

**Molekulare Mechanismen der Aufnahme, Detoxifizierung  
und Akkumulation von Metallen**



**HABILITATIONSSCHRIFT**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium habilitatus (Dr. rer. nat. habil.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Dr. rer. nat. Stephan Clemens

geb. am: 9. Februar 1963 in: Hamburg

Gutachter

1. Prof. Dr. Dierk Scheel
2. Prof. Dr. Enrico Martinoia
3. Prof. Dr. Elmar Weiler

Halle (Saale), 22. Oktober 2003

**urn:nbn:de:gbv:3-000006092**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006092>]

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>		<b>Seite</b>
<b>1.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	3
<b>2.</b>	<b>MOLEKULARE MECHANISMEN DER AUFNAHME, DETOXIFIZIERUNG UND AKKUMULATION VON METALLEN</b>	4
<b>2.1</b>	<b>Einleitung</b>	4
2.1.1	Die Notwendigkeit der Metallhomöostase	4
2.1.2	Aufnahme von Metallionen	6
2.1.3	Kompartimentierung von Metallen ( <i>Metal Trafficking</i> )	7
2.1.4	Metalltoleranz: Sequestrierung und Speicherung von Metallen	7
2.1.5	Regulation der Metallhomöostase	11
2.1.6	Die pflanzliche Hyperakkumulation von Metallen	12
<b>2.2</b>	<b>Aufnahme von Cd<sup>2+</sup>-Ionen</b>	15
<b>2.3</b>	<b>Cd<sup>2+</sup>-Toleranz: Phytochelatinsynthesen</b>	17
2.3.1	Die Klonierung und Charakterisierung von Phytochelatinsynthase-Genen	17
2.3.2	Eine funktionelle PC-Synthase in <i>C. elegans</i>	20
2.3.3	Charakterisierung des zweiten PCS-Gens in <i>A. thaliana</i>	21
2.3.4	Die Aktivierung der PC-Synthese durch Cd <sup>2+</sup> -Ionen	22
<b>2.4</b>	<b>Der Beitrag anderer zellulärer Metalltoleranzmechanismen</b>	25
<b>2.5</b>	<b>Der Metallophyt <i>Arabidopsis halleri</i> als Modell</b>	29
2.5.1	Metallregulierte Gene aus <i>A. thaliana</i> und <i>A. halleri</i>	30
2.5.2	Putative Hyperakkumulationsgene	33
<b>2.6</b>	<b>Ausblick</b>	35
<b>2.7</b>	<b>Literatur</b>	39
<b>3.</b>	<b>VERZEICHNIS DER FÜR DIESE ARBEIT RELEVANTEN EIGENEN VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	48
<b>4.</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	49
<b>5.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	50

## 1. DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Dierk Scheel herzlich danken für die freundschaftliche Atmosphäre unserer Zusammenarbeit und für die Freiheit, in seiner Abteilung und mit seiner tatkräftigen Unterstützung eine unabhängige Arbeitsgruppe aufbauen zu können. Das von ihm maßgeblich gestaltete Umfeld am IPB und seine Anteilnahme an meiner Arbeit haben mir sehr geholfen.

Bei Prof. Dr. Julian Schroeder möchte ich mich für die Chance bedanken, in seinem Labor und mit seiner Hilfe ein noch junges Forschungsgebiet eigenständig verfolgen zu dürfen. Den KollegInnen in San Diego danke ich für eine tolle gemeinsame Zeit.

Ein Dankeschön für ihr freudiges Engagement und ihre Beiträge zu unseren Projekten allen jetzigen und früheren Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe: Dr. Anne-Claire Cazalé, Stefanie Haase, Dr. Emiko Harada, Marina Häußler, Dr. Thomas Maier, Claudia Simm, Pierre Tennstedt, Christoph Veß, Michael Weber.

Den KollegInnen der Abt. Stress- und Entwicklungsbiologie des IPB danke ich für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und zahllose anregende Diskussionen über Wissenschaft, Fußball und andere wichtige Themen.

Dank gilt auch den in- und ausländischen Kooperationspartnern der letzten Jahre. Die Arbeit an gemeinsamen Projekten und der Austausch von Ideen sind wichtige Gründe für die Freude an der Wissenschaft.

Prof. Dr. Dietrich H. Nies, Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, danke ich für seine bereitwillige Unterstützung des Habilitationsverfahrens.

DAAD, DFG und EU haben die meisten der hier dargestellten Arbeiten finanziell gefördert und dafür möchte ich danken.

Schließlich meinen Eltern und meiner Familie ein dickes Dankeschön für ihre bedingungslose Unterstützung, für Rat und Tat, Enthusiasmus und Ermutigung.

## **2. MOLEKULARE MECHANISMEN DER AUFNAHME, DETOXIFIZIERUNG UND AKKUMULATION VON METALLEN**

### **2.1 Einleitung**

Essentiell für alle lebenden Systeme sind etwa 20 Elemente (Frausto da Silva und Williams, 2001). Zu den Metallen gehören von diesen Elementen die Alkali- und Erdalkalimetalle Na, K, Ca und Mg sowie die Übergangsmetalle Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn und Mo. Für Pflanzen sind die genannten Übergangsmetalle Mikronährstoffe oder Spurenelemente (Marschner, 1995). Aufgenommen werden aus der Umwelt nicht nur essentielle Elemente. Auch nicht-essentielle Metalle wie Cd, Hg und Pb oder Halbmetalle wie As und Se lassen sich in Organismen nachweisen. Häufig ist die Aufnahme mit toxischen Wirkungen verbunden.

Viele der Übergangsmetalle und selbst Halbmetalle wie As werden häufig unter der Bezeichnung „Schwermetalle“ zusammengefasst. Dieser Begriff ist jedoch nicht klar definiert (Duffus, 2002) und wird deshalb hier vermieden. Kontext der vorliegenden Arbeit ist die Aufnahme, Detoxifizierung, Verteilung und Akkumulation von essentiellen wie nicht-essentiellen Übergangsmetallen. Solche sind gemeint wenn im folgenden von „Metallen“ gesprochen wird. Relevant ist außerdem As. Zudem ist wichtig zu betonen, dass Metalle im wesentlichen in ihrer ionischen Form in biologischen Systemen vorkommen. Deshalb wird immer dann bei der Beschreibung und Diskussion von Experimenten die ionische Form benutzt, wenn es sich um ein nicht-redoxaktives Metall handelt und klar ist, in welcher Form dieses Metall vorlag.

#### 2.1.1 Die Notwendigkeit der Metallhomöostase

Die essentiellen Übergangsmetalle sind an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt. Cu- und Fe-Ionen z.B. können unter physiologischen Bedingungen in verschiedenen Oxidationsstufen vorliegen: Cu(I)/Cu(II) bzw. Fe(II)/Fe(III). Diese Eigenschaft ermöglicht die Katalyse von Elektronentransfer-Reaktionen. Cu z.B. ist Ko-Faktor von Cytochrom c-Oxidase, Superoxiddismutase oder Plastocyanin. Fe-abhängig sind Ferredoxin, Cytochrom P450-Monooxygenasen, viele Peroxidasen und eine grosse Zahl weiterer Proteine. Eine weitere wichtige Eigenschaft vieler Übergangsmetalle ist die hohe Affinität zu O-, N- und S-haltigen organischen Liganden, die Interaktionen mit biologischen Molekülen erlauben. Das

nicht-redoxaktive Metall Zn fungiert vor allem als Ko-Faktor von hydrolytischen Enzymen und als Strukturelement von Zn-Finger-Proteinen wie etwa Transkriptionsfaktoren.

Die für biologische Prozesse nützlichen Eigenschaften einiger Metalle wie Redoxaktivität oder hohe Affinität für organische Liganden sind gleichzeitig die Ursache ihrer Toxizität bei Auftreten im Überschuss. Cu- und Fe-Ionen können die Bildung von Hydroxyl-Radikalen in der Fenton-Reaktion katalysieren. Cu-Ionen sind zudem die mono- und divalenten Ionen mit der höchsten Affinität zu organischen Liganden (Frausto da Silva und Williams, 2001). Unkontrolliertes Binden kann – wie auch für  $Zn^{2+}$  und andere Metallionen - zur Inaktivierung von Proteinen oder Metaboliten führen, etwa durch Verdrängung eines Ko-Faktors oder Interaktion mit essentiellen funktionellen Gruppen.

Aus Essentialität und potentieller Toxizität ergibt sich die Notwendigkeit, in Zellen und Geweben die Konzentrationen dieser Metalle in einem sehr engen Rahmen zu kontrollieren. Aufnahme, Chelatierung und Speicherung müssen genau reguliert erfolgen. Zudem sind die Ansprüche der einzelnen zellulären Kompartimente sehr unterschiedlich. Cu- und Zn-abhängige Proteine z.B. sind fast ohne Ausnahme außerhalb des Cytosols lokalisiert. Deshalb sind homöostatische Mechanismen auch erforderlich, um die richtige Distribution von Metallionen auf subzellulärer Ebene, d.h. die Versorgung aller Zellkompartimente und Enzymkomplexe mit diesen Ko-Faktoren, sicherzustellen.

Nicht homöostatisch kontrolliert, sondern toleriert werden müssen Ionen nicht-essentieller toxischer Metallen wie Blei oder Cadmium, für die eine biologische Funktion nur in Einzelfällen wie der Cd-abhängigen Carboanhydrase aus *Thalassiosira weissflogii* (Lane und Morel, 2000) bekannt ist, und denen viele Organismen – nicht zuletzt aufgrund anthropogener Einflüsse - ausgesetzt sein können. Diese müssen nach der Aufnahme durch unspezifische Transporter (Clemens et al., 1998; Arazi et al., 1999) von besonders sensitiven zellulären Kompartimenten und Bestandteilen ferngehalten werden durch Sequestrierung oder Austransport, um eine schädliche Bindung an andere Proteine zu verhindern. Die genauen Mechanismen der Toxizität von Ionen wie  $Cd^{2+}$  sind nicht bekannt. Die Affinität von  $Cd^{2+}$  für N- und S-haltige Gruppen ist sehr hoch. Dies ermöglicht die Wechselwirkung mit einer Vielzahl biologischer Moleküle und deren Inaktivierung.  $Zn^{2+}$ -Ionen können in Zn-abhängigen Proteinen durch  $Cd^{2+}$  sehr leicht ersetzt werden (Frausto da Silva und Williams, 2001). Für  $Cd^{2+}$  ist auch bekannt, dass es  $Ca^{2+}$  aus  $Ca^{2+}$ -bindenden Proteinen wie Calmodulin verdrängen kann (Ouyang und Vogel, 1998). Viele  $Ca^{2+}$ -Kanäle werden durch  $Cd^{2+}$  blockiert (Kiss und Osipenko, 1994).

Die wesentlichen Elemente der Metallhomöostase sind Transport- und Chelatierungsprozesse. Ein koordiniertes Zusammenwirken von Mobilisierung, Aufnahme-, Efflux- und Sequestrierungsaktivitäten sowie der Synthese und dem Abbau von metallbindenden Molekülen ist erforderlich, um die Aquisition und Distribution essentieller Metalle in den engen physiologischen Grenzen zu gewährleisten. Chelatierung, Sequestrierung und Efflux sind zudem Grundlage der Tolerierung von in den Organismus gelangten nicht-essentiellen toxischen Metallen. Die Bedeutung der Metallhomöostase und die Existenz komplexer Mechanismen der Verteilung von Metallionen sind erst seit wenigen Jahre in den Blickpunkt intensiver Forschung gerückt. Gefördert wurde diese Entwicklung u.a. durch die Erkenntnis, dass eine Reihe menschlicher Erkrankungen, vor allem solche neurodegenerativer Art, im Zusammenhang stehen mit Störungen der Metallhomöostase (für Übersichten: Nelson, 1999; Sayre et al., 2000; Lehmann, 2002). Molekular identifiziert und funktionell charakterisiert sind bisher jedoch nur wenige Komponenten der Metallhomöostase (für eine Übersicht zur Metallhomöostase in Pflanzen: Clemens, 2001). Im folgenden wird der Erkenntnisstand für Pflanzen kurz zusammengefasst unter Berücksichtigung grundlegender Einsichten aus anderen Modellsystemen (*S. cerevisiae* im wesentlichen).

### 2.1.2 Aufnahme von Metallionen

Metallionen gelangen vermittelt durch Transporter in der Plasmamembran in die Zellen. Antriebskraft für Kationen ist das vor allem durch  $H^+$ -ATPasen erzeugte negative Membranpotential (Palmgren, 2001), welches in Wurzelepidermis-Zellen Werte von bis zu – 200 mV erreichen kann (Hirsch et al., 1998). Einige für die Aufnahme essentieller Metallionen verantwortliche pflanzliche Transporter sind in den letzten Jahren durch die Komplementation von *S. cerevisiae*-Mutanten kloniert worden. IRT1 ist ein  $Fe^{2+}$ -Transporter (Eide et al., 1996), andere Proteine der ZIP-Familie (**ZRT-/IRT-like Proteins**) transportieren  $Zn^{2+}$  (Grotz et al., 1998; Guerinot und Eide, 1999) und das *COPT1*-Gen kodiert für einen *Arabidopsis* Cu-Transporter (Kampfenkel et al., 1995). Auch zur Familie der Nramps (**Natural resistance associated macrophage protein**) gehörige Transporter tragen möglicherweise zur Metallaufnahme bei (Thomine et al., 2000; Curie et al., 2000). Am besten charakterisiert von allen pflanzlichen Metalltransportern ist IRT1. Dieses Protein ist essentiell für die  $Fe^{2+}$ -Ernährung von *A. thaliana* (Vert et al., 2002). IRT1 ist sowohl transkriptionell als auch posttranslational reguliert. *IRT1*-Expression wird unter Fe-Mangel induziert (Eide et al., 1996). IRT1-Protein ist nur unter Fe-Mangel stabil (Connolly et al., 2002).

Da Blei und Cadmium ohne bekannte biologische Funktion sind, ist für diese Elemente davon auszugehen, dass ihre entsprechenden Ionen über unspezifische Kationentransporter in der Plasmamembran aufgenommen werden. Erstmals gezeigt wurde dies für LCT1, einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter aus Weizen, der auch den Einstrom von  $\text{Cd}^{2+}$  vermittelt (Clemens et al., 1998). Inzwischen wurde mit NtCBP4 ein erstes Protein gefunden, das die Aufnahme von  $\text{Pb}^{2+}$  vermittelt (Arazi et al., 1999). Für IRT1 konnte kürzlich ein Beitrag zur unter Fe-Mangelbedingungen erhöhten  $\text{Cd}^{2+}$ -Aufnahme gezeigt werden (Connolly et al., 2002).

### 2.1.3 Kompartimentierung von Metallen (*Metal Trafficking*)

Ein bestimmendes Merkmal des *Metal Trafficking*, d.h. des intrazellulären Transfers von Metallen zu jeweiligen Ko-Faktor-abhängigen Proteinen als Zielorten, ist, dass Metallionen wegen ihrer Reaktivität wahrscheinlich nur an Liganden gebunden in der Zelle existieren. Nach Aufnahme in die Zelle werden Cu- und möglicherweise andere Metallionen direkt von spezifischen Chelatoren (=Metallochaperonen) gebunden. Für Cu konnte in *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass intrazellulär keine freien Ionen vorkommen (Rae et al., 1999). Ebenfalls aus *S. cerevisiae* sind einige dieser Metallochaperone und ihre Funktionen bekannt (zusammengefasst in: O'Halloran und Culotta, 2000). Atx1 ist am *Trafficking* von Cu in Golgi-Vesikel beteiligt, wo Cu-Ionen u.a. in Oxidasen eingebaut werden (Pufahl et al., 1997). Atx1-Homologe sind in Pflanzen und Säugetieren gefunden worden (Himmelblau et al., 1998). Das menschliche Atx1-Homologe Hah1 interagiert dabei direkt mit einer Cu-pumpenden ATPase (Hamza et al., 1999), wie sie kürzlich mit dem RAN1 Protein auch in *A. thaliana* beschrieben wurde (Hirayama et al., 1999). Cox 17 ist essentiell für die Cu-Versorgung der Mitochondrien (Glerum et al., 1996), Lys7 für den Einbau von Cu in die Cu/Zn Superoxiddismutase (Culotta et al., 1997).

### 2.1.4 Metalltoleranz: Sequestrierung und Speicherung von Metallen

In die Zelle gelangte nicht-essentielle Metallionen, sowie auch essentielle bei Vorliegen zu hoher Konzentrationen, werden dem Cytosol entzogen durch Bindung an Chelatoren und Sequestrierung in Zellkompartimenten. In Pflanzenzellen ist dies wahrscheinlich vor allem die Vakuole. Die bestuntersuchten Chelatoren in pflanzlichen Zellen sind Phytochelatine (PCs), kleine Peptide der generellen Struktur  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  ( $n=2-11$ ).

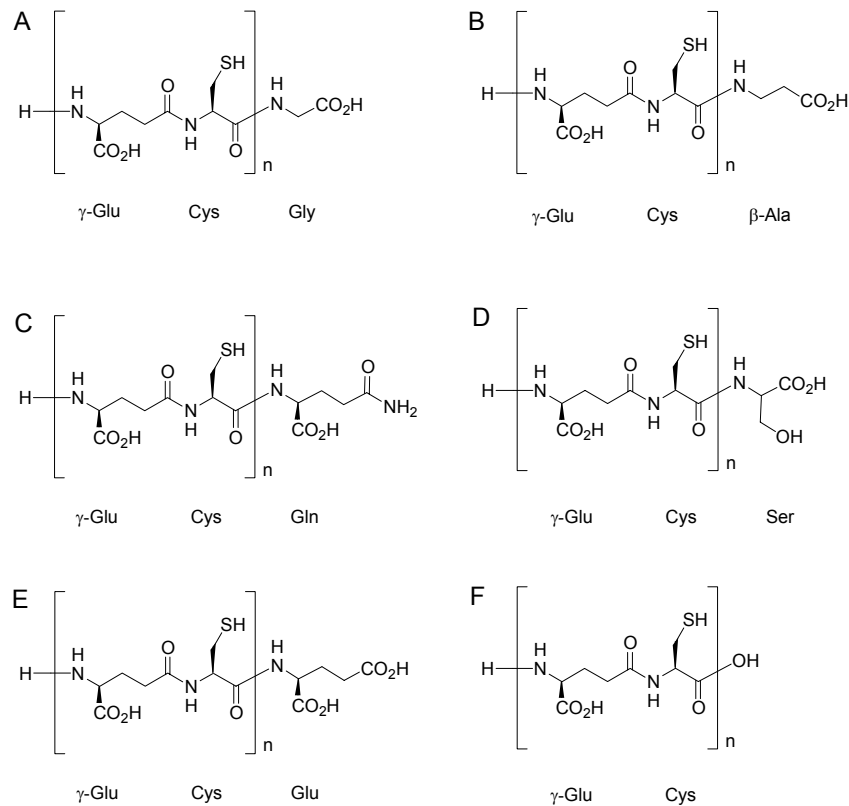
Das C-terminale Glycin kann fehlen oder ersetzt sein durch entweder Serin,  $\beta$ -Alanin, Glutamat oder Glutamin (Iso-Phytochelatine, Zenk, 1996)(Abb.1). PCs sind zunächst in *Schizosaccharomyces pombe*, der Spaltheefe, als *Cadystins* beschrieben worden (Kondo et al., 1984) und kurze Zeit später in Pflanzen unter der inzwischen gebräuchlichsten Bezeichnung Phytochelatine (Grill et al., 1985). Die  $\gamma$ -Carboxyamid-Bindung legte nahe, dass PCs nicht-ribosomal synthetisiert werden. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass sie in einer Transpeptidase-Reaktion aus Glutathion-Einheiten aufgebaut werden durch das Enzym Phytochelatinsynthase (PCS)(Grill et al., 1989). PCs kommen in der Zelle in zwei verschiedenen, durch Gelfiltration von Rohextrakten zu separierenden Komplexen vor, dem *low molecular weight*-Komplex (LMW) und dem *high molecular weight*-Komplex (HMW). Vom LMW wird angenommen, dass er cytosolisch ist, während der HMW in der Vakuole unter Einschluss von Sulfid gebildet wird (Abb. 2). Der Transport von LMW-Komplexen in vakuoläre Vesikel aus pflanzlichen Zellen zeigt die Merkmale einer ABC-Transporter-abhängigen Aktivität: Energetisierung durch ATP, Unabhängigkeit von  $\Delta$ pH (Salt und Rauser, 1995). In *S. pombe* ist der ABC-Transporter Hmt1 für diesen Transport verantwortlich (Ortiz et al., 1992; Ortiz et al., 1995). Für keinen der bekannten pflanzlichen ABC-Transporter konnte bisher jedoch eine entsprechende Aktivität gezeigt werden (Sanchez-Fernandez et al., 2001; Martinoia et al., 2002).

PC-Komplexe sind *in vivo* beschrieben worden mit Cd, Cu und As (Maitani et al., 1996; Schmöger et al., 2000). PCs sind in Pflanzen essentiell für die  $\text{Cd}^{2+}$ - und  $\text{AsO}_4^{3-}$ -Entgiftung, wie an der PC-defizienten *A. thaliana*-Mutante *cad1* demonstriert wurde (Howden und Cobbett, 1992; Howden et al., 1995; Ha et al., 1999). Auch eine leicht erhöhte Cu- und  $\text{Hg}^{2+}$ -Sensitivität wurde beobachtet. Darüber hinaus spielen PCs möglicherweise eine Rolle bei der Zn- und Cu-Homöostase (Thumann et al., 1991; Rauser, 1995). PCS-kodierende Gene sind kürzlich aus Pflanzen und *S. pombe* kloniert und funktionell charakterisiert worden (Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999; Clemens et al., 1999). Nach der Existenz eines Orthologen in *Caenorhabditis elegans* läßt sich vermuten, dass diese Peptide auch in tierischen Organismen eine Rolle in der Metalltoleranz und -homöostase spielen (Vatamaniuk et al., 2001; Clemens et al., 2001).

Eine Reihe weiterer Mechanismen sind möglicherweise beteiligt an der  $\text{Cd}^{2+}$ -Detoxifizierung in pflanzlichen Zellen (Abb. 2). Metallothioneine dienen in tierischen Zellen und Hefen als Speicher für Metallionen und tragen zur Detoxifizierung von  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  und Cu bei (Hamer, 1986). MT-ähnliche Proteine sind auch in Pflanzen zu finden. Für einige wurde gezeigt, dass sie die Cu-Sensitivität einer MT-defizienten *S. cerevisiae*-Mutante



komplementieren (Zhou und Goldsbrough, 1994). Wie in Säugern auch wird die Funktion der MTs jedoch noch immer als rätselhaft angesehen (Palmiter, 1998; Cobbett und Goldsbrough, 2002).

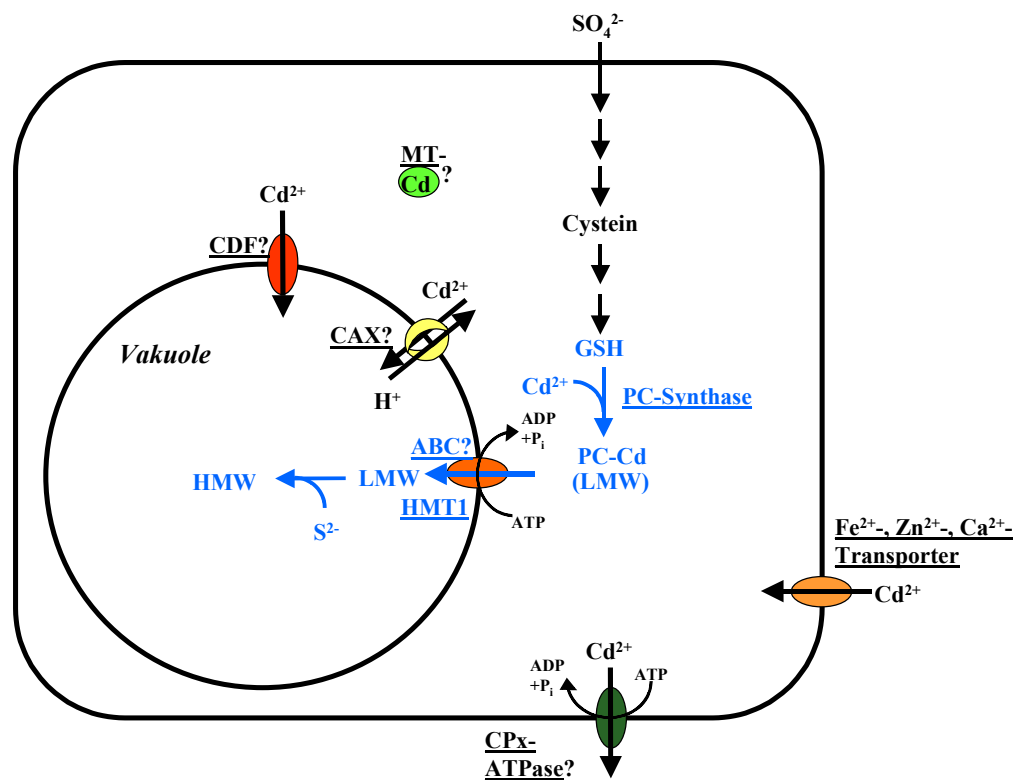


**Abb. 1:** Die Strukturen von Phytochelatinen (A) und Iso-Phytochelatinen (B-F). Alle Familien bestehen aus 2-11 (meist 2-4)  $\gamma$ -Glu-Cys-Einheiten, die aus Glutathion bzw. aus entsprechenden Glutathion-Derivaten stammen. Die C-terminale Aminosäure ist in den meisten Fällen Glycin (wie in Glutathion) und kann ersetzt sein durch  $\beta$ -Alanin (B, Homo-PC in Vertretern der *Leguminosae*), Glutamin (C, Iso-PC (Gln) in *Armoracia rusticana*), Serin (D, Iso-PC (Ser) in Vertretern der *Poaceae*), Glutamat (E, Iso-PC (Glu) in *Zea mays*) oder kann fehlen (F, desGly-PC, ebenfalls nachgewiesen in *Zea mays*) (für Nomenklatur und Literaturübersicht siehe: Zenk, 1996; für Iso-PC (Gln) siehe: Kubota et al., 2000).

Die vakuoläre Sequestrierung von Cd wird zum Teil auch einer  $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiport-Aktivität zugeschrieben, die in vakuolären Vesikeln von *Avena sativa*-Wurzeln detektiert worden ist (Salt und Wagner, 1993). Eine ähnliche Aktivität ist aus *S. pombe*-Vakuolen bekannt (Ortiz et al., 1995). Eine Hypothese zur molekularen Identität der verantwortlichen Proteine ist, dass  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiporter auch  $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiport vermitteln (Salt und Wagner, 1993; Barkla und Pantoja, 1996).  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiporter sind inzwischen kloniert worden (Hirschi et al., 1996) und für zwei der zur Familie der CAX-Transporter gehörigen Proteine (CAX2 und CAX4) ist Evidenz gefunden worden, die eine Beteiligung an der Sequestrierung von Cd und Mn unterstützt (Hirschi et al., 2000; Cheng et al., 2002).

Die intrazelluläre Speicherung von essentiellen Metallen wie Zn erfolgt nach bisherigem Wissen vor allem vermittelt durch Transporter der CDF-Familie (*Cation Diffusion*

*Facilitators*, Nies und Silver, 1995; Paulsen und Saier, 1997). Beteiligt sein können diese Proteine daneben auch an der Sequestrierung von Co und Cd wie die Beispiele Zrc1 und Cot1 aus *S. cerevisiae* zeigen (Kamizono et al., 1989; Conklin et al., 1992; Li und Kaplan, 1998). Verschiedene CDF-Proteine aus Säugern vermitteln den Austransport von Zn aus dem Cytosol. ZnT1 aus Ratten beispielsweise ist Plasmamembran-lokalisiert und transportiert Zn aus dem Cytosol (Palmiter und Findley, 1995). ZnT2 vermittelt die Akkumulation von Zn in Vesikeln (Palmiter et al., 1996), während der nur im Gehirn von Mäusen exprimierte ZnT3 an der Zn-Beladung synaptischer Vesikel beteiligt ist (Palmiter et al., 1998). Der erste in *Arabidopsis* beschriebene CDF-Vertreter ist ZAT (van der Zaal, 1999). Dessen 35S-Promotor-getriebene Überexpression in *A. thaliana* bewirkt eine leichte Erhöhung der  $Zn^{2+}$ -Toleranz und der Zn-Akkumulation, was für eine Beteiligung am Zn-Transport in die Vakuole oder ein anderes Kompartiment spricht.



**Abb. 2:** Der Phytochelatin-Weg (blau hervorgehoben) und mögliche andere Mechanismen der  $Cd^{2+}$ -Detoxifizierung. Die PC-Synthese geht von GSH aus, welches wiederum u.a. aus Cystein gebildet wird, dessen Synthese ein Produkt der Sulfatassimilation ist. Diese Prozesse oberhalb der PC-Synthese sind durch Pfeile nur angedeutet. PC-Cd-Komplexe (LMW) werden in *S. pombe* durch den ABC-Transporter Hmt1 in die Vakuole transportiert. Auch in pflanzlichen Zellen wird angenommen, dass ein ABC-Transporter für diese Aktivität verantwortlich ist. In der Vakuole werden unter Addition von Sulfid HMW-Komplexe gebildet. Für Pflanzen und andere Organismen diskutierte weitere Wege der  $Cd^{2+}$ -Detoxifizierung sind die vakuoläre Sequestrierung vermittelt durch CDF-Proteine oder  $Cd^{2+}/H^{+}$ -Antiporter, die Bindung an Metallothioneine oder der Austransport abhängig von CPx-Typ-ATPasen. Für Referenzen siehe Text.

Das aktive Auspumpen von Metallionen ist der wichtigste Toleranzmechanismus in Bakterien (Silver, 1996). Vermittelt wird dies meist durch für die jeweiligen Ionen spezifische P-Typ-ATPasen. Metallionen-transportierende P-Typ-ATPasen weisen ein charakteristisches Sequenzmotif auf, CPx (Solioz und Vulpe, 1996), das auch in einer ganzen Reihe von pflanzlichen ATPase-Sequenzen zu finden ist (Axelsen und Palmgren, 2001). Evidenz für ein Auspumpen von Metallionen als Mechanismus der Toleranz fehlt jedoch bisher ebenso wie ein Nachweis der Aktivität dieser putativen pflanzlichen Metallpumpen. Ausnahme ist das oben zitierte RAN1 Protein, welches wahrscheinlich in Post-Golgi-Vesikeln lokalisiert ist und essentiell für die Kupfer-Versorgung des Ethylen-Rezeptors (Hirayama et al., 1999) und wahrscheinlich anderer Cu-abhängiger Proteine ist (Woeste und Kieber, 2000).

### 2.1.5 Regulation der Metallhomöostase

Die Komplexität der Metallhomöostase, also des Zusammenspiels verschiedener Transport- und Chelatierungsprozesse, erfordert eine genaue Regulation der Synthese und Stabilität der einzelnen Komponenten. Veränderungen in der Transkription von Metallhomöostase- und Toleranzgenen erfolgen sowohl in der Antwort auf Mikronährstoff-Defizienz als auch in Antwort auf zu hohe externe Konzentrationen essentieller wie nicht-essentieller Metalle. Zahlreiche hochaffine Aufnahmesysteme z.B. werden unter Mangelbedingungen induziert. Gezeigt wurde dies für *IRT1* (Eide et al., 1996) und auch andere Transportergene der *ZIP*-Familie (Grotz et al., 1998). Erkenntnisse sind vor allem für die pflanzlichen Antworten auf Fe-Defizienz vorhanden (für eine Übersicht: Marschner, 1995; Connolly und Guerinot, 2002).

Eine typische Folge von  $\text{Cd}^{2+}$ - und  $\text{Cu}^{2+}$ -Exposition ist die Induktion von Genen, die an der Sulfatassimilation, der Cysteinbiosynthese und der Glutathionbiosynthese beteiligt sind, d.h. also des metabolischen Weges „oberhalb“ der PC-Synthese (Abb. 2). Die Expression von O-Acetylserin-Lyase-Genen wird in *A. thaliana* induziert durch  $\text{Cd}^{2+}$  und eine Überexpression kann die  $\text{Cd}^{2+}$ -Toleranz erhöhen (Dominguez-Solis et al., 2001).  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$ , nicht jedoch oxidativer Stress oder andere toxische Metalle, induzieren für  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase, Glutathion-Synthetase und Glutathion-Reduktase kodierende Gene (Xiang und Oliver, 1998). Die Antworten auf  $\text{Cd}^{2+}$ -Exposition sind anscheinend nicht einfach eine unspezifische Antwort auf Schädigung. Ueki und Citovsky (2002) z.B. haben gezeigt, dass in *Nicotiana tabacum* verschiedene Gruppen von Genen reguliert werden je nachdem, ob eine wachstumsinhibierende oder nicht-wachstumsinhibierende Konzentration

eingesetzt wird. Ihnen gelang es, ein nur unter niedriger  $\text{Cd}^{2+}$ -Belastung induziertes Gen zu identifizieren, das wahrscheinlich verantwortlich ist für die vorher beschriebene Hemmung der Virusausbreitung unter diesen Bedingungen (Citovsky et al., 1998).

Die für eine Regulation zu postulierende Perzeption der Metallkonzentration intra- und/oder extrazellulär liegt bisher weitgehend im Dunkeln. Für *S. cerevisiae* sind die Transkriptionsfaktoren Mac1 und Amt1 charakterisiert worden, welche die Transkription des hochaffinen Cu-Transporters Ctr1 regulieren und selbst metallbindend sind (Winge et al., 1998). Vermittelt durch den Transkriptionsfaktor Zap1 werden in *S. cerevisiae* mindestens 46 Gene in Antwort auf veränderte  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentrationen reguliert, unter ihnen wiederum  $\text{Zn}^{2+}$ -Aufnahmesysteme (Lyons et al., 2000). In tierischen Systemen ist die Induktion von MT-Genen nach Metallexposition teilweise molekular aufgeklärt (Saydam et al., 2002). Aus Pflanzen sind bisher - mit Ausnahme von zwei an der Antwort auf Fe-Defizienz beteiligte Proteine, Fer aus *Lycopersicon esculentum* und FRD3 aus *A. thaliana* (Ling et al., 2002; Rogers et al., 2002) - weder regulatorische Proteine noch Signaltransduktionskaskaden identifiziert worden, die eine Regulation in Antwort auf schwankende Metallkonzentrationen vermitteln könnten. Indirekte pharmakologische Evidenz existiert für eine Phosphorylierungsabhängigkeit der Induktion von *Arabidopsis*-Genen durch  $\text{Cd}^{2+}$  (Suzuki et al., 2001).

An pflanzlichen Signaltransduktionskaskaden, die Antworten auf abiotische Stressfaktoren vermitteln, ist nach heutigem Erkenntnisstand häufig ein typischer Satz von Proteinen beteiligt. Zu diesen gehören  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierte Proteine wie Calmodulin oder Ca-abhängige Proteinkinasen, MAP-Kinasen, Proteinphosphatasen und Transkriptionsfaktoren (Knight und Knight, 2001). Für eine ausführliche Diskussion der Regulation pflanzlicher Antworten auf abiotische Stressfaktoren siehe: Zhu, 2001; Vranova et al., 2002.

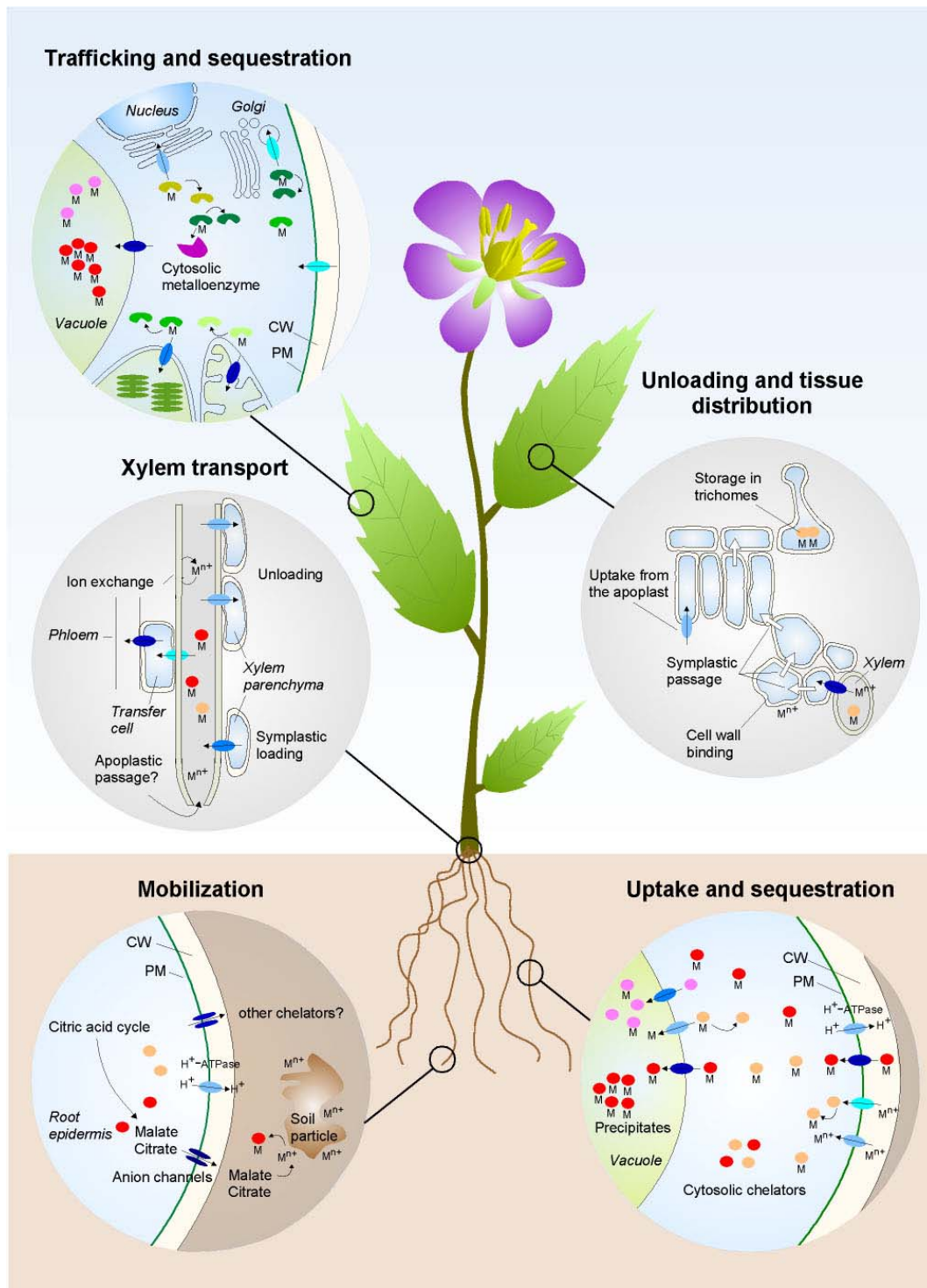
### 2.1.6 Die pflanzliche Hyperakkumulation von Metallen

Ein vor allem von Pflanzen bekannter Aspekt der Metallhomöostase und -toleranz ist die Hyperakkumulation einiger Metalle. Auf bestimmten natürlich oder durch anthropogene Einflüsse metallreichen Standorten ist eine spezifische Vegetation zu finden, deren Vertreter eine gesteigerte Toleranz gegenüber bestimmten Metallionen aufweisen (Ernst, 1974; Baker und Brooks, 1989). Grundsätzlich sind zwei Strategien dieser Pflanzen zu unterscheiden: Ausschluss und Hyperakkumulation. Mehr als 400 Pflanzenarten sind bisher als Metallhyperakkumulierer beschrieben worden (Baker und Brooks, 1989). Etwa 75 % dieser

Arten hyperakkumulieren Ni, die übrigen vor allem Zn oder Se. Einzelne Beispiele existieren auch für die Hyperakkumulation von Cd (Escarré et al., 2000) und As (Ma et al., 2001). Als Hyperakkumulierer werden Pflanzen definiert, die im Feld in Blättern einen Gehalt  $> 0.1\%$  des Trockengewichts an Metallen wie Ni zeigen. Für Zn ist das Limit bei  $> 1\%$ , für Cd  $> 0.01\%$  des Trockengewichts. Zudem muss das Spross/Wurzel-Verhältnis des Metallgehalts  $> 1$  sein (Baker und Brooks, 1989). Für die meisten Pflanzenarten gilt, dass die Wurzeln einen deutlich höheren Metallgehalt aufweisen.

Das Interesse an der Hypertoleranz und -akkumulation ist vor allem durch die in den letzten Jahren in den Blickpunkt gerückte Idee der Phytoremediation gefördert worden (Raskin, 1996; Chaney et al., 1997; Salt et al., 1998). Hyperakkumulierende Pflanzen sollen zur Sanierung von metallbelasteten Böden und Gewässern eingesetzt werden. Um die Erfolgsaussichten dieser Technik zu verbessern, ist ein molekulares Verständnis der Hyperakkumulation unabdingbar. Biotechnologisch ist die Metallakkumulation durch Pflanzen zudem von Interesse, weil einerseits das Ziel existiert, Nahrungspflanzen mit einem höheren Gehalt an essentiellen Metallen wie Fe und Zn anzureichern und andererseits den Gehalt an nicht-essentiellen, toxischen Metallen wie Cd in Nahrungspflanzen zu senken (Guerinot und Salt, 2001). Eine Reihe von Prozessen determinieren nach heutiger Erkenntnis die Metallakkumulationsrate von Pflanzen (Abb. 3) (für eine genauere Beschreibung und Diskussion dieser Prozesse siehe: Clemens et al., 2002). Diese sind: die Effizienz der Mobilisierung aus dem Boden; die Aufnahme- und Sequestrierungskapazität von Wurzelzellen, die Mobilisierbarkeit der Metalle für die Beladung des Xylems, schließlich die Kapazität der Aufnahme und Speicherung in Blattzellen. Voraussetzung für die Hyperakkumulation ist außerdem eine erhöhte Metalltoleranz.

Daten zu den molekularen Mechanismen der Hyperakkumulation wurden zuerst für  $\text{Ni}^{2+}$  erarbeitet. In *Alyssum lesbiacum* konnte die sogenannte "Histidin-Antwort" nachgewiesen werden, die stark induzierte Bildung von Histidin bei Ni-Exposition. Histidin chelatiert  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen und die Erhöhung der Histidin-Konzentrationen durch Fütterung war ausreichend, die nicht-akkumulierende *Alyssum montanum* Ni hyperakkumulieren zu lassen (Krämer et al., 1996). Allerdings ist die Histidin-Antwort kein generell für Ni-Hyperakkumulierer gültiger Mechanismus, wie inzwischen Studien an *Thlaspi goesingense* ergaben (Persans et al., 1999). Eine Rolle für Metalltransporter ist erstmals für die Zn-Hyperakkumulation durch *Thlaspi caerulescens* gezeigt worden. Der Vergleich von *T.*



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der nach heutigem Kenntnisstand wesentlichen Prozesse für die Aufnahme, Verteilung und Speicherung von Metallen in Pflanzen. Metallionen werden durch Sekretion von Chelatoren oder durch Ansäuerung der Rhizosphäre mobilisiert. Aufnahme von Metallionen oder Metall-Chelat-Komplexen wird vermittelt durch verschiedene Transportsysteme in der Plasmamembran. In den Zellen werden Metallionen chelatiert und überschüssige Mengen werden durch Transport in die Vakuole sequestriert. Über das vor allem symplastisch beladene Xylem gelangen Metallionen in den Spross. Im Xylem liegen Metalle wahrscheinlich sowohl als hydratisierte Ionen wie auch als Chelat-Komplexe vor. In den Blättern sind wiederum Transporter für die Aufnahme aus dem Apoplasten in die Zellen verantwortlich. *Metal trafficking* wird – in allen Zellen - vermittelt durch spezifische Metallochaperone und Transportsysteme in Endomembranen. M: Metall; Kreise: Chelatoren, Ovale: Transporter; bohnenförmige Strukturen: Metallochaperone (Clemens et al., 2002).

*caerulescens* mit der nicht-akkumulierenden Verwandten *T. arvense* hatte gezeigt, dass die  $Zn^{2+}$ -Aufnahmeaktivität in Wurzeln eine etwa 4.5fach höhere  $V_{max}$  zeigt (Lasat et al., 1996). Die Suche nach  $Zn^{2+}$ -Transportern hat zur Klonierung von ZNT1 geführt, einem Transporter der ZIP-Familie (Pence et al., 2000). Dieser komplementiert die *S. cerevisiae*  $Zn^{2+}$ -Aufnahmemutante *zhy3*. In guter Übereinstimmung mit den physiologischen Daten zeigte sich eine konstitutiv deutlich höhere Expression des ZNT1-Gens in *T. caerulescens*, während in *T. arvense* nur Expression unter Zn-Mangel detektierbar war. Eine Ursache der Hyperakkumulation könnte demnach eine De-Regulation der  $Zn^{2+}$ -Transporter-Expression sein. Ähnlich haben Studien zur Expression einiger putativer  $Zn^{2+}$ -Transporter der ZIP- und der CDF-Familie in Pflanzen verschiedener *T. caerulescens*-Populationen eine gegenüber *T. arvense* extrem erhöhte Expression gezeigt (Assunção et al., 2001).

Prozesse, die essentiell sind für die basale Metalltoleranz, wie die Bildung von Phytochelatinen, scheinen soweit bisher bekannt keine Rolle zu spielen bei der Ausbildung der spezifischen Hypertoleranz einiger Arten oder Genotypen. Für *Silene vulgaris*-Ökotypen (Schat und Kalff, 1992; de Knecht et al., 1994) und für *Silene vulgaris*- und *Lycopersicon esculentum*-Zellkulturen (Leopold et al., 1999) konnten keine Unterschiede in der Kinetik, Lokalisation oder Stärke der PC-Synthese detektiert werden, die eine differentielle Metalltoleranz erklären könnten. Einzig für As wird eine Rolle der PC-Bildung für die Hervorbringung erhöhter Toleranz angenommen (Schat et al., 2002). Abgesehen von der oben geschilderten Histidin-Antwort und der verstärkten Zn-Speicherung in Vakuolen (Chardonens et al., 1999) sind damit noch keine Einsichten in die molekulare Natur der Hyperakkumulation und -toleranz gewonnen worden.

## 2.2 Aufnahme von $Cd^{2+}$ -Ionen

Die wesentlichen Fragestellungen zu Beginn meiner Arbeiten ergaben sich zunächst aus dem Konzept der Phytoremediation (Raskin, 1996). Molekulare Grundlagen der Akkumulation von bestimmten Metallen waren nicht verstanden. Weder die Aufnahme von essentiellen wie nicht-essentiellen Metallionen in Pflanzenzellen noch die Mechanismen der Detoxifizierung und Speicherung von Metallen waren molekular aufgeklärt. Cadmium wurde als Beispielelement gewählt für die Suche nach Aufnahme- und Detoxifizierungssystemen, da es als sehr toxisches, durch industrielle Prozesse in die Umwelt gebrachtes Metall ein mögliches Zielobjekt für die Phytoremediation darstellt. Weiterhin eröffnet es bessere

experimentelle Möglichkeiten als etwa Blei, da  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen weniger leicht in Nährmedien präzipitieren.

Kurz vor Beginn meiner Arbeiten waren die ersten pflanzlichen Kationentransporter identifiziert worden (Anderson et al., 1992; Sentenac et al., 1992; Schachtman et al., 1992; Schachtman und Schroeder, 1994). Gelungen war dies durch Komplementation von entsprechenden *S. cerevisiae*-Transportmutanten (für eine Übersicht: Fox und Guerinot, 1998). Es konnte nun die Frage gestellt werden, ob einer dieser Transporter auch die Aufnahme von  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen vermittelt. Grundlegende Annahme war dabei, dass keine Aufnahmesysteme für nicht-essentielle Ionen wie  $\text{Cd}^{2+}$  existieren, dass vielmehr die Aufnahme durch Transporter für essentielle Ionen erfolgt. Von Antosiewicz und Schroeder war beobachtet worden, dass Expression von LCT1, einem *T. aestivum*-Transporter, der durch Komplementation des  $\text{K}^+$ -Aufnahmedefekts von *trk1trk2*-Zellen (Anderson et al., 1992) kloniert worden war (Schachtman et al., 1997), zu einer erhöhten  $\text{Cd}^{2+}$ -Sensitivität führte. Dieser Phänotyp ist von mir im Zuge der systematischen Analyse bekannter Kationentransporter bestätigt worden. LCT1 verursachte als einziger der getesteten Transporter diesen Effekt und ist deshalb funktionell genauer charakterisiert worden (Clemens et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass LCT1-Expression in der Tat eine Erhöhung der  $\text{Cd}^{2+}$ -Aufnahme in Hefezellen bewirkt. Damit war zum ersten Mal ein pflanzlicher Transporter identifiziert worden, der die Aufnahme von nicht-essentiellen Metallionen vermittelt.

Entsprechend der oben erwähnten Annahme wurde nach dem natürlichen Substrat für LCT1 gesucht. Die kaum signifikante Komplementation des *trk1trk2* Stammes ließ vermuten, dass  $\text{K}^+$  Ionen dies nicht sind. Zudem gab es für tierische Zellen Hinweise, dass  $\text{Cd}^{2+}$ -Aufnahme durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle erfolgen kann (Hinkle et al., 1992).  $\text{Cd}^{2+}$ -Aufnahmeversuche in Gegenwart verschiedener Kationen ergaben dann, dass der auf LCT1-Expression zurückzuführende Einstrom von  $\text{Cd}^{2+}$  Ionen durch  $\text{Ca}^{2+}$  praktisch vollständig kompetiert wurde, während etwa  $\text{Mg}^{2+}$  kaum einen Einfluss auf die Transportrate hatte. Um der daraus resultierenden Hypothese, dass LCT1 einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter repräsentiert, weiter nachzugehen, wurde zunächst das Wachstum von Hefezellen in Gegenwart millimolarer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen analysiert. LCT1-Expression führte dabei zu einer ausgeprägten Hemmung des Wachstums, während Konzentrationen von 3 mM im Medium keinen Effekt auf Kontrollzellen hatten. Halbmaximale Hemmung der LCT1-exprimierenden Zellen trat bei etwa 1,5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  auf. Ähnlich wie für  $\text{Cd}^{2+}$  konnte anschließend gezeigt werden, dass diese Steigerung der Sensitivität mit einer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmerate um etwa den Faktor 2



korrelierte. Damit waren deutliche Hinweise auf eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität von LCT1 gefunden.

Um dies weiter zu untersuchen, wurde von John Ward ein *S. cerevisiae midI*-Knock-out hergestellt. Das *midI*-Gen kodiert für einen Transporter, der während der *mating response* von *S. cerevisiae* einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zellen vermittelt (Iida et al., 1994). Die *mating response* wird induziert durch Gabe von  $\alpha$ -Faktor. Ein Defekt des *midI*-Gens führt dazu, daß der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach  $\alpha$ -Faktor-Applikation unterbleibt und die Zellen sterben. Durch LCT1-Expression konnte die *midI*-Mutante komplementiert werden, d.h. das Absterben der Zellen unterblieb (Clemens et al., 1998).

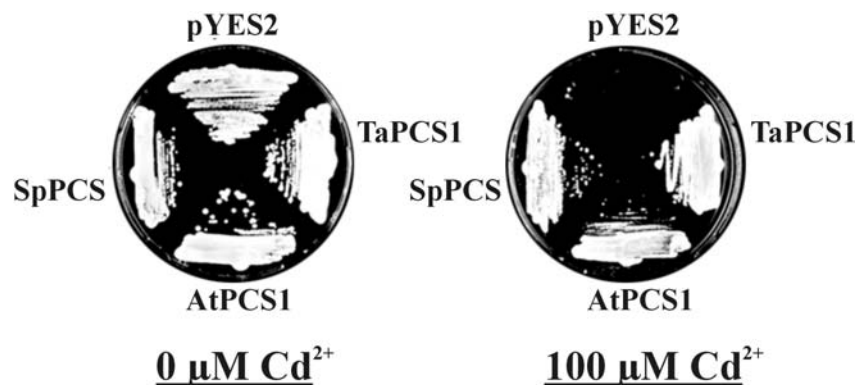
Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität und erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme der LCT1-exprimierenden *S. cerevisiae*-Zellen sowie die Komplementation der *midI*-Mutation durch LCT1 haben zusammengenommen zu der These geführt, dass LCT1 den ersten klonierten pflanzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter repräsentiert (Clemens et al., 1998; Maathuis und Sanders, 1999; Sanders et al., 1999). Im Klassifizierungssystem für Transporter (Saier, 2000) konstituiert LCT1 eine eigene Familie (TC 9A.20) in der Gruppe der *Transporters of unknown classification*.

## 2.3 $\text{Cd}^{2+}$ -Toleranz: Phytochelatinsynthesen

### 2.3.1 Die Klonierung und Charakterisierung von Phytochelatinsynthesen

Nach dem Auffinden eines möglichen Eintrittsweges für nichtessentielle  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen in pflanzliche Zellen hinein stellte sich als nächstes die Frage nach den Mechanismen der Detoxifizierung. Erhöhte Toleranz wurde und wird als eine Voraussetzung für die Akkumulation von Metallen angesehen (Chaney et al., 1997). Molekular war zu diesem Zeitpunkt mit Ausnahme von Metallothioneinen (Zhou und Goldsbrough, 1994) noch keine Komponente der pflanzlichen Metalltoleranz identifiziert worden. Als methodischer Ansatz für die Isolierung pflanzlicher Toleranzfaktoren wurde die Expressionsklonierung in *S. cerevisiae* gewählt. Aus einer aus *Triticum aestivum*-Wurzelspitzen hergestellten cDNA-Bank (Schachtman und Schroeder, 1994) konnten verschiedene Klone eines Gens isoliert werden, das *S. cerevisiae* Wildtyp-Zellen eine signifikant gesteigerte  $\text{Cd}^{2+}$ -Toleranz verlieh. Der Wert für halbmaximale Wachstumsinhibierung wurde um etwa den Faktor 20 gesteigert durch Expression des inzwischen *TaPCS1* genannten Gens von einem Multicopy-Plasmid (Clemens et al., 1999). Sequenzanalyse ergab keinerlei Ähnlichkeit zu Genen bekannter Funktion. Lediglich ein *A. thaliana Expressed sequence tag* (EST) sowie je eine homologe genomische

Sequenz aus *S. pombe* und *C. elegans* waren zum damaligen Zeitpunkt in GenBank zu finden. Auch das *A. thaliana*- und das *S. pombe*-Gen (*AtPCS1* bzw. *SpPCS*) erhöhten nach Expression in *S. cerevisiae* die  $\text{Cd}^{2+}$ -Toleranz (Abb. 4). RT-PCR-Versuche haben für die *PCS*-Gene in *A. thaliana* und *T. aestivum* eine Expression in Wurzel und Spross gezeigt. Experimente mit kompetitiver PCR zur Quantifizierung der *TaPCS1*-mRNA deuteten eine fünf- bis zehnfache Induktion des *TaPCS1*-Gens in Wurzeln von  $\text{Cd}^{2+}$ -behandelten Weizenkeimlingen an.



**Abb. 4:** Expression verschiedener *PCS*-Gene erhöht die  $\text{Cd}^{2+}$ -Toleranz von *S. cerevisiae*-Zellen. Wildtyp-Zellen, transformiert mit entweder leerem pYES2-Vektor oder *PCS* Genen aus *Triticum aestivum* (*TaPCS1*), *Arabidopsis thaliana* (*AtPCS1*) oder *Schizosaccharomyces pombe* (*SpPCS*) in pYES2 wurden auf Medium ohne (links) und mit  $100 \mu\text{M Cd}^{2+}$  (rechts) angezogen (Clemens et al., 1999).

In *TaPCS1*-exprimierenden Hefezellen war die höhere Toleranz gegenüber  $\text{Cd}^{2+}$  begleitet von einer Zunahme der Cadmium-Akkumulation. Ein Herauspumpen der  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen aus der Zelle analog zu bakteriellen Systemen wurde daher als Mechanismus der Toleranz ausgeschlossen. Vielmehr schien die *PCS*-Expression zu einer verstärkten Sequestrierung der  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen zu führen. Wichtig zu bemerken ist in diesem Zusammenhang, dass bereits eine sehr schwache Expression des gal-Promotor-kontrollierten *TaPCS1*-Gens in Abwesenheit von Galaktose für die Ausprägung des  $\text{Cd}^{2+}$ -Toleranzphänotyps ausreichte. Dies machte ein unspezifisches Binden von  $\text{Cd}^{2+}$  durch ein überexprimiertes Protein als Erklärung für den Phänotyp unwahrscheinlich. Als Arbeitshypothese wurde zunächst die durch *PCS*-Proteine vermittelte intrazelluläre Sequestrierung von Cd angenommen. Versuche mit verschiedenen *S. cerevisiae*-Mutanten zeigten jedoch, dass der Toleranzphänotyp weder von einem pH-Gradienten über der Vakuolenmembran noch vom Vorhandensein funktioneller Vakuolen abhängig war.

Die im heterologen System *S. cerevisiae* messbaren Phänotypen nach Expression von *PCS*-Genen, also höhere Toleranz und Akkumulation, ließen – trotz der festgestellten  $\text{Cd}^{2+}$ -

Responsivität des *TaPCS1*-Gens - noch keinen Rückschluss auf eine physiologische Relevanz der *PCS*-Gene für die Metalltoleranz zu. Deshalb wurde das – wie Southern-Analyse gezeigt hatte - einzige *PCS*-Homologe in *S. pombe* durch Marker-Insertion über homologe Rekombination ausgeschaltet. Der resultierende  $\Delta SpPCS$ -Stamm zeigte eine extrem gesteigerte  $Cd^{2+}$ -Sensitivität sowie eine leicht gesteigerte Cu-Sensitivität (Clemens et al., 1999). Damit war der Nachweis der physiologischen Relevanz der *PCS*-Gene erbracht.

Die erwähnten Experimente mit verschiedenen *S. cerevisiae*-Mutanten sowie die Modulation der Expressionsniveaus hatten Hinweise auf eine mögliche katalytische Rolle der *PCS*-Genprodukte bei der cytosolischen Chelatierung von Metallionen ergeben. Das deutete auf eine Beteiligung an der Synthese von Phytochelatinen (PCs), kleinen aus Glutathion-Einheiten aufgebauten metallbindenden Peptiden, hin. Diese waren in Pflanzen erstmals 1985 beschrieben worden (Grill et al., 1985). Die nicht-ribosomale Bildung dieser Peptide wird durch das Enzym Phytochelatinsynthase katalysiert (Grill et al., 1989). Das für dieses Enzym kodierende Gen war bis dato nicht gefunden worden. Erste Evidenz dafür, dass es sich bei den *PCS*-Genen um Phytochelatinsynthase-Gene handeln könnte, erbrachte ein Versuch, der die Glutathion-Abhängigkeit des *PCS*-vermittelten Phänotyps in *S. cerevisiae* zeigte. Hemmung der Glutathion-Biosynthese durch Buthioninsulfoximin (BSO) (Griffith und Meister, 1979) hatte keinen Einfluss auf die durch ein aus *A. thaliana* kloniertes Metallothionein (Clemens und Schroeder, unveröffentlicht) vermittelte  $Cd^{2+}$ -Toleranz. Die *TaPCS1*-abhängige  $Cd^{2+}$ -Toleranz dagegen wurde durch BSO dosisabhängig reduziert. Daraufhin wurde PC-Bildung in *S. pombe*-Zellen in Antwort auf  $Cd^{2+}$ -Exposition gemessen. Im Unterschied zu Wildtyp-Zellen waren über HPLC und Fluoreszenzdetektion nach Markierung der Thiole mit Monobrombiman keine PCs nachzuweisen. Umgekehrt bildeten *PCS*-exprimierende *S. cerevisiae*-Zellen – hier im Unterschied zu Wildtyp-Zellen – nach  $Cd^{2+}$ -Zugabe PCs (Clemens et al., 1999). Schließlich wurde HA-getaggtetes *SpPCS* gereinigt und für das Protein PC-Synthase-Aktivität demonstriert. Damit war der Nachweis erbracht, dass es sich bei den *PCS*-Genen um für Phytochelatinsynthasen kodierende Gene handelt. Zwei anderen Arbeitsgruppen ist gleichzeitig und unabhängig ebenfalls die Klonierung und funktionelle Charakterisierung von *PCS*-Genen gelungen (Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999). Durch diese Arbeiten ist die molekulare Aufklärung des nach heutigem Kenntnisstand wichtigsten pflanzlichen Mechanismus der Detoxifizierung von Cd, As und Hg gelungen. Entsprechend groß war das Echo nach der Veröffentlichung der Ergebnisse der drei Gruppen. In mehreren wichtigen Zeitschriften sind Zusammenfassungen erschienen (Cobbett 1999, 2000a, 2000b)

und auch ein News-Artikel in *Science* (Moffat, 1999) hat die Klonierung der *PCS*-Gene behandelt.

### 2.3.2 Eine funktionelle PC-Synthase in *C. elegans*

Das Vorkommen von Phytochelatinen ist bis jetzt nur in Pflanzen, Pilzen und Algen beschrieben worden (Rauser, 1995). Es war daher ein überraschender Befund, dass das Genom von *C. elegans* ein Gen mit Ähnlichkeiten zu *PCS*-Genen enthält (DDBJ/EMBL/GenBank Acc. No. 266513, =CePCS). Das abgeleitete vorhergesagte Protein stimmt zu 30 % mit TaPCS1 und zu 29 % mit AtPCS1 überein. Auch im Genom von *Caenorhabditis brueggiae* war später eine *PCS*-homologe Sequenz gefunden worden (DDBJ/EMBL/GenBank Acc. No. AC084525). Zu klären war, ob CePCS PC-Synthase-Aktivität besitzt.

Aus *C. elegans* cDNA (zur Verfügung gestellt von Raffi Aroian, UC San Diego, La Jolla) konnte das *CePCS*-Gen amplifiziert werden. *CePCS* wird also exprimiert. Durch Expression von CePCS ließ sich die Cd<sup>2+</sup>-Sensitivität des *SpPCS*-Knock-out-Stammes komplementieren (Clemens et al., 2001). HPLC-Analyse zeigte die CePCS-abhängige Bildung von Thiol-Verbindungen, deren Retentionszeiten mit denen von PC2 bzw. PC3 übereinstimmten. Um einen zweifelsfreien Nachweis der PC-Bildung durch CePCS-exprimierende Zellen nach Cd<sup>2+</sup>-Exposition zu erhalten, wurden TFA-Extrakte durch Thomas Degenkolb mittels Cap-LC-Q-TOF-MS analysiert. Die Massenbestimmung ergab für die beiden Verbindungen mit [M+H]<sup>+</sup>-Werten von 540,1389 bzw. 772,1912 sehr gute Übereinstimmung mit den kalkulierten [M+H]<sup>+</sup>-Werten für PC2 und PC3 von 540,1429 bzw. 772,1946. Es konnte also geschlossen werden, dass CePCS eine funktionelle PC-Synthase darstellt. Auch die Aktivierbarkeit von CePCS durch verschiedene Metallionen wurde untersucht und verglichen mit derjenigen von SpPCS in Wildtyp-Zellen. Dabei zeigten sich nur geringfügige Unterschiede. Für beide Proteine war die Aktivierung durch Cd<sup>2+</sup> am größten, gefolgt von AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup> und Cu. Ni<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> induzierten nur kaum detektierbare PC2-Bildung während in Co<sup>2+</sup>- und Mn<sup>2+</sup>-behandelten Zellen keinerlei PC-Synthese nachweisbar war (Clemens et al., 2001).

Praktisch gleichzeitig mit unseren Ergebnissen ist eine Studie von Vatamaniuk et al. (2001) veröffentlicht worden, die PCS-Aktivität von CePCS nach Expression in *S. cerevisiae* nachwies. Zudem wurde CePCS in *C. elegans* durch RNAi inaktiviert. Konsequenz der Inaktivierung war deutlich erhöhte Cd<sup>2+</sup>-Sensitivität. Damit wurde gezeigt, dass PC-

Synthasen auch in einigen tierischen Organismen essentiell für die Detoxifizierung von  $\text{Cd}^{2+}$  - und möglicherweise anderen Metallionen – sind. PCS-homologe Sequenzen finden sich zudem in den Genomen anderer Nematoden, Trematoden und Rundwürmer. Unter diesen befinden sich einige Humanpathogene (z.B. *Brugia malayi* und *Schistosoma*-Arten), was zu dem Vorschlag geführt hat, dass PC-Synthasen sinnvolle *targets* für die Entwicklung von Pharmazeutika sein könnten (Vatamaniuk et al., 2002). Auch das Genom von *Dictyostelium discoideum* enthält ein PCS-Orthologes (Cobbett und Goldsbrough, 2002). PCS-ähnliche EST-Sequenzen sind zudem aus Oomyceten (*Phytophthora infestans*, *P. sojae*) bekannt sowie aus dem zu den *Asciidiaceae* gehörigen Modellorganismus *Ciona intestinalis* (Dehal et al., 2002).

### 2.3.3 Charakterisierung des zweiten PCS-Gens in *A. thaliana*

Für einige  $\text{Cd}^{2+}$ -Toleranzfaktoren wie z.B. in Säugetierzellen exprimierte Metallothioneine wird postuliert, dass die entgiftende Wirkung bei  $\text{Cd}^{2+}$ -Exposition nur ein Nebenprodukt und nicht die eigentliche – bislang unbekannte - physiologische Funktion darstellt.  $\text{Cd}^{2+}$ -Belastung sei viel zu selten, um die Konservierung dieser ubiquitären Proteine im Verlauf der Evolution zu erklären (Palmiter, 1998). Ähnlich lässt sich auch für PCS-Gene fragen, warum sie eine solche Verbreitung haben sollten, wenn die Funktion einzig die Vermittlung von Toleranz gegenüber Cd, As und Hg ist, deren Gehalte in der Umwelt erst im Zuge industrieller Aktivitäten der letzten 150 Jahre stark zugenommen haben (Nriagu und Pacyna, 1988). Ähnlich wie für MTs ist deshalb auch für PCs schon formuliert worden, dass die  $\text{Cd}^{2+}$ -Entgiftung nur eine zufällige biochemische Aktivität ist (Chaney et al., 1997). Eine Bedeutung der PC-Synthese für die Metallhomöostase ist früh vorgeschlagen worden (Grill et al., 1988). PCs könnten bei Überangebot als temporäre Speicher für Cu- und Zn-Ionen dienen und diese Ko-Faktoren bei Bedarf an Cu- bzw. Zn-abhängige Enzyme abgeben. *In vitro*-Versuche haben gezeigt, dass Cu-PC-Komplexe die Apo-Form der Diaminoxidase und Zn-PC-Komplexe die Apoform der Carboanhydrase reaktivieren konnten (Thumann et al., 1991). Für PC-defiziente Mutanten sind jedoch bislang keine Phänotypen berichtet worden, die auf eine Störung der Homöostase essentieller Metalle hindeuten. Die *A. thaliana cad1-3*-Mutante ist  $\text{Cd}^{2+}$ -hypersensitiv, wächst jedoch normal und zeigt keine Anzeichen von Nährstoffdefizienz (Howden et al., 1995).

Angesichts des ausgeprägten Phänotyps der *cad1-3*-Mutante und der Frage nach weiteren Funktionen von PC-Synthasen war von Interesse, dass das *A. thaliana*-Genom ein

zweites PCS-Gen enthält (*AtPCS2*, AGI code At1g03980). Es wurden von mir deshalb Untersuchungen zur Funktion von *AtPCS2* initiiert (Cazalé und Clemens, 2001). Zunächst konnte von uns gezeigt werden, dass auch mit den sensitiveren Methoden der Fluoreszenz-HPLC und Cap-LC-ESI-Q-TOF-MS keine PC-Bildung in  $\text{Cd}^{2+}$ -behandelten *cad1-3*-Pflanzen zu detektieren ist. Nach Bestätigung der PC-Defizienz der Mutante war zu klären, ob *AtPCS2* exprimiert wird. Zu *AtPCS2* gehörige ESTs waren in den Datenbanken nicht zu finden, was eine sehr niedrige Expression vermuten ließ. Schließlich gelang der Nachweis der Expression in Wurzeln und Blättern von hydroponisch angezogenen *A. thaliana*-Pflanzen (Ökotyp Columbia und *cad1-3*) mittels RT-PCR. Semiquantitative RT-PCR durch  $^{32}\text{P}$ -Einbau in die PCR-Produkte ergab, dass in *A. thaliana*-Wurzeln das Expressionsniveau von *AtPCS1* und *AtPCS2* vergleichbar hoch ist. Damit war eine fehlende Expression von *AtPCS2* als Ursache für die  $\text{Cd}^{2+}$ -Sensitivität von *cad1-3*-Pflanzen auszuschließen. Die *AtPCS2*-cDNA wurde kloniert und *AtPCS2* wurde in zwei verschiedenen heterologen Systemen, *S. cerevisiae* und PCS-defizienten *S. pombe*-Zellen, exprimiert. In beiden Fällen konnte PC-Bildung nach  $\text{Cd}^{2+}$ -Gabe zum Medium beobachtet werden. Die Aktivierbarkeit durch verschiedene Metallionen wurde getestet und nur für Cu ein Unterschied gefunden. In *S. pombe* exprimierte *AtPCS2* wurde durch dieses Metall nicht aktiviert. Bilanz der Arbeiten an *AtPCS2* ist damit bisher, dass die  $\text{Cd}^{2+}$ -Sensitivität der *cad1-3*-Mutante mit den bisher vorliegenden Beobachtungen nicht erklärt werden kann. Untersucht wird von uns nun, ob die beiden PCS-Proteine die PC-Synthese in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten katalysieren oder die Präsenz eines defekten Proteins die Aktivität des zweiten intakten stört.

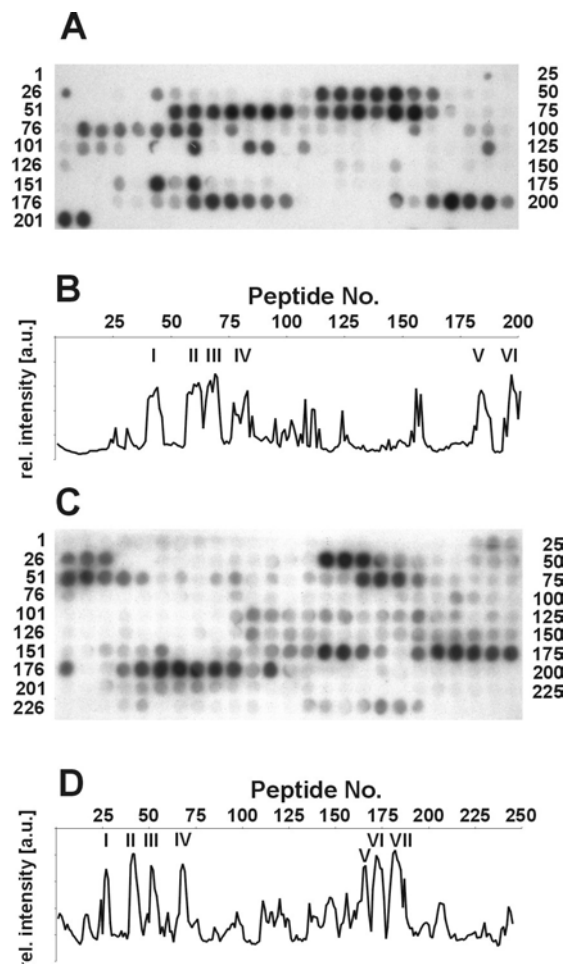
#### 2.3.4 Die Aktivierung der PC-Synthese durch $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen

Zu den interessanten biochemischen Eigenschaften der PC-Synthese gehört die Aktivierung durch verschiedene Metallionen und Halbmetalle. Früh war festgestellt worden, dass die Synthese von PCs ausgelöst wird durch die Behandlung von Zellen mit wachstumshemmenden Dosen entsprechender Ionen. Entsprechend war bei der Etablierung des *in vitro* PC-Synthese-Assays eine strikte Abhängigkeit von Metallionen festgestellt worden (Grill et al., 1989).  $\text{Cd}^{2+}$  ist der stärkste Induktor. Auch  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Sb}^{3+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{AsO}_4^{3-}$  und einige weitere Ionen aktivieren die PC-Synthese. PCS-Gene sind konstitutiv exprimiert und PC-Synthese-Aktivität ist ebenfalls konstitutiv messbar (Grill et al., 1989; Chen et al., 1997). PC-Synthese allerdings erfolgt erst nach Aktivierung. Für rekombinantes *AtPCS1*-Protein war  $\text{Cd}^{2+}$ -Bindung gezeigt worden mit einer Stöchiometrie von etwa 7 mol

$\text{Cd}^{2+}$ /mol Protein (Vatamaniuk et al., 2000). Allerdings wurde von diesen Autoren auch festgestellt, dass S-alkylierte Glutathion-Derivate ausreichend sind für die PCS-Aktivierung. Dies führte zu der Hypothese, dass Cd-GSH-Komplexe ( $\text{CdGS}_2$ ) und anderer blockierte Thiole die aktivierenden Substrate für PC-Synthasen sind. Dies wurde später in Frage gestellt (Oven et al., 2002) aufgrund von Beobachtungen, dass mit S-Methyl-GSH als Substrat in Abwesenheit von Metallionen nur sehr geringe Aktivität zu messen war und auch verschiedene andere Metall-Thiolate, die nicht als Substrate dienen, aktivierend wirken. Der genaue Mechanismus der Aktivierung von PC-Synthasen ist damit weiterhin unklar.

Metallbindungsstellen in Proteinen werden häufig durch kurze, zusammenhängende Abfolgen von Aminosäuren gebildet. Beispiele hierfür sind etwa Cys-Xaa-Xaa-Cys- und Cys-Cys-Motive in Metallothioneinen (Kojima et al., 1999), die His-reiche cytoplasmatische Domäne vieler CDF-Proteine (Paulsen und Saier, 1997), die aus Cys-Xaa-Xaa-Cys-Motiven bestehenden N-terminalen Metallbindungsstellen von CPx-ATPasen (Solioz und Vulpe, 1996) oder auch Cu-Bindungsstellen im menschlichen Prion-Protein (Jackson et al., 2001). Um  $\text{Cd}^{2+}$ -Bindungsstellen identifizieren zu können, habe ich deshalb Experimente mit von Chao Yu und Gerhard Küllertz (Max-Planck-Forschungsstelle für die Enzymologie der Proteinfaltung, Biozentrum Halle) hergestellten *Peptide Scans* von TaPCS1 und SpPCS durchgeführt (Maier, Yu, Küllertz und Clemens, eingereicht). Hierbei wurden die gesamte Aminosäuresequenz abdeckende 13mere, die sich um 11 Aminosäuren überlappen, auf Filtern synthetisiert. Bindungsstudien mit  $^{109}\text{Cd}^{2+}$  zeigten diskrete Abfolgen von Peptiden mit Bindungsaktivität (Abb. 5). Die Zahl der aus der Quantifizierung der Signale abgeleiteten putativen  $\text{Cd}^{2+}$ -Bindungsstellen entsprach für TaPCS1 sehr gut der für AtPCS1 ermittelten Stöchiometrie. Aus den Überlappungen zwischen Peptiden mit Bindungsaktivität ließen sich Hypothesen über die für die Bindungsaktivität verantwortlichen Aminosäuren ableiten. Viele der Bindungsmotive enthalten Cysteine – was nicht überraschend war angesichts der Affinität von  $\text{Cd}^{2+}$  für S-haltige funktionelle Gruppen. Jedoch war eine klare Korrelation festzustellen zwischen dem Grade der Konserviertheit eines Cystein-Restes und seinem vermuteten Beitrag zur  $\text{Cd}^{2+}$ -Bindung. Alle in den bekannten PCS-Orthologen vollständig konservierten Cysteine wurden als Bestandteil eines Bindungsmotivs ausgemacht, die meisten nicht konservierten Cysteine dagegen zeigten auch keine Bindungsaktivität. Dies wurde als Indiz für eine nicht zufällige Markierung bestimmter Cysteine mit  $^{109}\text{Cd}^{2+}$  interpretiert. Gerichtete Mutagenese und Expression in PCS-defizienten *S. pombe*-Zellen wurde genutzt für die funktionelle Charakterisierung von verschiedenen  $\text{Cd}^{2+}$ -bindenden und –nicht-bindenden Cysteinen. Ergebnis dieser von Thomas Maier und mir durchgeführten Experimente war, dass die zum

N-terminalen, stärker konservierten Bereich der PCS-Proteine gehörigen Cysteine mit Bindungsaktivität essentiell für die PCS-Aktivität sind, während der Verlust von als  $\text{Cd}^{2+}$ -bindend angesprochenen Cysteinen in der C-terminalen Hälfte der PCS-Proteine keine oder nur geringe Auswirkungen auf die Aktivität zeigte. Das gleiche gilt für nicht-bindende mutierte Cysteine. Diese Resultate stehen im Einklang mit dem von Cobbett (2000a) vorgeschlagenen Modell einer katalytischen N-terminalen Hälfte der PCS-Proteine, die die Aktivierungsstelle(n) trägt und einer C-terminalen Sensordomäne, die ebenfalls metallbindend ist, jedoch verzichtbar für die Aktivität. Desweiteren zeigen die Ergebnisse dieser Studien, dass die Verwendung von *Peptide Scans* einen methodischen Ansatz darstellen kann, um solche Metallbindungsstellen, die von konsekutiven Aminosäuren gebildet werden, zu identifizieren und zu charakterisieren.



**Abb. 5:** SpPCS (A) und TaPCS1 (C) *Peptide Scans* wurden von Chao Yu und Gerhard Küllertz (Max-Planck-Forschungsstelle für die Enzymologie der Proteinfaltung, Biozentrum Halle) als in 11 Aminosäuren überlappende 13mere synthetisiert. Inkubation mit  $^{109}\text{Cd}^{2+}$  und anschließende Autoradiographie zeigten distinkte Abfolgen von Peptiden mit Bindungsaktivität. In B und D ist die Quantifizierung gezeigt für SpPCS bzw. TaPCS1. 6 verschiedene putative  $\text{Cd}^{2+}$ -Bindungsstellen wurden in SpPCS ausgemacht, 7 verschiedene in TaPCS1 (bezeichnet mit römischen Ziffern)(Maier et al., eingereicht).



## 2.4 Der Beitrag anderer zellulärer Metalltoleranzmechanismen

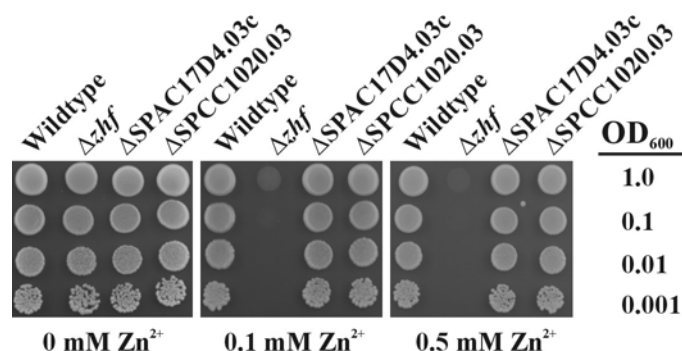
Die Phytochelatinsynthese spielt wie gezeigt eine entscheidende Rolle für die Detoxifizierung von Cd, As, Hg und Cu in verschiedenen Organismen. Für eine Reihe weiterer Chelatierungs- und Transportmechanismen wird eine Beteiligung an der Metalltoleranz angenommen. Dazu zählen Metallothioneine und verschiedene am Transport von Metallionen aus dem Cytosol beteiligte Transporter. Kandidaten sind hier vor allem Vertreter der *Cation Diffusion Facilitator*-Familie und Antiporter wie die  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  Exchanger der CAX-Familie (Abb. 2). Für die Aufklärung der Metallhomöostase, -toleranz und -akkumulation in PC-produzierenden Zellen ist es von Wichtigkeit, die Beiträge der einzelnen Sequestrierungs- und Chelatierungswege zu verstehen.

In Pflanzen gehören MTs, CDFs und CAXs zu Multigen-Familien. *A. thaliana* besitzt mindestens 7 MT-Gene (Cobbett und Goldsbrough, 2002), 11 CAX-Gene und 8 CDF-Gene (Mäser et al., 2001). Angesichts dieser möglichen Redundanz und der Langwierigkeit genetischer Experimente sind von mir für die Analyse der Funktion der angesprochenen Mechanismen systematische Studien an einem einfach zu bearbeitenden, einzelligen Modellsystem initiiert worden (für eine Übersicht: Clemens und Simm, eingereicht). Zwar ist *S. cerevisiae* das am intensivsten studierte Modell einer eukaryotischen Zellen und viele grundlegende Einsichten in die molekularen Mechanismen der Metallhomöostase – wie beispielsweise die Identifizierung von Metalltransportern (Eide, 1998) oder das Metallochaperon-Konzept (O'Halloran und Culotta, 2000) - sind in diesem System erarbeitet worden. Phytochelatine spielen jedoch offenbar keine Rolle für die Metalltoleranz. Eine PCS-homologe Sequenz ist im *S. cerevisiae*-Genom nicht zu finden und es existiert nur ein Bericht über das Vorkommen von vergleichsweise sehr geringen PC2-Mengen (Kneer et al., 1992). In *S. pombe* dagegen trägt die PC-Synthese wie in pflanzlichen Zellen entscheidend zur Metalltoleranz bei. Die anderen zu untersuchenden Faktoren sind basierend auf Homologievergleichen ebenfalls präsent (Clemens und Simm, eingereicht). Zudem ist *S. pombe* vor allem Dank der Zellzyklusforschung (Moser und Russell, 2000) ein sehr gut entwickeltes Modellsystem. Das Genom ist vollständig sequenziert (Wood et al., 2002) und Deletionsmutanten können gezielt über Markerinsertion generiert werden. Insgesamt besitzt *S. pombe* etwa 5000 Gene. Mehr als 90 % von ihnen haben im *S. pombe*-Genom keine homologe Sequenz (Wood et al., 2002). Diese geringe Redundanz macht das Auffinden von Phänotypen in Deletionsmutanten sehr viel leichter.

Das Hauptaugenmerk wurde auf die Familie der *Cation Diffusion Facilitators* gelegt. Bisher veröffentlichte Daten haben in verschiedenen Systemen von Bakterien bis zu menschlichen Nervenzellen eine Zn-Transportaktivität gezeigt sowie in einigen Fällen auch den Transport von Cd- und Co-Ionen (s. oben). In eukaryotischen Zellen ist bisher vor allem die Entfernung von Zn aus dem Cytosol gezeigt worden. CDF-Transporter sind zudem Kandidaten für eine Beteiligung an der Hyperakkumulation von Zn und möglicherweise anderen Metallen. Überexpression von *A. thaliana* ZAT erhöht die Zn<sup>2+</sup>-Toleranz und Zn-Akkumulation (van der Zaal et al., 1999). In Zn-hyperakkumulierenden *T. caerulescens* ist ein ZAT-verwandtes Protein, ZTP1, signifikant stärker exprimiert als in *T. arvense* (Assunção et al., 2001).

Neben der Gewinnung von Erkenntnissen über die Rolle von CDF-Proteinen in PC-produzierenden Zellen war ein weiteres Interesse, ein für die funktionelle Charakterisierung von pflanzlichen CDF-Vertretern geeignetes System zu etablieren. Homologie-Vergleiche zeigten, dass *S. pombe* drei Gene mit Ähnlichkeit zu CDF-Genen besitzt. Für alle drei Gene wurden Deletionsmutanten hergestellt. Ein Test auf Wachstum in Gegenwart erhöhter Zn<sup>2+</sup>-Konzentrationen im Medium zeigte für einen der Stämme extreme Zn<sup>2+</sup>-Sensitivität (Abb. 6). Der betreffende Transporter, inzwischen *Zhf* genannt (für **Z**inc **h**omeostasis **f**actor), wurde funktionell charakterisiert (Clemens et al., 2002). Dabei zeigte sich auch für das zweite vermutete Substrat, Co<sup>2+</sup>-Ionen, eine Erhöhung der Sensitivität. Das Wachstum in Gegenwart von Cd<sup>2+</sup> war dagegen für den  $\Delta zhf$ -Stamm weniger inhibiert als für Wildtyp-Zellen. Gleiches galt für Ni<sup>2+</sup>, während Unterschiede für Cu kaum signifikant waren. Um zu überprüfen, ob die gesteigerte Cd<sup>2+</sup>-Toleranz von  $\Delta zhf$ -Zellen abhängig von der Fähigkeit zur PC-Synthese war, wurde *zhf* auch im  $\Delta pcs$  Stamm durch Markerinsertion inaktiviert. Der resultierende Stamm zeigte extrem erhöhte Cd<sup>2+</sup>-Toleranz. In Flüssigkultur-Assays wurde die durch PCS-Defizienz bewirkte Cd<sup>2+</sup>-Sensitivität fast vollständig revertiert. Von Tanja Bloss in der Arbeitsgruppe von Dietrich Nies (Universität Halle) konnte eine verringerte Akkumulation von Zn, Cd und Co demonstriert werden (Clemens et al., 2002). Diese war besonders ausgeprägt für Zn. EDX-Messungen durch Dieter Neumann (IPB Halle) ergaben niedrigere nicht-vakuoläre Zn-Gehalte für  $\Delta zhf$ -Zellen. Auch die Menge an für die Aktivierung der PC-Synthese zur Verfügung stehendem Cd war deutlich reduziert wie durch HPLC-Messungen der Cd<sup>2+</sup>-Dosis-abhängigen PC-Synthese gezeigt werden konnte.  $\Delta zhf$ -Zellen konnten durch Expression von mit einem N-terminalen Hämagglutinin-Tag exprimiertem *Zhf* (*Zhf*-HA) komplementiert werden. Das HA-Tag ermöglichte die elektronenmikroskopische Immunlokalisation mit Hilfe eines monoklonalen HA-Antikörpers. Diese von Uta zur Nieden (IPB Halle)

durchgeführten Arbeiten zeigten Assoziation von Zhf-HA mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und der Kernhülle (Clemens et al., 2002). Aus den beschriebenen Befunden wurde die Hypothese abgeleitet, dass Zhf die Speicherung von Zn im ER vermittelt und diese Sequestrierung essentiell ist in Situationen erhöhten  $Zn^{2+}$ -Angebots. Mit diesen Arbeiten ist meines Wissens nach zum ersten Mal Evidenz für eine solche Rolle des ER für die Zn-Speicherung gefunden worden. Gleichzeitig ergaben sich neue Einsichten in die Mechanismen der  $Cd^{2+}$ -Toxizität. Die erhöhte  $Cd^{2+}$ -Toleranz bei Zhf-Verlust lässt sich durch die Annahme erklären, dass Cd Zhf-vermittelt mit dem ER in ein Kompartiment gelangt, welches sensitiver ist als das Cytosol. In PCS-defizienten Zellen ist die Menge an Cd, die für den Transport ins ER zur Verfügung steht, grösser, da keine PCS- und Hmt1-abhängige Cd-Sequestrierung in der Vakuole erfolgt. Demzufolge ist in solchen Zellen der Schutz vor  $Cd^{2+}$ -Toxizität durch Zhf-Verlust größer.

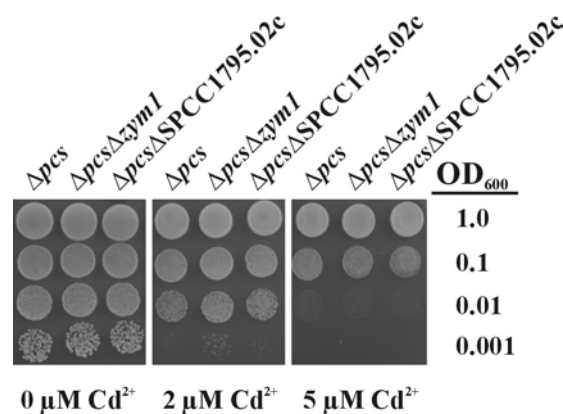


**Abb. 6:** Inaktivierung von Zhf führt zu extremer  $Zn^{2+}$ -Sensitivität. Die drei für CDF-Proteine kodierenden Gene in *S. pombe* wurden durch Markerinsertion mittels homologer Rekombination inaktiviert.  $\Delta zhf$ -Zellen wachsen auf Medium ohne zusätzliches  $Zn^{2+}$  (0 mM  $Zn^{2+}$ ) wie Wildtyp-Zellen, eine Erhöhung der  $Zn^{2+}$ -Konzentration im Medium führt jedoch zu drastischer Wachstumsinhibierung. Die  $Zn^{2+}$ -Toleranz von  $\Delta SPAC17D4.03c$ - und  $\Delta SPCC1020.03$ -Zellen ist gleich der von Wildtyp-Zellen. Rechts ist die OD<sub>600</sub> der zum Animpfen verwendeten Zellsuspension angegeben.

Die von uns beschriebenen Phänotypen für  $\Delta zhf$ -Zellen wurden später unabhängig bestätigt (Borrelly et al., 2002).

Dem zweiten Ziel der Arbeiten an *S. pombe* CDF-Vertretern entsprechend, ist der  $\Delta zhf$ -Stamm in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dietrich Nies genutzt worden für die funktionelle Charakterisierung des ersten in *A. thaliana* beschriebenen CDF-Proteins ZAT (Bloss et al., 2002). ZAT wurde von mir in  $\Delta zhf$ -Zellen exprimiert. Es wurde eine Komplementation der  $Zn^{2+}$ -Sensitivität, jedoch nicht der  $Co^{2+}$ -Sensitivität gefunden. Dies war in guter Übereinstimmung mit *in vitro*-Daten, die nur  $Zn^{2+}$ -Ionen als ZAT-Substrate zeigten (Bloss et al., 2002).

Neben Mitgliedern der CDF-Familie sind auch Proteine mit  $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiport-Aktivität und Metallothioneine Kandidaten für eine Beteiligung an der Cd-Sequestrierung. Von Ortiz et al. (1995) war eine  $\Delta\text{pH}$ -abhängige  $\text{Cd}^{2+}$ -Aufnahme in vakuoläre Vesikel beobachtet worden. Vermittelt werden könnte eine solche Aktivität durch Proteine der CAX-Familie. Das einzige zur CAX-Familie gehörige Gen in *S. pombe* trägt jedoch anscheinend nicht zur  $\text{Cd}^{2+}$ -Detoxifizierung bei. Inaktivierung von SPCC1795.02c in Wildtyp- und in PCS-defizienten Zellen führt zu keiner Reduzierung der  $\text{Cd}^{2+}$ -Toleranz (Abb. 7). Gleiches ist von uns beobachtet worden (Clemens und Simm, eingereicht) für das einzige Metallothionein in *S. pombe*, Zym1 (Borrelly et al., 2002) (Abb. 7). Der aus diesen Ergebnissen gezogene vorläufige Schluß lautet, dass es bisher keine Evidenz für einen Mechanismus der  $\text{Cd}^{2+}$ -Detoxifizierung neben dem PC-abhängigen Weg in *S. pombe* gibt. Es ist fraglich, ob der *in vitro* beobachtete Hmt1-unabhängige Transport von  $\text{Cd}^{2+}$  in die Vakuole *in vivo* eine Rolle spielt. Das einzige Metallothionein ist offenbar nicht an der Detoxifizierung von überschüssigen Metallionen beteiligt. Die Tatsache, dass *S. pombe* nur ein MT besitzt, bietet die Chance, in diesem System einen Beitrag zur Aufklärung vermuteter metallhomöostatischer Funktionen von MTs zu leisten.



**Abb. 7:** Inaktivierung von Zym1, dem einzigen *S. pombe* Metallothionein, oder des einzigen Proteins in *S. pombe* mit Ähnlichkeit zu CAX-Proteinen aus *A. thaliana* führt zu keiner Erhöhung der  $\text{Cd}^{2+}$ -Sensitivität von PCS-defizienten Zellen. *zym1* und SPCC1795.02c wurden durch Markerinsertion mittels homologer Rekombination inaktiviert. Gezeigt ist das Wachstum von  $\Delta\text{pcs}$ -,  $\Delta\text{pcs}\Delta\text{zym1}$ - und  $\Delta\text{pcs}\Delta\text{SPCC1795.02c}$ -Zellen in Gegenwart verschiedener  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen nach Inokulation mit Zellsuspensionen unterschiedlich hoher optischer Dichte (rechts).

## 2.5 Der Metallophyt *Arabidopsis halleri* als Modell

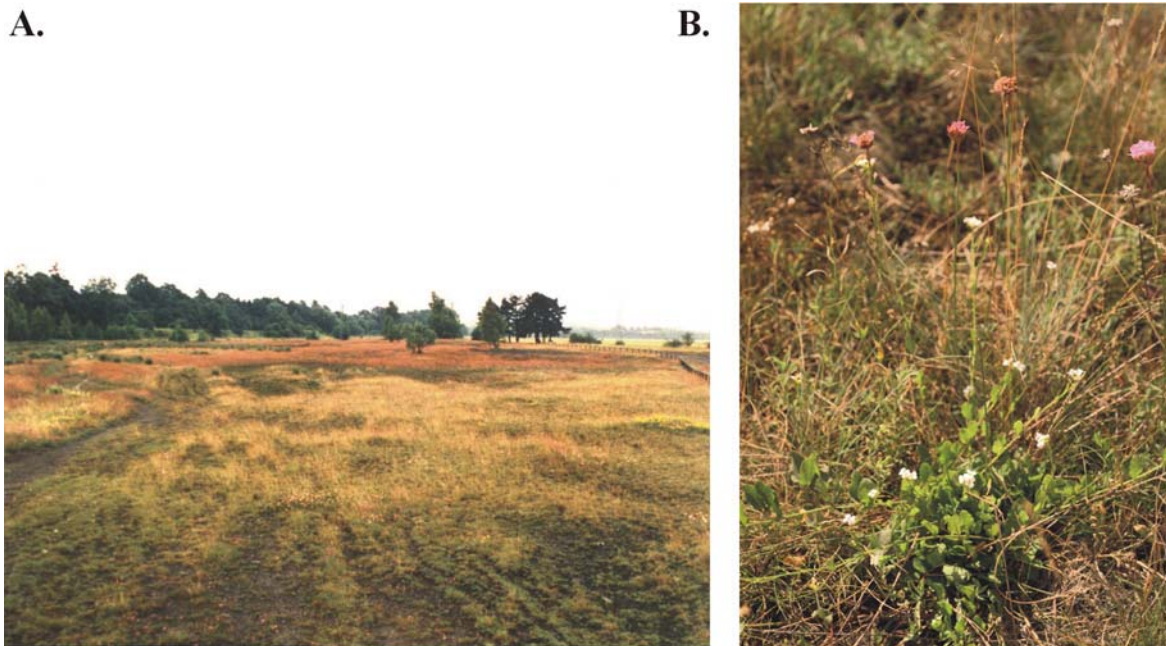
Die meisten Komponenten ebenso wie die Regulation der pflanzlichen Metallhomöostase sind molekular noch kaum verstanden. Gleiches gilt für die Metallhyperakkumulation. Um zum molekularen Verständnis dieser Phänomene beitragen zu können, habe ich die Etablierung eines geeigneten Modellsystems für Studien zur Metallhomöostase und -hyperakkumulation initiiert und vorangetrieben.

*Arabidopsis halleri* ist eine enge Verwandte von *Arabidopsis thaliana*. Da *A. halleri* als Vertreter der typischen „Schwermetallvegetation“ beschrieben ist (Ernst, 1974) und u.a. auf bekannten metallbelasteten Böden wie etwa einer mittelalterlichen Halde bei Langelsheim im Harz wächst (Abb. 8), habe ich diese Spezies als geeigneten Kandidaten für die molekulare Analyse der pflanzlichen Metallakkumulation und -homöostase ausgewählt.

Untersuchungen an *A. halleri* sind in den letzten Jahren unabhängig auch von anderen Arbeitsgruppen gestartet worden, sodass diese Pflanze inzwischen zum neben *Thlaspi caerulescens* wichtigsten System für die Erforschung der Metallhyperakkumulation geworden ist (Clemens et al., 2002). Einige dieser eher ökophysiologisch und populationsgenetisch ausgerichteten Arbeiten haben klar den schon von Ernst beschriebenen Status als Zn-Hyperakkumulierer bestätigt. In Blättern von Pflanzen an belasteten Standorten sind Zinkgehalte von  $> 20 \text{ mg Zn/ g Trockengewicht}$  gemessen worden (Bert et al., 2002; Macnair, 2002). Neu ist die Beobachtung, dass *A. halleri* auch als Cd-Hyperakkumulierer einzustufen ist. Nach der klassischen Definition von Baker und Brooks (1989) liegt der Schwellenwert für Cd bei  $100 \text{ } \mu\text{g/ g Trockengewicht}$ . Berichtet worden sind vor kurzem Werte von bis zu  $281 \text{ } \mu\text{g/ g Trockengewicht}$  (Dahmani-Muller et al., 2000) bzw. bis zu  $267 \text{ } \mu\text{g/ g Trockengewicht}$  (Bert et al., 2002). Außerdem war jeweils das Spross/Wurzel-Verhältnis im Cd-Gehalt  $>1$ . Damit ist *A. halleri* neben *T. caerulescens* der zweite etablierte Cd-Hyperakkumulierer (Escarré et al., 2000). Systematische Untersuchungen an verschiedenen mitteleuropäischen *A. halleri*-Populationen von metallbelasteten wie -unbelasteten Standorten haben zudem ergeben, dass sowohl die Zn- als auch die Cd-Hyperakkumulation konstitutive Eigenschaften sind. Selbst auf Böden mit normalen Zn- und Cd-Gehalten zeigt *A. halleri* eine verglichen mit anderen Pflanzen extreme Akkumulation dieser beiden Elemente in den oberirdischen Geweben (Bert et al., 2002; Macnair, 2002).

Strategie unserer Arbeiten ist, die Metallhomöostase in *A. thaliana* und *A. halleri* vergleichend zu analysieren, um auf diesem Wege sowohl generelle pflanzliche Metallantworten molekular aufklären zu helfen, als auch zu einem Verständnis der

ausgeprägten *A. halleri*-Phänotypen, d.h. der signifikant höheren Zn/Cd-Toleranz und -akkumulation, beizutragen. Die gewählten methodischen Ansätze zur Identifizierung von Kandidatengenomen sind dabei solche des *Expression Profiling* mittels cDNA-AFLP (Bachem et al., 1996) und GeneChips (Zhu und Wang, 2000). Da diese Daten noch nicht veröffentlicht worden sind, sollen sie im folgenden zusammengefasst dargestellt werden.



**Abb. 8:** Der Standort Langelshiem bei Goslar (A.) und am Standort wachsende *Arabidopsis halleri* (B.). Im Hintergrund ist ein zweiter Metallophyt, *Armeria maritima*, zu erkennen. Aufnahmen: Dieter Neumann (IPB Halle).

### 2.5.1 Metallregulierte Gene aus *A. thaliana* und *A. halleri*

Um die Voraussetzungen für die molekulare Analyse zu schaffen, haben wir *A. halleri*-Samen von einem belasteten Standort bei Langelshiem (Abb. 8) eingesammelt und, ausgehend von den Erfahrungen mit *A. thaliana*, die Anzucht unter Labor- und Gewächshausbedingungen etabliert. Eine der von *A. thaliana* berichteten entsprechende Responsivität (Xiang und Oliver, 1998) auf Metallexposition wurde am Beispiel von GSH-Biosynthesegenen getestet und bestätigt. Als erster Ansatz für die Identifizierung metallresponsiver Gene wurde das cDNA-AFLP (Bachem et al., 1996; Durrant et al., 2000) gewählt, welches die Kapazität besitzt, bis zu 80 % des Transkriptoms zu erfassen (Terry et al., 1999). Wichtig beim Aufbau der Technik war dabei Hilfe der Arbeitsgruppe von Ulla Bonas (Universität Halle). Insgesamt sind 100 Primerkombinationen getestet worden auf

jeweils vier verschiedene Proben: Kontrolle sowie 2, 8 und 24 h nach Behandlung mit einem Mix aus  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ . Ausgeschnitten, eluiert, kloniert und sequenziert wurden insgesamt 264 Fragmente (Vess, Weber und Clemens, unveröffentlicht)(Tab. 1). Da von einigen Genen, wie zu erwarten ist, mehr als ein Fragment gefunden wurde, sind insgesamt 213 putativ metall-regulierte Gene aus *A. halleri* identifiziert worden. 88 % dieser Gene zeigten im cDNA-AFLP nach Metallgabe eine Aktivierung, 12 % eine Reprimierung. Für jedes cDNA-Fragment wurde im BLAST-Search (Altschul et al., 1990) nach dem entsprechenden Gen im *A. thaliana*-Genom gesucht. Nach der Sequenzierung des *A. thaliana*-Genoms (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) wurde ein solches für praktisch jedes *A. halleri*-Fragment eindeutig gefunden. Nur in Einzelfällen sehr ähnlicher Gene im *A. thaliana*-Genom war die Generierung zusätzlicher Sequenzinformation notwendig, um eindeutig das zum *A. halleri*-Fragment Homologe zu finden. Die Sequenzhomologie betrug im Durchschnitt aller Fragmente etwa 94 %.

Die Regulation von 29 Genen wurde genauer untersucht mittels RT-PCR. Primersequenzen wurden abgeleitet aus der entsprechenden *A. thaliana*-Sequenz und für beide Arten verwendet. In den meisten Fällen führten die *A. thaliana*-Primer direkt zum Erfolg. RT-Fragmente wurden kloniert und sequenziert zur Bestätigung der Identität. Für 18 Gene (=62 %) wurde die Regulation in Antwort auf Metallexposition bestätigt.

Zahl der getesteten Primerkombinationen	100
Gesamtzahl der analysierten Fragmente	ca. 3500
Zahl der Fragmente von induzierten Genen	187
Zahl der Fragmente von reprimierten Genen	26
Zahl der mittels RT-PCR überprüften Gene	29
Bestätigte Regulation durch Metalle (in Prozent)	62
Putative metallspezifisch regulierte Gene	8
Gene insgesamt mit Homologem in <i>A. thaliana</i> (in Prozent)	ca. 99
Sequenzhomologie zwischen <i>A. halleri</i> und <i>A. thaliana</i> (in Prozent)	ca. 94

**Tab. 1:** Summarischer Überblick zur cDNA-AFLP-Analyse von *Arabidopsis halleri*.

Eine erste Kategorisierung der gefundenen *A. halleri*-Gene anhand der Annotierung der entsprechenden *A. thaliana*-Homologe ergab, dass ca. 40 % annotiert sind als *unknown protein* oder *predicted protein* und nur wenige Gene offensichtlich der Metall-Homöostase zuzurechnen sind. Zu diesen gehören vor allem Gene, die für an der Sulfatassimilation

beteiligte Proteine kodieren wie etwa einen Sulfat-Transporter, eine ATP-Sulfurylase oder eine APS Reduktase.

Der Akzent bei der Auswahl von funktionell zu charakterisierenden Genen wurde auf putative Signaltransduktionskomponenten gelegt, da wie oben beschrieben über die molekularen Ereignisse zwischen der Veränderung der externen Metallkonzentration und der dadurch ausgelösten transkriptionellen Antwort praktisch nichts bekannt ist. Die Identifizierung von Genen bzw. Proteinen, die z.B. als Sensoren für den Metallstatus einer Zelle oder als Transkriptionsfaktoren bei der Regulation von Glutathionbiosynthese-Genen eine Rolle spielen, wäre daher von großem Interesse. Eine gängige Strategie bei der Analyse von stressaktivierten Signalwegen in Pflanzen ist, die Regulation in Antwort auf den jeweiligen Stress als einen Hinweis auf eine mögliche funktionelle Relevanz zu interpretieren. Die inzwischen mögliche Isolierung von Insertionsmutanten in *A. thaliana* lässt prinzipiell dann durch verschiedene phänotypische Untersuchungen eine direkte Überprüfung dieser Hypothese zu. Im cDNA-AFLP wurden Vertreter der wesentlichen Klassen von Signaltransduktionskomponenten gefunden. Ausgewählt wurden für die genauere RT-PCR-Analyse solche, die zu den typischen “Knotenpunkten” (Knight und Knight, 2001) von Signalkaskaden zählen. Es wurde für das *A. halleri*-Gen und das Homologe aus *A. thaliana* jeweils die Responsivität auf die dem cDNA-AFLP zugrundeliegenden Bedingungen (Gemisch von  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ), auf die Applikation der einzelnen Metalle sowie auf andere abiotische Stressfaktoren wie etwa erhöhte Salzkonzentrationen getestet. Für ein MAPK-Gen, AtMPK11 (MAPK Group, 2002), ein PP2C-Gen (AGI code At2g30020), ein bZIP-Transkriptionsfaktor-Gen, AtbZIP6 (The bZIP Research Group, 2002), zwei für Calmodulin-ähnliche Proteine (AGI codes At5g42380, At1g76650) kodierende Gene und ein für eine “wall-associated kinase” kodierendes Gen (WAK2, Verica und He, 2002) konnte eine weitgehende Metallspezifität der Regulation festgestellt werden. Hierbei ist zu betonen, dass keine prinzipiellen Unterschiede zwischen *A. thaliana* und *A. halleri* in der Responsivität dieser Gene detektiert wurden. Es handelt sich also um Gene, die generell beteiligt sein könnten an der Generierung von Metallantworten in Pflanzen.

Der cDNA-AFLP-Ansatz hat im wesentlichen zur Identifizierung von Genen geführt, die generell in der Antwort auf erhöhte externe Metallkonzentrationen eine Rolle spielen könnten. Da alle aus *A. halleri* näher analysierten Gene Responsivität auch in *A. thaliana* zeigten, geschieht die weitere funktionelle Analyse deshalb im wesentlichen unter Nutzung der für *A. thaliana* verfügbaren molekularen Werkzeuge. Wichtig ist festzuhalten, dass



meines Wissens nach für keines der ausgewählten Kandidatengene bisher veröffentlichte Information verfügbar ist.

Ausgelöst durch die Beobachtung der transkriptionellen Aktivierung eines MAP-Kinase-Gens ist nach der Aktivierung von MAP-Kinasen auf Metallexposition hin gesucht worden. Mindestens zwei MAP-Kinasen werden nach  $\text{Cu}^{2+}$ - und  $\text{Cd}^{2+}$ -Behandlung in *A. thaliana* und *A. halleri* aktiviert (Vess und Clemens, unveröffentlicht). Immunopräzipitationsexperimente (mit einem von Kazuo Shinozaki, Tsukuba, Japan, zur Verfügung gestellten Antikörper) haben erbracht, dass es sich bei der einen wahrscheinlich um MPK6 handelt, die durch eine Reihe von Stressoren aktiviert wird (Ichimura et al., 2000; Kovtun et al., 2000). Die andere MPK ist noch unidentifiziert.

### 2.5.2 Putative Hyperakkumulationsgene

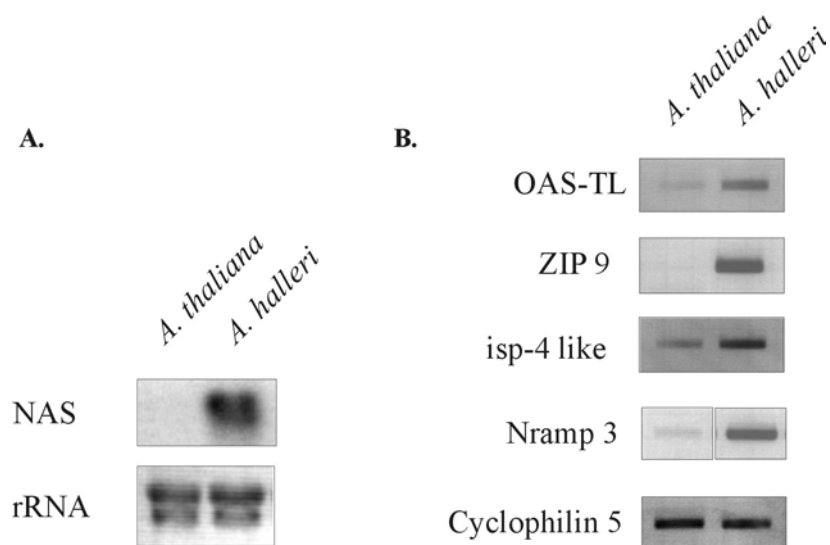
Drei aus den oben beschriebenen Arbeiten und der neuesten Literatur abgeleitete Feststellungen haben uns dazu geführt, die inzwischen verfügbaren Microarray-Technologien für das *Expression Profiling* auf den Vergleich von *A. halleri* und *A. thaliana* anzuwenden:

- (i) Die festgestellte Ähnlichkeit der kodierenden Sequenzen von etwa 94% deutete an, dass ein direkter Vergleich möglich sein könnte.
- (ii) Für die identifizierten metallinduzierten und -reprimierten Gene wurden keine prinzipiellen Unterschiede zwischen *A. halleri* und *A. thaliana* festgestellt.
- (iii) Die Hyperakkumulation von Zn und Cd durch *A. halleri* hat sich als konstitutiver Charakter herausgestellt (s.o.; Bert et al., 2002; Macnair, 2002). Selbst auf unbelasteten Böden – also in Abwesenheit möglicher induzierender Bedingungen – zeigt *A. halleri* deutlich höhere Metallakkumulation als andere Pflanzen.

Für den konstitutiven Vergleich wurden insgesamt 6 Proben mit Affymetrix GeneChips (8.3 k) analysiert, je drei *A. thaliana*- und *A. halleri*-Wurzelproben von etwa 5 Wochen alten hydroponisch angezogenen Pflanzen (Weber und Clemens, unveröffentlicht). Hybridisierung und Auslesen der Chips erfolgte in Kooperation mit dem Labor von Stefan Burdach (Kinderklinik Halle und Biozentrum Halle).

Ähnlich wie bei kürzlich beschriebenen GeneChip-Experimenten mit Proben aus verschiedenen Primaten (Enard et al., 2002), sind die bei der Normalisierung von der Affymetrix-Software ermittelten Skalierungsfaktoren nur etwa um den Faktor 3 höher gewesen für die Art, auf deren Gensequenzen das Design des Chips nicht basiert. Unter

diesen Genen ist nach solchen gesucht worden, die in *A. halleri* mindestens 8fach höhere Signalstärke zeigen. Die so erhaltene Liste umfasst ca. 20 Gene. Die beiden extremsten Beispiele sind interessanterweise ein Nicotianamin-Synthase-Gen (73fach höher) und eines der für  $Zn^{2+}$ -Transporter kodierenden ZIP-Gene (42fach höher). Weitere für Metalltransporter bzw. an der Synthese von Metallchelatoren beteiligte Enzyme kodierende Gene sind ein Nramp-Gen (8fach höher) und ein O-Acetylserin-Thiol-Lyase-Gen (13fach höher). Die meisten der übrigen stärker exprimierten Gene sind von unbekannter Funktion. Für die genannten Gene konnte die teilweise extrem erhöhte Expression in *A. halleri* unabhängig bestätigt werden (Abb. 9).



**Abb. 9:** Stark erhöhte konstitutive Expression putativer Hyperakkumulationsgene in *A. halleri*. A. Northern-Analyse der Nicotianaminsynthase-Expression in Wurzeln von *A. thaliana* und *A. halleri*. B. RT-PCR-Analyse verschiedener in Microarray-Experimenten identifizierter Kandidatengene. Cyclophilin 5 diente als konstitutive Kontrolle (Weber und Clemens, unveröffentlicht).

Nicotianamin ist schon seit langem als Chelator für  $Fe^{2+}$  bekannt. Es wird außerdem in Zusammenhang gebracht mit Xylem- und Phloem-Transport von anderen divalenten Kationen wie  $Cu^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  (Scholz et al., 1992). Transporter der ZIP-Familie sind verantwortlich für einen grossen Teil der  $Fe^{2+}$ - und wohl auch der  $Zn^{2+}$ -Aufnahmeaktivität pflanzlicher Zellen (Guerinot, 2000; Vert et al., 2002). Nramp-Transporter vermitteln den Transport von  $Fe^{2+}$  und  $Cd^{2+}$  (Thomine et al., 2000) und spielen wahrscheinlich eine Rolle bei der Mobilisierung von Metallionen aus der Vakuole (Sebastien Thomine, persönliche Mitteilung). Die Überexpression einer cytosolischen OAS-TL in *A. thaliana* führte zu einer Steigerung der  $Cd^{2+}$ -Toleranz (Dominguez-Solis, 2001). Diese Gene passen damit exzellent zu der Vorstellung, dass zur molekularen Basis der Metallhyperakkumulation höhere Toleranz, eine erhöhte Aufnahmeaktivität sowie eine effizientere Mobilisierung der Metallionen für den

Transport in die oberirdischen Teile im Xylem gehören (Chaney et al., 1997; Clemens et al., 2002). Damit sind sehr vielversprechende Spuren für die molekulare Aufklärung der Hyperakkumulation gefunden.

## 2.6 Ausblick

Mit der Klonierung und Charakterisierung von *PCS*-Genen ist ein wesentlicher Beitrag zur molekularen Aufklärung eines Biosyntheseweges gelungen, der offenbar in verschiedenen Organismenklassen essentiell für die Entgiftung von Cd, As und auch Hg ist sowie zur Cu-Toleranz beiträgt. Eine Vielzahl von wichtigen Fragen ist offen und die Isolierung der *PCS*-Gene ermöglicht nun die Beantwortung einiger dieser Fragen. Zentral ist die unter 2.3.3 diskutierte, ob die Synthese von Phytochelatinen neben dem Schutz vor zu hohen Konzentrationen nicht-essentieller Metalle und Halbmetalle auch homöostatische Funktionen erfüllt. Bisher sind für PC-defiziente Mutanten von *A. thaliana*, *C. elegans* oder *S. pombe* keine Phänotypen berichtet worden, die auf einen Defekt in der Versorgung einzelner Proteine z.B. mit Cu-Ionen hindeuten. Der Grund hierfür könnte allerdings sein, dass die bisherigen Untersuchungen kaum über die Suche nach unmittelbaren Wachstumsphänotypen hinausgehen. Entwickelt werden müssen z.B. Assays, die eine organellen- und gewebsppezifische Evaluierung der Metallversorgung erlauben. Ein von uns verfolgter Ansatz ist, Aktivitäten bestimmter metallabhängiger Enzyme unter verschiedenen Bedingungen der Nährstoffversorgung in Wildtyp-Pflanzen und *PCS*-Mutanten zu verfolgen. Dieser Ansatz kann auch generell für die funktionelle Charakterisierung von putativen Metallhomöostase-Genen von Nutzen sein.

Unklar ist auch der genaue Zusammenhang zwischen PC-Synthese und den oberhalb und unterhalb gelegenen Schritten des metabolischen Weges, der GSH-Synthese und des PC-Cd-Transports. Eigene präliminäre Daten zu *S. pombe* sowie ebenso präliminäre Daten zu *C. elegans* (Vatamaniuk und Rea, unveröffentlicht) deuten an, dass PC-Synthese und Transport von PC-Cd-Komplexen eng zusammenhängen. Beide Prozesse müssen funktionell sein. Der Verlust eines Schrittes führt bereits zum vollständigen Verlust der PC-abhängigen Cd<sup>2+</sup>-Toleranz. In diesem Kontext müssen die Kompartimentierung des PC-Weges und die Interaktion von Komponenten dieses Weges mit anderen Proteinen untersucht werden. Unsere Experimente zielen auf die Immunopräzipitation von interagierenden Proteinen und deren Identifizierung durch MALDI-TOF-MS und ESI-Q-TOF-MS.

Molekular unbekannt ist in Pflanzen noch der Transporter für PC-Metall-Komplexe. Wir verfolgen die Suche nach dem kodierenden Gen vor allem auf zwei Wegen. Die meisten Schritte des PC-Detoxifizierungsweges sind transkriptionell reguliert in Antwort auf Metallexposition. Deshalb ist die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von metallregulierten ABC-Typ- und anderen Kandidaten-Transportern ein Ansatz. Gleichzeitig wird der Versuch der Komplementierung einer von mir generierten *hmt1*-Deletionsmutante mit pflanzlichen cDNAs gemacht.

In Bezug auf eine Ausgangszielstellung der beschriebenen Arbeiten, die Identifizierung von möglichen für die Phytoremediation nutzbaren molekularen Werkzeugen, ist noch offen, ob und auf welche Weise *PCS*-Gene für die gezielte Veränderung der Metallakkumulation durch Pflanzen einsetzbar sind. Eine einfache Überexpression war bisher nicht erfolgreich (Clemens, unveröffentlicht). Noch nicht abgeschlossen sind Arbeiten zur Expression von CePCS in *A. thaliana*. Da PCs beteiligt sind an der Detoxifizierung von Cd-, As- und Hg-Ionen, die zu den sehr problematischen Umweltgiften gehören, wird davon ausgegangen, dass die Modulierung der PC-Synthese Teil der meisten *Engineering*-Ansätze zur Phytoremediation sein wird (Vatamaniuk et al., 2002). Auch in diesem Zusammenhang wird es deshalb wichtig sein, die Regulation und Kompartimentierung der PC-Synthese sowie deren Interaktion mit anderen Komponenten der Metallhomöostase besser verstehen zu lernen und PC-Metallkomplex-Transporter zu identifizieren.

Die Untersuchungen an CDF-Proteinen in *S. pombe* haben zu wichtigen neuen Einsichten in die Zn-Homöostase und die Toxizität von Cd-Ionen geführt. Für das Verständnis der pflanzlichen Metallhomöostase ergeben sich daraus eine Reihe von Fragen. So ist z.B. zu klären, ob das ER auch in Pflanzenzellen ein Ort besonders hoher Cd<sup>2+</sup>-Sensitivität ist und ob dementsprechend Pflanzen mit erhöhter Cd<sup>2+</sup>-Toleranz sich von normalen Pflanzen in ER-lokalisierten Transportaktivitäten unterscheiden. Zudem werfen die Beobachtungen an *S. pombe* die Frage auf, ob neben der Vakuole auch das ER ein an der Zn-Speicherung beteiligtes Kompartiment ist. Grundsätzlich ist die Prozessierung von Zn-abhängigen Proteinen ein ungelöstes Problem und Zhf bietet einen Ansatzpunkt, zu Einsichten über die Versorgung von Proteinen mit dem Ko-Faktor Zn zu kommen.

Die Funktion verschiedener Chelatoren, Enzyme und Transporter auf die Metallhomöostase soll auch in *S. pombe* weiterverfolgt werden. Ähnlich wie für Pflanzen sollen sensitivere Methoden für die Suche nach „Metall-Phänotypen“ aufgebaut werden. In Arbeit ist auch ein *S. pombe Metal Array* für die Charakterisierung transkriptioneller Veränderungen in den bisher schon erzeugten und weiteren zu generierenden Knock-out-

Stämmen. Solche *S. pombe*-Mutanten sind zudem bisher noch kaum für die Expressionsklonierung pflanzlicher Gene genutzt worden. Wir sind im Prozess der Herstellung verschiedener cDNA-Banken aus RNA der beiden *Arabidopsis*-Arten, um nach Genen zu suchen, die die extremen Phänotypen z.B. von  $\Delta zhf$ - oder  $\Delta hmt1$ -Zellen komplementieren.

Mit den beschriebenen Arbeiten an *A. halleri* und *A. thaliana* ist nun der Grundstein gelegt für ein molekulares Verständnis der pflanzlichen Metallhyperakkumulation wie auch der Regulation von Metallantworten. Die Voraussetzungen für eine funktionelle Charakterisierung der ausgewählten metallspezifisch regulierten putativen Signaltransduktionskomponenten sind etabliert. T-DNA-Insertionslinien sind für die meisten der Kandidatengene gefunden und zum Teil werden bereits homozygote Linien untersucht. Eine Reihe phänotypischer, biochemischer und molekularer Assays steht zur Verfügung, um z.B. die Metalltoleranz und -akkumulation von Insertionsmutanten, die transkriptionellen Metallantworten oder die Veränderungen im Thiolmetabolismus zu untersuchen. Der Nachweis einer durch den Verlust eines Gens verursachten Veränderung in metallrelevanten Phänotypen würde dann die Möglichkeit eröffnen, einen an der Metallhomöostase beteiligten Signaltransduktionsweg molekular zu analysieren.

Der konstitutive Vergleich der beiden *Arabidopsis*-Arten hat zur Identifizierung von Kandidatengenen geführt, die eine sehr gute Ausgangsbasis für die molekulare Erklärung der Metallhyperakkumulation bieten. Unsere Experimente konzentrieren sich nun darauf zu ermitteln, ob die teilweise extremen Unterschiede auf Transkriptionsebene auch Auswirkungen auf Abundanz der entsprechenden Proteine, Enzymaktivitäten oder Metabolitspektren haben. Hierbei werden u.a. auch analytische Werkzeuge zum *Metabolite Profiling* genutzt, die in einem unabhängigen von mir geleiteten Projekt entwickelt wurden. Zu nennen ist hier vor allem die Analyse von (Sekundär)metaboliten in *Arabidopsis* mittels Cap-LC-ESI-Q-TOF-MS. Diese Methode erlaubt die Detektion von nach jetzigem Stand über 1000 Massensignalen in methanolischen Extrakten und damit die Suche nach metabolischen Veränderungen in Antwort auf z.B. veränderte Nährstoffbedingungen. Genauso können auch gezielt bekannte Verbindungen wie etwa Nicotianamin analysiert werden.

Ein weiteres Ziel für die nächste Zeit ist, die molekulare Basis der unterschiedlichen Regulation der Kandidatengene durch funktionelle Analyse der Promotoren aus *A. halleri* zu entschlüsseln sowie nach direkter genetischer Evidenz für die Beteiligung dieser Gene an der Hyperakkumulation zu suchen. Die Promotoren von Nicotianaminsynthase- und ZIP-Genen aus *A. halleri* sollen in *A. thaliana* auf Funktionalität untersucht werden. Im positiven Falle

könnten diese Promotoren dann molekular „seziert“ werden, um die Grundlage für eine Suche nach regulatorischen Proteinen zu legen, die für die beobachteten Unterschiede zwischen *A. halleri* und *A. thaliana* verantwortlich sind. Direkte genetische Evidenz für die Beteiligung der identifizierten Kandidatengene an der Hyperakkumulation setzt die Inaktivierung dieser Gene in *A. halleri* oder phänotypisierte Nachkommen aus Kreuzungen von *A. halleri* und einer anderen Verwandten von *A. thaliana*, *A. lyrata*, voraus (Mark Macnair, Exeter), in denen dann nach Ko-Segregation der Hyperakkumulation mit erhöhter Expression einzelner der Kandidatengene gesucht werden könnte.

## 2.7 Literatur

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Anderson, J. A., Huprikar, S. S., Kochian, L. V., Lucas, W. J., Gaber, R. F. (1992) Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3736-3740.
- Arazi, T., Sunkar, R., Kaplan, B., Fromm, H. (1999) A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni<sup>2+</sup> tolerance and Pb<sup>2+</sup> hypersensitivity in transgenic plants. *Plant J.* **20**, 171-182.
- Assunção, A. G. L., da Costa Martins, P., de Folter, S., Vooijs, R., Schat, H., Aarts, M. G. M. (2001) Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell Environ.* **24**, 217-226.
- Axelsen, K., Palmgren, M. G. (2001). Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**, 696-706.
- Bachem, C. W., van der Hoeven, R. S., de Bruijn, S. M., Vreugdenhil, D., Zabeau, M., Visser, R. G. (1996). Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J.* **9**, 745-753.
- Baker, A. J. M., Brooks, R. R. (1989) Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* **1**, 81-126.
- Barkla, B. J., Pantoja, O. (1996). Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 159-184.
- Bert, V., Bonnin, I., Saumitou-Laprade, P., de Laguerie, P., Petit, D. (2002) Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations? *New Phytol.* **155**, 47-57.
- Bloss, T., Clemens, S., Nies, D. H. (2002) Characterization of the ZAT1p zinc transporter from *Arabidopsis thaliana* in microbial model organisms and reconstituted proteoliposomes. *Planta* **214**, 783-791.
- Borrelly, G. P., Harrison, M. D., Robinson, A. K., Cox, S. G., Robinson, N. J., Whitehall, S. K. (2002). Surplus zinc is handled by Zym1 metallothionein and Zhf endoplasmic reticulum transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **277**, 30394-30400.
- Cazalé, A.-C., Clemens, S. (2001) *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase. *FEBS Lett.* **507**, 215-219.
- Chaney, R., Malik, M., Li, Y. M., Brown, S. L., Brewer, E. P., Angle, J. S., Baker, A. J. M. (1997) Phytoremediation of soil metals. *Curr. Opin. Biotech.* **8**, 279-284.
- Chardonens, A. N., Koevoets, P. L., van Zanten, A., Schat, H., Verkleij, J. A. (1999) Properties of enhanced tonoplast zinc transport in naturally selected zinc-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Physiol.* **120**, 779-786.
- Chen, J., Zhou, J., Goldsbrough, P. B. (1997) Characterization of phytochelatin synthase from tomato. *Physiol. Plant.* **101**, 165-172.
- Cheng, N., Pittman, J., Shigaki, T., Hirschi, K. (2002) Characterization of CAX4, an *Arabidopsis* H(+)/cation antiporter. *Plant Physiol.* **128**, 1245-1254.

- Citovsky, V., Ghoshroy, S., Tsui, F., Klessig, D. (1998) Non-toxic concentrations of cadmium inhibit systemic movement of turnip vein clearing virus by a salicylic acid-independent mechanism. *Plant J.* **16**, 13-20.
- Clemens, S., Antosiewicz, D. M., Ward, J. M., Schachtman, D. P., Schroeder, J. I. (1998) The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **95**, 12043-12048.
- Clemens, S., Kim, E. J., Neumann, D., Schroeder, J. I. (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J.* **18**, 3325-3333.
- Clemens, S., Schroeder, J. I., Degenkolb, T. (2001) *C. elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3640-3643.
- Clemens, S. (2001) Molecular mechanisms of plant metal homeostasis and tolerance. *Planta* **212**, 475-486.
- Clemens, S., Bloss, T., Vess, C., Neumann, D., Nies, D. H., zur Nieden, U. (2002) A transporter in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells mediates zinc storage and differentially affects transition metal tolerance. *J. Biol. Chem.* **277**, 18215-18221.
- Clemens, S., Palmgren, M. G., Krämer, U. (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci.* **7**, 309-315.
- Cobbett, C. S. (1999) A family of phytochelatin synthase genes from plant, fungal and animal species. *Trends Plant Sci.* **4**, 335-337.
- Cobbett, C. S. (2000a) Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**: 211-216.
- Cobbett, C. S. (2000b) Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* **123**, 825-833.
- Cobbett, C. S., Goldsbrough, P. (2002) Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **53**, 159-182.
- Conklin, D. S., McMaster, J. A., Culbertson, M. R., Kung, C. (1992) COT1, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3678-3688.
- Connolly, E. L., Fett, J. P., Guerinot, M. L. (2002). Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* **14**, 1347-1357.
- Connolly, E. L., Guerinot, M. L. (2002). Iron stress in plants. *Genome Biol.* **3**, Reviews 1024.1-1024.4.
- Culotta, V. C., Klomp, L. W., Strain, J., Casareno, R. L., Krems, B., Gitlin, J. D. (1997). The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **272**, 23469-23472.
- Curie, C., Alonso, J. M., Le Jean, M., Ecker, J. R., Briat, J. F. (2000). Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem. J.* **347**, 749-755.
- Dahmani-Muller, H., van Oort, F., Gelie, B., Balabane, M. (2000) Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environ. Pollut.* **109**, 231-238.
- Dehal, P. et al. (2002). The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* **298**, 2157-2167.



- de Knecht, J. A., van Dillen, M., Koevoets, P. L. M., Schat, H., Verkleij, J. A., Ernst, W. H. O. (1994). Phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Physiol.* **104**, 255-261.
- Dominguez-Solis, J., Gutierrez-Alcala, G., Romero, L., Gotor, C. (2001) The cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance. *J. Biol. Chem.* **276**, 9297-9302.
- Duffus, J. H. (2002) "Heavy metals" - A meaningless term? (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem.* **74**, 793-807.
- Durrant, W. E., Rowland, O., Piedras, P., Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D. (2000) cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* **12**, 963-977.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J., Guerinot, M. L. (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5624-5628.
- Eide, D. (1998) The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Nutr.* **18**, 441-469.
- Enard, W., Khaitovich, P., Klose, J., Zollner, S., Heissig, F., Giavalisco, P., Nieselt-Struwe, K., Muchmore, E., Varki, A., Ravid, R., Doxiadis, G. M., Bontrop, R. E., Pääbö, S. (2002) Intra- and interspecific variation in primate gene expression patterns. *Science* **296**, 340-343.
- Ernst, W. H. O. (1974) *Schwermetallvegetation der Erde*. G. Fischer Verlag, Stuttgart.
- Escarre, J., Lefebvre, C., Gruber, W., Leblanc, M., Lepart, J., Riviere, Y., Delay, B. (2000) Zinc and cadmium hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites in the Mediterranean area: implications for phytoremediation. *New Phytol.* **145**, 429-437.
- Fox, T. C., Guerinot, M. L. (1998) Molecular biology of cation transport in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 669-696.
- Frausto da Silva, J. J. R., Williams, R. J. P. (2001) *The Biological Chemistry of the Elements*. Oxford University Press, New York.
- Glerum, D. M., Shtanko, A., Tzagoloff, A. (1996) Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* **271**, 14504-14509.
- Griffith, O. W., Meister, A. (1979) Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J. Biol. Chem.* **254**, 7558-7560.
- 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., Thumann, J., Winnacker, E.-L., Zenk, M. H. (1988) Induction of heavy-metal binding phytochelatins by inoculation of cell cultures in standard media. *Plant Cell Rep.* **7**, 375-378.
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E.-L., Zenk, M. H. (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6838-6842.

- Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M. L., Eide, D. (1998) Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7220-7224.
- Guerinot, M. L. (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**, 190-198.
- Guerinot, M. L., Eide, D. (1999) Zeroing in on zinc uptake in yeast and plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 244-249.
- Guerinot M. L., Salt, D. E. (2001) Fortified foods and phytoremediation: two sides of the same coin. *Plant Physiol.* **125**, 164-167.
- Ha, S. B., Smith, A. P., Howden, R., Dietrich, W. M., Bugg, S., O'Connell, M. J., Goldsbrough, P. B., Cobbett, C. S. (1999) Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* **11**, 1153-1163.
- Hamer, D. (1986) Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 913-951.
- Hamza, I., Schaefer, M., Klomp, L. W., Gitlin, J. D. (1999) Interaction of the copper chaperone HAH1 with the Wilson disease protein is essential for copper homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13363-13368.
- Himelblau, E., Mira, H., Lin, S. J., Culotta, V. C., Penarrubia, L., Amasino, R. M. (1998) Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **117**, 1227-1234.
- Hinkle, P. M., Shanshala, E. D., Nelson E. J. (1992) Measurement of intracellular cadmium with fluorescent dyes. Further evidence for the role of calcium channels in cadmium uptake. *J. Biol. Chem.* **267**, 25553-25559.
- Hirayama, T., Kieber, J. J., Hirayama, N., Kogan, M., Guzman, P., Nourizadeh, S., Alonso, J. M., Dailey, W. P., Dancis, A., Ecker, J. R. (1999) RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell* **97**, 383-393.
- Hirsch, R. E., Lewis, B. D., Spalding, E. P., Sussman, M. R. (1998). A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* **280**, 918-921.
- Hirschi, K., Korenkov, V., Wilganowski, N. L., Wagner, G. J. (2000). Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiol.* **124**, 125-133.
- Hirschi, K. D., Zhen, R. G., Cunningham, K. W., Rea, P. A., Fink, G. R. (1996) CAX1, an  $H^+/Ca^{2+}$  antiporter from *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. USA* **93**, 8782-8786.
- Howden, R., Cobbett, C. S. (1992) Cadmium-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **107**, 1059-1066.
- Howden, R., Goldsbrough, P. B., Andersen, C. R., Cobbett, C. S. (1995) Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol.* **99**, 100-107.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T., Shinozaki, K. (2000). Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J.* **24**, 655-665.
- Iida, H., Nakamura, H., Ono, T., Okumura, M. S., Anraku, Y. (1994) MID1, a novel *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a plasma membrane protein, is required for  $Ca^{2+}$  influx and mating. *Mol. Cell Biol.* **14**, 8259-8271.

- Jackson, G., Murray, I., Hosszu, L., Gibbs, N., Waltho, J., Clarke, A., Collinge, J. (2001) Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8531-8535.
- Kamizono, A., Nishizawa, M., Teranishi, Y., Murata, K., Kimura, A. (1989) Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **219**, 161-167.
- Kampfenkel, K., Kushnir, S., Babiyshuk, E., Inze, D., Van Montagu, M. (1995) Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *J. Biol. Chem.* **270**, 28479-28486.
- Kiss, T., Osipenko, O. N. (1994) Toxic effects of heavy metals on ionic channels. *Pharmacol. Rev.* **46**, 245-267.
- Kneer, R., Kutchan, T. M., Hochberger, A., Zenk, M. H. (1992) *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin. *Arch. Microbiol.* **157**, 305-310.
- Knight, H., Knight, M. R. (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* **6**, 262-267.
- Kojima, Y., Binz, P.-A., Kägi, J. H. (1999) Nomenclature of metallothionein: proposal for a revision, in: *Metallothionein IV* (ed. Klaassen, C.), Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 7-13.
- Kondo, N., Imai, K., Isobe, M., Goto, T., Murasugi, A., Wada-Nakagawa, C., Hayashi, Y. (1984) Cadystin A and B, major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced in a fission yeast - separation, revision of structures and synthesis. *Tetrahed. Lett.* **25**, 3869-3872.
- Kovtun, Y., Chiu, W. L., Tena, G., Sheen, J. (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2940-2945.
- Krämer, U., Cotter-Howells, J. D., Charnock, J. M., Baker, A. J. M., Smith, A. C. (1996) Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* **379**, 635-638.
- Kubota, H., Sato, K., Yamada, T., Maitani, T. (2000) Phytochelatin homologs induced in hairy roots of horseradish. *Phytochem.* **53**, 239-245.
- Lane, T., Morel, F. (2000) A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4627-4631.
- Lasat, M. M., Baker, A. J. M., Kochian, L. V. (1996) Physiological characterization of root  $Zn^{2+}$  absorption and translocation to shoots in Zn hyperaccumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. *Plant Physiol.* **112**, 1715-1722.
- Lehmann, S. (2002) Metal ions and prion diseases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 187-192.
- Leopold, I., Günther, D., Schmidt, J., Neumann, D. (1999) Phytochelatin and heavy metal tolerance. *Phytochem.* **50**, 1323-1328.
- Li, L., Kaplan, J. (1998) Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity. *J. Biol. Chem.* **273**, 22181-22187.
- Ling, H. Q., Bauer, P., Berczky, Z., Keller, B., Ganai, M. (2002) The tomato fer gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 13938-13943.

- Lyons, T., Gasch, A., Gaither, L., Botstein, D., Brown, P., Eide, D. (2000) Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7957-7962.
- Ma, L., Komar, K., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y., Kennelley, E. (2001) A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* **409**, 579.
- Maathuis, F. J., Sanders, D. (1999) Plasma membrane transport in context - making sense out of complexity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 236-243.
- Macnair, M. R. (2002) Within and between population genetic variation for zinc accumulation in *Arabidopsis halleri*. *New Phytol.* **155**, 59-66.
- Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J. I., Ward, J., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I., Amtmann, A., Maathuis, F., Sanders, D., Harper, J., Tchieu, J., Gribskov, M., Persans, M., Salt, D., Kim, S., Guerinot, M. L. (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**, 1646-1667.
- Maitani, T., Kubota, H., Sato, K., Yamada, T. (1996). The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol.* **110**, 1145-1150.
- MAPK Group (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.* **7**, 301-308.
- Marschner, H. (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*, Academic Press, San Diego.
- Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, U., Müller-Röber, B., Schulz, B. (2002). Multifunctionality of plant ABC transporters - more than just detoxifiers. *Planta* **214**, 345-355.
- Moffat, A. S. (1999) Engineering plants to cope with metals. *Science* **285**, 369-370.
- Moser, B. A., Russell, P. (2000) Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 631-636.
- Nelson, N. (1999) Metal ion transporters and homeostasis. *EMBO J.* **18**, 4361-4371.
- Nies, D. H., Silver, S. (1995) Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Ind. Microbiol.* **14**, 186-199.
- Nriagu, J., Pacyna, J. (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* **333**, 134-139.
- O'Halloran, T. V., Culotta, V. C. (2000) Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J. Biol. Chem.* **275**, 25057-25060.
- Ortiz, D. F., Kreppel, L., Speiser, D. M., Scheel, G., McDonald, G., Ow, D. W. (1992) Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *EMBO J.* **11**, 3491-3499.
- 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.
- Ouyang, H., Vogel, H. J. (1998) Metal ion binding to calmodulin: NMR and fluorescence studies. *Biomaterials* **11**, 213-222.
- 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.

- Palmgren, M. G. (2001) Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 817-845.
- Palmiter, R. D. (1998) The elusive function of metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8428-8430.
- Palmiter, R. D., Cole, T. B., Findley, S. D. (1996) ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. *EMBO J.* **15**, 1784-1791.
- Palmiter, R. D., Cole, T. B., Quaife, C. J., Findley, S. D. (1998) ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14934-14939.
- Palmiter, R. D., Findley, S. D. (1995) Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J.* **14**, 639-649.
- Paulsen, I. T., Saier, M. H. Jr. (1997) A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J. Membr. Biol.* **156**, 99-103.
- Pence, N. S., Larsen, P. B., Ebbs, S. D., Letham, D. L., Lasat, M. M., Garvin, D. F., Eide D., Kochian L. V. (2000) The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4956-4960.
- Persans, M. W., Yan, X., Patnoe, J. M., Krämer, U, Salt, D. E. (1999) Molecular dissection of the role of histidine in nickel hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Plant Physiol.* **121**, 1117-1126.
- Pufahl, R. A., Singer, C. P., Peariso, K. L., Lin, S. J., Schmidt, P. J., Fahrni, C. J., Culotta, V. C., Penner-Hahn, J. E., O'Halloran, T. V. (1997) Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science* **278**, 853-856.
- Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C., O'Halloran, T. V. (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **284**, 805-808.
- Raskin, I. (1996) Plant genetic engineering may help with environmental cleanup. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3164-3166.
- Rausser, W. E. (1995) Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol.* **109**, 1141-1149.
- Rogers, E., Guerinot, M. L.(2002) FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 1787-1799.
- Saier, M. H. Jr. (2000) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 354-411.
- Salt, D. E., Rausser, W. E. (1995) MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiol.* **107**, 1293-1301.
- Salt, D. E., Smith, R. D., Raskin, I. (1998) Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 643-668.
- Salt, D. E., Wagner, G. J. (1993) Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a Cd<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity. *J. Biol. Chem.* **268**, 12297-12302.
- Sanchez-Fernandez, R., Davies, T. G., Coleman, J. O., Rea, P. A. (2001) The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *J. Biol. Chem.* **276**, 30231-30244.
- Sanders, D., Brownlee, C., Harper, J. F. (1999) Communicating with calcium. *Plant Cell* **11**, 691-706.

- Saydam, N., Adams, T., Steiner, F., Schaffner, W., Freedman, J. (2002) Regulation of metallothionein transcription by the metal responsive transcription factor MTF-1. Identification of signal transduction cascades that control metal-inducible transcription. *J. Biol. Chem.* **277**, 20438-20445.
- Sayre, L. M., Perry, G., Atwood, C. S., Smith, M. A. (2000) The role of metals in neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Biol.* **46**, 731-741.
- Schachtman, D. P., Schroeder, J. I., Lucas, W. J., Anderson, J. A., Gaber, R. F. (1992) Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis* KAT1 cDNA. *Science* **258**, 1654-1658.
- Schachtman, D. P., Kumar, R., Schroeder, J. I., Marsh, E. L. (1997) Molecular and functional characterization of a novel low-affinity cation transporter (LCT1) in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11079-11084.
- Schachtman, D. P., Schroeder, J. I. (1994) Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* **370**, 655-658.
- Schat, H., Kalff, M. M. A. (1992) Are phytochelatins involved in differential metal tolerance or do they merely Reflect metal-imposed strain? *Plant Physiol.* **99**, 1475-1480.
- Schat, H., Llugany, M., Vooijs, R., Hartley-Whitaker, J., Bleeker, P. M. (2002) The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *J. Exp. Bot.* **53**, 2381-2392.
- Schmöger, M., Oven, M., Grill, E. (2000) Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiol.* **122**, 793-801.
- Scholz, G., Becker, R., Pich, A., Stephan, U. W. (1992) Nicotianamine - a common constituent of strategy-I and strategy-II of iron acquisition by plants - a review. *J. Plant Nutr.* **15**, 1647-1665.
- Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J. M., Gaymard, F., Grignon, C. (1992) Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* **256**, 663-665.
- Silver, S. (1996) Bacterial resistances to toxic metal ions--a review. *Gene* **179**, 9-19.
- Solioz, M., Vulpe, C. (1996) CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends Biochem Sci.* **21**, 237-241.
- Suzuki, N., Koizumi, N., Sano, H. (2001) Screening of cadmium-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* **24**, 1177-1188.
- Terryn, N., Rouze, P., Van Montagu, M. (1999) Plant genomics. *FEBS Lett.* **452**, 3-6.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- The bZIP research group (2002) bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **7**, 106-111.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J. M., Crawford, N. M., Schroeder, J. I. (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4991-4996.
- Thumann, J., Grill, E., Winnacker, E.-L., Zenk, M. H. (1991) Reactivation of metal-requiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes. *FEBS Lett.* **284**, 66-69.
- Ueki, S., Citovsky, V. (2002) The systemic movement of a tobamovirus is inhibited by a

- cadmium-ion-induced glycine-rich protein. *Nat. Cell Biol.* **4**, 478-85.
- van der Zaal, B. J., Neuteboom, L. W., Pinas, J. E., Chardonens, A. N., Schat, H., Verkleij, J. A., Hooykaas, P. J. (1999) Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc- transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiol.* **119**, 1047-1056.
- Vatamaniuk, O. K., Mari, S., Lu, Y. P., Rea, P. A. (1999) AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and in vitro reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7110-7115.
- Vatamaniuk, O. K., Mari, S., Lu, Y., 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.
- Vatamaniuk, O. K., Bucher, E., Ward, J., Rea, P. A. (2001) A new pathway for heavy metal detoxification in animals. Phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **276**, 20817-20820.
- Vatamaniuk, O. K., Bucher, E., Ward, J., Rea, P. A. (2002) Worms take the 'phyto' out of 'phytochelatins'. *Trends Biotechnol.* **20**, 61-64.
- Verica, J., He, Z. (2002) The cell wall-associated kinase (WAK) and WAK-like kinase gene family. *Plant Physiol.* **129**, 455-459.
- Vert, G., Grotz, N., Dedaldechamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M. L., Briat, J. F., Curie, C. (2002) IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* **14**, 1223-1233.
- Vranova, E., Inzé, D., Van Breusegem, F. (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* **53**, 1227-1236.
- Winge, D. R., Jensen, L. T., Srinivasan, C. (1998) Metal-ion regulation of gene expression in yeast. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 216-221.
- Woeste, K. E., Kieber, J. J. (2000) A strong loss-of-function mutation in RAN1 results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. *Plant Cell* **12**, 443-455.
- Wood, V. et al. (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**, 871-880.
- Xiang, C., Oliver, D. J. (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1539-1550.
- Zenk, M. H. (1996) Heavy metal detoxification in higher plants--a review. *Gene* **179**, 21-30.
- Zhou, J., Goldsbrough, P. B. (1994) Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell* **6**, 875-884.
- Zhu, J. K. (2001) Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 401-406.
- Zhu, T., Wang, X. (2000) Large-scale profiling of the *Arabidopsis* transcriptome. *Plant Physiol.* **124**, 1472-1476.

### 3. VERZEICHNIS DER FÜR DIESE ARBEIT RELEVANTEN EIGENEN VERÖFFENTLICHUNGEN

1. **Clemens, S.**, Antosiewicz, D. M., Ward, J. M., Schachtman, D. P., Schroeder, J. I. (1998) The plant cDNA *LCT1* mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12043-12048.
2. **Clemens, S.**, Kim, E. J., Neumann, D., Schroeder, J. I. (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J.* **18**, 3325-3333.
3. **Clemens, S.** (2001) Molecular mechanisms of plant metal homeostasis and tolerance. *Planta* **212**, 475-486.
4. **Clemens, S.**, Schroeder, J. I., Degenkolb, T. (2001) *C. elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3640-3643.
5. **Clemens, S.** (2001) Developing tools for phytoremediation: towards a molecular understanding of plant metal tolerance and accumulation. *Int. J. Occup. Med. Environm. Health* **14**, 235-239.
6. Cazalé, A.-C., **Clemens, S.** (2001) *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase. *FEBS Lett.* **507**, 215-219.
7. **Clemens, S.**, Thomine, S., Schroeder, J. I. (2002) Molecular mechanisms that control plant tolerance to heavy metals and possible roles towards manipulating metal accumulation. In: Plant Biotechnology and Transgenic Plants (eds. Oksman-Caldentey, K.-M., Barz, W.), Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 665-691.
8. Bloss, T., **Clemens, S.**, Nies, D. H. (2002) Characterization of the ZAT1p zinc transporter from *Arabidopsis thaliana* in microbial model organisms and reconstituted proteoliposomes. *Planta* **214**, 783-791.
9. **Clemens, S.**, Bloss, T., Vess, C., Neumann, D., Nies, D. H., zur Nieden, U. (2002) A transporter in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells mediates zinc storage and differentially affects transition metal tolerance. *J. Biol. Chem.* **277**, 18215-18221.
10. **Clemens, S.**, Palmgren M.G., Krämer, U. (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci.* **7**, 309-315
11. **Clemens, S.**, Simm, C., Maier, T. (2003) Heavy metal binding proteins and peptides. In: Biopolymers, Vol. 8 Polyamides and complex proteinaceous materials II (eds. Steinbüchel, A., Fahnestock, S.R.), Wiley-VCH, Weinheim, 255-288.
12. Maier, T., Yu, C., Küllertz, G., **Clemens, S.** Peptide scanning localizes metal-binding sites in phytochelatin synthases. Eingereicht.
13. **Clemens, S.**, Simm, C. *Schizosaccharomyces pombe* as a model for metal homeostasis in plant cells: the phytochelatin-dependent pathway is the main Cd detoxification mechanism. Eingereicht.



#### **4. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Habilitationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt habe. Andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Halle, den 6. Februar 2003

Stephan Clemens

## 5. LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Name: Stephan Clemens  
 Geburtsdatum: 9. Februar 1963  
 Nationalität: deutsch  
 Familienstand: verheiratet, zwei Kinder (Tobias, 13 Jahre alt, Nicola, 10 Jahre alt)

Anschrift: Ernst-Schneller-Str. 8  
 06114 Halle/Saale

1969-1973 Besuch der Grundschule Burgaltendorf in Essen  
 1973-1983 Humboldt-Gymnasium Essen, Abitur im Mai 1983 (Note 1.8)  
 1983-1985 Grundstudium der Geschichte, Germanistik und Politikwissenschaft an der Universität Münster  
 1985-1991 Studium der Biologie an der Universität Münster und der University of Sussex, Brighton, UK (1988/89), Diplom Januar 1992 (Note: Sehr gut)  
 1988-1991 Stipendiat der „Studienstiftung des Deutschen Volkes“  
 1992-1995 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Pflanzen, Universität Münster, und Promotionsstudium unter Betreuung von Prof. Dr. Wolfgang Barz  
 August 1995 Promotionsprüfung und Ernennung zum Dr. rer. nat. (magna cum laude)  
 1996-1997 DAAD-Stipendiat (NATO) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Julian I. Schroeder an der University of California San Diego, USA  
 1997-1998 Postdoctoral Research Associate an der University of California San Diego, USA, Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Julian I. Schroeder  
 seit März 1998 Gruppenleiter am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle/Saale, Abt. Stress- und Entwicklungsbiologie, Leiter: Prof. Dr. Dierk Scheel

Halle, den 6. Februar 2003

Stephan Clemens