

**Untersuchungen zur Bedeutung des Glutathions bei der
Cadmium-Detoxifizierung in *Physcomitrella patens***

D i s s e r t a t i o n

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

vorgelegt der

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

von

Frau Diplom-Biochemikerin Corinna Bleuel

geb. am 21.02.1981 in Altenburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. G.-J. Krauß
2. Prof. Dr. K. Humbeck
3. Prof. Dr. R. Hell

Halle (Saale), 09.07.2009

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1. EINLEITUNG	1
1.1 Das Blasenmützenmoos <i>Physcomitrella patens</i>	1
1.2 Schwermetalle	3
1.3 Detoxifizierung von Schwermetallen	5
1.3.1 Glutathion und seine Bedeutung für die Schwermetalldetoxifizierung	6
1.4 Sulfatstoffwechsel in Pflanzen	10
1.4.1 Sulfatmangel-Stress	13
1.5 Nitratassimilation in Pflanzen	15
1.6 Zielstellung	16
2. MATERIALIEN UND METHODEN	17
2.1 Chemikalien	17
2.2 Anzucht und Kultivierung	17
2.2.1 Kultivierung unter Cadmium-Exposition	18
2.2.2 Kultivierung unter Sulfatmangel	18
2.2.3 Kultivierung unter Sulfatmangel und Cd-Exposition	18
2.2.4 <i>In-situ</i> -Markierung mit Monochlorobimban	18
2.2.5 ¹⁵ N-Tracer-Experimente	19
2.3 Probenentnahme und Vorbereitung	19
2.4 Vitalitätstest – Chlorophyllbestimmung	20
2.5 Nachweis thiolhaltiger Verbindungen	20
2.6 Bestimmung der Enzymaktivität der Glutathion-S-Transferasen (GST)	22
2.7 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)	23
2.8 Kapillarelektrophoretische Analyse von Sulfat	23

2.9	¹⁵N-Traceruntersuchungen.....	24
2.9.1	Trennung der Protein-(PN) und Nichtproteinfraktion (NPN)	24
2.9.2	Trennung der Glutathionfraktion.....	24
2.9.3	Bestimmung der ¹⁵ N-Häufigkeit.....	25
2.10	Transkriptanalyse	26
2.10.1	RNA-Isolierung	26
2.10.2	DNase-Verdau	26
2.10.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	27
2.10.4	Agarose-Gelelektrophorese	27
2.10.5	cDNA-Synthese.....	28
2.10.6	quantitative real-time-PCR (qRT-PCR)	28
2.11	Statistische Auswertung	29
3.	ERGEBNISSE	30
3.1	Auswirkungen von Cadmium-Exposition in <i>P. patens</i>.....	30
3.1.1	Vitalität unter Cd-Exposition	30
3.1.2	Thiolgehalte unter Cd-Exposition	33
3.1.3	Sulfatgehalt unter Cd-Exposition	37
3.1.4	¹⁵ N-Tracer-Studien unter Cd-Exposition.....	38
3.2	Auswirkungen von Sulfatmangel auf <i>P. patens</i>	40
3.2.1	Vitalität unter Sulfatmangel	40
3.2.2	Thiolgehalte unter Sulfatmangel	42
3.2.3	Sulfatgehalt unter Sulfatmangel	44
3.2.4	Transkriptmengen der Enzyme der reduktiven Sulfatassimilation.....	45
3.3	Einfluss von Sulfatmangel auf die Cd-Toxizität.....	46
3.3.1	Vitalität unter Sulfatmangel und Cd-Exposition	46
3.3.2	Thiolgehalte unter Sulfatmangel und Cd-Exposition	48
3.3.3	Sulfatgehalt unter Sulfatmangel und Cd-Exposition	50
3.4	Einfluss von langfristigem Sulfatmangel auf die Cadmium-Toxizität	50
3.4.1	Vitalität unter langfristigem Sulfatmangel und Cadmium-Exposition.....	50
3.4.2	Thiolgehalte unter langfristigem Sulfatmangel und Cadmium-Exposition.....	53
3.5	<i>In-situ</i>-Markierung mit Monochlorobiman	54
3.5.1	Visualisierung der <i>in-situ</i> -Markierung mit Monochlorobiman	54
3.5.2	<i>In-situ</i> -Markierung von Glutathion in Kontroll- und Cd-exponierten Kulturen.....	55
3.5.3	<i>In-situ</i> -Markierung von Cystein und γ -Glutamylcystein.....	57
3.5.4	<i>In-situ</i> -Markierung unter Sulfatmangel.....	61
3.5.5	Enzymaktivität der Glutathion-S-Transferasen während <i>in-situ</i> -Markierung	64

3.5.6	Abbau des Glutathion-Biman-Konjugats	64
4.	DISKUSSION	66
4.1	Auswirkungen von Cadmium-Exposition in <i>P. patens</i>	66
4.2	Auswirkungen von Sulfatmangel.....	74
4.3	Einfluss von Sulfatmangel auf die Cd-Toxizität.....	78
4.4	<i>In-situ</i> -Markierung mit Monochlorobiman	81
5.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	90
6.	LITERATURVERZEICHNIS	93
	ANHANG	106
	DANKSAGUNG	109
	LEBENS LAUF	110
	ERKLÄRUNG	111

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. bidest.</i>	bidestilliertes Wasser
ABC-Transporter	<i>ATP binding cassette transporter</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APR	APS-Reduktase
APS	Adenosylphosphosulfat
APSK	APS-Kinase
at.-% exc.	Atom-% Excess (Überschusshäufigkeit)
ATP	Adenosintriphosphat
ATPS	ATP-Sulfurylase
BSO	Buthioninsulfoximin
Cd[GS] ₂	Cadmiumbisglutathionatkomplex
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzen
CHES	2-(Cyclohexylamino)ethansulfonsäure
Chl	Chlorophyll
CLSM	<i>confocal laser scanning microscopy</i>
C _t	<i>threshold cycle</i> (Schwellenwert)
Cys	Cystein
Cys-B	Cysteinbimankonjugat
CysSC	Cysteinsynthase-Komplex
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	<i>energy dispersive X-ray analysis</i>
EELS	<i>electron energy loss spectroscopy</i>
FM	Frischmasse
GGT	γ-Glutamyltranspeptidase
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GOGAT	Glutamatsynthase
GS	Glutaminsynthetase
GS-B	Glutathionbimankonjugat
GSH	Glutathion

GSHS	Glutathion-Synthetase
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
ID	Innendurchmesser
MBB	Monobromobiman
Mbp	Megabasenpaare
MCB	Monochlorobiman
MRP	<i>multidrug resistance-associated protein</i>
NPN	Nicht-Protein-Fraktion
n.s.	nicht signifikant
OAS	O-Acetylserin
OAS-TL	O-Acetylserin(thiol)lyase
PAPR	PAPS-Reduktase
PAPS	Phosphoadenosylphosphosulfat
PC	Phytochelatin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCS	Phytochelatinsynthase
PI	Propidiumiodid
PN	Proteinfraktion
PS	Photosystem
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RP	<i>reversed phase</i>
RuBisCO	Ribulosebisphosphatcarboxylase/oxygenase
SAT	Serinacetyltransferase
SiR	Sulfitreduktase
ST	Sulfattransporter
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
YCF	<i>yeast cadmium factor</i>
γ -EC	γ -Glutamylcystein
γ -EC-B	γ -EC-Bimankonjugat
γ -ECS	γ -EC-Synthetase

1. Einleitung

1.1 Das Blasenmützenmoos *Physcomitrella patens*

In der vorliegenden Arbeit diente das Blasenmützenmoos *Physcomitrella patens* (Abb. 1) als Modellorganismus für die Untersuchung von Cadmium¹- und Sulfatmangel-Stress. *P. patens* ist ein terrestrisches Laubmoos aus der Ordnung der Funariales (Tabelle 1, Frey *et al.*, 1995; Shaw & Goffinet, 2000).

Tabelle 1 Taxonomische Einordnung des Blasenmützenmooses *P. patens* (nach Shaw & Goffinet, 2000)

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

Die Funariales sind kleine, rosettenförmige, kurzlebige Erdmoose (Frahm, 2001), die nährstoffreiche Böden besiedeln. Im Oktober 2002 fand man an der Urfttalsperre einen großen Bestand an *Riccia cavernosa* und *P. patens* (Weddeling, 2002). Aufgrund des niedrigen Wasserstandes wurden zu dieser Zeit weite Schlammflächen freigelegt. Generelle Einschätzungen zum Vorkommen und der Gefährdung von *P. patens* sind schwierig, da es keine vollständige Kartierung für dieses Moos in Deutschland gibt (Weddeling, 2002).



Abb. 1 Flüssigkultur von *Physcomitrella patens* (Protonema)

¹ In der vorliegenden Arbeit ist bei Verwendung von Cadmium/Cd bzw. Schwermetall stets die entsprechende ionische Form gemeint.

Der Lebenszyklus (Abb. 2) von *P. patens* wird durch einen phototrophen, haploiden Gametophyten dominiert. Dieser ist durch zwei verschiedene Entwicklungsstadien charakterisiert: Protonema und Moospflänzchen (Gametophor). Das Protonema besteht aus zwei Zelltypen: Chloronema (viele Chloroplasten) und Caulonema (wenige, schwach entwickelte Chloroplasten, schräggehende Zellwände, Schaefer & Zryd, 2001; Cove *et al.*, 2006). Durch die Dominanz des haploiden Gametophyten eignet sich *P. patens* sehr gut für genetische Studien. Die effiziente homologe Rekombination in *P. patens*, vergleichbar mit der von Hefe, ermöglicht die Inaktivierung von Genen und somit die Untersuchung von deren Funktion (Schaefer, 2001; Quatrano *et al.*, 2007). Die kürzliche Aufklärung des Genoms (ca. 500 Mbp, 27 Chromosomen) birgt weitere Vorteile für zukünftige molekularbiologische Studien sowie genauere Einblicke in die Evolution höherer Landpflanzen (Quatrano *et al.*, 2007; Rensing *et al.*, 2008). Generell sind Moose durch ihren einfachen Bau und die anspruchslose Kultivierung in Flüssigmedium oder auf Agar gut geeignet für Stoffwechsel- und Entwicklungsuntersuchungen (Cove *et al.*, 2006). Im Jahre 2004 wurde durch ein Proteom-mapping von Protonemazellen mittels 2-D-Gelelektrophorese und anschließende Massenspektrometrie die Basis für umfassende Proteomanalysen in *P. patens* gelegt (Sarnighausen *et al.*, 2004).

Eine weitere große Bedeutung kommt dem Blasenmützenmoos als „Moos-Bioreaktor“ zu (Decker & Reski, 2004). Durch gezielte genetische Modifikationen kann *P. patens* pharmazeutische Proteine mit einem bestimmten, für den Menschen verträglichen Glykosilierungsmuster produzieren, die dann als Therapeutika eingesetzt werden können (Decker & Reski, 2004; Decker & Reski, 2008, www.greenovation.com).

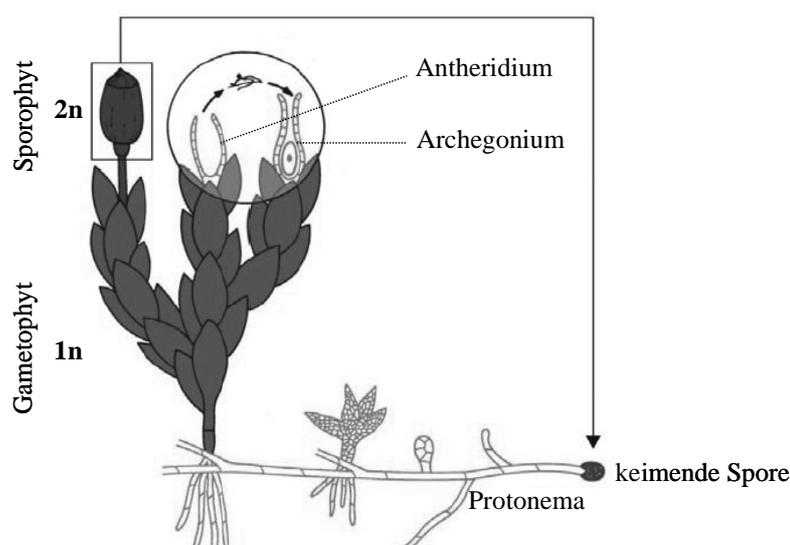


Abb. 2 Lebenszyklus von *Physcomitrella patens* (Abbildung entnommen aus www.plant-biotech.net und modifiziert). *P. patens* ist ein monoözisches Moos, bei dem sich Antheridien und Archegonien auf der gleichen Pflanze befinden.

1.2 Schwermetalle

Der Begriff Schwermetall lässt sich in verschiedenster Weise definieren. Duffus (2002) konnte in einem Review 40 verschiedene, in der Literatur benutzte Definitionen zusammentragen, die sich u. a. auf spezifische Dichte, Atomgewicht, Ordnungszahl und chemische Eigenschaften bezogen. Jedoch gibt es auch in den einzelnen Gruppen keine Klarheit. Für die Definition nach der spezifischen Dichte konnten Angaben von größer als $3,5$ bis 7 g cm^{-3} gefunden werden (Duffus, 2002). Die vorgeschlagenen Klassifizierungen der Metalle nach Elektronenkonfiguration oder ihrem Lewissäure-Verhalten sollen eine bessere Beurteilung ihrer Toxizität ermöglichen.

In dieser Arbeit soll eine Unterscheidung der Schwermetalle in essenziell und nicht-essenziell getroffen werden. Zu den **essenziellen** Schwermetallen gehören u. a. Eisen, Mangan, Zink, Kupfer und Molybdän, die als Mikroelemente wichtige Nährstoffe für Pflanzen sind (Schopfer & Brennicke, 2006). Man findet sie vor allem als Cofaktoren im aktiven Zentrum von Enzymen. Essenzielle Metalle werden in bestimmten, meist sehr geringen Konzentrationen für die pflanzliche Entwicklung benötigt. Somit haben sowohl Mangel als auch Überschuss dieser Metalle negative Folgen. Überschüssige Kupfer- und Zinkionen haben vielfältige Auswirkungen, die meist die Photosynthese betreffen (Krämer & Clemens, 2006). **Nicht-essenzielle** Schwermetalle, wie z. B. Cadmium, Blei und Quecksilber sind schon in sehr geringen Konzentrationen toxisch und haben keinerlei physiologische Bedeutung. Für Cadmium ist jedoch eine Ausnahme beschrieben: In der marinen Diatomee *Thalassiosira weissflogii* wird unter Zinkmangelbedingungen, wie sie häufig in der Meeresumgebung vorkommen, eine Cd-spezifische Carboanhydrase exprimiert (Lane & Morel, 2000; Lane *et al.*, 2005).

Die Toxizität von Schwermetallen beruht auf vielfältigen Mechanismen. Nach dem HSAB-Prinzip (Pearson, 1963) binden Schwermetalle wie Cd, Hg und Pb als weiche Lewis-Säuren bevorzugt an SH-Gruppen. Dies führt in der Zelle zu Strukturveränderungen von Proteinen/Enzymen, Austausch von Zentralionen im aktiven Zentrum von Enzymen sowie die Beeinflussung des Thiolgehaltes durch Komplexbildung mit Glutathion bzw. Phytochelatin-Synthese. In Pflanzen ist vor allem die Photosynthese ein Angriffspunkt für Schwermetalle. Sie verursachen z. B. die Hemmung der Ribulosebisphosphatcarboxylase/oxygenase (RuBisCO) und eine verminderte Chlorophyllbiosynthese durch die Beeinträchtigung der 5-Aminolävulinatdehydratase (Padmaja *et al.*, 1990; Pietrini *et al.*, 2003). Weiterhin kann das zentrale Magnesiumion im Chlorophyllmolekül durch Schwermetalle verdrängt werden (Küpper *et al.*, 1996; Küpper *et al.*, 1998). Für Zink konnte auch die Fähigkeit zur

Verdrängung von Mangan aus dem wasserspaltenden Komplex gezeigt werden (van Assche & Clijsters, 1986). Neben dem Photosyntheseapparat ist ebenso der Redoxzustand pflanzlicher Zellen durch Schwermetalle gefährdet. Redoxaktive Schwermetalle, wie z. B. Cu, sind in der Lage, über die Fenton-Reaktion freie Sauerstoffradikale zu bilden oder Lipidperoxidationen zu verursachen, die membranabhängige Prozesse, wie Photosynthese und Atmung, schädigen (Brunold *et al.*, 1996). Nicht-redoxaktive Schwermetalle, wie z. B. Cadmium, können aber ebenfalls oxidativen Stress durch Veränderung des Glutathion-*pools* der Zellen oder Aktivitätsverminderung antioxidativer Enzyme verursachen (Sanità Di Toppi & Gabbrielli, 1999).

Schwermetalle, und somit auch Cd, sind natürliche Bestandteile der Erdkruste. Durchschnittlich liegt der Cd-Gehalt im Boden bei $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ (Alloway, 1999), in Bodenlösungen bei $0,04\text{--}0,32 \text{ }\mu\text{M}$ (Sanità Di Toppi & Gabbrielli, 1999). Durch den anthropogenen Eintrag (Metallindustrie, Verbrennungsprozesse, Klärschlammdüngung) kann es jedoch zu lokalen Anreicherungen kommen, bei denen diese Konzentration deutlich überschritten wird. Bodenlösungen mit Cd-Konzentrationen über $0,32$ bis $1 \text{ }\mu\text{M}$ gelten schon als belastet (Sanità Di Toppi & Gabbrielli, 1999). Die bisher höchste gemessene Cd-Konzentration einer Bodenlösung lag bei $70 \text{ }\mu\text{M}$, welche durch Chemiefabriken verursacht wurde (in Taiwan, Lee *et al.*, 2004). Bei Untersuchungen zur Auswirkung von Cd auf pflanzliche Stoffwechselprozesse unter Laborbedingungen sollte immer auf umweltrelevante Konzentrationen geachtet werden, um die ökologische Relevanz herauszuarbeiten (Ernst *et al.*, 2008). Sowohl in der Natur als auch unter Laborbedingungen ist die Aufnahme von Schwermetallen jedoch nicht nur von der extrazellulären Konzentration, sondern auch von der Bioverfügbarkeit abhängig. Die Bioverfügbarkeit von Cd wird u. a. durch organische Stoffe, pH-Wert, Redoxpotenzial, Temperatur und andere Elemente beeinflusst (Sanità Di Toppi & Gabbrielli, 1999). Die Cd-Aufnahme selbst in die Pflanzen erfolgt unspezifisch über Fe^{2+} -, Ca^{2+} - und Zn^{2+} -Transporter bzw. -Kanäle mit einer geringen Spezifität (Clemens, 2001; Clemens, 2006b).

Moose gelten im Allgemeinen als Schwermetallakkumulatoren aufgrund der direkten Nährstoffaufnahme über die Oberfläche (Frahm, 2001). Daher können Moose sehr gut als Bioindikatoren für Schwermetallbelastungen der Atmosphäre, von Böden und Gewässern eingesetzt werden. Zur Untersuchung aquatischer Ökosysteme wird hierbei häufig das Gemeine Wassermoos *Fontinalis antipyretica* als Bioindikator verwendet (u. a. Bruns *et al.*, 1997; Cenci, 2001; Samecka-Cymerman *et al.*, 2002; Bleuel *et al.*, 2005).

1.3 Detoxifizierung von Schwermetallen

Im Laufe der Evolution haben Pflanzen zwei wesentliche Strategien zur Schwermetallentgiftung entwickelt. *Avoidance*-Mechanismen dienen dem Ausschluss der Schwermetalle, beispielsweise durch Wurzelausscheidungen oder Bindung an die Zellwand. Die Sekretion von Histidin und Citrat führte in einer nicht-hyperakkumulierenden *Thlaspi*-Art zu einer Verminderung der Nickelaufnahme aus dem Boden (Salt *et al.*, 2000). Die Bindung von Schwermetallen an die Zellwand ist vor allem für Moose hinsichtlich der Detoxifizierung von großer Bedeutung. Untersuchungen der Arbeitsgruppe Krauß an dem aquatischen Moos *Fontinalis antipyretica* zeigten eine rasche Biosorption von Cd an die Zellwand (Sutter, 2000; Bleuel *et al.*, 2005). Auch für Pb und Zn wurde eine Biosorption an die Zellwand festgestellt (Sutter, 2000). Für terrestrische Moose konnte ebenfalls die Bindung von Schwermetallen (Cu, Zn, Cd, Cr, Ni) an die Oberfläche nachgewiesen werden (Al-Asheh & Duvnjak, 1997). *Physcomitrella patens* hingegen adsorbiert nur sehr geringe Mengen Cd an die Zellwand (Rother, 2007). Dies ist möglicherweise auf eine andere Zellwandzusammensetzung, wie z. B. dem Anteil an Pektinsäuren zurückzuführen. Eine solche Abhängigkeit konnte für drei verschiedene *Sphagnum*-Arten gezeigt werden (Breuer & Melzer, 1990). Des Weiteren wird die Biosorption von Cd durch den pH-Wert beeinflusst (Martins *et al.*, 2004).

Die Aufnahme von Schwermetallen induziert *tolerance*-Mechanismen, die stoffwechselphysiologische Veränderungen in den Pflanzenzellen hervorrufen. Es kommt zur Synthese schwermetallkomplexierender Verbindungen. Neben der großen Gruppe der thiolhaltigen Peptide sind auch organische Säuren und Aminosäuren an der Schwermetallentgiftung beteiligt (Rauser, 1999; Clemens, 2001; Hall, 2002). Zur Gruppe der Thiolpeptide zählen Glutathion (GSH), Phytochelatine (PC) und Metallothioneine (MT). Thiolgruppen sind weiche Lewis-Basen und daher nach dem HSAB-Prinzip (Pearson, 1963) prädestiniert, weiche Lewis-Säuren, wie z. B. Cadmiumionen, zu chelatieren. Die gebildeten Schwermetallkomplexe werden letztendlich in die Vakuole transportiert (Hall, 2002). Der Transport von Cd[GS]₂- bzw. Cd-PC-Komplexen in die Vakuole erfolgt in Pflanzen vermutlich über ABC-Transporter. Erste Kenntnisse zu diesen Transport-Prozessen wurden durch Untersuchungen an Hefen erhalten. In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* erfolgt der Transport von Cd[GS]₂-Komplexen über den ABC-Transporter YCF1 in die Vakuole (Li *et al.*, 1997). YCF1 ist ein membrangebundenes Protein, das den Mg-ATP-abhängigen Transport von Glutathion-Konjugaten katalysiert und Sequenzhomologien zu den menschlichen MRP-Proteinen (*multidrug resistance-associated*) besitzt (Li *et al.*, 1996). Die Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* besitzt ebenfalls ein ABC-Transporter-Protein (HMT1), das in der

Lage ist, Apo-PC und Cd-PC-Komplexe in die Vakuole zu transportieren (Ortiz *et al.*, 1995). Für den Transport von Cd-Komplexen in die Vakuole von *A. thaliana* kommen ebenfalls ABC-Transporter (AtMRP) in Frage. Die Expression von *AtMRP3* wird durch Cd stark erhöht (Bovet *et al.*, 2003). Die Überexpression von *YCF1* in *Arabidopsis thaliana* führte zu einer gesteigerten Cd-Toleranz (Song *et al.*, 2003). In der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* wurde ein ABC-Transporter, CrMRP2, mit Sequenzähnlichkeiten zu HsMRP1 (*Homo sapiens*), AtMRP3 und ScYCF1 gefunden, der am Transport von Cd in die Vakuole beteiligt ist (Wang & Wu, 2006).

In Algen, wie z. B. *C. reinhardtii* und *Euglena gracilis* gibt es einen weiteren Speicherort für Cd. Hier wurde die Ablagerung von Cd-PC-Komplexen im Chloroplasten beschrieben (Nagel *et al.*, 1996; Mendoza-Cozatl *et al.*, 2006).

1.3.1 Glutathion und seine Bedeutung für die Schwermetalldetoxifizierung

Glutathion (γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin, GSH) ist ein Tripeptid, bestehend aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin (Abb. 3 A), und kommt in Zellen in zwei verschiedenen Redoxzuständen vor: reduziert (GSH) und oxidiert (GSSG). In einigen Pflanzen sind Analoge, sogenannte Isoformen, beschrieben, bei denen das endständige Gly durch andere Aminosäuren wie β -Alanin (Homo-GSH, Leguminosen, Klapheck, 1988), Glutamat (Mais, Meuwly *et al.*, 1993) oder Serin (Poaceae/Gramineae, Klapheck *et al.*, 1994; Okumura *et al.*, 2003) ausgetauscht ist (Abb. 3 B-D).

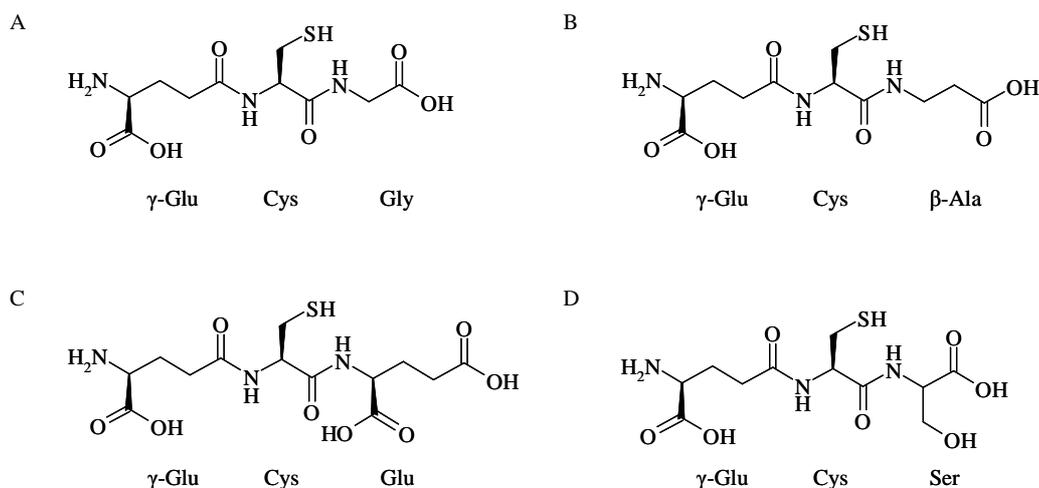


Abb. 3 Strukturformeln von Glutathion und Analogen des Glutathions in undissoziierter Form. A - GSH, B - Homo-GSH, C - γ -Glutamylcysteinylglutamat, D - Hydroxymethyl-GSH

Die GSH-Biosynthese erfolgt in zwei ATP-abhängigen Schritten. Zunächst katalysiert die γ -Glutamylcystein-Synthetase (γ -ECS) die Knüpfung einer partiellen Isopeptidbindung zwischen Glutamat und Cystein. Danach überträgt die Glutathion-Synthetase (GSHS) Gly auf das gebildete γ -EC. Die Bildung von GSH findet sowohl im Cytosol als auch in den Chloroplasten statt (Noctor & Foyer, 1998; Leustek *et al.*, 2000). In dem Modellorganismus *A. thaliana* sowie in *Brassica juncea* wurde festgestellt, dass die γ -ECS ausschließlich in den Chloroplasten lokalisiert ist (Abb. 4). Die GSHS ist hingegen vorwiegend ein cytosolisches Enzym, welches aber auch im Chloroplasten lokalisiert sein kann (Wachter *et al.*, 2005). Wie in tierischen Zellen ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der GSH-Biosynthese die Bildung von γ -EC durch die γ -ECS. Deren Aktivität wird posttranslational durch das Endprodukt GSH (Noctor *et al.*, 2002) und die Redox-Umgebung reguliert (siehe Review: Meyer & Hell, 2005). Xiang und Oliver (1998) stellten unter Cd-Exposition auch eine Regulation auf Transkriptebene fest. Da die Synthese der drei Aminosäuren Glu, Cys und Gly Voraussetzung für die GSH-Biosynthese ist, ist diese gleichzeitig auch abhängig von der Regulation des Kohlenstoff-, Stickstoff und Schwefelmetabolismus (Kopriva & Rennenberg, 2004). Glycin wird hauptsächlich über die Photorespiration gebildet, womit auch Licht ein wichtiger Faktor für die GSH-Biosynthese ist (Buwalda *et al.*, 1988; Noctor *et al.*, 1997).

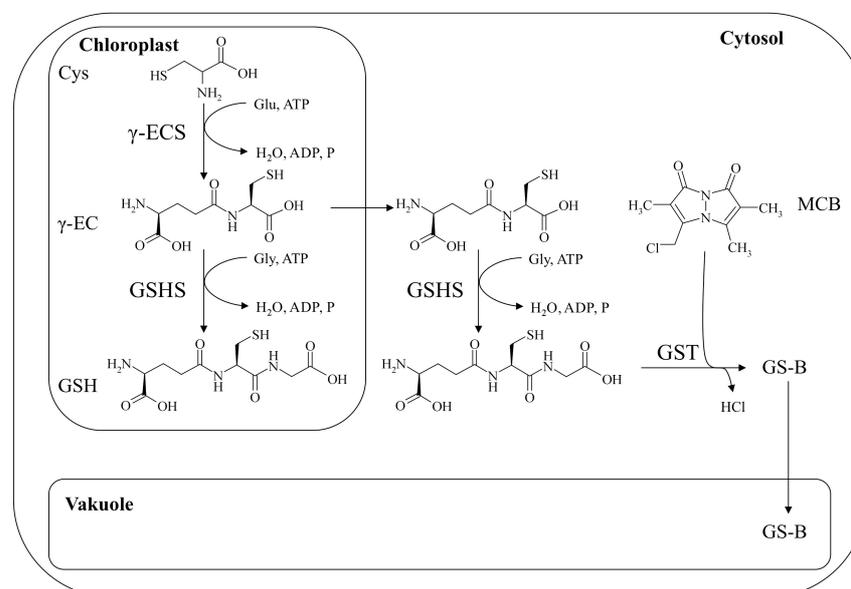


Abb. 4 Schematische Darstellung der subzellulären Kompartimentierung der GSH-Biosynthese und der *in-situ*-Markierung von GSH mit MCB in *A. thaliana* (modifiziert nach Meyer & Hell, 2005)

Der Abbau von GSH bzw. GSH-Konjugaten findet in der Vakuole statt (Abb. 4). Diese Reaktion beginnt entweder mit der Abspaltung des γ -Glu- oder des Gly-Restes. In Pflanzen

gibt es Belege für beide Abbauwege. In *A. thaliana* startet der Abbau des Glutathion-Bi-man-Konjugates durch Abspaltung des γ -Glu-Restes, katalysiert durch eine γ -Glutamyltranspeptidase (Grzam *et al.*, 2007; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007). Die Abspaltung des Gly-Restes als initialen Schritt wurde in Gerste nach Exposition mit Alachlor beobachtet. Diese Reaktion wurde durch ein vakuoläre Carboxypeptidase katalysiert (Wolf *et al.*, 1996).

Der GSH-Gehalt in Blättern liegt zwischen 0,1 und 1,5 mM (Mullineaux & Rausch, 2005). Die chloroplastidären GSH-Gehalte liegen im Bereich von 1-4,5 mM (Noctor & Foyer, 1998), sehr frühe Arbeiten indizierten sogar Gehalte bis zu 20 mM (Mullineaux & Rausch, 2005). Diese Gehalte sagen jedoch nichts über zellspezifische GSH-Gehalte des Cytosols aus, da sie durch Extraktion ganzer Blätter erhalten wurden bzw. kann auch die Fraktionierung von Zellorganellen zu Artefakten führen (Mullineaux & Rausch, 2005). Möglichkeiten, dies zu überwinden, bietet die *in-situ*-Markierung von GSH mit Monochlorobiman (MCB, S. 7, Abb. 4). Der nicht-fluoreszierende Farbstoff MCB wird in der Zelle durch cytosolische Glutathion-S-Transferasen (GST) mit GSH konjugiert, und es bildet sich ein fluoreszierendes Konjugat (GS-B), welches mittels konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie sichtbar gemacht und quantifiziert werden kann (Fricker *et al.*, 2000; Gutierrez-Alcala *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2003). Mit dieser Technik wurde in photosynthetischen und nicht-photosynthetischen Zellen von Pappelblättern eine GSH-Konzentration von 0,2 bis 0,3 mM ermittelt (Hartmann *et al.*, 2003). Neben Cytosol und Chloroplasten enthalten auch andere Zellkompartimente, wie Zellkern, Mitochondrien und Peroxisomen, GSH. Obwohl Mitochondrien nicht in der Lage sind, GSH selbst zu synthetisieren, wurde kürzlich für *A. thaliana* mittels Immunogold-*Labelling* gezeigt, dass diese deutlich mehr GSH enthalten als Plastiden (Zechmann *et al.*, 2008). Über den GSH-Transport zwischen Cytosol und Organellen ist bis jetzt jedoch kaum etwas bekannt (Rouhier *et al.*, 2008).

Glutathion ist für Pflanzen der größte Speicher an organischem, nicht-proteinogenem Schwefel (Noctor *et al.*, 2002) und hat zahlreiche physiologische Aufgaben in der Zelle (siehe Reviews: Meyer & Hell, 2005; Rouhier *et al.*, 2008). GSH spielt eine zentrale Rolle im Redoxstatus der Zellen. Es wirkt als Redoxpuffer und ist an der Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt. Neben der direkten Oxidation durch ROS, wie H_2O_2 , ist GSH auch über den Ascorbat-GSH-Zyklus in die ROS-Detoxifizierung involviert. Außerdem dient GSH als Elektronendonator für einige Peroxidasen und ist an post-translationalen Modifizierungen von Proteinen durch Glutaredoxin-abhängige Glutathionierungen beteiligt. Darüber hinaus kommt GSH eine große Bedeutung bei der Entgiftung von Xenobiotika und Schwermetallen zu (Grill *et al.*, 2002). Xenobiotika, wie z. B. Herbizid-*safener*, aber auch

MCB, welches zur *in-situ*-Markierung von GSH eingesetzt wird, werden im Cytosol durch GST mit GSH konjugiert. Die gebildeten Konjugate werden in die Vakuole transportiert, wo sie abgebaut werden (Dixon *et al.*, 1998). Bei der Detoxifizierung von Schwermetallen, wie Cd, kann GSH selbst als Chelatormolekül dienen oder als Präkursor für die Synthese von Phytochelatinen (PC). PC sind kleine Peptide der generellen Struktur $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ (Grill *et al.*, 1985) und kommen in höheren Pflanzen, Pilzen, Algen und Protisten vor (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005). Wie beim GSH existieren auch bei PC Isoformen, bei denen das C-terminale Gly durch Aminosäuren wie Ser, Glu, $\beta\text{-Ala}$ (Cobbett & Goldsbrough, 2002) oder Glutamin (Ducruix *et al.*, 2006) ausgetauscht ist. Des Weiteren gibt es Isoformen, bei denen das C-terminale Gly fehlt (Oven *et al.*, 2001) oder sich am N-Terminus ein zusätzlich Cys befindet (Pawlik-Skowronska, 2003; Sarry *et al.*, 2006). Die PC-Synthese erfolgt nicht-ribosomal ausgehend von zwei Molekülen GSH und wird durch eine Transpeptidase (Phytochelatinsynthase, PCS) katalysiert (Grill *et al.*, 1989). Unter Abspaltung von Gly wird zunächst PC₂ gebildet. Längerkettige PC entstehen durch Übertragung weiterer GSH-Moleküle. Die Aktivierung der PCS erfolgt nicht durch freie Metallionen, sondern durch Metall-GSH-Komplexe, wie z. B. Cd[GS]₂-Komplexe (Vatamaniuk *et al.*, 2000; Oven *et al.*, 2002). Neben Cd als stärkstem Aktivator sind auch Pb²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Sb³⁺, Ag⁺, Hg²⁺, AsO₄³⁻ in der Lage, die PCS zu aktivieren (Clemens, 2006a). Durch Komplexierung der Schwermetalle mit PC kommt es zur Abnahme der PCS-Aktivität (Loeffler *et al.*, 1989). In der Literatur gibt es auch Hinweise auf eine Beteiligung der PCS am Glutathion-Konjugat-Abbau durch eine Carboxypeptidaseaktivität (Beck *et al.*, 2003; Blum *et al.*, 2007).

Zum PC-Vorkommen in Moosen gibt es jedoch unterschiedliche Aussagen in der Literatur. Bei der Untersuchung 19 verschiedener terrestrischer und aquatischer Moose aus 11 verschiedenen Ordnungen (darunter 17 Laubmoose wie z. B. *F. antipyretica* und *P. patens* sowie 2 Lebermoose) konnten keine PC unter Cd-Exposition detektiert werden (Bruns *et al.*, 2001). Für die Lebermoose *Marchantia polymorpha* (Gekeler *et al.*, 1989) und *Lunularia cruciata* (Carginale *et al.*, 2004) wurde eine PC-Synthese beschrieben, allerdings ohne die Peptide eindeutig zu identifizieren. Kürzlich in der Arbeitsgruppe Krauß durchgeführte Analysen mit verschiedenen Moosen der Unterklasse *Jungermanniiidae*, welche ebenfalls zur Abteilung Marchantiophyta gehören, zeigen auch eine Induktion von PC unter Cd, die eindeutig durch MS identifiziert wurden (unveröffentlichte Daten). Der PC-Nachweis erfolgt meist durch chromatographische Trennung und anschließende Ellman-Derivatisierung (Grill *et al.*, 1991), wobei die publizierten Daten oft den massenspektrometrischen Nachweis vermissen lassen. Dieser ist jedoch sehr wichtig, da beispielsweise Coumarine unter den

basischen Bedingungen für eine PC-Analyse vergleichbare UV/VIS-Absorptionseigenschaften haben und somit eine PC-Induktion vortäuschen können (Berlich *et al.*, 2002). Des Weiteren hat auch der pH-Wert des Extraktionsmittels einen Einfluss auf die PC-Analyse (Möller, 2007). Unter Beachtung dieser experimentellen Bedingungen kann für *P. patens* eine PC-Synthese ausgeschlossen werden. Dies wird auch durch das Fehlen eines PCS-Gens unterstützt (Kopriva *et al.*, 2007b). Cd führt in *P. patens* zu einer Erhöhung des GSH-Gehaltes (Bruns *et al.*, 2001; Rother *et al.*, 2006). Daraus konnte abgeleitet werden, dass GSH zur Cd-Komplexierung bereitgestellt wird, ähnlich wie in *F. antipyretica* (Bruns *et al.*, 2001).

1.4 Sulfatstoffwechsel in Pflanzen

Neben Kohlenstoff, Stickstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Phosphor, Kalium, Calcium und Magnesium gehört Schwefel zu den von Pflanzen benötigten Makroelementen (Schopfer & Brennicke, 2006) und ist essenziell für die Bildung von Cystein, einer zentralen Verbindung für die GSH-, Methionin- und Proteinbiosynthese. Schwefel kommt auf der Erde hauptsächlich als Sulfat mit dem Valenzzustand +6 vor. Daneben existieren aber noch drei weitere Oxidationsstufen, die in anaeroben und vulkanischen Umgebungen sowie lebenden Zellen zu finden sind (Tabelle 2, Leustek, 2002). Pflanzen nehmen Schwefel hauptsächlich als Sulfat aus dem Boden oder Wasser auf.

Tabelle 2 Valenzzustände von anorganischem Schwefel (nach Leustek, 2002)

	Chemische Formel	Valenzzustand
Sulfat	SO_4^{2-}	+6
Sulfit	SO_3^{2-}	+4
elementarer Schwefel	S^0	0
Schwefelwasserstoff	H_2S	-2

Die Bildung von Cystein aus Sulfat erfolgt in Pflanzen über die reduktive Sulfatassimilation und umfasst **vier Schritte** (S. 11, Abb. 5, siehe Reviews: Leustek, 1996; Hell, 1997; Leustek & Saito, 1999; Leustek *et al.*, 2000; Leustek, 2002; Saito, 2004). Die **Aufnahme** von Sulfat in die Pflanzen erfolgt aktiv über Protonen/Sulfat-Cotransporter (ST). Pflanzliche Sulfattransporter gehören einer Genfamilie an, die sich in fünf verschiedene Gruppen einteilen lässt (Buchner *et al.*, 2004; Kopriva, 2006). Zur Gruppe 1 gehören *high-affinity*-Sulfattransporter, über welche Sulfat aus der Bodenlösung in die Wurzeln aufgenommen wird. Gruppe-2-Sulfattransporter sind *low-affinity*-Sulfattransporter, die für den Transport von Sulfat innerhalb der Pflanze verantwortlich sind. Der Efflux von Sulfat aus der Vakuole erfolgt über die Sulfattransporter der Gruppe 4, die in der Tonoplastenmembran lokalisiert sind. Über die Funktionen der Sulfattransporter der Gruppen 3 und 5 ist bis jetzt

nur sehr wenig bekannt. *P. patens* besitzt sieben Sulfattransporter, die den Familien 1, 4 und 5 zugeordnet werden (Kopriva *et al.*, 2007b).

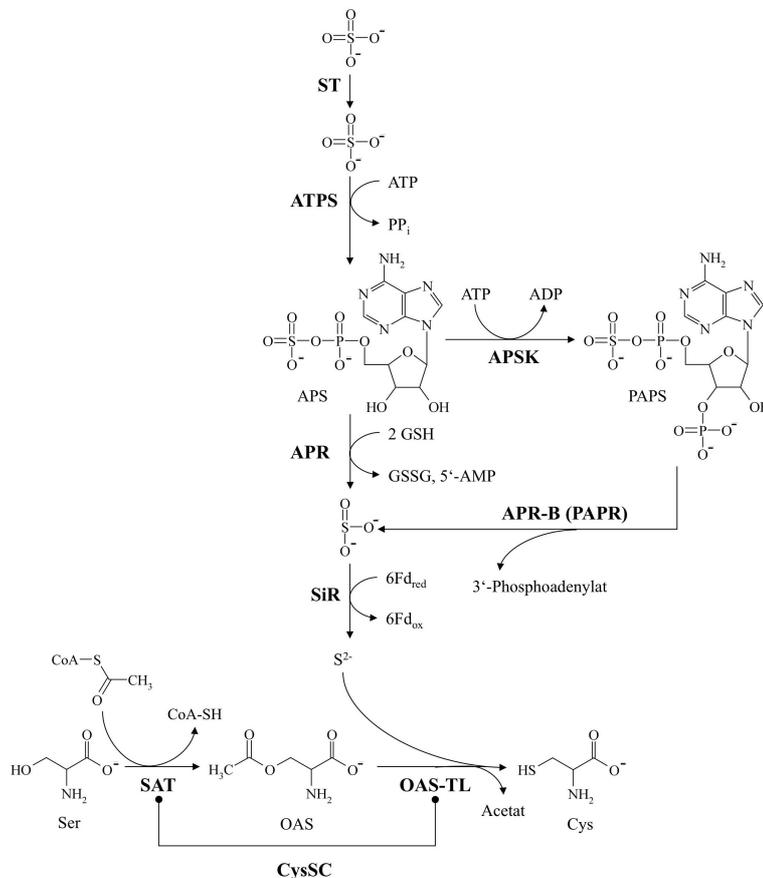


Abb. 5 Schematische Darstellung der reduktiven Sulfatassimilation in *P. patens* (ST = Sulfattransporter, ATPS = ATP-Sulfurylase, APS = Adenosylphosphosulfat, APSK = APS-Kinase, PAPS = Phosphoadenosylphosphosulfat, APR-B (PAPR) = PAPS-Reduktase, APR = APS-Reduktase, SiR = Sulfidreduktase, SAT = Serinacetyltransferase, OAS = O-Acetylserin, OAS-TL = OAS-(Thiol)Lyase, CysSC = Cysteinsynthase-Komplex)

Nach der Aufnahme folgt die **Aktivierung** des Sulfats. Die ATP-Sulfurylase (ATPS) überträgt Sulfat auf ATP, wobei Adenosylphosphosulfat (APS) entsteht und Pyrophosphat abgespalten wird. APS kann nun direkt durch die APS-Reduktase zu Sulfid **reduziert** oder durch die APS-Kinase nochmals phosphoryliert werden, wobei Phosphoadenosylphosphosulfat (PAPS) entsteht. In höheren Pflanzen kann PAPS lediglich für Sulfatierungsreaktionen genutzt werden. *P. patens* hingegen kann sowohl APS als auch PAPS zum Sulfid reduzieren (Koprivova *et al.*, 2002). Die PAPS-Reduktase (PAPR) aus *P. patens* besitzt Sequenzhomologien zu bakteriellen und pilzlichen PAPR. Da dieses Enzym jedoch eine höhere Aktivität mit APS als Substrat zeigt und kein für APS-Reduktasen typisches Fe-S-cluster enthält, wird es als APR-B bezeichnet (Kopriva *et al.*, 2007a). Auch in *Selaginella lepidophylla*, einem Moosfarn und dem Lebermoos *Marchantia polymorpha* wurden EST-

Sequenzen gefunden, die für Orthologe des APR-B-Gens kodieren (Kopriva *et al.*, 2007a). Darüber hinaus enthält auch das Genom von *Selaginella moellendorffii* ein APR-B-Gen (Kopriva *et al.*, 2007b). Sulfid wird anschließend sowohl in höheren als auch niederen Pflanzen durch die Sulfitreduktase (SiR) zu Sulfid reduziert. Der **Einbau** von Sulfid in Cystein erfolgt dann durch die Übertragung auf O-Acetylserin (OAS), katalysiert durch die OAS-(Thiol)Lyase (OAS-TL). OAS wird aus Serin und Acetyl-CoA durch die Serinacetyltransferase (SAT) synthetisiert. SAT und OAS-TL bilden gemeinsam den Cysteinsynthase-Komplex (CysSC, Bogdanova & Hell, 1997). Während die SAT nur im Komplex aktiv ist, ist die OAS-TL dies nur in freier Form. Die Dissoziation und Assoziation des CysSC ist abhängig von der Sulfatversorgung der Zellen und der OAS-Konzentration (Hell, 2002).

Die reduktive Sulfatassimilation findet in Pflanzen in den Chloroplasten statt. Jedoch ist auch die Bildung von Cys im Cytosol und in den Mitochondrien möglich, da sowohl SAT als auch OAS-TL in allen drei Kompartimenten lokalisiert sind (Leustek, 1996; Leustek & Saito, 1999; Leustek *et al.*, 2000). Studien an verschiedenen Pflanzenspezies haben gezeigt, dass die kompartimentspezifischen Isoenzyme in unterschiedlichem Ausmaß zur Gesamtaktivität des jeweiligen Enzyms in der Zelle beitragen (Hell & Wirtz, 2008). Jüngste Untersuchungen an *A. thaliana* zeigen, dass die Cys-Biosynthese größtenteils im Cytosol stattfindet, während Sulfid über die reduktive Sulfatassimilation von den Chloroplasten und OAS von den Mitochondrien bereitgestellt wird (Abb. 6, Haas *et al.*, 2008; Heeg *et al.*, 2008).

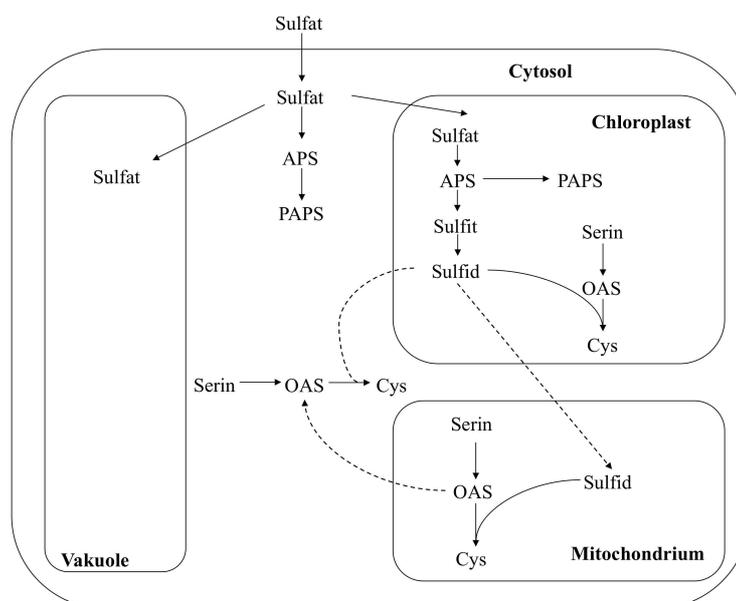


Abb. 6 Schematische Darstellung der Kompartimentierung der reduktiven Sulfatassimilation in Pflanzen (modifiziert nach Kopriva, 2006)

Der Bedarf an Cys ist ein wichtiger Faktor bei der Regulation der reduktiven Sulfatassimilation. Umwelteinflüsse, wie oxidativer Stress, Toxine oder Schwermetalle, erfordern eine stärkere Synthese von Cys (Leustek *et al.*, 2000; Leustek, 2002). Neben Sulfat ist auch die Versorgung mit Stickstoff wichtig für die Cys-Biosynthese; zusätzlich erfolgt eine Regulation über den Kohlenstoff-Metabolismus (Kopriva & Rennenberg, 2004). Wichtige Komponenten bei der Regulation des Sulfatstoffwechsels sind OAS, Cys und GSH (Kopriva, 2006).

In *Physcomitrella patens* wurde die reduktive Sulfatassimilation unter Cd-Exposition auf Transkriptebene intensiv untersucht (Rother *et al.*, 2006). In Gegenwart von 10 μM Cd geht die Erhöhung des Thiolgehaltes mit einer deutlichen Induktion der Genexpression von ATPS, APR, APR-B (PAPR) sowie SiR einher. Während in höheren Pflanzen die APR den stärksten Einfluss auf die Sulfatassimilation hat, scheint dies in *P. patens* anders zu sein. Wiedemann *et al.* (2007) konnten keine Beeinflussung der APR-Aktivität durch OAS, Cys, GSH, Sulfatmangel bzw. BSO, einem Inhibitor der γ -ECS, in *P. patens* feststellen. Auf Transkriptebene wurde nur ein Effekt von GSH auf die APR-B beobachtet. In *P. patens* ist die SiR unter Cd am stärksten induziert (Rother *et al.*, 2006). Daher ist anzunehmen, dass dieses Enzym in *P. patens* bzw. Moosen den größten Einfluss auf die Sulfatassimilation hat (Kopriva *et al.*, 2007b).

1.4.1 Sulfatmangel-Stress

Schwefelmangel entwickelte sich in den letzten Jahren zu einem ernst zu nehmenden Problem in der Landwirtschaft. Durch die steigende Reduzierung der Schwefeloxid-Emissionen kommt es zu einer drastischen Abnahme des atmosphärischen Eintrages von Schwefel in die Böden. In einer Studie entwickelten McGrath und Zhao (1995) ein Modell zur Abschätzung des Risikos für Schwefelmangel in Getreide. Das Modell zeigte zu diesem Zeitpunkt, dass 11 % der britischen Landfläche ein hohes und 22 % ein mittleres Risiko tragen. Bei Reduktion der SO_2 -Emissionen auf 40 % des *levels* von 1980 wurde eine Erhöhung des Risikos auf 23 bzw 27 % prognostiziert (McGrath & Zhao, 1995). Auch für Deutschland wurde jetzt auf Grundlage eines Modells (MOPS, *MOdel for Predicting Sulfur-deficiency*) eine Risikokarte für Schwefelmangel im Ackerbau erstellt. Derzeit tragen 38 % der Ackerflächen ein hohes Risiko für Schwefelmangel. Berechnungen zufolge werden die Risikoackerflächen in 60 Jahren bis auf 50 % angestiegen sein (www.jki.bund.de²).

Schwefel- bzw. Sulfatmangel hat tiefgreifende Auswirkungen auf Pflanzen (siehe Review: Hawkesford, 2000). Besonders bei Getreide, wie z. B. Weizen, führt Schwefelmangel zur

² http://www.jki.bund.de/cIn_045/nn_806762/DE/pressstelle/Presseinfos/2008/2803_Klimawandel__verschaeft__Schwefelmangel.html

Verminderung von Ertrag und Qualität (Zhao *et al.*, 1999). Dies beruht vor allem auf der Beeinträchtigung der Photosynthese, z. B. durch Veränderung des RuBisCO- und Chlorophyllgehaltes oder der CO₂-Assimilation (Terry, 1976; Burke *et al.*, 1986; Gilbert *et al.*, 1997; Lunde *et al.*, 2008). In Weizen verursacht Schwefelmangel weiterhin die verstärkte Synthese S-armer Proteine, wie ω -Gliadin und der *high-molecular-weight*-Untereinheit des Glutenins, wodurch die Teigeigenschaften sowie die Brotqualität beeinflusst werden (Zhao *et al.*, 1999; Hawkesford, 2000). Erst kürzlich konnte belegt werden, dass auch die mit Sulfatmangel einhergehende Abnahme des Thiolgehaltes (Cys, GSH) negative Auswirkungen auf die Qualität von Weizenmehl hat (Reinbold *et al.*, 2008).

Zahlreiche Experimente zum Sulfatmangel am Modellorganismus *A. thaliana* führten zu umfangreichen Einblicken in die Regulation des Schwefelmetabolismus auf Transkript- und Metabolitebene (Hoefgen & Nikiforova, 2008; Lewandowska & Sirko, 2008). So kommt es u. a. nicht nur zur Abnahme des Cys- bzw. GSH-Gehaltes, sondern zu einer völligen Veränderung des Aminosäuremetabolismus mit dem Ziel der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase (Nikiforova *et al.*, 2006). Sulfatmangel führt stets zur Anreicherung von OAS in den Zellen, da es nicht zu Cys umgesetzt werden kann. Hohe OAS-Konzentrationen bewirken die Dissoziation des CysSC und somit die Inaktivierung der SAT. OAS ist aber auch ein positiver Transkriptionsregulator für die Expression pflanzlicher Sulfattransporter sowie der APR (Saito, 2004). Ebenso scheint die Induktion weiterer Sulfatassimilationsgene, z. B. *ATPS3*, *Serat3;1* und *3;2* aus *A. thaliana*, unter Sulfatmangel von der OAS-Konzentration abhängig zu sein (Hirai *et al.*, 2005). Auch andere Gene (bzw. Isoformen) der reduktiven Sulfatassimilation, deren Expressions-*level* nicht mit der OAS-Konzentration korrelierte, wurden induziert. Zusammenfassend ist also festzustellen, dass OAS zwar ein Sensor für Sulfatmangel ist, aber nicht der alleinige (Hirai *et al.*, 2005; Kopriva, 2006).

Zur Sulfatmangel-Stressantwort in Moosen ist bisher nur wenig bekannt. Umfassende Untersuchungen gibt es hier nur für das aquatische Moos *F. antipyretica*, jedoch nur auf Metabolitebene (Sutter, 2000; Bleuel, 2004). Dieses Moos ist in der Lage, lange Sulfatmangelperioden trotz starkem Absinken des intrazellulären Sulfat- und Thiolgehaltes ohne Vitalitätsverlust zu überdauern. Darüber hinaus können sulfatverarmte *F.-antipyretica*-Kulturen auf Cd-Exposition mit einer Erhöhung des Thiolgehaltes reagieren, wenn auch nicht in gleichem Ausmaß wie sulfatversorgte Kulturen. In *P. patens* gibt es bisher nur Untersuchungen in Bezug auf die Expression und Aktivität von APR und APR-B in Abhängigkeit von der Sulfatversorgung (Wiedemann *et al.*, 2007).

1.5 Nitratassimilation in Pflanzen

Voraussetzung für die Bildung von Cys bzw. GSH ist die Synthese der Aminosäuren Serin, Glycin und Glutamat. Die Aminosäurebiosynthese erfordert jedoch zunächst die reduktive Assimilation von Nitrat. Die Aufnahme von Nitrat geschieht aktiv, ähnlich wie die Sulfataufnahme, über Protonen/Nitrat-Symporter (Daniel-Vedele *et al.*, 1998). Bei hohen Nitratkonzentrationen erfolgt die Aufnahme über das *low-affinity*-Transportsystem (LATS), während bei niedrigen Konzentrationen (0–0,5 mM) Nitrat über zwei *high-affinity*-Transportsysteme (HATS) aufgenommen wird.

Nitrat wird nach der Aufnahme aus dem Boden bzw. dem Medium über drei Reaktionsschritte in Aminostickstoff umgewandelt (Abb. 7, Schopfer & Brennicke, 2006). Zunächst reduziert die **Nitratreduktase** Nitrat zu Nitrit, wobei NAD(P)H als Reduktionsmittel dient. Diese Reaktion findet im Cytosol statt. Danach erfolgt in den Chloroplasten die Reduktion von Nitrit zu Ammonium (NH_4^+) durch die **Nitritreduktase** mit Ferredoxin als Elektronendonator. Da Ammoniumionen toxisch sind, werden diese sofort umgesetzt. Unter Verbrauch von ATP überträgt die Glutaminsynthetase (GS) NH_4^+ auf Glutamat, wobei Glutamin entsteht. Glutamin reagiert mit 2-Oxoglutarat zu zwei Molekülen Glutamat. Diese Reaktion wird durch die Glutamatsynthase (GOGAT) mit Ferredoxin als Elektronendonator katalysiert. Ein Molekül Glutamat fließt wieder in die Glutaminsynthesereaktion zurück, während das andere Molekül für Transaminierungen von 2-Oxosäuren und somit für die Aminosäuresynthese genutzt wird. Die Reaktionsabfolge von GS und GOGAT wird auch als **GS/GOGAT-Zyklus** bezeichnet.

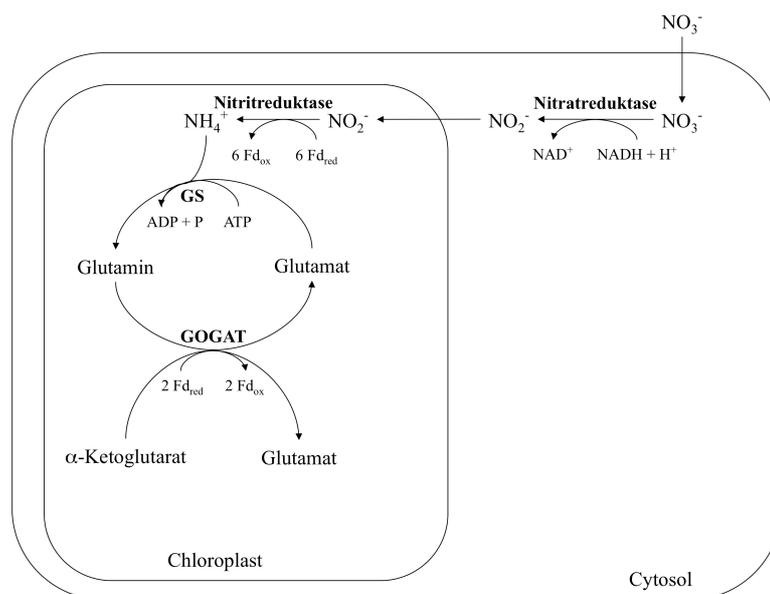


Abb. 7 Nitratassimilation in Blättern (modifiziert nach Heldt, 1996; Schopfer & Brennicke, 2006)

Die Auswirkungen von Cadmium auf die Stickstoffassimilation wurde in verschiedenen Pflanzen wie Gerste (Boussama *et al.*, 1999a), Mais (Boussama *et al.*, 1999b; Astolfi *et al.*, 2004a) und Hafer (Astolfi *et al.*, 2004b) untersucht. Es wurden u. a. Veränderungen der Nitrataufnahme sowie von Enzymaktivitäten (Nitrat- und Nitritreduktase, GS) festgestellt. Cd führt zu einer Beeinträchtigung der Nitrataassimilation in Pflanzen (DalCorso *et al.*, 2008). Im aquatischen Moos *F. antipyretica* zeigten ¹⁵N-Tracerexperimente eine negative Beeinflussung der Aminosäure- und Proteinbiosynthese durch Cd (Sutter *et al.*, 2002).

1.6 Zielstellung

Die vorliegende Dissertation baut auf Ergebnissen bisheriger Arbeiten der Arbeitsgruppe Krauß zum Thema Cadmium-Entgiftung in Moosen auf (Bruns, 1998; Sutter, 2000; Bruns *et al.*, 2001; Rother *et al.*, 2006; Rother, 2007). Diese Untersuchungen belegten, dass die beiden Moose *Fontinalis antipyretica* und *Physcomitrella patens* bei Cd-Exposition mit einer Erhöhung des Glutathiongehaltes reagieren und keine Phytochelatine synthetisieren. Rother (2007) konnte zudem für *P. patens* sowohl auf transkriptioneller als auch enzymatischer Ebene eine Induktion der GSH-Biosynthese nachweisen.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die Bedeutung des GSH bei der Cd-Detoxifizierung näher zu untersuchen. Für das aquatische Moos *F. antipyretica* konnte mittels elektronenmikroskopischer Analysen (EDX, EELS) eine Chelatierung des Cd im Cytosol mit SH-Gruppen, die möglicherweise vom GSH stammen, gezeigt werden (Bruns *et al.*, 2001). *P. patens* war jedoch bisher für solche Untersuchungen, vermutlich aufgrund der zu geringen intrazellulären Cd-Konzentration, nicht zugänglich (Rother, 2007).

Voraussetzung für die GSH-Biosynthese ist die Aufnahme von Sulfat. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, welche Auswirkungen Sulfatmangel auf den intrazellulären Sulfat- und Thiolgehalt sowie die transkriptionelle Regulation der reduktiven Sulfatassimilation hat. In einem weiteren Schritt sollte dann der Einfluss von Sulfatmangel auf die Cd-Toxizität hinsichtlich der Thiolbiosynthese untersucht werden. Bei allen Untersuchungen wurde der Chlorophyllgehalt als Vitalitätsparameter eingesetzt.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Etablierung der *in-situ*-Markierung von GSH mit dem Fluoreszenzfarbstoff Monochlorobiman sowie die Nutzung dieses Verfahrens zur Beurteilung der Beteiligung vom GSH an der Cd-Detoxifizierung. Über den Abbau von Glutathion-Konjugaten in *P. patens* gibt es bisher in der Literatur keine Angaben. Daher sollte dies anhand des Glutathion-Biman-Konjugates in *P. patens* näher untersucht werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle benutzten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) sowie Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Schnelldorf, Deutschland) bezogen. Für die HPLC-Analysen benötigte Lösungsmittel stammten von der Firma Prolabo (VWR, Deutschland) und die Standardsubstanzen für Cystein und γ -Glutamylcystein von Reatec (Weiterstadt, Deutschland).

2.2 Anzucht und Kultivierung

Alle Experimente der vorliegenden Arbeit wurden mit Protonema-Kulturen von *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. durchgeführt. Die Stammkulturhaltung erfolgte in 250-mL-Erlenmeyerkolben mit 75 mL ABC-Medium unter Langtagbedingungen (18 h Licht, 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ / 6 h Dunkelheit) bei 25 °C und 111 rpm ohne Nachtabsenkung. Im zweiwöchigen Rhythmus wurden die Kulturen über einem sterilen Sieb abfiltriert und die Biomasse auf zwei neue Kolben aufgeteilt. Die Homogenisierung des Pflanzenmaterials erfolgte wöchentlich mit einem Ultra-Turrax[®] (T25 digital, IKA[®], Staufen, Deutschland). Medium, Siebe, Spatel und Dispergierwerkzeuge (S25N-18G) wurden zweimal sterilisiert. Die Kultur wurde regelmäßig auf Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen durch Ausstrich von je 100 μL Kulturmedium auf LB-Agar (LAB M, Roth, laut Herstellerangaben) überprüft.

Zusammensetzung ABC-Medium (Knight *et al.*, 1988):

Stammlösung: 100×	Endkonzentration im Medium
A1: 1.25 g L ⁻¹ FeSO ₄ × 7 H ₂ O	12,5 mg L ⁻¹
A2: 118 g L ⁻¹ Ca(NO ₃) ₂ × 4 H ₂ O	1180 mg L ⁻¹
B: 24 g L ⁻¹ MgSO ₄ × 7 H ₂ O	240 mg L ⁻¹
C: 24 g L ⁻¹ KH ₂ PO ₄	240 mg L ⁻¹
Spurenelementlösung: 1000×	
614 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₄	0,614 mg L ⁻¹
55 mg L ⁻¹ CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,055 mg L ⁻¹
28 mg L ⁻¹ LiCl	0,028 mg L ⁻¹
389 mg L ⁻¹ MnCl ₂ × 4 H ₂ O	0,389 mg L ⁻¹
55 mg L ⁻¹ CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,055 mg L ⁻¹
55 mg L ⁻¹ ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,055 mg L ⁻¹
28 mg L ⁻¹ KI	0,028 mg L ⁻¹
28 mg L ⁻¹ SnCl ₂	0,028 mg L ⁻¹
pH 10 (KOH)	

2.2.1 Kultivierung unter Cadmium-Exposition

Zur Untersuchung des Einflusses von Cadmium auf den Schwefelstoffwechsel von *Physcomitrella patens* wurden die Kulturen nach viertägiger Vorkultivierung mit CdCl_2 exponiert (Endkonzentration $10 \mu\text{M}$). Es wurden sowohl Kurzzeit- (zwei, vier, sechs Stunden) als auch Langzeitexperimente (ein, drei, fünf Tage) durchgeführt.

2.2.2 Kultivierung unter Sulfatmangel

Sulfatmangelexperimente wurden nach viertägiger Vorkultivierung in normalem ABC-Medium (1 mM Sulfat) gestartet. Es wurden Experimente in ABC-Sulfatmangel-Medium (Austausch der Sulfatsalze der Stammlösungen A1 und B gegen die entsprechenden Chloridsalze; $0,4 \mu\text{M}$ Sulfat) und in ABC-Medium ohne Sulfat (Austausch aller Sulfatsalze der Stammlösungen und der Spurenelementelösung gegen die entsprechenden Chloridsalze). Vor dem Umsetzen auf Sulfatmangelbedingungen wurde die Biomasse zweimal mit den entsprechenden Medien gewaschen. Die Kulturen wurden sofort, nach drei und zehn Tagen geerntet.

2.2.3 Kultivierung unter Sulfatmangel und Cd-Exposition

Zur Untersuchung der Auswirkung von Sulfatmangel auf die Cd-Toxizität wurden Experimente unter kurzfristigem und langfristigem Sulfatmangel durchgeführt. Bei kurzfristigem Sulfatmangel wurden die Kulturen nach der Vorkultivierung in Medium ohne Sulfat bzw. in Medium ohne Sulfat mit $10 \mu\text{M}$ Cd umgesetzt und nach einem, drei und fünf Tagen die Biomasse geerntet. In der zweiten Variante wurde das Moos erst nach zehntägigem Sulfatmangel mit $10 \mu\text{M}$ Cd exponiert und anschließend nach drei Tagen geerntet.

2.2.4 *In-situ*-Markierung mit Monochlorobiman

Zur *in-situ*-Markierung mit Monochlorobiman (MCB) wurden die Kulturen vier Tage in 250-mL-Kolben mit 75 mL ABC-Medium vorkultiviert und dann drei Tage ohne bzw. mit $10 \mu\text{M}$ CdCl_2 exponiert. Danach wurden die Kulturen in 100-mL-Kolben mit 40 mL ABC-Medium (ohne bzw. mit $10 \mu\text{M}$ CdCl_2) überführt und 200 bzw. $500 \mu\text{M}$ MCB zugegeben. Es wurde kein frisches Medium verwendet. Die weitere Kultivierung erfolgte im Dunkeln bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und 111 rpm. Die Probenentnahme erfolgte nach 15 min und 30 min sowie 1; 1,5; 2,5; 3; 6; 9; 12 und 24 Stunden (S. 19, Abb. 8). Zur Untersuchung des Abbaus des Glutathion-Biman-Konjugates wurden die Kulturen 2,5 Stunden mit MCB markiert, zweimal mit farbstofffreiem Medium gewaschen und danach in MCB-freiem Medium für weitere 24 Stunden im Dunkeln kultiviert (Zeitpunkte der Probenentnahme analog MCB-Markierung).

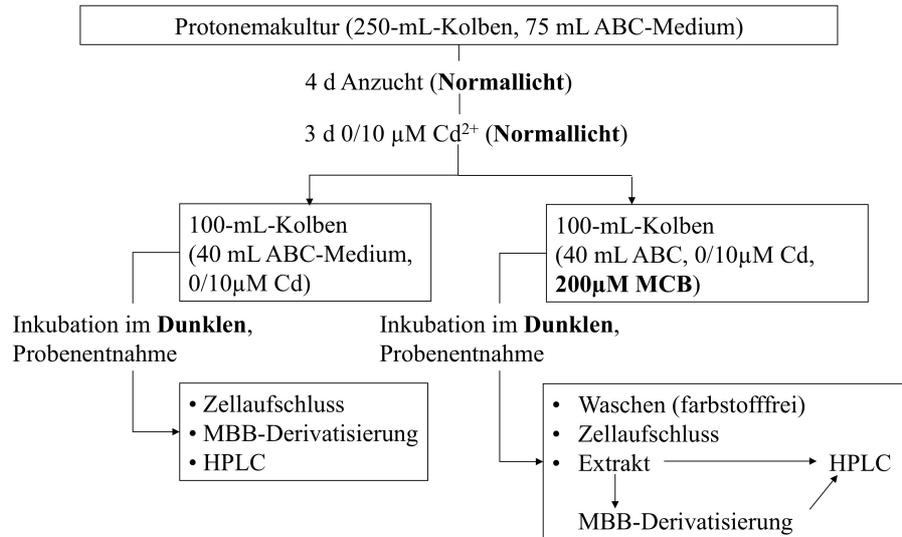


Abb. 8 Arbeitsschema zur *in-situ*-Markierung mit Monochlorobiman

2.2.5 ¹⁵N-Tracer-Experimente

Zur Untersuchung des Einbaus von Stickstoff in die Protein- und Nichtprotein-(Aminosäuren)-Fraktion sowie in das Glutathion wurden die Kulturen nach viertägiger Vorinkubation in ¹⁵N-ABC-Medium (Austausch von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ gegen $\text{Ca}(\text{^{15}NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 10 at%; Chemotrade, Leipzig) umgesetzt. Gleichzeitig erfolgte die Zugabe von $10 \mu\text{M CdCl}_2$. Das Moosmaterial wurde nach einem, drei und fünf Tagen geerntet.

2.3 Probenentnahme und Vorbereitung

Bei allen Experimenten außer den MCB-Versuchen wurde zu jedem Zeitpunkt der ganze Kolben mit Hilfe einer Absaugvorrichtung (Nalgene, jetzt Nunc, Wiesbaden; Filter Rotilabo \varnothing 55 mm) geerntet, das Moosmaterial trockengetupft und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Aufarbeitung wurden die Proben bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Für die MCB-Experimente wurde zu jedem Zeitpunkt etwas Moosmaterial aus dem Kolben entnommen, zweimal mit farbstofffreiem Medium gewaschen, trockengetupft und eingefroren. Bei den ¹⁵N-Tracerstudien wurde das Pflanzenmaterial vor dem Einfrieren dreimal mit *A. bidest.* gewaschen.

Für alle Analysen wurde das eingefrorene Moosmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und danach entsprechend extrahiert.

2.4 Vitalitätstest – Chlorophyllbestimmung

Zur Beurteilung der Vitalität von *Physcomitrella patens* unter den verschiedenen Versuchsbedingungen wurde der Gehalt an Photosynthesepigmenten (Chlorophyll a, b und Carotinoide) bestimmt.

Dazu wurden 50 mg gemörstertes Moosmaterial mit 1 mL ammoniakalischem Aceton (80 % Aceton; 19,5 % *A. bidest*; 0,5 % NH₃-Lösung [25 %]) versetzt, 1 min kräftig gemischt und dann 15 min bei 4 °C geschüttelt. Nach Zentrifugation (18890 g, 4 min, 4 °C) wurde der Extrakt 1:20 mit ammoniakalischem Aceton verdünnt. Die Proben wurden dann photometrisch vermessen (480 nm, 647 nm, 664 nm, als Blindwert diente Luft ohne Küvette). Während der Messungen wurden die Proben stets im Dunkeln und auf Eis aufbewahrt. Die Berechnung der Pigmentkonzentrationen erfolgte anhand folgender Formeln:

$$\text{Chlorophyll a} \quad [\text{mg L}^{-1}] = 11,78 \times E_{664} - 2,29 \times E_{647}$$

$$\text{Chlorophyll b} \quad [\text{mg L}^{-1}] = 20,05 \times E_{647} - 4,77 \times E_{664}$$

$$\text{Carotinoide} \quad [\text{mg L}^{-1}] = E_{480} / 200$$

2.5 Nachweis thiolhaltiger Verbindungen

Die Bestimmung der Konzentrationen an Cystein (Cys), γ -Glutamylcystein (γ -EC) und Glutathion (GSH) erfolgte durch Derivatisierung der Thiolgruppen mit Monobromobiman (Abb. 9, MBB, Fahey & Newton, 1987).

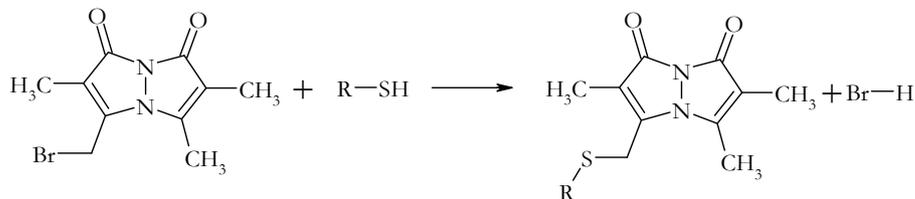


Abb. 9 Derivatisierung von Thiolgruppen mit Monobromobiman

Hierzu wurden 50 mg gemörstertes Moosmaterial mit 1 mL 0,1 N HCl versetzt, kräftig gemischt und anschließend 10 min zentrifugiert (16090 g, 4 °C). 120 μ L des Überstandes wurden dann mit 180 μ L CHES-Puffer (0,2 M; pH 9,3) und 30 μ L 5 mM DTT gemischt und zur Reduktion der Thiolgruppen eine Stunde auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 10 μ L 30 mM MBB erfolgte die Markierung der SH-Gruppen (15 min, Raumtemperatur, Dunkelheit). Die Reaktion wurde mit 250 μ L 5 %iger Essigsäure gestoppt. Bis zur HPLC-Analyse wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Nach Zentrifugation (4 min, 21910 g, 4 °C) wurden die Derivate chromatographisch (RP-18-Phase) an einer Merck-Hitachi-LaChrom-HPLC-Anlage (Interface D-7000, Pumpe L-7100, Autosampler L-7200, Fluoreszenzdetektor L-7480, Darmstadt, Deutschland) getrennt.

Für *in situ* mit Monochlorobiman markierte Moosproben wurde der HCl-Extrakt direkt für die chromatographische Analyse eingesetzt.

Bedingungen zur Trennung der Biman-Derivate:

Stationäre Phase	Lichrospher 60 RP Select B 5 μm , 250 \times 4 mm
Mobile Phase	A: 2 % Methanol; 2,5 mL L ⁻¹ Essigsäure pH 4,3 (10 N NaOH) B: 90 % Methanol, 2,5 mL L ⁻¹ Essigsäure pH 3,9 (0,1 N NaOH)
Flussrate	0,9 mL min ⁻¹
Injektionsvolumen	10 / 20 μL
Detektion	380 nm _{ex} / 480 nm _{em}

Gradientenprogramm zur Trennung der Biman-Derivate:

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	97	3
15,0	93	7
30,0	0	100
30,1	0	100
35,0	0	100
35,1	97	3
45,0	97	3

Quantifiziert wurde über Eichgeraden im Bereich von 0–14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Cys, γ -EC und GSH. Nach jeweils 20 Proben wurde die stationäre Phase einem Waschprogramm unterzogen.

Zusammensetzung der mobilen Phasen für das Waschprogramm:

Mobile Phase	Zusammensetzung
A	2 % Methanol; 2,5 mL L ⁻¹ Essigsäure pH 4,3 (10 N NaOH)
B	90 % Methanol, 2,5 mL L ⁻¹ Essigsäure pH 3,9 (0,1 N NaOH)
C	30 % Acetonitril
D	85 % Acetonitril

Gradientenprogramm zum Waschen der RP-18-Phase:

Zeit [min]	A [%]	B [%]	C [%]	D [%]	Fluss [mL min ⁻¹]
0	97	0	0	0	0,3
18,0	0	0	100	0	0,9
18,1	0	0	100	0	0,3
36,0	0	0	0	100	0,9
42,0	0	0	0	100	0,9
42,1	0	0	0	100	0,3
60,0	0	0	100	0	0,9
60,1	0	0	100	0	0,3
78,0	97	3	0	0	0,9
86,0	97	3	0	0	0,9

2.6 Bestimmung der Enzymaktivität der Glutathion-S-Transferasen (GST)

50 mg gemörsertes Moosmaterial wurde mit 150 µL Aufschlusspuffer (0,1 M KH₂PO₄ [pH 7,8 mit NaOH]; 5 mM Na₂EDTA × 7 H₂O; 1 % Polyvinylpyrrolidon) versetzt, kräftig gemischt und 30 min zentrifugiert (11000 g, 4 °C). Der Überstand wurde dann für die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität der GST nach Habig *et al.* (1974) eingesetzt. Hierbei wird die Konjugation des Substrates 1-Chlor-2,4-dinitrobenzen (CDNB) mit Glutathion photometrisch bei 340 nm über einen Zeitraum von drei Minuten verfolgt (1 min lag-Phase, 2 min *steady-state*-Phase). Der Reaktionsansatz enthielt:

500 µL	200 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 6,4 (30 °C, Wasserbad)
20 µL	100 mM GSH
20 µL	100 mM CDNB (in Ethanol gelöst)
x µL	Rohextrakt (Kontrolle 25 µL; MCB 5 – 25 µL)
ad 1 mL	A bidest. (30 °C, Wasserbad)

Bei jeder Messung wurde eine Referenz ohne Rohextrakt mitgeführt.

Zur Bestimmung der eingesetzten Proteinmenge wurde die Proteinkonzentration des Rohextraktes nach Bradford (1976) bestimmt. Hierfür wurde der Rohextrakt 1:10 mit *A. bidest.* verdünnt und 10 µL dieser Verdünnung mit 790 µL *A. bidest.* und 200 µL Bioquant (Merck, Darmstadt) gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation erfolgte die Messung bei 595 nm (Referenz: Ansatz mit *A. bidest.*). Eine Kalibriergerade mit Rinderserumalbumin im Bereich von 2–8 µg mL⁻¹ wurde zur Quantifizierung herangezogen.

2.7 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Mit Monochlorobiman inkubierte Protonema-Zellen von *P. patens* wurden der Kultur entnommen, farbstofffrei gewaschen und in einen Tropfen 50 μM Propidiumiodidlösung (PI) auf einem Objektträger überführt. Die Bilder wurden an einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (Zeiss LSM 510 META) mit einem 63er Wasserimmersionsobjektiv (C-Apochromat 1.2NA, Zeiss) aufgenommen. Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit einem 405 nm Dioden-Laser (Glutathion-Biman-Konjugat) und einem 543 nm HeNe-Laser (PI). Die Biman-Fluoreszenz wurde im Wellenlängenband 475-525 nm detektiert. PI wurde im Bereich 560-615 nm beobachtet, die Autofluoreszenz der Chloroplasten oberhalb von 680 nm aufgenommen.

2.8 Kapillarelektrophoretische Analyse von Sulfat

Zur Bestimmung des intrazellulären Sulfatgehaltes wurden 50 mg gemörsertes Moosmaterial mit 200 μL *A. bidest.* versetzt, kräftig gemischt und anschließend 10 min bei 90 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (10 min, 23000 g) wurde der Überstand 1:5 mit *A. bidest.* verdünnt und für die kapillarelektrophoretische Analyse an einem Hewlett Packard HP^{3D} System (Palo Alto, Kalifornien) mit Diodenarray-Detektor eingesetzt. Zur Bestimmung des extrazellulären Sulfatgehaltes wurde das jeweilige Kulturmedium 1:10 mit *A. bidest.* verdünnt und analysiert.

Bedingungen zur Trennung der anorganischen Ionen mittels Kapillarelektrophorese:

Kapillare	SUPELCO FS 50 CE effektive Länge: 24,5 cm; ID 50 μm
Kapillarentemperatur	20 °C
Injektion	200 mbar \times s
Detektion	Signalwellenlänge 350 nm Referenzwellenlänge 235 nm als positive Peaks
Spannung	18 kV, negative Polarität
Äquilibrierung der Kapillare	5 min 0,1 N NaOH 5 min 10 mM H ₃ PO ₄ 2 min H ₂ O 3 min Trennpuffer
Analysenzeit	6 min

Der Trennpuffer enthielt 2,25 mM Pyromellinsäure; 6,5 mM NaOH; 0,75 mM Hexamethoniumhydroxid und 1,6 mM Triethanolamin (pH 11,4 mit NaOH, Sutter, 2000). Die Quantifizierung erfolgte anhand von Kalibriergeraden im Bereich von 0,015-1 mM Na₂SO₄.

2.9 ¹⁵N-Traceruntersuchungen

2.9.1 Trennung der Protein-(PN) und Nichtproteinfraktion (NPN)

Zur Trennung der PN- und NPN-Fraktion wurden ca. 50 mg gemörsertes Moosmaterial mit 1 mL 10 %iger Trichloressigsäure (TCA) versetzt, kräftig gemischt und ca. 17 Stunden bei 4 °C zur Proteinfällung inkubiert. Nach Zentrifugation (11180 g, 15 min, 4 °C) wurden 200 µL des Überstandes (= NPN-Fraktion) bei 50 °C in Zinnkapseln (5 × 13 mm, HEKAtech GmbH, Wegberg, Deutschland) getrocknet. Das Pellet (PN-Fraktion) wurde zweimal mit 1 mL 0,5 %iger TCA gewaschen (Zentrifugation 10 min, 11180 g, 4 °C) und anschließend ebenfalls bei 50 °C getrocknet.

2.9.2 Trennung der Glutathionfraktion

Zur Untersuchung der ¹⁵N-Häufigkeit im Glutathion musste diese Fraktion zunächst getrennt werden. Dazu wurden 50 mg Moosmaterial mit 150 µL 0,1 N HCl versetzt. Nach Zentrifugation (10 min, 9500 g, 4 °C) und Filtration des Überstandes (Whatman Spritzenvorsatzfilter Ø 13 mm; 0,2 µm Porendurchmesser) wurden 25-100 µL zur chromatographischen Trennung (RP-18-Säule, ProntoSil C18AQ, Bischoff Chromatography, Leonberg, Deutschland) an einer Merck-Hitachi-LaChrom-HPLC-Anlage (Interface D-7000, Pumpe L-7110, Autosampler L-7200, Darmstadt, Deutschland) injiziert. Nach acht bis elf Minuten wurden Fraktionen gesammelt, die anschließend in der *speed vac* bis zu einem Volumen von 50-80 µL eingengt wurden.

Bedingungen zur Trennung des Glutathions:

Stationäre Phase	ProntoSil C18AQ, 5 µm, 120 Å; 250 × 4.6 mm
Mobile Phase	A: TFA in Wasser (pH 2) B: ACN
Flussrate	1 mL min ⁻¹

Gradientenprogramm zur Trennung des Glutathions:

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	99	1
5,0	99	1
13,0	99	1
13,1	50	50
23,0	50	50
23,1	99	1
30,0	99	1

Im Anschluss wurden die eingegangenen Fraktionen in Zinngefäßen bei 50 °C getrocknet. Da der Stickstoffgehalt dieser Fraktionen zu gering war für die Analyse der ^{15}N -Häufigkeit, wurden zusätzlich 50 μL einer NH_4Cl -Lösung (25 μg N/50 μL) zupipettiert und getrocknet (Isotopenverdünnung). Die Genauigkeit dieser Methode wurde in einem Vorexperiment überprüft (siehe Kapitel 2.9.3).

2.9.3 Bestimmung der ^{15}N -Häufigkeit

Die Analyse des ^{15}N -Isotops erfolgte mittels einer Kombination aus Elementar-Analysator und Isotopen-Verhältnis-Massenspektrometer (IRMS). Dabei werden die zuvor in Zinnfolie eingewogenen Proben mittels Autosampler in einen Elementar Analysator (EuroVector 3000, Mailand, Italien) unter Zugabe von reinem Sauerstoff verbrannt. Die entstandenen Gase N_2 , CO_2 und $\text{H}_2\text{O}_{(\text{Dampf})}$ werden mit einem Trägergas (He) über eine Wasserfalle (P_2O_5 auf Träger) zum Entfernen des $\text{H}_2\text{O}_{(\text{Dampf})}$ und durch eine GC-Trennsäule (5A, $\frac{1}{4}$ " , 60 cm) zum Trennen von N_2 und CO_2 über ein open-split-System (ConFlo III, Thermo Elektron, Bremen, Deutschland) direkt in das IRMS (MAT 253, Thermo Elektron, Bremen) transportiert. Dort werden die Gase in einer Elektronenstoß-Ionenquelle ionisiert und die einzelnen Isotope gemessen. Von den Proben wurde der natürliche ^{15}N -Gehalt der Luft (ca. 0,3663 %) abgezogen und somit der tatsächliche ^{15}N -Gehalt der Probe als Atom-Prozent-Excess (at.-% exc.) ermittelt.

Da die Menge des Glutathions für eine reguläre Messung nicht ausreichte, wurde die Methode der Isotopenverdünnung angewendet. Dabei wird die Probe mit einer definierten Menge N (hier NH_4Cl -Eichlösung, s. Kapitel 2.9.2) versetzt, bei der die Menge (als Äquivalent der Flächeneinheit pro N-Einwaage Vs/ μg) und der ^{15}N -Gehalt bekannt ist. Nach der Messung wird vom Gesamtergebnis diese Fläche und der ^{15}N -Gehalt der zugegebenen NH_4Cl -Eichlösung herausgerechnet und man erhält den ^{15}N -Gehalt des Glutathions.

Eingesetzte Menge N (NH_4Cl -Lösung)	Berechnete Menge Stickstoff nach der Messung
40 μg	38,85 μg
35 μg	34,53 μg
25 μg	24,13 μg
10 μg	9,53 μg

2.10 Transkriptanalyse

Zur Untersuchung der Induktion der Gene der reduktiven Sulfatassimilation sowie der Glutathion-Biosynthese unter Sulfatmangelbedingungen wurden die Proben nach RNA-Isolierung und cDNA-Synthese mittels quantitativer *real-time* PCR analysiert.

2.10.1 RNA-Isolierung

Ca. 60-70 mg gemörseretes Pflanzenmaterial wurde zunächst mit 500 μ L Extraktionspuffer (0,2 M Tris/HCl pH 8,0; 0,25 M NaCl; 0,025 M EDTA; 0,5 % SDS) versetzt und gemischt. Nach Zugabe von 500 μ L eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) wurde nochmal kräftig gemischt und 20 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (18890 g). Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und die Extraktion zweimal wiederholt. Anschließend wurde die wässrige Phase mit 150 μ L 8 M LiCl versetzt, gemischt und die RNA zwei Stunden bei -80 C gefällt. Nach Zentrifugation (20 min, 18890 g, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und 300 μ L *A. bidest.* zugegeben. Danach erfolgte eine zehnminütige Inkubation bei 65 °C. Der Ansatz wurde danach nochmals mit 100 μ L 8 M LiCl gemischt und die RNA über Nacht bei -20 C gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (18890 g, 4 °C, 20 min) wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 150 μ L 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 18890 g, 4 °C). Das Pellet wurde getrocknet, in 25–50 μ L DEPC-H₂O (laut Herstellerangaben) aufgenommen und zehn Minuten bei 65 °C inkubiert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei 280 nm (Proben 1:100 mit DEPC-H₂O verdünnt, Genequant). Jede Probe wurde zweimal verdünnt und jede Verdünnung dreimal gemessen. Die RNA-Konzentration resultierte aus dem Mittelwert der sechs Messwerte. Alle Proben wurden anschließend einem DNA-Verdau unterzogen.

2.10.2 DNase-Verdau

Der DNase-Verdau erfolgte mit DNase I (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland). Ein Ansatz enthielt:

0,75 μ g RNA
1 μ l 10 \times Puffer
ad 9 μ L DEPC-H₂O
1 μ L DNase I

Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 μ L 25 mM EDTA gestoppt.

2.10.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Um die RNA auf etwaige Kontaminationen mit DNA zu überprüfen, wurde eine PCR mit Primern für die RuBisCO durchgeführt. Die PCR wurde mit dem FastStart-Taq-Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Der PCR-Ansatz enthielt:

0,5 µL	RNA aus DNase-Verdau
2 µL	10 × Puffer
1 µL	10 mM dNTP-Mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP; Roth)
1 µL	10 µM forward Primer (RuBisCO, S. 29, Tabelle 3)
1 µL	10 µM reverse Primer (RuBisCO, S. 29, Tabelle 3)
0,2 µL	FastStart Taq DNA Polymerase
14,3 µL	DEPC-H ₂ O

Die PCR-Reaktion erfolgte in einem MultiBlock System (Hybaid GmbH, Heidelberg, Deutschland):

Schritt 1 (1×):	2 min	95 °C	
Schritt 2 (40×):	15 sec	94 °C	Denaturierung
	15 sec	60 °C	Primeranlagerung
	20 sec	72 °C	Elongation
Schritt 3 (1×):	10 min	72 °C	<i>final extension</i>
Schritt 4 (1×):	∞	4 °C	

2.10.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Größentrennung der PCR-Produkte wurde mittels horizontaler Gelelektrophorese in Flachbett-Elektrophoresekammern durchgeführt. Hierfür wurden 2,25 g Agarose (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 150 mL TAE-Puffer (40 mM Tris; 0,5 mM Na-Acetat; 0,01 mM Na₂EDTA pH 8,0) durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen wurde dem noch flüssigen Gel Ethidiumbromid (0,5 µg/mL Gel) zugesetzt und in die Kammer gegossen. Die Proben wurden mit 6 × Ladepuffer (30 % [v/v] Glycerin; 0,25 % [w/v] Bromphenolblau; 0,25 % [w/v] Xylencyanol) versetzt und je 10 µL aufgetragen. Als Größenstandard wurde eine 50 bp-DNA-Leiter (GeneRuler™ 50bp DNA Ladder, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Die Trennung erfolgte bei 120 V.

2.10.5 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte laut Herstellerangaben mit SuperScript II™ Reverse Transkriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA). Es wurde 0,5 µg DNA-freie RNA eingesetzt.

2.10.6 quantitative real-time-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative *real-time*-PCR wurde mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt:

0,5 µL	cDNA
10 µL	2 × QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix
0,6 µL	10 µM forward Primer (S. 29, Tabelle 3)
0,6 µL	10 µM reverse Primer (S. 29, Tabelle 3)
8,3 µL	DEPC-H ₂ O

Die Reaktion wurde in einem iCycler-PCR-Gerät (Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt:

Schritt 1 (1x):	15 min	95 °C	
Schritt 2 (40x):	15 sec	94 °C	Denaturierung
	15 sec	60 °C	Primeranlagerung
	20 sec	72 °C	Elongation, Datenaufnahme
Schritt 3 (1x):	1 min	95 °C	
Schritt 4 (72x):	10 sec	57 °C	(je Zyklus + 0.5 °C, Schmelzkurve)
Schritt 5 (1x):	∞	4 °C	

Die Schmelzkurve diente der Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte, so dass keine unspezifischen Produkte mit in die Berechnung einbezogen wurden. Mit Hilfe der iCycler-Software wurden die C_t -Werte (*threshold cycle*, Schwellenwert) berechnet. Die relative Quantifizierung erfolgte über die iQ5-Software (Bio-Rad, München, Deutschland).

Tabelle 3 Primerübersicht

Enzymname (EST, Zugangsnummer NCBI)	Sequenz Forward primer	Sequenz reverse Primer
RuBisCO (AB120708)	aagttgcccatgttcgggtg	acctgcttcttgctgtcgaag
ST (BI487450; AB699545; BI436714)	agtacctcattgtggacttg	tcatacgggacattctgcga
ATPS (BU052122)	ttctggaactaagatgcgc	tccagttttgcagtccttgg
APR (BQ827272)	acggttggttagctttgcag	tgtgttgatg'gccttggtgc
APR-B (PAPR) (AJ489220)	ttcaactcggaggattgtcc	tcagaaaccacagcagttgc
SiR (BQ827026)	gggttatgtttccaaggacg	tcatacgggacattctgcga
SAT (AW599682)	gtacagctgtgggaaatcct	accagcctttgatagtgtgatcc
OASTL (BU052293)	ggacagagtgtggtcagccag	aatattggcgggtgcatcctcc
γ -ECS (BU052092)	tctttgagaaaaccagcctcg	catgctccgcaacaaggctcc
GSHS (BQ827502)	accaccttcatcagagtcag	tgaattgggcatctttggca

2.11 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden in 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils 3 parallelen Ansätzen ($n = 9$; Ausnahmen: MCB-Experiment, Kurzzeitexperiment Cadmium, Cd-Exposition nach langfristigem Sulfatmangel) durchgeführt. Die Ergebnisse aller Versuche wurden mit Hilfe des Programms Microsoft[®] Office Excel 2003 gemittelt und die Standardabweichungen berechnet. Für die Standardabweichung wurde folgende Formel verwendet:

$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

Die, in den Diagrammen dargestellten Säulen bzw. Datenpunkte zeigen stets den Mittelwert \pm Standardabweichung. Zur Bestimmung der Signifikanzen wurde beim Vergleich von zwei Gruppen (Kontrolle, Cadmium-exponiert) ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Bei signifikant verschiedenen Standardabweichungen erfolgte der t-Test mit Welch-Korrektur. Für den Vergleich von drei Gruppen (Kontrolle; 0,4 μ M Sulfat; 0 μ M Sulfat) wurde der One-way-ANOVA-Test mit anschließendem Tukey-Kramer-Test herangezogen. Diese statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Programm Graphpad InStat Version 3.05. Die statistischen Analysen der Experimente zur Cd-Exposition nach langfristigem Sulfatmangel sowie zur *in-situ*-Markierung mit Monochlorobimban erfolgten mittels einer zweifaktoriellen univariaten Varianzanalyse (2-way-ANOVA) mit dem Programm SAS (SAS Institut Inc., 1989). In den Diagrammen und Tabellen werden die Ergebnisse der statistischen Analysen wie folgt dargestellt: * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

3. Ergebnisse

3.1 Auswirkungen von Cadmium-Exposition in *P. patens*

3.1.1 Vitalität unter Cd-Exposition

Zur Beurteilung der Vitalität des Blasenmützenmooses *Physcomitrella patens* wurde der Pigmentgehalt (Chlorophyll a und b, Carotinoide) herangezogen.

Abb. 10 und Abb. 11 zeigen den Chlorophyll-a-Gehalt in *P. patens* während fünftägiger Belastung mit 10 μM CdCl_2 . In einem ersten Experiment wurden die Proben frühestens nach einem Tag Cd-Belastung entnommen (Abb. 10). Schon nach 24 Stunden waren signifikante Änderungen in der Vitalität zu beobachten. Deshalb wurden in einem zweiten Experiment Proben innerhalb der ersten sechs Stunden entnommen (Abb. 11). Aufgrund des großen zeitlichen Abstandes zwischen den beiden Experimenten wurden bei dem Kurzzeitexperiment ebenfalls Proben nach einem, drei und fünf Tagen genommen. Somit konnte zusätzlich die Stabilität der Kultur und der Versuchsdurchführung überprüft werden.

Über den gesamten Versuchszeitraum lag der Gehalt an Chlorophyll a bei 2 bis 2,4 mg g FM^{-1} . Die Zugabe von Cadmium führte innerhalb der ersten sechs Stunden nach Cadmiumzugabe zu keiner signifikanten Änderung im Chlorophyll-a-Gehalt (Abb. 11). Zwischen dem ersten und fünften Kulturtag kam es zu einer zeitabhängigen Abnahme des Chlorophyll-a-Gehaltes unter Cadmium-Exposition. Nach fünf Tagen sank der Chlorophyll-a-Gehalt auf ca. 50 % der entsprechenden Kontrollkultur (Abb. 10, Abb. 11).

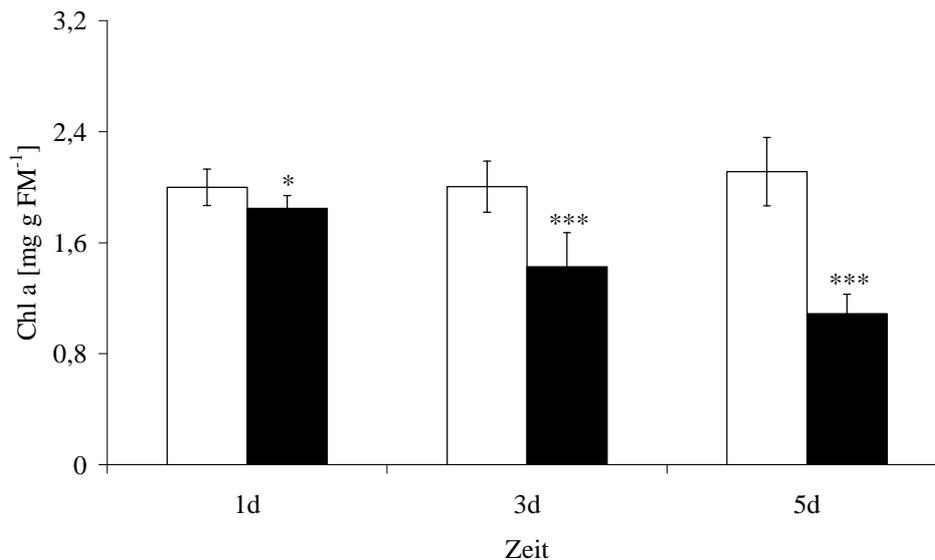


Abb. 10 Chlorophyll-a-Gehalt in *P. patens* unter Cd-Exposition (□ = Kontrolle, ■ = 10 µM Cd), n = 9

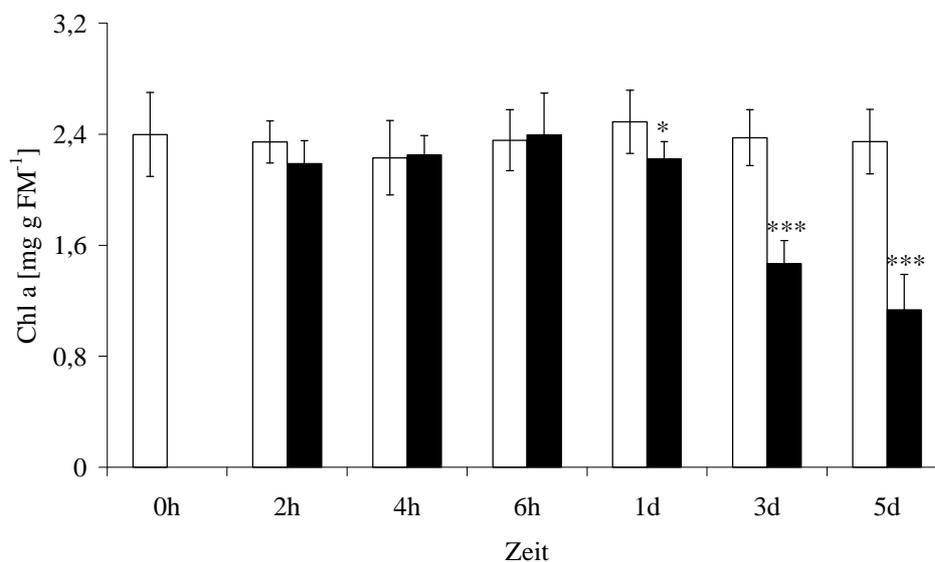


Abb. 11 Chlorophyll-a-Gehalt in *P. patens* unter kurz- und langfristiger Cd-Exposition (□ = Kontrolle, ■ = 10 µM Cd), n = 6, außer Kontrolle Tag 3 und 5: n = 3

Der Chlorophyll-b-Gehalt ($1,2 \text{ mg g FM}^{-1}$ bis $1,3 \text{ mg g FM}^{-1}$; Abb. 12, Abb. 13) in *P. patens* ist zwar deutlich geringer als der Chlorophyll-a-Gehalt, aber auch hier wurden innerhalb der ersten sechs Stunden nach Cadmium-Zugabe keine signifikanten Änderungen festgestellt (Abb. 13). Nach 24 Stunden Cadmium-Exposition kam es zu einer signifikanten, zeitabhängigen Abnahme bis auf 60 % des Kontrollwertes nach fünf Tagen (Abb. 12, Abb. 13).

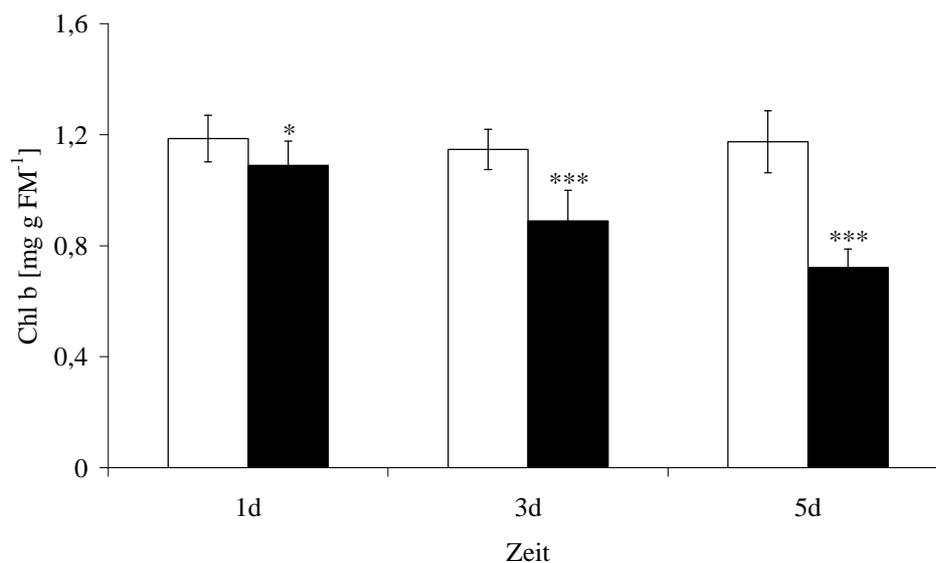


Abb. 12 Chlorophyll-b-Gehalt in *P. patens* unter Cd-Exposition (□ = Kontrolle, ■ = 10 μM Cd), n = 9

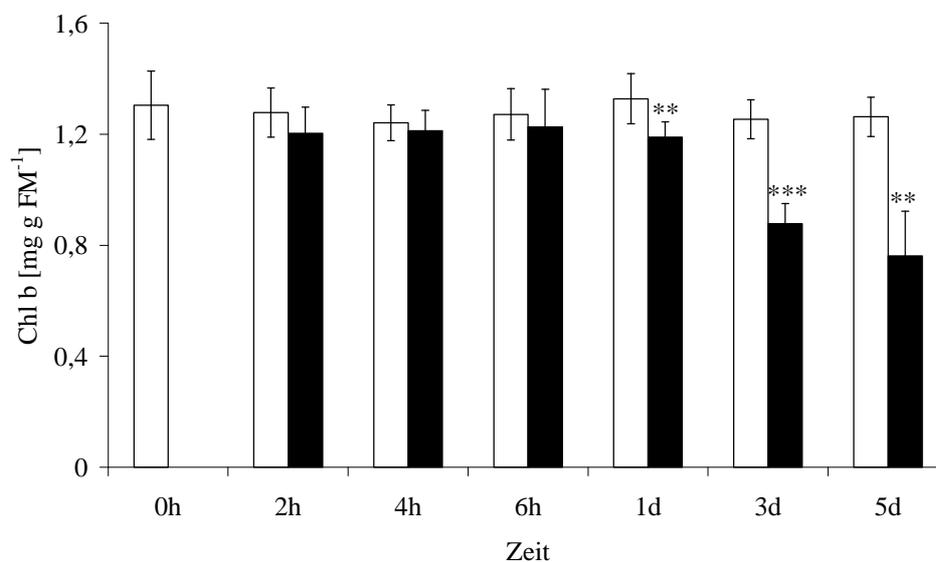


Abb. 13 Chlorophyll-b-Gehalt in *P. patens* unter kurz- und langfristiger Cd-Exposition (□ = Kontrolle, ■ = 10 μM Cd), n = 6, außer Kontrolle Tag 3 und 5: n = 3

Auch die Carotinoidkonzentration wurde durch Cadmium-Exposition beeinflusst (Abb. 14, Abb. 15). Jedoch konnte hier erst ab Tag drei eine signifikante Abnahme unter 10 μM Cd beobachtet werden. Bis zum fünften Tag nach Cadmium-Zugabe sank der Carotinoidgehalt auf ca. 80 % ab.

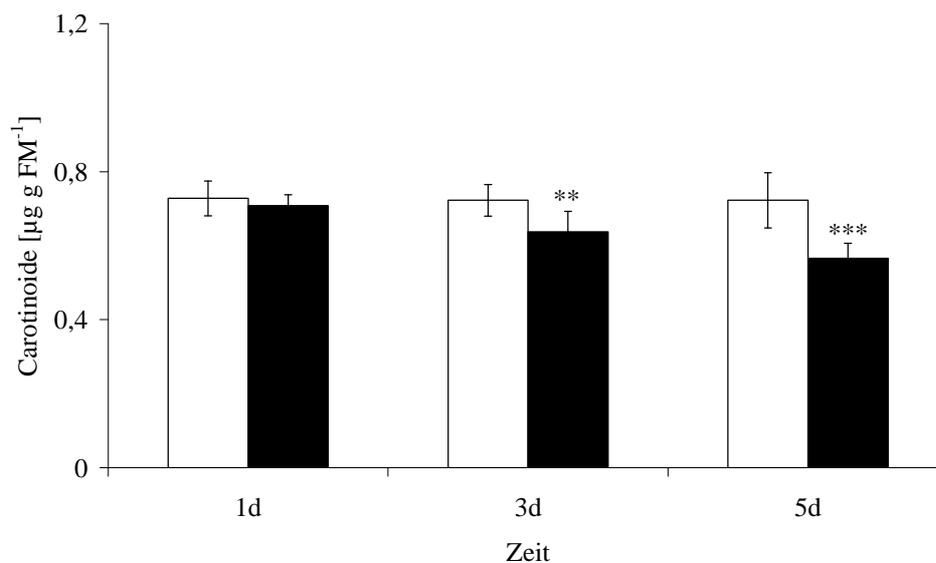


Abb. 14 Carotinoide-Gehalt in *P. patens* unter Cd-Exposition (□ = Kontrolle, ■ = 10 µM Cd), n = 9

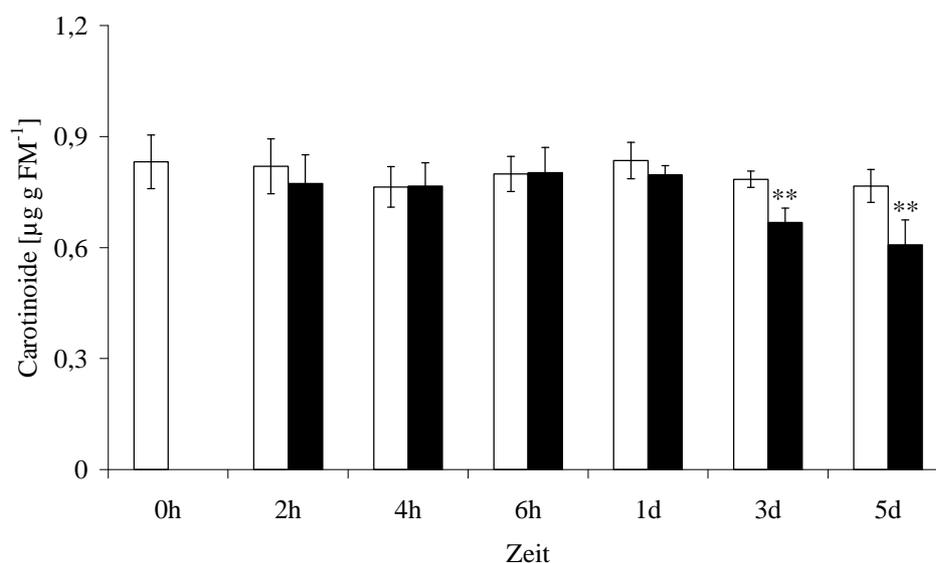


Abb. 15 Carotinoide-Gehalt in *P. patens* unter kurz- und langfristiger Cd-Exposition (□ = Kontrolle, ■ = 10 µM Cd), n = 6, außer Kontrolle Tag 3 und 5: n = 3

3.1.2 Thiolgehalte unter Cd-Exposition

Der Thiolgehalt des Moores unter Cadmium-Exposition wurde durch Derivatisierung der Sulfhydrylgruppen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Monobromobiman und anschließender chromatographischer Trennung an einer RP-18-Phase bestimmt.

Exposition mit 10 µM Cd führte zu einer signifikanten Zunahme der niedermolekularen Thiole Cystein (Cys, Abb. 16, Abb. 17), γ -Glutamylcystein (γ -EC, Abb. 18, Abb. 19) und Glutathion (GSH, Abb. 20, Abb. 21). Auch hier wurden, wie im Abschnitt 3.1.1 erläutert, zwei Experimente durchgeführt. Die Cys-Konzentration in Kontrollkulturen lag über den

Versuchszeitraum bei ca. $34 \text{ nmol g FM}^{-1}$. Nach Zugabe von $10 \mu\text{M CdCl}_2$ stieg der Cystein-Gehalt signifikant bis auf $83 \text{ nmol g FM}^{-1}$ nach fünf Tagen (Abb. 16). Im Kurzzeitexperiment konnte gezeigt werden, dass der Cystein-Gehalt schon nach 2 Stunden signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht war (Abb. 17).

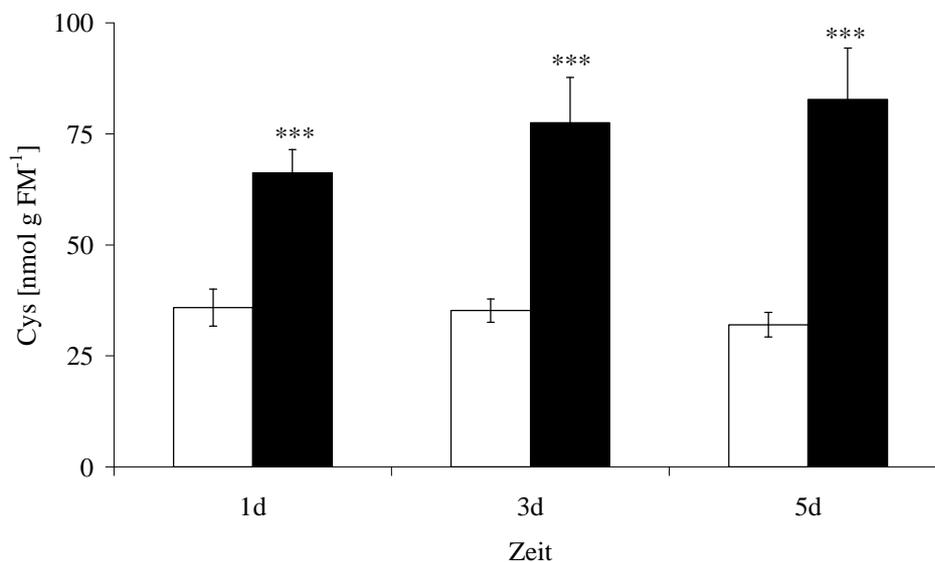


Abb. 16 Cystein-Gehalt in *P. patens* unter Cd-Exposition (□ = Kontrolle, ■ = $10 \mu\text{M Cd}$), n = 9

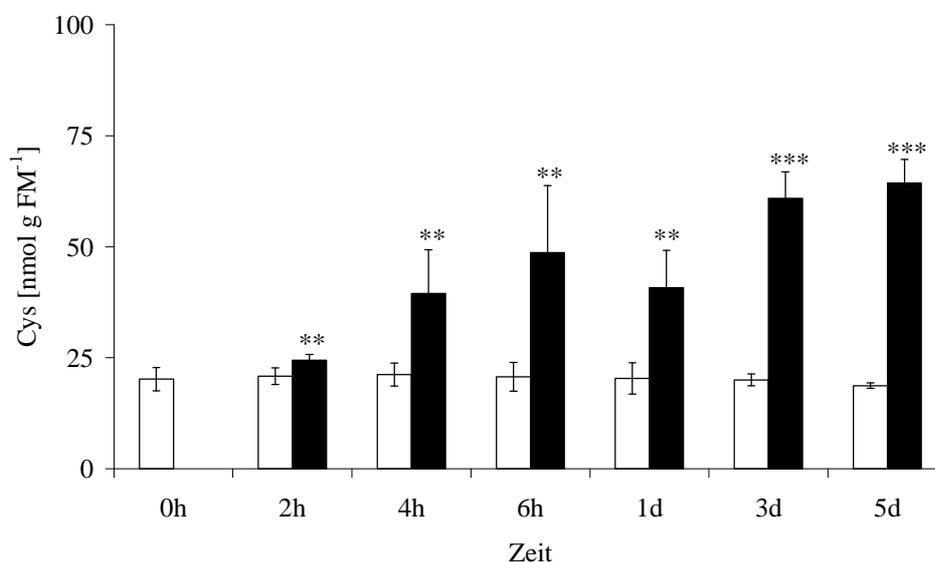


Abb. 17 Cystein-Gehalt in *P. patens* unter kurz- und langfristiger Cd-Exposition (□ = Kontrolle, ■ = $10 \mu\text{M Cd}$), n = 6, außer Kontrolle Tag 3 und 5: n = 3

Der Gehalt an γ -EC in *P. patens* ist sehr gering und beträgt durchschnittlich nur 5 nmol g FM^{-1} . Unter $10 \mu\text{M Cd}$ konnte eine zeitabhängige signifikante Zunahme der intrazellulären γ -EC-Konzentration bis auf das 7- bzw. 16-fache des Kontrollwertes

beobachtet werden (Abb. 18, Abb. 19). Kurzzeitige Cadmium-Exposition über sechs Stunden zeigte keine Veränderungen im γ -EC-Gehalt (Abb. 19).

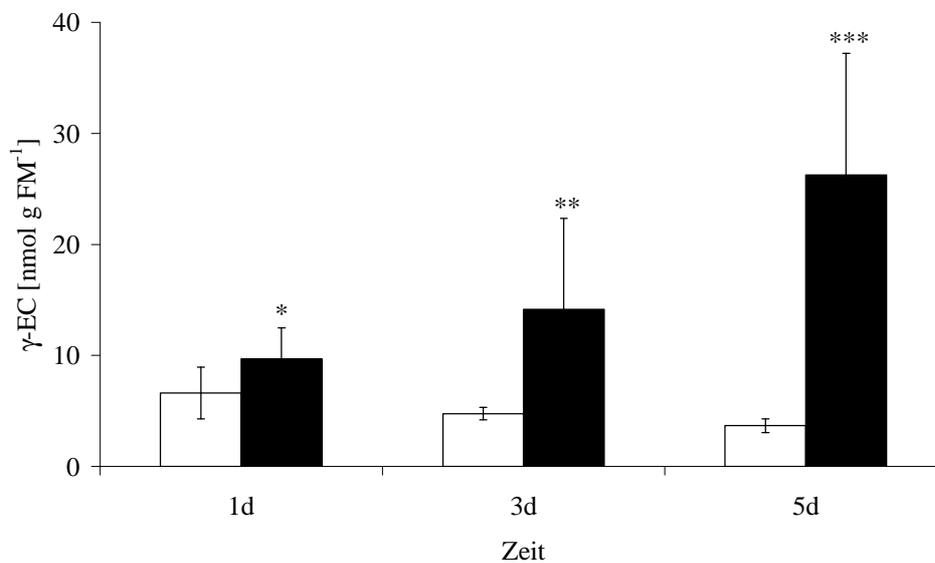


Abb. 18 γ -EC-Gehalt in *P. patens* unter Cd-Exposition (\square = Kontrolle, \blacksquare = 10 μ M Cd), n = 9

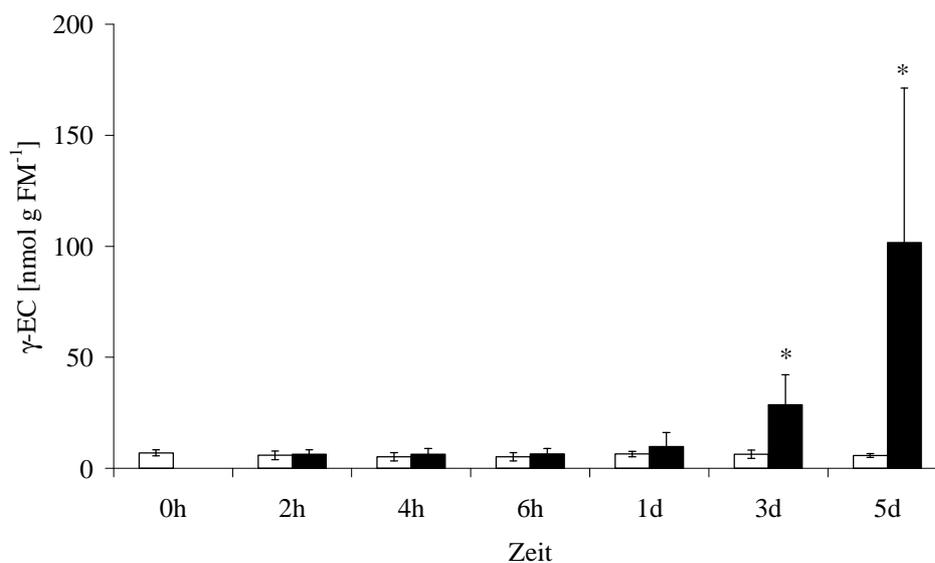


Abb. 19 γ -EC-Gehalt in *P. patens* unter kurz- und langfristiger Cd-Exposition (\square = Kontrolle, \blacksquare = 10 μ M Cd), n = 6, außer Kontrolle Tag 3 und 5: n = 3

Das Tripeptid Glutathion kam in *P. patens*-Zellen in weitaus höheren Konzentrationen ($328 \text{ nmol g FM}^{-1}$) als die Thiole Cys und γ -EC vor. Unter Cadmium-Belastung wurde auch hier eine signifikante Erhöhung ermittelt. Bereits nach vier Stunden Cd-Belastung stieg der intrazelluläre Gesamtglutathiongehalt von 341 auf $411 \text{ nmol g FM}^{-1}$ (Abb. 21). Bis zum ersten Tag stieg dieser Gehalt weiter bis auf ca. $660 \text{ nmol g FM}^{-1}$ (Abb. 20, Abb. 21). Zwischen Tag 3 und Tag 5 konnten keine weiteren Änderungen beobachtet werden. Die GSH-Konzentration blieb auf dem, im Vergleich zur Kontrolle, verdoppelten Niveau.

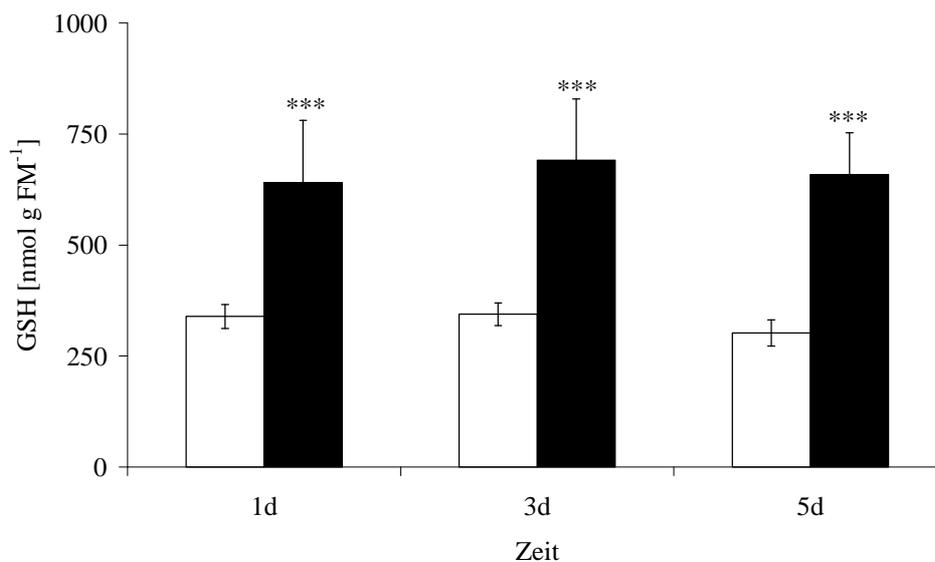


Abb. 20 Gesamtglutathiongehalt in *P. patens* unter Cd-Exposition (□ = Kontrolle, ■ = $10 \mu\text{M Cd}$), $n = 9$

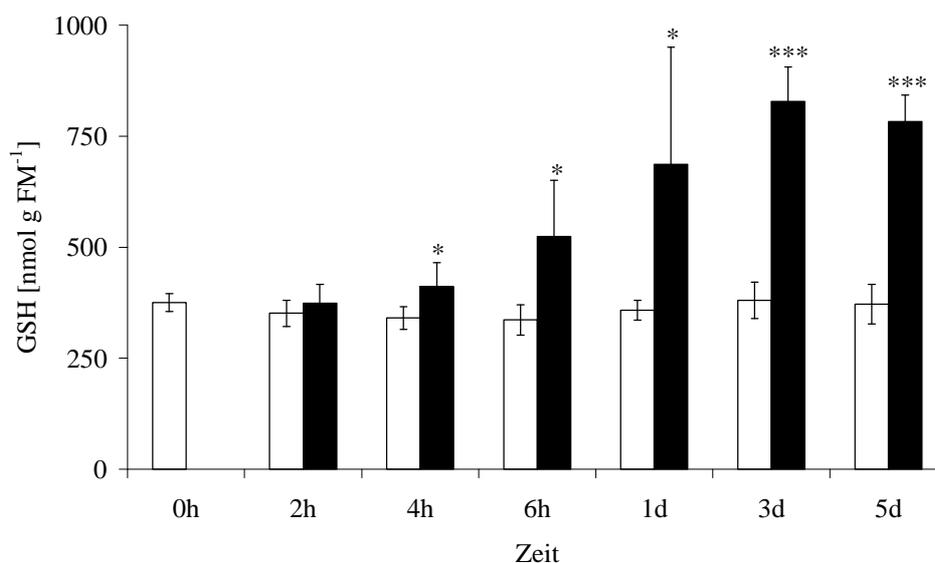


Abb. 21 Gesamtglutathiongehalt in *P. patens* unter kurz- und langfristiger Cd-Exposition (□ = Kontrolle, ■ = $10 \mu\text{M Cd}$), $n = 6$, außer Kontrolle Tag 3 und 5: $n = 3$

3.1.3 Sulfatgehalt unter Cd-Exposition

Sulfat als Ausgangsstoff für die reduktive Sulfatassimilation und somit für die Biosynthese der Thiole Cys, γ -EC und GSH wurde kapillarelektrophoretisch analysiert.

Der Sulfatgehalt des Mediums von Kontrollkulturen betrug am ersten Kulturtag 1,36 mM und lag im weiteren Versuchsverlauf zwischen 1,1 bis 1,2 mM. Cadmium-Exposition führte im Vergleich zur Kontrolle nach einem Tag zu einer Abnahme des Sulfatgehaltes im Medium auf 1,2 mM. Bis zum Ende des Versuches konnten keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Cadmium-belasteten Kulturen beobachtet werden (Abb. 22).

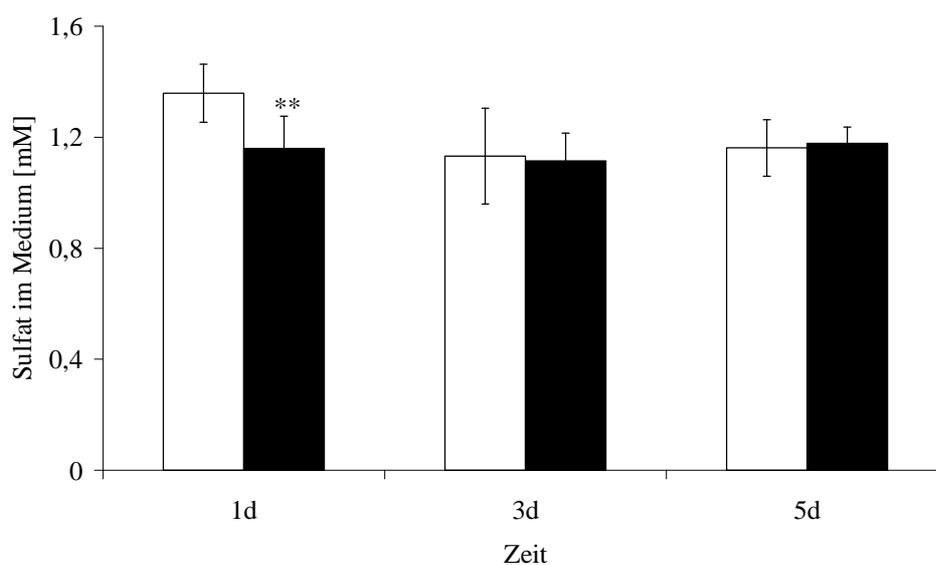


Abb. 22 Sulfatgehalt im Medium von *P. patens* unter Cd-Exposition (□ = Kontrolle, ■ = 10 µM Cd), n = 9

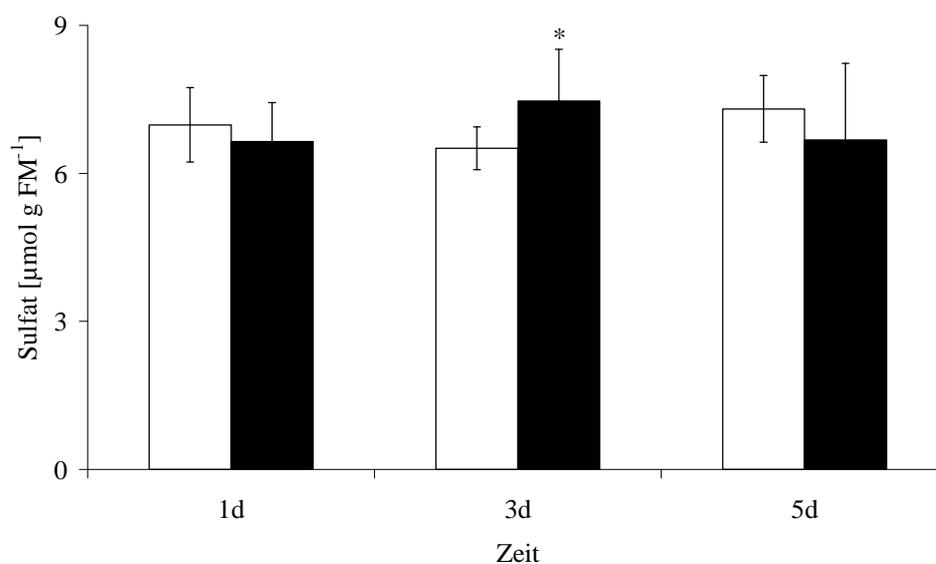


Abb. 23 intrazellulärer Sulfatgehalt von *P. patens* unter Cd-Exposition (□ = Kontrolle, ■ = 10 µM Cd), n = 9

Der intrazelluläre Sulfatgehalt in *P. patens* betrug über den gesamten Versuchszeitraum ohne Cadmium-Belastung ca. $7 \mu\text{mol g FM}^{-1}$. Exposition mit $10 \mu\text{M Cd}$ führte nach 3 Tagen zu einem geringen, aber signifikanten Anstieg auf $7,5 \mu\text{mol g FM}^{-1}$. Am fünften Tag nach Cadmium-Zugabe war kein Unterschied mehr zwischen Kontrolle und Cadmium-inkubierter Kultur sichtbar (Abb. 23).

3.1.4 ^{15}N -Tracer-Studien unter Cd-Exposition

Da die reduktive Sulfatassimilation eng mit dem Stickstoffmetabolismus verknüpft ist, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Cd auf die Stickstoffaufnahme bzw. den Einbau des Stickstoffs in die Nichtprotein- (Aminosäure-, NPN-) und Proteinfraction (PN) mittels ^{15}N -Tracerstudien in *P. patens* untersucht. Dazu wurde *P. patens* mit und ohne Cadmium in Gegenwart von $\text{Ca}(^{15}\text{NO}_3)_2$ (10 at.-%) als Tracersubstanz kultiviert.

Der Einbau des ^{15}N in die Aminosäuren (NPN-Fraktion) erfolgte sehr rasch (Abb. 24). Schon nach sechs Stunden betrug die ^{15}N -Häufigkeit ca. 1,4 at.-% exc. In der Kontrollkultur stieg die ^{15}N -Häufigkeit kontinuierlich bis zum fünften Tag auf 2,9 at.-% exc. an. Unter Cd-Exposition konnte hingegen nach dem ersten Tag keine weitere Veränderung der ^{15}N -Häufigkeit beobachtet werden. Die ^{15}N -Häufigkeiten in der Nichtproteinfraction unter Cd-Belastung lagen am dritten und fünften Tag bei 66 % und 62 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 24).

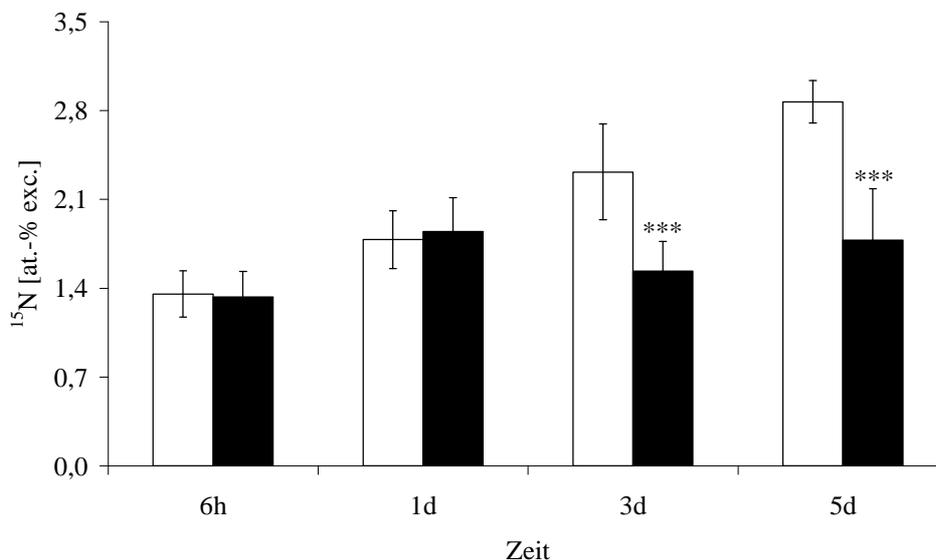


Abb. 24 ^{15}N -Häufigkeit in der NPN-Fraktion von *P. patens* unter Cd-Exposition (\square = Kontrolle, \blacksquare = $10 \mu\text{M Cd}$), n = 9

Der Einbau des ^{15}N in die Proteinfraction erfolgte etwas verzögert (Abb. 25). Nach sechs Stunden betrug die ^{15}N -Häufigkeit in der Kontrollkultur erst 0,19 at.-% exc. Auch hier

konnte ein kontinuierlicher Anstieg des Tracereinbaus bis zum fünften Kulturtag beobachtet werden. Am fünften Tag war die ^{15}N -Häufigkeit in der NPN- und PN-Fraktion unter Kontrollbedingungen fast gleich. Im Gegensatz zur NPN-Fraktion wurde unter Cd-Belastung ebenfalls ein kontinuierlicher Anstieg des Einbaus von ^{15}N in die Proteinfraktion beobachtet. Jedoch war die ^{15}N -Häufigkeit geringer als unter Kontrollbedingungen. Nach fünf Tagen Cadmium-Exposition wurde eine ^{15}N -Häufigkeit von 2,2 at.-% exc. bestimmt (72 % im Vergleich zur Kontrolle, Abb. 25).

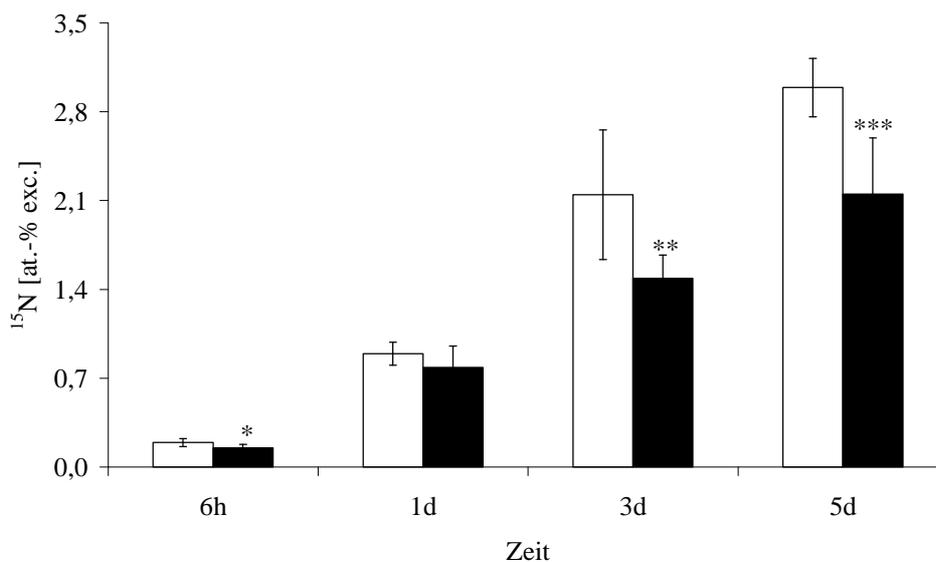


Abb. 25 ^{15}N -Häufigkeit in der PN-Fraktion von *P. patens* unter Cd-Exposition (\square = Kontrolle, \blacksquare = 10 μM Cd), n = 9

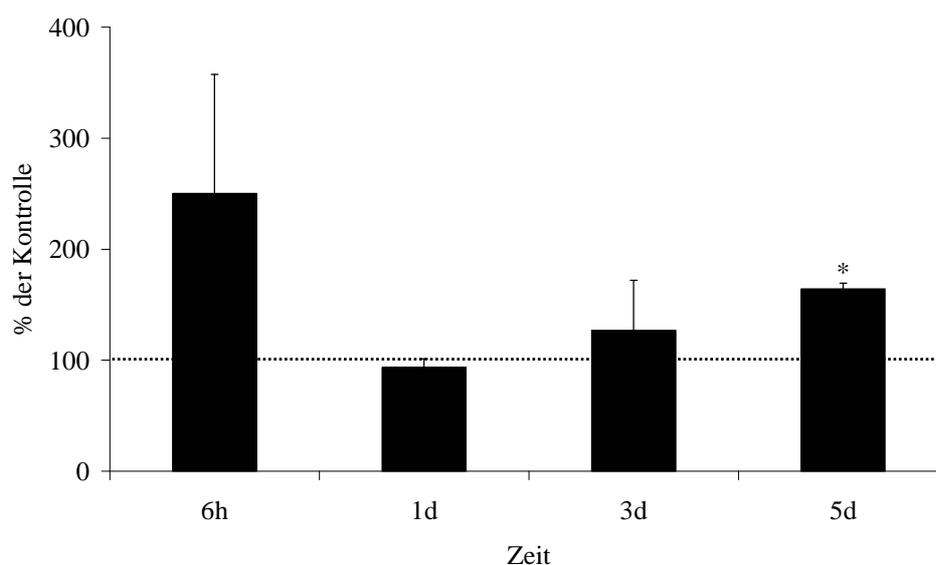


Abb. 26 ^{15}N -Häufigkeit in der Glutathionfraction von *P. patens* unter Cd-Exposition (dargestellt in % der Kontrolle), n = 3

In einem weiteren Experiment wurde die ^{15}N -Häufigkeit in der Glutathionfraktion von Kontroll- und Cd-belasteten Kulturen untersucht. Hierzu wurde diese Fraktion zunächst chromatographisch getrennt. Da diese Fraktion zu wenig Stickstoff für die massenspektrometrische Isotopenanalyse enthielt, wurde die Methode der Isotopenverdünnung (Jung *et al.*, 1979) angewendet (Kapitel 2.9.3, S. 25). Sowohl in Kontroll- als auch in Cd-belasteten Kulturen wurde kontinuierlich ^{15}N in das Glutathion eingebaut. Abb. 26 zeigt die ^{15}N -Häufigkeiten in der GSH-Fraktion während fünftägiger Kultivierung mit Cd als Prozent der entsprechenden Kontrolle. Nach fünf Tagen war die ^{15}N -Häufigkeit im Glutathion der Cd-belasteten Kultur signifikant höher als in der Kontrollkultur (Abb. 26). Auf eine absolute Quantifizierung der ^{15}N -Häufigkeiten musste verzichtet werden, da während des Trocknungsprozesses der Fraktionen Stickstoff verloren ging. Da jedoch genug Stickstoff für die Messung der ^{15}N -Häufigkeit vorhanden war und Vorexperimente die Genauigkeit der Methode bestätigten, erfolgte die Auswertung mittels Standards.

3.2 Auswirkungen von Sulfatmangel auf *P. patens*

3.2.1 Vitalität unter Sulfatmangel

Zur Untersuchung des Einflusses von Cadmium auf die reduktive Sulfatassimilation wurden zunächst Sulfatmangelexperimente durchgeführt. Abb. 27, Abb. 28 und Abb. 29 zeigen den Pigmentgehalt (Chl a, Chl b, Carotinoide) von *P. patens* unter Kontrollbedingungen (ca. 1 mM Sulfat), 0,4 μM Sulfat und ohne Sulfat im Medium. Während des Versuchszeitraumes von 10 Tagen lag der Chlorophyllgehalt der Kontrollkulturen bei ca. 2 mg g FM⁻¹ (Chl a) bzw. 1 mg g FM⁻¹ (Chl b). Die Reduktion des Sulfatgehaltes im Medium bewirkte bis zum dritten Tag noch keine Effekte hinsichtlich des Chlorophyllgehaltes. Eine zehntägige Kultivierung sowohl mit 0,4 μM Sulfat als auch ohne Sulfat im Medium ergab eine Abnahme des Chlorophyllgehaltes auf ca. 76 % (Chl a, Abb. 27) bzw. 81 % (Chl b, Abb. 28) der Kontrolle.

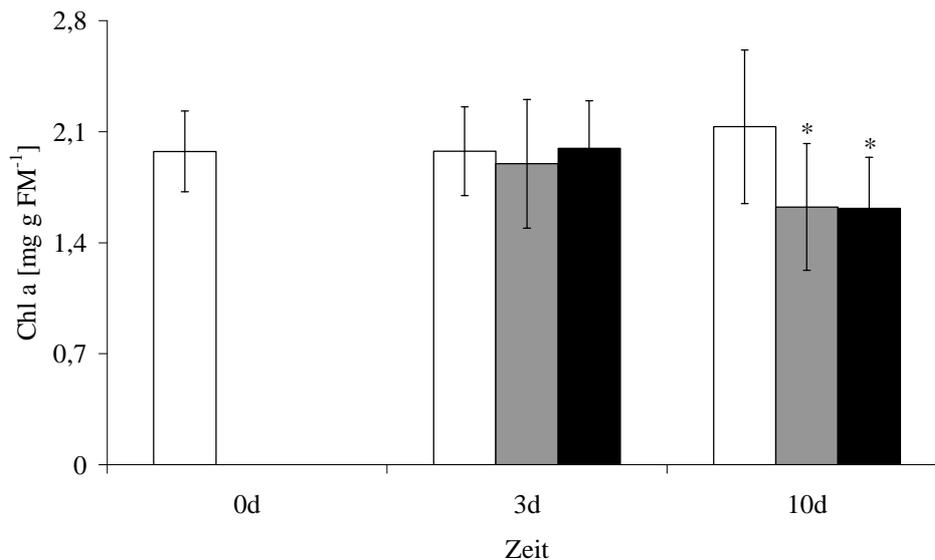


Abb. 27 Chlorophyll-a-Gehalt in *P. patens* unter Sulfatmangelbedingungen (□ = Kontrolle, ■ = 0,4 μM Sulfat, ■ = 0 μM Sulfat), n = 9

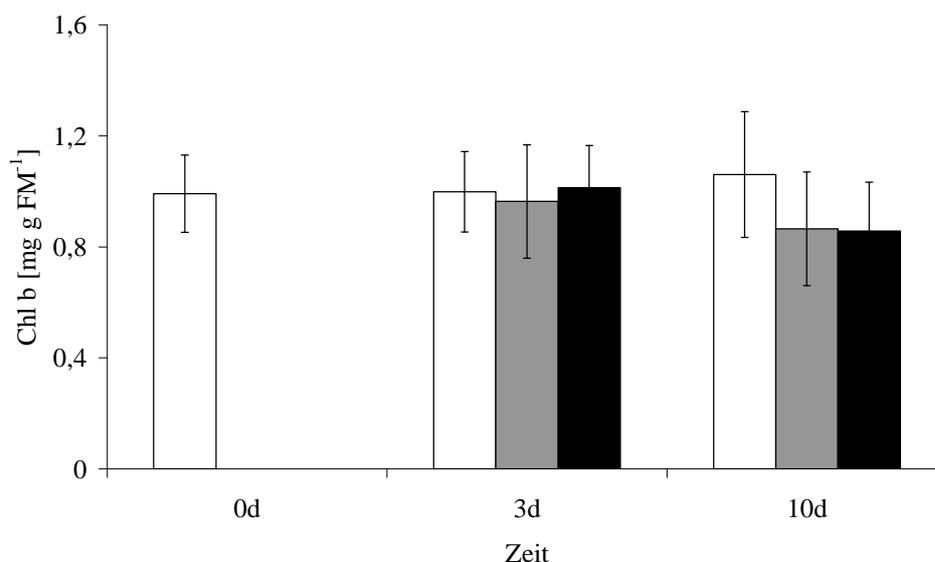


Abb. 28 Chlorophyll-b-Gehalt in *P. patens* unter Sulfatmangelbedingungen (□ = Kontrolle, ■ = 0,4 μM Sulfat, ■ = 0 μM Sulfat), n = 9

Aufgrund der großen Standardabweichungen war die Abnahme für Chlorophyll b nicht signifikant. Es konnten auch keine signifikanten Unterschiede im Chlorophyllgehalt zwischen den beiden Sulfatmangel-Kulturen beobachtet werden. Auf den Carotinoidgehalt hatte eine dreitägige Sulfatverarmung keinen Einfluss (Abb. 29). Erst nach zehn Tagen sank dieser auf 84 % unter 0,4 μM Sulfat bzw. 82 % ohne Sulfat im Medium.

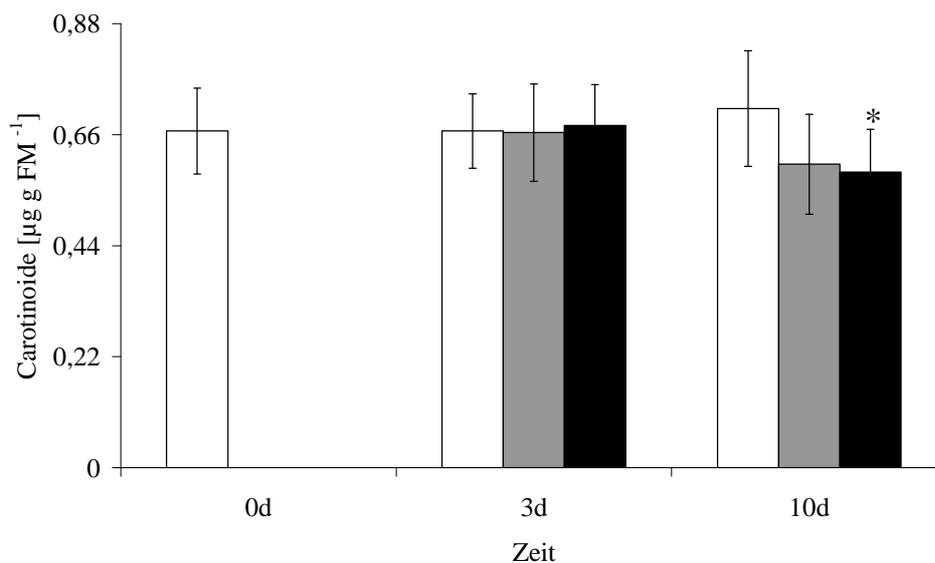


Abb. 29 Carotinoide-Gehalt in *P. patens* unter Sulfatmangelbedingungen (□ = Kontrolle, ■ = 0,4 µM Sulfat, ■ = 0 µM Sulfat), n = 9

3.2.2 Thiolgehalte unter Sulfatmangel

Sulfat ist die Ausgangsverbindung für die reduktive Sulfatassimilation und somit essenziell für die Bildung von Thiolen wie Cystein, γ -EC und GSH. Daher war es wichtig zu überprüfen, welche Auswirkungen Sulfatmangel auf die intrazellulären Thiolgehalte hat. In ausreichend mit Sulfat versorgten *P. patens*-Kulturen betrug der Cys-Gehalt über den Versuchszeitraum von zehn Tagen ca. 34 nmol g FM⁻¹ (Abb. 30).

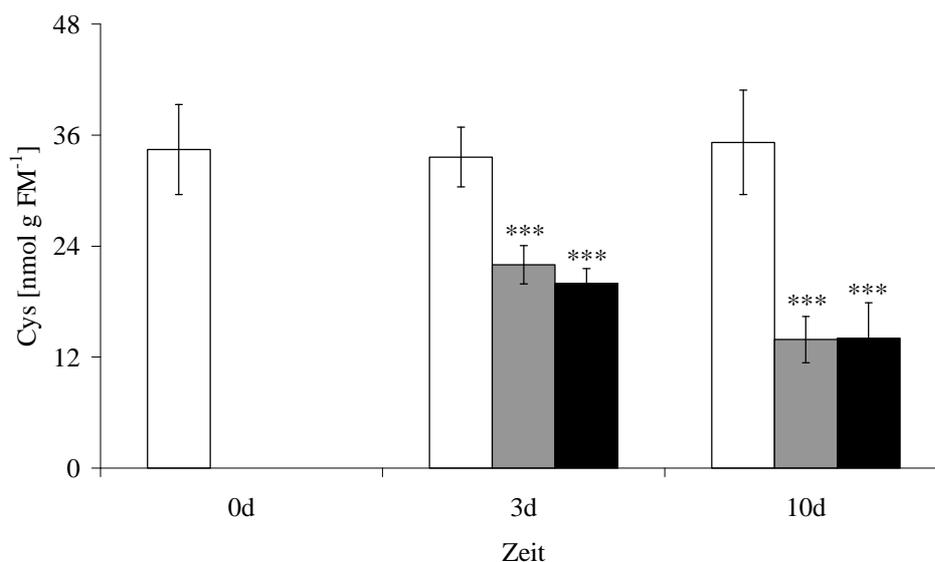


Abb. 30 Cystein-Gehalt in *P. patens* unter Sulfatmangelbedingungen (□ = Kontrolle, ■ = 0,4 µM Sulfat, ■ = 0 µM Sulfat), n = 9

Sowohl 0,4 μM Sulfat als auch vollständiger Sulfatmangel im Medium führten schon nach drei Tagen zu einer signifikanten Abnahme im Cys-Gehalt auf 22 nmol g FM^{-1} bzw. 20 nmol g FM^{-1} (Abb. 30). Bis zum zehnten Tag wurde eine weitere Abnahme bis auf 14 nmol g FM^{-1} in beiden Versuchsansätzen beobachtet. Zwischen den beiden Sulfatmangel-Ansätzen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die Konzentration des GSH-Biosynthese-Zwischenproduktes, $\gamma\text{-EC}$, lag zu Beginn des Experimentes in der Kontroll-Kultur bei 7,6 nmol g FM^{-1} und sank innerhalb von zehn Tagen auf ca. 4,7 nmol g FM^{-1} (Abb. 31). Nach drei Tagen Sulfatmangel waren noch keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle messbar. Jedoch sank nach zehn Tagen der $\gamma\text{-EC}$ -Gehalt deutlich auf 53 % (0,4 μM Sulfat) bzw. 67 % (ohne Sulfat im Medium) der Kontrolle (Abb. 31).

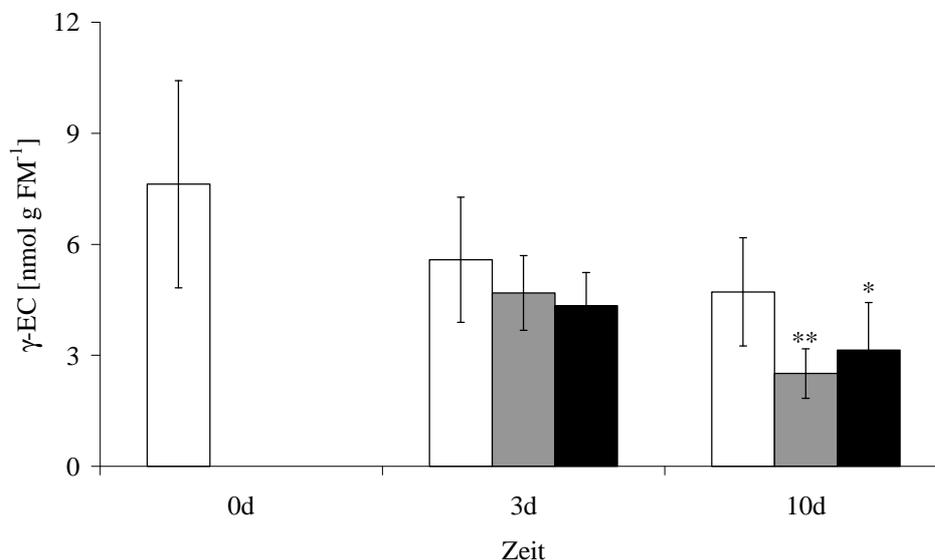


Abb. 31 $\gamma\text{-EC}$ -Gehalt in *P. patens* unter Sulfatmangelbedingungen (□ = Kontrolle, ■ = 0,4 μM Sulfat, ■ = 0 μM Sulfat), n = 9

Bei einer Sulfatkonzentration von 1 mM im Medium (Kontrolle) wurde in *P. patens* ein Glutathion-Gehalt von ca. 319 nmol g FM^{-1} bestimmt. Innerhalb von zehn Tagen Kultivierung wurden in den Kontrollkulturen kaum Veränderungen beobachtet. Sulfatmangel bewirkte schon nach drei Tagen ein Absinken des Gesamtglutathiongehaltes auf 193 nmol g FM^{-1} (0,4 μM Sulfat) bzw. 189 nmol g FM^{-1} (0 μM Sulfat). Bis zum zehnten Tag unter Sulfatmangel sanken die GSH-Gehalte weiter bis auf 118 nmol g FM^{-1} (Abb. 32).

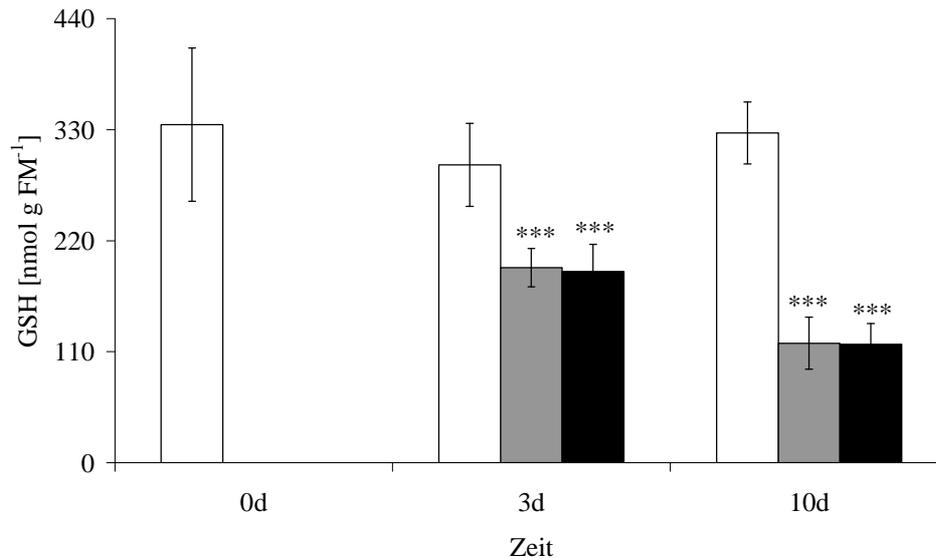


Abb. 32 Gesamtglutathiongehalt in *P. patens* unter Sulfatmangelbedingungen (□ = Kontrolle, ■ = 0,4 μM Sulfat, ■ = 0 μM Sulfat), n = 9

3.2.3 Sulfatgehalt unter Sulfatmangel

Während der Kultivierung unter Sulfatmangel wurde auch der intrazelluläre Sulfatgehalt gemessen. Unter Kontrollbedingungen betrug der intrazelluläre Sulfatgehalt gleichbleibend ca. 6–7 μmol g FM⁻¹ über den gesamten Versuchszeitraum. Bereits nach drei Tagen Sulfatmangel sank dieser auf ca. 40 % der Kontrolle und nach zehn Tagen wurden nur noch ca. 7 % gemessen (Abb. 33).

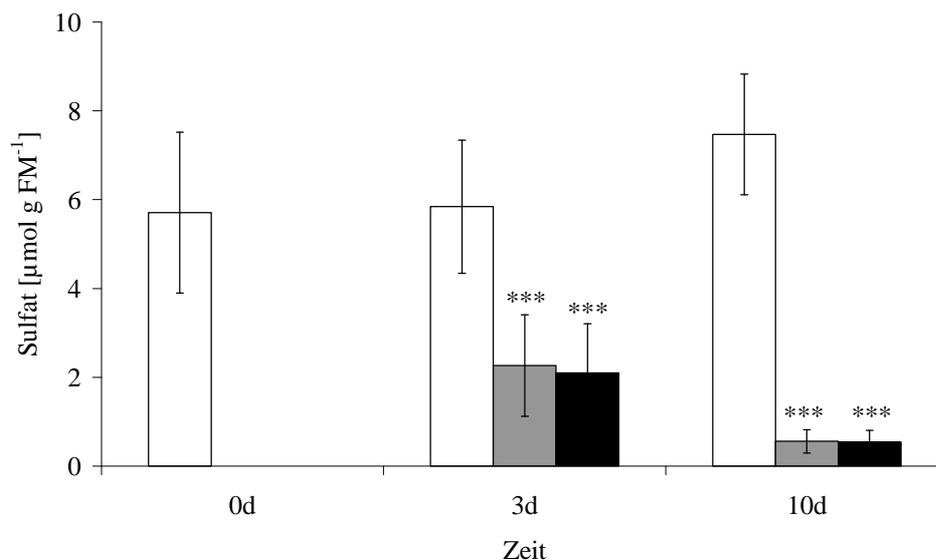


Abb. 33 intrazellulärer Sulfatgehalt von *P. patens* unter Sulfatmangelbedingungen (□ = Kontrolle, ■ = 0,4 μM Sulfat, ■ = 0 μM Sulfat), n = 9

3.2.4 Transkriptmengen der Enzyme der reduktiven Sulfatassimilation

Unter Sulfatmangel-Kultivierung wurden die Transkriptmengen der Gene der reduktiven Sulfatassimilation und der Glutathionbiosynthese mittels quantitativer *real-time*-PCR analysiert. Es wurden folgende Gene untersucht: Sulfattransporter (ST), ATP-Sulfurylase (ATPS), APS-Reduktase (APR), PAPS-Reduktase (PAPR, jetzt APR-B), Sulfitreduktase (SiR), Serinacetyltransferase (SAT), O-Acetylserin(thiol)lyase (OAS-TL) sowie die beiden Gene für die GSH-Biosyntheseenzyme, γ -Glutamylsynthetase (γ -ECS) und Glutathionsynthetase (GSHS). Die relative Genexpression wurde mit Hilfe des Programms iQ5 (Bio-Rad) berechnet. Als Referenzgen (*housekeeping gene*) wurde die RuBisCO verwendet, da diese unter Sulfatmangel keine Induktion zeigte. Die Ergebnisse zeigen eine eindeutige Induktion des SAT-Gens schon nach drei Tagen (ca. 4-fach), welche sich bis zum zehnten Tag noch steigerte (ca. 19-fach). Es konnte kein Unterschied zwischen der Versorgung mit 0,4 μ M Sulfat und sulfatfreier Kultivierung beobachtet werden. Alle anderen Gene zeigen nur sehr geringe bzw. keine Induktion mit sehr hohen Standardabweichungen unter Sulfatmangel (Tabelle 4). Aufgrund der Transformation der Rohdaten bei der Berechnung wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Tabelle 4 Quantifizierung der Transkriptmengen der Gene für die reduktive Sulfatassimilation und GSH-Biosynthese unter Sulfatmangel (n=6)

Gen	0,4 μ M Sulfat		ohne Sulfat	
	Tag 3	Tag 10	Tag 3	Tag 10
ST	0,96 \pm 0,49	1,47 \pm 1,23	1,36 \pm 0,77	1,25 \pm 0,96
ATPS	1,02 \pm 0,64	0,84 \pm 0,51	1,65 \pm 1,74	1,68 \pm 1,00
APR	1,35 \pm 1,01	1,92 \pm 1,49	0,98 \pm 0,48	1,41 \pm 0,94
APR-B (PAPR)	0,82 \pm 0,42	0,58 \pm 0,67	1,01 \pm 0,55	0,65 \pm 0,60
SiR	1,02 \pm 0,68	0,85 \pm 0,94	1,21 \pm 0,92	0,82 \pm 0,83
SAT	4,39 \pm 2,22	19,19 \pm 13,89	4,05 \pm 2,41	18,95 \pm 10,80
OAST-L	2,08 \pm 1,13	1,14 \pm 1,29	1,53 \pm 1,04	1,07 \pm 1,08
γ -ECS	0,93 \pm 0,40	1,19 \pm 1,07	1,08 \pm 0,66	1,20 \pm 0,91
GSHS	1,92 \pm 1,13	1,79 \pm 1,57	1,41 \pm 0,62	1,97 \pm 1,42

3.3 Einfluss von Sulfatmangel auf die Cd-Toxizität

3.3.1 Vitalität unter Sulfatmangel und Cd-Exposition

Zur Untersuchung des Einflusses von Sulfatmangel auf die Cadmium-Toxizität wurden *P. patens*-Kulturen ohne Sulfat im Medium für fünf Tage mit 10 μM CdCl_2 exponiert. Als Kontrolle diente eine Cd-freie Kultur, die ebenfalls ohne Sulfatquelle im Medium kultiviert wurde. Unter Kontrollbedingungen (Sulfatmangel) nahm der Chlorophyll-a-Gehalt leicht von 2,5 auf 2,1 mg g FM^{-1} ab. Wurden die Kulturen zusätzlich mit 10 μM Cd belastet, konnten schon nach drei Tagen signifikante Unterschiede zwischen beiden Kulturen beobachtet werden (Abb. 34). Nach fünf Tagen unter Sulfatmangel und Cadmium-Belastung lag der Chlorophyll-a-Gehalt bei 73 % der Kontrolle (= Sulfatmangel ohne Cadmium-Belastung).

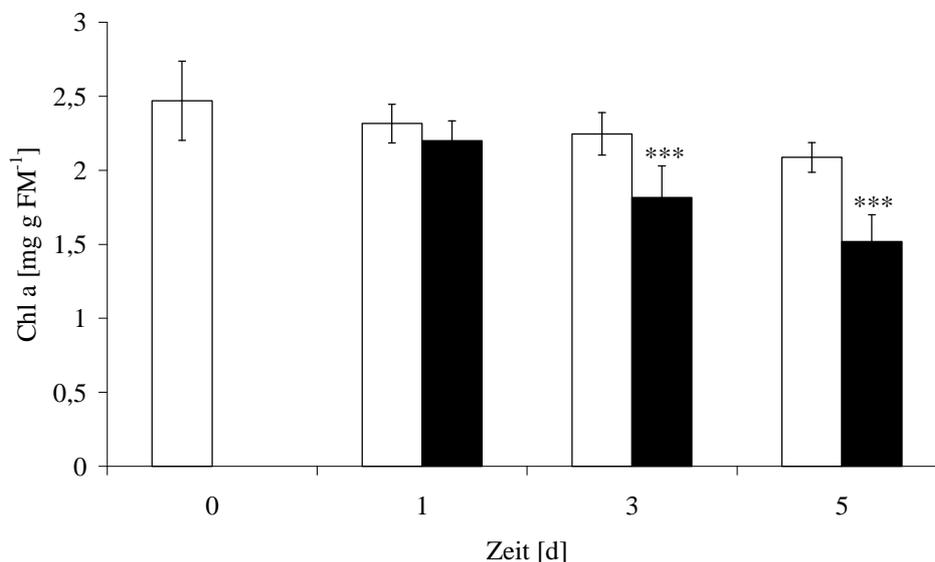


Abb. 34 Chlorophyll-a-Gehalt in *P. patens* unter Sulfatmangelbedingungen und Cd-Exposition (\square = $-\text{SO}_4^{2-}/-\text{Cd}$, \blacksquare = $-\text{SO}_4^{2-}/+\text{Cd}$), $n = 9$

Ein ähnliches Verhalten wurde auch beim Chlorophyll-b-Gehalt beobachtet (Abb. 35). Hier sank der Gehalt unter Sulfatmangel von 1,3 auf 1,2 mg g FM^{-1} . Eine fünftägige Cadmium-Belastung bewirkte eine Abnahme des Chlorophyll-b-Gehaltes auf 76 % der Kontrolle.

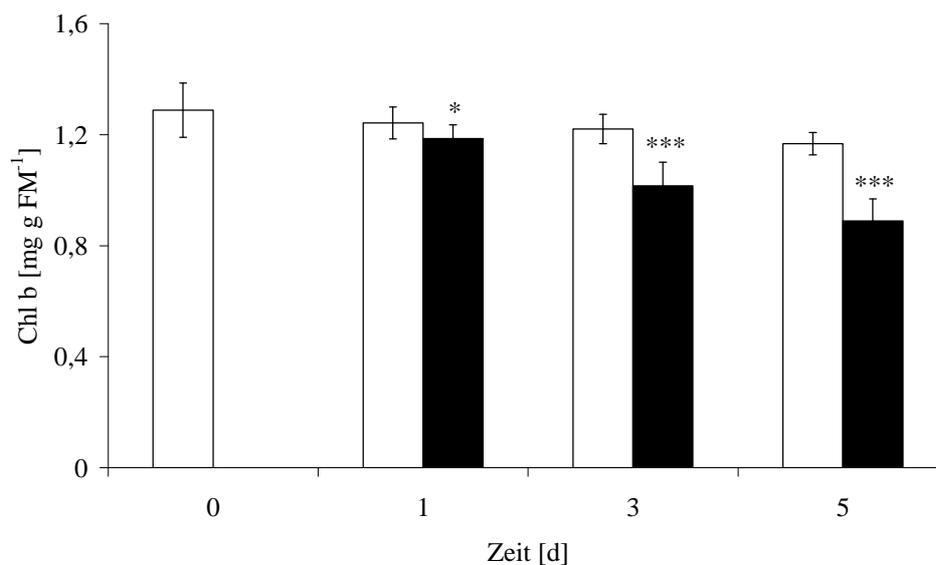


Abb. 35 Chlorophyll-b-Gehalt in *P. patens* unter Sulfatmangelbedingungen und Cd-Exposition (□ = -SO₄²⁻/- Cd, ■ = -SO₄²⁻/+ Cd), n = 9

Der Carotinoidgehalt zeigte nach fünf Tagen Sulfatmangel eine geringe, aber signifikante Abnahme. Zusätzliche Cadmium-Belastung führte zu einer zeitabhängigen Abnahme des Carotinoidgehaltes im Vergleich zur Kontrolle ohne Cadmium (Abb. 36). Nach fünf Tagen betrug der Carotinoidgehalt 0,68 µg g FM⁻¹ unter Cadmium-Belastung, während die Konzentration in der Kontrollkultur bei 0,76 µg g FM⁻¹ lag.

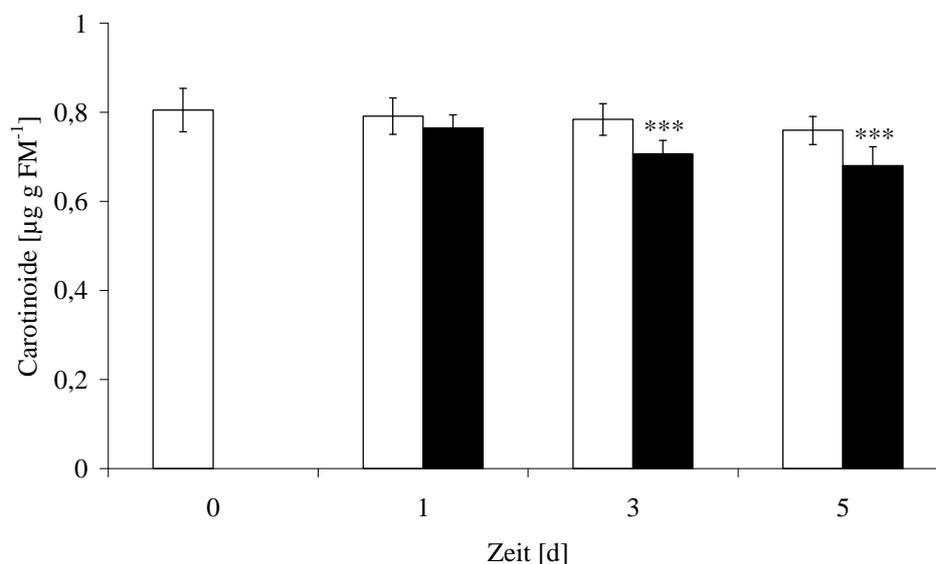


Abb. 36 Carotinoid-Gehalt in *P. patens* unter Sulfatmangelbedingungen und Cd-Exposition (□ = -SO₄²⁻/- Cd, ■ = -SO₄²⁻/+ Cd), n = 9

3.3.2 Thiolgehalte unter Sulfatmangel und Cd-Exposition

Die Analyse der Thiolgehalte unter Sulfatmangelbedingungen und Cadmium-Exposition zeigte, dass sich die Konzentrationen der Thiole Cystein, γ -EC und Glutathion erhöhten, trotz Fehlens der Ausgangsverbindung Sulfat (Abb. 37, Abb. 38, Abb. 39). Zu Beginn dieses Experimentes lag der Cys-Gehalt der *P. patens*-Kultur bei ca. 26 nmol g FM⁻¹. Fünftägiger Sulfatmangel im Medium führte zu einer Reduktion des Cys-Gehaltes auf 12 nmol g FM⁻¹. Wurden zeitgleich mit der Entfernung des Sulfates aus dem Medium 10 μ M Cadmium zugegeben, erhöhte sich der Cys-Gehalt schon nach einem Tag signifikant im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 37). Als Kontrolle diente eine Kultur ohne Sulfat und ohne Cadmium im Medium. Nach fünf Tagen war der Cys-Gehalt der Cadmium-belasteten Kultur 3,4-fach erhöht gegenüber der Kontrollkultur (Abb. 37).

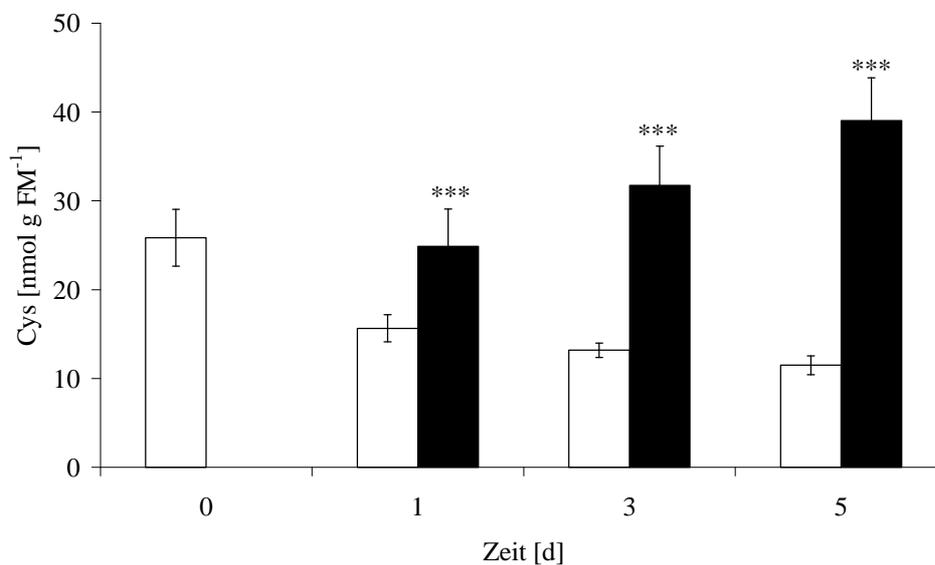


Abb. 37 Cystein-Gehalt in *P. patens* unter Sulfatmangelbedingungen und Cd-Exposition (□ = -SO₄²⁻/-Cd, ■ = -SO₄²⁻/+ Cd), n = 9

Ein ähnlicher Trend konnte auch für das Dipeptid γ -EC beobachtet werden. Der Sulfatmangel bewirkte hier ein Absinken von 10 nmol g FM⁻¹ auf 3,6 nmol g FM⁻¹ innerhalb von fünf Tagen. Bei Zugabe von 10 μ M CdCl₂ stieg der γ -EC-Gehalt erst nach 3 Tagen signifikant auf den doppelten Wert der Kontrolle an. Bis zum fünften Kulturtag bewirkte Cadmium einen weiteren Anstieg bis auf ca. 15 nmol g FM⁻¹ (Abb. 38).

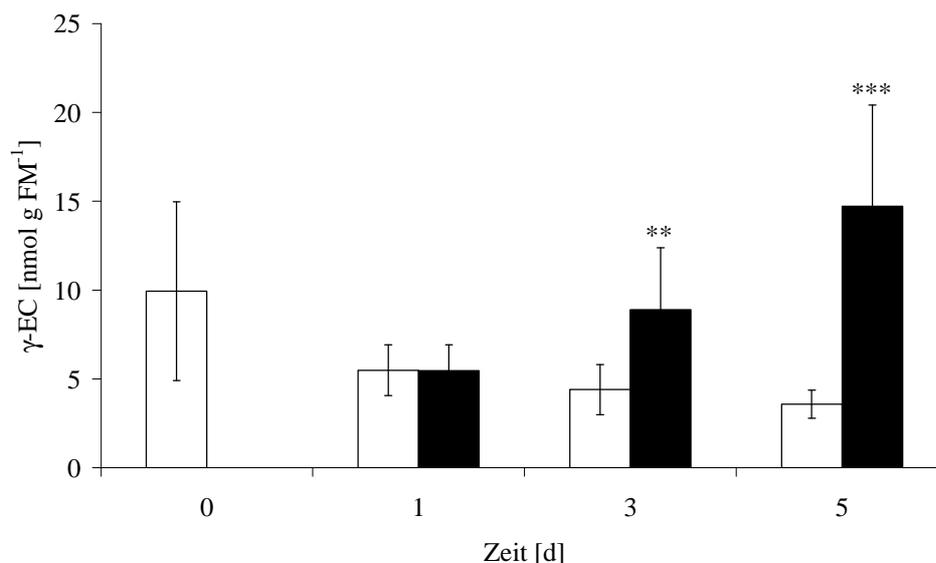


Abb. 38 γ -EC-Gehalt in *P. patens* unter Sulfatmangelbedingungen und Cd-Exposition (\square = $-\text{SO}_4^{2-}/-\text{Cd}$, \blacksquare = $-\text{SO}_4^{2-}/+\text{Cd}$), $n = 9$

Der Gesamtglutathiongehalt zeigte auch bei diesem Experiment die höchste Konzentration in der Zelle im Vergleich zu Cys und γ -EC und lag bei Versuchsbeginn bei ca. 380 nmol g FM⁻¹. Sulfatmangel bewirkte eine rasche Abnahme des Tripeptids auf 216 nmol g FM⁻¹ nach einem Tag. Bis zum fünften Tag nahm der Gesamt-GSH-Gehalt langsamer bis auf 171 nmol g FM⁻¹ ab. Cd-Exposition unter Sulfatmangelbedingungen führte zu einer schnellen Induktion der GSH-Biosynthese. Schon nach einem Tag war der GSH-Gehalt signifikant erhöht und steigerte sich bis zum fünften Tag auf das 3,3-fache im Vergleich zur Kontrolle ohne Sulfat und ohne Cadmium im Medium (Abb. 39).

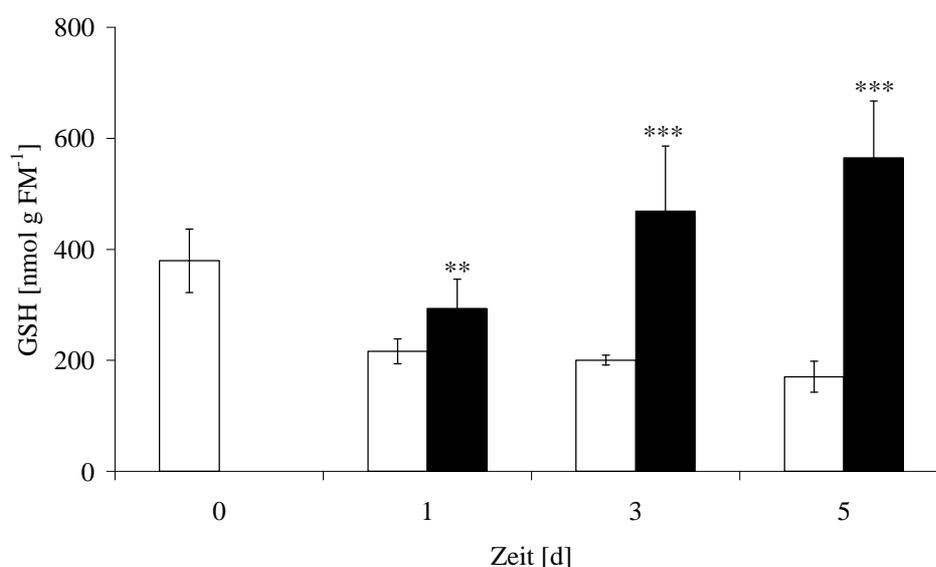


Abb. 39 Gesamtglutathiongehalt in *P. patens* unter Sulfatmangelbedingungen und Cd-Exposition (\square = $-\text{SO}_4^{2-}/-\text{Cd}$, \blacksquare = $-\text{SO}_4^{2-}/+\text{Cd}$), $n = 9$

3.3.3 Sulfatgehalt unter Sulfatmangel und Cd-Exposition

Die Untersuchungen zum intrazellulären Sulfatgehalt unter Sulfatmangel und gleichzeitiger Cadmium-Exposition zeigten in beiden Versuchsvarianten ($-\text{SO}_4^{2-}/-\text{SO}_4^{2-} + \text{Cd}$) ein Absinken des intrazellulären Sulfatgehaltes über den Versuchszeitraum von fünf Tagen (Abb. 40). An Tag drei und fünf konnte für die Cadmium-belastete Kultur ein etwas, jedoch nicht signifikant, erhöhter Sulfatgehalt gegenüber der sulfatverarmten Kultur ohne Cadmium festgestellt werden.

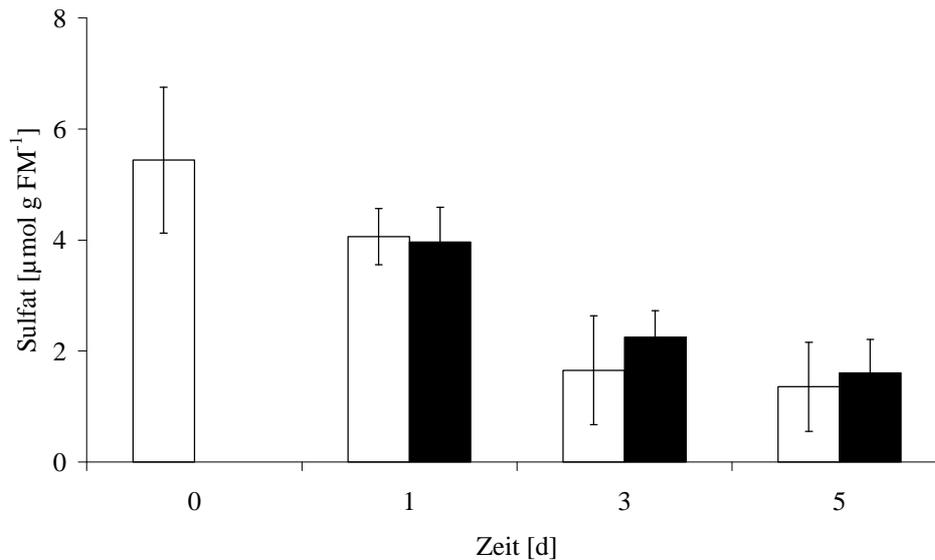


Abb. 40 intrazellulärer Sulfatgehalt in *P. patens* unter Sulfatmangelbedingungen und Cd-Exposition (□ = $-\text{SO}_4^{2-}/-\text{Cd}$, ■ = $-\text{SO}_4^{2-}/+\text{Cd}$), n = 9

3.4 Einfluss von langfristigem Sulfatmangel auf die Cadmium-Toxizität

Zur Untersuchung der Auswirkung von langfristigem Sulfatmangel auf die Cadmium-Toxizität wurde das Moos zunächst zehn Tage mit bzw. ohne Sulfat im Medium kultiviert. In Vorexperimenten (Kapitel 3.2, S. 40) konnte gezeigt werden, dass nach zehntägigem Sulfatmangel kaum noch intrazelluläres Sulfat nachweisbar war. Des Weiteren war die Vitalität in geringem Maße, aber signifikant beeinflusst und auch der Thiolgehalt war signifikant gesunken.

3.4.1 Vitalität unter langfristigem Sulfatmangel und Cadmium-Exposition

Als Vitalitätsparameter wurde der Pigmentgehalt ausgewählt. Die Gehalte an Chlorophyll a und b betragen zu Beginn des Experimentes 2,7 bzw. 1,4 mg g FM⁻¹ und verringerten sich unter Sulfatmangel innerhalb von zehn Tagen in guter Übereinstimmung mit den Daten des Vorversuches (Kapitel 3.2.1, S. 40) auf 73 bzw. 80 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 41,

Abb. 42). Die Abnahme war jedoch nicht signifikant. Die anschließende dreitägige Exposition mit 10 μM Cadmium führte sowohl unter Sulfatmangel als auch unter ausreichender Sulfatversorgung zu einer weiteren Abnahme im Chlorophyll-a und b-Gehalt (Abb. 41, Abb. 42). Eine signifikante Wechselwirkung zwischen Sulfatversorgung und Cadmium-Exposition konnte nicht festgestellt werden (Tabelle 5).

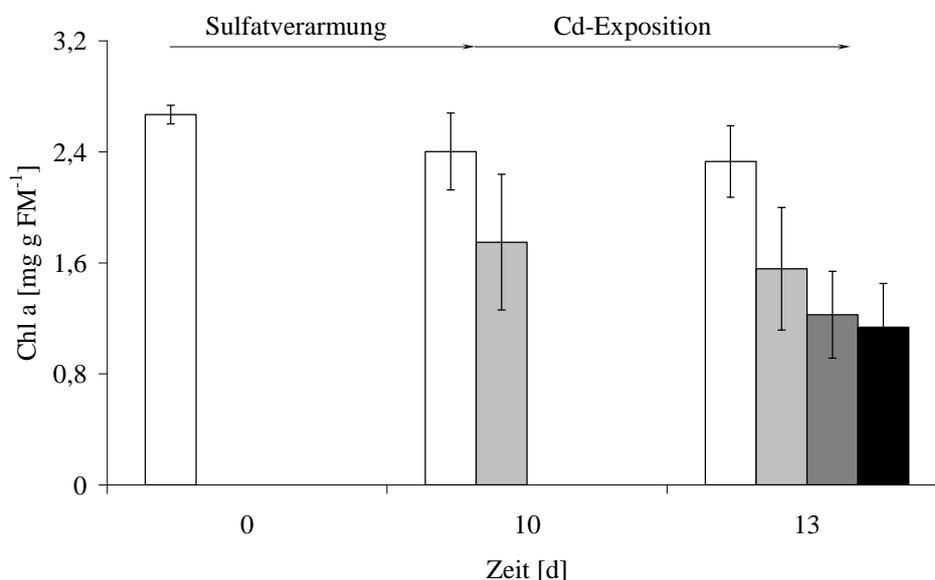


Abb. 41 Chlorophyll-a-Gehalt in *P. patens* nach zehntägiger Sulfatverarmung und anschließender Cd-Exposition (□ = +SO₄²⁻/-Cd, □ = -SO₄²⁻/-Cd, ■ = +SO₄²⁻/+Cd, ■ = -SO₄²⁻/+Cd), n = 4

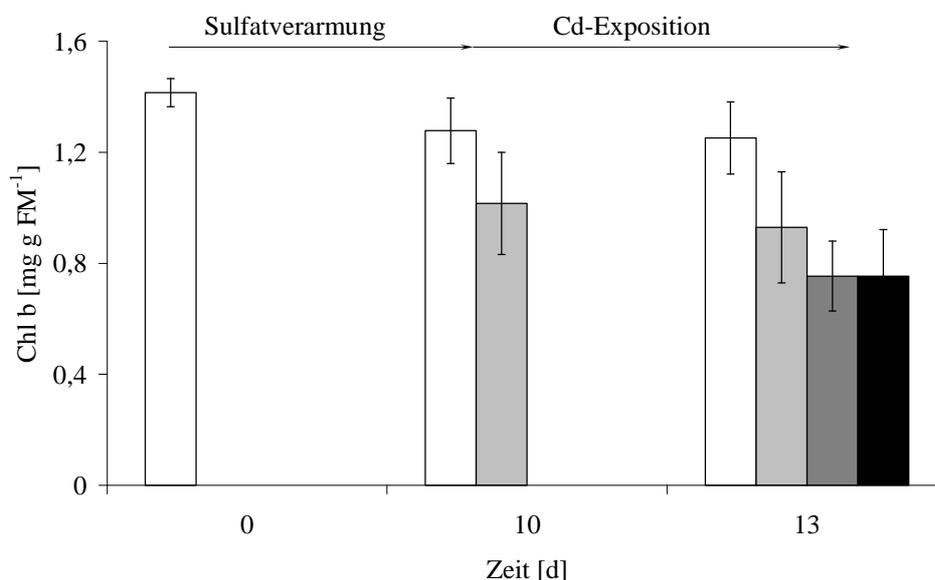


Abb. 42 Chlorophyll-b-Gehalt in *P. patens* nach zehntägiger Sulfatverarmung und anschließender Cd-Exposition (□ = +SO₄²⁻/-Cd, □ = -SO₄²⁻/-Cd, ■ = +SO₄²⁻/+Cd, ■ = -SO₄²⁻/+Cd), n = 4

Auch der Carotinoidgehalt zeigte Veränderungen unter Sulfatmangel und Cadmium-Exposition. Während des zehntägigen Sulfatmangels sank die intrazelluläre Carotinoidekonzentration.

zentration signifikant auf 79 % (Abb. 43). Auch hier wurden die Ergebnisse des Vorexperimentes bestätigt (Kapitel 3.2.1, S. 40). Bei der anschließenden Inkubation mit Cadmium zeigte sich nach drei Tagen nur eine Veränderung bei den Kulturen, denen kein Sulfat im Medium zur Verfügung stand (Abb. 43). Jedoch konnte keine signifikante Wechselwirkung zwischen Sulfatversorgung und Cadmium-Exposition ermittelt werden (Tabelle 5).

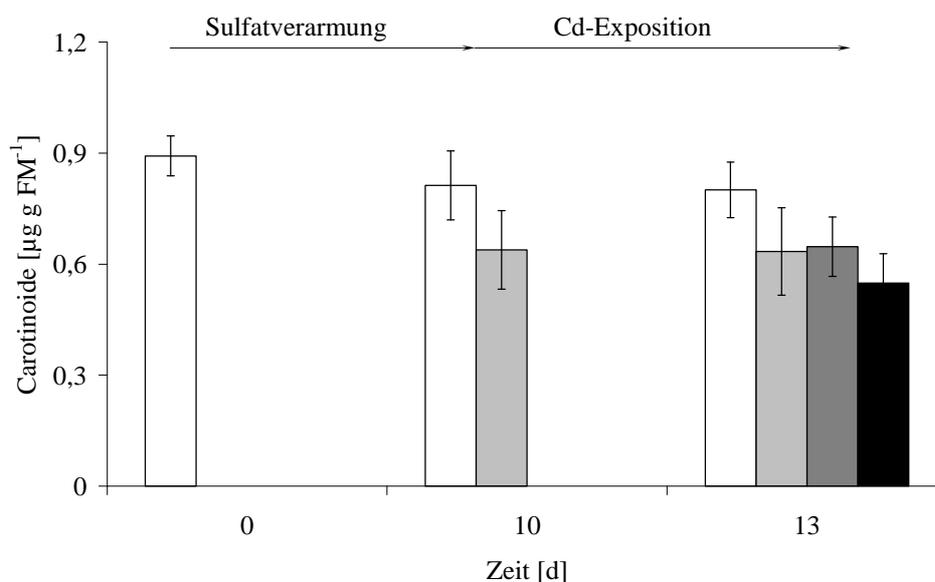


Abb. 43 Carotinoidgehalt in *P. patens* nach zehntägiger Sulfatverarmung und anschließender Cd-Exposition (□ = +SO₄²⁻/-Cd, ◻ = -SO₄²⁻/-Cd, ◼ = +SO₄²⁻/+Cd, ◼ = -SO₄²⁻/+Cd, n = 4)

Tabelle 5 Zusammenfassung der Ergebnisse der zweifaktoriellen univarianten Varianzanalyse (2-way-ANOVA) zum Effekt der Faktoren Sulfatangebot und Cadmium-Exposition auf die Variablen Chlorophyll- und Carotinoidgehalt, gemessen in *P. patens* (df = Freiheitsgrade, F = Prüfgröße, P = Signifikanz)

	df	Varianz	F-Wert	P
Chlorophyll a				
Cadmium	1	2,33	20,26	***
Sulfat	1	0,745	6,48	**
Sulfat×Cadmium	1	0,467	4,06	n.s.
error	12	0,115		
Chlorophyll b				
Cadmium	1	0,45	18	***
Sulfat	1	0,103	4,12	n.s.
Sulfat×Cadmium	1	0,104	4,16	n.s.
error	12	0,025		
Carotinoide				
Cadmium	1	0,0569	7,02	*
Sulfat	1	0,0996	8,64	*
Sulfat×Cadmium	1	0,00569	0,58	n.s.
error	12	0,008099		

3.4.2 Thiolgehalte unter langfristigem Sulfatmangel und Cadmium-Exposition

Wie in vorherigen Experimenten (Kapitel 3.2.2, S. 42) gezeigt, kam es unter zehntägigem Sulfatmangel zu einem starken Absinken der thiolhaltigen Verbindungen Cystein und Glutathion (Abb. 44, Abb. 45). Trotz Sulfatmangel konnte bei anschließender Exposition mit 10 μM Cadmium ein Anstieg der Konzentrationen von Cys und GSH beobachtet werden. Jedoch zeigten Kulturen, die ausreichend mit Sulfat versorgt waren, einen ca. fünffach höheren Anstieg (Abb. 44, Abb. 45).

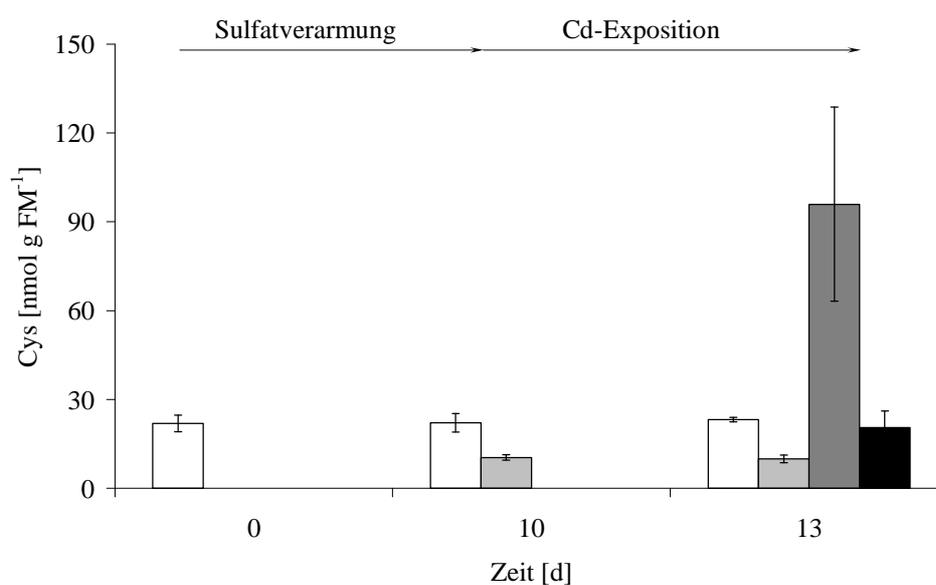


Abb. 44 Cys-Gehalt in *P. patens* nach zehntägiger Sulfatverarmung und anschließender Cd-Exposition (□ = +SO₄²⁻/-Cd, □ = -SO₄²⁻/-Cd, ■ = +SO₄²⁻/+Cd, ■ = -SO₄²⁻/+Cd), n = 4

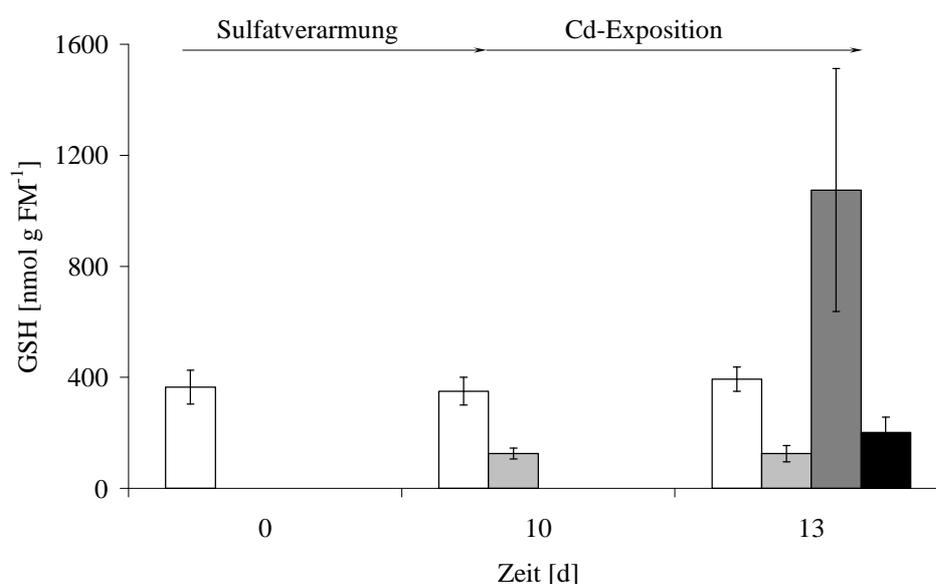


Abb. 45 Gesamtglutathiongehalt in *P. patens* nach zehntägiger Sulfatverarmung und anschließender Cd-Exposition (□ = +SO₄²⁻/-Cd, □ = -SO₄²⁻/-Cd, ■ = +SO₄²⁻/+Cd, ■ = -SO₄²⁻/+Cd), n = 4

Beim Einfluss auf den Thiolgehalt wurde eine signifikante Wechselwirkung zwischen Sulfatversorgung und Cadmium-Exposition festgestellt (Tabelle 6). Bei allen Sulfatmangel-Ansätzen konnte kein γ -EC detektiert werden.

Tabelle 6 Zusammenfassung der Ergebnisse der zweifaktoriellen univariaten Varianzanalyse (2-way-ANOVA) zum Effekt der Faktoren Sulfatangebot und Cadmium-Exposition auf die Variablen Cystein- und Glutathiongehalt, gemessen in *P. patens* (df = Freiheitsgrade, F = Prüfgröße, P = Signifikanz)

	df	Varianz	F	P
Cystein				
Cadmium	1	6930	25,05	***
Sulfat	1	7850	28,36	***
Sulfat×Cadmium	1	3860	13,96	***
error	12	270		
Glutathion				
Cadmium	1	575000	11,73	***
Sulfat	1	1302000	26,57	***
Sulfat×Cadmium	1	365000	0,45	**
error	12	49000		

3.5 *In-situ*-Markierung mit Monochlorobiman

3.5.1 Visualisierung der *in-situ*-Markierung mit Monochlorobiman

Abb. 46 zeigt den Zeitverlauf der *in-situ*-Markierung mit 200 μ M Monochlorobiman (MCB), visualisiert mit Hilfe eines konfokalen *Laserscanning*-Mikroskops. Um zu überprüfen, ob die Zellen während der *in-situ*-Markierung mit MCB noch vital waren, wurden diese mit Propidiumiodid (PI) angefärbt. Vitale Zellen zeigen eine Färbung der Zellwand (Abb. 46), bei toten Zellen hingegen würde der Zellkern angefärbt werden. Die nicht-markierte Kontrolle zeigt nur die PI-gefärbte Zellwand sowie die Autofluoreszenz des Chlorophylls (Abb. 46, A). Die Inkubation mit 200 μ M MCB führte zu einer sofortigen Markierung des Cytosols (Abb. 46, B). Anschließend wurden die fluoreszierenden Glutathion-Biman-Konjugate (GS-B) in die Vakuole transportiert (Abb. 46, C).

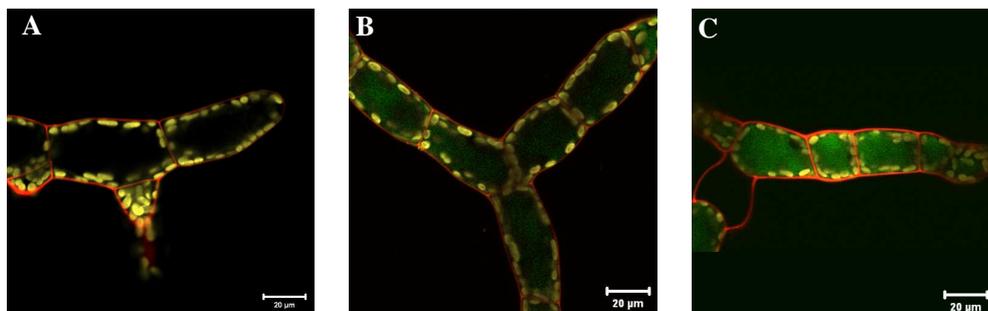


Abb. 46 Visualisierung der Glutathion-Biman-Konjugate mit Hilfe der CLSM. Die Bilder zeigen die Fluoreszenz der GS-B-Konjugate (grün), die PI-gefärbte Zellwand (rot) und die Autofluoreszenz des Chlorophylls (gelb). A) nicht-markierte Kontrolle, B) 30 min C) 180 min Markierung mit 200 μ M MCB

3.5.2 *In-situ*-Markierung von Glutathion in Kontroll- und Cd-exponierten Kulturen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die *in-situ*-Markierung von GSH mit MCB in *P. patens* prinzipiell möglich ist, sollten die Produkte dieser Glutathion-S-Transferase-katalysierten Reaktion quantifiziert werden. Hierzu wurde das Moosmaterial zunächst vier Tage vorkultiviert. Anschließend wurde für drei Tage mit bzw. ohne (als Metall-Kontrolle) 10 μM Cadmium exponiert. Für die *in-situ* Markierung wurden je drei 75-mL-Kolben vereinigt und in 40-mL-Kolben überführt. Je ein 40-mL-Kolben wurde mit 200 μM MCB inkubiert, ein anderer diente als Kontrolle ohne Farbstoff. Zur Bestimmung der intrazellulären Konzentration der Glutathion-Bi-man-Konjugate (GS-B) wurde das mit MCB-markierte Moosmaterial nach Abwaschen des Farbstoffes aufgeschlossen und der Extrakt chromatographisch analysiert. Alle Kulturen wurden zusätzlich nach der Extraktion mit DTT reduziert und mit Monobromobiman (MBB) derivatisiert. Für die farbstofflosen Kontrollkulturen (ohne MCB) konnte somit der intrazelluläre Thiolgehalt und für Kulturen mit MCB der Anteil nicht mit MCB konjugierbarer Thiole bestimmt werden (Seite 19, Abb. 8).

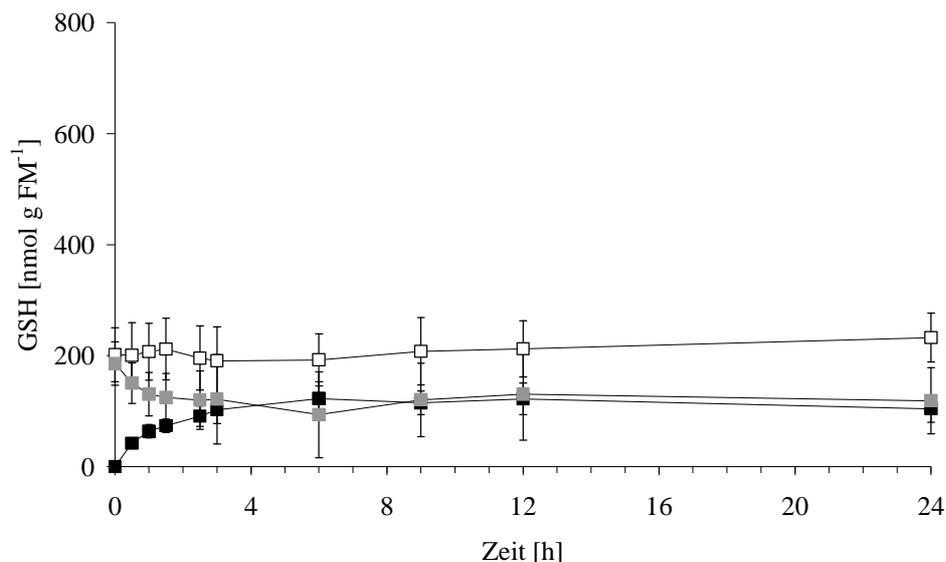


Abb. 47 GSH-Gehalt in Kontroll-Kulturen nach *in-situ*-Markierung mit 200 μM MCB (■) und nach Derivatisierung von Extrakten nicht-markierter Proben mit MBB (□). Zusätzlich wurde mit MCB-markierten Extrakten nach Reduktion mit DTT eine MBB-Derivatisierung durchgeführt, um nicht mit MCB markierte Thiole zu bestimmen (●), $n = 3$

Der Gesamtglutathiongehalt in Kontroll-Kulturen ohne MCB betrug ca. 200 nmol g FM^{-1} (□, Abb. 47). Im Rohextrakt ohne vorherige MCB-Markierung konnten erwartungsgemäß keine GS-B-Konjugate nachgewiesen werden. Innerhalb der ersten drei Stunden nach Zugabe von 200 μM MCB kam es zu einem raschen Anstieg der GS-B-Konzentration. Nach drei Stunden waren ca. 100 $\text{nmol GS-B g FM}^{-1}$ im Rohextrakt detektierbar. In den nächsten drei

Stunden kam es zu einem weiteren leichten Anstieg bis auf ca. 123 nmol GS-B g FM⁻¹. Zum Ende des Experimentes nach 24 Stunden lag der GS-B-Gehalt wieder bei ca. 100 nmol g FM⁻¹ (■, Abb. 47). Dies entsprach ca. der Hälfte des Gesamtglutathiongehaltes der nicht-markierten Kontrolle. Durch die zusätzliche MBB-Derivatisierung des Extraktes MCB-markierter Zellen konnte ein Absinken des mit MBB markierbaren Gesamtglutathions von 186 auf 120 nmol g FM⁻¹ nach 2,5 Stunden gezeigt werden. Danach blieb dieser Wert nahezu unverändert (■, Abb. 47).

Durch 200 µM MCB sind theoretisch 200 µM GSH, also das 20-fache der gemessenen Konzentration, in Kontrollkulturen derivatisierbar. Um dennoch Limitierungen in der Menge des markierbaren Glutathions durch die Farbstoffkonzentration auszuschließen, wurde ein zweites Experiment mit 500 µM MCB durchgeführt. Bei diesem Experiment lag der Gesamtglutathiongehalt der Kontrolle deutlich höher (□, Abb. 48, ca. 440 nmol g FM⁻¹). Hier kam es schon innerhalb der ersten Stunde nach Farbstoffzugabe zu einem starken Anstieg der GS-B-Konzentration bis auf ca. 250 nmol g FM⁻¹. Danach sank die nachgewiesene GS-B-Menge wieder bis auf 150 nmol g FM⁻¹ ab. Auch hier wurde mit der MCB-Markierung nicht der Wert der *in-vitro* bestimmten Gesamtglutathionkonzentration erreicht (■, Abb. 48).

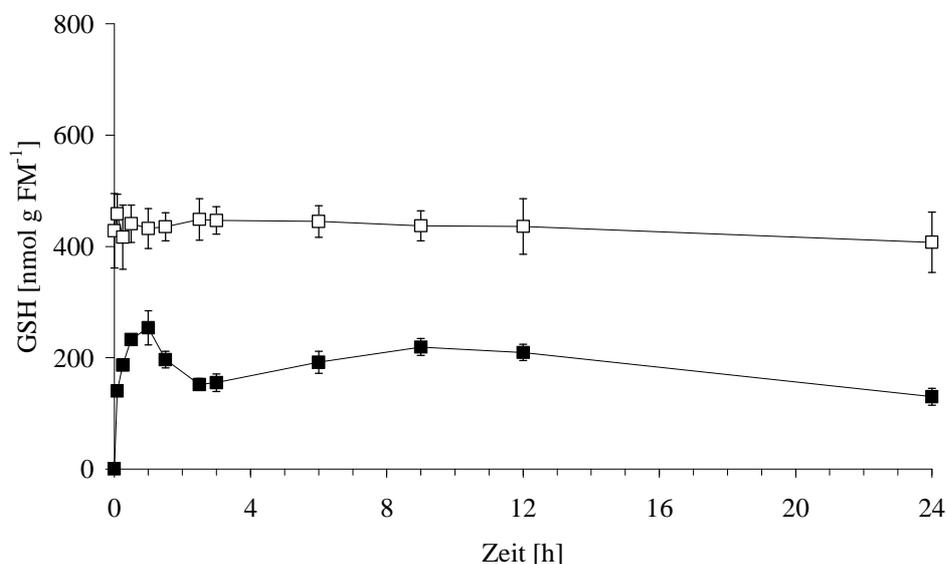


Abb. 48 GSH-Gehalt in Kontroll-Kulturen nach *in-situ*-Markierung mit 500 µM MCB (■) und nach Derivatisierung von Extrakten nicht-markierter Proben mit MBB (□), n = 3

Wie bereits in vorgehenden Experimenten gezeigt, wiesen Cadmium-exponierte Moosproben einen zwei- bis dreifach höheren Gesamtglutathiongehalt als die Kontrollkulturen auf. Zu Beginn des Experimentes lag der GSH-Gehalt Cd-exponierter, aber nicht mit MCB markierter Proben bei ca. 615 nmol g FM⁻¹ und sank innerhalb von 24 Stunden auf ca. 430 nmol g FM⁻¹ (○, Abb. 49). Während der *in-situ*-Markierung mit 200 µM MCB kam es

innerhalb der ersten sechs Stunden zu einem Anstieg des GS-B-Gehaltes bis auf ca. $70 \text{ nmol g FM}^{-1}$. Danach blieb der GS-B-Gehalt nahezu konstant bei $73\text{-}75 \text{ nmol g FM}^{-1}$ (●, Abb. 49). Nach 24 Stunden war der mit MCB markierbare GSH-Gehalt sechsfach niedriger als der im Rohextrakt mit MBB markierbare Gesamt-GSH-Gehalt. Zu jedem Probennahmezeitpunkt war der *in-situ* markierte GSH-Gehalt in Cd-exponierten Protonemazellen von *P. patens* niedriger als in Kontrollkulturen (Abb. 47, Abb. 49). Auch hier wurde eine zusätzliche MBB-Derivatisierung auf die Extrakte der mit MCB markierten Zellen vorgenommen. Der Anteil des nicht mit MCB markierten Glutathions sank von 618 auf $216 \text{ nmol g FM}^{-1}$ (●, Abb. 49). Um den Einfluss von Cd auf die MCB-Markierung statistisch näher zu charakterisieren, wurde zusätzlich eine *two-way*-ANOVA für die MCB-markierten Proben mit den Faktoren Cd und Zeit durchgeführt (Anhang S. 107, Tabelle 7). Es konnte ein signifikant geringerer GSH-Gehalt in Cd-belasteten MCB-markierten Zellen festgestellt werden.

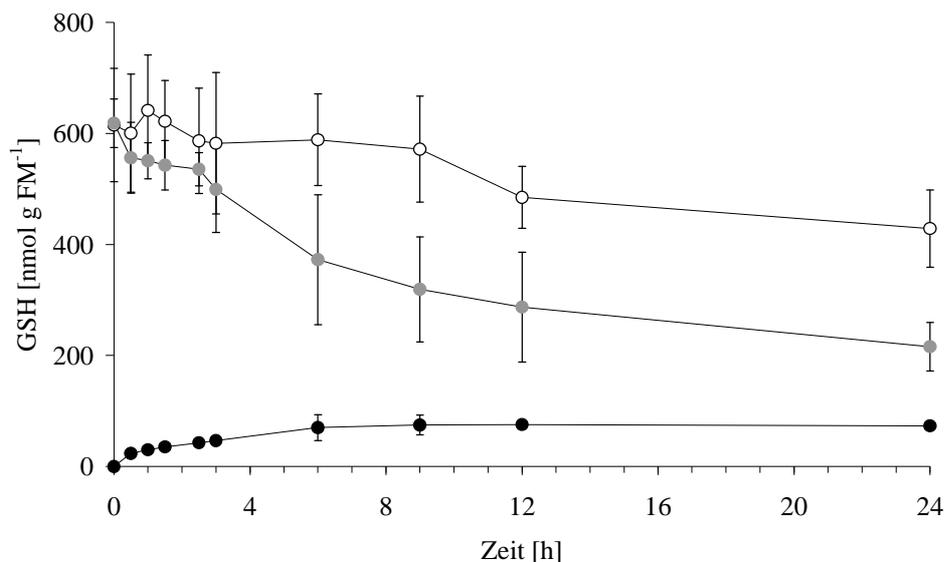


Abb. 49 GSH-Gehalt in Cd-exponierten Kulturen nach *in-situ*-Markierung mit $200 \mu\text{M}$ MCB (●) und nach Derivatisierung von Extrakten nicht-markierter Proben mit MBB (○). Zusätzlich wurde mit MCB-markierten Extrakten nach Reduktion mit DTT eine MBB-Derivatisierung durchgeführt, um nicht mit MCB markierte Thiole zu bestimmen (●), $n = 3$

3.5.3 *In-situ*-Markierung von Cystein und γ -Glutamylcystein

Obwohl Monochlorobiman Substrat für die Glutathion-S-Transferasen im Cytosol ist und somit nur mit GSH konjugiert werden sollte, wurden auch Cys- und γ -EC-Biman-Konjugate (Cys-B, γ -EC-B) gefunden. Der Cys-Gehalt der Kulturen ohne Cadmium lag während der 24-stündigen Versuchsdauer bei ca. $40\text{-}45 \text{ nmol g FM}^{-1}$ (□, Abb. 50, Abb. 51). Bei der Cadmium-belasteten Kultur war der Cys-Gehalt verdreifacht ($136 \text{ nmol g FM}^{-1}$, ○, Abb. 52).

Es konnte bei allen Kulturen ein leichtes Absinken der Cys-Konzentration vom Versuchsbeginn bis zum –ende beobachtet werden. Die *in-situ*-Markierung mit MCB führte sowohl in den Kontroll- als auch in den Cadmium-belasteten Kulturen zu einem kontinuierlichen Anstieg der Cys-Biman-Konjugate. Nach 24 Stunden Exposition mit 200 μM MCB wurde in beiden Kulturen eine Konzentration von ca. 180 nmol Cys-B g FM^{-1} gemessen (■, Abb. 50; ●, Abb. 52). Durch die *two-way*-ANOVA-Analyse der MCB-markierten Kontroll- und Cd-belasteten Kulturen konnte gezeigt werden, dass Cd keinen Einfluss auf die Markierung von Cys hat (Anhang, S. 107, Tabelle 8). Die Zugabe von 500 μM MCB führte zu einer Cys-B-Konzentration von ca. 113 nmol g FM^{-1} nach 24 Stunden (■, Abb. 51). Durch die MBB-Derivatisierung der Extrakte mit 200 μM MCB markierter Kontrollzellen konnten durchschnittlich ca. 52 nmol Cys g FM^{-1} gemessen werden, das nicht mit MCB konjugiert war (■, Abb. 50). Bei Cd-belasteten Kulturen stieg dieser Anteil zunächst von 150 auf 200 nmol Cys g FM^{-1} (2,5 Stunden), sank dann aber wieder bis auf ca. 105 nmol Cys g FM^{-1} (●, Abb. 52).

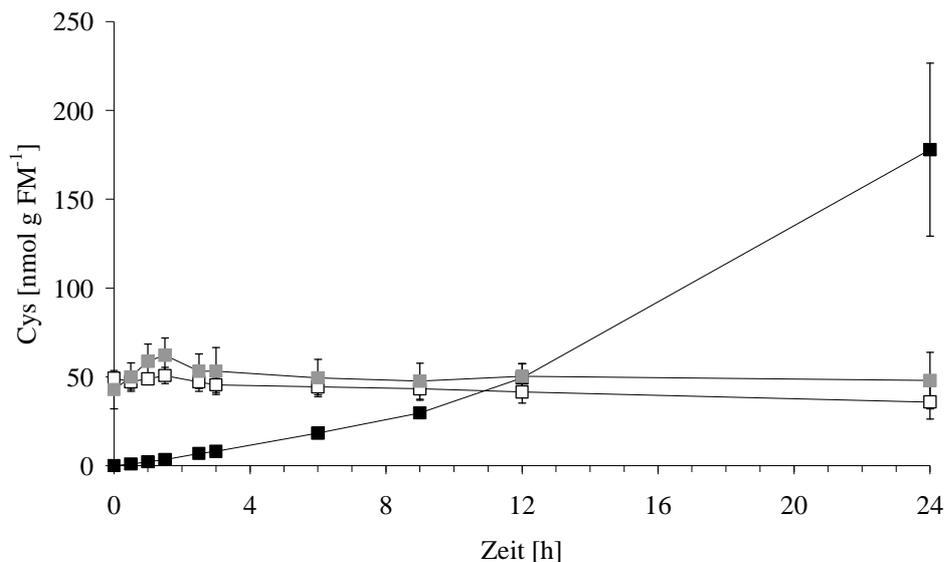


Abb. 50 Cys-Gehalt in Kontroll-Kulturen nach *in-situ*-Markierung mit 200 μM MCB (■) und nach Derivatisierung von Extrakten nicht-markierter Proben mit MBB (□). Zusätzlich wurde mit MCB-markierten Extrakten nach Reduktion mit DTT eine MBB-Derivatisierung durchgeführt, um nicht mit MCB markierte Thiole zu bestimmen (■), n = 3

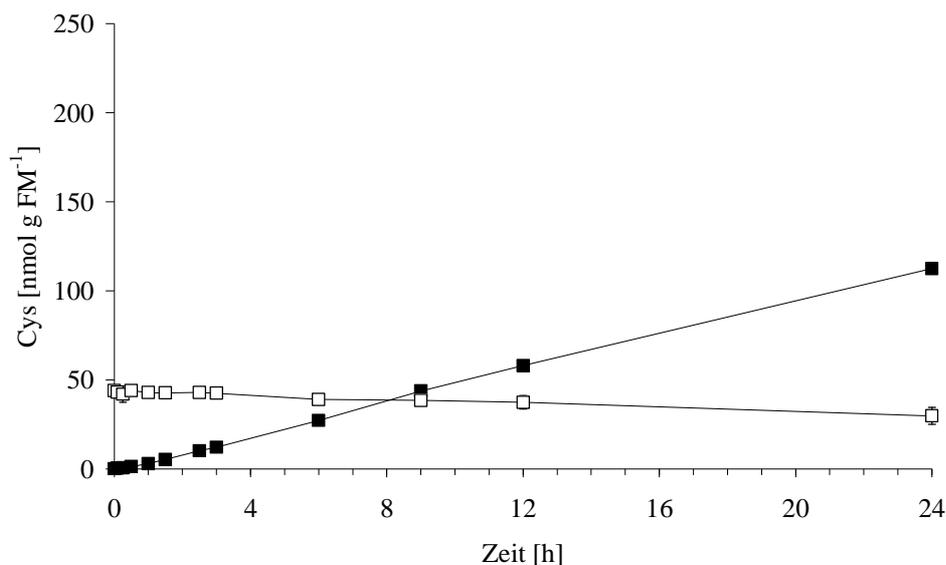


Abb. 51 Cys-Gehalt in Kontroll-Kulturen nach *in-situ*-Markierung mit 500 μM MCB (■) und nach Derivatisierung von Extrakten nicht-markierter Proben mit MBB (□), $n = 3$

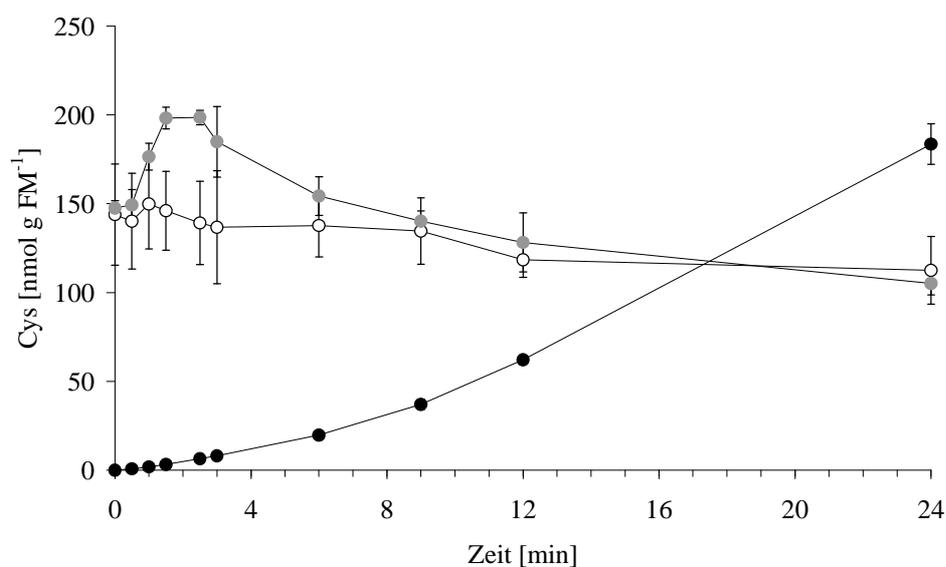


Abb. 52 Cys-Gehalt in Cd-exponierten Kulturen nach *in-situ*-Markierung mit 200 μM MCB (●) und nach Derivatisierung von Extrakten nicht-markierter Proben mit MBB (○). Zusätzlich wurde mit MCB-markierten Extrakten nach Reduktion mit DTT eine MBB-Derivatisierung durchgeführt, um nicht mit MCB markierte Thiole zu bestimmen (●), $n = 3$

Der γ -EC-Gehalt der Kontrollkulturen lag bei ca. 6 nmol g FM⁻¹ (□, Abb. 53, Abb. 54). Exposition mit 10 μM CdCl₂ führte zu einem Anstieg des γ -EC auf ca. 16 nmol g FM⁻¹ (○, Abb. 55). Auch hier führte die *in-situ*-Markierung mit MCB in allen Ansätzen zu einem kontinuierlichen Anstieg der detektierten γ -EC-Konjugate. Unter Kontrollbedingungen stieg die Konzentration der γ -EC-Bimarkkonjugate auf ca. 1900 nmol γ -EC-B g FM⁻¹ (200 μM MCB, ■, Abb. 53) bzw. ca. 3300 nmol γ -EC-B g FM⁻¹ (500 μM MCB, ■, Abb. 54) und unter Cadmium-Exposition auf ca. 1500 nmol g FM⁻¹ (200 μM MCB, ●, Abb. 55). Die statistische

Analyse ergab auch hier, dass Cd keinen Einfluss auf die MCB-Markierung von γ -EC hat (*two-way*-ANOVA, Anhang, S. 108, Tabelle 9).

Aus der zusätzlichen MBB-Derivatisierung resultierte ein Ansteigen des nicht mit MCB konjugierten γ -EC von 5 bis auf 170 nmol g FM⁻¹ (■, Abb. 53) bzw. von 12 auf 274 nmol g FM⁻¹ unter Cd-Belastung (●, Abb. 55).

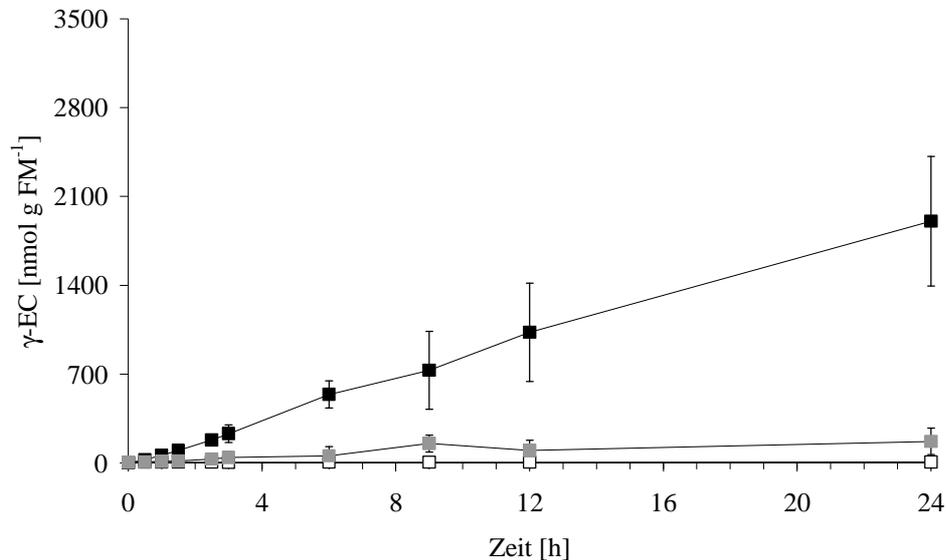


Abb. 53 γ -EC-Gehalt in Kontroll-Kulturen nach *in-situ*-Markierung mit 200 μ M MCB (■) und nach Derivatisierung von Extrakten nicht-markierter Proben mit MBB (□). Zusätzlich wurde mit MCB-markierten Extrakten nach Reduktion mit DTT eine MBB-Derivatisierung durchgeführt, um nicht mit MCB markierte Thiole zu bestimmen (◐), n = 3

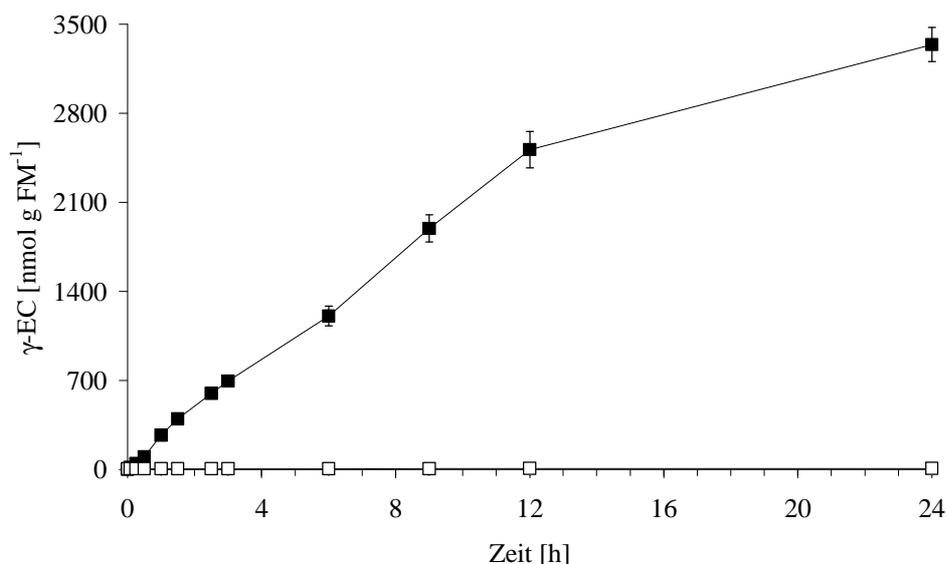


Abb. 54 γ -EC-Gehalt in Kontroll-Kulturen nach *in-situ*-Markierung mit 500 μ M MCB (■) und nach Derivatisierung von Extrakten nicht-markierter Proben mit MBB (□), n = 3

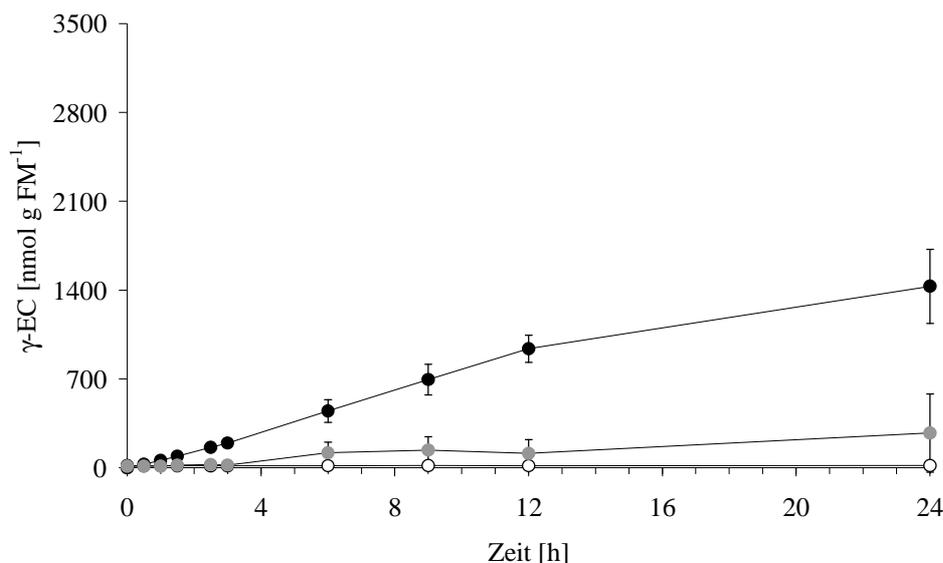


Abb. 55 γ -EC-Gehalt in Cd-exponierten Kulturen nach *in-situ*-Markierung mit 200 μ M MCB (●) und nach Derivatisierung von Extrakten nicht-markierter Proben mit MBB (○). Zusätzlich wurde mit MCB-markierten Extrakten nach Reduktion mit DTT eine MBB-Derivatisierung durchgeführt, um nicht mit MCB markierte Thiole zu bestimmen (●), n = 3

3.5.4 *In-situ*-Markierung unter Sulfatmangel

Die aus den Ergebnissen der vorangegangenen *in-situ*-Markierungsexperimente abgeleitete Hypothese der Neusynthese von Thiolen sollte verifiziert werden. Vorexperimente mit einem häufig verwendeten Inhibitor der Glutathionbiosynthese (Buthioninsulfoximin, BSO) haben gezeigt, dass dieser nur in viel höheren Konzentrationen als in der Literatur beschrieben wirksam ist (Daten nicht gezeigt). Daher sollte die reduktive Sulfatassimilation durch Sulfatmangel inhibiert werden. Die Kulturen wurden zehn Tage in Medium mit nur 0,4 μ M Sulfat vorkultiviert (zu diesem Zeitpunkt lag der intrazelluläre Sulfatgehalt bei ca. 7 % im Vergleich zur sulfatversorgten Kontrolle, vgl. Abb. 33, S. 44) und dann die Markierung über 24 Stunden mit 200 μ M MCB im Dunkeln durchgeführt (●). Es wurden Kontrollen mit Sulfat und MCB (■) bzw. ohne Farbstoff im Medium mitgeführt (□, ○). Nach zehn Tagen Sulfatmangel waren die Konzentrationen von Cys, γ -EC und GSH deutlich niedriger als in den Kontrollkulturen (Abb. 56, Abb. 57, Abb. 58). Während des 24-stündigen Markierungsexperimentes konnte nach sechs Stunden ein Anstieg im Glutathiongehalt der Sulfatmangelkulturen ohne MCB beobachtet werden (Abb. 56, ○). Nach 24 Stunden war die Glutathionkonzentration der sulfatverarmten Kultur genauso hoch wie die der sulfatversorgten Kultur (Abb. 56). Die Cys-Konzentration hingegen sank über den 24-stündigen Versuchszeitraum unter Sulfatversorgung (□), war jedoch stets signifikant höher als unter Sulfatmangel (Abb. 57, ○). Der Verlauf der *in-situ*-Markierung mit MCB war in

beiden Kulturen ähnlich. Jedoch lagen die Absolutwerte der GS-B-Konjugate der Sulfatmangelkultur (●) zu jedem Probenentnahmezeitpunkt unter dem der Kontrollkultur (Abb. 56, ■). Nach 24 Stunden wurde unter Sulfatmangelbedingungen eine GS-B-Konzentration von $113 \text{ nmol g FM}^{-1}$, in der sulfatversorgten Kontrollkultur von $154 \text{ nmol g FM}^{-1}$ gemessen (Abb. 56). Die *two-way*-ANOVA-Analyse der MCB-markierten Kulturen ergab einen signifikanten Effekt der Sulfatversorgung auf die GS-B-Konzentration (Anhang, S. 108, Tabelle 10).

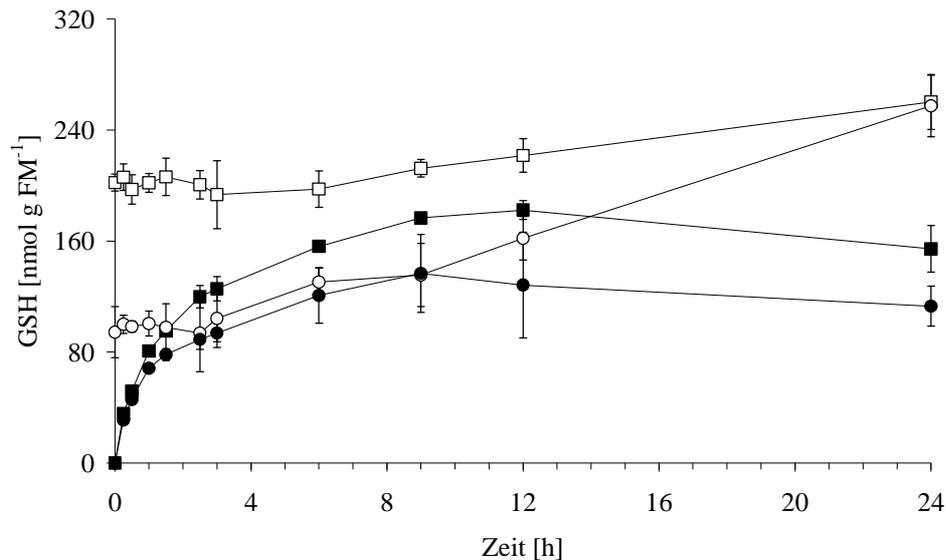


Abb. 56 GSH-Gehalt in Kontroll- und Sulfatmangel-Kulturen nach *in-situ*-Markierung mit $200 \mu\text{M}$ MCB (■ = $+\text{SO}_4^{2-}$, ● = $0,4 \mu\text{M SO}_4^{2-}$) und nach Derivatisierung von Extrakten nicht-markierter Proben mit MBB (□ = $+\text{SO}_4^{2-}$, ○ = $0,4 \mu\text{M SO}_4^{2-}$), $n = 3$

Die Konzentration der Cys-B-Konjugate stieg innerhalb der ersten neun Stunden MCB-Markierung in beiden Kulturen auf ca. $60 \text{ nmol g FM}^{-1}$ an. Nach 24 Stunden war die Cys-B-Konzentration in Sulfatmangelkulturen (●) mit $320 \text{ nmol g FM}^{-1}$ nicht signifikant höher als bei ausreichender Sulfatversorgung ($253 \text{ nmol g FM}^{-1}$, Abb. 57, ■).

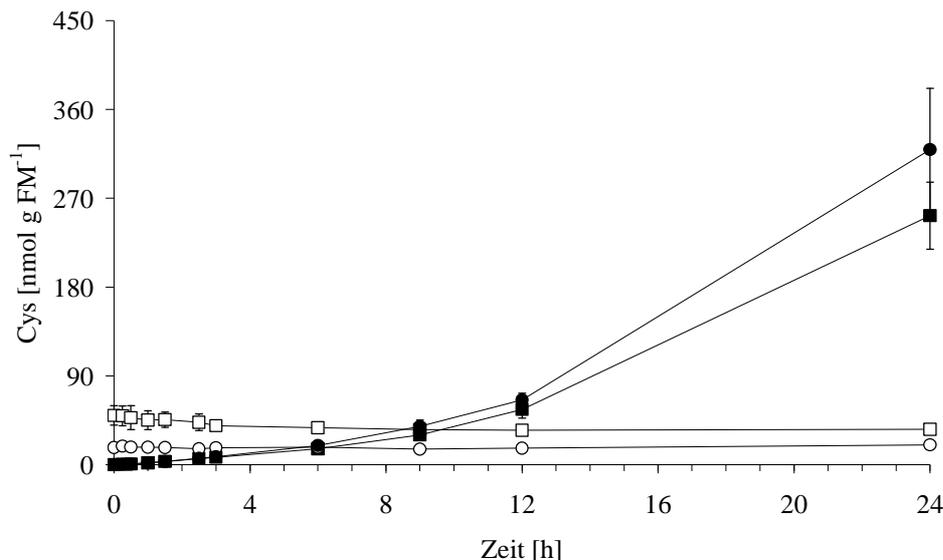


Abb. 57 Cys-Gehalt in Kontroll- und Sulfatmangel-Kulturen nach *in-situ*-Markierung mit 200 μM MCB (■ = $+\text{SO}_4^{2-}$, ● = $0,4 \mu\text{M SO}_4^{2-}$) und nach Derivatisierung von Extrakten nicht-markierter Proben mit MBB (□ = $+\text{SO}_4^{2-}$, ○ = $0,4 \mu\text{M SO}_4^{2-}$), $n = 3$

Bei der Bildung der γ -EC-B-Konjugate wurde ein nahezu linearer Anstieg beobachtet (Abb. 58). Nach 24 Stunden wurde hier eine signifikant höhere Endkonzentration mit 1655 $\text{nmol } \gamma\text{-EC-B g FM}^{-1}$ unter ausreichender Sulfatversorgung (■) als unter Sulfatmangel (998 $\text{nmol } \gamma\text{-EC-B g FM}^{-1}$, Abb. 58, ●) erreicht.

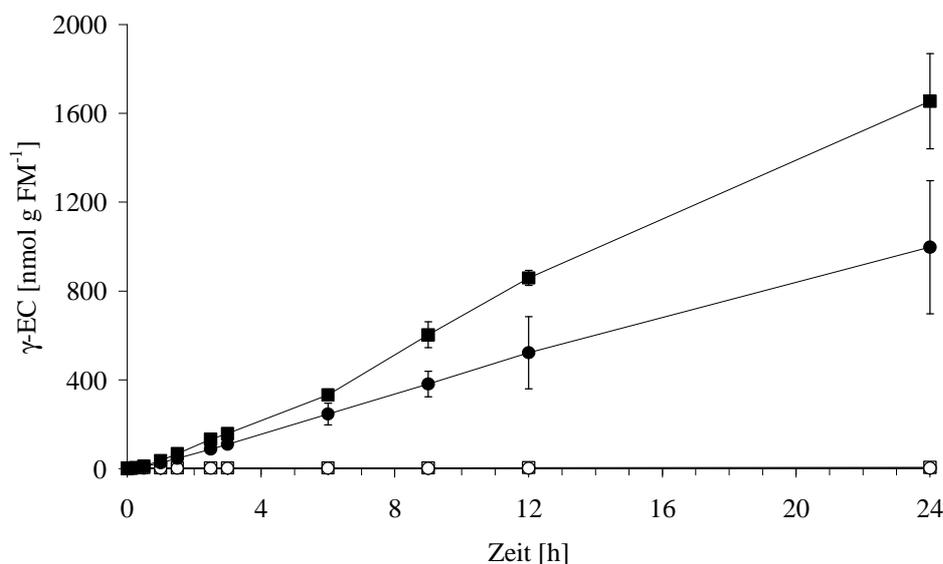


Abb. 58 γ -EC-Gehalt in Kontroll- und Sulfatmangel-Kulturen nach *in-situ*-Markierung mit 200 μM MCB (■ = $+\text{SO}_4^{2-}$, ● = $0,4 \mu\text{M SO}_4^{2-}$) und nach Derivatisierung von Extrakten nicht-markierter Proben mit MBB (□ = $+\text{SO}_4^{2-}$, ○ = $0,4 \mu\text{M SO}_4^{2-}$), $n = 3$

Sowohl für γ -EC als auch Cys wurden ebenfalls *two-way*-ANOVA-Analysen durchgeführt. Die Sulfatversorgung hatte nur auf die γ -EC-B-, nicht jedoch auf die Cys-B-Konzentration MCB-markierter Zellen einen signifikanten Einfluss (Anhang, S. 108, Tabelle 11, Tabelle 12).

3.5.5 Enzymaktivität der Glutathion-S-Transferasen während *in-situ*-Markierung

Der *in-situ*-Markierung von Glutathion im Cytoplasma mit Monochlorobiman liegt eine GST-katalysierte Reaktion zugrunde. Daher wurde die Gesamtzymaktivität der GST in *P. patens* näher untersucht. Eine drei Tage alte Kontrollkultur wurde mit 200 μ M MCB inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten die GST-Aktivität bestimmt. Die GST-Aktivität nicht mit MCB markierter Zellen lag über den gesamten Versuchszeitraum zwischen 0,03 und 0,4 U mg Protein⁻¹ (Abb. 59). Die Inkubation mit MCB führte zu einem Anstieg der GST-Aktivität. Die Änderungen wurden jedoch erst nach sechs Stunden MCB-Exposition signifikant. Bis zum Versuchsende erhöhte sich die GST-Aktivität kontinuierlich bis auf das 5,5-fache gegenüber der Kontrolle (Abb. 59).

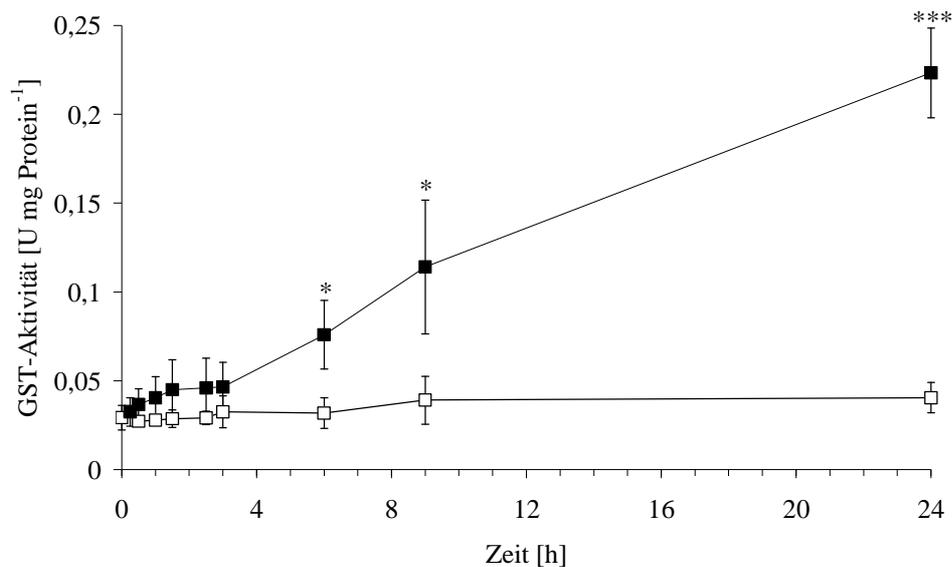


Abb. 59 Enzymaktivität der GST in *P. patens* während der Inkubation mit 200 μ M MCB (■) im Vergleich zur Kontrolle ohne MCB (□), n = 3

3.5.6 Abbau des Glutathion-Biman-Konjugats

Zur Überprüfung, ob die gebildeten Cys-B- und γ -EC-B-Konjugate aus einem Abbau der GS-B-Konjugate stammen, wurden Protonema-Kulturen von *P. patens* zunächst für 2,5 Stunden mit 200 μ M MCB inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt war ein Großteil des markierbaren Glutathions mit MCB konjugiert und es hatten sich nur geringe Mengen an Cys-B und γ -EC-B

gebildet. Zum Zeitpunkt des Entfernens des MCB aus dem Medium wurden intrazellulär 85 nmol GS-B g FM⁻¹, 6 nmol Cys-B g FM⁻¹ und 169 nmol γ -EC-B g FM⁻¹ detektiert (Abb. 60). Die weitere Kultivierung ohne MCB führte zu einem sofortigen Absinken der GS-B-Konzentration. Nach 24 Stunden konnte kaum noch GS-B nachgewiesen werden. Zeitgleich mit der Abnahme der GS-B-Konzentration stieg die Menge des Cys-B kontinuierlich weiter an. Nach 24 Stunden wurden 47 nmol Cys-B g FM⁻¹ gemessen. Anders verhielt es sich beim γ -EC-B. Hier stieg die Konzentration innerhalb der ersten drei Stunden nach Entfernung des MCB weiter bis auf 248 nmol g FM⁻¹. Danach schwankte die γ -EC-B-Konzentration zunächst um diesen Wert und sank nach zwölf Stunden dann leicht bis auf ca. 210 nmol g FM⁻¹ ab (Abb. 60).

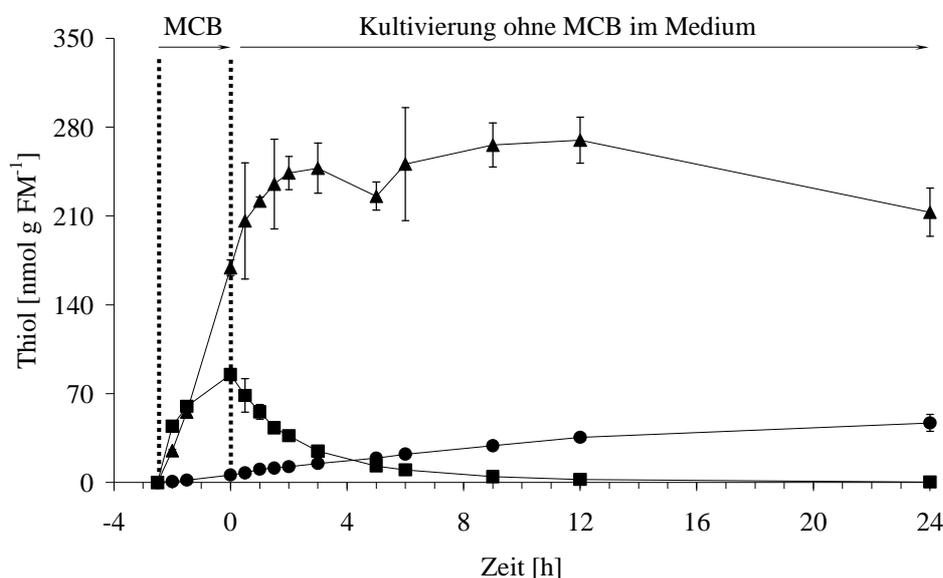


Abb. 60 Konzentrationen der Thiol-Biotin-Konjugate in *P. patens* nach Markierung mit 200 μ M MCB für 2,5 Stunden und anschließender Entfernung des Farbstoffes aus dem Medium (● = Cys-B, ▲ = γ -EC-B, ■ = GS-B), n = 3

4. Diskussion

4.1 Auswirkungen von Cadmium-Exposition in *P. patens*

Hinsichtlich der Cadmium-Entgiftung in *P. patens* wurden in der Arbeitsgruppe Krauß bereits erste Untersuchungen durchgeführt (Wesenberg *et al.*, 2005; Rother *et al.*, 2006; Rother, 2007). Da in der vorliegenden Arbeit eine Kultur anderer Herkunft (greenovation, Freiburg) verwendet wurde, wurden zunächst zum Vergleich mit der von Rother verwendeten Kultur Analysen zur Vitalität, dem Thiol- und Sulfatgehalt unter 10 μM Cd durchgeführt. Die Cd-Konzentration von 10 μM wurde auf Grundlage der Ergebnisse von Rother *et al.* (2006) verwendet. Die Autoren schätzten 5 μM Cd als tolerierbaren Stress und 10 μM Cd als Stress mit Vitalitätsverlust ein.

Zunächst wurde die **Vitalität** von *P. patens* unter Cd-Exposition näher charakterisiert. Als Vitalitätsparameter wurde der Gehalt an photosynthetischen Pigmenten gewählt. Innerhalb der ersten sechs Stunden Cd-Exposition waren keine Änderungen im Chlorophyll-a- und -b- sowie im Carotinoidgehalt messbar (S. 31-33, Abb. 11, Abb. 13, Abb. 15). Nach 24 Stunden kam es dann bis zum fünften Tag zu einer kontinuierlichen Abnahme des Chlorophyllgehaltes (S. 31-32, Abb. 10 - Abb. 13). Der Carotinoidgehalt reagierte verzögert und sank erst nach drei Tagen (S. 33, Abb. 14, Abb. 15).

Rother (2007) untersuchte als Vitalitätsparameter unter Cd-Stress zunächst den Chlorophyllgehalt. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit traten Änderungen im Chlorophyllgehalt unter 10 μM Cd erst nach zwei Tagen Exposition auf, unter 5 μM nach drei Tagen. Somit wurden die Ergebnisse von Rother (2007) bestätigt, geringe Differenzen sind vermutlich in der unterschiedlichen Herkunft der verwendeten *P.-patens*-Kulturen begründet. Zusätzlich analysierte Rother (2007) die PS-II-Effizienz. Während 5 μM Cd keinen Einfluss auf die PS-II-Effizienz hatte, sank diese jedoch unter 10 μM auf ca. 80 % nach fünf Tagen (Rother, 2007). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Chlorophyllgehalt ein geeigneter Parameter für die Vitalität in *P. patens* ist und wurde daher für alle Untersuchungen herangezogen. Für das aquatische Moos *Fontinalis antipyretica* konnte gezeigt werden, dass unter 100 μM Cd keine Änderungen im Chlorophyllgehalt auftreten (Bruns, 1998). Da jedoch die PS-II-Effizienz beeinflusst ist, wurde diese in späteren Untersuchungen stets als Vitalitätsparameter genutzt (Sutter, 2000; Rau *et al.*, 2007). Die PS-II-Effizienz in *F. antipyretica* wurde nicht nur unter Cd, sondern auch unter Cu (Rau *et al.*, 2007), Zn und Pb (Sutter, 2000; Rau *et al.*, 2007) gemessen. Zn und Pb haben erst in sehr hohen Konzentrationen (ab 500 μM) Auswirkungen auf die PS-II-Effizienz (Sutter, 2000). Im

Torfmoos *Sphagnum squarrosum* verursachten Bleikonzentrationen zwischen 0,1 und 100 mM eine Abnahme im Chlorophyllgehalt (Saxena *et al.*, 2003). In einer kürzlich erschienenen Arbeit konnte für zwei Laubmoose und ein Lebermoos ebenfalls unter Blei, aber auch unter Zn und Cu die Abnahme des Chlorophyllgehaltes gezeigt werden (Shakya *et al.*, 2008). Es wurden Konzentrationen im Bereich von 0,1 nM bis 10 mM eingesetzt. Die Abnahme unter Blei und Zink war aber nur für das Lebermoos signifikant. Die Autoren vermuteten als Ursache eine schnellere Zerstörung der Zellmembran des Lebermooses (Shakya *et al.*, 2008).

Die Auswirkung von Schwermetallstress auf die Vitalität höherer Pflanzen wird ebenfalls meistens über den Chlorophyllgehalt oder die PS-II-Effizienz bestimmt. In *Cucumis sativus* haben Cd, Cu (20–50 μ M) und Pb (1000 μ M) einen größeren Einfluss auf den Chlorophyllgehalt als auf die PS-II-Effizienz (Burzynski & Klobus, 2004). Auch für *Avicenna marina* (Cu, Zn, MacFarlane & Burchett, 2001) und *Brassica oleracea* (500 μ M Co, Ni, Cd, Pandey & Sharma, 2002) wird die Abnahme des Chlorophyllgehaltes als Folge der Schwermetalexposition beschrieben. Die unterschiedlichen Auswirkungen von Schwermetallstress auf den Chlorophyllgehalt und die PS-II-Effizienz ist somit abhängig von der Art des Schwermetalls, dessen Konzentration sowie dem Organismus. Vorzugsweise sollten Chlorophyllgehalt und Photosystem-II-Effizienz immer im Zusammenhang betrachtet werden. Häufig geht, wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt, die Abnahme des Chlorophyllgehaltes mit einer Abnahme des Carotinoidgehaltes einher (MacFarlane & Burchett, 2001; Djebali *et al.*, 2005).

In der Literatur werden vielfältige Mechanismen des Einflusses von Schwermetallen auf die Photosynthese diskutiert. Zunächst stellt schon die Chlorophyllbiosynthese einen Angriffspunkt für Schwermetalle dar. Padmaja *et al.* (1990) stellten fest, dass die δ -Aminolävulinat-Dehydratase durch Cd gehemmt wird. Ein weiterer Mechanismus ist der Austausch des zentralen Magnesiumions im Porphyrinring des Chlorophylls. Dies wurde von Küpper *et al.* (1998) durch nicht-invasive spektroskopische, fluorometrische und fluoreszenzmikroskopische Methoden an vier Wasserpflanzen unter Cu-, Cd- und Zn-Exposition bestätigt. Des Weiteren beeinflusst z. B. Cadmium die Regulation der Spaltöffnungen, wie an *Phaseolus vulgaris* (Poschenrieder *et al.*, 1989) und *Arabidopsis thaliana* (Perfus-Barbeoch *et al.*, 2002) gezeigt wurde, sowie die Photoaktivierung des Photosystems II in *Chlamydomonas reinhardtii* (Faller *et al.*, 2005). Cadmium-Exposition führt zu einer verringerten Eisenaufnahme und somit zu einer Beeinträchtigung des Elektronenflusses vom Photosystem I auf Ferredoxin (Siedlecka & Baszynski, 1993). Szalontai *et al.* (1999) klassifizierten

toxische Schwermetalle nach Fourier-Transform-Infrarot- und Elektronenspinresonanz-Spektroskopie-Untersuchungen in zwei Gruppen: Cd und Ni ändern die Lipid- und Proteinzusammensetzung der Thylakoidmembranen nicht, während Pb, Cu und Zn auf diese einen erheblichen Einfluss haben und somit den Elektronentransport inhibieren. Für *Lycopersicon esculentum* konnte jedoch gezeigt werden, dass Cd die Lipidzusammensetzung der Chloroplastenmembran verändert (Djebali *et al.*, 2005). Letztendlich ist der Vitalitätsverlust nach Schwermetallexposition durch die Summe der genannten Faktoren zu erklären. Je nach Schwermetall und dessen Konzentration sind die Auswirkungen unterschiedlich stark ausgeprägt.

Da die Vitalität von *P. patens* unter 10 μM Cd bis auf maximal 50 % (gemessen am Chl-a-Gehalt) nach fünf Tagen sank, wurde diese Konzentration auch für weiterführende Experimente im Zeitfenster von bis zu fünf Tagen eingesetzt.

Zur Untersuchung der intrazellulären Stoffwechsellistung von *P. patens* unter Cd-Exposition wurde der **Thiolgehalt** (Cystein, γ -Glutamylcystein, Glutathion) näher untersucht. Nach dem von Pearson (1963) aufgestellten HSAB-Prinzip sind Cadmiumionen weiche Lewis-Säuren und sollten demzufolge stabile Verbindungen mit weichen Lewis-Basen, wie Thiolgruppen, eingehen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass *P. patens* mit einer gesteigerten Synthese von Cystein (Cys), γ -Glutamylcystein (γ -EC) und Glutathion (GSH) unter 10 μM Cd reagiert (S. 34-36, Abb. 16 - Abb. 21). Die Konzentration an Cystein, dem Endprodukt der reduktiven Sulfatassimilation und Ausgangsverbindung für die Glutathionbiosynthese, war schon nach zwei-stündiger Cadmium-Exposition leicht erhöht. Glutathion selbst zeigte ebenfalls sehr schnell eine Erhöhung. Nur beim Intermediat der Glutathionbiosynthese, γ -EC, konnte erst nach einem bzw. drei Tagen Cadmium-Exposition eine Erhöhung nachgewiesen werden. Grund hierfür könnte die schnelle Umsetzung des Intermediates zum GSH sein, die eine Beobachtung des Pools in Form von Momentaufnahmen unmöglich macht. Die vorliegenden Ergebnisse stehen im guten Einklang mit den von Rother (2006; 2007) gewonnenen Daten. Auch er konnte zeigen, dass der Cysteingehalt sehr früh ansteigt. Jedoch konnte bei seinen Untersuchungen eine signifikante Erhöhung des GSH-Gehaltes erst nach drei Tagen bzw. des γ -EC-Gehaltes nach fünf Tagen ermittelt werden. Dies ist vermutlich auch wieder auf die unterschiedliche Herkunft der beiden untersuchten *P.-patens*-Wildtyp-Stämme zurückzuführen. Im Gegensatz zu Rother (2007) wurde in der vorliegenden Arbeit zu jedem Proben-

entnahmezeitpunkt ein ganzer Kolben geerntet, um keinen Einfluss auf das Verhältnis Biomassezuwachs und Cadmium-Aufnahme zu nehmen.

Die Erhöhung des intrazellulären Glutathiongehaltes unter Schwermetallstress ist ein bekanntes Phänomen in Moosen (Bruns *et al.*, 2001). Am besten untersucht ist dies für das Wassermoos *F. antipyretica* unter Cd-Stress (Bruns, 1998; Sutter, 2000; Bruns *et al.*, 2001; Bleuel, 2004; Bleuel *et al.*, 2005). Im Vergleich zu *P. patens* toleriert dieses Moos Cd in weitaus höheren Konzentrationen. Experimente mit 100 μM Cd zeigten eine rasche Biosorption der Schwermetallionen an die Zellwand (4-6 $\mu\text{mol g FM}^{-1}$) und von dort aus einen kontinuierlichen Einstrom in die Zellen bis ca. 5 $\mu\text{mol g FM}^{-1}$ nach zehn Tagen (Bleuel *et al.*, 2005). *P. patens* hingegen toleriert Cd nur bis zu einer Konzentration von 10 μM und zeigt dabei eine äußerst geringe Biosorption an die Zellwand (im nmol-Bereich), aber eine rasche intrazelluläre Akkumulation bis zu 1,5 $\mu\text{mol g FM}^{-1}$ (Rother *et al.*, 2006; Rother, 2007).

Für *P. patens*, *F. antipyretica* und weitere Moose (insgesamt 17 Laubmoose und 2 Lebermoose) konnte auch gezeigt werden, dass sie auf Cd nur mit einer Erhöhung des GSH-Pools reagieren, aber keine Phytochelatine (PC) bilden (Bruns *et al.*, 2001). Eine Ausnahme bilden das Brunnenlebermoos *Marchantia polymorpha* sowie einige Vertreter der *Jungermaniidae*. Diese zur Abteilung der Marchantiophyta gehörenden Moose synthetisieren wie höhere Pflanzen Phytochelatine als Schwermetallstressantwort (unveröffentlichte Daten, AG Krauß). Carginale *et al.* (2004) vermuteten im Lebermoos *Lunularia cruciata* nach Gel-permeationschromatographie-Untersuchungen ebenfalls eine Phytochelatinsynthese unter Cadmium-Exposition, legten aber keine Ergebnisse zur Identifizierung vor. Meist erfolgt die PC-Identifizierung durch den Ellman-Nachweis (Ellman, 1959; Grill *et al.*, 1991), jedoch haben Coumarine unter basischen pH-Bedingungen, wie sie für diese Methode notwendig sind, vergleichbare UV/VIS-Absorptionseigenschaften (Berlich *et al.*, 2002). Daher sind „positive“ Ergebnisse mit Ellmans Reagenz nicht eindeutig. Ein massenspektroskopischer Nachweis ist stets dringend zu fordern.

Des Weiteren zeigen die bisherigen Untersuchungen an *M. polymorpha*, dass auch die Extraktionsmethode einen großen Einfluss auf die PC-Analyse hat. So wurden unter klassischen basischen Extraktionsbedingungen keine PC in *M. polymorpha* gefunden (Bruns *et al.*, 2001), jedoch unter sauren Bedingungen PC 2-5 sowie einige Isoformen detektiert (Möller, 2007). Gekeler *et al.* (1989) fanden zwar unter basischen Extraktionsbedingungen PC in *M. polymorpha*, aber es wurde kein massenspektroskopischer Nachweis geführt. In

P. patens konnten sowohl unter sauren als auch basischen Extraktionsbedingungen keine PC detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

In höheren Pflanzen erfolgt die Entgiftung von Cadmium vorrangig über die Bildung von Phytochelatinen (u. a. Grill *et al.*, 1985; Keltjens & van Beusichem, 1998a; Keltjens & van Beusichem, 1998b; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005; Semane *et al.*, 2007; Mendoza-Cozatl *et al.*, 2008) aus Glutathionmolekülen. Es handelt sich hierbei um eine Transpeptidase-Reaktion (PC-Synthase) unter Abspaltung von Glycin. Für die Aktivierung dieses Enzyms sind Schwermetallglutathionkomplexe (z. B. Cd[GS]₂) von Bedeutung (Vatamaniuk *et al.*, 2000; Oven *et al.*, 2002). Häufig wird mit der Synthese von PC eine Abnahme des GSH-Gehaltes beobachtet (Noctor & Foyer, 1998; Sarry *et al.*, 2006; Semane *et al.*, 2007). Es gibt aber auch Studien, bei denen ein Anstieg der GSH-Konzentration trotz PC-Synthese zu verzeichnen war (Maier *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2005). Erst kürzlich konnte in *Brassica napus* gezeigt werden, dass PC und GSH nicht nur eine Rolle bei der Komplexierung von Cd spielen, sondern auch am Phloem-Transport von Cd beteiligt sind (Mendoza-Cozatl *et al.*, 2008). In Pilzen, wie z. B. dem aquatischen Hyphomyceten *Heliscus lugdunensis*, kommt es ebenfalls zur Induktion der GSH- und PC-Biosynthese (Jaeckel *et al.*, 2005).

Der Anstieg des Glutathiongehaltes als Reaktion auf Cd-Stress dient in Moosen möglicherweise der Entgiftung durch Bildung eines Cadmiumbisglutathionatkomplexes (Cd[GS]₂) im Cytoplasma, der dann in die Vakuole transportiert wird. Hinweise darauf gaben energiedispersive Röntgenanalysen (EDX) sowie Elektronen-Energy-Loss-Spektroskopie (EELS)-Untersuchungen an *F. antipyretica*. Es wurde gezeigt, dass Cadmium im Cytoplasma durch Thiolgruppen chelatiert und in der Vakuole als Phosphat präzipitiert wird (Sutter, 2000; Bruns *et al.*, 2001). Elektronenmikroskopische Untersuchungen von *P. patens* unter Cadmium-Exposition waren bisher noch nicht möglich. Obwohl *P. patens* Cd rasch intrazellulär akkumuliert, war die Konzentration zu gering für diese Analysen (Rother, 2007). Weitere Studien zu Cd[GS]₂-Komplexen in Moosen und anderen Organismen werden im Kapitel 4.4 ab Seite 88 ausführlicher diskutiert.

Da die Thiolpeptidbiosynthese in Pflanzen die reduktive Assimilation von **Sulfat** voraussetzt, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die erhöhte Thiolbiosynthese mit einer Veränderung des extrazellulären Sulfatgehaltes im Medium und des intrazellulären Sulfatgehaltes in *P. patens* einhergeht. Signifikante Änderungen in der Sulfatkonzentration des Mediums waren nur am ersten Tag unter Cadmium-Exposition feststellbar, intrazelluläre Unterschiede am dritten Tag (S. 37, Abb. 22, Abb. 23). Der geringere Sulfatgehalt im

Medium nach einem Tag Cadmium-Exposition im Vergleich zur Kontrolle deutet auf eine gesteigerte Aufnahme des Sulfates in die Zelle hin. Aber auch unter Kontrollbedingungen ohne Cadmium im Medium wird Sulfat von *P. patens* aufgenommen. Dies wird ersichtlich aus der signifikanten Abnahme des extrazellulären Sulfates im Medium vom ersten bis zum dritten Tag (S. 37, Abb. 22). Bedingt durch die Aufnahme des Sulfates in die Zelle unter Cd-Stress wurde am dritten Tag im Vergleich zur Kontrolle eine höhere intrazelluläre Sulfatkonzentration gemessen (S. 37, Abb. 23). Die Beurteilung des Sulfatbedarfs aufgrund der gesteigerten Thiolbiosynthese sollte im vorliegenden Fall jedoch kritisch betrachtet werden. Durch Messung des Ist-Zustandes kann keine genaue Aussage über das Sulfataufnahme-Verhalten von *P. patens* unter Cd-Stress getroffen werden. Vor allem kleinste Änderungen sind mit der verwendeten kapillarelektrophoretischen Methode nicht genau detektierbar, da sowohl das Medium als auch die Extrakte sehr stark verdünnt werden mussten. Analysen mit ³⁵S-markierten Sulfatsalzen im Medium wären hier von Vorteil.

In *P. patens* sind sieben Gene bekannt, die für Sulfattransporter (ST) kodieren (Kopriva *et al.*, 2007b), jedoch ist bisher nichts zu einer möglichen differenziellen Regulation unter Cadmium-Exposition beschrieben. Es konnte aber eine Induktion aller anderen Gene (außer APS-Kinase), die an der reduktiven Sulfatassimilation beteiligt sind, unter Cd-Exposition gezeigt werden (Rother *et al.*, 2006; Rother, 2007). Am stärksten wurde die SiR induziert. Im Gegensatz zu höheren Pflanzen erfolgt die Kontrolle der reduktiven Sulfatassimilation in *P. patens* somit nicht hauptsächlich über die APR, sondern vermutlich über die SiR (Kopriva *et al.*, 2007b).

Auch mit dem aquatischen Moos *F. antipyretica* wurden Analysen zum Sulfatgehalt unter Cd-Stress durchgeführt, aber nur unter Sulfatmangelbedingungen (siehe Kapitel 4.3). Studien mit ³⁵S-markiertem Sulfat an Maiskeimlingen haben gezeigt, dass bei Exposition mit 50 µM Cd mehr ³⁵S in höhermolekulare Verbindungen eingebaut wird als unter Kontrollbedingungen (Nussbaum *et al.*, 1988). Nocito *et al.* (2002; 2006) stellten ebenfalls bei Untersuchungen an Maiswurzeln eine Cd-induzierte Sulfataufnahme fest sowie ein höheres mRNA-level eines putativen *high-affinity*-Sulfattransporters (*ZmST1;1*). Die konstitutive Expression des *high-affinity*-Sulfattransporters *SHST1* aus *Stylosanthes hamata* in *Brassica juncea* führte zu einer gesteigerten Cd- und Sulfat-Aufnahme in die Wurzeln (Lindblom *et al.*, 2006). Jedoch zeigten die Pflanzen keine höhere Toleranz gegenüber Cadmium. Diese Untersuchungen belegen, dass unter Cd die Sulfataufnahme in Pflanzen gesteigert wird und eine Regulation der Sulfattransporter stattfindet.

Um den Einfluss von Sulfat auf die Cd-Toxizität von *P. patens* näher zu untersuchen wurden weitere Experimente unter Sulfatmangel-Bedingungen durchgeführt.

Die Erhöhung des Glutathiongehaltes unter Cd-Exposition geht einher mit einem höheren Bedarf an den drei Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin, da über deren Verfügbarkeit die GSH-Biosynthese reguliert wird (Kopriva & Rennenberg, 2004). Stickstoff- und Schwefelstoffwechsel sind über O-Acetylserin (OAS) eng miteinander vernetzt (Hesse *et al.*, 2004; Kopriva & Rennenberg, 2004). **Tracerstudien mit ^{15}N** wurden herangezogen, um den Stoffwechsel von *P. patens* unter Cd-Einfluss näher zu charakterisieren. ^{15}N wurde durch Austausch von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ gegen $\text{Ca}(^{15}\text{NO}_3)_2$ als einzige Stickstoffquelle dem Medium zugegeben. Das aus dem Medium aufgenommene Nitrat wird durch die Nitratreduktase, Nitritreduktase und den GS/GOGAT-Zyklus in Aminostickstoff des Glutamats umgewandelt. Glutamat fungiert dann als Aminogruppendonor bei der Synthese weiterer Aminosäuren (Schopfer & Brennicke, 2006). Über Aminosäuren kann der gesamte Weg des ^{15}N -Tracerstickstoffs im Organismus bis hin zu den Proteinen verfolgt werden. Sowohl ^{15}N -Tracertechniken als auch die Analyse der natürlichen $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Verhältnisse wurden schon in zahlreichen Untersuchungen genutzt, um den Einfluss von Schadstoffen und Schwermetallen auf den N-Stoffwechsel verschiedener Pflanzen und Moose zu erfassen (u. a. Jung & Junghans, 1981; Hofmann *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 1999; Pearson *et al.*, 2000; Hafner *et al.*, 2002; Sutter *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2004). Die vorliegenden Studien haben für *P. patens* gezeigt, dass sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Cadmium-Belastung erwartungsgemäß ein Einbau von ^{15}N in die Aminosäuren und Proteine stattfindet (S. 38-39, Abb. 24, Abb. 25). Jedoch führte die Exposition mit Cd zu einer Reduktion des ^{15}N -Einbaus um ca. 40 % in der Aminosäure-Fraktion bzw. 30 % in der Protein-Fraktion. Ähnliche Befunde wurden auch bei Tracerstudien mit ^{15}N an dem aquatischen Moos *F. antipyretica* erhalten (Sutter *et al.*, 2002). Diese Untersuchungen zeigten außerdem eine Abhängigkeit der ^{15}N -Häufigkeit von der Cd-Konzentration. Eine fünftägige Belastung mit 25 μM Cd reduzierte den ^{15}N -Einbau um ca. 50 %, mit 100 μM Cd um ca. 80 % im Vergleich zur Kontrolle. Die stärkere Abnahme der Einbauraten im Vergleich zu *P. patens* steht möglicherweise im Zusammenhang mit der höheren intrazellulären Cd-Konzentration in *F. antipyretica* (ca. 3 $\mu\text{mol g FM}^{-1}$ nach fünf Tagen Exposition mit 100 μM Cd). Schlussfolgernd kann festgestellt werden, dass Cd-Exposition in beiden Moosen zu einer Hemmung der Nitratassimilation sowie der Aminosäuresynthese führt. Bei *F. antipyretica* wurde die ^{15}N -Aufnahme auch in Gegenwart anderer Schwermetalle (Zn, Pb) untersucht.

Auch für diese Schwermetallionen konnte eine Abhängigkeit der Reduktion des ^{15}N -Einbaus von der Schwermetallkonzentration beobachtet werden (Sutter *et al.*, 2002). In *Silene vulgaris* konnte für As(V) ebenfalls eine konzentrationsabhängige Hemmung des ^{15}N -Einbaus in die Blätter festgestellt werden, während für As(III) zunächst eine Hemmung, aber bei der höchsten Konzentration (60 mg L^{-1}) wiederum ein stärkerer Einbau beobachtet wurde (Schmidt *et al.*, 2004). Die Autoren schlossen aus den Ergebnissen, dass dies auf die Arsenspezies zurückzuführen sei. As(III) kann durch Komplexierung mit Thiolpeptiden entgiftet werden, während As(V) als Phosphatanalogon verschiedene Phosphorylierungsprozesse in der Zelle inhibiert (Schmidt *et al.*, 2004). Die Beeinflussung des N-Stoffwechsels in Maisblättern und –keimlingen sowie Gerste unter Cd wurde durch Abnahme der Enzymaktivitäten der Nitrat- und Nitritreduktase sowie der Glutaminsynthetase (GS) festgestellt (Boussama *et al.*, 1999a; Boussama *et al.*, 1999b; Astolfi *et al.*, 2004a). Im Gegensatz dazu waren die GS-Aktivitäten in *Avena sativa* kaum verändert (Astolfi *et al.*, 2004b). Die verminderten Enzymaktivitäten wurden für Gerste und Maiskeimlinge in Zusammenhang mit dem niedrigeren Nitratgehalt der Pflanzen unter Cd-Exposition gebracht (Boussama *et al.*, 1999a; Boussama *et al.*, 1999b). Somit hemmt Cd vermutlich die Nitrataufnahme aus dem Medium. Die mögliche Hemmung eines Nitrattransporters unter Cd in *F. antipyretica* wurde auch von Sutter *et al.* (2002) diskutiert. In *Helianthus-annuus*-Pflanzen ist der inhibitorische Effekt von Cd auf die Photosynthese abhängig von der Stickstoffversorgung (Pankovic *et al.*, 2000).

Die ^{15}N -Tracertechnik ist eine nützliche Methode bei der Untersuchung von Cd-Stress in Pflanzen. Lanquar *et al.* (2007) führten mit dieser Technik vergleichende Membranproteom-Studien an *Arabidopsis*-Zellkulturen durch. Dabei wurden drei Proteine identifiziert, die unter Cd-Einfluss deutlich induziert waren (AtPDR8, AtLRRXII, AtAMT1.1). AtAMT1.1 ist ein Ammoniumtransporter, dessen Induktion im Einklang mit dem erhöhten Stickstoffbedarf unter Cd steht (Lanquar *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde die ^{15}N -Tracermethode erstmalig genutzt, um die GSH-Biosynthese unter Cd näher zu betrachten. Es konnte gezeigt werden, dass mehr ^{15}N in die GSH-Fraktion Cd-belasteter Proben eingebaut wurde als in die der unbelasteten Kontrollen. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Aktivierung der Glutathionbiosynthese unter Cd-Stress, die schon von Rother *et al.* (2006) durch Transkriptanalysen und die Bestimmung der Enzymaktivitäten der Glutathionbiosynthese-Enzyme gezeigt wurde. Jedoch können noch keine Rückschlüsse gezogen werden, ob der Anstieg des GSH vorwiegend aus einer Neusynthese oder einem Aminosäure-Recycling durch

Proteinabbaureaktionen stammt. *Turnover*-Studien mit ^{15}N unter Cd-Exposition könnten hier weitere Ansatzpunkte sein.

4.2 Auswirkungen von Sulfatmangel

Schwefelmangel ist in den letzten Jahren aufgrund der Senkung des Ausstoßes von SO_2 in die Atmosphäre zu einer erheblichen Problematik für die Landwirtschaft geworden. Durch Beeinträchtigung der Photosynthese hat Schwefelmangel negative Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum und führt in Verbindung mit der Synthese schwefelarmer Proteine zu Ertrags- und Qualitätsminderung.

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Sulfatmangel auf *P. patens* wurden zwei verschiedene Versuchsbedingungen gewählt. Zum einen wurde das Moos über einen Zeitraum von zehn Tagen in Sulfatmangelmedium ($0,4 \mu\text{M}$ Sulfat) und zum anderen in sulfatfreiem Medium kultiviert. Zunächst wurde anhand des Pigmentgehaltes die **Vitalität** von *P. patens* unter diesen Bedingungen näher charakterisiert. Kurzfristiger Sulfatmangel bis zu drei Tagen hatte in beiden Versuchsansätzen keinerlei Auswirkungen. Zehntägiger Sulfatmangel führte jedoch zu einer Abnahme der photosynthetischen Pigmente auf ca. 80 % im Vergleich zur sulfatversorgten Kontrolle, die aber nur für Chl a und die Carotinoide signifikant war (S. 41-42, Abb. 27, Abb. 28, Abb. 29). In der Vitalität konnte jedoch kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsansätzen festgestellt werden.

Untersuchungen an Moosen unter Sulfatmangel wurden bisher nur an dem aquatischen Moos *Fontinalis antipyretica* vorgenommen (Sutter, 2000; Bleuel, 2004). Hierbei hatte eine 38-tägige Sulfatverarmung ($0 \mu\text{M}$ Sulfat im Medium) für dieses Moos weder Auswirkungen auf den Chl-a- und -b-Gehalt noch die photochemische Quantenausbeute des PSII (Sutter, 2000, Bleuel unveröffentlichte Daten). Sogar zweimonatiger Sulfatmangel beeinflusste den Chlorophyllgehalt und die PSII-Effizienz nicht (Sutter, 2000, Bleuel unveröffentlichte Daten). In höheren Pflanzen werden die Auswirkungen von Schwefelmangel schon seit langem untersucht. Bereits 1976 analysierte Terry die Photosyntheseleistung intakter Blätter und isolierter Chloroplasten von Zuckerrüben. Es konnte gezeigt werden, dass ein linearer Zusammenhang zwischen dem Sulfatgehalt der Blätter und dem Chlorophyllgehalt besteht. Gesamtschwefelgehalte in den Blättern unterhalb von $2500 \mu\text{g g}^{-1}$ TM führten zu einer verminderten CO_2 -Aufnahme, einer reduzierten Photophosphorylierung und einer Beeinträchtigung der CO_2 -Assimilation durch die RuBisCO (Terry, 1976). Auch junge Weizenblätter reagieren auf Sulfatmangel mit einem verminderten Chlorophyllgehalt sowie geringeren RuBisCO-Aktivitäten und RuBisCO-Proteingehalten (große Untereinheit). Auch der nicht-zyklische Elektronentransport wurde beeinträchtigt (Burke *et al.*, 1986; Gilbert *et*

al., 1997). Eine kürzlich erschienene umfangreiche Studie an Reis unter Sulfatmangel zeigte ebenfalls eine negative Beeinflussung des gesamten Photosyntheseapparates (Lunde *et al.*, 2008). Neben der Abnahme des Gehaltes an Chlorophyll (50 %) und RuBisCO (5- bis 6-fach) wurde auch eine Beeinflussung der beiden Photosysteme nachgewiesen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass höhere Pflanzen durch Sulfatmangel in ihrer Vitalität, gemessen am Chlorophyllgehalt und der Photosyntheseleistung, vermutlich stärker beeinträchtigt werden als Moose, wobei *P. patens* etwas sensitiver reagiert als *F. antipyretica*.

Die Verringerung des Sulfatangebotes im Medium führte in *P. patens* letztendlich auch zu einer raschen Abnahme des **intrazellulären Sulfatgehaltes**, wobei jedoch auch hier keine Unterschiede zwischen geringem (0,4 μM) und keinem Sulfatangebot ersichtlich waren (S. 44, Abb. 33). Nach zehn Tagen waren nur noch geringste Mengen an Sulfat, 7 % im Vergleich zur sulfatversorgten Kontrolle, messbar. In Konsequenz des Mangels an der Ausgangsverbindung für die reduktive Sulfatassimilation kam es zu einem Absinken der Konzentrationen an **Cys**, **γ -EC** und **GSH** (S. 42-44, Abb. 30, Abb. 31, Abb. 32). Während der Cys- und GSH-Gehalt schon nach drei Tagen deutlich absank, wurde die Reduktion des γ -EC-Gehaltes erst zum Versuchsende signifikant. Nach zehn Tagen waren nur noch 40 % Cys, 60 % γ -EC und 36 % GSH im Vergleich zur Kontrolle messbar, während die Vitalität nur bis max. 80 % sank. Wie bei allen anderen Analysen wurden keine Unterschiede zwischen den zwei verschiedenen Versuchsansätzen beobachtet. In vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe am Wassermoos *F. antipyretica* wurde das Verhalten der Sulfat- und Thiolkonzentrationen unter Sulfatmangel ebenfalls intensiv analysiert (Sutter, 2000; Bleuel, 2004). Sulfatmangel von bis zu 60 Tagen führte in *F. antipyretica* zu einer Reduktion des intrazellulären Sulfatgehaltes bis auf 8 bzw. 35 % und des GSH-Gehaltes auf 10 bzw. 25 %. Die unterschiedlich starken Ausmaße sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass es sich bei diesen Untersuchungen um Freilandmaterial von zwei verschiedenen Standorten handelt (Bach Helbe, Sutter, 2000; Bach Wipper, Bleuel, 2004). Das Moos aus der Wipper hatte zu Beginn des Experimentes einen etwas niedrigeren Sulfatgehalt (2,6 $\mu\text{mol g FM}^{-1}$) als das aus der Helbe (3,1 $\mu\text{mol g FM}^{-1}$). Beide Arbeiten zeigen jedoch, dass *F. antipyretica* sehr lange Sulfatmangelperioden trotz verminderter reduktiver Sulfatassimilation überdauern kann. Auch in höheren Pflanzen geht ein Mangel an extrazellulärem Sulfat zunächst mit der Abnahme der intrazellulären Sulfat- bzw. Gesamtschwefelkonzentration einher. Dies wurde u. a. an jungen Weizenblättern (Gilbert *et al.*, 1997), Spinatpflanzen (Prosser *et al.*, 2001), *A. thaliana* (Hirai *et al.*, 2003; Nikiforova *et al.*, 2003) und Raps (Lencioni *et al.*, 1997) gezeigt. Ebenso

übereinstimmend ist die Abnahme des GSH-Gehaltes beschrieben (u. a. Lappartient & Touraine, 1996; Hirai *et al.*, 2003; Nikiforova *et al.*, 2003). Studien an der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* belegen, dass es in einer frühen Phase des Schwefelmangels (innerhalb der ersten sechs Stunden) zur Nutzung eines Membransulfolipids der Chloroplastenmembran als interne Schwefelquelle kommt (Sugimoto *et al.*, 2007). In *Arabidopsis*-Pflanzen wurde bei geringem Sulfatangebot die Induktion des *AtMGL*-Gens, das für eine Methionin- γ -Lyase kodiert, beobachtet (Goyer *et al.*, 2007). Dieses Enzym ist an der Bildung von Cystein aus Methionin (Alternative zum *Reverse Trans-sulfuration Pathway* von Tieren und einigen Mikroorganismen) beteiligt. *AtMGL*-*knock-out*-Pflanzen bauten weniger ^{35}S in Protein-Cystein ein als Wildtyp-Pflanzen, wenn sie bei geringen Sulfatkonzentrationen mit L- ^{35}S -Methionin als weitere Schwefelquelle versorgt wurden. Inwieweit Moose, aber auch andere höhere Pflanzen ebenfalls diese beiden Möglichkeiten nutzen, um einen bestimmten Schwefel- bzw. Cystein-Pool unter Sulfatmangelbedingungen aufrechtzuerhalten, ist bisher nicht bekannt.

Die Regulation der reduktiven Sulfatassimilation in *P. patens* auf Transkriptebene ist von Rother *et al.* (2006) unter Cd-Exposition analysiert worden. Da unter Cd-Exposition ein erhöhter Bedarf an Sulfat vorliegt und es somit zu einer Aktivierung der reduktiven Sulfatassimilation kam, wurde diese Regulation nun auch unter Sulfatmangel näher betrachtet. Mittels **quantitativer real-time-PCR** wurden alle Gene des reduktiven Sulfatassimilationsweges außer der APS-Kinase unter Sulfatmangelbedingungen untersucht. Die Ergebnisse sind direkt mit denen von Rother *et al.* (2006) vergleichbar, da dieselben Primer eingesetzt wurden. Die vorliegenden Daten zeigen eine eindeutige stärkere Induktion der Serinacetyltransferase (SAT) unter Sulfatmangel, während für die anderen Gene keine bzw. nur geringste Induktionen sichtbar waren (S. 45, Tabelle 4). Unter Cd-Exposition war in *P. patens* nur eine geringe Induktion des SAT-Gens zu beobachten, am höchsten war die Sulfitreduktase induziert (Rother *et al.*, 2006). Genexpressionstudien unter Sulfatmangel finden sich in der Literatur vorwiegend für *A. thaliana* (u. a. Takahashi *et al.*, 1997; Hirai *et al.*, 2003; Nikiforova *et al.*, 2003), aber auch für die einzellige Grünalge *C. reinhardtii* (Ravina *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004). Sowohl für *A. thaliana* als auch *C. reinhardtii* konnte wie im vorliegenden Fall die Induktion eines SAT-Gens gezeigt werden. Jedoch waren auch mRNA-level anderer Gene erhöht, die ebenfalls an der reduktiven Sulfatassimilation beteiligt sind.

Die SAT katalysiert die Bildung von O-Acetylserin (OAS) aus Serin und Acetyl-CoA. Gemeinsam mit der O-Acetylserin(thiol)lyase (OAS-TL) bildet sie über Protein-Protein-Wechselwirkungen den Cysteinsynthase-Komplex (Bogdanova & Hell, 1997). *P. patens* besitzt vier Gene, die für SAT kodieren (Kopriva *et al.*, 2007b), wovon zwei (SAT1 und SAT4) eindeutig eine chloroplastidäre Lokalisierung aufweisen (persönliche Mitteilung C. Hermsen). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer weisen nur zu SAT1 eine 100-prozentige Identität auf, so dass sich die Induktion direkt auf diese SAT und keine der anderen Isoformen bezieht. *A. thaliana* besitzt fünf SAT-Gene mit unterschiedlichen Lokalisierungen für Cytosol, Chloroplasten und Mitochondrien. Kawashima *et al.* (2005) konnten durch *real-time*-PCR-Analysen eine differenzielle Expression der verschiedenen SAT-Gene (*Serat*) unter Sulfatmangel zeigen. Nur *Serat3;1* und *Serat3;2* zeigten eine deutliche Induktion unter Sulfatmangel, wobei *Serat3;1* erst nach 96 Stunden Sulfatmangel in den Wurzeln erhöht war. Experimente mit *Citrullus vulgaris* zeigten nur eine sehr geringe Erhöhung eines SAT-Gens (1,5- bis 2-fach) unter Sulfatmangel (Saito *et al.*, 1997). Cd-Exposition führte in *A. thaliana* zur Induktion aller SAT-Gene (außer *Serat3;1*) in den Wurzeln, während im Spross nur *Serat 3;2* induziert wurde (Kawashima *et al.*, 2005). Möglicherweise gibt es in *P. patens* ebenfalls eine differenzielle Regulation der verschiedenen SAT-Gene, was nach Primerableitung für die anderen Isoformen noch geprüft werden soll. Die unter Cd-Exposition und Sulfatmangel deutlich unterschiedlich starken Induktionen des untersuchten SAT-Gens lassen den Schluss zu, dass unter Cd-Exposition möglicherweise eine andere SAT-Isoform stärker induziert wird. Die transkriptionelle Regulation der reduktiven Sulfatassimilation unter diesen beiden Bedingungen verläuft in jedem Fall unterschiedlich.

Auf Proteinebene ist die SAT nur im Cysteinsynthase-Komplex mit der OAS-TL aktiv (Droux *et al.*, 1998; Wirtz & Hell, 2006). Sie unterliegt einer *feedback*-Regulation durch Cystein, dem Endprodukt der reduktiven Sulfatassimilation (Saito *et al.*, 1995; Noji *et al.*, 1998). Es wurde jedoch gezeigt, dass nicht alle Isoformen Cys-sensitiv sind (Noji *et al.*, 1998; Kawashima *et al.*, 2005). Sulfatmangel führt durch den Anstieg der intrazellulären OAS-Konzentration zur Dissoziation des Cysteinsynthase-Komplexes und somit zum Aktivitätsverlust der SAT (Saito, 2004). Untersuchungen zur Regulation der Sulfatassimilation durch Stickstoff- und Schwefelmangel in *A. thaliana* belegen, dass OAS auch bei der transkriptionellen Regulation eine große Rolle spielt (Koprivova *et al.*, 2000; Hirai *et al.*, 2003). Daten zur OAS-Konzentration und den Enzymaktivitäten der SAT unter Sulfatmangel

in *P. patens* sowie zur Sensitivität der einzelnen Isoformen gegenüber Cys liegen bisher noch nicht vor.

4.3 Einfluss von Sulfatmangel auf die Cd-Toxizität

Um den Einfluss von Sulfatmangel auf die Cd-Toxizität zu untersuchen, wurden Experimente unter kurzfristigem und langfristigem Sulfatmangel durchgeführt. Für kurzfristige Sulfatmangelbedingungen wurden die Protonema-Kulturen nach der Vorkultivierung für fünf Tage in Medium ohne Sulfat umgesetzt und zeitgleich mit 10 μM Cd exponiert. In der zweiten Versuchsvariante erfolgte die dreitägige Cd-Exposition erst nach zehntägiger Sulfatverarmung (insgesamt 13 Tage Versuchsdauer).

Zunächst wurde die **Vitalität** charakterisiert. Fünftägiger Sulfatmangel bewirkte ein Absinken des Chl-a, -b- und des Carotinoidgehaltes auf 85, 91 und 94 % im Vergleich zum Versuchsbeginn. Die zusätzliche Exposition mit 10 μM Cd verstärkte die Abnahme der Pigmentgehalte (S. 46-47, Abb. 34 - Abb. 36). Nach fünf Tagen war der Vitalitätsverlust durch Cd-Exposition etwas geringer, aber ähnlich dem unter ausreichender Sulfatversorgung. Langfristige Sulfatverarmung (insgesamt 13 Tage) bewirkte nur für Chl a und die Carotinoide eine signifikante Abnahme. Auch hier konnte keine Wechselwirkung zwischen Sulfatangebot und Cd-Exposition beobachtet werden (S. 51-52, Abb. 41 - Abb. 43). Untersuchungen unter Sulfatmangel und Cd-Exposition in Moosen wurden ebenfalls nur im aquatischen Moos *F. antipyretica* durchgeführt (Sutter, 2000; Bleuel, 2004). Kurzfristiger Sulfatmangel (hier vier Tage) und die anschließende Exposition mit 100 μM Cd bei weiterer Kultivierung ohne Sulfat im Medium zeigte die gleiche Abnahme der Vitalität, gemessen an der Quantenausbeute des PS II, wie unter verschiedenen Sulfatkonzentrationen (Sutter, 2000). Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass der Vitalitätsverlust nur durch Cd und nicht durch den Sulfatmangel hervorgerufen wurde. Die Zugabe von Cd nach langfristigem Sulfatmangel (38 Tage) und die weitere Kultivierung ohne Sulfat führte zu einer drastischen Abnahme der PS-II-Effizienz in *F. antipyretica* von zwei verschiedenen Standorten. Wurde Cd und Sulfat nach 38-tägigem Sulfatmangel zugegeben, verringerte sich die PS-II-Effizienz weniger stark (Sutter, 2000 Bleuel, unveröffentlichte Daten). Nach 21-tägiger Cd-Exposition mit und ohne Sulfat im Medium zeigte die Analyse des Pigmentgehaltes eine Abnahme des Chlorophyllgehaltes in *F. antipyretica*, wobei die Unterschiede zwischen den beiden Versuchsansätzen deutlich geringer waren im Vergleich zur PS-II-Effizienz (Bleuel, unveröffentlichte Daten). Die Abnahme des Chlorophyllgehaltes unter Cd-Exposition scheint somit in Moosen von der Cd-Exposition und weniger von der Sulfatversorgung abhängig zu sein. Jedoch ist die

Photosyntheseleistung unter Cd, gemessen als Quantenausbeute des PS II, abhängig von der Sulfatversorgung.

Für höhere Pflanzen liegen verschiedene Untersuchungen zu Schwermetallstress bei unterschiedlichem Sulfatangebot vor. Popovic *et al.* (1996) beobachteten in Zuckerrübenpflanzen einen sehr geringen Chlorophyllgehalt unter Sulfatmangel. Die zusätzliche Belastung mit Cd führte zu einer weiteren, aber sehr geringen Abnahme des Chl-a-Gehaltes, während sich der Chl-b-Gehalt nicht weiter veränderte. In Maisblättern war der Chlorophyllgehalt bei Sulfatmangel und Cd-Exposition geringer als unter +Sulfat/+Cd-Bedingungen (Astolfi *et al.*, 2004a). In einer früheren Untersuchung wurde der Zusammenhang zwischen Sulfat- und Eisenversorgung in Maispflanzen untersucht (Astolfi *et al.*, 2003). Eisenmangel hatte unabhängig von der Sulfatversorgung keinen Einfluss auf den Chlorophyllgehalt. Analysen zur Chromentgiftung in Abhängigkeit des Sulfatangebotes in *Brassica juncea* zeigten eine Abnahme der Chlorophyllkonzentration unter Sulfatmangel, während Cr-Exposition keine Auswirkungen hatte (Schiavon *et al.*, 2008). Die generelle Beurteilung des Einflusses der Sulfatversorgung unter Schwermetallexposition auf die Vitalität ist sehr schwierig, da es zahlreiche unterschiedliche experimentelle Ansätze gibt, die vor allem in der Versuchsdauer stark variieren.

Die Fähigkeit von *P. patens* zur Cd-Detoxifizierung unter kurz- und langfristigen Sulfatmangelbedingungen wurde durch Analyse der **Thiolgehalte** untersucht. Unabhängig von der Dauer des Sulfatmangels war das Moos noch in der Lage, die Thiolgehalte als Cd-Stressantwort zu erhöhen (S. 48-49, Abb. 37 - Abb. 39; S. 53, Abb. 44, Abb. 45). Unter kurzfristigem Sulfatmangel stieg der Cys- und GSH-Gehalt bei Cd-Exposition auf das Dreifache und der γ -EC-Gehalt auf das Vierfache an. Nach zehntägigem Sulfatmangel und anschließender dreitägiger Kultivierung unter -S/+Cd-Bedingungen konnte nur noch eine Verdopplung des Cys- und GSH-Gehaltes festgestellt werden, γ -EC wurde nicht mehr detektiert. Trotz Erhöhung der Thiolkonzentrationen unter Sulfatmangel und Cd-Exposition war festzustellen, dass in allen Versuchsansätzen nicht die Konzentrationen wie bei ausreichender Sulfatversorgung erreicht werden konnten. In *F. antipyretica* wurden nach eintägiger Vorkultivierung ohne Sulfat und anschließender Umsetzung auf +S/+Cd- sowie -S/+Cd-Bedingungen lediglich Unterschiede im Cys- und γ -EC-Gehalt beobachtet, der GSH-Gehalt erhöhte sich gleichermaßen unabhängig von der Sulfatversorgung (Sutter, 2000). Mit der Erhöhung der Thiolgehalte unter Cd-Exposition kam es zu einer deutlichen Abnahme des intrazellulären Sulfatgehaltes in *F. antipyretica*. Dies konnte in *P. patens* jedoch nicht

festgestellt werden (S. 50, Abb. 40). Nach langfristigem Sulfatmangel (38 Tage) und anschließender Kultivierung von *F. antipyretica* unter $-S/+Cd$ - sowie $+S/+Cd$ -Bedingungen wurde ebenfalls in beiden Kulturen eine Erhöhung der Thiolgehalte gemessen, die jedoch durch die Zugabe von Sulfat weiter verstärkt wurde (Sutter, 2000; Bleuel, 2004). Die vorliegenden Daten deuten somit auf die Notwendigkeit von Sulfat für die Thiolbiosynthese und die Beteiligung von GSH an der Cd-Detoxifizierung hin.

Der Einfluss von Sulfat auf die Cadmium-Detoxifizierung war ebenfalls Gegenstand einiger Untersuchungen in höheren Pflanzen. Die Abhängigkeit der Thiolbiosyntheseleistung vom Sulfatangebot bei Cd-Exposition wurde u. a. für *Triticum aestivum* cv. *Condor*, (McMahon & Anderson, 1998), *Zea mays* L. (Astolfi *et al.*, 2004a) und *Dionaea muscipula* Ell. (Babula *et al.*, 2008) gezeigt. Auch Aktivitäten einiger Enzyme der reduktiven Sulfatassimilation werden durch das Sulfatangebot bei Cd-Stress verändert. So wurde in Mais bei Sulfatmangel und Cd-Exposition nach vier Tagen eine Erhöhung der Enzymaktivitäten der ATP-Sulfurylase und der O-Acetylserin(thiol)Lyase gemessen (Astolfi *et al.*, 2004a). Die schützende Rolle von Sulfat konnte von Popovic *et al.* (1996) auch in Bezug auf die Beeinträchtigung des Stickstoffmetabolismus (Abnahme der Enzymaktivitäten der Nitratreduktase und Glutamindehydrogenase) durch Cadmium-Belastung in Zuckerrüben gezeigt werden.

Nicht nur die Entgiftung von Cadmium ist abhängig von der Versorgung mit Sulfat, sondern auch die Toxizität anderer Schwermetalle. *Glycine-max*-Pflanzen zeigten bei höheren Sulfatkonzentrationen im Medium (20 mM) geringere Zink-Toxizitätserscheinungen, wie Chlorosen, als bei geringeren Sulfatkonzentration (Fontes & Cox, 1995). Bei Exposition mit Chromat wurde in den zwei verschiedenen Wasserlinsenarten *Spirodela polyrhiza* und *Lemna minor* eine Verminderung des toxischen Effektes (gemessen durch Frischgewicht, Chl a und Carotinoide) mit steigender Sulfatkonzentration beobachtet (Appenroth *et al.*, 2008). Untersuchungen an *Brassica juncea* und *Zea mays* zeigten einen inhibierenden Effekt von Sulfat auf die Chromataufnahme (Schiavon *et al.*, 2007; Schiavon *et al.*, 2008). Dies wurde auch an *S. polyrhiza* beobachtet und erklärt somit möglicherweise den oben genannten positiven Effekt von Sulfat hinsichtlich der Vitalität (Kaszycki *et al.*, 2005). Weiterhin wird die Sulfataufnahme in *B. juncea* und *Z. mays* durch Chromat beeinträchtigt und die Genexpression von Sulfattransportern (*BjST1*, *ZmST1;1*) herunterreguliert (Schiavon *et al.*, 2007; Schiavon *et al.*, 2008). Schultz und Hutchinson (1988) zeigten an *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv., dass bei Kupferbelastung die Synthese thiolreicher Cu-bindender

Proteine durch das Sulfatangebot beeinflusst wird. In *P. patens* wurde bisher nur die Abhängigkeit der Cd-Toxizität von der Sulfatversorgung untersucht.

4.4 *In-situ*-Markierung mit Monochlorobiman

Zur Untersuchung Glutathion-abhängiger Entgiftungsmechanismen in Pflanzen wird häufig die *in-situ*-Markierung mit Monochlorobiman (MCB) eingesetzt (Coleman *et al.*, 1997; Fricker & Meyer, 2001; Schröder *et al.*, 2007). Monochlorobiman ist ein membran-permeabler, nicht-fluoreszierender Farbstoff, der im Cytosol in einer Phase-II-Reaktion mit Glutathion konjugiert wird, wobei fluoreszierendes Glutathion-Biman entsteht. Diese Reaktion wird durch Glutathion-S-Transferasen (GST) im Cytosol katalysiert. GST sind Enzyme, die die nukleophile Konjugation von elektrophilen, meist cytotoxischen Substraten (Xenobiotika) mit GSH vermitteln (Basantani & Srivastava, 2007). Sie werden in acht verschiedene Klassen eingeteilt (phi, tau, zeta, theta, lambda, DHAR, TCHQD, MAPEG), wobei die Xenobiotika-Detoxifizierung hauptsächlich durch Vertreter der phi- und tau-Klasse erfolgt. GST besitzen noch andere Enzymaktivitäten, wie z. B. Glutathionperoxidase- (phi, tau, theta), Isomerase- (zeta) und Oxidoreduktase-Aktivität (lambda, DHAR). Phi-, tau-, zeta- und theta-GST liegen als Dimere vor, deren Untereinheiten katalytisch unabhängig sind und je eine flexible Substrat- und eine hochkonservierte GSH-Bindungsstelle besitzen. Von großer Bedeutung ist ein Serinrest, der die Ionisierung der SH-Gruppe des GSH begünstigt, wodurch ein Thiolanion gebildet wird (Basantani & Srivastava, 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *in-situ*-Markierung mit MCB auch in *P. patens* möglich ist. Die Visualisierung mit Hilfe der konfokalen *Laserscanning*-Mikroskopie (CLSM) zeigte, dass die Glutathion-Biman-Konjugate (GS-B) zunächst im Cytosol gebildet und mit fortschreitender Inkubationsdauer in die Vakuole transportiert werden (S. 54, Abb. 46). Dieser Verlauf der GS-B-Bildung wurde auch in Mais- und Karottenzellen (Coleman *et al.*, 1997), Trichoblasten und Atrichoblasten von *Arabidopsis*-Wurzeln (Meyer & Fricker, 2000), grünen *Arabidopsis*-Zellkulturen (Meyer & Fricker, 2002), *Arabidopsis*-Blättern (Grzam *et al.*, 2006) sowie Pappelblättern (Hartmann *et al.*, 2003) nachgewiesen. Neben der bloßen Lokalisierung ermöglicht die Konjugation von MCB mit Glutathion auch eine Quantifizierung des GSH in der Zelle (Fricker *et al.*, 2000; Gutierrez-Alcala *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2001; Hartmann *et al.*, 2003; Cairns *et al.*, 2006). Die Quantifizierung kann sowohl über die CLSM nach Kalibrierung mit GS-B-Standards als auch über HPLC-Analysen der Zellextrakte erfolgen. Die CLSM bietet zusätzlich die Möglichkeit, GSH-Gehalte in unterschiedlichen Zelltypen zu analysieren (Fricker *et al.*, 2000; Gutierrez-Alcala *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2003), während mittels HPLC Cys-B, γ -EC-B und GS-B

unterschieden werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der CLSM die Bildung des Konjugates und dessen Transport in die Vakuole beobachtet, wobei die eigentliche Quantifizierung mittels HPLC erfolgte. Eine Konjugatbildung erfolgte sowohl in Kontroll- als auch in Cd-belasteten Zellen sehr schnell in Form einer Sättigungskurve (S. 55, Abb. 47; S. 57, Abb. 49). Ein solcher Kurvenverlauf ist typisch für die *in-situ*-Markierung mit MCB (Coleman *et al.*, 1997; Fricker *et al.*, 2000; Meyer & Fricker, 2000; Meyer *et al.*, 2001; Hartmann *et al.*, 2003). Ein Vergleich der Markierungsansätze mit 200 μ M MCB (unter Kontrollbedingungen und Cd-Belastung) und mit 500 μ M MCB zeigte, dass im Vergleich zum Gesamt-Glutathiongehalt von Rohextrakten nicht der ganze GSH-Pool der Zellen markiert werden konnte (S. 55-57, Abb. 47, Abb. 48, Abb. 49). Durch eine zusätzliche *in-vitro*-Derivatisierung von Extrakten MCB-markierter Zellen konnte sowohl in Kontrollen als auch in Cd-belasteten Kulturen immer noch freies GSH mit Monobromobiman (MBB) markiert werden (S. 55, Abb. 47; S. 57, Abb. 49). Gleiche Beobachtungen machten auch Hartmann *et al.* (2003) an Pappelblättern. Die Autoren schlussfolgerten, dass es sich bei dem nicht markierten GSH-*pool* wahrscheinlich um den chloroplastidären handelt. In den Chloroplasten fehlt vermutlich die entsprechende GST, um eine Konjugation zwischen GSH und MCB zu katalysieren. Die Aussage konnte durch den Vergleich von *in-situ*-Markierung mit MCB an intakten Spinatchloroplasten und dem Gesamt-GSH-Gehalt osmotisch zerstörter Chloroplasten untermauert werden (Hartmann *et al.*, 2003). In *Arabidopsis*-Zellkulturen hingegen konnte der gesamte GSH-*pool* mit 100 μ M MCB markiert werden (Meyer *et al.*, 2001). Auch in Karottenzellen war nach 75-minütiger Inkubation mit 100 μ M MCB kaum noch freies GSH feststellbar (Coleman *et al.*, 1997). Möglicherweise sind diese Beobachtungen in der Tatsache begründet, dass diese Zelltypen keine voll ausgebildeten Chloroplasten enthalten.

Eine weitere Erklärung dafür, dass nicht der gesamte GSH-*pool* markiert wurde, könnte nicht mit MCB markierbares Glutathiondisulfid (GSSG) sein. Ein Experiment, bei dem für die zusätzliche *in-vitro*-Glutathionbestimmung in MCB-markierten Extrakten kein Reduktionsmittel (DTT) eingesetzt wurde, resultierte in einem deutlich geringeren Gehalt an freiem reduzierten GSH (Daten nicht gezeigt). Dies spricht für einen relativ hohen GSSG-Gehalt in *P. patens*-Zellen, der ohne vorhergehende Reduzierung nicht durch MCB markiert werden kann. Rother (2007) zeigte mittels enzymatischer Messungen, dass der prozentuale Anteil des GSSG am Gesamt-GSH-Gehalt in Kontrollkulturen von *P. patens* zwischen 35 und 46 % liegt. Diese GSSG-Gehalte sollten jedoch kritisch betrachtet werden. Eine direkte Bestimmung des *in-situ* Gehaltes an GSSG wie in *Arabidopsis thaliana* durch Überexpression

eines Redoxsensors (Meyer *et al.*, 2007) steht für *P. patens* noch aus. Wenngleich die kritische Einschätzung der Autoren an nach Extraktion gewonnenen GSSG-Werten auch für *P. patens* zutreffen kann. Welche der beiden möglichen Ursachen dafür verantwortlich ist, dass nicht der gesamte GSH-*pool* in *P. patens* mit MCB markiert werden konnte, ist bisher nicht geklärt.

Auf Grundlage der hier vorliegenden Ergebnisse kann geschlossen werden, dass die gemessene Aktivitätserhöhung der Glutathion-S-Transferasen-Aktivität während der *in-situ*-Markierung (S. 64, Abb. 59) vermutlich von einer Aktivitätserhöhung der cytosolischen GST stammt. In Karottenzellen ist die Konjugation von MCB mit GSH ebenfalls eine GST-katalysierte Reaktion. Dies schlossen Coleman *et al.* (1997) aus der Tatsache, dass die zelluläre Reaktionsgeschwindigkeit zwölfmal höher war als die berechnete nicht-enzymatische. Des Weiteren stellten die Autoren fest, dass gereinigte GST aus Mais bzw. GST in Zellextrakten (Mais, Karotte) *in-vitro* kaum GST-Aktivität gegenüber MCB zeigten. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass pflanzliche GST einer starken Produkthemmung unterliegen, die in der Zelle aber durch den Abtransport des GS-B-Konjugats in die Vakuole verhindert wird (Coleman *et al.*, 1997). Untersuchungen an Gerstenwurzeln deuteten auf eine hohe GST-Aktivität im meristematischen Gewebe während der *in-situ*-Markierung mit MCB hin (Schröder *et al.*, 2007). An zwei verschiedenen *Arabidopsis*-Wurzeln wurden hingegen unterschiedliche Beobachtungen gemacht: Während bei der einen Wurzel mit steigender Zelllänge keine Veränderung der GST-Aktivität gezeigt werden konnte, stieg die GST-Aktivität in der zweiten Wurzel (Fricker & Meyer, 2001). Die Autoren wiesen darauf hin, dass aufgrund dieser zwei Messungen mittels CLSM und anschließender mathematischer Modellierung noch keine genauen Vorhersagen getroffen werden können, sie jedoch einen Hinweis auf Variabilität geben, welche durch konventionelle biochemische Extraktion und Assay-Techniken verloren geht (Fricker & Meyer, 2001).

Obwohl die *in-situ*-Markierung mit MCB eine GST-katalysierte Reaktion und somit spezifisch für GSH ist, wurden auch Cys-B- und γ -EC-B-Konjugate gefunden (S. 58-61, Abb. 50 - Abb. 55). Während der *in-situ*-Markierung mit MCB wurde ein kontinuierlicher Anstieg der Cys-B-Konzentration bis auf $180 \text{ nmol g FM}^{-1}$ ($200 \mu\text{M MCB}$, Kontrolle und Cd-belastet) bzw. $113 \text{ nmol g FM}^{-1}$ ($500 \mu\text{M MCB}$, Kontrolle) beobachtet. Die nachweisbare Menge an γ -EC-B stieg wesentlich stärker bis auf $1900 \text{ nmol g FM}^{-1}$ ($200 \mu\text{M MCB}$, Kontrolle), $1500 \text{ nmol g FM}^{-1}$ ($200 \mu\text{M MCB}$, Cd-belastet) bzw. $3300 \text{ nmol g FM}^{-1}$ ($500 \mu\text{M MCB}$, Kontrolle) an. Bei Dünnschichtchromatographie-Analysen von Lysaten MCB-markierter

Karottenzellen konnte nur GS-B nachgewiesen werden (Coleman *et al.*, 1997). Allerdings waren diese Analysen schon nach nur einer Stunde Markierung abgeschlossen. Auch in Pappelblättern zeigten HPLC-Analysen die hohe Spezifität von MCB für GSH in Gegenwart von Natriumazid auf. In Abwesenheit von Natriumazid, welches den vakuolären Transport der GS-B-Konjugate hemmt, wurden jedoch kleinere Peaks für Cys-B, Cys-Gly-B und γ -EC-B gefunden (Hartmann *et al.*, 2003). In *Arabidopsis*-Blättern hingegen konnten sowohl mit als auch ohne Natriumazid zusätzlich Cys-B, Cys-Gly-B und γ -EC-B detektiert werden (Grzam *et al.*, 2006). Auch in *Arabidopsis*-Zellkulturen wurden nach HPLC-Trennung MCB-markierter Extrakte neben GS-B Peaks für Cys-B, Cys-Gly-B und γ -EC-B gefunden (Meyer *et al.*, 2001; Meyer & Fricker, 2002). Diese Befunde deuten auf einen vakuolären Abbau des GS-B-Konjugates hin, der vermutlich auch in *P. patens* stattfindet. Da die Abbauprodukte ursprünglich von dem gebildeten GS-B stammen, kann man das gebildete Gesamt-GS-B durch Aufsummierung aller Abbauprodukte (Cys-B, γ -EC-B) sowie dem gemessenen GS-B bestimmen (Anhang, S. 106, Abb. 62, Abb. 63). Die Auftragung zeigt, dass die Gesamt-GS-B-Konzentration über den gesamten Versuchszeitraum kontinuierlich ansteigt. Dies deutet darauf hin, dass *P. patens* unmittelbar auf die, durch MCB verursachte, Glutathionverarmung der Zellen reagiert. Unter 200 μ M MCB beträgt die *de-novo*-Synthese von GSH in *P. patens* ca. 90 nmol g FM⁻¹ h⁻¹ (Anhang, S. 106, Abb. 62). Die Geschwindigkeit für die GSH-Biosynthese in *Arabidopsis*-Zellkulturen, inkubiert mit 100 μ M MCB, war wesentlich schneller (534 \pm 84 nmol g FM⁻¹ h⁻¹ (Meyer & Fricker, 2002)). Unter 500 μ M MCB stieg die Geschwindigkeit der GS-B-Bildung in *P. patens* an, war jedoch nur bis zwölf Stunden nach MCB-Zugabe linear (Anhang, S. 106, Abb. 63). In *Arabidopsis*-Zellkulturen konnte unter 300 μ M MCB nicht mehr GS-B gebildet werden als unter 100 μ M (Meyer *et al.*, 2001). Vermutlich ist die MCB-Aufnahme in die Zellen in *P. patens* limitierter, so dass trotz der sehr hohen MCB-Konzentration die *de-novo*-Syntheserate von GSH zumindest bis zu zwölf Stunden linear war. Die Aufnahme von Xenobiotika, wie MCB, erfolgt in Pflanzen vermutlich unspezifisch. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass z. B. die extrazelluläre Hydrolyse von ATP durch Phosphatasen and ATPasen die Xenobiotika-Aufnahme (Cycloheximid) beeinflusst (Thomas *et al.*, 2000). Die Autoren vermuteten als Grund eine Veränderung des Membranpotenzials.

Um die *de-novo*-Synthese von GSH während der *in-situ*-Markierung mit MCB näher zu untersuchen, wurden Inhibierungsexperimente durchgeführt. Ein spezifischer Inhibitor der GSH-Biosynthese ist L-Buthionin-(S,R)-sulfoximin (BSO). BSO hemmt das Enzym γ -Glutamylcystein-Synthetase (γ -ECS), welches den ersten Schritt der GSH-Biosynthese katalysiert

(Griffith, 1982). Meyer und Fricker (2002) konnten mit Hilfe von BSO die *de-novo*-Synthese von GSH in grünen *Arabidopsis*-Zellkulturen während der MCB-Markierung vollständig hemmen. Gewöhnlich wird BSO in Konzentrationen bis 1 mM eingesetzt (z. B. Kocsy *et al.*, 2000; Lindberg *et al.*, 2007). In *P. patens* wurde in Vorexperimenten ohne MCB-Markierung erst bei höheren BSO-Konzentrationen eine Erniedrigung des intrazellulären GSH-Gehaltes und somit eine Inhibierung der GSH-Biosynthese beobachtet (Daten nicht gezeigt). Auch im aquatischen Moos *F. antipyretica* konnte keine Inhibierung der GSH-Biosynthese mit bis zu 1 mM BSO erzielt werden (Sutter, 2000; Bruns *et al.*, 2001). Die Autoren spekulierten, dass BSO nicht in die Zellen aufgenommen wurde. Somit kann für *P. patens* das Fazit gezogen werden, dass Fremdstoffe, wie BSO und MCB, vermutlich in geringeren Maßen aufgenommen werden als es in höheren Pflanzen der Fall ist.

Als Alternative wurden daher die Inhibierungsexperimente der *de-novo*-GSH-Biosynthese unter MCB durch Limitierung des externen Sulfatangebotes durchgeführt. Das Kultivierungsmedium für *P.-patens*-Protonemazellen enthält ca. 1 mM Sulfat. Durch Austausch aller Sulfatsalze der Hauptkomponenten des Mediums gegen die entsprechenden Chloridsalze wurde der Sulfatgehalt auf ca. 0,4 μ M reduziert. Vorexperimente zeigten, dass eine Reduktion des extrazellulären Sulfatgehaltes auf 0,4 μ M eine deutliche Reduktion des intrazellulären Sulfat- und Thiolgehaltes bewirkte (S. 42-44, Abb. 30 - Abb. 33). Nach zehn Tagen Sulfatmangel bzw. ausreichender Sulfatversorgung zeigten die Kulturen den gleichen Kurvenverlauf für die Bildung des GS-B-Konjugates, ähnlich einer Michaelis-Menten-Kinetik (S. 62, Abb. 56). Jedoch waren die Absolutwerte unter Sulfatmangel niedriger. Unter Sulfatversorgung konnte auch bei diesem Experiment, wie bereits beschrieben, nicht der gesamte GSH-*pool* mit MCB markiert werden. Bei den sulfat-defizienten Kulturen jedoch entsprach die extrahierbare GS-B-Konzentration der Gesamt-GSH-Konzentration unmarkierter Zellen nach 2,5 bis 9 Stunden (S. 62, Abb. 56). Nach 24 Stunden war die GS-B-Menge aber nur halb so groß wie die Gesamt-GSH-Konzentration, da es innerhalb dieser Zeit zu einer Verdopplung des GSH-Gehaltes der nicht-markierten sulfatverarmten Kultur kam. Das 24-stündige Experiment fand in der Dunkelheit statt, da MCB lichtempfindlich ist, und hat somit vermutlich zu einer Veränderung des GSH-Gehaltes der sulfat-defizienten Kulturen geführt. Unter Sulfatversorgung konnte solch eine Veränderung nicht beobachtet werden. Dunkelheit führte in Pappel- bzw. Spinatblättern zu einer Zunahme der γ -EC-Konzentration bei gleichzeitiger Abnahme des GSH-Gehaltes (Buwalda *et al.*, 1988; Noctor *et al.*, 1997). Als Ursache wurde das Fehlen von Glycin diskutiert, welches vorrangig aus der Photorespiration stammt, die im Licht stattfindet. Im Gegensatz dazu wurde in Mais, einer C₄-Pflanze, keine

Veränderung des GSH-Gehaltes in der Dunkelheit festgestellt, aber eine Erhöhung der γ -EC-Konzentration (Masi *et al.*, 2002).

Wie unter Sulfatversorgung wurden unter Sulfatmangel auch Cys-B- und γ -EC-B-Konjugate detektiert, was auch hier auf einen Abbau der GS-B-Konjugate hindeutet. Über zehn Tage sulfatverarmte *P. patens*-Kulturen zeigten während der *in-situ*-Markierung mit MCB eine Glutathionbiosyntheserate von ca. $60 \text{ nmol g FM}^{-1} \text{ h}^{-1}$ im Vergleich zur sulfatversorgten Kontrolle, die bei ca. $88 \text{ nmol g FM}^{-1} \text{ h}^{-1}$ lag (Anhang S. 107, Abb. 64). Somit konnte lediglich eine Reduktion, aber keine völlige Inhibierung der *de-novo*-Biosynthese erreicht werden. Wie bereits erwähnt, besitzt *P. patens* 7 Sulfattransporter, die den Gruppen 1 (*high-affinity*-Transporter, *PpSULTR1;1*, *PpSULTR1;2*, *PpSULTR1;3*, *PpSULTR1;4*), 4 (Sulfatefflux aus der Vakuole, *PpSULTR4;1*) und 5 (*PpSULTR5;1*, *PpSULTR5;2*) durch Stammbaumanalysen zugeordnet wurden. Jedoch kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Sulfattransporter niederer Pflanzen zu einem Cluster gehören und für *high-affinity*-Transporter kodieren (Kopriva *et al.*, 2007b). Somit ist es möglich, dass *P. patens* durch Sulfattransporter mit einer hohen Affinität für Sulfat, auch bei geringsten extrazellulären Sulfatkonzentrationen von $0,4 \mu\text{M}$, Sulfat aufnehmen und somit GSH neusynthetisieren kann. Des Weiteren könnten natürlich auch die Nutzung des, nach zehn Tagen Sulfatmangel, in der Zelle verbleibenden Sulfates (7 % im Vergleich zur sulfatversorgten Kontrolle) sowie eine Mobilisierung von Cystein aus Proteinabbaureaktionen, die *de-novo*-Synthese von GSH ermöglicht haben. Bei grünen *Arabidopsis*-Zellkulturen wurde unter Sulfatmangel während der *in-situ*-Markierung mit MCB eine völlige Inhibierung der *de-novo* GSH-Biosynthese erreicht (Meyer & Fricker, 2002). Es wurde geschlussfolgert, dass unter diesen Bedingungen keine intrazellulären Sulfatspeicher für die erforderliche Cysteinsynthese benutzt werden, sondern nur extrazelluläres Sulfat aus dem Medium.

Die Tatsache, dass neben GS-B- auch Cys-B- und γ -EC-B-Konjugate gefunden wurden, ist ein Hinweis auf einen Abbau der GS-B-Konjugate. Nach der Bildung der GS-B-Konjugate im Cytosol werden diese in die Vakuole transportiert. Dort findet der stufenweise Abbau statt, der mit der Abspaltung einer der beiden terminalen Aminosäuren, Glutamat (Glu) oder Glycin (Gly), beginnt. Für *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass der Abbau mit der Abspaltung des Glu-Restes beginnt. Dies ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und wird durch das Enzym γ -Glutamyltranspeptidase 4 (GGT 4) katalysiert (Grzam *et al.*, 2007; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007). Im zweiten Reaktionsschritt, für den noch kein Enzym identifiziert werden konnte, wird dann Gly abgespalten. Dies verläuft in *Arabidopsis* sehr schnell, so dass es zur

Akkumulation von Cys-B-Konjugaten kommt (Grzam *et al.*, 2006; Grzam *et al.*, 2007). Auch in Rettich wurde die Beteiligung vakuolärer GGT am Glutathion-Konjugat-Abbau beschrieben (Nakano *et al.*, 2006). In *P. patens* hingegen konnte eine rasche Akkumulation des γ -EC-Konjugates gezeigt werden, was auch durch Abbauxperimente nach Entfernung des MCB aus dem Medium untermauert wurde (S. 60-61, Abb. 53 - Abb. 55; S. 65, Abb. 60). Cys-Gly-B-Konjugate wurden nicht detektiert. Der GS-B-Abbau in *P. patens* erfolgt somit über einen anderen Weg, bei dem zuerst der Gly-Rest abgespalten wird. Auch in Gerstenblättern werden z. B. GS-Alachlor-Konjugate zunächst zu den entsprechenden γ -EC-Konjugaten abgebaut (Wolf *et al.*, 1996). Alachlor ist ein Herbizid der Chloracetanilid-Gruppe und in Deutschland nicht zugelassen. Als katalysierendes Enzym für den Abbau der GS-Konjugate in Gerstenblättern wurde eine vakuoläre Carboxypeptidase identifiziert (Wolf *et al.*, 1996). Der Abbau des GS-Fenclorim-Konjugates nach Behandlung von *Arabidopsis-thaliana*-Zellkulturen mit dem Herbizid-*safener* Fenclorim (4,6-Dichloro-2-Phenylpyrimidin), der in Reis die Toleranz gegenüber Chloracetanilid-Herbiziden erhöht, erfolgt ebenfalls über das γ -EC- zum Cys-Konjugat (Brazier-Hicks *et al.*, 2008).

Die Bildung der Cys-B-Konjugate in *P. patens* wird über die Zeit beschleunigt. Dies deutet darauf hin, dass das spaltende Enzym nur bei ausreichend hohen γ -EC-B-Konzentrationen arbeiten kann bzw. erst induziert werden muss. In der Literatur wird auch die Beteiligung von Phytochelatinsynthesen (PCS) am Glutathion-Konjugat-Abbau durch Carboxypeptidase-Aktivität beschrieben (Beck *et al.*, 2003; Blum *et al.*, 2007). Da es sich hierbei aber um ein cytosolisches Enzym handelt, wurde aufgrund des Transportes der GS-B-Konjugate in die Vakuole die Beteiligung am GS-B-Abbau in Abwesenheit von Schwermetallen in *A. thaliana* ausgeschlossen (Grzam *et al.*, 2006). Für *P. patens* ist dieser Befund ohne Bedeutung, da es im Genom kein PCS-Gen gibt (Kopriva *et al.*, 2007b).

Die *in-situ*-Markierung mit MCB wurde nicht nur unter Kontrollbedingungen, sondern auch unter Cd-Exposition in *P. patens* untersucht. Obwohl die Gesamt-GSH-Konzentration in *P. patens* unter 10 μ M Cd drastisch erhöht ist (S. 36, Abb. 20, Abb. 21; S. 55, Abb. 47; S. 57, Abb. 49), wurde während der *in-situ*-Markierung mit MCB weniger GSH markiert als in den Kontrollen ohne Cd. Sowohl in *A.-thaliana*-Zellkulturen als auch in *Medicago sativa* wurde eine Abnahme der Fluoreszenz während der *in-situ*-Markierung mit MCB unter Cd festgestellt (Meyer & Fricker, 2002; Ortega-Villasante *et al.*, 2005). Als Ursachen wurden a) die Bildung von Schwermetall-GSH-Komplexen und somit die Blockierung der freien SH-Gruppen, b) die PC-Synthese, die mit einer Reduktion des GSH-Gehaltes einhergeht und c)

die Inhibierung der GST durch Schwermetalle diskutiert. *In-vitro* Untersuchungen an *M. sativa* zeigten keine Veränderungen der GST-Aktivität unter Cd (Ortega-Villasante *et al.*, 2005). Die genaue Ursache für die Fluoreszenzabnahme konnte nicht geklärt werden.

Da in *P. patens* keine Phytochelatine unter Cd-Exposition gebildet werden, sondern der Organismus mit einer gesteigerten GSH-Biosynthese reagiert, kann die Abnahme der markierbaren GSH-Menge nur durch Bildung von Cd[GS]₂-Komplexen erklärt werden. Auch ein Einfluss der GST auf die *in-situ*-Markierung mit MCB unter Cd kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da die Gesamt-GST-Aktivität in *P. patens* unter Cd erhöht ist (Rother, 2007).

Mehrere Untersuchungen an Pflanzen und Moosen deuten auf eine Komplexierung von Cd durch Thiolgruppen und eine Ablagerung in der Vakuole hin. Vögeli-Lange und Wagner (1990) fanden nach Cd-Exposition von Tabakkeimlingen eine vakuoläre Lokalisierung des gesamten, in den Protoplasten gemessenen Cd sowie der Cd-bindenden Peptide (PC 3 und PC 4). EDX- und EELS-Analysen Cd-exponierter Wildtomatenzellen zeigten ebenfalls Ablagerungen von Cd in der Vakuole in Form von unlöslichen Präzipitaten, die Schwefel enthalten. Hierbei handelte es sich jedoch nicht um CdS-Kristalle oder CdSO₄, sondern wahrscheinlich um Cd-PC-Komplexe (Neumann *et al.*, 1994). Diese Techniken wurden, wie bereits beschrieben, auch zur Analyse Cd-exponierter Zellen des aquatischen Moores *F. antipyretica* eingesetzt (siehe S. 70) und gaben Hinweise auf eine Komplexierung des Cd im Cytosol mit SH-Gruppen (Sutter, 2000; Bruns *et al.*, 2001). Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Lebermooses *L. cruciata* zeigten ebenfalls eine Anreicherung von Cd gemeinsam mit Schwefel in der Vakuole (Carginale *et al.*, 2004). Die intrazelluläre Komplexierung von Cd mit SH-haltigen Verbindungen scheint sich nicht nur auf das Pflanzenreich zu beschränken. So wird auch für das Knöllchenbakterium *Rhizobium leguminosorum* eine intrazelluläre Komplexierung von Cd mit GSH beschrieben (Lima *et al.*, 2006). Jedoch erfolgten diese Untersuchungen durch klassische Extraktion mit einem basischen Puffer und anschließender *size-exclusion*-Chromatographie. Da Cd und GSH aber spontan im basischen Milieu einen Komplex bilden (Material und Methoden, Li *et al.*, 1997), sollten diese Ergebnisse kritisch betrachtet werden. Erst kürzlich wurde auch für *Escherichia coli* eine Beteiligung von GSH an der Cd-Toleranz nachgewiesen (Helbig *et al.*, 2008). GSH ist jedoch nicht nur in der Lage Cd zu komplexieren, sondern auch andere toxische Verbindungen, wie z. B. Arsenit. Im Gegensatz zu Cd-GSH-Komplexen sind diese jedoch im sauren pH-Bereich stabil, können sich aber ebenfalls durch eine einfache chemische Reaktion zwischen Arsenit und GSH bilden (Canovas *et al.*, 2004). Für den Schimmelpilz

Aspergillus sp. P37 konnte die Bildung von $\text{As}(\text{GS})_3$ -Komplexen und deren Ablagerung in der Vakuole gezeigt werden (Canovas *et al.*, 2004). Auch in Pflanzen erfolgt eine Komplexierung von Arsenit, wobei diese Komplexe vorwiegend PC enthalten, aber auch PC und GSH (Raab *et al.*, 2004; Raab *et al.*, 2005).

Der Transport der Schwermetall-GSH/PC-Komplexe erfolgt über ATP-abhängige Transporter. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die unter Cd-Exposition ebenfalls eine gesteigerte GSH-Biosynthese zeigt (Vido *et al.*, 2001), konnte ein Transporter (YCF 1), der den Transport von $\text{Cd}[\text{GS}]_2$ -Komplexen katalysiert, identifiziert werden (Li *et al.*, 1997). Dieser Transporter ist ein membrangebundenes Protein, das auch den MgATP-abhängigen Transport von Glutathion-Konjugaten, wie GS-B, in die Vakuole katalysiert (Li *et al.*, 1996). In *Schizosaccharomyces pombe* katalysiert HMT1, ebenfalls ein ABC-Transporter, den Transport von Cd-PC-Komplexen (Ortiz *et al.*, 1995). Auch in Pflanzen sind ABC-Transporter sehr verbreitet. *A. thaliana* besitzt z. B. 53 Gene für sogenannte *full-size*-Transporter (Martinoia *et al.*, 2002). Neben der Beteiligung an Entgiftungsprozessen wird pflanzlichen ABC-Transportern eine Rolle bei Wachstums- und Entwicklungsprozessen zugeschrieben. Cd-Exposition führt in *A. thaliana* zur Induktion von 17 verschiedenen putativen ABC-Genen, die zu acht verschiedenen Subfamilien gehören (Bovet *et al.*, 2005). Vor allem Vertreter der *multidrug resistance-associated proteins* (MRP) scheinen geeignete Kandidaten für den Transport von Cd-Komplexen in Pflanzen zu sein. Es wurde gezeigt, dass es in *A. thaliana* unter Cd-Exposition zur Induktion von *AtMRP3* kommt (Bovet *et al.*, 2003; Bovet *et al.*, 2005). In der Grünalge *C. reinhardtii* gibt es ein ähnliches Gen, *CrMRP2*, welches ebenfalls unter Cadmium stark induziert wird (Wang & Wu, 2006). Welche Transporter in *P. patens* am Transport der $\text{Cd}[\text{GS}]_2$ -Komplexe bzw. GS-B-Konjugate beteiligt sind, ist bisher noch nicht näher untersucht. Jedoch ist anzunehmen, dass sie auch zur Familie der ABC-Transporter gehören.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Schwermetalle sind allgegenwärtige Bestandteile aller Ökosysteme. In Bezug auf ihre Toxizität muss eine Unterscheidung in essenzielle und nicht-essenzielle Schwermetalle getroffen werden. Essenzielle Schwermetalle, wie z. B. Cu und Zn, werden für den pflanzlichen Stoffwechsel in bestimmten Konzentrationen benötigt. Im Gegensatz dazu verursachen nicht-essenzielle Schwermetalle, wie z. B. Cd und Hg, schon in geringen Konzentrationen Schäden in den Zellen. Im Laufe der Evolution haben Pflanzen verschiedenste Resistenzmechanismen gegenüber Schwermetallstress entwickelt. Neben Strategien, die dem Ausschluss der Schwermetalle aus der Zelle dienen (*avoidance*), haben Pflanzen Möglichkeiten, auch durch intrazelluläre stoffwechselphysiologische Anpassungen mit Schwermetallstress umzugehen (*tolerance*). In der vorliegenden Arbeit war vor allem die intrazelluläre Detoxifizierung von Interesse. Aufbauend auf bisherigen Ergebnissen der Arbeitsgruppe wurde der Modellorganismus *Physcomitrella patens* unter Cd-Exposition untersucht. Das terrestrische Moos reagiert unter Cd mit einer Induktion der Glutathion-Biosynthese, wobei jedoch keine Phytochelatine gebildet werden. Dies ist eine für Laubmoose typische Reaktion, die sie von höheren Pflanzen stark unterscheidet.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *P. patens* bei Exposition mit 10 μM Cd mit einem erhöhten Gehalt an Cystein, γ -Glutamylcystein und GSH reagiert (S. 92, Abb. 61). Gleichzeitig kam es zu einer Abnahme der Vitalität auf bis zu 50 % innerhalb von fünf Tagen. Somit wurden die Beobachtungen von Rother (2006; 2007) bestätigt. Die Analyse der extra- und intrazellulären Sulfatkonzentrationen zeigte lediglich am ersten (extrazellulär) und dritten Tag (intrazellulär) nur geringste Veränderungen unter Cd-Exposition. Untersuchungen zur Sulfataufnahme unter Cd-Stress mittels ^{35}S könnten hier genauere Einblicke in die Regulation der Sulfataufnahme unter Cd geben.

Stickstoff- und Sulfatassimilation sind bei der Synthese von Cystein eng über das Intermediat O-Acetylserin (OAS) verbunden. Um Veränderungen der Stickstoffassimilation unter Cd-Exposition zu untersuchen, wurden ^{15}N -Tracerexperimente durchgeführt. Der verringerte Einbau des Isotops in die Aminosäuren und Proteine hat gezeigt, dass Cd zu einer reduzierten Aufnahme von Nitrat führt. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode erstmals genutzt, um den Einbau von ^{15}N in das GSH zu verfolgen. Cd-Exposition führte in *P. patens* zu einem stärkeren Einbau von ^{15}N in die GSH-Fraktion. Somit wird die Aktivierung der GSH-Biosynthese unter Cd-Exposition nochmals belegt. Auskunft darüber,

ob der GSH-Anstieg aus einer Neusynthese oder einem Aminosäurerecycling stammt, können diese Untersuchungen jedoch nicht geben. ^{15}N -turnover-Experimente sollten hier zur Klärung beitragen.

Cystein- und somit auch GSH-Biosynthese setzen die reduktive Assimilation von Sulfat voraus. Untersuchungen zur Auswirkung von Sulfatmangel in *P. patens* zeigten, dass die Vitalität bei kurzfristigem Sulfatmangel nicht beeinflusst wird und längerfristiger Sulfatmangel eine Abnahme der Vitalität um ca. 20 % verursacht. Erwartungsgemäß kam es zu einem Absinken des intrazellulären Sulfat- und Thiolgehaltes (S. 92, Abb. 61). Auf Transkriptionsebene wurde im Rahmen dieser Arbeit eine stark erhöhte Genexpression der Serinacetyltransferase (SAT) festgestellt, während Rother *et al.* (2006) unter Cd-Exposition die Sulfitreduktase als am stärksten induziert identifizierte. Die transkriptionelle Regulation der reduktiven Sulfatassimilation erfolgt also in *P. patens* unter Sulfatmangel anders als unter Cd-Exposition. Analysen zur Enzymaktivität der SAT stehen noch aus.

Studien zur Cd-Exposition unter Sulfatmangel ergaben, dass es hinsichtlich der Vitalität keine Wechselwirkung zwischen Sulfatangebot und Cd-Exposition gab. Die Abnahme der Vitalität Cd-exponierter *P.-patens*-Kulturen unter Sulfatmangel zeigte im Vergleich zu ausreichender Sulfatversorgung keine Unterschiede. Trotz Sulfatmangel war das Moos unter Cd-Exposition in der Lage, Thiole verstärkt zu synthetisieren, erwartungsgemäß in geringerem Ausmaß (S. 92, Abb. 61).

In der vorliegenden Arbeit ist es weiterhin gelungen, die *in-situ*-Markierung von GSH mit Monochlorobimane (MCB) in *P. patens* zu etablieren. Es handelt sich hierbei um eine Phase-II-Reaktion, die im Cytosol stattfindet und durch Glutathion-S-Transferasen (GST) katalysiert wird. Die Gesamt-Enzymaktivität der GST erhöhte sich hierbei erwartungsgemäß.

Es wurde festgestellt, dass nicht der komplette GSH-pool der Zelle markiert werden konnte. Dies deutet zum einen auf einen größeren nicht-cytosolischen GSH-pool hin, möglicherweise in den Chloroplasten. Zum anderen kann es sich aber auch um oxidiertes Glutathion (GSSG) handeln, welches nicht durch MCB markiert werden kann. Untersuchungen von Rother (2007) deuten auf relativ hohe GSSG-Konzentrationen in *P. patens* hin. Da es sich beim GSH um einen Redoxpuffer in den Zellen handelt, sollte dieser Sachverhalt durch die Überexpression eines Redoxsensors (roGFP, Meyer *et al.*, 2007) weiter verifiziert werden.

Obwohl die Konjugationsreaktion mit MCB spezifisch für GSH ist, wurden auch Cys-Biman- und γ -EC-Biman-Konjugate detektiert. Es konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um Abbauprodukte des GS-B-Konjugats handelt (Abb. 61). Somit verläuft der initiale Schritt des Glutathion-Konjugat-Abbaus über eine vermutlich Carboxypeptidase-katalysierte Reaktion.

Weiterhin konnte während der *in-situ*-Markierung mit MCB eine *de-novo*-Synthese von GSH beobachtet werden, welche durch Reduktion des extrazellulären Sulfatangebotes gemindert, aber nicht vollständig inhibiert werden konnte.

Trotz der deutlichen Erhöhung des GSH-Gehaltes in Cd-exponierten Mooszellen wurde in diesen Kulturen weniger GSH mit MCB markiert als in Kontrollzellen. Dies könnte nicht nur ein Effekt der Kompartimentierung von verschiedenen GSH-pools sein, sondern auch ein Hinweis auf eine Komplexierung von Cd mit GSH in Form von $\text{Cd}[\text{GS}]_2$ -Komplexen geben. In diesen Komplexen ist die SH-Gruppe des GSH nicht zugänglich für MCB. Weitere Studien, ob es möglicherweise eine Induktion potenzieller Transporter gibt, die solche Komplexe, aber auch GSH-Konjugate transportieren, sollten Gegenstand zukünftiger Untersuchungen zur Cd-Detoxifizierung in *P. patens* sein.

Mit den vorliegenden Studien konnte eine wesentliche Bedeutung des GSH für die Cd-Detoxifizierung deutlich gemacht werden. Die Untersuchungen geben einen weiteren Hinweis auf die Existenz möglicher Cadmium-GSH-Komplexe wie sie auch für das aquatische Moos *Fontinalis antipyretica* postuliert wurden.

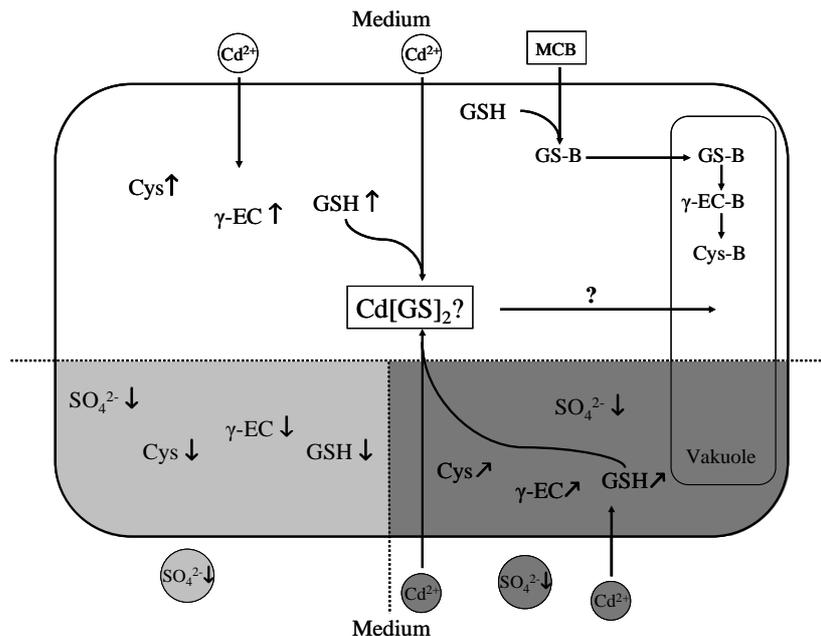


Abb. 61 Zusammenfassende Darstellung der zellulären Reaktionen in *P. patens* auf Cd-Exposition (○), Sulfatmangel (●), Cd-Exposition unter Sulfatmangelbedingungen (●) sowie *in-situ*-Markierung mit MCB

6. Literaturverzeichnis

- AL-ASHEH, S. & DUVNJAK, Z. (1997). Adsorption of metal ions by moss. — Adv. Environ. Res. 1, 194-212.
- ALLOWAY, B. J. (1999). Herkunft von Schwermetallen in Böden. — In: Schwermetalle in Böden: Analytik, Konzentration, Wechselwirkungen (Alloway, B. J., Hrsg.), Berlin, Heidelberg, New York.
- APPENROTH, K.-J., LUTHER, A., JETSCHKE, G. & GABRYS, H. (2008). Modification of chromate toxicity by sulphate in duckweeds (*Lemnaceae*). — Aquat. Toxicol. 89, 167-171.
- ASTOLFI, S., ZUCHI, S., PASSERA, C. & CESCO, S. (2003). Does the sulfur assimilation pathway play a role in the response to Fe deficiency in maize (*Zea mays* L.) plants? — J. Plant Nutri. 26, 2111-2121.
- ASTOLFI, S., ZUCHI, S. & PASSERA, C. (2004a). Role of sulphur availability on cadmium-induced changes of nitrogen and sulphur metabolism in maize (*Zea mays* L.) leaves. — J. Plant Physiol. 161, 795-802.
- ASTOLFI, S., ZUCHI, S. & PASSERA, C. (2004b). Effects of cadmium on the metabolic activity of *Avena sativa* plants grown in soil or hydroponic culture. — Biol. Plant. 48, 413-418.
- BABULA, P., RYANT, P., ADAM, V., ZEHNALÉK, J., HAVEL, L. & KIZEK, R. (2008). The role of sulphur in cadmium(II) ions detoxification demonstrated in in vitro model: *Dionaea muscipula* Ell. — Environ. Chem. Lett., online first.
- BASANTANI, M. & SRIVASTAVA, A. (2007). Plant glutathione transferases - a decade falls short. — Can. J. Bot. 85, 443-456.
- BECK, A., LENDZIAN, K., OVEN, M., CHRISTMANN, A., & GRILL, E. (2003). Phytochelatin synthase catalyzes key step in turnover of glutathione conjugates. — Phytochemistry 62, 423-431.
- BERLICH, M., MENGE, S., BRUNS, I., SCHMIDT, J., SCHNEIDER, B. & KRAUSS, G.-J. (2002). Coumarins give misleading absorbance with Ellman's reagent suggestive of thiol conjugates. — The Analyst 127, 333-336.
- BLEUEL, C. (2004). Vergleichende Untersuchungen zur Regulation der Sulfat-Assimilation unter Cadmium-Stress in *Fontinalis antipyretica* und *Physcomitrella patens*. — Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- 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. — Sci. Total Environ. 345, 13-21.
- BLUM, R., BECK, A., KORTE, A., STENGEL, A., LETZEL, T., LENDZIAN, K. & GRILL, E. (2007). Function of phytochelatin synthase in catabolism of glutathione-conjugates. — Plant J. 49, 740-749.
- BOGDANOVA, N. & HELL, R. (1997). Cysteine synthesis in plants: Protein-protein interactions of serine acetyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. — Plant J. 11, 251-262.
- BOUSSAMA, N., OUARITI, O. & GHORBAL, M. H. (1999a). Changes in growth and nitrogen assimilation in barley seedlings under cadmium stress. — J. Plant Nutri. 22, 731-752.
- BOUSSAMA, N., OUARITI, O., SUZUKI, A. & GHORBAL, M. H. (1999b). Cd-stress on nitrogen assimilation. — J. Plant Physiol. 155, 310-317.
- BOVET, L., EGGMANN, T., MEYLAN-BETTEX, M., POLIER, J., KAMMER, P., MARIN, E., FELLER, U. & MARTINOIA, E. (2003). Transcript levels of *AtMRPs* after cadmium treatment: Induction of *AtMRP3*. — Plant, Cell and Environ. 26, 371-381.

- BOVET, L., FELLER, U. & MARTINOIA, E. (2005). Possible involvement of plant ABC transporters in cadmium detoxification: a cDNA sub-microarray approach. — *Environ. Int.* 31, 263-267.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. — *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- BRAZIER-HICKS, M., EVANS, K. M., CUNNINGHAM, O. D., HODGSON, D. R., STEEL, P. G. & EDWARDS, R. (2008). Catabolism of glutathione conjugates in *Arabidopsis thaliana*. Role in metabolic reactivation of the herbicide safener fenclorim. — *J. Biol. Chem.* 283, 21102-21112.
- 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.
- BRUNOLD, C., RÜEGSEGG, A. & BRÄNDLE, R., Hrsg. (1996). Stress bei Pflanzen: Ökologie, Physiologie, Biochemie, Molekularbiologie. — UTB Verlag für Wissenschaft, Bern, Stuttgart, Wien.
- BRUNS, I., FRIESE, K., MARKERT, B. & KRAUSS, G.-J. (1997). The use of *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. as a bioindicator for heavy metals. 2. Heavy metal accumulation and physiological reaction of *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. in active biomonitoring in the River Elbe. — *Sci. Total Environ.* 204, 161-176.
- BRUNS, I. (1998). Induktion thiolhaltiger Peptide im Wassermoos *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. — *J. Plant Physiol.* 158, 79-89.
- BUCHNER, P., TAKAHASHI, H. & HAWKESFORD, M. J. (2004). Plant sulphate transporters: coordination of uptake, intracellular and long-distance transport. — *J. Exp. Bot.* 55, 1765-1773.
- BURKE, J. J., HOLLOWAY, P. & DALLING, M. J. (1986). The effect of sulphur deficiency on the organisation and photosynthetic capability of wheat leaves. — *J. Plant Physiol.* 125, 371-375.
- BURZYNSKI, M. & KLOBUS, G. (2004). Changes of photosynthetic parameters in cucumber leaves under Cu, Cd, and Pb stress. — *Photosynthetica* 42, 505-510.
- BUWALDA, F., DE KOK, L. J., STULEN, I. & KUIPER, P. J. C. (1988). Cysteine, γ -glutamyl-cysteine and glutathione contents of spinach leaves as affected by darkness and application of excess sulfur. — *Physiol. Plant.* 74, 663-668.
- CAIRNS, N. G., PASTERNAK, M., WACHTER, A., COBBETT, C. S. & MEYER, A. J. (2006). Maturation of *Arabidopsis* seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. — *Plant Physiol.* 141, 446-455.
- CANOVAS, D., VOOIJS, R., SCHAT, H. & DE LORENZO, V. (2004). The role of thiol species in the hypertolerance of *Aspergillus* sp. P37 to arsenic. — *J. Biol. Chem.* 279, 51234-51240.
- CARGINALE, V., SORBO, S., CAPASSO, C., TRINCHELLA, F., CAFIERO, G. & BASILE, A. (2004). Accumulation, localisation, and toxic effects of cadmium in the liverwort *Lunularia cruciata*. — *Protoplasma* 223, 53-61.
- CENCI, R. M. (2001). The use of aquatic moss (*Fontinalis antipyretica*) as monitor of contamination in standing and running waters: limits and advantages. — *J. Limnol.* 60, 53-61.
- CLEMENS, S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. — *Planta* 212, 475-486.

- CLEMENS, S. (2006a). Evolution and function of phytochelatin synthases. — *J. Plant Physiol.* 163, 319-332.
- CLEMENS, S. (2006b). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. — *Biochimie* 88, 1707-1719.
- COBBETT, C. & GOLDSBROUGH, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. — *Ann. Rev. Plant Biol.* 53, 159-182.
- COLEMAN, J. O. D., BLAKE-KALFF, M. M. A. & DAVIES, T. G. E. (1997). Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation: A fluorescent assay using monochlorobimane. — *Trends Plant Sci.* 2, 144-151.
- COVE, D., BEZANILLA, M., HARRIES, P. & QUATRANO, R. (2006). Mosses as Model Systems for the Study of Metabolism and Development. — *Ann. Rev. Plant Biol.* 57, 497-520.
- DALCORSO, G., FARINATI, S., MAISTRI, S. & FURINI, A. (2008). How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. — *J. Integr. Plant Biol.* 50, 1268-1280.
- DANIEL-VEDELE, F., FILLEUR, S. & CABOCHE, M. (1998). Nitrate transport: a key step in nitrate assimilation. — *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 235-239.
- DECKER, E. L. & RESKI, R. (2004). The moss bioreactor. — *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 166-170.
- DECKER, E. L. & RESKI, R. (2008). Current achievements in the production of complex biopharmaceuticals with moss bioreactors. — *Bioprocess Biosyst. Eng.* 31, 3-9.
- DIXON, D. P., CUMMINS, L., COLE, D. J. & EDWARDS, R. (1998). Glutathione-mediated detoxification systems in plants. — *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 258-266.
- DJEBALI, W., ZARROUK, M., BROUQUISSE, R., EL KAHOU, S., LIMAM, F., GHORBEL, M. H. & CHAIBI, W. (2005). Ultrastructure and lipid alterations induced by cadmium in tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplast membranes. — *Plant Biol. (Stuttg.)* 7, 358-368.
- DROUX, M., RUFFET, M. L., DOUCE, R. & JOB, D. (1998). Interactions between serine acetyltransferase and O-acetylserine (thiol) lyase in higher plants - structural and kinetic properties of the free and bound enzymes. — *Eur. J. Biochem.* 255, 235-245.
- DUCRUIX, C., JUNOT, C., FIEVET, J. B., VILLIERS, F., EZAN, E. & BOURGUIGNON, J. (2006). New insights into the regulation of phytochelatin biosynthesis in *A. thaliana* cells from metabolite profiling analyses. — *Biochimie* 88, 1733-1742.
- DUFFUS, J. H. (2002). "Heavy metals" - A meaningless term? (IUPAC technical report). — *Pure Appl. Chem.* 74, 793-807.
- ELLMAN, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. — *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.
- ERNST, W. H. O., KRAUSS, G.-J., VERKLEIJ, J. A. C. & WESENBERG, D. (2008). Interaction of heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. — *Plant, Cell and Environ.* 31, 123-143.
- FAHEY, R. C. & NEWTON, G. L. (1987). Determination of low-molecular-weight thiols using monobromobimane fluorescent labeling and high-performance liquid chromatography. — *Methods Enzymol.* 143, 85-96.
- 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. — *Biochi. Biophys. Acta* 1706, 158-164.
- FONTES, R. L. F. & COX, F. R. (1995). Effects of sulfur supply on soybean plants exposed to zinc toxicity. — *J. Plant Nutri.* 18, 1893 - 1906.
- FRAHM, J.-P. (2001). *Biologie der Moose*. — Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- FREY, W., FRAHM, J.-P., FISCHER, E. & LOBIN, W. (1995). Moos- und Farnpflanzen. — In: *Kleine Kryptogamenflora* (Gams, H., Hrsg.). Fischer-Verlag, Stuttgart.
- FRICKER, M. D., MAY, M., MEYER, A. J., SHEARD, N. & WHITE, N. S. (2000). Measurement of glutathione levels in intact roots of *Arabidopsis*. — *J. Microsc.* 198, 162-173.

- FRICKER, M. D. & MEYER, A. J. (2001). Confocal imaging of metabolism in vivo: pitfalls and possibilities. — *J. Exp. Bot.* 52, 631-640.
- GEKELER, W., GRILL, E., WINNACKER, E. L. & ZENK, M. H. (1989). Survey of the plant kingdom for the ability to bind heavy-metals through phytochelatins. — *Z. Naturforsch.* 44, 361-369.
- GILBERT, S. M., CLARKSON, D. T., CAMBRIDGE, M., LAMBERS, H. & HAWKESFORD, M. J. (1997). SO_4^{2-} deprivation has an early effect on the content of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and photosynthesis in young leaves of wheat. — *Plant Physiol.* 115, 1231-1239.
- GOYER, A., COLLAKOVA, E., SHACHAR-HILL, Y. & HANSON, A. D. (2007). Functional characterization of a methionine γ -lyase in *Arabidopsis* and its implication in an alternative to the reverse trans-sulfuration pathway. — *Plant Cell Physiol.* 48, 232-242.
- GRIFFITH, O. (1982). Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. — *J. Biol. Chem.* 257, 13704-13712.
- GRILL, D., TAUSZ, M. & DE KOK, L. J., Hrsg. (2002). Significance of glutathione in plant adaptation to the environment. — Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- GRILL, E., WINNACKER, E. L. & ZENK, M. H. (1985). Phytochelatins: The principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. — *Science* 230, 674-676.
- GRILL, E., LOEFFLER, S., WINNACKER, E. L. & ZENK, M. H. (1989). Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific (γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6838-6842.
- GRILL, E., WINNACKER, E. L. & ZENK, M. H. (1991). Phytochelatins. — *Methods Enzymol.* 205, 333-341.
- GRZAM, A., TENNSTEDT, P., CLEMENS, S., HELL, R. & MEYER, A. J. (2006). Vacuolar sequestration of glutathione S-conjugates outcompetes a possible degradation of the glutathione moiety by phytochelatin synthase. — *FEBS Lett.* 580, 6384-6390.
- GRZAM, A., MARTIN, M. N., HELL, R. & MEYER, A. J. (2007). γ -Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in *Arabidopsis*. — *FEBS Lett.* 581, 3131-3138.
- GUTIERREZ-ALCALA, G., GOTOR, C., MEYER, A. J., FRICKER, M., VEGA, J. M. & ROMERO, L. C. (2000). Glutathione biosynthesis in *Arabidopsis trichome* cells. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 11108-11113.
- HAAS, F. H., HEEG, C., QUEIROZ, R., BAUER, A., WIRTZ, M. & HELL, R. (2008). Mitochondrial serine acetyltransferase functions as a pacemaker of cysteine synthesis in plant cells. — *Plant Physiol.* 148, 1055-1067.
- HABIG, W. H., PABST, M. J. & JAKOBY, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. — *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- HAFNER, C., JUNG, K. & SCHÜÜRMAN, G. (2002). Effects of trichloroacetic acid on the nitrogen metabolism of *Pinus sylvestris* - a $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ tracer study. — *Chemosphere* 46, 259-266.
- HALL, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. — *J. Exp. Bot.* 53, 1-11.
- HARTMANN, T. N., FRICKER, M. D., RENNENBERG, H. & MEYER, A. J. (2003). Cell-specific measurement of cytosolic glutathione in poplar leaves. — *Plant, Cell and Environ.* 26, 965-975.

- HAWKESFORD, M. J. (2000). Plant responses to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S-utilization efficiency. — J. Exp. Bot. 51, 131-138.
- HEEG, C., KRUSE, C., JOST, R., GUTENSOHN, M., RUPPERT, T., WIRTZ, M. & HELL, R. (2008). Analysis of the Arabidopsis O-Acetylserine(thiol)lyase Gene Family Demonstrates Compartment-Specific Differences in the Regulation of Cysteine Synthesis. — Plant Cell 20, 168-185.
- HELBIG, K., BLEUEL, C., KRAUSS, G. J. & NIES, D. H. (2008). Glutathione and transition-metal homeostasis in *Escherichia coli*. — J. Bacteriol. 190, 5431-5438.
- HELDT, H. W. (1996). Pflanzenbiochemie. — Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- 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. & WIRTZ, M. (2008). Metabolism of cysteine in plants and phototrophic bacteria. — In: Advances in Photosynthesis and Respiration-Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms (Hell, R., Dahl, C., Knaff, D. B. & Leustek, T., Hrsg.). Springer, Dordrecht, S. 59-91.
- HESSE, H., NIKIFOROVA, V., GAKIERE, B. & HOEFGEN, R. (2004). Molecular analysis and control of cysteine biosynthesis: Integration of nitrogen and sulphur metabolism. — J. Exp. Bot. 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. — Plant J. 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., *et al.* (2005). Elucidation of gene-to-gene and metabolite-to-gene networks in *Arabidopsis* by integration of metabolomics and transcriptomics. — J. Biol. Chem. 280, 25590-25595.
- HOEFGEN, R. & NIKIFOROVA, V. J. (2008). Metabolomics integrated with transcriptomics: assessing systems response to sulfur-deficiency stress. — Physiol. Plant. 132, 190-198.
- HOFMANN, D., JUNG, K., BENDER, J., GEHRE, M. & SCHÜÜRMAN, G. (1997). Using natural isotope variations of nitrogen in plants as an early indicator of air pollution stress. — J. Mass Spectrom. 32, 855-863.
- 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. — Biochem. Biophys. Res. Commun. 333, 150-155.
- JUNG, K., RUDEL, M., FAUST, H. & GABERT, A. (1979). Proteinmikrobestimmung an einem Protein-Träger-Komplex mit Hilfe der Isotopenverdünnungsanalyse von Stickstoff. — Z. Chem. 19, 70-71.
- JUNG, K. & JUNGHANS, P. (1981). Untersuchungen des pflanzlichen Proteinturnovers unter Stoffeinfluß mit Hilfe von ¹⁵N-Tracerexperimenten und ihre Interpretation auf der Grundlage von Kompartimentmodellen. — Biol. Zbl. 100, 217-226.
- JUNG, K., KALETTA, K., SEGNER, H. & SCHÜÜRMAN, G. (1999). ¹⁵N Metabolic test for the determination of phytotoxic effects of chemicals and contaminated environmental samples. — Environ. Sci. & Pollut. Res. 6, 72-76.
- KASZYCKI, P., GABRYS, H., APPENROTH, K.-J., JAGLARZ, A., SEDZIWIY, S., WALCZAK, T. & KOLOCZEK, H. (2005). Exogenously applied sulphate as a tool to investigate transport and reduction of chromate in the duckweed *Spirodela polyrhiza*. — Plant, Cell and Environ. 28, 260-268.

- KAWASHIMA, C. G., BERKOWITZ, O., HELL, R., NOJI, M. & SAITO, K. (2005). Characterization and expression analysis of a serine acetyltransferase gene family involved in a key step of the sulfur assimilation pathway in *Arabidopsis*. — *Plant Physiol.* 137, 220-230.
- KELTJENS, W. G. & VAN BEUSICHEM, M. L. (1998a). Phytochelatins as biomarkers for heavy metal stress in maize (*Zea mays* L) and wheat (*Triticum aestivum* L): Combined effects of copper and cadmium. — *Plant Soil* 203, 119-126.
- KELTJENS, W. G. & VAN BEUSICHEM, M. L. (1998b). Phytochelatins as biomarkers for heavy metal toxicity in maize: Single metal effects of copper and cadmium. — *J. Plant Nutri.* 21, 635-648.
- KLAPHECK, S. (1988). Homogluthathione: Isolation, quantification and occurrence in legumes. — *Physiol. Plant.* 74, 727-732.
- KLAPHECK, S., FLIEGNER, W. & ZIMMER, I. (1994). Hydroxymethyl-phytochelatins [(γ -glutamylcysteine)_n-serine] are metal-induced peptides of the *Poaceae*. — *Plant Physiol.* 104, 1325-1332.
- KNIGHT, C. D., COVE, D. J., BOYD, P. J. & ASHTON, N. W. (1988). The isolation of biochemical and developmental mutants in *Physcomitrella patens*. — *Meth. Bryol.*, Mainz, Germany, S. 47-58.
- KOCSY, G., BALLMOOS, P. V., SUTER, M., RÜEGSEGG, A., GALLI, U., SZALAI, G., GALIBA, G. & BRUNOLD, C. (2000). Inhibition of glutathione synthesis reduces chilling tolerance in maize. — *Planta* 211, 528-536.
- KOPRIVA, S. & RENNENBERG, H. (2004). Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: Interaction with N and C metabolism. — *J. Exp. Bot.* 55, 1831-1842.
- KOPRIVA, S. (2006). Regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis* and beyond. — *Ann. Bot.* 97, 479-495.
- KOPRIVA, S., FRITZEMEIER, K., WIEDEMANN, G. & RESKI, R. (2007a). The putative moss 3' phosphoadenosine 5' phosphosulfate reductase is a novel form of adenosine 5' phosphosulfate reductase without an iron sulfur cluster. — *J. Biol. Chem.* 282, 22930-22938.
- KOPRIVA, S., WIEDEMANN, G. & RESKI, R. (2007b). Sulfate assimilation in basal land plants - What does genomic sequencing tell us? — *Plant Biol.*, 556-564.
- KOPRIVOVA, A., SUTER, M., DEN CAMP, R. O., BRUNOLD, C. & KOPRIVA, S. (2000). Regulation of sulfate assimilation by nitrogen in *Arabidopsis*. — *Plant Physiol.* 122, 737-746.
- KOPRIVOVA, 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. — *J. Biol. Chem.* 277, 32195-32201.
- KRÄMER, U. & CLEMENS, S. (2006). Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants. — In: *Topics in Current Genetics*, S. 216-271.
- KÜPPER, H., KÜPPER, F. & SPILLER, M. (1996). Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. — *J. Exp. Bot.* 47, 259-266.
- KÜPPER, H., KÜPPER, F. & SPILLER, M. (1998). In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. — *Photosyn. Res.* 58, 123-133.
- LANE, T. W. & MOREL, F. M. M. (2000). A biological function for cadmium in marine diatoms. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 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.
- LANQUAR, V., KUHN, L., LELIEVRE, F., KHAFIF, M., ESPAGNE, C., BRULEY, C., BARBIER-BRYGOO, H., GARIN, J. & THOMINE, S. (2007). ¹⁵N-metabolic labeling for comparative plasma membrane proteomics in *Arabidopsis* cells. — *Proteomics* 7, 750-754.

- LAPPARTIENT, A. G. & TOURAINE, 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 Physiol.* 111, 147-157.
- LEE, T. M., LAI, H. Y. & CHEN, Z. S. (2004). Effect of chemical amendments on the concentration of cadmium and lead in long-term contaminated soils. — *Chemosphere* 57, 1459-1471.
- LENCIONI, L., RANIERI, A., FERGOLA, S. & F., S. G. (1997). Photosynthesis and metabolic changes in leaves of repeseed grown under long-term sulfate deprivation. — *J. Plant Nutri.* 20, 405-415.
- LEUSTEK, T. (1996). Molecular genetics of sulfate assimilation in plants. — *Physiol. Plant.* 97, 411-419.
- LEUSTEK, T. & SAITO, K. (1999). Sulfate transport and assimilation in plants. — *Plant Physiol.* 120, 637-644.
- LEUSTEK, T., MARTIN, M. N., BICK, J.-A. & DAVIES, J. P. (2000). Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. — *Ann. Rev. Plant Biol.* 51, 141-165.
- LEUSTEK, T. (2002). Sulfate metabolism. — In: *The Arabidopsis Book* (Somerville, C. R. & Meyerowitz, E. M., Hrsg.). American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, S. 1-16.
- LEWANDOWSKA, M. & SIRKO, A. (2008). Recent advances in understanding plant response to sulfur-deficiency stress. — *Acta Biochim. Pol.* 55, 457-471.
- LI, Z.-S., SZCZYPKA, M., LU, Y.-P., THIELE, D. J. & REA, P. A. (1996). The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. — *J. Biol. Chem.* 271, 6509-6517.
- 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. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 42-47.
- LIMA, A. I. G., CORTICEIRO, S. C. & FIGUEIRA, E. M. D. P. (2006). Glutathione-mediated cadmium sequestration in *Rhizobium leguminosarum*. — *Enzyme Microb. Technol.* 39, 763-769.
- LINDBERG, S., LANDBERG, T. & GREGER, M. (2007). Cadmium uptake and interaction with phytochelatin in wheat protoplasts. — *Plant Physiol. Biochem.* 45, 47-53.
- LINDBLOM, S. D., ABDEL-GHANY, S., HANSON, B. R., HWANG, S. B., TERRY, N. & PILON-SMITS, E. A. H. (2006). Constitutive expression of a high-affinity sulfate transporter in Indian mustard affects metal tolerance and accumulation. — *J. Environ. Qual.* 35, 726-733.
- LOEFFLER, S., HOCHBERGER, A., GRILL, E., WINNACKER, E.-L. & ZENK, M. H. (1989). Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of heavy metals by the reaction product. — *FEBS Lett.* 258, 42-46.
- LUNDE, C., ZYGADLO, A., SIMONSEN, H. T., NIELSEN, P. L., BLENNOW, A. & HALDRUP, A. (2008). Sulfur starvation in rice: the effect on photosynthesis, carbohydrate metabolism, and oxidative stress protective pathways. — *Physiol. Plant.* 134, 508-521.
- MACFARLANE, G. R. & BURCHETT, M. D. (2001). Photosynthetic Pigments and Peroxidase Activity as Indicators of Heavy Metal Stress in the Grey Mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. — *Marine Poll. Bull.* 42, 233-240.
- MAIER, E. A., MATTHEWS, R. D., MCDOWELL, J. A., WALDEN, R. R. & AHNER, B. A. (2003). Environmental cadmium levels increase phytochelatin and glutathione in lettuce grown in a chelator-buffered nutrient solution. — *J. Environ. Qual.* 32, 1356-1364.

- MARTINOIA, E., KLEIN, M., GEISLER, M., BOVET, L., FORESTIER, C., KOLUKISA OGLU, U., MULLER-ROBER, B. & SCHULZ, B. (2002). Multifunctionality of plant ABC transporters - more than just detoxifiers. — *Planta* 214, 345-355.
- 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. — *Wat. Res.* 38, 693-699.
- MASI, A., GHISI, R. & FERRETTI, M. (2002). Measuring low-molecular-weight thiols by detecting the fluorescence of their SBD-derivatives: application to studies of diurnal and UV-B induced changes in *Zea mays* L. — *J. Plant Physiol.* 159, 499-507.
- MCGRATH, S. P. & ZHAO, F. J. (1995). A risk assessment of sulphur deficiency in cereals using soil and atmospheric deposition data. — *Soil Use and Management* 11, 110-114.
- 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. — *Physiol. Plant.* 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 Microbiol. Rev.* 29, 653-671.
- MENDOZA-COZATL, D. G., RODRIGUEZ-ZAVALA, J. S., RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S., MENDOZA-HERNANDEZ, G., BRIONES-GALLARDO, R. & MORENO-SANCHEZ, R. (2006). Phytochelatin-cadmium-sulfide high-molecular-mass complexes of *Euglena gracilis*. — *FEBS Journal* 273, 5703-5713.
- MENDOZA-COZATL, D. G., BUTKO, E., SPRINGER, F., TORPEY, J. W., KOMIVES, E. A., KEHR, J. & SCHROEDER, J. I. (2008). Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. — *Plant J.* 54, 249-259.
- MEUWLY, P., THIBAUT, P. & RAUSER, W. E. (1993). γ -Glutamylcysteinylglutamic acid - A new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium. — *FEBS Lett.* 336, 472-476.
- MEYER, A. J. & FRICKER, M. D. (2000). Direct measurement of glutathione in epidermal cells of intact *Arabidopsis* roots by two-photon laser scanning microscopy. — *J. Microsc.* 198, 174-181.
- MEYER, A. J., MAY, M. J. & FRICKER, M. (2001). Quantitative *in vivo* measurement of glutathione in *Arabidopsis* cells. — *Plant J.* 27, 67-78.
- MEYER, A. J. & FRICKER, M. D. (2002). Control of demand-driven biosynthesis of glutathione in green *Arabidopsis* suspension culture cells. — *Plant Physiol.* 130, 1927-1937.
- MEYER, A. J. & HELL, R. (2005). Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. — *Photosyn. Res.* 86, 435-457.
- MEYER, A. J., BRACH, T., MARTY, L., KREYE, S., ROUHIER, N., JACQUOT, J. P. & HELL, R. (2007). Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. — *Plant J.* 52, 973-986.
- MÖLLER, A.-M. (2007). Etablierung von *Marchantia polymorpha* L. als Modellorganismus für die Schwermetallstressantwort in Moosen. — Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität.
- MULLINEAUX, P. M. & RAUSCH, T. (2005). Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. — *Photosyn. Res.* 86, 459-474.
- NAGEL, K., ADELMEIER, U. & VOIGT, J. (1996). Subcellular distribution of cadmium in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. — *J. Plant Physiol.* 149, 86-90.
- NAKANO, Y., OKAWA, S., PRIETO, R. & SEKIYA, J. (2006). Subcellular localization and possible functions of γ -glutamyltransferase in the radish (*Raphanus sativus* L.) plant. — *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 1790-1793.

- NEUMANN, D., LICHTENBERGER, O., GÜNTHER, D., TSCHIERSCHE, K. & NOVER, L. (1994). Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. — *Planta* 194, 360-367.
- NIKIFOROVA, V., FREITAG, J., KEMPA, S., ADAMIK, M., HESSE, H. & HOEFGEN, R. (2003). Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. — *Plant J.* 33, 633-650.
- NIKIFOROVA, V. J., BIELECKA, M., GAKIERE, B., KRUEGER, S., RINDER, J., KEMPA, S., MORCUENDE, R., SCHEIBLE, W. R., HESSE, H. & HOEFGEN, R. (2006). Effect of sulfur availability on the integrity of amino acid biosynthesis in plants. — *Amino Acids* 30, 173-183.
- NOCITO, F. F., PIROVANO, L., COCUCCHI, M. & SACCHI, G. A. (2002). Cadmium-induced sulfate uptake in maize roots. — *Plant Physiol.* 129, 1872-1879.
- NOCITO, F. F., LANCILLI, C., CREMA, B., FOURCROY, P., DAVIDIAN, J. C. & SACCHI, G. A. (2006). Heavy metal stress and sulfate uptake in maize roots. — *Plant Physiol.* 141, 1138-1148.
- 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. & FOYER, C. H. (1998). Ascorbat and glutathione: Keeping active oxygen under control. — *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249-279.
- NOCTOR, G., GOMEZ, L., VANACKER, H. & FOYER, C. H. (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. — *J. Exp. Bot.* 53, 1283-1304.
- NOJI, M., INOUE, K., KIMURA, N., GOUDA, A. & SAITO, K. (1998). Isoform-dependent differences in feedback regulation and subcellular localization of serine acetyltransferase involved in cysteine biosynthesis from *Arabidopsis thaliana*. — *J. Biol. Chem.* 273, 32739-32745.
- NUSSBAUM, S., SCHMUTZ, D. & BRUNOLD, C. (1988). Regulation of assimilatory sulfate reduction by cadmium in *Zea mays* L. — *Plant Physiol.* 88, 1407-1410.
- OHKAMA-OHTSU, N., ZHAO, P., XIANG, C. B. & OLIVER, D. J. (2007). Glutathione conjugates in the vacuole are degraded by γ -glutamyl transpeptidase GGT3 in *Arabidopsis*. — *Plant J.* 49, 878-888.
- OKUMURA, R., KOIZUMI, Y. & SEKIYA, J. (2003). Synthesis of hydroxymethylglutathione from glutathione and L-serine catalyzed by carboxypeptidase Y. — *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 434-437.
- ORTEGA-VILLASANTE, C., RELLAN-ALVAREZ, R., DEL CAMPO, F. F., CARPENA-RUIZ, R. O. & HERNANDEZ, L. E. (2005). Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. — *J. Exp. Bot.* 56, 2239-2251.
- ORTIZ, D. F., RUSCITTI, T., MCCUE, K. F. & OW, D. W. (1995). Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. — *J. Biol. Chem.* 270, 4721-4728.
- OVEN, M., RATH, K., NEUBERT, R. H., KUTCHAN, T. M. & ZENK, M. H. (2001). Homo-phytochelatins are synthesized in response to cadmium in azuki beans. — *Plant Physiol.* 126, 1275-1280.
- OVEN, M., PAGE, J. E., ZENK, M. H. & KUTCHAN, T. M. (2002). Molecular characterization of the homo-phytochelatin synthase of soybean *Glycine max*. Relation to phytochelatin synthase. — *J. Biol. Chem.* 277, 4747-4754.
- 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.

- PANDEY, N. & SHARMA, C. P. (2002). Effect of heavy metals Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage. — *Plant Sci.* 163, 753-758.
- PANKOVIC, D., PLESNICAR, M., ARSENIJEVIC-MAKSIMOVIC, I., PETROVIC, N., SAKAC, Z. & KASTORI, R. (2000). Effects of Nitrogen Nutrition on Photosynthesis in Cd-treated Sunflower Plants. — *Ann. Bot.* 86, 841-847.
- PAWLIK-SKOWRONSKA, B. (2003). When adapted to high zinc concentrations the periphytic green alga *Stigeoclonium tenue* produces high amounts of novel phytochelatin-related peptides. — *Aquat. Toxicol.* 62, 155-163.
- PEARSON, J., WELLS, D. M., SELLER, K. J., BENNETT, A., SOARES, A., WOODALL, J. & INGROUILLE, M. J. (2000). Traffic exposure increases natural ^{15}N and heavy metal concentrations in mosses. — *New Phytol.* 147, 317-326.
- PEARSON, R. G. (1963). Hard and soft acids and bases. — *J. Am. Chem. Soc.* 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 J.* 32, 539-548.
- PIETRINI, F., IANNELLI, M. A., PASQUALINI, S. & MASSACCI, A. (2003). Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. — *Plant Physiol.* 133, 829-837.
- POPOVIC, M., KEVRESAN, S., KANDRAC, J., NIKOLIC, J., PETROVIC, N. & KASTORI, R. (1996). The role of sulphur in detoxication of cadmium in young sugar beet plants. — *Biol. Plant.* 38, 281-287.
- POSCHENRIEDER, C., GUNSE, B. & BARCELO, J. (1989). Influence of Cadmium on Water Relations, Stomatal Resistance, and Abscisic Acid Content in Expanding Bean Leaves. — *Plant Physiol.* 90, 1365-1371.
- PROSSER, I. M., PURVES, J. V., SAKER, L. R. & CLARKSON, D. T. (2001). Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. — *J. Exp. Bot.* 52, 113-121.
- QUATRANO, R. S., MCDANIEL, S. F., KHANDELWAL, A., PERROUD, P. F. & COVE, D. J. (2007). *Physcomitrella patens*: mosses enter the genomic age. — *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 182-189.
- RAAB, A., FELDMANN, J. & MEHARG, A. A. (2004). The nature of arsenic-phytochelatin complexes in *Holcus lanatus* and *Pteris cretica*. — *Plant Physiol.* 134, 1113-1122.
- RAAB, A., SCHAT, H., MEHARG, A. A. & FELDMANN, J. (2005). Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sunflower (*Helianthus annuus*): Formation of arsenic-phytochelatin complexes during exposure to high arsenic concentrations. — *New Phytol.* 168, 551-558.
- RAU, S., MIERSCH, J., NEUMANN, D., WEBER, E. & KRAUSS, G. J. (2007). Biochemical responses of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* to Cd, Cu, Pb and Zn determined by chlorophyll fluorescence and protein levels. — *Environ. Exp. Bot.* 59, 299-306.
- RAUSER, W. E. (1999). Structure and function of metal chelators produced by plants. — *Cell Biochem. Biophys.* 31, 19-48.
- RAVINA, C. G., CHANG, C.-I., TSAKRAKLIDES, G. P., MCDERMOTT, J. P., VEGA, J. M., LEUSTEK, T., GOTOR, C. & DAVIES, J. P. (2002). The sac mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* reveal transcriptional and posttranscriptional control of cysteine biosynthesis. — *Plant Physiol.* 130, 2076-2084.
- REINBOLD, J., RYCHLIK, M., ASAM, S., WIESER, H. & KOEHLER, P. (2008). Concentrations of total glutathione and cysteine in wheat flour as affected by sulfur deficiency and correlation to quality parameters. — *J. Agric. Food Chem.* 56, 6844-6850.
- RENSING, S. A., LANG, D., ZIMMER, A. D., TERRY, A., SALAMOV, A., SHAPIRO, H., NISHIYAMA, T., PERROUD, P. F., LINDQUIST, E. A., KAMISUGI, Y., *et al.* (2008). The

- Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. — Science 319, 64-69.
- ROTHER, M., KRAUSS, G. J., GRASS, G. & WESENBERG, D. (2006). Sulphate assimilation under Cd stress in *Physcomitrella patens* - Combined transcript, enzyme and metabolite profiling. — Plant, Cell and Environ. 29, 1801-1811.
- ROTHER, M. (2007). Untersuchungen zur assimilatorischen Sulfatreduktion in *Physcomitrella patens*: Analyse von Transkripten, Metaboliten und Enzymaktivitäten unter Schwermetallstress. — Dissertation, Martin-Luther-Universität.
- ROUHIER, N., LEMAIRE, S. D. & JACQUOT, J. P. (2008). The role of glutathione in photosynthetic organisms: Emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. — Ann. Rev. Plant Biol. 59, 143-166.
- SAITO, K., YOKOYAMA, H., NOJI, M. & MURAKOSHI, I. (1995). Molecular cloning and characterization of a plant serine acetyltransferase playing a regulatory role in cysteine biosynthesis from watermelon. — J. Biol. Chem. 270, 16321-16326.
- SAITO, K., INOUE, K., FUKUSHIMA, R. & NOJI, M. (1997). Genomic structure and expression analyses of serine acetyltransferase gene in *Citrullus vulgaris* (watermelon). — Gene 189, 57-63.
- SAITO, K. (2004). Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. — Plant Physiol. 136, 2443-2450.
- SALT, D. E., KATO, N., KRÄMER, U., SMITH, R. D. & RASKIN, I. (2000). The role of root exudates in nickel hyperaccumulation and tolerance in accumulator and non-accumulator species of *Thlaspi*. — In: Phytoremediation of contaminated soil and water (Terry, N. & Bañuelos, G., Hrsg.). Lewis Publishers, Boca Raton, S. 189-200.
- SAMECKA-CYMERMAN, A., KOLON, K. & KEMPERS, A. (2002). Heavy metals in aquatic bryophytes from the Ore mountains (Germany). — Ecotoxicol. Environ. Saf. 52, 203-210.
- SANITÀ DI TOPPI, L. & GABBRIELLI, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. — Environ. Exp. Bot. 41, 105-130.
- SARNIGHAUSEN, E., WURTZ, V., HEINTZ, D., VAN DORSSELAER, 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., *et al.* (2006). The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. — Proteomics 6, 2180 - 2198.
- SAXENA, A., SAXENA, D. K. & SRIVASTAVA, H. S. (2003). The influence of glutathione on physiological effects of lead and its accumulation in moss *Sphagnum squarrosum*. — Water Air Soil Poll. 143, 351-361.
- SCHAEFER, D. G. (2001). Gene targeting in *Physcomitrella patens*. — Curr. Opin. Plant Biol. 4, 143-150.
- SCHAEFER, D. G. & ZRYD, J. P. (2001). The moss *Physcomitrella patens*, now and then. — Plant Physiol. 127, 1430-1438.
- SCHIAVON, M., WIRTZ, M., BORSA, P., QUAGGIOTTI, S., HELL, R. & MALAGOLI, M. (2007). Chromate differentially affects the expression of a high-affinity sulfate transporter and isoforms of components of the sulfate assimilatory pathway in *Zea mays* (L.). — Plant Biol. (Stuttg.) 9, 662-671.
- SCHIAVON, M., PILON-SMITS, E. A., WIRTZ, M., HELL, R. & MALAGOLI, M. (2008). Interactions between chromium and sulfur metabolism in *Brassica juncea*. — J. Environ. Qual. 37, 1536-1545.
- SCHMIDT, A.-C., REISSER, W., MATTUSCH, J., WENNRICH, R. & JUNG, K. (2004). Analysis of arsenic species accumulation by plants and the influence on their nitrogen uptake. — J. Anal. At. Spectrom. 19, 172-177.

- SCHOPFER, P. & BRENNICKE, A. (2006). Pflanzenphysiologie. — Spektrum Akademischer Verlag, München.
- SCHRÖDER, P., SCHEER, C. E., DIEKMANN, F. & STAMPFL, A. (2007). How plants cope with foreign compounds. Translocation of xenobiotic glutathione conjugates in roots of barley (*Hordeum vulgare*). — Env. Sci. Pollut. Res. 14, 114-122.
- SCHULTZ, C. L. & HUTCHINSON, T. C. (1988). Evidence against a key role for metallothionein-like protein in the copper tolerance mechanism of *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv. — New Phytol. 110, 163-171.
- SEMANE, B., CUYPERS, A., SMEETS, K., VAN BELLEGHEM, F., HOREMANS, N., SCHAT, H. & VANGRONSVELD, J. (2007). Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: glutathione metabolism and antioxidative defence system. — Physiol. Plant. 129, 519-528.
- SHAKYA, K., CHETTRI, M. K. & SAWIDIS, T. (2008). Impact of heavy metals (copper, zinc, and lead) on the chlorophyll content of some mosses. — Arch. Environ. Contam. Toxicol. 54, 412-421.
- SHAW, A. J. & GOFFINET, Hrsg. (2000). Bryophyte Biology. — University Press, Cambridge.
- 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. — Physiol. Plant. 87, 199-202.
- SONG, W. Y., SOHN, E. J., MARTINOIA, E., LEE, Y. J., YANG, Y. Y., JASINSKI, M., FORESTIER, C., HWANG, I. & LEE, Y. (2003). Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. — Nat. Biotechnol. 21, 914-919.
- SUGIMOTO, K., SATO, N. & TSUZUKI, M. (2007). Utilization of a chloroplast membrane sulfolipid as a major internal sulfur source for protein synthesis in the early phase of sulfur starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. — FEBS Lett. 581, 4519-4522.
- SUN, Q., WANG, X. R., DING, S. M. & YUAN, X. F. (2005). Effects of interactions between cadmium and zinc on phytochelatin and glutathione production in wheat (*Triticum aestivum* L.). — Environ. Toxicol. 20, 195-201.
- SUTTER, K. (2000). Untersuchungen zur Akkumulation und physiologisch-biochemischen Wirkung von Schwermetallen im Wassermoos *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. — Dissertation, Martin-Luther-Universität.
- SUTTER, K., JUNG, K., & KRAUSS, G.-J. (2002). Effects of heavy metals on the nitrogen metabolism of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. - A ¹⁵N tracer study. — Environ. Sci. & Pollut. Res. 9, 417-421.
- SZALONTAI, B., HORVÁTH, L. I., DEBRECZENY, M., DROPPA, M. & HORVÁTH, G. (1999). Molecular rearrangements of thylakoids after heavy metal poisoning, as seen by Fourier transform infrared (FTIR) and electron spin resonance (ESR) spectroscopy. — Photosyn. Res. 61, 241-252.
- TAKAHASHI, H., YAMAZAKI, M., SASAKURA, N., WATANABE, A., LEUSTEK, T., ENGLER, J. A., ENGLER, G., VAN MONTAGU, M. & SAITO, K. (1997). Regulation of sulfur assimilation in higher plants: a sulfate transporter induced in sulfate-starved roots plays a central role in *Arabidopsis thaliana*. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 11102-11107.
- TERRY, N. (1976). Effects of sulfur on the photosynthesis of intact leaves and isolated chloroplasts of sugar beets. — Plant Physiol. 57, 477-479.
- THOMAS, C., RAJAGOPAL, A., WINDSOR, B., DUDLER, R., LLOYD, A. & ROUX, S. J. (2000). A role for ectophosphatase in xenobiotic resistance. — Plant Cell 12, 519-533.
- VAN ASSCHE, F. & CLIJSTERS, H. (1986). Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentrations of zinc: effects on electron transport and photophosphorylation. — Physiol. Plant. 66, 717-721.
- VATAMANIUK, O. K., MARI, S., LU, Y.-P. & REA, P. A. (2000). Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase: Blocked thiols are sufficient for PC

- synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. — J. Biol. Chem. 275, 31451-31459.
- VIDO, K., SPECTOR, D., LAGNIEL, G., LOPEZ, S., TOLEDANO, M. B. & LABARRE, J. (2001). A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. — J. Biol. Chem. 276, 8469-8474.
- VÖGELI-LANGE, R. & WAGNER, G. J. (1990). Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. — Plant Physiol. 92, 1086-1093.
- 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 J. 41, 15-30.
- WANG, T. L. & WU, M. (2006). An ATP-binding cassette transporter related to yeast vacuolar ScYCF1 is important for Cd sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii*. — Plant, Cell and Environ. 29, 1901-1912.
- WEDDELING, K. (2002). Massenentwicklung von *Riccia cavernosa* und *Physcomitrella patens* auf Schlammflächen an der Urfttalsperre bei Gmünd/Eifel. — Bryologische Rundbriefe 60, 1-2.
- WESENBERG, D., ROTHER, M., BLEUEL, C., MENGE, S. & KRAUSS, G.-J. (2005). Single cell sampling and analysis (SiCSA) of cadmium-exposed *Physcomitrella patens* by thiol peptide profiling and quantitative PCR. — In: Sulfur Transport and Assimilation in Plants in the post genomic era (Saito, K. D. K., L. J.; Stulen, I.; Hawkesford, M. J.; Schnug, E.; Sirko, A.; Rennenberg, H., Hrsg.). Backhuys Publishers, Leiden, S. 237-240.
- WIEDEMANN, G., KOPRIVOVA, A., SCHNEIDER, M., HERSCHBACH, C., RESKI, R. & KOPRIVA, S. (2007). The role of the novel adenosine 5'-phosphosulfate reductase in regulation of sulfate assimilation of *Physcomitrella patens*. — Plant Mol. Biol. 65, 667-676.
- WIRTZ, M. & HELL, R. (2006). Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: Structural, biochemical and regulatory properties. — J. Plant Physiol. 163, 273-286.
- WOLF, A. E., DIETZ, K. J. & SCHRODER, P. (1996). Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. — FEBS Lett. 384, 31-34.
- XIANG, C. & OLIVER, D. J. (1998). Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. — Plant Cell 10, 1539-1550.
- ZECHMANN, B., MAUCH, F., STICHER, L. & MULLER, M. (2008). Subcellular immunocytochemical analysis detects the highest concentrations of glutathione in mitochondria and not in plastids. — J. Exp. Bot. 59, 4017-4027.
- ZHANG, Z. D., SHRAGER, J., JAIN, M., CHANG, C. W., VALLON, O. & GROSSMAN, A. R. (2004). Insights into the survival of *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur starvation based on microarray analysis of gene expression. — Eukaryotic Cell 3, 1331-1348.
- ZHAO, F. J., HAWKESFORD, M. J. & MCGRATH, S. P. (1999). Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat. — J. Cereal Sci. 30, 1-17.

Anhang

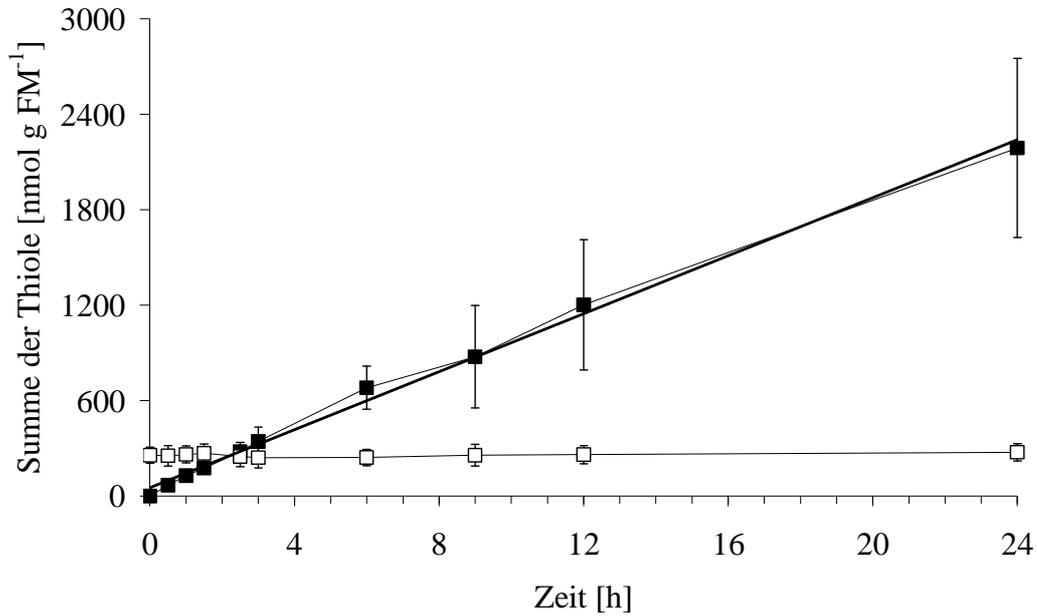


Abb. 62 Summe der Thiole (■ = *in-situ*-Markierung mit 200 µM MCB, □ = Derivatisierung von Extrakten nicht-markierter Proben mit MBB, — = Regressionsgerade: $y = 91,096x + 52,192$, $R^2 = 0,996$), $n = 3$

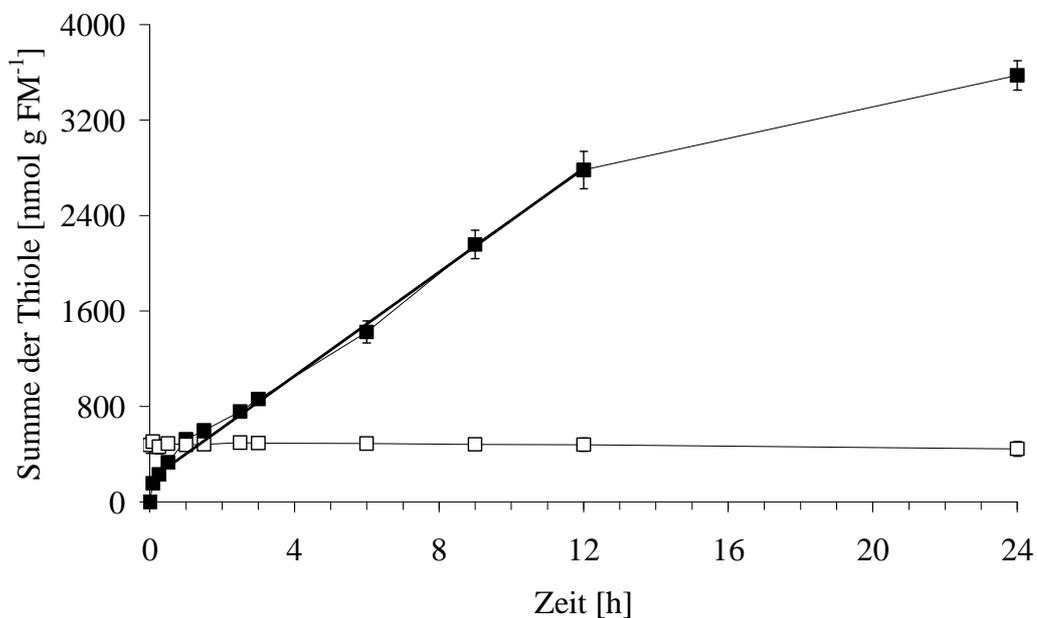


Abb. 63 Summe der Thiole (■ = *in-situ*-Markierung mit 500 µM MCB, □ = Derivatisierung von Extrakten nicht-markierter Proben mit MBB, — = Regressionsgerade: $y = 217,48x + 185,5$, $R^2 = 0,9914$), $n = 3$

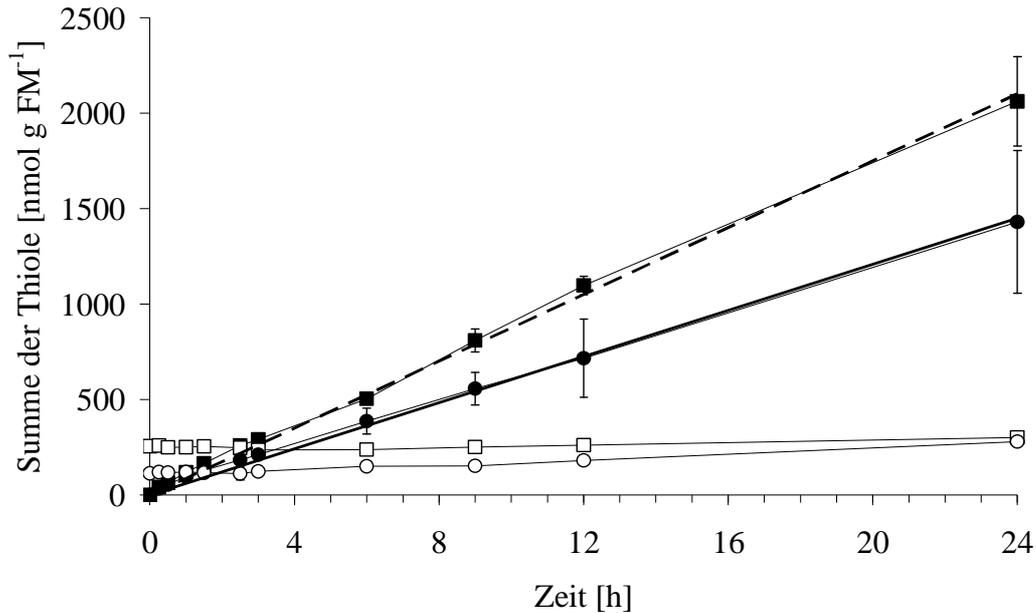


Abb. 64 Summe der Thiole in Kontroll- und Sulfatmangel-Kulturen nach *in-situ*-Markierung mit 200 μM MCB (■ = $+\text{SO}_4^{2-}$, — = Regressionsgerade: $y = 87,521x$; $R^2 = 0,9974$, ● = $-\text{SO}_4^{2-}$, --- = Regressionsgerade: $y = 60,393x$; $R^2 = 0,9961$) und nach Derivatisierung von Extrakten nicht-markierter Proben mit MBB (□ = $+\text{SO}_4^{2-}$, ○ = $-\text{SO}_4^{2-}$), $n = 3$

Tabelle 7 Zusammenfassung der Ergebnisse der zweifaktoriellen univariaten Varianzanalyse (2-way-ANOVA) zum Effekt der Faktoren Cd-Exposition und Zeit auf die Variable GSH gemessen in *P. patens* (df = Freiheitsgrade, F = Prüfgröße, P = Signifikanz)

	df	Varianz	F-Wert	P
Cd	1	20173,03567	78,15	< 0,0001
Zeit	9	6257,64963	24,24	< 0,0001
Cd×Zeit	9	433,89762	1,68	0,1259
error	40	258,14726		

Tabelle 8 Zusammenfassung der Ergebnisse der zweifaktoriellen univariaten Varianzanalyse (2-way-ANOVA) zum Effekt der Faktoren Cd-Exposition und Zeit auf die Variable Cys gemessen in *P. patens* (df = Freiheitsgrade, F = Prüfgröße, P = Signifikanz)

	df	Varianz	F-Wert	P
Cd	1	100,9570	0,78	0,3827
Zeit	9	18506,8999	142,83	< 0,0001
Cd×Zeit	9	30,5829	0,24	0,9869
error	40	129,5770		

Tabelle 9 Zusammenfassung der Ergebnisse der zweifaktoriellen univariaten Varianzanalyse (2-way-ANOVA) zum Effekt der Faktoren Cd-Exposition und Zeit auf die Variable γ -EC gemessen in *P. patens* (df = Freiheitsgrade, F = Prüfgröße, P = Signifikanz)

	df	Varianz	F-Wert	P
Cd	1	85580,07	2,65	0,1113
Zeit	9	1755073,88	54,37	< 0,0001
Cd×Zeit	9	31378,33	0,97	0,4771
error	40	32280,13		

Tabelle 10 Zusammenfassung der Ergebnisse der zweifaktoriellen univariaten Varianzanalyse (2-way-ANOVA) zum Effekt der Faktoren Sulfatangebot und Zeit auf die Variable GSH gemessen in *P. patens* (df = Freiheitsgrade, F = Prüfgröße, P = Signifikanz)

	df	Varianz	F-Wert	P
Sulfat	1	10316,1605	62,96	< 0,0001
Zeit	10	15944,9129	97,32	< 0,0001
Sulfat×Zeit	10	469,9595	2,87	0,0079
error	43	163,8432		

Tabelle 11 Zusammenfassung der Ergebnisse der zweifaktoriellen univariaten Varianzanalyse (2-way-ANOVA) zum Effekt der Faktoren Cd-Exposition und Zeit auf die Variable Cys gemessen in *P. patens* (df = Freiheitsgrade, F = Prüfgröße, P = Signifikanz)

	df	Varianz	F-Wert	P
Sulfat	1	820,3295	3,41	0,0718
Zeit	10	42565,2901	176,79	< 0,0001
Sulfat×Zeit	10	589,0297	2,45	0,0207
error	43	240,7714		

Tabelle 12 Zusammenfassung der Ergebnisse der zweifaktoriellen univariaten Varianzanalyse (2-way-ANOVA) zum Effekt der Faktoren Cd-Exposition und Zeit auf die Variable γ -EC gemessen in *P. patens* (df = Freiheitsgrade, F = Prüfgröße, P = Signifikanz)

	df	Varianz	F-Wert	P
Sulfat	1	312783,57	38,80	< 0,0001
Zeit	10	1009614,79	125,25	< 0,0001
Sulfat×Zeit	10	62705,07	7,78	< 0,0001
error	43	8060,58		

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den zahlreichen Personen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt zunächst Prof. Dr. G.-J. Krauß für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe, die Überlassung dieses überaus interessanten Themas sowie das stetige Interesse am Fortgang der Arbeit und die Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Dirk Wesenberg möchte ich für die ausgezeichnete Betreuung, die vielen wissenschaftlichen Anregungen sowie die Hilfe bei größeren und kleineren Computerkatastrophen bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Herrn PD Dr. Andreas J. Meyer vom Heidelberger Institut für Pflanzenwissenschaften für die Zusammenarbeit bei den MCB-Experimenten, die Möglichkeit, die CLSM-Aufnahmen in Heidelberg durchführen zu können sowie die zahlreichen Tipps und Anregungen.

Herrn Dr. Matthias Gehre (UFZ, Leipzig) sowie Herrn Prof. em. Dr. K. Jung danke ich für die Unterstützung bei den ^{15}N -Tracerexperimenten und ihre stete Diskussionsbereitschaft bei der Auswertung der Daten.

Herrn Dr. Gilbert Gorr (greenovation Biotech GmbH) danke ich für die Bereitstellung steriler *P.-patens*-Protonemakulturen.

Ich danke Frau Dr. Magali Solé für die Unterstützung bei der Auswertung der *real-time*-Daten sowie bei der statistischen Analyse der Daten.

Der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Magret Köck danke ich für die Möglichkeit, die *real-time*-PCR-Analysen an ihrem Gerät durchführen zu können sowie die ständige Hilfsbereitschaft.

Im Laufe der Zeit waren viele Diplomanden und Doktoranden in unseren Laboren. Besonders möchte ich Michael Rother für die Einweisung in die *Physco*-Kulturpflege sowie die tolle Zusammenarbeit im Labor bedanken. Ebenso haben Corinna Hermsen, Diana Meissner und Anja Bräutigam mir oft mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Ich danke euch für die schöne Zeit im Labor und so manche lustige Stunden in der Freizeit.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Ökologische und Pflanzen-Biochemie, die durch ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zum Schluss danke ich meiner Familie, meinen Freunden und dir, Markus. Ihr habt immer an mich geglaubt und wart stets für mich da.

Lebenslauf

ANGABEN ZUR PERSON

Name Corinna Bleuel
Adresse Thomasiusstraße 41, 06110 Halle (Saale)
corinna.bleuel@biochemtech.uni-halle.de
geb. 21.02.1981 in Altenburg, ledig

AUSBILDUNG / BERUFLICHER WERDEGANG

seit Februar 2009 Fachreferentin Arzneimittelzulassung
RIEMSER Arzneimittel AG – Betriebstätte Leipziger Arzneimittelwerk

2004 – 2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Promotion am Institut für Biochemie
und Biotechnologie in der Abteilung Ökologische und Pflanzen-Biochemie,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
assoziierte Kollegiatin im Graduiertenkolleg 416 der Deutschen
Forschungsgemeinschaft

2003 – 2004 Diplomarbeit: „Vergleichende Untersuchungen zur Regulation der Sulfat-
Assimilation unter Cadmium-Stress in *Fontinalis antipyretica* und
Physcomitrella patens“

1999 – 2004 Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachrichtung
Biochemie, Vertiefungsfach: Ökologische und Pflanzen-Biochemie

1991 – 1999 Platanengymnasium, Altenburg

1989 – 1991 Polytechnische Oberschule „Erich Mäder“, Altenburg

1987 – 1989 Polytechnische Oberschule „Dr. Richard Sorge“, Altenburg

PUBLIKATIONEN

- 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. — *Sci. Total Environ.* 345, 13-21.
- BLEUEL, C., GROSSE, C., TAUDTE, N., SCHERER, J., WESENBERG, D., KRAUSS, G. J., NIES, D. H. & GRASS, G. (2005). TolC is involved in enterobactin efflux across the outer membrane of *Escherichia coli*. — *J. Bacteriol.* 187, 6701-6707.
- WESENBERG, D., ROTHER, M., BLEUEL, C., MENGE, S. & KRAUSS, G.-J. (2005). Single cell sampling and analysis (SiCSA) of cadmium-exposed *Physcomitrella patens* by thiol peptide profiling and quantitative PCR. — In: *Sulfur Transport and Assimilation in Plants in the post genomic era* (Saito, K. D. K., L. J.; Stulen, I.; Hawkesford, M. J.; Schnug, E.; Sirko, A.; Rennenberg, H., Hrsg.). Backhuys Publishers, Leiden, S. 237-240.
- WESENBERG, D., BLEUEL, C. & KRAUSS, G.-J. (2007). A glossary of microanalytical tools to assess the metallome. — In: *Molecular Microbiology of Heavy Metals* (Nies, D. H. & Silver, S., Hrsg.). Springer, Heidelberg, S. 159-186.
- HELBIG, K., BLEUEL, C., KRAUSS, G. J. & NIES, D. H. (2008). Glutathione and transition-metal homeostasis in *Escherichia coli*. — *J. Bacteriol.* 190, 5431-5438.
- BLEUEL, C., MEYER, A. J., KRAUSS, G.-J. & WESENBERG, D. (2008). Intracellular cadmium detoxification mechanisms in the moss *Physcomitrella patens*. — In: *Sulfur Metabolism in Higher Plants* (Saito, K., De Kok, L. J., Stulen, I., Hawkesford, M. J., Schnug, E., Sirko, A. & Rennenberg, H., Hrsg.), in press.
- BLEUEL, C., MEYER, A. J., KRAUSS, G.-J. & WESENBERG, D. (2008). Glutathione-dependent detoxification of cadmium and xenobiotics in *Physcomitrella patens*. — in preparation.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig, ohne fremde Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Die den benutzen Werken wörtlich und inhaltlich entnommen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere, dass die Arbeit an keiner anderen Einrichtung zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht wurde.

Halle, den