesis in heavy metal stressed plants. — In: Heavy metal stress in plants (M. N. V. Prasad, Hrsg.). Springer, Berlin, S. 146-181.
- NAKAMURA, S., MARUYAMA, K., WATANABE, A., HATTORI, H. & CHINO, M. (2005). Response of glutathione in the sieve tube of *Brassica napus* L. to cadmium treatment. — In: Sulfur

- transport and assimilation in plants in the post genomic era (H. Rennenberg, Hrsg.). Backhuys, Leiden, S. 229-232.
- NAVAZA, A. P., MONTES-BAYÓN, M., LEDUC, D. L., TERRY, N. & SANZ-MEDEL, A. (2006). Study of phytochelatins and other related thiols as complexing biomolecules of As and Cd in wild type and genetically modified *Brassica juncea* plants. — Journal of Mass Spectrometry 41, 323-331.
- NEPOVIM, A., PODLIPNA, R., SOUDEK, P., SCHRODER, P. & VANEK, T. (2004). Effects of heavy metals and nitroaromatic compounds on horseradish glutathione S-transferase and peroxidase. — Chemosphere 57, 1007-1015.
- NEUENSCHWANDER, U., SUTER, M. & BRUNOLD, C. (1991). Regulation of sulfate assimilation by light and O-acetyl-l-serine in *Lemna minor* L. — Plant Physiology 97, 253-258.
- NIKIFOROVA, V., FREITAG, J., KEMPA, S., ADAMIK, M., HESSE, H. & HOEGEN, R. (2003). Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. — Plant Journal 33, 633-650.
- NIKIFOROVA, V. J., BIELECKA, M., GAKIERE, B., KRUEGER, S., RINDER, J., KEMPA, S., MORCUENDE, R., SCHEIBLE, W. R., HESSE, H. & HOEGEN, R. (2006). Effect of sulfur availability on the integrity of amino acid biosynthesis in plants. — Amino Acids 30, 173-183.
- NISHIYAMA, T., FUJITA, T., SHIN-I, T., SEKI, M., NISHIDE, H., UCHIYAMA, I., KAMIYA, A., CARNINCI, P., HAYASHIZAKI, Y., SHINOZAKI, K., KOHARA, Y. & HASEBE, M. (2003). Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: Implication for land plant evolution. — Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100, 8007-8012.
- NISHIYAMA, T., HIWATASHI, Y., SAKAKIBARA, I., KATO, M. & HASEBE, M. (2000). Tagged mutagenesis and gene-trap in the moss, *Physcomitrella patens* by shuttle mutagenesis. — DNA Research: an International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes 7, 9-17.
- NOCTOR, G. (2006). Metabolic signalling in defence and stress: The central roles of soluble redox couples. — Plant Cell and Environment 29, 409-425.
- NOCTOR, G., ARISI, A.-C. M., JOUANIN, L. & FOYER, C. H. (1998). Manipulation of glutathione and amino acid biosynthesis in the chloroplast. — Plant Physiology 118, 471-482.
- NOCTOR, G., ARISI, A.-C. M., JOUANIN, L., VALADIER, M.-H., ROUX, Y. & FOYER, C. H. (1997). Light-dependent modulation of foliar glutathione synthesis and associated amino acid metabolism in poplar overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. — Planta 202, 357 - 369.
- NOCTOR, G., STROHM, M., JOUANIN, L., KUNERT, K. J., FOYER, C. H. & RENNENBERG, H. (1996). Synthesis of glutathione in leaves of transgenic poplar overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. — Plant Physiology 112, 1071-1078.
- PADMAJA, K., PRASAD, D. D. K. & PRASAD, A. R. K. (1990). Inhibition of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* L seedlings by cadmium acetate. — Photosynthetica 24, 399-405.
- PAGE, V. & FELLER, U. (2005). Selective transport of zinc, manganese, nickel, cobalt and cadmium in the root system and transfer to the leaves in young wheat plants. — Annals of Botany 96, 425-434.
- PEARSON, R. G. (1963). Hard and soft acids and bases. — Journal of the American Chemical Society 85, 3533-3536.
- PERFUS-BARBECH, L., LEONHARDT, N., VAVASSEUR, A. & FORESTIER, C. (2002). Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. — Plant Journal 32, 539-48.
- PEUKE, A. D. & RENNENBERG, H. (2005). Phytoremediation. — EMBO Rep 6, 497-501.
- PICKERING, D. C. & PUJA, I. L. (1969). Mechanism for the uptake of zinc by *Fontinalis antipyretica*. — Physiologia Plantarum 22, 653-661.

- PIECHALAK, A., TOMASZEWSKA, B., BARALKIEWICZ, D. & MALECKA, A. (2002). Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. — *Phytochemistry* 60, 153-162.
- POMPONI, M., CENSI, V., DI GIROLAMO, V., DE PAOLIS, A., DI TOPPI, L. S., AROMOLO, R., COSTANTINO, P. & CARDARELLI, M. (2006). Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase in tobacco plants enhances Cd²⁺ stop tolerance and accumulation but not translocation to the shoot. — *Planta* 223, 180-190.
- PUNZ, W. F. & SIEGHARDT, H. (1993). The Response of Roots of Herbaceous Plant Species to Heavy Metals. — *Environmental and Experimental Botany* 33, 85-98.
- RAAB, A., FELDMANN, J. & MEHARG, A. A. (2004). The nature of arsenic-phytochelatin complexes in *Holcus lanatus* and *Pteris cretica*. — *Plant Physiology* 134, 1113-1122.
- RAUSER, W. E. (1999). Structure and function of metal chelators produced by plants. — *Cell Biochemistry and Biophysics* 31, 19-48.
- REA, P. A. (2006). Phytochelatin synthase, papain's cousin, in stereo. — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 507-508.
- RELLAN-ALVAREZ, R., ORTEGA-VILLASANTE, C., ALVAREZ-FERNANDEZ, A., DEL CAMPO, F. F. & HERNANDEZ, L. E. (2006). Stress responses of *Zea mays* to cadmium and mercury. — *Plant and Soil* 279, 41-50.
- REPP, A., MIKAMI, K., MIITMANN, F. & HARTMANN, E. (2004). Phosphoinositide-specific phospholipase C is involved in cytokinin and gravity responses in the moss *Physcomitrella patens*. — *Plant Journal* 40, 250-259.
- RESKI, R. (1998). *Physcomitrella* and *Arabidopsis*: The David and Goliath of reverse genetics. — *Trends in Plant Science* 3, 209-210.
- RESKI, R., FAUST, M., WANG, X. H., WEHE, M. & ABEL, W. O. (1994). Genome analysis of the moss *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. — *Molecular & General Genetics: MGG* 244, 352-359.
- RIVERA-BECERRIL, F., VAN TUINEN, D., GIANINAZZI, S., GIANINAZZI-PEARSON, V., MARTIN-LAURENT, F., METWALLY, A. & DIETZ, K.-J. (2005). Molecular changes in *Pisum sativum* L. roots during arbuscular mycorrhiza buffering of cadmium stress. — *Mycorrhiza* 16, 51-60.
- ROMERO-PUERTAS, M. C., RODRIGUEZ-SERRANO, M., CORPAS, F. J., GOMEZ, M., DEL RIO, L. A. & SANDALIO, L. M. (2004). Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂⁻ and H₂O₂ in pea leaves. — *Plant Cell and Environment* 27, 1122-1134.
- ROTH, U., VON ROEPENACK-LAHAYE, E. & CLEMENS, S. (2006). Proteome changes in *Arabidopsis thaliana* roots upon exposure to Cd²⁺. — *Journal of Experimental Botany* 57, 4003-4013.
- RÜEGSEGGER, A., SCHMUTZ, D. & BRUNOLD, C. (1990). Regulation of glutathione synthesis by cadmium in *Pisum sativum* L. — *Plant Physiology* 93, 1579-1584.
- SALT, D. E., BLAYLOCK, M., KUMAR, N. P. B. A., DUSHENKOV, V., ENSLEY, B. D., CHET, I. & RASKIN, I. (1995). Phytoremediation - a Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants. — *Bio-Technology* 13, 468-474.
- SALT, D. E., KATO, N., KRÄMER, U., SMITH, R. D. & RASKIN, I. (2000). The role of root exsudates in nickel hyperaccumulation and tolerance in accumulator and non-accumulator species of *Thlaspi*. — In: *Phytoremediation of contaminated soil and water* (N. Terry & G. Bañuelos, Hrsg.). Lewis Publishers, Boca Raton, S. 189-200.
- SANITÀ DI TOPPI, L. & GABBRIELLI, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. — *Environmental and Experimental Botany* 41, 105-130.
- SARNIGHAUSEN, E., WURTZ, V., HEINTZ, D., VAN DORSEL, A. & RESKI, R. (2004). Mapping of the *Physcomitrella patens* proteome. — *Phytochemistry* 65, 1589-1607.
- SARRY, J.-E., KUHN, L., DUCRUIX, C., LAFAYE, A., JUNOT, C., HUGOUVIEUX, V., JOURDAIN, A., BASTIEN, O., FIEVET, J. B., VAILHEN, D., AMEKRAZ, B., MOULIN, C., EZAN, E., GARIN, J. & BOURGUIGNON, J. (2006). The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to

- cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. — PROTEOMICS 6, 2180 - 2198.
- SCHAEFER, D. & ZRYD, J. (1997). Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. — Plant Journal 11, 1195 - 1206.
- SCHAEFER, D. G. (2002). A new moss genetics: Targeted Mutagenesis in *Physcomitrella patens*. — Annual Reviews in Plant Biology 53, 477-501.
- SCHÄFER, H. J., HAAG-KERWER, A. & RAUSCH, T. (1998). cDNA cloning and expression analysis of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy-metal accumulator *Brassica juncea* L.: evidence for Cd-induction of a putative mitochondrial gamma-glutamylcysteine synthetase isoform. — Plant Molecular Biology 37, 87-97.
- SCHNEIDER, S. & BERGMANN, L. (1995). Regulation of glutathione synthesis in suspension cultures of parsley and tobacco. — Botanica Acta 108, 34-40.
- SCHRODER, P., FISCHER, C., DEBUS, R. & WENZEL, A. (2003). Reaction of detoxification mechanisms in suspension cultured spruce cells (*Picea abies* L. Karst.) to heavy metals in pure mixture and in soil eluates. — Environmental Science and Pollution Research 10, 225-234.
- SEREGIN, I. V. & IVANOV, V. B. (2001). Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. — Russian Journal of Plant Physiology 48, 523-544.
- SHARMA, S. S. & DIETZ, K. J. (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. — Journal of Experimental Botany 57, 711-726.
- SIEDLECKA, A. & BASZYNSKI, T. (1993). Inhibition of electron flow around photosystem I in chloroplasts of Cd-treated maize plants is due to Cd-induced iron-deficiency. — Physiologia Plantarum 87, 199-202.
- SMEETS, K., CUYPERS, A., SEMANE, B., VANGRONSVELD, J., LAMBRECHTS, A., VAN LAERE, A. & HOET, P. (2005). Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. — Plant Physiology and Biochemistry 43, 437-444.
- SMITH, F. W., HAWKESFORD, M. J., EALING, P. M., CLARKSON, D. T., VANDEN BERG, P. J., BELCHER, A. R. & WARRILOW, A. G. S. (1997). Regulation of expression of a cDNA from barley roots encoding a high affinity sulphate transporter. — Plant Journal 12, 875-884.
- STEPHEN, D. W. S. & JAMIESON, D. J. (1997). Amino acid-dependent regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* GSH1 gene by hydrogen peroxide. — Molecular Microbiology 23, 203-210.
- SUN, Q., WANG, X. R., DING, S. M. & YUAN, X. F. (2005a). Effects of interactions between cadmium and zinc on phytochelatin and glutathione production in wheat (*Triticum aestivum* L.). — Environmental Toxicology 20, 195-201.
- SUN, X., SUN, X.-M., YANG, Z.-M., LI, S.-Q., WANG, J. & WANG, S.-H. (2005b). Expression of *Brassica napus* L. γ -glutamylcysteine synthetase and low- and high-affinity sulfate transporters in response to excess cadmium. — Journal of Integrative Plant Biology 47, 243-250.
- SUTTER, K. (2000). Untersuchungen zur Akkumulation und physiologisch-biochemischen Wirkung von Schwermetallen im Wassermoos *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. — Dissertation, Martin-Luther-Universität.
- TAKAHASHI, H., WATANABE-TAKAHASHI, A., SMITH, F. W., BLAKE-KALFF, M., HAWKESFORD, M. J. & SAITO, K. (2000). The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. — Plant Journal 23, 171-82.
- TOMMEY, A. M., SHI, J., LINDSAY, W. P., URWIN, P. E. & ROBINSON, N. J. (1991). Expression of the pea gene PsMTA in *E. coli*. Metal-binding properties of the expressed protein. — FEBS Letters 292, 48-52.

- UNYAYAR, S., CELIK, A., CEKIC, F. O. & GOZEL, A. (2006). Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. — Mutagenesis 21, 77-81.
- VAN ASSCHE, F., CLIJSTERS, H. (1990). A biological test system for the evaluation of the phytotoxicity of metal-contaminated soils. — Environmental Pollution 66, 157-172.
- VAN DUIJVENDIJK-MATTEOLI, M. A. & DESMETTA, G. M. (1975). On the inhibitory site of PSII in isolated chloroplasts. — Biochimica and Biophysica Acta 408, 164-169.
- VAN HOOF, N. A. L. M., HASSINEN, V. H., HAKVOORT, H. W. J., BALLINTIJN, K. F., SCHAT, H., VERKLEIJ, J. A. C., ERNST, W. H. O., KARENLAMPI, S. O. & TERVAHAUTA, A. I. (2001). Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. — Plant Physiology 126, 1519-1526.
- VASSILEV, A., YORDANOV, I. & TSONEV, T. (1997). Effects of Cd²⁺ on the physiological state and photosynthetic activity of young barley plants. — Photosynthetica 34, 293-302.
- VATAMANIUK, O. K., BUCHER, E. A., WARD, J. T. & REA, P. A. (2001). A new pathway for heavy metal detoxification in animals. Phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. — Journal of Biological Chemistry 276, 20817-20820.
- VATAMANIUK, O. K., MARI, S., LANG, A., CHALASANI, S., DEMKIV, L. O. & REA, P. A. (2004). Phytochelatin synthase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with gamma-glutamylcysteine during catalysis: Stoichiometric and site-directed mutagenic analysis of *Arabidopsis thaliana* PCS1-catalyzed phytochelatin synthesis. — Journal of Biological Chemistry 279, 22449-22460.
- VATAMANIUK, O. K., MARI, S., LU, Y.-P. & REA, P. A. (1999). AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: Isolation and in vitro reconstitution. — Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96, 7110-7115.
- VAUCLARE, P., KOPRIVA, S., FELL, D., SUTER, M., STICHER, L., VON BALLMOOS, P., KRAHENBUHL, U., DEN CAMP, R. O. & BRUNOLD, C. (2002). Flux control of sulphate assimilation in *Arabidopsis thaliana*: adenosine 5'-phosphosulphate reductase is more susceptible than ATP sulphurylase to negative control by thiols. — Plant Journal 31, 729-740.
- VIDO, K., SPECTOR, D., LAGNIEL, G., LOPEZ, S., TOLEDANO, M. B. & LABARRE, J. (2001). A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. — Journal of Biological Chemistry 276, 8469-8474.
- VOLKOV, R. A., PANCHUK, I. I. & SCHOFFL, F. (2003). Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR. — Journal of Experimental Botany 54, 2343-2349.
- WACHTER, A., WOLF, S., STEININGER, H., BOGS, J. & RAUSCH, T. (2005). Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae. — Plant Journal 41, 15-30.
- WEBER, M., HARADA, E., VESS, C., ROEPENACK-LAHAYE, E. V. & CLEMENS, S. (2004). Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. — Plant Journal 37, 269-281.
- WÓJCIK, M. & TUKIENDORF, A. (2004). Phytochelatin synthesis and cadmium localization in wild type of *Arabidopsis thaliana*. — Plant Growth Regulation 44, 71-80.
- WÓJCIK, M., VANGRONSVELD, J., D'HAEN, J. & TUKIENDORF, A. (2005). Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens* - II. Localization of cadmium in *Thlaspi caerulescens*. — Environmental and Experimental Botany 53, 163-171.

- WORMS, I., SIMON, D. F., HASSLER, C. S. & WILKINSON, K. J. (2006). Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. — *Biochimie* 88, 1721-1731.
- WU, F. B., DONG, J., CHEN, F. & ZHANG, G. P. (2005). Response of cadmium uptake in different barley genotypes to cadmium level. — *Journal of Plant Nutrition* 28, 2201-2209.
- XIANG, C. & OLIVER, D. J. (1998). Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. — *Plant Cell* 10, 1539-1550.
- XUE, H. B. & SIGG, L. (1998). Cadmium speciation and complexation by natural organic ligands in fresh water. — *Analytica Chimica Acta* 363, 249-259.
- YANG, X. E., JIN, X. F., FENG, Y. & ISLAM, E. (2005). Molecular mechanisms and genetic basis of heavy metal tolerance/hyperaccumulation in plants. — *Journal of Integrative Plant Biology* 47, 1025-1035.
- ZHU, Y. L., PILON-SMITS, E. A. H., TARUN, A. S., WEBER, S. U., JOUANIN, L. & TERRY, N. (1999). Cadmium tolerance and accumulation in indian mustard is enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. — *Plant Physiology* 121, 1169-1177.
- ZIMERI, A. M., DHANKHER, O. P., MCCAIIG, B. & MEAGHER, R. B. (2005). The plant MT1 metallothioneins are stabilized by binding cadmiums and are required for cadmium tolerance and accumulation. — *Plant Molecular Biology* 58, 839-55.

Anhang A - Rohdaten**Chlorophyll- bzw. Carotinoid-Gehalte und Vitalität**Tabelle 1. Chlorophyll- und Carotinoid-Gehalte in *Physcomitrella patens* nach Exposition mit 0 µM Cd(II), 5 µM Cd(II) und 10 µM Cd(II), MW ± SD, n = 4 (Kap. 4.1.1)

Zeit [d]	Cd(II) [µM]	Chlorophyll a [mg g ⁻¹ FM]	Chlorophyll b [mg g ⁻¹ FM]	Carotinoide [mg g ⁻¹ FM]
0	0	2,35 ± 0,26	1,13 ± 0,08	0,79 ± 0,08
1	0	1,91 ± 0,23	1,01 ± 0,10	0,75 ± 0,04
	5	1,99 ± 0,19	0,99 ± 0,11	0,75 ± 0,08
	10	1,77 ± 0,32	0,92 ± 0,15	0,70 ± 0,12
2	0	2,10 ± 0,10	1,06 ± 0,09	0,75 ± 0,03
	5	1,80 ± 0,22	0,92 ± 0,12	0,71 ± 0,09
	10	1,44 ± 0,32	0,76 ± 0,15	0,61 ± 0,11
3	0	2,04 ± 0,21	1,04 ± 0,10	0,77 ± 0,06
	5	1,63 ± 0,18	0,81 ± 0,09	0,66 ± 0,04
	10	1,46 ± 0,22	0,75 ± 0,09	0,68 ± 0,06
4	0	2,04 ± 0,16	1,02 ± 0,08	0,77 ± 0,02
	5	1,64 ± 0,18	0,81 ± 0,08	0,72 ± 0,07
	10	1,33 ± 0,16	0,69 ± 0,06	0,65 ± 0,04
5	0	2,13 ± 0,08	1,06 ± 0,02	0,80 ± 0,03
	5	1,48 ± 0,17	0,74 ± 0,09	0,68 ± 0,05
	10	1,16 ± 0,20	0,62 ± 0,07	0,61 ± 0,09

Tabelle 2. Chlorophyll- und Carotinoid-Gehalte der Δ apr-Mutante 11-3-12 nach Exposition mit 0 μ M Cd(II), 5 μ M Cd(II) und 10 μ M Cd(II), MW \pm SD, n = 3 (Kap. 4.1.1)

Zeit [d]	Cd(II) [μ M]	Chlorophyll a [mg g ⁻¹ FM]	Chlorophyll b [mg g ⁻¹ FM]	Carotinoide [mg g ⁻¹ FM]
1	0	1,51 \pm 0,05	0,87 \pm 0,02	0,60 \pm 0,01
	5	1,58 \pm 0,07	0,88 \pm 0,04	0,63 \pm 0,03
	10	1,49 \pm 0,09	0,84 \pm 0,04	0,60 \pm 0,03
3	0	1,50 \pm 0,10	0,85 \pm 0,04	0,61 \pm 0,03
	5	1,36 \pm 0,17	0,76 \pm 0,09	0,57 \pm 0,07
	10	1,01 \pm 0,14	0,58 \pm 0,08	0,46 \pm 0,05
5	0	1,43 \pm 0,06	0,84 \pm 0,02	0,61 \pm 0,02
	5	1,02 \pm 0,03	0,60 \pm 0,02	0,49 \pm 0,03
	10	0,83 \pm 0,05	0,52 \pm 0,02	0,49 \pm 0,02

Tabelle 3. Chlorophyll- und Carotinoid-Gehalte der Δ apr-Mutante 12-4-3 nach Exposition mit 0 μ M Cd(II), 5 μ M Cd(II) und 10 μ M Cd(II), MW \pm SD, n = 3 (Kap. 4.1.1)

Zeit [d]	Cd(II) [μ M]	Chlorophyll a [mg g ⁻¹ FM]	Chlorophyll b [mg g ⁻¹ FM]	Carotinoide [mg g ⁻¹ FM]
1	0	1,13 \pm 0,04	0,62 \pm 0,02	0,45 \pm 0,02
	5	1,06 \pm 0,04	0,59 \pm 0,02	0,44 \pm 0,02
	10	1,01 \pm 0,03	0,56 \pm 0,01	0,42 \pm 0,01
3	0	1,02 \pm 0,07	0,54 \pm 0,01	0,39 \pm 0,02
	5	0,79 \pm 0,11	0,46 \pm 0,05	0,37 \pm 0,03
	10	0,77 \pm 0,11	0,45 \pm 0,05	0,38 \pm 0,03
5	0	1,05 \pm 0,03	0,58 \pm 0,01	0,42 \pm 0,01
	5	0,71 \pm 0,07	0,42 \pm 0,04	0,36 \pm 0,02
	10	0,59 \pm 0,05	0,37 \pm 0,02	0,35 \pm 0,01

Tabelle 4. Photosystem-II-Effizienz (Fv/Fm) von *Physcomitrella patens* nach Exposition mit 5 µM Cd(II) bzw. 10 µM Cd(II), % der Kontrolle, MW ± SD, n = 3 (Kap. 4.1.1)

	Photosystem-II-Effizienz (Fv/Fm) [% der Kontrolle]		
	Tag 1	Tag 3	Tag 5
5 µM Cd(II)	99,3 ± 2,1	98,1 ± 1,5	95,2 ± 2,5
10 µM Cd(II)	95,3 ± 2,2	92,9 ± 1,9	81,1 ± 3,4

Biosorption und Bioakkumulation

Tabelle 5. Biosorption und Bioakkumulation von Cd(II) in *Physcomitrella patens* nach Belastung mit 5 µM Cd(II) bzw. 10 µM Cd(II), MW ± SD, n = 3, Zeit = 0 d entspricht einminütiger Inkubation mit Cd(II), u. N. - unterhalb d. Nachweisgrenze(Kap. 4.2.1)

Zeit [d]	Cd(II) [µM]	Biosorption	Bioakkumulation	Medium [µmol g⁻¹ FM]	Wiederfindung [%]
		[nmol g⁻¹ FM]	[µmol g⁻¹ FM]		
0	5	28,3 ± 5,6	0,61 ± 0,05	0,97 ± 0,10	103,2 ± 5,1
	10	181,3 ± 62	1,06 ± 0,22	1,73 ± 0,14	100,4 ± 10,2
1	5	6,4 ± 11,1	0,70 ± 0,03	0,71 ± 0,01	103,2 ± 4,0
	10	123,5 ± 21,5	1,31 ± 0,03	1,10 ± 0,11	93,1 ± 2,7
2	5	14,6 ± 4,6	0,75 ± 0,06	0,44 ± 0,02	93,6 ± 1,8
	10	36,2 ± 6,0	1,47 ± 0,09	0,76 ± 0,07	92,6 ± 6,7
3	5	u. N.	0,82 ± 0,03	0,31 ± 0,05	103,2 ± 2,1
	10	14,0 ± 6,7	1,47 ± 0,08	0,48 ± 0,08	94,8 ± 3,1
4	5	u. N.	0,69 ± 0,11	0,33 ± 0,07	91,1 ± 6,3
	10	13,6 ± 4,5	1,51 ± 0,09	0,69 ± 0,08	92,1 ± 4,0
5	5	u. N.	0,75 ± 0,02	0,25 ± 0,02	97,0 ± 4,1
	10	4,5 ± 3,9	1,43 ± 0,03	0,43 ± 0,02	93,8 ± 2,2

Tabelle 6. Bioakkumulation von Cd(II) in *Physcomitrella patens* nach Belastung mit 10 µM Cd(II) und Anzucht in Medium mit erhöhtem Na₂SO₄-Gehalt, MW ± SD, n = 3 (Kap. 4.2.2)

Zeit [d]	Na ₂ SO ₄ [mM]			
	3	5	7	9
Bioakkumulation				
[µmol g ⁻¹ FM]				
1	1,96 ± 0,05	2,05 ± 0,15	1,93 ± 0,34	1,85 ± 0,28
3	2,03 ± 0,05	2,02 ± 0,14	1,99 ± 0,16	1,99 ± 0,08
5	2,14 ± 0,12	2,04 ± 0,2	1,98 ± 0,1	2,1 ± 0,32

Tabelle 7. Bioakkumulation von Cd(II) in *Physcomitrella patens* nach Belastung mit 10 µM Cd(II) und Anzucht in Medium mit erhöhtem MgSO₄-Gehalt, MW ± SD, n = 3 (Kap. 4.2.2)

Zeit [d]	MgSO ₄ [mM]			
	3	5	7	9
Bioakkumulation				
[µmol g ⁻¹ FM]				
1	1,87 ± 0,03	2,11 ± 0,25	2,45 ± 0,20	2,51 ± 0,09
3	1,96 ± 0,09	2,09 ± 0,27	2,71 ± 0,40	2,85 ± 0,29
5	1,88 ± 0,25	2,24 ± 0,49	3,23 ± 0,50	3,32 ± 0,55

Genexpression

Tabelle 8. Transkription der mRNAs von Genen der Sulfatassimilation und GSH-Biosynthese in *Physcomitrella patens* nach Anzucht unter 0 µM Cd(II) (Kontrolle), 5 µM Cd(II) und 10 µM Cd(II) im Medium, MW ± SD, n = 3 (Kap. 4.4.2)

	Cd(II) [µM]	-fache Expression		
		Tag 1	Tag 3	Tag 5
ATPS	0	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1
	5	1,1 ± 0,4	1,4 ± 0,4	2,6 ± 0,7
	10	1,7 ± 0,4	4,2 ± 1,2	3,9 ± 1,4
APR	0	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,5	1,0 ± 0,2
	5	1,9 ± 0,3	2,4 ± 0,6	3,9 ± 1,0
	10	2,3 ± 0,9	4,5 ± 0,8	4,1 ± 1,5
PAPR	0	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,3
	5	1,8 ± 0,8	4,0 ± 1,9	3,6 ± 1,5
	10	2,1 ± 0,3	5,3 ± 0,7	3,6 ± 1,2
SiR	0	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,3
	5	3,1 ± 1,8	4,0 ± 0,8	8,6 ± 2,6
	10	3,7 ± 1,1	9,5 ± 2,1	9,8 ± 2,4
SAT	0	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,4	1,0 ± 0,4
	5	1,7 ± 0,6	1,2 ± 0,3	2,1 ± 0,0
	10	1,6 ± 0,3	2,7 ± 0,9	1,7 ± 0,2
OAS-TL	0	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,1
	5	1,4 ± 0,5	1,2 ± 0,1	2,0 ± 0,7
	10	1,2 ± 0,6	2,3 ± 0,4	1,7 ± 0,6
γ-ECS	0	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2
	5	2,7 ± 0,4	5,7 ± 0,4	6,1 ± 1,8
	10	3,0 ± 1,2	7,9 ± 1,7	6,2 ± 2,7
GSHS	0	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,4	1,0 ± 0,2
	5	2,0 ± 0,3	2,2 ± 0,6	5,5 ± 0,5
	10	2,7 ± 1,3	3,2 ± 0,8	5,8 ± 1,5

Tabelle 9. Transkription der mRNAs von Genen, deren Produkte an der Metall-Homöostase in *Physcomitrella patens* beteiligt sein könnten nach Anzucht unter 0 µM Cd(II) (Kontrolle), 5 µM Cd(II) und 10 µM Cd(II) im Medium, MW ± SD, n = 3 (Kap. 4.4.5)

	Cd(II) [µM]	-fache Expression		
		Tag 1	Tag 3	Tag 5
MT A	0	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,3
	5	1,8 ± 0,5	4,9 ± 1,3	12,7 ± 3,6
	10	2,3 ± 1,0	10,5 ± 2,7	15,1 ± 3,1
MT B	0	1,1 ± 0,5	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,5
	5	1,2 ± 0,3	3,4 ± 1,2	3,6 ± 1,0
	10	1,5 ± 0,4	6,7 ± 1,9	3,9 ± 1,5

Tabelle 10. Transkription der mRNAs von Genen, deren Produkte an der Redox-Homöostase in *Physcomitrella patens* beteiligt sein könnten nach Anzucht unter 0 µM Cd(II) (Kontrolle), 5 µM Cd(II) und 10 µM Cd(II) im Medium, MW ± SD, n = 3 (Kap. 4.4.3)

	Cd(II) [µM]	-fache Expression		
		Tag 1	Tag 3	Tag 5
Ascorbat-	0	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,4	1,0 ± 0,1
	5	3,0 ± 2,0	5,3 ± 2,7	7,4 ± 1,5
	10	2,6 ± 0,9	9,8 ± 2,7	11,4 ± 5,8
Ascorbat-	0	1,1 ± 0,5	1,1 ± 0,6	1,0 ± 0,1
	5	2,1 ± 0,8	4,9 ± 1,2	9,4 ± 5,1
	10	2,6 ± 0,7	9,1 ± 1,6	9,6 ± 4,9
GSH-	0	1,1 ± 0,4	1,2 ± 0,9	1,0 ± 0,1
	5	1,4 ± 0,4	2,9 ± 1,8	3,2 ± 1,3
	10	1,1 ± 0,3	4,0 ± 1,0	4,1 ± 2,3
GSH-	0	1,0 ± 0,3	1,1 ± 0,7	1,0 ± 0,1
	5	2,7 ± 0,8	6,2 ± 0,7	10,1 ± 2,8
	10	4,3 ± 3,7	13,4 ± 1,8	12,9 ± 2,8

Tabelle 11. Transkription der mRNAs von Genen, die Glutathion-S-Transferasen kodieren, in *Physcomitrella patens* nach Anzucht unter 0 µM Cd(II) (Kontrolle), 5 µM Cd(II) und 10 µM Cd(II) im Medium, MW ± SD, n = 3 (Kap. 4.4.4)

	Cd(II) [µM]	-fache Expression		
		Tag 1	Tag 3	Tag 5
GST 1	0	1,2 ± 0,9	1,2 ± 0,8	1,1 ± 0,7
	5	1,8 ± 0,6	2,0 ± 0,2	2,3 ± 0,6
	10	4,0 ± 2,2	6,8 ± 6,2	2,4 ± 0,9
GST 2	0	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,3
	5	22,6 ± 9,1	25,8 ± 6,0	25,4 ± 1,0
	10	36,1 ± 14,3	50,8 ± 4,0	32,6 ± 19,5
GST 3	0	1,4 ± 1,0	1,4 ± 1,1	1,4 ± 1,4
	5	70,3 ± 44,8	74,6 ± 24,4	40,7 ± 7,6
	10	94,7 ± 38,0	132,9 ± 31,1	133,2 ± 43,7
GST 4	0	1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,5	1,0 ± 0,4
	5	24,1 ± 15,8	27,9 ± 17,7	28,5 ± 15,7
	10	31,8 ± 16,7	43,6 ± 7,7	24,7 ± 5,9

Enzymaktivitäten

Tabelle 12. Enzymaktivitäten von OAS-TL, γ-ECS, GSHS und GSTs in *Physcomitrella patens* nach Exposition mit 0 µM Cd(II) (K), 5 µM Cd(II) und 10 µM Cd(II), MW ± SD, n = 3 (Kap. 4.5)

Zeit [d]	Enzym	K	5 µM Cd(II)	10 µM Cd(II)
OAS-TL [U·mg ⁻¹ Protein]				
1		1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,2

3		$1,7 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$
5		$1,4 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,3$
γ -ECS [$\text{mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ Protein]				
1		$83,4 \pm 7,1$	$81,0 \pm 16,6$	$93,5 \pm 8,9$
3		$63,8 \pm 4,4$	$112,2 \pm 20,1$	$107,9 \pm 29,2$
5		$73,3 \pm 8,4$	$136,5 \pm 30,2$	$247,4 \pm 80,7$
GSHS [$\text{mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ Protein]				
1		$400,1 \pm 28,1$	$447,2 \pm 6,0$	$484,1 \pm 56,6$
3		$467,0 \pm 15,1$	$629,7 \pm 56,6$	$665,8 \pm 43,3$
5		$520,7 \pm 74,8$	$670,5 \pm 10,8$	$835,2 \pm 74,5$
GST [$\text{mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ Protein]				
1		$5,2 \pm 1,6$	$22,7 \pm 7,9$	$20,4 \pm 7,3$
3		$5,1 \pm 1,0$	$28,6 \pm 6,2$	$38,4 \pm 7,6$
5		$5,3 \pm 0,5$	$53,4 \pm 9,4$	$58,3 \pm 2,0$

Thiolgehalte

Tabelle 13. Gehalte von Cys, γ -EC und GSH_{ges} in *Physcomitrella patens* nach Belastung mit 0 μM Cd(II) (K), 5 μM Cd(II) und 10 μM Cd(II) in [nmol g⁻¹ FM], MW \pm SD, HPLC-Bestimmung, n = 3 (Kap. 4.6)

Zeit [d]		K	5 μM Cd(II)	10 μM Cd(II)
1	Cys	$22,7 \pm 1,0$	$30,3 \pm 3,8$	$33,9 \pm 1,7$
	γ -EC	$9,2 \pm 0,7$	$8,2 \pm 1,4$	$8,6 \pm 0,5$
	GSH _{ges}	$195,0 \pm 13,2$	$226,2 \pm 42,9$	$240,6 \pm 10,6$
2	Cys	$20,3 \pm 3,4$	$28,5 \pm 4,4$	$31,8 \pm 2,9$

	γ -EC	7,4 ± 0,9	8,6 ± 1,3	9,1 ± 0,9
	GSH _{ges}	178,6 ± 15,2	258,6 ± 37,0	291,9 ± 35,9
3	Cys	24,9 ± 2,9	33,5 ± 6,3	41,5 ± 4,8
	γ -EC	7,8 ± 0,2	10,8 ± 4,0	13,2 ± 3,0
	GSH _{ges}	205,1 ± 3,6	286,9 ± 51,7	354,5 ± 27,0
4	Cys	23,4 ± 0,4	39,0 ± 5,5	47,6 ± 0,5
	γ -EC	8,1 ± 0,9	14,4 ± 6,3	17,9 ± 2,9
	GSH _{ges}	197,5 ± 8,5	339,0 ± 48,5	390,7 ± 14,0
5	Cys	18,2 ± 0,5	39,9 ± 8,5	49,4 ± 1,1
	γ -EC	6,9 ± 0,5	14,4 ± 5,6	21,7 ± 2,0
	GSH _{ges}	191,1 ± 11,6	369,3 ± 44,1	425,5 ± 1,3

Tabelle 14. Gehalte an GSH_{ges}, GSH_{red} und GSSG in *Physcomitrella patens* nach Belastung mit 0 μ M Cd(II) (K), 5 μ M Cd(II) und 10 μ M Cd(II) in [nmol g⁻¹ FM], MW ± SD, enzymatische Bestimmung, n = 3, GSH_{red} ergibt sich aus der Differenz von GSH_{ges} und GSSG (Kap. 4.6)

Zeit [d]		K	5 μ M Cd(II)	10 μ M Cd(II)
0	GSH _{ges}	200,0 ± 5,8	-	-
	GSH _{red}	130,2 ± 5,6	-	-
	GSSG	69,8 ± 7,1	-	-
1	GSH _{ges}	185,7 ± 1,7	264,3 ± 57,8	253,7 ± 17,9
	GSH _{red}	99,8 ± 15,0	149,7 ± 54,5	138,3 ± 40,2
	GSSG	85,9 ± 13,8	114,6 ± 13,3	115,4 ± 30,6
3	GSH _{ges}	187,0 ± 30,1	456,4 ± 77,2	507,9 ± 80,6
	GSH _{red}	105,2 ± 34,4	288,8 ± 48,9	356,5 ± 66,7
	GSSG	81,8 ± 6,0	167,5 ± 31,2	151,4 ± 37,9
5	GSH _{ges}	263,5 ± 28,4	555,2 ± 102,9	565,2 ± 86,7
	GSH _{red}	165,3 ± 17,1	408,9 ± 106,9	417,8 ± 82,1
	GSSG	98,2 ± 11,6	146,4 ± 11,3	147,5 ± 34,9

Tabelle 15. Gehalt an Cys in *Physcomitrella patens* nach Belastung mit 0 µM Cd(II) (K), 5 µM Cd(II) bzw. 10 µM Cd(II) in Medium mit erhöhtem Na₂SO₄-Gehalt, MW ± SD, n = 3 (Kap.4.6.4)

Zeit [d]		Na ₂ SO ₄ [mM]			
		3	5	7	9
Cys [nmol g ⁻¹ FM]					
1	K	17,9 ± 0,1	16,4 ± 2,5	15,9 ± 1,9	16,7 ± 0,6
	5 µM Cd(II)	29,2 ± 7,1	28,1 ± 3,6	26,7 ± 4,3	27,5 ± 5,9
	10 µM Cd(II)	27,2 ± 0,7	32,3 ± 5,7	31,7 ± 2,8	32,1 ± 3,4
3	K	21,6 ± 1,0	19,2 ± 2,9	18,0 ± 3,8	19,9 ± 2,7
	5 µM Cd(II)	41,4 ± 9,5	38,5 ± 5,4	38,6 ± 4,8	38,1 ± 6,3
	10 µM Cd(II)	45,9 ± 3,8	52,3 ± 10,8	48,8 ± 8,7	52,2 ± 9,2
5	K	19,2 ± 0,5	18,4 ± 1,4	17,9 ± 1,8	19,3 ± 1,3
	5 µM Cd(II)	55,3 ± 11,2	52,1 ± 10,6	50,2 ± 11,8	54,3 ± 10,4
	10 µM Cd(II)	66,8 ± 3,9	67,9 ± 14,3	65,3 ± 10,3	72,4 ± 13,6

Tabelle 16. Gehalt an GSH_{ges} in *Physcomitrella patens* nach Belastung mit 0 µM Cd(II) (K), 5 µM Cd(II) bzw. 10 µM Cd(II) in Medium mit erhöhtem Na₂SO₄-Gehalt, MW ± SD, n = 3 (Kap.4.6.4)

Zeit [d]		Na ₂ SO ₄ [mM]			
		3	5	7	9
GSH _{ges} [nmol g ⁻¹ FM]					
1	K	179,2 ± 14,0	178,4 ± 16,0	167,4 ± 16,3	170,2 ± 13,8
	5 µM Cd(II)	263,6 ± 72,5	250,9 ± 27,4	243,0 ± 55,5	228,0 ± 54,5
	10 µM Cd(II)	229,7 ± 12,9	321,2 ± 102,0	297,7 ± 62,1	291,2 ± 47,4
3	K	194,0 ± 3,3	190,9 ± 7,7	181,1 ± 15,0	185,0 ± 22,1
	5 µM Cd(II)	425,9 ± 102,0	432,0 ± 42,3	422,9 ± 43,0	384,9 ± 69,2
	10 µM Cd(II)	465,7 ± 35,8	485,7 ± 30,1	479,7 ± 59,8	485,4 ± 58,2
5	K	169,7 ± 1,3	190,0 ± 2,9	184,0 ± 4,2	182,3 ± 2,4
	5 µM Cd(II)	589,8 ± 12,4	564,8 ± 71,8	546,7 ± 62,1	558,0 ± 41,0
	10 µM Cd(II)	644,0 ± 1,9	616,9 ± 17,8	614,5 ± 32,6	632,3 ± 26,6

Tabelle 17. Gehalt an Cys in *Physcomitrella patens* nach Belastung mit 0 µM Cd(II) (K), 5 µM Cd(II) bzw. 10 µM Cd(II) in Medium mit erhöhtem MgSO₄-Gehalt, MW ± SD, n = 3 (Kap.4.6.4)

Zeit [d]		MgSO ₄ [mM]			
		3	5	7	9
Cys [nmol g ⁻¹ FM]					
1	K	19,8 ± 6,8	23,3 ± 6,3	23,8 ± 5,4	21,9 ± 6,6
	5 µM Cd(II)	33,8 ± 17,6	38,1 ± 19,6	38,1 ± 10,5	33,1 ± 4,5
	10 µM Cd(II)	39,4 ± 15,3	42,3 ± 16,2	42,1 ± 13,4	36,2 ± 6,8
3	K	22,6 ± 6,8	22,3 ± 7,5	24,0 ± 5,9	23,3 ± 7,3
	5 µM Cd(II)	44,0 ± 11,8	45,3 ± 13,9	47,9 ± 11,4	38,5 ± 16,6
	10 µM Cd(II)	53,4 ± 11,4	46,6 ± 13,0	55,3 ± 34,3	40,1 ± 15,8
5	K	21,3 ± 6,8	21,6 ± 6,5	22,6 ± 6,0	21,9 ± 6,0
	5 µM Cd(II)	49,5 ± 8,4	48,1 ± 14,0	52,2 ± 18,6	44,4 ± 25,3
	10 µM Cd(II)	53,7 ± 9,9	52,6 ± 16,5	47,7 ± 26,8	36,9 ± 24,1

Tabelle 18. Gehalt an GSH_{ges} in *Physcomitrella patens* nach Belastung mit 0 µM Cd(II) (K), 5 µM Cd(II) bzw. 10 µM Cd(II) in Medium mit erhöhtem MgSO₄-Gehalt, MW ± SD, n = 3 (Kap. 4.6)

Zeit [d]		MgSO ₄ [mM]			
		3	5	7	9
GSH _{ges} [nmol g ⁻¹ FM]					
1	K	217,6 ± 38,4	241,6 ± 30,8	260,1 ± 23,8	249,0 ± 25,3
	5 µM Cd(II)	381,1 ± 163,6	423,2 ± 202,4	476,2 ± 38,6	405,7 ± 41,7
	10 µM Cd(II)	443,5 ± 129,7	445,7 ± 124,5	524,0 ± 104,9	408,0 ± 59,4
3	K	249,9 ± 23,9	247,8 ± 37,1	274,3 ± 15,6	262,3 ± 15,5
	5 µM Cd(II)	475,5 ± 29,7	463,5 ± 56,2	489,1 ± 41,6	384,0 ± 105,8
	10 µM Cd(II)	518,3 ± 89,8	462,2 ± 76,9	478,3 ± 230,4	403,4 ± 89,0
5	K	264,1 ± 5,7	270,8 ± 38,2	292,1 ± 33,7	272,0 ± 5,1
	5 µM Cd(II)	547,2 ± 6,8	544,3 ± 77,7	545,4 ± 64,3	439,2 ± 195,4
	10 µM Cd(II)	558,4 ± 144,5	537,8 ± 183,2	467,1 ± 192,1	370,1 ± 201,4

Tabelle 19. Gehalte an Cys, γ -EC und GSH_{ges} der Δ apr-Mutante 11-3-12 nach Belastung mit 0 μ M Cd(II) (K), 5 μ M Cd(II) und 10 μ M Cd(II), MW \pm SD, n = 3 (Kap. 4.6)

Zeit [d]	Cd(II) [μ M]	Cys [nmol g ⁻¹ FM]	γ -EC [nmol g ⁻¹ FM]	GSH _{ges} [nmol g ⁻¹ FM]
1	0	41,8 \pm 2,2	10,1 \pm 1,5	345,6 \pm 10,0
	5	55,0 \pm 2,3	9,7 \pm 0,3	473,6 \pm 18,3
	10	63,3 \pm 7,5	11,0 \pm 3,5	583,8 \pm 110,0
3	0	35,9 \pm 4,2	7,1 \pm 1,1	360,2 \pm 18,1
	5	89,8 \pm 11,6	12,1 \pm 1,3	781,5 \pm 83,1
	10	99,9 \pm 11,6	15,6 \pm 1,9	819,8 \pm 44,1
5	0	48,9 \pm 5,3	10,4 \pm 0,5	410,9 \pm 46,4
	5	115,3 \pm 10,1	20,2 \pm 6,1	812,2 \pm 62,7
	10	135,8 \pm 4,7	42,5 \pm 6,2	867,5 \pm 28,8

Tabelle 20. Gehalte an Cys, γ -EC und GSH_{ges} der Δ apr-Mutante 12-4-3 nach Belastung mit 0 μ M Cd(II) (K), 5 μ M Cd(II) und 10 μ M Cd(II), MW \pm SD, n = 3 (Kap. 4.6)

Zeit [d]	Cd(II) [μ M]	Cys [nmol g ⁻¹ FM]	γ -EC [nmol g ⁻¹ FM]	GSH _{ges} [nmol g ⁻¹ FM]
1	0	28,7 \pm 0,9	5,6 \pm 0,6	177,7 \pm 11,0
	5	47,0 \pm 3,2	6,8 \pm 1,4	268,9 \pm 13,1
	10	53,5 \pm 6,2	5,9 \pm 1,2	311,3 \pm 51,2
3	0	24,2 \pm 1,7	3,4 \pm 0,3	156,0 \pm 16,6
	5	61,2 \pm 5,8	6,1 \pm 1,7	343,3 \pm 43,9
	10	73,6 \pm 12,7	7,3 \pm 1,5	441,7 \pm 52,3
5	0	27,3 \pm 3,3	3,8 \pm 0,1	155,1 \pm 24,8
	5	70,6 \pm 4,5	8,6 \pm 1,6	342,9 \pm 26,0
	10	81,4 \pm 7,8	15,3 \pm 1,0	469,7 \pm 50,1

Anhang B - Mikroskopische Dokumentation

Lichtmikroskopie

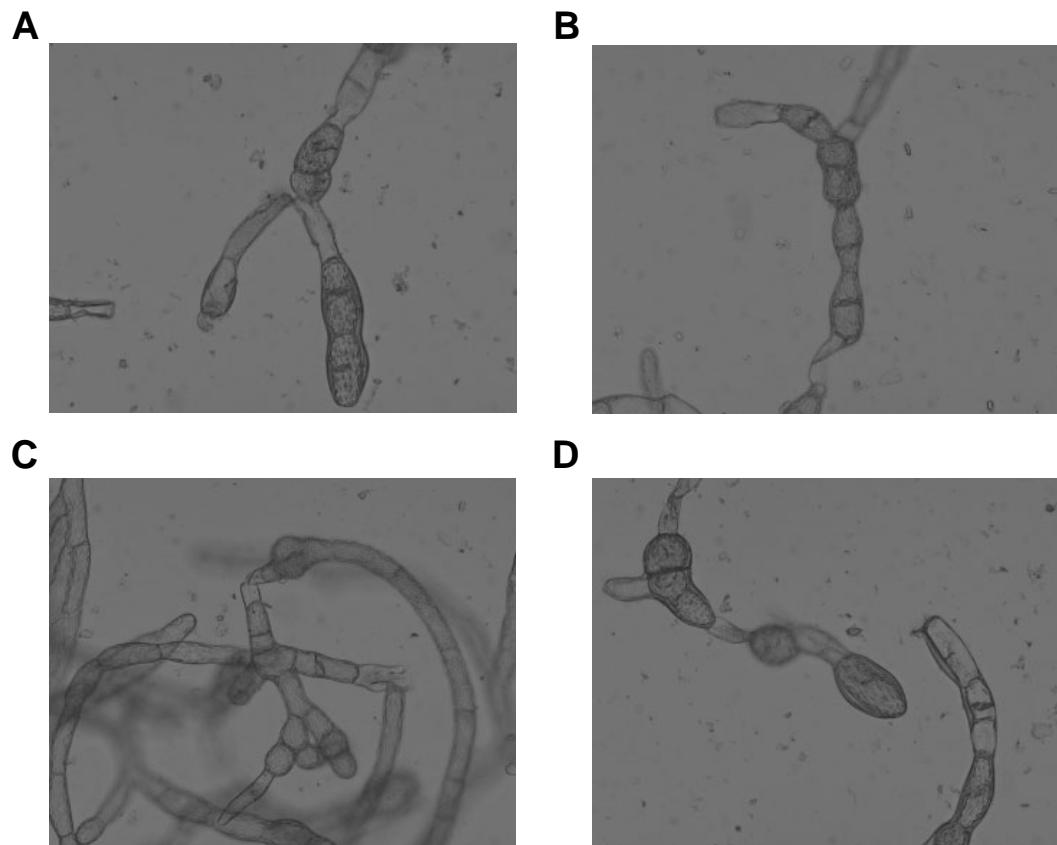


Abb. 1 Lichtmikroskopische Aufnahmen von *P. patens* als Beispiel für unregelmässiges Zellteilungswachstum und anomale Zellformen nach Cd(II)-Zugabe; A - 5 μM Cd(II) 5 d, B - 10 μM Cd(II) 1 d, C - 10 μM Cd(II) 2 d, D - 10 μM Cd(II) 3 d

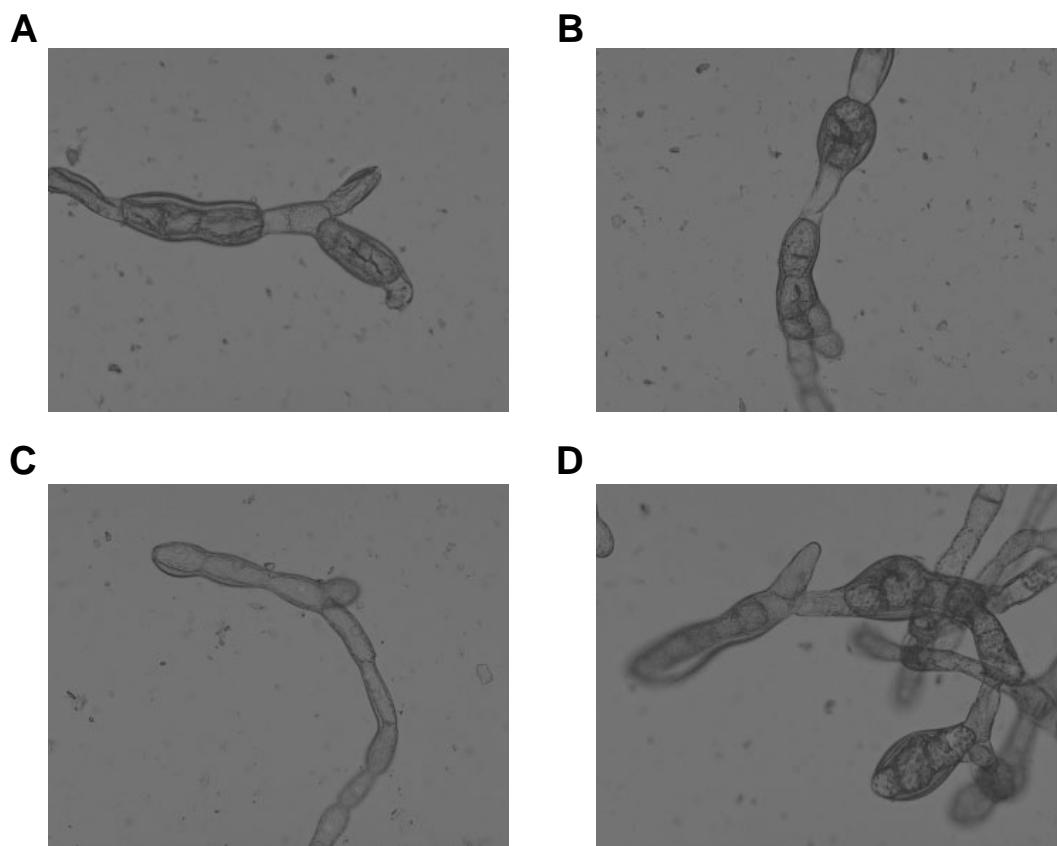


Abb. 2 Lichtmikroskopische Aufnahmen von *P. patens* als Beispiele für Zellwandverdickungen nach Cd(II)-Zugabe; A - 5 µM Cd(II) 4 d, B - 10 µM Cd(II) 3 d, C - 10 µM Cd(II) 4 d, D - 10 µM Cd(II) 5 d

Fluoreszenzmikroskopie mit BTC-5N

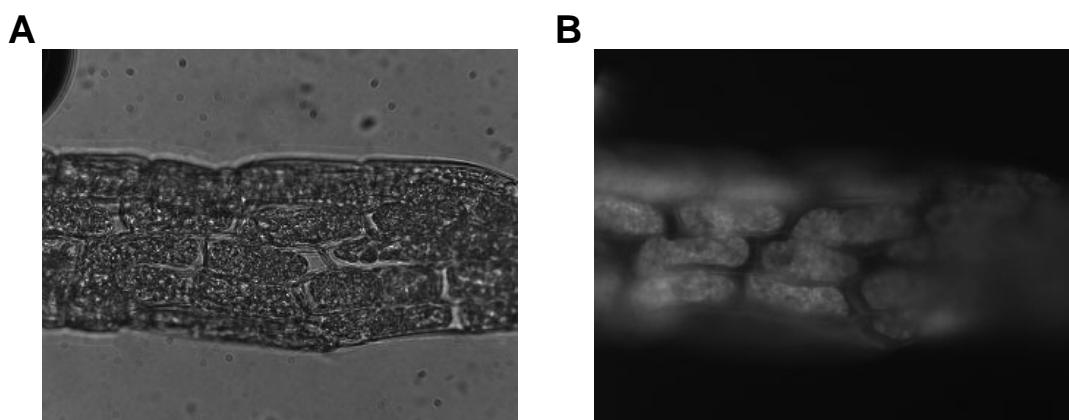


Abb. 3 Aufnahmen von *P. patens* nach Applikation (3 d) von 5 µM Cd(II) und Färbung mit 100 µM BTC-5N, A - lichtmikroskopische Aufnahme, B - Fluoreszenz-Aufnahme derselben Region

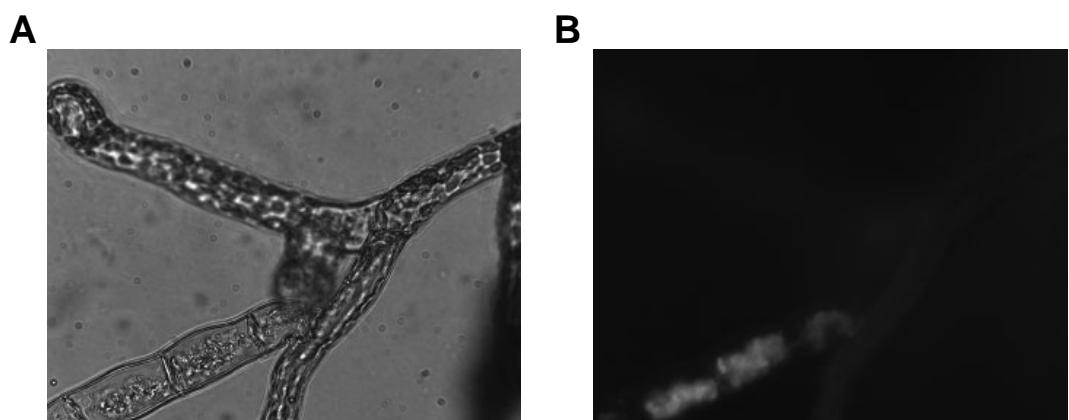


Abb. 4 Aufnahmen von *P. patens* nach Applikation (3 d) von 10 µM Cd(II) und Färbung mit 100 µM BTC-5N, A - lichtmikroskopische Aufnahme, B - Fluoreszenz-Aufnahme derselben Region

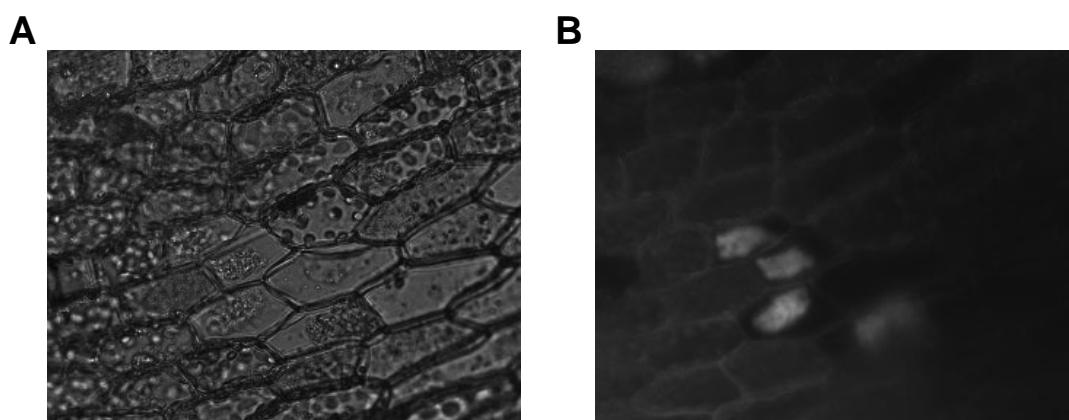


Abb. 5 Aufnahmen von *P. patens* nach Applikation (5 d) von 10 µM Cd(II) und Färbung mit 100 µM BTC-5N, A - lichtmikroskopische Aufnahme, B - Fluoreszenz-Aufnahme derselben Region

Elektronenmikroskopie

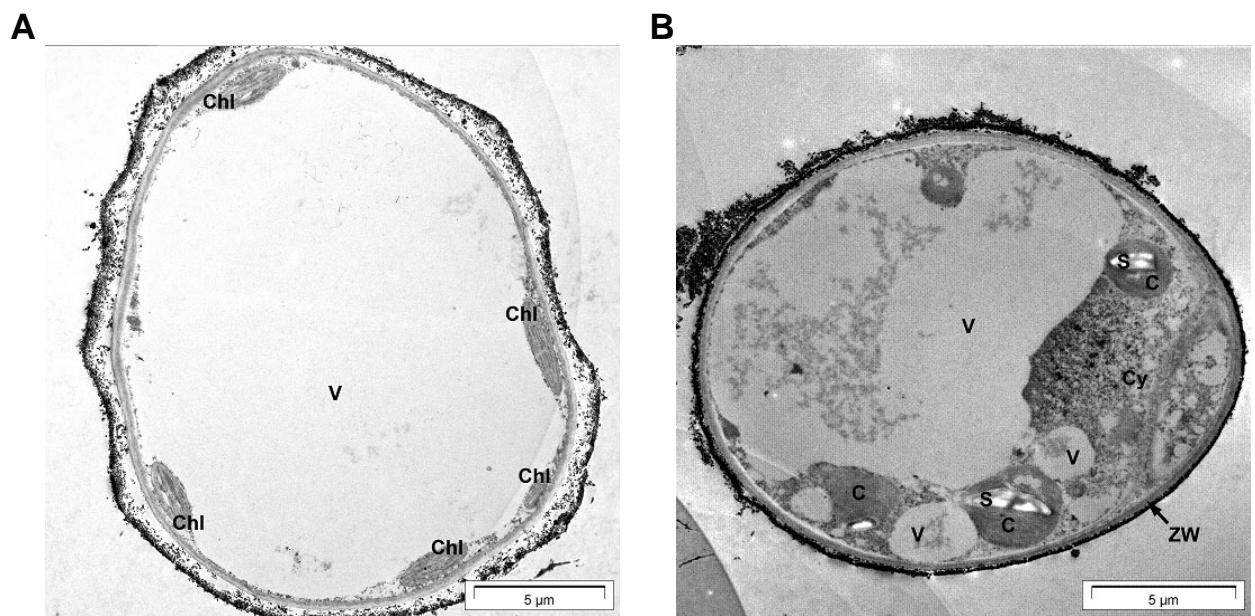


Abb. 6 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *P. patens*; A - Kontrolle 3d, B - 10 µM Cd(II) 3d;
Chl / C - Chloroplasten, Cy - Cytosol, S - Stärke, V - Vakuolen, ZW - Zellwand

Danksagung

Ich bedanke mich bei

Prof. Dr. G.-J. Krauß für die freundliche Überlassung des spannenden Themas, sein Interesse am Fortgang der Arbeit sowie für seine Diskussionsbereitschaft.

Dr. Dirk Wesenberg für die hervorragende Betreuung der Arbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre und seine freundliche und qualifizierte Hilfe im Labor und am Computer.

Prof. Dr. R. Hell (Heidelberger Institut für Pflanzenwissenschaften) für die Möglichkeit, die OAS-TL-Aufreinigung in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können.

Prof. Dr. S. Kopriva (John Innes Centre, Norwich, Großbritannien) für die Versorgung mit Δ apr-Mutanten.

Frau Dr. Sieglinde Menge für die Einführung in die HPLC-Analytik, ihr Interesse am Fortgang der Arbeit und ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Erika und Herbert für die Hilfe bei den Messungen der Enzymaktivität.

Corinna Bleuel, Michał Świeca und Clemens Cammann für das gute Arbeitsklima im Labor und die erfolgreiche Zusammenarbeit.

den Mitarbeitern der Abteilung Ökologische- und Pflanzenbiochemie, die durch ihre Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Frau Dr. M. Birschwilks (Institut für Pflanzenbiochemie, Halle) für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Frau G. Wiedemann (AG Reski, Freiburg i. Breisgau) für die Bereitstellung steriler *P. patens*-Kulturen.

der AG Humbeck und AG Köck für die Möglichkeit, die *real time*-PCR-Analysen an Ihren Geräten durchführen zu können.

der AG Nies, vor allem Gregor und Nadine, die mir mit ihren aufmunternden Worten zur Seite standen.

der AG Hell, insbesondere bei Dr. M Wirtz und C. Heeg, für die Hilfe bei der OAS-TL-Aufreinigung aus *P. patens*.

bei meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden für Ihre Unterstützung, ohne die das alles gar nicht möglich gewesen wäre. Tausend Dank!

Lebenslauf

ANGABEN ZUR PERSON

Name	Michael Rother, Dipl.-Biochem.
Anschrift	Rennbahnring 53, 06124 Halle
e-mail:	michael.rother@biochemtech.uni-halle.de
geb.	19.04.1978 in Halle/Saale, ledig

AUSBILDUNG

1984 – 1992	Polytechnische Oberschule „Karl Liebknecht“ in Halle
1992 – 1996	Abitur am mathematisch-naturwissenschaftlich-technischen Gymnasium „Georg Cantor“
1996 – 1997	zwölfmonatiger Grundwehrdienst
1997 – 2002	Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachrichtung Biochemie, Spezialisierungsrichtung: Ökologische und Pflanzen-Biochemie
2002	Diplomarbeit: „Zur Bildung Schwermetall-bindender Proteine in <i>Heliscus lugdunensis</i> Sac. et Therry unter Cadmium-Stress“
Seit 2002	Promotion: „Untersuchungen zur assimilatorischen Sulfatreduktion in <i>Physcomitrella patens</i> : Analyse von Transkripten, Metaboliten und Enzymaktivitäten unter Schwermetallstress“; Projekt im DFG-Graduiertenkolleg 416 "Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe"

PUBLIKATIONEN

M. Rother, G.-J. Krauss, G. Grass, D. Wesenberg	“Sulphate assimilation under Cd ²⁺ stress in <i>Physcomitrella patens</i> - combined transcript, enzyme and metabolite profiling” Plant Cell Environ 2006 29(9): 1801-11.
D. Wesenberg, M. Rother, C. Bleuel, S. Menge, G.-J. Krauss	“Single cell sampling and analysis (SiCSA) of cadmium-exposed <i>Physcomitrella patens</i> by thiol peptide profiling and quantitative PCR” In: Sulfur Transport and Assimilation in Plants in the Post Genomic Era (2005) Backhuys Publishers, Leiden, 237-240

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Weiterhin versichere ich, dass die Arbeit an keiner anderen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Halle, den 07. Mai 2007

Michael Rother