

"Funktionelle Charakterisierung von ZIP-Transportproteinen aus  
*Schizosaccharomyces pombe* und *Arabidopsis*"

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

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

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

von

Frau Annegret Boch, geborene Bährecke

geboren am 28.12.1977 in Schönebeck

Gutachter:

1. Prof. Dr. D.H. Nies

2. Prof. Dr. K. Humbeck

3. Prof. Dr. S. Clemens

Halle (Saale), 10.06.2010



---

Teile dieser Arbeit wurden in Fachzeitschriften publiziert:

Loss of Zhf and the tightly regulated zinc-uptake system SpZrt1 in *Schizosaccharomyces pombe* reveals the delicacy of cellular zinc balance.

Boch A, Trampczynska A, Simm C, Taudte N, Kämer U, Clemens S.  
FEMS Yeast Res. 2008 Sep; 8(6):883-96. Epub 2008 Jul 11.

Arabidopsis IRT3 is a zinc-regulated and plasma membrane localized zinc/iron transporter.

Lin YF, Liang HM, Yang SY, Boch A, Clemens S, Chen CC, Wu JF, Huang JL, Yeh KC.  
New Phytol. 2009; 182(2): 392-404. Epub 2009 Feb 12.



## Zusammenfassung

Übergangsmetalle wie Zink verursachen besondere Probleme für alle Organismen. Auf der einen Seite ist Zink essentieller Bestandteil einer Vielzahl von Enzymen und Transkriptionsfaktoren. Auf der anderen Seite kann es leicht unter erhöhten Konzentrationen toxisch wirken. Deshalb ist ein komplexes Metalhomöostasenetzwerk notwendig, um eine streng kontrollierte Aufnahme, Verteilung, Speicherung und Entgiftung zu gewährleisten. Hauptaufgaben in der Zinkhomöostase werden durch Metalltransporter und Metallliganden mit niedrigem Molekulargewicht übernommen.

Die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* ist ein Modellorganismus für die Entgiftung verschiedener Übergangsmetalle durch Phytochelatine. Kürzlich wurden Phytochelatine auch mit der Entgiftung von Zink in Verbindung gebracht. In dieser Arbeit, zur Charakterisierung der zellulären Zinkhomöostase im eukaryotischen Modell *S. pombe* wurde die Familie der ZIP-Transporter untersucht. Proteine dieser Familie sind ubiquitär verbreitet und sowohl an der  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  Aufnahme über die Plasmamembran als auch an ihrer Mobilisierung aus internen Depots beteiligt.

Durch die Charakterisierung von Mutanten konnte das Zinkhuptaufnahmesystem Zrt1 in *S. pombe* identifiziert werden. Zellen ohne *zrt1*<sup>+</sup> haben im Vergleich zum Wildtyp einen drastisch reduzierten Zinkgehalt und können nicht auf zinkarmen Medium wachsen. Die Zinkaufnahme von Zrt1 ist spezifisch und wird nur durch  $\text{Cd}^{2+}$  nicht aber durch  $\text{Fe}^{2+}$  oder  $\text{Mn}^{2+}$  inhibiert. Sowohl die Transkript- als auch die Proteinmenge werden straff durch die äußere Zinkkonzentration reguliert. Dementsprechend ist Zrt1 in Zellen, die einen Zinkmangel aufweisen aktiv und inaktiv in zinkgesättigten Zellen. Besonders deutlich wird dies in Stämmen in denen der Zhf Transporter, der die Speicherung in das Endoplasmatische Retikulum vermittelt, fehlt. Hier wird die *zrt1*<sup>+</sup> mRNA 100-fach sensitiver reguliert als im Wildtyp.

Auch in Zellen, die kein *zip2*<sup>+</sup> Gen besitzen, ist die Zrt1 Aktivität erhöht. Zip2 konnte im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert werden und ist hier wahrscheinlich für die Remobilisierung des gespeicherten Zinks verantwortlich. *Zip2*<sup>+</sup> Mutantenzellen, die unter hohen Zinkkonzentrationen angezogen wurden, haben im Vergleich zum Wildtyp einen doppelt so hohen Zinkgehalt. Durch den gleichzeitigen Verlust von Zrt1 und Zip2 können die Zellen über einer großen Zinkkonzentrationsbreite nicht mehr wachsen. Erst hohe Zinkkonzentrationen führen zur Wiederherstellung der Wildtypvitalität.

Bei Zip3 handelt es sich um einen Transporter, der in der Vakuolenmembran von *S. pombe* lokalisiert wurde. Auch bei diesem ZIP-Transporter kann nach ersten Ergebnissen eine Beteiligung an der Zinkhomöostase vermutet werden. Weitere Funktionen sind allerdings nicht bekannt.

Um *S. pombe* als Modellorganismus zur Charakterisierung pflanzlicher Zinkhomöostasefaktoren zu etablieren, wurden die ZIP Transporter IRT3 aus *Arabidopsis thaliana* und *Arabidopsis halleri* in der *S. pombe* Aufnahmemutante  $\Delta zrt1$  exprimiert. Die pflanzlichen Proteine waren in der Lage den Wachstumsphänotyp der  $\Delta zrt1$  Mutante zu komplementieren. Desweiteren

konnte eine Zinkaufnahmeaktivität für AtIRT3 und AhIRT3 in *S. pombe* und *Saccharomyces cerevisiae* gemessen werden. Darüber hinaus konnte eine Inhibierung der IRT3 abhängigen Zinkaufnahme durch  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  in *S. cerevisiae* beobachtet werden.

## Summary

Transition metals like zinc cause specific problem for all organisms. On the one hand zinc is an essential component of many enzymes and transcription factors. On the other hand it is toxic under elevated concentrations. Thus, a complex metal homeostasis network is necessary to guarantee a tightly regulated uptake, distribution, storage and detoxification. Major tasks in the zinc homeostasis are controlled by metal transporters and low-molecular weight ligands.

The fission yeast *Schizosacharomyces pombe* is a model organism for detoxification of different transition metals by phytochelatin. Recently, phytochelatin have also been described to detoxify zinc. In this work to study cellular zinc homeostasis in the eucaryotic model *S. pombe* I focused on the ZIP- transporter family. Proteins of this family are ubiquitous and involved in  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  uptake across the plasma membrane as well as mobilisation from internal depots.

The main zinc uptake system Zrt1 could be identified in *S. pombe* by characterisation of mutants. Cells lacking *zrt1*<sup>+</sup> have a strongly reduces zinc content compared to wildtype and are not able to grow under zinc-depleted conditions. Zinc uptake via Zrt1 is specific and only inhibited by  $\text{Cd}^{2+}$  but not by  $\text{Fe}^{2+}$  or  $\text{Mn}^{2+}$ . Both, transcript and protein abundances are tightly regulated by the external zinc concentration. Accordingly, Zrt1 is active in zinc-depleted cells and not active in zinc-repletes cells. Especially in the absence of Zhf, a transporter mediating zinc storage in the endoplasmatic reticulum, *zrt1*<sup>+</sup> mRNA is regulated 100-fold more sensitive.

In cells without a fuctional *zip2*<sup>+</sup> gene, the Zrt1 activity is also higher than in wildtype cells. Zip2 was localized in the endoplasmic reticulum membrane and presumably remobilises stored zinc. *Zip2*<sup>+</sup> mutant cells grown under high zinc conditions contain twice as much zinc than wildtype cells. In the abcense of Zrt1 and Zip2 strains are not able to grow over a wide range of zinc concentrations. Only under high zinc concentrations double mutant cells achieved wildtype vitality.

Zip3 is a transporter localised in the *S. pombe* vacuolar membrane. According to preliminary results a function in zinc homeostasis is supposed. Further functions are still unknown.

To establish *S. pombe* as a model system for the characterisation of plant zinc homeostasis factors, the ZIP proteins IRT3 from *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* were expressed in the *S. pombe*  $\Delta zrt1$  mutant. Both plant proteins were able to complement the  $\Delta zrt1$  mutant growth phenotype. Futhermore a zinc uptake activity of AtIRT3 and AhIRT3 was measured. This uptake activity was verified by experiments in *Saccharomyces cerevisiae*. Moreover an inhibition of IRT3 zinc uptake by  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  was monitored in *S. cerevisiae*.



## Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	III
INHALTSVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IX
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Die physiologische Bedeutung der Übergangsmetalle	1
1.2 Das Mikronährelement Zink	5
1.3 Das nichtessentielle Übergangsmetall Cadmium	6
1.4 Mechanismen der Metallhomöostase	8
1.4.1 Membrantransport und Zinktransportproteine	8
1.4.2 Komplexierung von Zink	15
1.4.3 Regulation der Zinkhomöostase	17
1.5 Zinkhomöostase, -hyperakkumulation und -toleranz in Pflanzen	19
1.6 Metallhomöostase im Modellsystem <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	23
1.7 Zielstellung	25
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>27</b>
2.1 Stämme und Plasmide	27
2.1.1 Bakterien und Hefestämme	27
2.1.2 Plasmide	28
2.2 Nährmedien und Anzuchtbedingungen	29
2.3 Molekularbiologische Methoden	30
2.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren	30
2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	31
2.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	32
2.3.4 Klonierung mittels Gateway® Technologie	32
2.3.5 cDNA Synthese	33
2.3.6 Quantitative <i>real time</i> PCR	33
2.3.7 Methoden zum horizontalen Gentransfer	33
2.4 Proteinbiochemische Methoden	36
2.4.1 Zellaufschluss und Proteinrohextraktion aus <i>S. pombe</i>	36
2.4.2 Quantifizierung von Proteinen	36

2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, Western-Blot und Immundetektion	36
<b>2.5 <i>S. pombe</i> Wachstumsassays</b>	<b>36</b>
<b>2.6 Langzeitaufnahmeexperimente</b>	<b>37</b>
2.6.1 Anzucht und Probenaufbereitung für Atomabsorptionsspektroskopie (Flamme)	37
2.6.2 Probenanalyse mit Atomabsorptionsspektroskopie (Flamme)	37
2.6.3 Anzucht und Probenaufbereitung für ICP-OES ( <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> ) nach (Eide, 2005)	37
<b>2.7 Kurzaufnahmeexperimente mit radioaktivem Zink</b>	<b>38</b>
<b>2.8. Lokalisationsstudien</b>	<b>39</b>
2.8.1 Immunlokalisation und Elektronenmikroskopie nach (Clemens <i>et al.</i> 2002)	39
2.8.2 Fluoreszenzmikroskopie nach (Tran <i>et al.</i> 2004)	39
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Elementanalyse in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> Wildtyp und ausgewählten Mutanten des Metallhaushalts</b>	<b>41</b>
<b>3.2 Charakterisierung des SpZrt1 Zinktransporters aus <i>S. pombe</i></b>	<b>44</b>
3.2.1 Additiver Effekt der $\Delta zrt1$ und $\Delta zhf$ Mutationen	44
3.2.2 SpZrt1 ist für den Anstieg des Zinkgehalts unter niedrigen Zinkkonzentrationen verantwortlich	46
3.2.3 SpZrt1 ist für den Zinkaufnahmetransport in <i>S. pombe</i> verantwortlich	47
3.2.4 Die SpZrt1 abhängige Zinkaufnahme wird durch Cadmium inhibiert	50
3.2.5 Transkriptionelle Regulation des Zinkaufnahmetransporters SpZrt1	51
3.2.6 Einfluss von Zink auf die SpZrt1 Proteinabundanz	54
3.2.7 Transkriptionelle Regulation von $zrt1^+$ durch Cadmium	57
3.2.8 Einfluss von Cadmium auf die SpZrt1-HA Abundanz	59
3.2.9 In <i>S. pombe</i> erfolgt ein Cadmiumeintrag unter Zinkmangel	60
3.2.10 Subzelluläre Lokalisation des SpZrt1-Proteins	61
<b>3.3 Charakterisierung des Zip2 Zinktransporters aus <i>S. pombe</i></b>	<b>63</b>
3.3.1 Verlust von Zip2 führt zu einer höheren zellulären Zinkkonzentration	63
3.3.2 Die SpZrt1 Aktivität ist in der $\Delta zip2$ Mutante erhöht	64
3.3.3 Einfluss der $\Delta zip2$ Mutation auf das Wachstum von <i>S. pombe</i> unter verschiedenen Zinkkonzentrationen	66
3.3.4 Einfluss der $\Delta zip2$ Mutation auf das Wachstum von <i>S. pombe</i> unter verschiedenen Cadmiumkonzentrationen	68
3.3.5 $zip2^+$ Transkriptregulation	69
3.3.8 Subzelluläre Lokalisation des Zip2 Proteins.	70
<b>3.4 Charakterisierung des ZIP-Transporters Zip3 aus <i>S. pombe</i></b>	<b>72</b>
3.4.1 Subzelluläre Lokalisation von Zip3	72
3.4.2 Analyse des zellulären Zinkgehalts der $\Delta zip3$ Mutante	74
<b>3.5 Charakterisierung von AtIRT3 und AhIRT3 in <i>S. cerevisiae</i> und <i>S. pombe</i> Mutanten</b>	<b>75</b>
3.5.1 Zinktransport durch AtIRT3 und AhIRT3	76
3.5.2 Konkurrenz der IRT3 abhängigen Zinkaufnahme	78

4. DISKUSSION	81
4.1 SpZrt1 der Haupteintrittsweg für Zink in die <i>Schizosaccharomyces pombe</i> Zelle	81
4.1.1 Kontrolle der Zinkaufnahme durch Regulation von SpZrt1	83
4.1.2 posttranskriptionelle Regulation von SpZrt1	88
4.1.3 Der Verlust des <i>zhf<sup>+</sup></i> Gens führt zu einer sensitiven Regulation der <i>zrt1<sup>+</sup></i> Expression	89
4.1.4 SpZrt1 Lokalisation	92
4.2 Die Hintertür, Zinkaufnahme ohne SpZrt1	94
4.3 Kompartimentierung: Zip2 ist ein Zinkaufnahmetransporter, der für die Remobilisierung des internen Zinkspeichers verantwortlich ist	97
4.4 Die Konkurrenz zwischen Zn <sup>2+</sup> und Cd <sup>2+</sup>	101
4.5 Zip3, ein Transporter in der Vakuolenmembran	105
4.6 AtIRT3 und AhIRT3 sind pflanzliche Zinkaufnahmetransporter der ZIP-Familie	107
4.7 Untersuchungen zur Zinkhomöostase in <i>S. pombe</i> : ein Ausblick	109
5. LITERATURVERZEICHNIS	112
DANKSAGUNG	124



## Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorbti <sup>o</sup> nsspektrometrie
ABC	ATP - <i>binding cassette</i>
AD	Aktivierungsdomäne
ade	Adenin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin- 5' - phosphat
BCA	<i>bicinchonic acid</i>
bp	<i>base pair</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CAX	<i>cation exchanger</i>
CCS	<i>copper chaperone</i> for SOD1
CDF	<i>cation diffusion facilitator</i>
DEPC	Diethylidicarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	<i>elongation factor</i>
EMM	Edinburgh Minimalmedium
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FIT	<i>Fe-deficiency induced transcriptionfactor</i>
FM	<i>fluorescent marker</i>
FY	<i>fission yeast</i>
GCS	Glutamylcysteinsynthetase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GSH	Glutathion
HA	Hämagglutinin
his	Histidin
HMA	<i>heavy metal ATPase</i>
HMT	<i>heavy metal tolerance</i>
ICP-OES	<i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
IRT	<i>iron regulated transporter</i>
IUBMB	<i>international union of biochemistry and molecular biology</i>
IUPAC	<i>international union of pure and applied chemistry</i>
kan	Kanamycin
KAT	Katalase
kb	<i>kilo base</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
leu	Leucin
MAT	<i>mating type locus</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MES	Morpholinoethansulonsäure
MRE	<i>metal responsive element</i>
Msc	<i>meiotic sister-chromatid recombination</i>
MT	Metallothionein
MTF	<i>metal-responsive transcription factor</i>
MTP	<i>metal tolerance protein</i>
NA	Nicotianamin
NAS	Nicotianaminsynthase
nmt	<i>no message in thiamine</i>
NRAMP	<i>natural resistance associated macrophage proteins</i>
OD	optische Dichte
ori	<i>origin of replication</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PC	Phytochelatine
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PCS	Phytochelatinsynthase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	<i>parts per million</i> (mg/kg)
PS	Phytochelatin
QTL	<i>quantitative trait loci</i>
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reaktive oxygen species</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SD	<i>synthetic defined medium</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SOD	Superoxiddismutase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TG	Trockengewicht

---

TM	Transmembranhelix
Tris	Tris(hydroxymethyl)amminomethan
U	<i>unit</i>
ura	Uracil
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
w/w	<i>weight per weight</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
YS	<i>yellow stripe</i>
ZAP	<i>zinc-responsive activator protein</i>
ZAT	<i>Zn transporter of Arabidopsis thaliana</i>
Zhf	<i>zinc homeostasis factor</i>
ZIF	<i>zinc induced facilitator</i>
ZIP	<i>ZRT-, IRT-like protein</i>
ZnT	<i>zinc transporter</i>
znu	<i>Zn<sup>2+</sup> uptake</i>
ZRE	<i>zinc responsive element</i>
zrg	<i>zinc regulated gene</i>
ZRT	<i>zinc regulated transporter</i>

## Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung	
1.1 Bildung und Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) unter Einfluss von Übergangsmetallionen.	4
1.2 Typische Dosis-Effektkurve für Mikronährelemente.	4
1.3 TopologieModell der ZIP-Transporter.	9
1.4 Kristallstruktur des CDF-Transporters YiiP aus <i>E. coli</i> .	14
1.5 Abbildungen des Nichtakkumulators <i>Arabidopsis thaliana</i> und des Hyperakkumulators <i>Arabidopsis halleri</i> .	21
3. Ergebnisse	
3.1 ICP-OES-Elementanalyse ausgewählter Mutanten der Metallhomöostase.	43
3.2 Die Deletion in $\Delta zrt1$ führt zur Reduktion des Zinkgehalts in $\Delta zhf$ .	45
3.3 SpZRT1 ist essentiell für die Akkumulation von $Zn^{2+}$ unter niedrigen Zinkkonzentrationen.	47
3.4 SpZrt1 wird für die Zinkaufnahme benötigt.	48
3.5 Temperaturabhängige $^{65}Zn$ -Akkumulation.	50
3.6 Kompetition der $^{65}Zn$ -Akkumulation durch verschiedene Metallkationen.	51
3.7 Das Zinkangebot beeinflusst die $zrt1^+$ Transkriptabundanz zeit- und konzentrationsabhängig.	52
3.8 SpZrt1-HA Fusionsprotein beeinflusst weder Wachstum noch Transkriptakkumulation.	54
3.9 Zink beeinflusst die SpZrt1-HA Proteinabundanz.	56
3.10 Einfluss der Zinkkonzentration auf die SpZrt1-HA Proteinabundanz.	57
3.11 Cadmium beeinflusst das $zrt1^+$ Transkriptlevel zeit- und konzentrationsabhängig.	58
3.12 Cadmium beeinflusst die SpZrt1-HA Proteinabundanz.	60
3.13 Die Cadmiumakkumulation ist zinkabhängig und in der $\Delta zrt1$ Mutante stark erhöht.	61
3.14 Subzelluläre Lokalisation des SpZrt1-Proteins.	62
3.15 Der Verlust von $zip2^+$ führt zu einer höheren zellulären Gesamtzinkkonzentration.	64
3.16 Effekte der $\Delta zip2$ Mutation in der Zinkaufnahme sind durch eine höhere SpZrt1 Aktivität begründet.	65
3.17 Zip2 wird für das Wachstum unter Zinkdefizienz benötigt.	67
3.18 Eine Mutation im $zip2^+$ Gen führt zu erhöhter Cadmiumsensitivität.	69
3.19 Die $zip2^+$ Expression ist zinkabhängig.	70
3.20 Lokalisation von Zip2-GFP.	71
3.21 Kolokalisation von Zip3-GFP mit Vakuolenmarker.	73
3.22 Die Deletion von $zip3^+$ führt zur geringfügigen Reduktion des Zinkgehalts.	74
3.23 Wachstum der AtIRT3- und AhIRT3- exprimierenden $\Delta zrt1$ Mutante unter verschiedenen $Zn^{2+}$ -Konzentrationen und Kompletionsanalyse mit $Fe^{2+}$ und $Cd^{2+}$ .	76
3.24 Zinkaufnahme durch AtIRT3 und AhIRT3 in der <i>S. pombe</i> Aufnahmemutante $\Delta zrt1$ .	77
3.25 Zinkaufnahme und Kompetition der AtIRT3 und AhIRT3 exprimierenden <i>S. cerevisiae</i> Aufnahmemutante <i>zhy3</i> .	79
4.1 Vergleichender Überblick über Zinkaufnahme und intrazellulärer -homöostase von <i>S. cerevisiae</i> (A) und <i>S. pombe</i> (B) (verändert nach (Eide 2006)).	87



# 1. Einleitung

## 1.1 Die physiologische Bedeutung der Übergangsmetalle

Zellen begegnen in einer sich verändernden Umwelt wechselnden Nährstoffangeboten. Von zirka 90 in der Erdkruste vorkommenden Elementen findet man rund 40 in Bestandteilen lebender Zellen wieder (Fallert-Müller *et al.* 2004). Bisher konnte aber nicht für alle diese Elemente eine biologische Relevanz nachgewiesen werden. Bioelemente sind essentiell, wenn sie in einer bestimmten Spezies nicht nur ständig gegenwärtig sind, sondern ihre Abwesenheit in der Nahrungsquelle zu Krankheit, Entwicklungsstörungen oder metabolischen Anomalien führt. Ungefähr 20 Bioelemente sind essentiell für jeden Organismus (Fraústo da Silva and Williams 2001). Sie werden nach ihrer mengenmäßigen Verteilung in Makro- und Mikronährelemente gruppiert. Während die Makronährelemente C, O, H, N, S, P, Ca, K, Na, Cl und Mg zusammen etwa 99 % der Biomasse stellen kommen andere Bioelemente nur in Spuren vor. Die Konzentration jener Spuren- oder Mikronährelemente beträgt weniger als 50 mg/kg (50 ppm) Feuchtwicht. In diesem Kontext kommt den Übergangsmetallionen der 4. Periode eine besondere Bedeutung zu. Ihre Vertreter Vanadium, Chrom, Mangan, Eisen, Cobalt, Nickel, Kupfer und Zink zählt man zu den Mikronährelementen (Marschner 1995; Fraústo da Silva and Williams 2001). Der geringe Massenanteil sagt jedoch nichts über deren enorme biologische Relevanz aus, die erst im Zusammenspiel mit Proteinen deutlich wird (Tabelle1). Genomsequenzprojekte zeigen, dass ungefähr 30 % eines durchschnittlichen Bakterienproteoms aus Metallproteinen besteht. Weiterhin binden mindestens 6 % der Proteine aus *Arabidopsis thaliana* an Übergangsmetalle (Krämer *et al.* 2007). Neusten Schätzungen zu Folge sind 10 % des humanen Proteoms allein mit Zink assoziiert (Andreini *et al.* 2006). Biologische Systeme benötigen Spurenelemente hauptsächlich für katalytische Reaktionen oder als strukturelle Bestandteile von Proteinen.

Obwohl die meisten essentiellen Übergangsmetalle eine horizontale Serie im Periodensystem der Elemente bilden sind viele physikalischen und chemischen Eigenschaften dieser Metalle, wie zum Beispiel Härtegrad, Schmelzpunkt oder elektrische Leitfähigkeit sehr ähnlich. Mit Ausnahme von Kupfer haben die Übergangsmetalle der 4. Periode die äußersten 4s-Orbitale besetzt und unterscheiden sich lediglich im Gradmaß mit dem die inneren 3d-Orbitale besetzt sind. Die Besetzung der 3d-Orbitale verleiht den Übergangsmetallen nicht nur ihren Namen sondern insbesondere zwei Eigenschaften: Sie können sowohl ionische als auch kovalente Bindungen eingehen. Im Vergleich zu anderen Elektronenschalen nehmen d-Orbitale mehr Raum ein. Auf deren Elektronen wirkt damit eine geringere Kernanziehung, die dem Element eine niedrige Ionisierungsenergie vermittelt (Mortimer 1996). In biologischen Systemen kommen die Übergangsmetalle fast ausschließlich in ihrer ionischen Form vor und können nur als solche aufgenommen und physiologisch aktiv werden. Die Fähigkeit leicht Elektronen aufzunehmen und abzugeben macht Übergangsmetalle zu idealen Redoxpartnern. Als solche üben sie eine Funktion als Metallkofaktoren in Enzymen von Elektronentransportketten

## 1. Einleitung

aber auch in einer Vielzahl anderer Enzyme aus. Ein prominentes Beispiel hierfür ist das Kupferion, das als Kofaktor der Cytochrom-c-oxidase und Plastocyanin unverzichtbar für Elektronentransportketten ist. Mit steigender Ordnungszahl vollzieht sich innerhalb der Periode ein Übergang zwischen schwacher und mittlerer Lewisäure Eigenschaften. Somit können Übergangsmetalle auch kovalente Bindungen eingehen und an funktionelle Gruppen von Proteinen wie Carboxyl-, Thiol-, Imidazol-, Sulfhydrylgruppen binden (Fraústo da Silva and Williams 2001). Daher können Übergangsmetalle nicht nur aktiv an enzymatischen Reaktionen beteiligt sein sondern auch eine passive Funktion als Strukturkomponente in Enzymen und anderen Proteinen wahrnehmen.

**Tabelle 1.1: Beispiele physiologischer Funktionen einiger Übergangsmetalle.**

Metallkation	Oxidationsstufe im biologischen System	Beispiele physiologischer Funktionen
Mangan (Mn)	+II,+III,+IV	- wasserspaltender Komplex der oxygenen Photosynthese - Superoxid-Dismutase - Insulinproduktion in der Bauchspeicheldrüse
Eisen (Fe)	+II +III	- Kofaktor im Hämoglobin und Myoglobin - Bestandteil von Eisen-Schwefel-Clustern in Nitrogenasen, Hydrogenasen oder Komplexen der Atmungskette - Superoxid-Dismutasen - Reaktionszentren des Photosystems I und II - Katalase - Elektronentransport in Atmungsketten, Reaktionszentren des Photosystems I und II - Ferredoxin, Cytochrom P450-Monooxygenase, Peroxidasen
Cobalt (Co)	+II,+III	Vitamin B12, Koenzym von Methyltransferasen
Nickel (Ni)	+II	Hydrogenasen, Urease, Coenzym F480
Kupfer (Cu)	+I,+II	Cytochrom c-Oxidase, Plastocyanin, Cu-, Zn-Superoxid-Dismutase
Zink (Zn)	+II	Bestandteil von Zinkfingertranskriptionsfaktoren Ribosomale Proteine (Nanamiya <i>et al.</i> 2004) Vertreter aus allen 6 Enzymklassen nach IUPAC und IUBMB: 1. Oxidoreduktasen, katalysieren Redoxreaktionen z.B.: Cu, Zn-Superoxid-Dismutase, Alkoholdehydrogenase  2. Transferasen, übertragen funktionellen Gruppen von einem Substrat auf ein anderes z.B.: DNA-Polymerase, RNA-Polymerase  3. Hydrolasen, spalten Bindungen unter Einsatz von Wasser z.B.: $\beta$ -Lactamase, Phospholipase C, Nuklease, Alkaline Phosphatase, Zn-Proteasen  4. Lyasen, Spaltung und Synthese komplexer Produkte ohne ATP-Spaltung z.B.: Carboanhydrase  5. Isomerasen, Umwandlung chemischer Isomere  6. Ligasen oder Synthetasen, Bildung von Substanzen, die chemisch komplexer sind als die Substrate unter ATP-Spaltung z.B.: DNA-Ligase

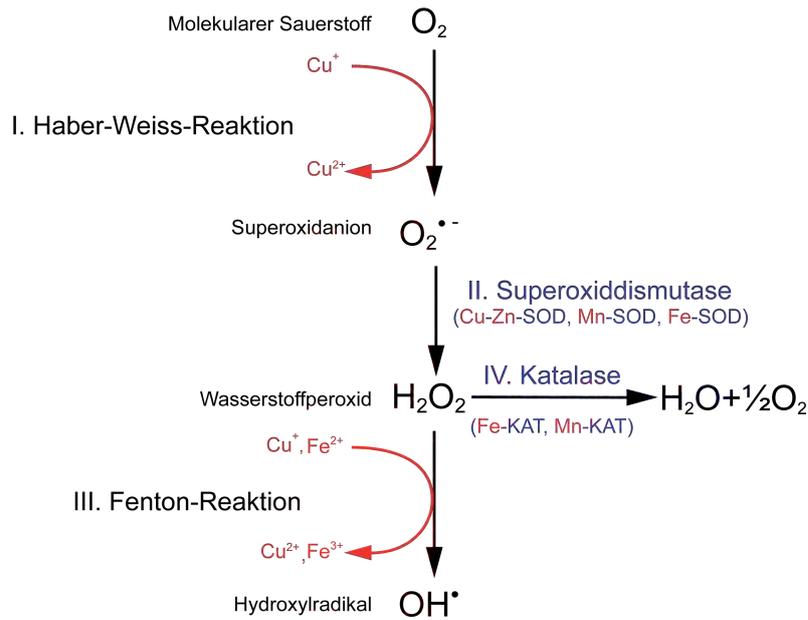
Während eine bestimmte enzymatische Reaktion in einer bestimmten Spezies ein spezifisches Übergangsmetall benötigt kann die gleiche Funktion in einer anderen Spezies ein anderes Spurenelement benötigen. Zum Beispiel können Superoxid-Dismutasen Fe, Cu und Zn oder Mn , Alkalische Phosphatasen Zn oder Mn und Katalasen Fe oder Mn enthalten. So ist es möglich, dass

Fe von den meisten Zellen in 10- bis 50-fach höherer Konzentration als andere Übergangsmetalle für die Katalyse essentieller Reaktionen akkumuliert wird, aber in anaerob lebenden Milchsäurebakterien fehlt (Archibald 1983). Die Eisenabstinenz von Milchsäurebakterien wird als Habitatanpassung an das eisenlimitierte Substrat gewertet. Neben den spezifischen Eigenschaften der einzelnen Übergangsmetalle liegt die Ursache in der Häufigkeit der Verwendung sicherlich auch in der Häufigkeit ihres Vorkommens in der Erdkruste. So besitzen Elemente der gleichen Gruppe zwar ähnliche chemische und physikalische Eigenschaften ihre Verbreitung in der Erdkruste nimmt aber mit zunehmender Ordnungszahl ab (Merian *et al.* 2004).

Essentielle Spurenelemente liegen für Lebewesen in der Natur oft limitiert vor oder sind bedingt durch geringe Löslichkeit wenig verfügbar. Jedoch führen natürliche oder anthropologische Einflüsse lokal zu erhöhten Konzentrationen bestimmter Übergangsmetalle in Organismen. Auch wenn viele Spurenelemente essentiell sind, ist die physiologische Konzentrationsbreite der Übergangsmetalle sehr eng und sie wirken in hoher Dosis toxisch. Die Gründe für die Toxizität sind vielseitig. So kann die beschriebene hohe Affinität zu funktionellen Gruppen von Enzymen unkontrolliert zu Funktionsverlust und Schaden führen. Weiterhin ist ein Übergangsmetallion in der Lage ein anderes abwärts der Irving-Williamsreihe zu verdrängen. In der ersten Periode der Übergangsmetalle kommt es in Metall-Ligandenkomplexen zu einer wachsende Stabilität von Mangan zu Kupfer gefolgt von einer niedrigeren Stabilität für Zink [ $Zn^{2+} < Cu^{+} < Cu^{2+} < Ni^{2+} < Co^{2+} > Fe^{2+} > Mn^{2+}$ ] (Irving and Williams 1948). Dieser Trend wird durch die erwähnte Umlagerung vom ionischen zum kovalenten Charakter der Metall-Liganden -Bindung erklärt. Bei Überdosierung kann es so zu Konkurrenz mit anderen Metallkationen um physiologisch relevanten Bindungsstellen in Enzymen und Strukturelementen kommen. Diese kompetitiven Eigenschaften können ebenfalls Stoffwechselwege inhibieren (van Assche and Clijsters 1990).

Das Janusgesicht der Spurenelemente zwischen essentiell und toxisch spiegelt sich besonders in der angesprochenen hohen Redoxaktivität wider. Zum einen können Übergangsmetalle als Katalysator zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies beitragen (Stoys and Bagchi 1995). Dabei werden über den mehrstufigen Prozess der Haber-Weiss und Fenton-Reaktion Hydroxylradikale gebildet (Halliwell and Gutteridge 1992). Zum anderen spielt in den Enzymen Katalase und Superoxid-Dismutase die hohe Reaktivität ihrer Metallkofaktoren zu Sauerstoff eine entscheidende Rolle bei der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies (Abb.1).

Neben der erwähnten 4. Periode der Übergangsmetalle besitzt zusätzlich Molybdän in der 5. Periode eine gesicherte biologische Relevanz als Kofaktor in ca. 20 Enzymen, darunter in Nitrogenasen stickstofffixierender Bakterien. Von allen weiteren Übergangsmetallen ist keine oder nur eine umstrittene physiologische Bedeutung bekannt. So werden Übergangsmetalle wie Cadmium und Quecksilber als nichtessentiell bewertet und gelten darüber hinaus als besonders toxisch.

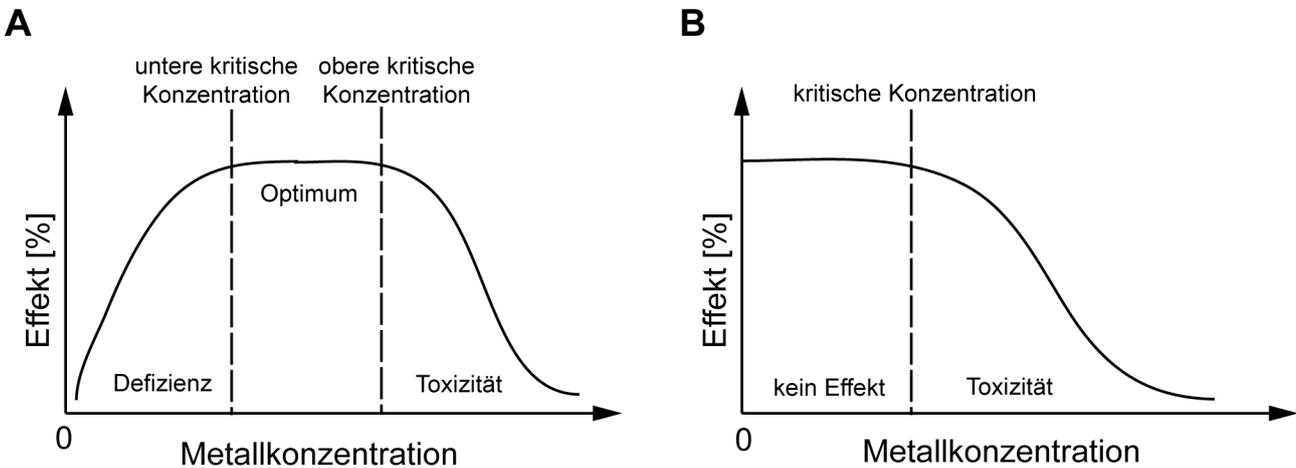


**Abb. 1.1 Bildung und Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) unter Einfluss von Übergangsmetallionen.**

I. Die Haber- Weiss Reaktion führt zur Bildung des Radikals Superoxidanion aus molekularem Sauerstoff. Diese Reaktion kann durch Metallkationen katalysiert werden. II. Das antioxidative Enzym Superoxiddismutase (SOD) kann verschiedene Metallkofaktoren enthalten und katalysiert die Bildung von Wasserstoffperoxid aus Superoxidanionen. III. Wasserstoffperoxid kann durch verschiedene antioxidative Enzyme entgiftet werden. Die Katalase (KAT) benutzt als Cofaktor ebenfalls Metallkationen. IV. In der Fenton-Reaktion kann unter Anwesenheit von  $Fe^{2+}$  die reaktivste der ROS entstehen, das Hydroxylradikal. In Fenton-Analogen Reaktionen spielen auch andere Metallkationen wie zum Beispiel Kupfer eine Rolle (verändert nach (Weidauer 2001)).

In der Ökotoxikologie versucht man die biologische Relevanz von Substanzen mit Dosis-Effektkurven zu beschreiben. Während sich für ein Mikronährelement der Kurvenverlauf zwischen Defizienz, Optimum und Toxizität dreiteilt, zeigen nichtessentielle Metallkationen nur einen zweiphasigen Kurvenverlauf (Abb.2).

Das Gleichgewicht zwischen der Aufnahme von physiologisch relevanten Konzentrationen an essentiellen Übergangsmetallen und dem Ausschluss und der Detoxifizierung von nichtessentiellen Metallen und potentiell toxischen Metallkonzentrationen ist die Aufgabe eines komplexen und streng regulierten Metallhomöostasenetzwerks (Clemens *et al.* 2002).



**Abb. 1.2 Typische Dosis-Effektkurve für Mikronährelemente. (A) und nichtessentielle Spurenelemente (B).** (verändert nach (Alloway and Ayres 1996))

### 1.2 Das Mikronährelement Zink

Zink ist ein unverzichtbarer Nährstoff für Organismen (Vallee and Auld 1989; Vallee and Auld 1990). In biologischen Systemen ist Zink neben Eisen das Übergangsmetall mit der größten Abundanz. Die Bedeutung von Zink wurde bereits im 19. Jahrhundert entdeckt. Erste Experimente von J. Raulin 1869 zeigten Zink als essentielles Element für das Wachstum von *Aspergillus niger* (Raulin 1869). Die erste spezifische biologische Funktion, als Kofaktor einer Carboanhydrase, wurde 1940 veröffentlicht (Keilin and Mann 1940). Seit 1972 weiß man nicht nur um die katalytische Funktion, sondern erkannte, dass Zink auch struktureller Bestandteil von Enzymen sein kann (Nelbach *et al.* 1972).

1983 erkannten J. Hanas und Koautoren die Bedeutung von Zink für strukturelle Domänen von Transkriptionsfaktoren (Zinkfingertranskriptionsfaktoren) (Hanas *et al.* 1983). Heute ist Zink als funktionelle und strukturelle Komponente in mehr als 300 Enzymen bekannt und somit Bestandteil in 50 verschiedenen Enzymklassen aus allen sechs Hauptklassen (Vallee and Auld 1990) (Tabelle1). Aufgrund der Tatsache, dass die Zinkkonzentration im synaptischen Spalt von Säugetieren mikromolare Größenordnungen erreicht, während die intrazelluläre Konzentration im pikomolaren Bereich liegt, wird Zink auch als Messengermolekül in Nervenzellen ähnlich dem Calcium diskutiert (Vogt *et al.* 2000; Beyersmann and Haase 2001).

Der Erfolg von Zink liegt in der vollständigen Besetzung der d-Orbitale ( $d^{10}$ ), die ihm mehrere charakteristische Eigenschaften verleiht. (1) Im Kontrast zu anderen Übergangsmetallen ist  $Zn^{2+}$  nicht redoxaktiv. Weder die potentiell oxidierte Form  $Zn^{3+}$  noch die potentiell reduzierte Form  $Zn^+$  sind unter physiologischen Bedingungen verfügbar (Vallee and Auld 1990; Berg and Shi 1996). Aufgrund dessen kann die obere Grenze des physiologischen Konzentrationsbereichs von Zink deutlich höher liegen als der von redoxaktiven Metallen wie zum Beispiel Kupfer. Speziell beim Einsatz in strukturellen Elementen von nukleinsäurebindenden oder genregulatorischen Proteinen erweist sich die fehlende Redoxaktivität als wichtige Eigenschaft zum Schutz der Erbinformation vor Sauerstoffradikalen. Evolutionär gesehen könnte so, mit dem Aufkommen von Sauerstoff,  $Zn^{2+}$  das ebenfalls energetisch begünstigte  $Fe^{3+}$  ( $d^5$ ) als Kofaktor verdrängt haben (Sekler *et al.* 2007). Zusätzlich zu den erwähnten Transkriptionsfaktoren kommt Zink auch in RNA- und DNA-Polymerasen vor.

(2)  $Zn^{2+}$  zählt neben  $Cu^{2+}$  zu den stärksten Lewis-Säuren unter den Übergangsmetallen. Durch die auf einen kleinen Atomradius ( $0.65 \text{ \AA}$ ) begrenzte zweiwertige Ladung ist Zink in der Lage starke nukleophile, aber dennoch lokal begrenzte Wechselwirkungen mit einer Reihe von Liganden einzugehen, unter anderem mit Schwefel aus Cysteinen, Stickstoff aus Histidinen und Sauerstoff aus Glutamat, Aspartat und Wasser (Berg and Shi 1996; Fraústo da Silva and Williams 2001). Substrate von Zinkenzymen (Hydrogenasen, Carboanhydrasen, Alkoholdehydrogenasen) sind oft kleine Moleküle wie Wasser, Kohlendioxid und Ethanol. Gleichzeitig kommt es infolge der kinetischen Instabilität von Zink zu einem leichten Austausch der Bindungspartner (Berg and Shi 1996).

(3) Das Zinkion besitzt eine vielseitige, flexible Koordinationsgeometrie, die eine hohe

Anpassungsfähigkeit für die vielfältigen biologischen Funktionen von Enzymen und Proteinen ermöglicht. Dabei kann die Koordinationszahl zwischen 2 und 8 variieren. In biologischen Molekülen hat  $Zn^{2+}$  häufig 4 oder 5 Liganden die eine tetrahedrale, trigonal bipyramidale, pyramidale oder oktaedrale Komplexgeometrie haben können (Vallee and Falchuk 1993).

Aufgrund der positiven Eigenschaften von Zink auf biologische Prozesse wird es durch die meisten Zellen akkumuliert. Bei steigender Zinkkonzentration in nährstoffreichem Medium steigt auch die Anzahl der Zinkatome pro Zelle. Wird dabei ein bestimmter Wert überschritten, ist Zink toxisch (Koh *et al.* 1996; Banci *et al.* 2002). Beispiele für die Zinktoxizität findet man dennoch selten, lassen aber nicht auf eine generell niedrige Toxizität schließen sondern sind ein Indiz dafür, dass dieses Metallion, das einen Einfluss auf eine Vielzahl von biologisch relevanten Prozessen ausübt, durch ein streng reguliertes Metallhomöostasennetzwerk kontrolliert wird (Vallee and Falchuk 1993). Der genaue Mechanismus der Zinktoxizität ist nicht bekannt. Begründet durch seine fehlende Redoxaktivität ist Zink nicht direkt an der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt. Man vermutet, dass es bei hohen zellulären Zinkkonzentrationen zu ungeeigneten intrazellulären Ligandenbindung kommen kann. Wahrscheinlicher ist aber, dass eine Verdrängung von anderen Übergangsmetallen an ihren zellulären Bindestellen gemäß der Irving-Williamsreihe stattfindet, zum Beispiel von  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  (Krämer 2005). Dabei kann Zink in hohen Konzentrationen unspezifisch mit Bindestellen von Proteinen und Kofaktoren interagieren und deren Funktion beeinträchtigen. Durch Konkurrenz freier redoxaktiver Metallionen können anschließend ihrerseits zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies beitragen. Die Symptome der Zinkdefizienz sind dagegen vielseitig. Zum einen übernimmt Zink eine cytoprotektive Funktion und unterdrückt damit Mechanismen, die zur Apoptose führen zum anderen hat Zink auch einen direkten Einfluss auf Apoptoseregulatoren wie Caspasen (Truong-Tran *et al.* 2001). Das Absinken der internen Zinkkonzentration führt also zum Zelltod. Wie schon mehrfach erwähnt ist Zink aufgrund oxoprotektiver Eigenschaften häufig struktureller Bestandteil von nukleinsäurebindenden Proteinen. Zinkdefizienz dagegen führt zu oxidativen DNA-Schäden (Ho and Ames 2002). Auch in *S. cerevisiae* kommt es zum oxidativen Stress unter Zinkdefizienz (Wu *et al.* 2007). In Pflanzen führt Zinkmangel zur Wachstumsinhibierung, Beeinträchtigung der Photosynthese und Blattchlorosen (Marschner 1995). In Säugern führt die Unterversorgung mit Zink, aufgrund eines defekten Zinktransporter im maternalen Brustgewebe zum Säuglingstod Znt4 (Huang and Gitschier 1997). Auch von menschlichen Zwergenwuchs durch zinkarme Ernährung wurde berichtet (Prasad 2001). Weiterhin konnte Zinkmangel aufgrund von Defekten in der Zinkverteilung auch mit Krankheitsbildern wie Asthma und Brustkrebs in Verbindung gebracht werden (Taylor *et al.* 2007).

### 1.3 Das nichtessentielle Übergangsmetall Cadmium

Im Periodensystem der Elemente findet man Cadmium wie auch Zink in der 2. Nebengruppe. Beide Elemente teilen sich also eine Vielzahl physikalischer und chemischer Eigenschaften. Dennoch zählt Zink zu den am häufigsten vorkommenden Enzymkofaktoren während im Gegensatz dazu nur

ein einziges Enzym aus Diatomeen bekannt ist, das cadmiumabhängig agieren kann. In *Thalassiosira weissflogii* wird unter Zinkmangel alternativ Cadmium als Kofaktor in eine eigene Klasse von Carboanhydrasen eingebaut (Lane and Morel 2000). Sowohl Zink als auch Cadmium als Kofaktor führen zu einem funktionellen Enzym. Darüber hinaus begünstigt die Struktur des Enzyms den leichten Austausch beider Metalle. Diese Eigenschaft entwickelte sich vermutlich aufgrund der metallarmen Umgebung des Ozeans (Xu *et al.* 2008).

Für alle anderen Organismen zählt Cadmium zu den nichtessentiellen Übergangsmetallen und gilt darüber hinaus bereits in niedriger Konzentration als toxisch. Cadmium gehört mit einem Vorkommen von 0,1 bis 0,13 ppm in der Erdkruste zu den wenig abundanten Übergangsmetallen (Merian *et al.* 2004). Hohe natürliche Cadmiumvorkommen findet man häufig in Verbindung mit hohen Zinkkonzentrationen. Weiterhin ist Cadmium eine weit verbreitete Industriechemikalie. Ein klassisches Beispiel für den schädlichen Einfluss industrieller Cadmiumimmission ist die in Japan aufgetretene Itai-Itai-Krankheit (Nordberg 2004). Über den genauen Mechanismen der Cadmiumtoxizität ist nur wenig bekannt. Eventuell ist die hohe Toxizität von Cadmium gerade auf die Eigenschaften zurückzuführen, die es mit seinem Isomorph Zink teilt. Als nichtessentielles Übergangsmetall findet Cadmium seinen Weg in die Zelle über Aufnahmetransporter für essentielle Kationen. Neben  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportern wurden vor allem Zinkaufnahmetransporter beschrieben, die einen Eintrittsweg für Cadmium in die Zelle darstellen (Clemens *et al.* 1998; Korshunova *et al.* 1999; Pence *et al.* 2000; Connolly *et al.* 2002; Dalton *et al.* 2005). So können hohe Zinkkonzentrationen vor  $\text{Cd}^{2+}$  Toxizität schützen, was als Aufnahmekonkurrenz interpretiert wird. Die Möglichkeit des zellulären Ausschlusses von Cadmium stellt sich für die Zelle als schwierig dar, da ähnliche Eigenschaften eine Differenzierung zwischen  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  erschweren. Einmal in die Zelle aufgenommen sind möglicher Bindungspartner für Cadmium Thiolverbindungen, namentlich Glutathion und proteingebundene Sulfhydrylgruppen. Zwar unterläuft Cadmium wie auch Zink keinen Redoxveränderungen, trotzdem dezimiert es durch seine hohe Affinität zu Schwefelgruppen Antioxidanzien, hauptsächlich Glutathion. Als Folge werden weniger reaktive Sauerstoffspezies entgiftet. Diese wiederum führen zur Zerstörung von biologischen Makromolekülen wie DNA und Membranen (Stohs *et al.* 2001). Weiterhin ist es auch möglich, dass  $\text{Cd}^{2+}$  interne  $\text{Zn}^{2+}$  Bindestellen besetzt. Zwar nimmt die Bindungsenthalpie, die den Hauptbeitrag am Stabilitätstrend der Irving-Williamsreihe leistet, in Cadmiumverbindungen gegenüber Zinkverbindungen ab, jedoch kann es aufgrund der ähnlichen Eigenschaften zwischen beiden Kationen bei einer Überdosierung von Cadmium dennoch zur Verdrängung kommen. Hinweise darauf liefert die erhöhte transkriptionelle Expression von Genen die für Zinkaufnahmetransporter codieren bei der externen Gabe von Cadmium (Chen *et al.* 2003; Weber *et al.* 2006; Yepiskoposyan *et al.* 2006).

### 1.4 Mechanismen der Metallhomöostase

Die zelluläre Zinkhomöostase beinhaltet die Aufnahme, Verteilung und Entgiftung von Zinkionen. Eine wichtige Rolle spielt dabei der Membrantransport. Neben zellulärem Im- und Export über die Plasmamembran ist ein wichtiger Bestandteil der Metallhomöostase in Eukaryoten auch der Transport über intrazelluläre Membranen. Bei der Kompartimentierung von Metallionen geht es nicht nur um die cytosolische Entgiftung potentiell toxischer, sondern auch um die Speicherung essentieller Metallionen, die gegebenenfalls unter Mangelbedingungen remobilisiert werden können. Weiterhin beinhaltet die Metallhomöostase die Komplexierung oder Chelatierung durch metallbindende Proteine, Peptide oder organische Säuren. Abschließend steht die Regulation der einzelnen Komponenten des Metallhaushalts, die Prozesse wie transkriptionelle Aktivierung und Repression, Änderung der Proteinstabilität und Veränderungen des „Proteintrafficking“ umfasst.

#### 1.4.1 Membrantransport und Zinktransportproteine

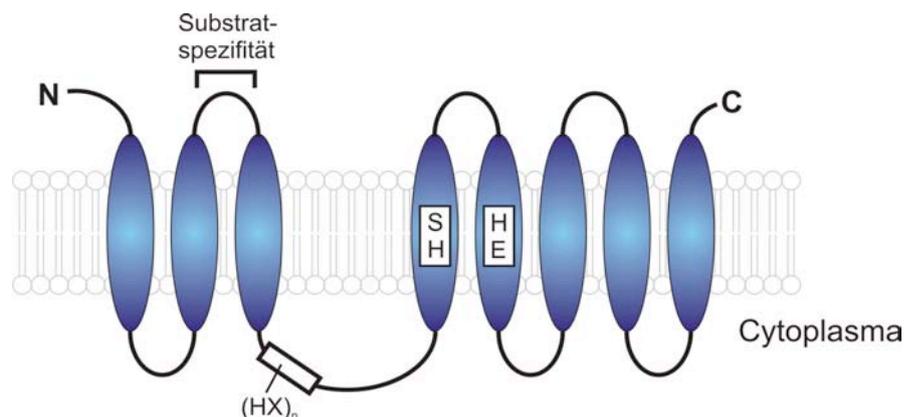
Die hydrophoben Eigenschaften biologischer Membranen stellen eine natürliche, physikalische Barriere für Metallkationen dar. So erfolgt auch der Transport des Zinkkations nicht passiv, sondern gekoppelt an spezifische Metalltransportproteine. Entscheidend für die Zinkhomöostase ist die Aufrechterhaltung der cytosolischen Kationenkonzentration. Sie markiert die physiologische Grenze zwischen Defizienz und Toxizität (MacDiarmid *et al.* 2000; Outten and O'Halloran 2001; Banci *et al.* 2002; Clemens *et al.* 2002; Simm *et al.* 2007). So können Metalltransporter durch die Richtung des Transports charakterisiert werden. Man unterscheidet zwischen Transportern, die den cytosolischen Metallgehalt erhöhen und solchen die ihn verringern. Cytosolischer Im- und Export wird in der Regel von unterschiedlichen Transportfamilien katalysiert. Eine besondere Bedeutung in der Zinkhomöostase spielen dabei die Vertreter der CDF- und ZIP-Proteine. Die bisher physiologisch charakterisierten Mitglieder dieser Familien nutzten  $\text{Zn}^{2+}$  und/oder andere Kationen als Substrat. Dieses lässt darauf schließen, dass auch homologe Proteine  $\text{Zn}^{2+}$  transportieren könnten.

##### 1.4.1.1 cytosolischer Import

Zur Erhöhung des cytosolischen Metallgehalts tragen zum einen Aufnahmetransporter bei, zum anderen aber auch Transporter, die Speicherstoffe aus eukaryotischen Kompartimenten remobilisieren.

Die ATP-binding cassette (ABC) Superfamilie ist ubiquitär und an einer großen Anzahl von Transportprozessen beteiligt. Vertreter dieser Familie werden durch ihren modularen Aufbau und für die Superfamilie spezifische Sequenzmotive in zwei nukleotidbindenden Domänen charakterisiert. ABC-Transporter nutzen ATP als direkte Energiequelle. Unter ihren Substraten kann man Zucker,

Peptide, und Siderophore finden (Rea *et al.* 1998). In Prokaryoten zählen ABC-Transporter zur wichtigsten Familie für die spezifische Aufnahme zweiwertiger Metallkationen. So ist das gut untersuchte *E. coli*-System ZnuABC für die hochaffine  $Zn^{2+}$  Aufnahme verantwortlich. Das *znuA*, *znuB* und *znuC* Operon kodiert für ein dreiteiliges Proteinsystem bestehend aus periplasmatischem Substratbindeprotein (ZnuA), integraler Membranpermease Untereinheit (ZnuB) und cytoplasmatischer ATP-hydrolysierender Untereinheit (ZnuC). ZnuABC Systeme wurden in verschiedenen bakteriellen Familien wie zum Beispiel Enterobacteriaceae, Pseudomonaceae und Neisseriaceae gefunden (Patzner and Hantke 1998; Patzner and Hantke 2000; Campoy *et al.* 2002). In Eukaryoten teilt man aufgrund struktureller Ähnlichkeiten ABC-Transporter in verschiedene Subfamilien ein, von denen lediglich zwei im Metallkationentransport involviert sind (Rea *et al.* 1998). Es konnte gezeigt werden, dass sie durch den Transport von  $Cd^{2+}$  bzw. Cd-Glutathion S-Konjugaten in Kompartimente zur Detoxifizierung von  $Cd^{2+}$  beitragen können (Szczycka *et al.* 1994; Li *et al.* 1997; Rea *et al.* 1998; Bovet *et al.* 2005; Kim *et al.* 2006). Bislang ist in Eukaryoten aber noch kein ABC-Transporter bekannt, der eine physiologische Rolle im Zinktransport spielt (Gaither and Eide 2001).



**Abb. 1.3 Topologie-Modell der ZIP-Transporter.** Die acht Transmembrandomänen (TM) sind in blau dargestellt. Eine histidinreiche Region in der Schleife zwischen TM III und TM IV, konservierte Histidine (H) und polare Aminosäuren in TM IV und TM V, und die Lokalisierung der Domäne, die an der Kontrolle der Substratspezifität beteiligt ist, sind wie am Beispiel von AtIRT1 aus *A. thaliana* kartiert. (adaptiert nach (Eide 2004))

Eine bedeutende Rolle für den cytosolischen Zinkimport in Eukaryoten spielt die ubiquitär verbreitete Familie der ZIP-Transportproteine (SLC39). Sie wurden nach den ersten charakterisierten Vertretern Zrt1 und Zrt2 aus *Saccharomyces cerevisiae* (*zinc regulated transporter*) und IRT1 (*iron regulated transporter*) aus *Arabidopsis thaliana* *ZRT/IRT like proteins* benannt. In den letzten Jahren konnten eine Reihe hoch- und niederaffiner Transporter aus allen drei phylogenetischen Domänen beschrieben werden. Mit der wachsenden Anzahl sequenzierter Genome werden zusätzlich homologe Gene identifiziert. Für ZIP-Transporter wird folgende charakteristische Topologie vorhergesagt (Abb.3). Die Mehrzahl der Familienmitglieder besitzt 8 helikale Transmembrandomänen (TM). Wie für hZIP1 und hZIP2 aus *Homo sapiens* nachgewiesen werden konnte, liegen N- und C-Terminus auf der dem Cytoplasma abgewandten Seite (Gaither and Eide 2000; Gaither and Eide

2001). Während die meisten Schleifen zwischen den TM eher kurz sind, ist die cytoplasmatische Schleife zwischen der TM III und TM IV länger (Gitan and Eide 2000) und enthält häufig eine histidinreiche Domäne mit der Sequenz  $(HX)_n$ , wobei  $n$  zwischen 3 und 5 variiert (Zhao and Eide 1996b). Obwohl die Funktion dieser Domäne nicht aufgeklärt ist, vermutet man eine Beteiligung am Metalltransport oder dessen Regulation. Weiterhin sind die TM IV und V besonders amphipatisch und zeichnen sich durch weitere konservierte Histidine aus, die den Voraussagen nach den Transportkanal flankieren (Dufner-Beattie *et al.* 2003a). Aufgrund konservierter Sequenzunterschiede wird die Familie in vier Subfamilien, Subfamilie I, Subfamilie II, *gufA* Proteine und die ausschließlich auf Eukaryoten beschränkten Vertreter der LIV-1 Subfamilie, eingeteilt (Guerinot 2000; Gaither and Eide 2001). Zu den am Besten charakterisierten Vertretern der ZIP-Familie überhaupt zählt das zur Subfamilie I, gehörende Gründungsmitglied AtIRT1 aus *A. thaliana*. Der Transporter wurde zunächst als hochaffines  $Fe^{2+}$ -Aufnahmesystem in Hefekomplementationsstudien, einer für die Eisenaufnahme defekten Doppelmutante *fet3fet4* mit einer *A. thaliana* cDNA Bank, identifiziert (Eide *et al.* 1996). Anschließend Untersuchungen zeigten, dass es sich bei AtIRT1 um das Hauptaufnahmesystem für Eisen in Strategie I Pflanzen handelt. Strategie I Pflanzen nehmen im Gegensatz zu Graminaceen zweiwertiges Eisen direkt auf. Der Verlust von AtIRT1 führt zu Chlorosen und einem drastisch eingeschränkten Wachstum (Vert *et al.* 2002). Aufnahmestudien in *A. thaliana* und *S. cerevisiae* zeigten, dass zusätzlich zu  $Fe^{2+}$ , auch  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  und  $Co^{2+}$  Substrate von AtIRT1 sind (Korshunova *et al.* 1999; Vert *et al.* 2002). Aufgrund des breiten Substratspektrums dieses Transporters wurde er einer umfangreichen Mutagenesestudie unterzogen. Sie lieferte erste Einblicke in die aminosäurecodierte Substratspezifität von ZIP-Transportern. Zum einen konnte gezeigt werden, dass konservierte Aminosäuren (H, S, H, E) der TM IV und TM V entscheidend für die Metalltransportfunktion im Allgemeinen sind. Zum anderen, dass im Bereich zwischen TM II und TM III, die konservierte Aminosäure Aspartat für die  $Fe^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  Aufnahme verantwortlich ist wohingegen Glutamat für die Aufnahmespezifität von  $Zn^{2+}$  und  $Cd^{2+}$  steht (Rogers *et al.* 2000). Die Regulation von AtIRT1 erfolgt transkriptionell durch  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  und  $Cd^{2+}$  und posttranslational durch  $Fe^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  (Connolly *et al.* 2002; Vert *et al.* 2002). Durch die Überexpression von IRT1 kommt es zu einer erhöhten Cadmiumakkumulation in der Pflanze. Diese Erkenntnis zeigte einen möglichen Eintrittsweg des nichtessentiellen Spurenelements  $Cd^{2+}$  in Pflanzen, unabhängig vom bis dahin einzigen bekannten pflanzlichen Cd-Transporter LCT1 (Clemens *et al.* 1998; Connolly *et al.* 2002).

Zwei weitere Transportproteine, ScZrt1 und ScZrt2 der Subfamilie I konnten anschließend aufgrund ihrer Homologie zu AtIRT1 identifiziert werden. Für Zrt1 und Zrt2 aus *S. cerevisiae* konnte über kinetische Studien und Wachstumsversuche auf unterschiedlichen Zinkkonzentrationen gezeigt werden, dass es sich hierbei um hoch- und niederaffine Zinkaufnahmetransporter handelt (Zhao and Eide 1996a; Zhao and Eide 1996b; Gitan *et al.* 1998). Die detaillierte Charakterisierung beider Transporter etablierte die ZIP-Familie als Zinktransporter. Die korrespondierende  $\Delta zrt1 \Delta zrt2$  Doppelmutante stellt ein nützliches System dar, um über den heterologen Expressionsweg

Zinkaufnahmetransporter, insbesondere der ZIP-Familie, physiologisch zu charakterisieren. So konnten unter Zuhilfenahme von  $\Delta zrt1 \Delta zrt2$  (ZHY3) unter anderem die pflanzlichen Zinkaufnahmetransporter AtZIP1, AtZIP2, AtZIP3 physiologisch charakterisiert werden (Grotz *et al.* 1998).

Zrt3 wurde als ein weiterer Zinktransporter aus *S. cerevisiae* identifiziert, der jedoch nicht am  $Zn^{2+}$  Aufnahmetransport beteiligt ist. Er gehört zur Subfamilie der GufA Proteine, die nach dem GufA Protein aus *Myxococcus xanthus* benannt sind. Die funktionelle Aufklärung von ScZrt3 erbrachte ein neues Verständnis der Zinkhomöostase in Eukaryoten. ScZrt3 ist in der Tonoplastenmembran und versorgt unter Zinkdefizienz das Cytoplasma. Die Versuche zeigten, dass der Transport in Organelle nicht nur zur Entgiftung dient, sondern auch zur Anlage eines verfügbaren Speichers (MacDiarmid *et al.* 2000). Somit übernehmen ZIP-Transporter nicht nur die wichtige Aufgabe der Zinkaufnahme über die Plasmamembran, sondern auch die Remobilisierung des Zinkspeichers aus der Vakuole.

In die LIV-1 Subfamilie gruppieren neun von 14 humanen Vertretern der ZIP-Familie. Die meisten von ihnen sind in der Plasmamembran lokalisiert und transportieren Zink. Einigen von ihnen konnte eine Beteiligung an verschiedenen Krankheitsbildern wie Asthma oder Brustkrebs nachgewiesen werden. Diese Beobachtung untermauert die Bedeutung einer funktionellen Zinkhomöostase für humane Zellen (Taylor *et al.* 2007). Während ein Großteil der bisher charakterisierten ZIP-Transporter den Kationeninflux in das Cytosol vermittelt, und damit im Gegensatz zu der nachfolgend beschriebenen CDF-Transportfamilie steht, finden sich in der LIV-1 Subfamilie auch bidirektionale Transporter (Hke4, Yke4). Dabei ist die Transportrichtung abhängig vom Zinkstatus der Zelle (Huang *et al.* 2005; Taylor *et al.* 2005; Kumánovics *et al.* 2006). Obwohl bislang eine große Anzahl an ZIP-Proteinen charakterisiert werden konnten, ist der Mechanismus des Transports immer noch unklar. Einige Vertreter zeigen eine Energieabhängigkeit, während andere energieunabhängig sind (Zhao and Eide 1996a; Zhao and Eide 1996b; Gaither and Eide 2000; Gaither and Eide 2001). Die Zinkaufnahme von hZIP2 wurde durch  $HCO_3^-$  stimuliert, was auf einen  $Zn^{2+}$ -  $HCO_3^-$ - Symport hindeutet (Gaither and Eide 2000). Eine weitere Möglichkeit bietet die Theorie, dass die Proteine einfach durch den Konzentrationsgradienten ihrer Substrate angetrieben werden (Suhy and O'Halloran 1996).

Die Familie der NRAMP-Proteine (natural resistance associated macrophage proteins) der zweiwertigen Kationentransporter ist ubiquitär verbreitet. Dem ersten Vertreter wurde in Mäusen eine Beteiligung an der natürlichen Resistenz gegenüber Bakterien nachgewiesen (Vidal *et al.* 1993). Die biochemische Funktion dieser Familie integraler Membranproteine war allerdings noch unbekannt (Cellier *et al.* 1995). Zunächst konnte gezeigt werden, dass es sich bei Smf1 aus *S. cerevisiae* um einen hochaffinen Manganaufnahmetransporter handelt (Supek *et al.* 1996). Die homologen Säugerproteine DCT1/Nramp2 wurden in einem funktionellen Screen nach Eisentransportsystemen gefunden, zeigen aber zusätzlich eine ungewöhnliche Substratbreite. Unter den Substraten befinden sich neben  $Fe^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  auch  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  und  $Pb^{2+}$  (Gunshin *et al.* 1997). So

werden NRAMP Proteine in der Literatur auch immer wieder als mögliche Zinktransporter diskutiert. Die bisher charakterisierten pflanzlichen NRAMP Transporter spielen jedoch vor allem eine Rolle in der Eisenhomöostase, können aber auch Mangan und Cadmium transportieren (Thomine *et al.* 2000; Bereczky *et al.* 2003). Erst kürzlich konnten NRAMP- Proteine mit dem Zinktransport in Pflanzen in Zusammenhang gebracht werden. Unter Eisenmangel wird in der *A. thaliana* Mutante *nramp3-1* Zink in den Wurzeln akkumuliert (Thomine *et al.* 2003). Die Inaktivierung von *nramp3nramp4* führt zu einer Zinkhypersensitivität in *A. thaliana*. Außerdem werden einige Vertreter dieser Familie in den zinkhyperakkumulierenden Spezies *Arabidopsis halleri* und *Thlaspi caerulescens* hoch exprimiert (Becher *et al.* 2004). In *S. cerevisiae* exprimiert transportieren NRAMP3 und NRAMP4 aus *T. caerulescens*  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  und NRAMP4 zusätzlich auch  $\text{Zn}^{2+}$  (Oomen *et al.* 2009). Ob die hohe Expression der NRAMP Transporter in zinkhyperakkumulierenden Spezies allerdings direkt mit dem Phänotyp der Hyperakkumulation in Verbindung steht oder ob es sich hierbei um eine Gewährleistung der Eisenversorgung unter hohen Zinkkonzentrationen handelt, bleibt noch ungeklärt.

Ein bisher nur für Pflanzen beschriebener Transportvorgang ist der Transport von Zn-Komplexen. Im Gegensatz zu Eisen muss Zink vor dem Transport nicht reduziert werden. Dennoch ist von einigen Gräsern, wie zum Beispiel Mais, die Aufnahme von Zn-Phytosiderophorkomplexe bekannt (von Wirén *et al.* 1996). Vor allem unter Zinkmangelbedingungen wurde eine erhöhte Freisetzung von Phytosiderophoren (PS) beschrieben, die bei der Akquirierung des Zn-Kations eine Rolle spielen (Camak *et al.* 1996). Die in *Zea maize* entdeckte Familie der YLS- Transporter (*yellow stripe like protein*) mit dem gut untersuchten ZmYS1 wurde zunächst als Fe-PS Transporter beschrieben (von Wirén *et al.* 1994). Heterologe Expressionsstudien von ZmYS1 in Hefe und Oocyten zeigten ein breiteres Transportspektrum von phytosiderophor- und nicotianaminchelaterter Metalle inklusive  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  (Roberts *et al.* 2004; Schaaf *et al.* 2004). In Anbetracht der Tatsache, dass Pflanzen keine PS bilden, geht man von Nicotianaminkomplexen aus, die durch die acht homologen Mitglieder dieser Familie aus *A. thaliana* transportieren werden (Curie *et al.* 2001). Unter den möglichen Substraten wird auch  $\text{Zn}^{2+}$  diskutiert (Schaaf *et al.* 2004; Waters *et al.* 2006). Verwandte Gene der YLS Familie konnte man zudem auch im filamentösen Pilz *Neurospora crassa* finden (Krämer *et al.* 2007).

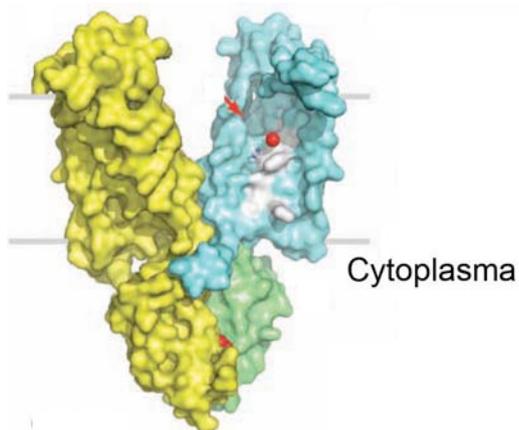
### 1.4.1.2 cytosolischer Export

Für die Verminderung des cytosolischen Metallgehalts sind neben Effluxtransportern auch Transporter verantwortlich, die Metalle zur Speicherung in Kompartimente einlagern. Die Superfamilie der P-Typ ATPasen ist eine ubiquitär verbreitete Gruppe von Membrantransportern. Der Begriff „P-Typ“ bezieht sich auf die Bildung eines Phosphoenzymintermediats im Reaktionszyklus. Neben einem konservierten Aspartat, das während des Reaktionszyklus phosphoryliert wird, besitzen P-Typ ATPasen ein konserviertes Prolin in einer Membrandomäne und Konsensusdomänen für die ATP-Bindung und Energieweiterleitung. Die Familie der P-Typ ATPasen wird in fünf Hauptzweige

aufgeteilt, die sich vor allem nach den Substraten spezifizieren. Die schwermetalltransportierenden ATPasen vom Typ  $1_B$  wurden zunächst aufgrund eines intramembranen Sequenzmotives als CPx-Typ ATPasen beschrieben (Solioz and Vulpe 1996). Phylogenetische Analysen teilen die  $P_{1B}$  ATPasen in zwei Gruppen, die mit ihrer Transportspezifität übereinstimmen. Entweder sie transportieren einwertige Kationen wie  $Cu^+$  und  $Ag^+$  oder es werden zweiwertige Kationen transportiert:  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  (Rensing *et al.* 1999; Axelsen and Palmgren 2001). Das Wachstum von *E. coli* unter hohen Zinkkonzentrationen wird durch die Induktion der Zinkeffluxpumpe ZntA ermöglicht (Beard *et al.* 1997; Rensing *et al.* 1997). Eine Mutante von *zntA* hat eine erhöhte  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  und  $Pb^{2+}$  Sensitivität zur Folge. In nicht pflanzlichen Eukaryoten wurden alle bisher charakterisierten  $1_B$  ATPasen als Cu-Transporter beschrieben (Hussain *et al.* 2004). Unter ihnen befinden sich die menschlichen Cu-ATPasen hATP7A und hATP7B, die eine Bedeutung bei Wilson- und Menkekrankheit spielen. Sie rühren aus einer Beeinträchtigung im Kupferexport her (Solioz and Vulpe 1996). Aus dem Arabidopsis Genom wurden acht  $1_B$  P-Typ ATPasen, HMA 1-8 (heavy metal transpoting P-type ATPases) abgeleitet (Baxter *et al.* 2003). HMA1-HMA4 zeigen die größte Verwandtschaft zu prokaryotischen ATPasen und sind am Transport von  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  und  $Pb^{2+}$  beteiligt (Eren and Argüello 2004; Gravot *et al.* 2004; Mills *et al.* 2005; Verret *et al.* 2005), während HMA5-HMA8 möglicherweise als Transporter des einwertigen Kupferions  $Cu^+$  fungieren (Andres-Colas *et al.* 2006). In Expressionsstudien in der *E. coli* Mutante  $\Delta zntA$  konnte deren zinksensitiver Phänotyp fast vollständig durch AtHMA4 komplementiert werden. Dies zeigte die Funktion des Proteins im cytosolischen Zinkexport. Darüber hinaus konnte durch die Expression von AtHMA4 die Sensitivität von *S. cerevisiae* gegenüber Cadmium drastisch gesenkt werden (Mills *et al.* 2003). HMA4 und die HMA2HMA4 Doppelmutante in *Arabidopsis thaliana* zeigen eine Abnahme in der Zinkakkumulation in den Blättern. Sie spielen möglicherweise eine Rolle in der Zinktranslokation durch die Beladung des Xylems (Hussain *et al.* 2004; Verret *et al.* 2004; Mills *et al.* 2005; Hanikenne *et al.* 2008). Bisher wurden jedoch noch keine zinkspezifischen P-Typ ATPasen in Hefe oder Säugerzellen entdeckt (Sekler *et al.* 2007).

Die ersten CDF- Transporter (SLC30) (cation diffusion facilitator) wurden aufgrund ihrer resistenzvermittelnden Eigenschaft gegenüber zweiwertigen Kationen entdeckt (Kamizono *et al.* 1989; Conklin *et al.* 1992; Nies 1992; Palmiter and Findley 1995; van der Zaal *et al.* 1999). Zu den Substraten dieser Transportfamilie zählen neben  $Zn^{2+}$  auch  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  und  $Fe^{2+}$ . Mitglieder dieser Familie findet man in allen drei phylogenetischen Domänen. Vertreter der CDF-Familie aus Bakterien und Hefen kontrollieren den  $Zn^{2+}$  Transport über  $H^+/Zn^{2+}$  Austausch (Chao and Fu 2004; Lu and Fu 2007). Gemeinsam sind sie charakterisiert durch sechs Transmembranhelices. Amino- und Carboxytermini sind cytoplasmatisch (Anton *et al.* 1999; Wei and Fu 2006). Die für die CDF-Proteine charakteristische Signatur der konservierten Aminosäuren liegt in der extracytoplasmatischen Schleife zwischen TM I und TM II (Paulsen and Saier 1997). Zwischen den TM IV und V befindet sich eine lange cytoplasmatische Schleife mit dem histidinreichen Motiv  $(HX)_n$  (Bloß *et al.* 2002). Auch der in manchen Mitgliedern sehr umfangreiche hydrophile C-Terminus enthält eine Histidinsequenz. Diese

Sequenzen sind in der Metallbindung involviert (Anton *et al.* 2004). Die kürzlich aufgeklärte Kristallstruktur von YiiP, das für den  $Zn^{2+}/H^+$  Austausch an der inneren *E. coli* Membran verantwortlich ist, bestätigt und vertieft diese Erkenntnisse. Das physiologische YiiP Homodimer wird durch  $Zn^{2+}$  Ionen an der Nahtstelle zwischen den cytoplasmatischen Domänen stabilisiert. Die Sekundärstruktur der beiden Transmembrandomänen bildet eine Y-förmige Struktur. Die cytoplasmatische Domäne formt dabei ein metallchaperonähnliches Protein. Die Transmembrandomänen bestehen aus sechs Transmembranhelices und besitzen je eine tetraedrale  $Zn^{2+}$  Bindestelle (Lu and Fu 2007). Vergleiche der Aminosäuresequenzen lassen eine Aufteilung der CDF-Proteine in drei Unterfamilien zu (Gaither and Eide 2001; Nies 2003). Während Bakterien nur ein oder wenige CDF-Gene enthalten, steigt die Anzahl in Eukaryoten entsprechend der Entwicklungsstufe an. In *E. coli* sind zwei Vertreter charakterisiert. Neben dem schon erwähnten YiiP gehört ZitB zu den bestcharakterisierten Mitgliedern der Familie. In *S. cerevisiae* sind sechs Vertreter bekannt und charakterisiert. Sie alle sind in Membranen intrazellulärer Kompartimente lokalisiert.



**Abb. 1.4 Kristallstruktur des CDF-Transporters YiiP aus *E. coli*.** Das Homodimer lagert sich in einer Y-förmigen Struktur zusammen. Dabei bilden die C-terminalen Enden der Untereinheiten eine metallchaperonähnliche cytoplasmatische Domäne, die durch Zink stabilisiert wird (Lu and Fu 2007).

Zrc1 und Cot1 vermitteln den Transport von  $Zn^{2+}$  und  $Cd^{2+}$  in die Vakuole und tragen in hohem Maße zur Entgiftung von überschüssigen cytoplasmatischen Konzentrationen bei. Darüber hinaus katalysiert Cot1 den Transport von  $Co^{2+}$  (Conklin *et al.* 1992; Conklin *et al.* 1994; Li and Kaplan 1998). Msc2 und Zrg17 vermitteln den Zinktransport in das Endoplasmatische Retikulum (ER) (Li and Kaplan 2001; Ellis *et al.* 2004; Ellis *et al.* 2005), während die CDF's Mmt1 und Mmt2 die Mitochondrien mit Zink versorgen (Li and Kaplan 1997). Der erste charakterisierte CDF-Transporter aus *Arabidopsis thaliana* war MTP1. Die Überexpression von MTP1 in der Pflanze führt zur erhöhten Zinkresistenz und steigender Akkumulation von Zink in den Wurzeln (*metal tolerance protein 1*, früher Zat1 (van der Zaal *et al.* 1999)). GFP-Fusionen und Westernblots mit Membranfraktionen zeigten AtMTP1 in der Tonoplastenmembran von *A. thaliana* (Kobae *et al.* 2004; Desbrosses-Fonrouge *et al.* 2005). Heterolog in verschiedenen prokaryotischen und eukaryotischen Systemen exprimiert, vermittelt AtMTP1 den Zinktransport (Bloß *et al.* 2002). AtMTP3 ist ebenfalls in der Vakuolenmembran lokalisiert und vermittelt den Ausschluss von Zink unter Eisenmangel (Arrivault *et al.* 2006). In Säugern waren

zuletzt mindestens 9 homologe Mitglieder der CDF-Familie, die Zinktransporter ZnT1-9 bekannt (Liuzzi and Cousins 2004). Der plasmamembranlokalisierte Transporter ZnT1 wurde als erster humane Zinktransporter beschrieben und fördert den Efflux von  $Zn^{2+}$  (Palmiter and Findley 1995). Energetisiert wird der Transport dieser Familie durch den Antiport mit Protonen oder  $K^+$  Gradienten (Guffanti *et al.* 2002; MacDiarmid *et al.* 2002; Anton *et al.* 2004; Chao and Fu 2004).

Proteine der CAX-Familie (*cation exchanger*) sind Kationen/Protonen Antiporter, die Kationen aus dem Cytosol der Zelle transportieren. Die Antriebskraft für den Transport wird durch einen über Protonenpumpen aufgebauten pH-Gradienten geliefert. Über 130 homologe Gene sind aus Bakterien, Pilzen und Pflanzen bekannt (Gaxiola *et al.* 2002). Die *Arabidopsis thaliana* Transporter CAX1 und CAX2 wurden durch die Komplementation einer *S. cerevisiae* Mutante entdeckt, die einen Defekt in der vakuolären Calciumaufnahme hat (Pittman and Hirschi 2001). Neben Calcium können CAX-Transporter auch Zink- und Cadmiumionen transportieren (Shigaki *et al.* 2005).

Aus *A. thaliana* ist ein weiteres Transportprotein bekannt, das eine Bedeutung für die Zinkhomöostase hat. ZIF1 (*zinc induced facilitator*) gehört zur Superfamilie der MFS Proteine (*major facilitator superfamilie*) und ist in der Tonoplastenmembran lokalisiert. In *zif1* Mutanten war der Zinkgehalt durchgängig erhöht. Außerdem waren die Pflanzen Zn-hypersensitiv. Aufgrund der Tatsache, dass MFS Proteine organische Säuren transportieren können wird eine Rolle für ZIF1 im Zinkligandentransport diskutiert (Haydon and Cobbett 2007).

### 1.4.2 Komplexierung von Zink

Einmal in die Zelle eingetreten, werden Zinkionen komplexiert. Diese Zinkbindung durch metallbindende Proteine ist sehr stark, so dass nach dem thermodynamischen Gleichgewicht die Konzentration an freiem  $Zn^{2+}$  im Cytoplasma sehr gering ist. In Eukaryoten wurde die Konzentrationen freier Zinkionen im pikomolaren (Atar *et al.* 1995; Yang *et al.* 2001; Heinz *et al.* 2005) und in Bakterien sogar im femtomolaren Bereich bestimmt, dagegen liegt der Bruttogehalt der Zelle im millimolaren Bereich (Outten and O'Halloran 2001). Die Bindung von Zink und anderen Metallionen ist ein notwendiger Schritt, um deren Reaktivität zu kontrollieren. Darüber hinaus erfüllen Liganden mit niedrigem Molekulargewicht eine Aufgabe bei der intrazellulären und in mehrzelligen Organismen auch bei der interzellulären Kationenverteilung. Sie stellen die Transportelemente der Metallhomöostase dar. Darüber, wie die Zelle ihren dynamischen Zinkpool verwaltet ist nur wenig bekannt. Aus der Kupferhomöostase sind spezifische Metallchaperone bekannt (Lin *et al.* 1997). Sie akquirieren Kupfer am Aufnahmesystem und begleiten das Ion zu seinen spezifischen zellulären Zielen. So leitet in *S. cerevisiae* zum Beispiel ATX1 Kupfer in den sekretorischen Weg (Lin and Culotta 1995) und CCS Kupfer zur Superoxiddismutase (Culotta *et al.* 1997). Mehrere Kupferchaperone sind bekannt, die Kupfer in die Cytochromoxidase einbauen (Glerum *et al.* 1996a; Glerum *et al.* 1996b; Mattatall *et al.* 2000). Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass die Verteilung von  $Zn^{2+}$  von ähnlich spezifischen Chaperonen abhängt wie es bei Kupfer der Fall ist, denn es würden zu viele verschiedene benötigt

werden, um die vielen unterschiedlichen Zinkbindestellen in Proteinen zu bedienen (Maret 2007). Indes sind organische Moleküle mit geringem Molekulargewicht bekannt, die Zink binden. Zu ihnen gehören Metallothioneine und Phytochelatine.

Metallothioneine sind cysteinreiche Proteine mit geringem Molekulargewicht (4-14 kDa) die verschiedene Metallionen binden können (Hamer 1986; Coyle *et al.* 2002). Sie wurden zunächst als Cadmiumbindepoteine in Geweben von Säugetieren entdeckt und sind anschließend auch in anderen Tieren, Pflanzen, Pilzen und einigen Bakterien identifiziert worden (Cobbett and Goldsbrough 2002). In höheren Eukaryoten, die eine Vielzahl von Metallothioneingenen besitzen (16 in Mäusen und Menschen; (West *et al.* 1990), sind Metallothioneine ein wichtiger Bestandteil der Zinkhomöostase. Sie dienen hauptsächlich der cytoplasmatischen Zinkpufferung, konnten aber auch im extrazellulären Raum von humanen Krebszelllinien gefunden werden (Hao *et al.* 2007). Hier vermitteln sie die Zinkaufnahme über einen endocytotischen Weg. In *S. cerevisiae* spielen Metallothioneine hauptsächlich eine Rolle bei der Kupferentgiftung (Ecker *et al.* 1986), während in *S. pombe* das Metallothionein Zym1 in der Zinkdetoxifikation involviert ist (Borrelly *et al.* 2002).

Im Gegensatz zu MT Proteinen handelt es sich bei Phytochelatinen (PC) um enzymatisch synthetisierte, metallionenbindende Peptide (Grill *et al.* 1989). Der unmittelbare Vorläufer der Phytochelatine ist Glutathion (GSH). Das Tripeptid, besteht aus  $\gamma$ -Glutamin, Cystein und Glycin und trägt auch durch die direkte Bindung an Cadmiumionen zur Detoxifikation in Bakterien, Hefen und höheren Eukaryoten bei (Li *et al.* 1997; Prévéral *et al.* 2009). Mutanten von *S. pombe* und *A. thaliana* die in ihrer GSH-Biosynthese defekt waren, konnten keine Phytochelatine herstellen und waren hypersensitiv gegenüber  $\text{Cd}^{2+}$  (Mutoh and Hayashi 1988; Howden *et al.* 1995b). Die Struktur der Produkte einer Transpeptidierungsreaktion, die durch die Phytochelatinsynthase (PCS) katalysiert werden, ist  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  ( $n > 1$ ) (Grill *et al.* 1989). PCS-Homologe findet man in verschiedenen Organismen von Hefen bis hin zu Nematoden, besonders aber in höheren Pflanzen (Clemens *et al.* 1999; Ha *et al.* 1999; Vatamaniuk *et al.* 1999; Clemens *et al.* 2001). Die PC-Synthese wird durch die Anwesenheit eines breiten Spektrums an Metallkationen induziert. Darunter befindet sich neben Cadmium- und Kupfer- auch Zinkionen (Grill *et al.* 1987; Maitani *et al.* 1996). PC-Metallkomplexe konnten dagegen nur in Verbindung mit Cadmium, Kupfer, Silber und Arsen beobachtet werden (Maitani *et al.* 1996; Schmöger *et al.* 2000). Die Tatsache, dass das Gen des katalysierenden Enzyms PCS aber konstitutiv exprimiert wird führte zu der Theorie, dass PCs nicht nur bei der Entgiftung von nichtessentiellen Kationen eine Rolle spielen, sondern auch essentielle Metalle komplexieren (Rausser 1990). Neuste Ergebnisse von Untersuchungen zur PC-Akkumulation in Pflanzen und *S. pombe* liefern weitere Anhaltspunkte für eine Beteiligung von PCs an der Chelatierung und Entgiftung von  $\text{Zn}^{2+}$ . Es konnte gezeigt werden, dass phytochelatindefiziente *A. thaliana cad1-6* und *cad1-3* Mutanten hypersensitiv gegenüber  $\text{Zn}^{2+}$  sind (Tennstedt *et al.* 2009).

Da Übergangsmetalle an Carboxyl-, Thiol-, Imidazol- und Sulfhydrylgruppen binden, rücken auch Carbon- und Aminosäuren als mögliche Metallliganden in den Fokus. Tatsächlich sind vor allem

aus pflanzlichen und pilzlichen Organismen neben den Phytochelatinen und Metallothioneinen, Aminosäuren und organische Säuren bekannt für die Chelatierung von Metallkationen (Callahan *et al.* 2006). Die Literatur beschreibt Zn-Malat-, Zn-Citrat und Zn-Phytat-Komplexe (Sarret *et al.* 2002).

Die nichtproteinogene Aminosäure Nicotianamin ist der Phytosiderophorvorläufer der Muginensäure und wird als cytosolischer Eisenchelator angesehen (Hell and Stephan 2003). Im filamentösen Pilz *Neurospora crassa* zeigen *real time* Analysen eine erhöhte Expression der Nicotianaminsynthase unter Zinkdefizienz und liefern erste Hinweise darauf, dass Nicotianamin auch als ein cytosolischer Zinkchelator fungieren könnte (Trampczynska *et al.* 2006).

### 1.4.3 Regulation der Zinkhomöostase

Die Aufrechterhaltung der cytosolischen Zinkkonzentration ist die Hauptaufgabe der Zinkhomöostase. Diese wird vor allem an 3 verschiedenen Punkten kontrolliert: die Regulation von Zinkaufnahmesystemen, die Bindung von Zink an Chelatoren und Entfernung von Zink aus dem Cytoplasma.

Sensorische Systeme nehmen Veränderungen in der intrazellulären, physiologischen Zinkkonzentration wahr und wandeln die Signale in eine Regulation der Genexpression, mRNA Stabilität oder eine Translationsregulation um. Transkriptionsfaktoren, die als Aktivator oder Repressor direkt an Metallionen binden und als Folge die Genexpression beeinflussen, werden metallregulatorische Proteine genannt.

Viele Aufnahmetransporter unterstehen einer transkriptionellen Kontrolle in Abhängigkeit ihrer Substrate. In Prokaryoten wird die Expression von Genen für die Metallaufnahme unter anderem durch Mitglieder der FUR Familie gesteuert. Bei den Fur Paralogen handelt es sich um metallionenabhängige, transkriptionelle Repressoren, die sowohl die Eisen- (Fur), Mangan- (Mur), Nickel- (Nur) als auch die Zinkhomöostase (Zur) regulieren (Lee and Helmann 2007). Der *Escherichia coli* Zur Regulator ist biochemisch das am besten charakterisierte Mitglied der Zur-Unterfamilie (Outten and O'Halloran 2001; Outten *et al.* 2001). Es reprimiert die Expression des Aufnahmesystems vom ABC-Typ ZnuABC durch die Bindung an die bidirektionale Promotoregion der Gene *znuA* und *znuCB* (Patzner and Hantke 2000). Die DNA-Bindung erfolgt nur, wenn die beiden Metallbindestellen unterschiedlicher Affinität und Koordination durch  $Zn^{2+}$  besetzt werden (Outten *et al.* 2001). Es wird angenommen, dass Zur ähnlich dem Fur Regulator nicht nur die Metallionenaufnahme sondern auch deren Speicherung und Mobilisierung kontrolliert.

Ein gut untersuchtes Beispiel für ein zinkregulatorisches Protein aus Eukaryoten ist der ScZap1 Transkriptionsfaktor aus *S. cerevisiae* (Zhao and Eide 1997). Zap1 spielt eine zentrale Rolle in der Zinkhomöostase. Er kontrolliert die Expression von fast 40 Genen, darunter befinden sich sowohl der hochaffine Zinkaufnahmetransporter ScZrt1 als auch die niederaffinen Zinkaufnahmetransporter ScZrt2 und ScFet4 (Zhao and Eide 1996a; Zhao and Eide 1996b; Lyons *et al.* 2000; Waters and Eide 2002). Weiterhin werden auch die vakuolären Zinktransporter ScZrt3 und ScZrc1 unter Zinkdefizienz

über Zap1 transkriptionell aktiviert (MacDiarmid *et al.* 2000; MacDiarmid *et al.* 2002). Während ScZrc1 für die Speicherung von Zink verantwortlich ist, remobilisiert ScZrt3  $Zn^{2+}$  aus der Vakuole. Interessante Einblicke in die Zinksensorik bietet die differentielle, zinkabhängige Regulation durch Zap1. Während die Gene der Zinktransporter ScZrt1, ScFet4, ScZrt3, ScZrc1 und auch Zap1 in zinkdefizienten Zellen transkriptionell aktiviert werden, ist die Expression des Gens für den niederaffinen Zinkaufnahmetransporters ScZrt2 reprimiert. In zinkgesättigten Zellen bietet sich ein gegenteiliges Bild, *zrt2* wird transkriptionell durch Zap1 aktiviert (Bird *et al.* 2004). Bindet Zap1 an das 11 bp große Sequenzmotiv, dem ZRE1 (*zinc responsive element*) so erfolgt eine Transkriptaktivierung (Zhao *et al.* 1998; Bird *et al.* 2000b). In der *zrt2* Promotorregion befindet sich ein weiteres von dem bekannten Konsensusmotiv abweichendes ZRE niedriger Affinität. Bindet Zap1 hier, kommt es zur Blockade des ZRE höherer Affinität (Bird *et al.* 2004). Bisher konnte in anderen Eukaryoten kein Zap1 Homolog gefunden werden, was auf eine große Variabilität in der Regulation der Zinkhomöostase verschiedener Organismen hindeutet.

Ein weiterer Regulator von ZIP-Transportern ist aus Arabidopsis bekannt. AtFIT1 (*Fe-deficiency Induced Transcriptionfactor 1*) induziert die Transkription des Eisen- und Zinkaufnahmetransporters AtIRT1 als Antwort auf Eisendefizienz (Colangelo and Guerinot 2004). In Arabidopsis werden die Zinktransporter AtZIP4 und AtZIP9 durch  $Zn^{2+}$  transkriptionell reguliert (Becher *et al.* 2004; Weber *et al.* 2004; Talke *et al.* 2006). Ebenso das Transkript des ZIP4 Homologs in *Thlaspi arvense* und *Thlaspi caerulescens* ZNT1. Ein pflanzlicher Regulator der Zinkaufnahme wurde bisher jedoch noch nicht gefunden.

Sind Zinkaufnahmetransporter einmal transkriptionell aktiviert, kann es bei Änderungen im Zinkangebot potentiell zur Überakkumulation kommen. Daher werden in *S. cerevisiae* unter Zinkmangelbedingungen nicht nur Zinkaufnahmetransporter transkriptionell aktiviert, sondern gleichzeitig auch Gene, die für cytoplasmatische Effluxtransporter kodieren (MacDiarmid *et al.* 2003). So kann die Zelle im Fall eines Zinkschocks toxische Konzentrationen des Kations zügig aus dem Cytoplasma entfernen.

Ein weiteres zinksensorisches Protein, das die Transkription von Genen zum Schutz vor Metalltoxizität aktiviert ist MTF-1 aus höheren Eukaryoten, von Insekten bis Säugern. MTF-1 induziert die Genexpression von Metallothionein I/II, dem cytosolischen Effluxtransporter ZnT1 und das Schlüsselenzym der Glutathionsynthese  $\gamma$ GCS (Radtke *et al.* 1993; Günes *et al.* 1998; Langmade *et al.* 2000; Yepiskoposyan *et al.* 2006). In unbehandelten Zellen befindet sich 80 % des MTF-1 Proteins in der cytosolischen Fraktion und kann nicht an DNA binden (Smirnova *et al.* 2000). Bei einer exogenen Zinkbehandlung kommt es zu einer schnellen Akkumulation von MTF-1 in der Kernfraktion, gekoppelt mit einer gesteigerten DNA-Bindeaktivität (Bittel *et al.* 1998; Smirnova *et al.* 2000). Das Ziel des Transkriptionsfaktors ist die Bindung an einer Anzahl von MRE Sequenzen (*metal responsive element*), die unter Zinkmangel reversibel ist (Andrews 2001).

Transkriptionskontrolle ist nur eine aus einer Reihe von möglichen regulatorischen Prozessen

der Metallhomöostase. Der transkriptionsabhängigen Stressantwort liegt der Rückkopplungsmechanismus der ubiquitinabhängigen Proteolyse zugrunde (Pahl and Baeuerle 1996). So werden durch Zink auch eine Reihe ubiquitinkonjugierender Enzyme induziert (Yepiskoposyan *et al.* 2006). In *S. pombe* wird der Transkriptionsfaktor Zip1 (ein bZIP (*basic leucine zipper*) Transkriptionsfaktor) kontinuierlich ubiquitiniert und durch das F-Box Protein SCF<sup>Pof1</sup> abgebaut. Zip1 spielt eine Rolle in der Transkription von Genen, die spezifisch unter Cadmiumstress benötigt werden, zum Beispiel Enzyme des Schwefelstoffwechsels. Unter Cadmiumstress findet höchstwahrscheinlich keine Ubiquitinierung mehr statt und das Niveau des SpZip1 Proteins steigt ohne eine transkriptionelle Aktivierung an (Harrison *et al.* 2005). Eine schnelle Stressantwort wird sichergestellt.

Eine weitere Schutzreaktion der Zelle auf hohe Zinkexposition ist die Endocytose von Zinkaufnahmetransportern. Unter Zinkdefizienz handelt es sich bei ScZrt1 aus *S. cerevisiae* um ein stabiles Plasmamembranprotein. Werden die Hefezellen aber hohen Zinkkonzentrationen ausgesetzt wird das Protein zunächst ubiquitiniert und anschließend durch Eintritt in den endocytotischen Weg von der Plasmamembran entfernt. Nach Internalisierung wird ScZrt1 in der Vakuole abgebaut (Gitan *et al.* 1998; Gitan and Eide 2000). Die Endocytose von Zinkaufnahmetransportern ist auch aus Säugerzellen bekannt. Beim Zinkaufnahmetransporter m/hZIP4, einem weiteren Mitglied der ZIP-Transportfamilie, ist die zinkabhängige Endocytose eine Voraussetzung für den proteasomalen und lysosomalen Abbau (Dufner-Beattie *et al.* 2003b; Kim *et al.* 2004; Mao *et al.* 2007). Auch mZIP4 akkumuliert unter Zinkdefizienzbedingungen in der Plasmamembran. Ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  wird das Protein endocytotiert, was mit einer sinkenden Zinkaufnahmeaktivität der Zellen einher geht. Erst ab einer Konzentration von 10-20  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  wird das mZIP4 Protein degradiert (Kim *et al.* 2004). Eine zinkstimulierte Endocytose ist auch von den Aufnahmetransportern mZIP1 und mZIP3 bekannt (Wang *et al.* 2004a).

Eine weitere Regulationsebene ist Aktivität der Zinktransporter selbst. Erste Hinweise einer solchen Aktivitätsregulierung zeigt die Kristallstruktur des CDF-Transporters YiiP aus *E. coli* (Lu and Fu 2007). Durch die Anwesenheit von  $\text{Zn}^{2+}$  kommt es zu einer Stabilisierung des Monodimers, der aktiven Form des Transporters. Die Struktur deutet darauf hin, dass das im Cytoplasma befindliche  $\text{Zn}^{2+}$  zu einer Dimerisierung und demzufolge zu einem Zinkexport führt (Lu and Fu 2007).

### 1.5 Zinkhomöostase, -hyperakkumulation und -toleranz in Pflanzen

Die sessile Natur der Pflanzen erfordert in Anpassung an die Umwelt in den meisten Gebieten eine besondere Strategie zur Aufnahme limitierter essentieller Nährstoffe, so zum Beispiel die der Strategie II Pflanzen, die Eisen über Phytosiderophorkomplexe aufnehmen. Auf der anderen Seite ist es einigen Arten gelungen auf Böden mit toxischen Konzentrationen von Übergangsmetallen zu wachsen. Die meisten Landpflanzen speichern hohe Metallkonzentrationen in der Zellwand und der Vakuole von Wurzelzellen, um einen möglichen Schaden von photosynthetischen Organen

abzuwenden. Andere Arten entwickelten dagegen die Fähigkeit der Metallhyperakkumulation. Das bedeutet, dass diese Pflanzen nicht nur an Standorten mit hohen Metallkonzentrationen im Boden anzutreffen sind, sondern zudem bestimmte Übergangsmetalle in hoher Konzentration in ihren oberirdischen Organen akkumulieren. Eine Pflanze wird dann als Hyperakkumulierer bezeichnet, wenn ihre Trockenmasse mehr als 1 % Zink, 0,1 % Nickel, Cobalt oder 0,01 % Cadmium enthält (Baker and Brooks 1989). Es konnten 4 verschiedene physiologische Ereignisse der Hyperakkumulation zugeschrieben werden. Erstens, eine erhöhte Metallaufnahme über die Plasmamembran, gefolgt von einer reduzierten Einlagerung der Metallkationen in die Wurzelvakuole (zweitens). Drittens gehört zur Hyperakkumulation eine erhöhte Beladung des Xylems und dem damit verbundenen Transport in die oberirdischen Organe. Viertens erfolgt eine erhöhte Metallaufnahme über die Plasmamembran der Blattzellen und eine dortige Einlagerung in die Vakuole (Milner and Kochian 2008). Bei allen diesen Prozessen spielen Metalltransportproteine eine wichtige Rolle. Neben dem biologischen Phänomen wird das Interesse an der Akkumulation und Speicherung von Mikronährstoffen in Pflanzen durch zwei technischen Anwendungsmöglichkeiten angetrieben. Zum einen zeigt die "Phytoremediation" eine umweltschonende Möglichkeit zur Detoxifizierung von durch hohe Metallkonzentrationen belasteter Böden und Gewässern auf (Salt *et al.* 1995). Zum anderen ist die Anreicherung von Nährstoffen in Kulturpflanzen zur Bekämpfung von Mangelernährung das Ziel der "Biofortifikation" (Guerinot and Salt 2001). Jedoch gehören die meisten der bekannten Hyperakkumulierer zu Pflanzen mit geringer Biomasseproduktion, zählen nicht zu den Kulturpflanzen und lassen eine technische Nutzung der Hyperakkumulation bisher nicht zu.

Derzeit sind ungefähr 400 Arten aus verschiedenen Familien darunter Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Poaceae, Violaceae und Fabaceae bekannt die hohe Konzentrationen von Metallkationen im Boden und im Spross tolerieren. Vor allem die Familie der Brassicaceae ist mit 87 bekannten Spezies besonders zahlreich in der Gruppe der Hyperakkumulierer vertreten. Arbeiten an Ökotypen der Modellpflanzen *Thlaspi caerulescens* und *Arabidopsis halleri* konzentrieren sich auf die molekularen und genetischen Hintergründe der hyperakkumulierenden Pflanzen im Vergleich zu ihren nicht hyperakkumulierenden Verwandten *Thlaspi arvense* und *Arabidopsis thaliana*. *T. caerulescens* ist ein Hyperakkumulierer für Zink, Cadmium und Nickel. Bei einem Vergleich der Zinkaufnahmeaktivität von Wurzeln aus *T. caerulescens* und *T. arvense* konnte gezeigt werden, dass die Affinität der Wurzeltransporter beider Arten zu Zink in der gleichen Größenordnung liegen, die maximale Zinkaufnahmegeschwindigkeit im Hyperakkumulierer *T. caerulescens* aber 6-fach höher ist als in *T. arvense*. Das bedeutet, dass die Transporter des Hyperakkumulierers nicht effizienter arbeiten als im Nichthyperakkumulierer, sondern, dass die Dichte der Zinkaufnahmetransporter in der Wurzelmembran des Hyperakkumulierers um ein vielfaches höher ist, was auf einen Unterschied in der Regulation beider Spezies hindeutet (Lasat *et al.* 1996). Nachfolgende Arbeiten am Zink- und Cadmiumaufnahmetransporter ZNT1 aus *T. arvense* und *T. caerulescens* bestätigen diesen Aspekt und zeigen eine konstitutiv höhere Expression des ZNT1

Gens in *T. caerulescens* (Lasat *et al.* 2000; Pence *et al.* 2000). Generell ist eine konstitutiv höhere Expression von mehreren Metallhomöostasefaktoren sowohl aus dem Hyperakkumulator *T. caerulescens* als auch aus dem Hyperakkumulator *A. halleri* gegenüber der Nichtakkumulatoren bekannt (Assunção *et al.* 2001; Becher *et al.* 2004; Weber *et al.* 2004; Hammond *et al.* 2006).



**Abb. 1.5** Abbildungen des Nicht-hyperakkumulators *Arabidopsis thaliana* und des Hyperakkumulators *Arabidopsis halleri*.

**A)** *A. thaliana*. Die Aufnahme entstand in der Nähe von Stapelburg im Eckertal. **B)** *A. halleri*. Aufnahme aus dem Nationalpark Hochharz, Schierke, Sandbrinkstraße

Eine Überschneidung von 16 homologen Genen, die sowohl in *A. halleri* als auch in *T. caerulescens* höher exprimiert waren, deutet auf Schlüsselfaktoren in der Ausprägung des Hyperakkumulationsphänotyps hin (Hammond *et al.* 2006). Neben Aufnahmetransportern der ZIP-Familie befindet sich unter diesen 16 Genen auch das Transkript des *A. thaliana* Homologs HMA4. Das Mitglied der ATPase Superfamilie  $P_{1B}$  wird in *A. thaliana* Wurzelstele exprimiert und ist an der Beladung des Xylems und damit an der Wurzel-Spross Translokation von Zink beteiligt (Hussain *et al.* 2004; Verret *et al.* 2004; Sinclair *et al.* 2007). Die Bedeutung der Xylembeladung als ein Schlüsselschritt der Hyperakkumulation (Papoyan *et al.* 2007) zeigte sich kürzlich in Untersuchungen von HMA4 aus dem Zink- und Cadmiumhyperakkumulator *A. halleri*. In der Analyse wurde das *A. halleri* HMA4 Transkripts durch RNAi gehemmt. Durch die Reduktion des Transkripts auf das Niveau des Nichtakkumulators *A. thaliana* verloren die transgenen Pflanzen die Fähigkeit zur erhöhten Wurzel-Spross Translokation von Zink und dessen Akkumulation in oberirdischen Organe (Hanikenne *et al.* 2008). Gleichzeitig wurde die Anreicherung von Zink in der Wurzel begünstigt. Hohe Zinkkonzentration in der Wurzel von *A. halleri* führten wiederum dazu, dass Zinkindikatorgene, die eine Rolle beim Aufnahmetransport in der Wurzel spielen reduziert exprimiert wurden. Darüber hinaus ist eine erhöhte *AhHMA4* Transkription nicht nur notwendig für die Zinkhyperakkumulation in *A. halleri* sondern auch ausreichend, um einen erhöhte Zinkxylembeladung in *A. thaliana* hervorzurufen. Sowohl eine Gentriflikation von *AhHMA4* als auch eine erhöhte Promotoraktivität aller drei Gene führen dazu, dass Zink aus den Wurzeln effektiv entfernt und in oberirdische Pflanzenteile transportiert wird. Das

daraus resultierende Zinkkonzentrationsgefälle mündet in einem stetigen Zinkeinstrom in die Wurzel (Talke *et al.* 2006; Hanikenne *et al.* 2008). Auch der Xylemsaft von *T. caerulescens* enthält eine 5-fach höhere Konzentration an Zink als der von *T. arvense* (Lasat *et al.* 1998).

Haben hohe Zinkkonzentrationen einmal oberirdische Organe erreicht ist eine weitere wichtige Voraussetzung der Hyperakkumulation die erhöhte Metalltoleranz der Blätter. Sie erfordert die effektive Speicherung hoher Metallkonzentrationen in den Vakuolen der Zellen. Die Bedeutung dieser Mechanismen zeigte sich in *A. thaliana* Pflanzen, die durch die erhöhte Expression des Xylemtransporters AhHMA4 unter geringen Zink- und Cadmiumkonzentrationen zwar zur Hyperakkumulation fähig waren, aber sensitiver gegenüber der zusätzlichen Gabe von Cadmium und Zink wurden, da hier in den oberirdischen Organen keine effizienten Detoxifizierungsmechanismen vorhanden sind (Hanikenne *et al.* 2008). Nach einem gesteigerten Xylemtransport, der gekoppelt an organische Säuren stattfindet, muss auch eine verbesserte Xylementladung stattfinden. Verantwortlich für die Aufnahme von Zink in Zellen oberirdischer Organe könnte ZIP6 sein. Im Spross von *T. caerulescens* und *A. halleri* ist ZIP6 gegenüber den Nichtakkumulatoren höher exprimiert (Becher *et al.* 2004; Hammond *et al.* 2006). In *A. halleri* liegt ZIP6 zusätzlich in mehr als einer Kopie vor (Talke *et al.* 2006). Weiterhin wies eine QTL Analyse ZIP6 als einen möglichen verantwortlichen Faktor der Akkumulation in *A. halleri* aus (Filatov *et al.* 2007). In *T. caerulescens* ist die Konzentration von Zink und Cadmium in den Blattepidermiszellen am höchsten (Küpper *et al.* 1999). Dieser Speicherort wird wahrscheinlich bevorzugt um Zellen mit photosynthetischen Organellen zu schützen. Dennoch befindet sich der größte Zinkpool in den Blättern von *T. caerulescens* aufgrund der Größenunterschiede der Zelltypen in den Vakuolen der Mesophyllzellen (Ma *et al.* 2005). In *A. halleri* befindet sich die höchste Zinkkonzentration an der Basis der Trichome. Auch in diesem Zinkakkumulierer ist der größte Speicherort die Vakuole der Mesophyllzellen (Küpper *et al.* 2000). Auf molekularer Ebene konnte der CDF-Transporter MTP1 als ein weiterer wichtiger Faktor der Zinkhyperakkumulation ermittelt werden. AtMTP1 ist in der Tonoplastenmembran von *A. thaliana* lokalisiert und vermittelt den Transport von Zink in die Vakuole (Bloß *et al.* 2002; Dräger *et al.* 2004; Kobae *et al.* 2004). Zunächst als "zinc transporter of *A. thaliana*" (ZAT) beschrieben, wird das Transkript unabhängig vom externen Zinkgehalt in *A. thaliana* konstitutiv exprimiert (van der Zaal *et al.* 1999). In *A. halleri* ist MTP1 in der Wurzel höher exprimiert als im Nichtakkumulator, in oberirdischen Organen, speziell in den Blättern, wird MTP1 jedoch unabhängig vom Zinkangebot konstitutiv exprimiert (Dräger *et al.* 2004). Durch die Unterdrückung des MTP1 Gens durch RNAi in *A. thaliana* wurde die Toleranz der Pflanzen gegenüber Zink im Vergleich zum Wildtyp herabgesetzt (Desbrosses-Fonrouge *et al.* 2005). MTP1 ist somit verantwortlich für die erhöhte Einlagerung von Zink in oberirdische Organe von *A. halleri* und maßgeblich an der Detoxifizierung von Zink in *A. thaliana* und *A. halleri* beteiligt. Neben den besprochenen Transportern werden auch noch niedermolekulare metallbindende Liganden zum einen für den Xylemtransport zum anderen zur cytoplasmatischen Entgiftung als Faktoren für die Metalltoleranz und Hyperakkumulation diskutiert. Bisher konnte

lediglich Histidin in Verbindung mit der Nickelhyperakkumulation in *Alyssum lesbiacum* gebracht werden (Krämer *et al.* 1996). Andere physiologische und biochemische Studien, die sich mit der Aufklärung von Liganden in Assoziation mit Zink und Cadmium beschäftigten lieferten bisher kein eindeutiges Ergebnis. Diskutiert wird neben Phytochelatinen und Metallothioneinen auch die nichtproteinogene Aminosäure Nicotianamin. In den Wurzeln von *A. halleri* und *T. caerulescens* ist das Transkriptlevel der Nicotianaminsynthase NAS2 höher als im Nichtakkumulator (Weber *et al.* 2004; van de Mortel *et al.* 2006). Im Spross von *A. halleri* ist NAS2 nur unter Zinkdefizienz exprimiert (Talke *et al.* 2006). Die unterschiedliche Regulation der Expression in Wurzel und Spross konnte auch bei anderen Hyperakkumulationsfaktoren beobachtet werden (Dräger *et al.* 2004). Darüber hinaus ist die Konzentration an Nicotianamin in den Wurzeln von *A. halleri* um das 3-fache höher als in *A. thaliana* (Weber *et al.* 2004). Deshalb wird eine Beteiligung von Nicotianamin an der Translokation von Zink im Spross diskutiert.

### 1.6 Metallhomöostase im Modellsystem *Schizosaccharomyces pombe*

Für die Identifizierung und Charakterisierung eukaryotischer Metallhomöostasefaktoren ist *Saccharomyces cerevisiae* ein nützliches Modellsystem, das nicht zuletzt aufgrund der leistungsstarken verfügbaren molekularbiologischen und genetischen Methoden als "eukaryotischer *E. coli*" gilt (Forsburg 1999). Nicht selten konnten auch pflanzliche Metallaufnahmetransporter durch eine gelungene Komplementation von *S. cerevisiae* Aufnahmemutanten identifiziert und charakterisiert werden.

Mit der Genomsequenz, die 2002 als sechstes eukaryotisches Genom veröffentlicht wurde, etablierte sich auch *Schizosaccharomyces pombe* als ein gleichsam bedeutender Modellorganismus (Eisen 2002; Wixon 2002; Wood *et al.* 2002; Yanagida 2002). Aus einem ostafrikanischen Hirsebier isoliert, wurde *S. pombe* 1893 erstmalig von P. Lindner als „neuer Gärungserreger“ beschrieben (Lindner 1893). *S. pombe* trennte sich in der Entwicklung von der Bäckerhefe vor 330-420 Millionen Jahren ab (Sipiczki 2000). Das Genom zeigte eine geringe Redundanz der Gene, 90 % liegen in Einzelkopie vor. Dadurch wird deren Funktionsaufklärung durch Mutantanalyse vereinfacht. Schon vor der Veröffentlichung der Genomsequenz von *S. pombe*, war die große Divergenz zwischen *S. pombe* und *S. cerevisiae* bekannt (Sipiczki 2000). Ein Satz von ca. 300 sowohl in *S. pombe* als auch in Pro- und Eukaryoten vertretenen Genen, findet keine Entsprechung in *S. cerevisiae* (Aravind *et al.* 2000; Wixon 2002; Wood *et al.* 2002). Bedeutend für die Metallhomöostase ist hier vor allem das Gen der Phytochelatinsynthase. Während in *S. pombe*, in einigen anderen Pilzen, Pflanzen, Algen und sogar in *Caenorhabditis elegans* Cadmium über die Bildung von Phytochelatinen entgiftet wird, fehlt das Gen der Phytochelatinsynthase in *S. cerevisiae*. Während der phytochelatinabhängige Weg der Cadmiumdetoxifikation in *S. pombe* als Modell der pflanzlichen Cadmiumentgiftung gilt, erfolgt in *S. cerevisiae* die Detoxifikation ausschließlich über die Chelatierung durch Glutathion. Weiterhin gibt es mehrere Hinweise, dass PC's nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Entgiftung von

nichtessentiellen Metallen wie Cadmium spielen, sondern auch einen Beitrag bei der Homöostase essentieller Metalle leisten. Neben Kupfer zeigte sich vor allem für den Zinkhaushalt eine Phytochelatinabhängigkeit in Pflanzen und Hefen (Thumann *et al.* 1991; Rauser 1995; Tennstedt *et al.* 2009). Ein weiterer Vergleich zwischen *S. pombe* und *S. cerevisiae* zeigt beträchtliche Unterschiede in der Regulation von Eisen- und Kupferhomöostase auf, obwohl eine grundlegende Anzahl an Genen, deren Proteine an der Metallaufnahme beteiligt sind in gleicher Weise reguliert werden (Rustici *et al.* 2007). Die Untersuchung der Metallhomöostase von *S. pombe* ist, neben der von *S. cerevisiae* ein notwendiger Schritt in der Untersuchung der eukaryotischen Einzelzelle. In den letzten Jahren konnten, neben der Aufklärung der Cadmiumdetoxifizierung auch Fortschritte in der Identifizierung von Faktoren der Eisen- und Kupferhomöostase in *S. pombe* erzielt werden (Zhou and Thiele 2001; Labbé *et al.* 2007).

Bisher ist jedoch nur wenig über die Zinkhomöostase von *S. pombe* bekannt. Der erste beschriebene Zinktransporter aus *S. pombe* zeigte eine Neuheit im eukaryotischen System. Im Gegensatz zum CDF-vermittelten ER Transport in *S. cerevisiae*, über die Transporter ScMsc1 und ScZrg17, übt der Transport über die ER- Membran in *S. pombe* einen starken Einfluss auf die Toleranz des Organismus gegenüber unterschiedlichen Metallen aus (Li and Kaplan 2001; Clemens *et al.* 2002; Ellis *et al.* 2004; Ellis *et al.* 2005). Der dafür verantwortliche CDF-Transporter, Zhf (*zinc homeostasis factor*), wurde in der ER-Membran und der Kernhülle lokalisiert (Borrelly *et al.* 2002; Clemens *et al.* 2002). Zum einen verleiht die Deletion des Gens eine erhöhte Toleranz gegenüber  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$ , auf der anderen Seite ist die *S. pombe* Mutante sensitiv gegenüber  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$ . Bis dahin wurde vermutet, dass Zink, wie in anderen Organismen auch, zur Entgiftung in die Vakuole transportiert wird. Zhf unterliegt keiner transkriptionellen Kontrolle. Die Zinktoleranz ist in diesem Fall eine konstitutive Eigenschaft (Borrelly *et al.* 2002; Clemens *et al.* 2002). Ein weiterer bekannter Zinkhomöostasefaktor aus *S. pombe* ist das Metallothionein Zym1. Im Cytoplasma der Zelle bindet Zym1 überschüssiges  $\text{Zn}^{2+}$ , das anschließend durch den Transport über Zhf im ER entgiftet wird (Borrelly *et al.* 2002). Die Expression des Metallothioneingens *zym1*<sup>+</sup> ist unter hohen Zinkkonzentrationen induziert (Borrelly *et al.* 2002). Weitere mögliche Faktoren der Zinkhomöostase in *S. pombe* sind die 3 homologen Proteine der ZIP-Familie. Wie bereits beschrieben gehören ZIP-Transportproteine zu einer weit verbreiteten Klasse von Metalltransportern, die neben dem Transport von weiteren Kationen den Zinktransport ins Cytoplasma katalysieren. Es konnte festgestellt werden, dass das SpZrt1-Protein die höchste Homologie (39 % Identität und 56 % Ähnlichkeit) von allen ZIP-Homologen in *S. pombe* zum hochaffinen Zinkaufnahmetransporter Zrt1 aus *S. cerevisiae* besitzt. Die durch die Aminosäurevergleiche implizierte Rolle der Homologen im Zinktransport wurde in einer Mutantenanalyse überprüft (Bährecke 2004). Dabei wurde das ZIP-Protein SpZrt1 als ein wichtiger Zinkhomöostasefaktor erkannt. Durch den Verlust des *zrt1*<sup>+</sup> Gens, waren *S. pombe* Zellen nicht mehr in der Lage unter Zinkmangel zu wachsen (Bährecke 2004). Der Mutantenphänotyp konnte durch die Zugabe hoher Zinkkonzentrationen gerettet werden. Erste Analysen zur Zinkkonzentration der  $\Delta zrt1$

Mutante zeigten einen niedrigen Zinkgehalt der Zellen (Bährecke 2004).

### 1.7 Zielstellung

Die Forschung an der Zinkhomöostase in *S. pombe* gründet auf der Entwicklung eines eukaryotischen Modellsystems für die Charakterisierung pflanzlicher Zinkhomöostasefaktoren. Da die Komplexbildung von Metallionen durch Phytochelatine einen bedeutenden Toleranzmechanismus für Pflanzen darstellt, ist *S. pombe* als Modell zur pflanzlichen Metallhomöostase gut geeignet (Clemens and Simm 2003). Der Metallhaushalt von Organismen ist eng an Membrantransportprozesse gekoppelt, deshalb wurde die Familie der ZIP-Transporter ausgewählt, um in einem rückwärts gerichteten genetischen Ansatz die Rolle der drei Homologen ZIP-Proteine bei der Zinkhomöostase in *S. pombe* zu untersuchen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf mögliche Eintrittswege für Zink in die Hefezelle gelegt. Zu Beginn dieser Arbeit waren bereits Einzelmutanten der drei ZIP-Transporter SpZrt1, SpZip2 und SpZip3 vorhanden. Desweiteren existierten Doppelmutanten der ZIP-Homologen mit dem CDF-Transporter Zhf. Aus Wachstumsanalysen auf Medien mit unterschiedlichen Zinkkonzentrationen war bekannt, dass  $\Delta zrt1$  Zellen nicht oder nur langsam unter niedrigen Zinkbedingungen wachsen (Bährecke 2004). Ob und in welchem Umfang SpZrt1 an der Aufnahme von Zink in *S. pombe* beteiligt ist, sollten die nun folgenden Analysen ermitteln. Weiterhin sollten Funktionen für die beiden weiteren vorhandenen ZIP-Transporter gesucht werden, die in den ersten Wachstumsanalysen keinen Phänotyp zeigten. Sowohl eine umfangreiche Elementanalyse der ZIP-Einzelmutanten als auch die Metallgehalte verschiedener ZIP-Doppelmutanten sollen die Mutanten charakterisieren, um Rückschlüsse auf deren Funktion im Metallhaushalt und insbesondere im Zinkhaushalt zu erhalten. Darüber hinaus sollte die Lokalisierung der einzelnen ZIP-Proteine Informationen über ihren Wirkungsort erbringen. Transkript- und Transportanalysen sollten das Bild der einzelnen Transporter vervollständigen.

Eine weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit konzentriert sich auf die Anwendbarkeit des Modellsystems *S. pombe* zur Charakterisierung von pflanzlicher Zinkhomöostase Faktoren. In einer Kooperationsarbeit sollten die pflanzlichen Transporter AtIRT3 aus *A. thaliana* und AhIRT3 aus *A. halleri* in einer geeigneten *S. pombe* Mutante analysiert werden. Neben Wachstumsanalysen sollten vor allem Zinkaufnahmeassays zur Funktionsaufklärung von IRT3 beitragen.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Stämme und Plasmide

#### 2.1.1 Bakterien und Hefestämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *Schizosaccharomyces pombe* Stämme wurden, in Tabelle 2.1 aufgelistet.

*Zrt1*<sup>+</sup>, *zip2*<sup>+</sup> und *zip3*<sup>+</sup> bezeichnen dabei die Gene mit den ID-Codes SPBC16D10.06, SPCC126.09, SPAP8A3.03.

**Tabelle 2.1: *S. pombe* Stammliste.**

Name	Plasmid	Genotyp / Merkmale	Herkunft / Referenz
Wildtyp FY261	plasmidfrei	<i>h</i> <sup>-</sup> , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i>	Susan Forsburg, Salk Institute, La Jolla, USA
Sp254	plasmidfrei	<i>h</i> <sup>-</sup> , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , <i>URA4</i>	(Clemens <i>et al.</i> 1999)
<i>Δzhf-ura</i>	plasmidfrei	<i>h</i> <sup>-</sup> , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , <i>Δzhf::URA4</i>	(Clemens <i>et al.</i> 2002)
<i>Δzhf-kanMX6</i>	plasmidfrei	<i>h</i> <sup>-</sup> , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , <i>Δzhf::kanMX6</i>	vorliegende Arbeit
Zhf-HA	plasmidfrei	<i>h</i> <sup>-</sup> , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , <i>zhf</i> <sup>-</sup> -3HA- <i>kanMX6</i>	vorliegende Arbeit
<i>Δzhf + GFP-Zhf</i>	pGATEN- <i>zhf</i> <sup>+</sup>	<i>h</i> <sup>-</sup> , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , <i>Δzhf::URA4</i>	vorliegende Arbeit
FY261-GFP-Zhf	pGATEN- <i>zhf</i> <sup>+</sup>	<i>h</i> <sup>-</sup> , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i>	vorliegende Arbeit
<i>Δzrt1-kanMX6</i>	plasmidfrei	<i>h</i> <sup>-</sup> , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , <i>Δzrt1<sup>+</sup>::kanMX6</i>	vorliegende Arbeit
<i>Δzrt1-leu</i>	plasmidfrei	<i>h</i> <sup>-</sup> , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , <i>Δzrt1<sup>+</sup>::Leu2</i>	(Bährecke 2004)
<i>Δzrt1-leerer Vektor</i>	pSLF173	<i>h</i> <sup>-</sup> , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , <i>Δzrt1<sup>+</sup>::Leu2</i>	(Bährecke 2004)
<i>Δzrt1-zrt1<sup>+</sup></i>	pSLF173- <i>zrt1<sup>+</sup></i>	<i>h</i> <sup>-</sup> , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , <i>Δzrt1<sup>+</sup>::Leu2</i>	(Bährecke 2004)
<i>Δzrt1*<sup>+</sup>zrt1<sup>+</sup></i>	pSLF373- <i>zrt1<sup>+</sup></i>	<i>h</i> <sup>-</sup> , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , <i>Δzrt1<sup>+</sup>::Leu2</i>	(Bährecke 2004)
<i>Δzrt1-AtIRT3</i>	pSFL173- <i>AtIRT3</i>	<i>h</i> <sup>-</sup> , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , <i>Δzrt1<sup>+</sup>::Leu2</i>	vorliegende Arbeit
<i>Δzrt1-AhIRT3</i>	pSFL173- <i>AhIRT3</i>	<i>h</i> <sup>-</sup> , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , <i>Δzrt1<sup>+</sup>::Leu2</i>	vorliegende Arbeit
SpZrt1-HA	plasmidfrei	<i>h</i> <sup>-</sup> , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , <i>zrt1<sup>+</sup>-3HA-kanMX6</i>	vorliegende Arbeit
SpZrt1-GFP	plasmidfrei	<i>h</i> <sup>-</sup> , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , <i>zrt1<sup>+</sup>-GFP(S65T)-kanMX6</i>	vorliegende Arbeit
<i>Δzrt1-ura</i>	plasmidfrei	<i>h</i> <sup>-</sup> , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , <i>Δzrt1<sup>+</sup>::URA4</i>	vorliegende Arbeit
FY261-GFP- <i>zrt1<sup>+</sup></i>	pGATEN- <i>zrt1<sup>+</sup></i>	<i>h</i> <sup>-</sup> , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i>	vorliegende Arbeit
<i>Δzrt1-GFP-zrt1<sup>+</sup></i>	pGATEN- <i>zrt1<sup>+</sup></i>	<i>h</i> <sup>-</sup> , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , <i>Δzrt1<sup>+</sup>::URA4</i>	vorliegende Arbeit
<i>ΔzhfΔzrt1</i>	plasmidfrei	<i>h</i> <sup>-</sup> , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , <i>Δzhf::URA4</i> , <i>Δzrt1<sup>+</sup>::Leu2</i>	(Bährecke 2004)

## 2. Material und Methoden

$\Delta zip2$ -leu	plasmidfrei	$h^-$ , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , <i>URA4</i> , $\Delta zip2^+::Leu2$	(Bährecke 2004)
$\Delta zip2$ -ura	plasmidfrei	$h^-$ , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , $\Delta zip2^+::URA4$	vorliegende Arbeit
$\Delta zrt1\Delta zip2$	plasmidfrei	$h^-$ , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , $\Delta zrt1^+::kanMX6$ , $\Delta zip2^+::URA4$	vorliegende Arbeit
$\Delta zhf\Delta zip2$	plasmidfrei	$h^-$ , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , $\Delta zhf^+::URA4$ , $\Delta zip2^+::Leu2$	(Bährecke 2004)
FY261- <i>zip2</i> -GFP	pGATEC- <i>zip2</i> <sup>+</sup>	$h^-$ , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i>	vorliegende Arbeit
$\Delta zrt1\Delta zip2$ - <i>zip2</i> <sup>+</sup>	pGATEC- <i>zip2</i> <sup>+</sup>	$h^-$ , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , $\Delta zrt1^+::kanMX6$ , $\Delta zip2^+::URA4$	vorliegende Arbeit
$\Delta zip3$ -ura	plasmidfrei	$h^-$ , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , $\Delta zip3^+::URA4$	vorliegende Arbeit
$\Delta zip3$ -leu	plasmidfrei	$h^-$ , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , <i>URA4</i> , $\Delta zip3^+::Leu2$	(Bährecke 2004)
FY261- <i>zip3</i> -GFP	pGATEC- <i>zip3</i> <sup>+</sup>	$h^-$ , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i>	vorliegende Arbeit
$\Delta zhf\Delta zip3$	plasmidfrei	$h^-$ , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , $\Delta zhf^+::URA4$ , $\Delta zip3^+::Leu2$	(Bährecke 2004)
$\Delta zrt1\Delta zip3$	plasmidfrei	$h^-$ , <i>ade6-M210</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-Δ18</i> , <i>can1-1</i> , $\Delta zrt1^+::Leu2$ , $\Delta zip3^+::URA4$	vorliegende Arbeit

Die in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae* Stämme werden in Tabelle 2.2 aufgelistet.

**Tabelle 2.2: S. cerevisiae Stammliste.**

Name	Plasmid	Genotyp / Merkmale	Herkunft / Referenz
<i>zhy3</i>	plasmidfrei	<i>MATa ade6 can1 his3 leu2 trp1 ura3</i> $\Delta zrt1::LEU2$ , $\Delta zrt2::HIS3$	(Zhao and Eide 1996b)
<i>zhy3 pFL61-1</i>	<i>pFL61-1</i>	<i>MATa ade6 can1 his3 leu2 trp1 ura3</i> $\Delta zrt1::LEU2$ , $\Delta zrt2::HIS3$	Kuo-Chen Yeh, Academia Sinica, Taipeh, Taiwan
<i>zhy3 AtIRT1-pFL61-1</i>	<i>AtIRT1-pFL61-1</i>	<i>MATa ade6 can1 his3 leu2 trp1 ura3</i> $\Delta zrt1::LEU2$ , $\Delta zrt2::HIS3$	Kuo-Chen Yeh, Academia Sinica, Taipeh, Taiwan
<i>zhy3 AtIRT3-pFL61-1</i>	<i>AtIRT3-pFL61-1</i>	<i>MATa ade6 can1 his3 leu2 trp1 ura3</i> $\Delta zrt1::LEU2$ , $\Delta zrt2::HIS3$	Kuo-Chen Yeh, Academia Sinica, Taipeh, Taiwan
<i>zhy3 AhIRT3-pFL61-1</i>	<i>AhIRT3-pFL61-1</i>	<i>MATa ade6 can1 his3 leu2 trp1 ura3</i> $\Delta zrt1::LEU2$ , $\Delta zrt2::HIS3$	Kuo-Chen Yeh, Academia Sinica, Taipeh, Taiwan

Weiterhin wurden in dieser Arbeit zur Klonierung von Plasmid-DNA der *Escherichia coli* Stamm DH10b ((Grant *et al.* 1990) verwendet.

### 2.1.2 Plasmide

**Tabelle 2.3: Plasmidliste.**

Name	Ausgangsplasmid	Hefeselektionsmarker	Eigenschaften, Verwendung	Referenz
pSLF172	REP4X	<i>URA4</i>	<i>nmt</i> -Promotor, erlaubt triple HA Epitoptagfusion am C-Terminus	(Forsburg and Sherman 1997)
pSLF173	REP4X	<i>URA4</i>	<i>nmt</i> -Promotor, erlaubt triple HA Epitoptagfusion am N-Terminus	(Forsburg and Sherman 1997)

## 2. Material und Methoden

pSGP72	REP3X	<i>Leu2</i>	<i>nmt</i> -Promotor, erlaubt triple HA Epitoptagfusion am C-Terminus	(Forsburg and Sherman 1997)
pSLF373	REP82X	<i>URA4</i>	<i>nmt</i> <sup>***</sup> -Promotor, erlaubt triple HA Epitoptagfusion am N-Terminus	(Forsburg and Sherman 1997)
pSLF173- <i>zrt1</i> <sup>+</sup>	pSLF173	<i>URA4</i>	<i>S.pombe zrt1</i> <sup>+</sup> Gen in MCS, <i>NotI</i> flankiert	(Bährecke 2004)
pSLF373- <i>zrt1</i> <sup>+</sup>	pSFL373	<i>URA4</i>	<i>S.pombe zrt1</i> <sup>+</sup> Gen in MCS, <i>NotI</i> flankiert	(Bährecke 2004)
pGATEC	REP41GFPC	<i>LEU2</i>	<i>nmt</i> -Promotor, erlaubt GFP-Fusion am C-Terminus, GATEWAY - Klonierungskassette	Neile Bone, John Armstrong, Falmer, Brighthon UK
pGATEN	REP41GFPC	<i>LEU2</i>	<i>nmt</i> -Promotor, erlaubt GFP-Fusion am N-Terminus, GATEWAY - Klonierungskassette	Neile Bone, John Armstrong, Falmer, Brighthon, UK
pSFL173- <i>AtIRT3</i>	pSLF173	<i>URA4</i>	<i>Arabidopsis thaliana IRT3</i> Gen in MCS, <i>Sall</i> , <i>BsrBI</i> flankiert	Kuo-Chen Yeh, Academia Sinica, Taipei, Taiwan
pSFL173- <i>AhIRT3</i>	pSLF173	<i>URA4</i>	<i>Arabidopsis halleri IRT3</i> Gen in MCS, <i>Sall</i> , <i>BsrBI</i> flankiert	Kuo-Chen Yeh, Academia Sinica, Taipei, Taiwan
pFL61		<i>URA4</i>		
pFL61- <i>AtIRT1</i>	pFL61	<i>URA4</i>	<i>Arabidopsis thaliana IRT1</i> Gen in MCS, <i>NotI</i> flankiert	Kuo-Chen Yeh, Academia Sinica, Taipei, Taiwan
pFL61- <i>AtIRT3</i>	pFL61	<i>URA4</i>	<i>Arabidopsis thaliana IRT3</i> Gen in MCS, <i>NotI</i> flankiert	Kuo-Chen Yeh, Academia Sinica, Taipei, Taiwan
pFL61- <i>AhIRT3</i>	pFL61	<i>URA4</i>	<i>Arabidopsis halleri IRT3</i> Gen in MCS, <i>NotI</i> flankiert	Kuo-Chen Yeh, Academia Sinica, Taipei, Taiwan
pFA6a-3HA-kanMX6	pFA6a	<i>kanMX6</i>	PCR Matrize, erlaubt triple HA Epitopfusion am C-Terminus von Proteinen, ausgehend von ihrer normalen Lokalisierung im Genom, wurde auch zum chromosomalen <i>knock out</i> von Genen verwendet	(Bähler <i>et al.</i> 1998)
pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6	pFA6a	<i>kanMX6</i>	PCR Matrize, erlaubt GFP-Fusion am C-Terminus von Proteinen, ausgehend von ihrer normalen Lokalisierung im Genom	(Bähler <i>et al.</i> 1998)
pGEM-T			f1 ori, <i>colE1</i> ori, <i>lacZ</i> , MCS, Amp <sup>r</sup> , SP6- und T7 Promotor	Promega, Madison, USA
pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO				Invitrogen. Karlsruhe

## 2.2 Nährmedien und Anzuchtbedingungen

Tabelle 2.4: Nährmedien und Anzuchtbedingungen

Name	Bestandteil(Endkonzentration)	Anzuchtbedingungen
<b>EMM</b> (Edinburgh <u>M</u> inimal <u>m</u> edium)	L-Kaliumhydrogenphthalat(3g/l(14,7mM)); L-Di-Natriumhydrogenphosphat(2,2g/l(15,5mM)); L-Ammoniumchlorid(5g/l(93,5mM)); D (+)-Glukose(20g/l(111mM)); <b>Salze</b> (20ml/l); <b>Vitamine</b> (1ml/l); <b>Mineralien I</b> (0,1ml/l)	<i>S. pombe</i> , 30°C
<b>Salze</b> (50x)	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O(52,5g/l(0,26M)); CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O(0,735g/l(4,99mM)); KCl(50g/l(0,67M)); Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2g/l(14,1mM))	
<b>Vitamine</b> (1000x)	Pantothensäure(1g/l(4,2mM)); Nicotinsäure(10g/l(81,2mM)); Inositol(10g/l(55,5mM)); Biotin(10mg/l(40,8µM))	

## 2. Material und Methoden

<b>Mineralien I</b> (10000x)	Borsäure(5g/l(80,9mM)); MnSO <sub>4</sub> (4g/l(23,7mM)); ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O(4g/l(13,9mM)); FeCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O(2g/l(7,4mM)); Molybdänsäure(0,4g/l(2,47mM)); KI(1g/l(6,02mM)); CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O(0,4g/l(1,6mM)); Citrat(10g/l(47,6mM))	
<b>EMM-Zn</b>	L-Kaliumhydrogenphthalat(3g/l(14,7mM)); L-Di-Natriumhydrogenphosphat(2,2g/l(15,5mM)); L-Ammoniumchlorid(5g/l(93,5mM)); D (+)-Glukose(30g/l(111mM)); <b>Salze</b> (20ml/l); <b>Vitamine</b> (1ml/l); <b>Mineralien II</b> (0,1ml/l)	
<b>Mineralien II</b> (10000x)	Borsäure(5g/l(80,9mM)); MnSO <sub>4</sub> (4g/l(23,7mM)); FeCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O(2g/l(7,4mM)); Molybdänsäure(0,4g/l(2,47mM)); KI(1g/l(6,02mM)); CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O(0,4g/l(1,6mM)); Citrat(10g/l(47,6mM))	
<b>EMM-Fe</b>	L-Kaliumhydrogenphthalat(3g/l(14,7mM)); L-Di-Natriumhydrogenphosphat(2,2g/l(15,5mM)); L-Ammoniumchlorid(5g/l(93,5mM)); D (+)-Glukose(30g/l(111mM)); <b>Salze</b> (20ml/l); <b>Vitamine</b> (1ml/l); <b>Mineralien III</b> (0,1ml/l)	
<b>Mineralien III</b> (10000x)	Borsäure(5g/l(80,9mM)); MnSO <sub>4</sub> (4g/l(23,7mM)); ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O(4g/l(13,9mM)); Molybdänsäure(0,4g/l(2,47mM)); KI(1g/l(6,02mM)); CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O(0,4g/l(1,6mM)); Citrat(10g/l(47,6mM))	
<b>EMM-Mn</b>	L-Kaliumhydrogenphthalat(3g/l(14,7mM)); L-Di-Natriumhydrogenphosphat(2,2g/l(15,5mM)); L-Ammoniumchlorid(5g/l(93,5mM)); D (+)-Glukose(30g/l(111mM)); <b>Salze</b> (20ml/l); <b>Vitamine</b> (1ml/l); <b>Mineralien IV</b> (0,1ml/l)	
<b>Mineralien IV</b> (10000x)	Borsäure(5g/l(80,9mM)); ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O(4g/l(13,9mM)); FeCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O(2g/l(7,4mM)); Molybdänsäure(0,4g/l(2,47mM)); KI(1g/l(6,02mM)); CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O(0,4g/l(1,6mM)); Citrat(10g/l(47,6mM))	
<b>YE5S</b> (Yeast Extract with Supplements)	Hefeextrakt(5g/l(0,5%w/v)), D(+)-Glukose(30g/l(3%w/v)), Adenin(100mg/l(0,74mM)), L-Histidin(100mg/l(0,64mM)), L-Leucin(100mg/l(0,76mM)), Uracil(100mg/l(0,89mM)), L-Lysin Monohydrochlorid(100mg/l(0,55mM))	<i>S. pombe</i> , 30°C
<b>LB</b>	Bacto-Trypton(10g/l(1%w/v)), Hefeextrakt(5g/l,(0,5%w/v)), NaCl(5g/l)	<i>Escherichia coli</i> DH5α, 37°C
<b>SD-ura</b>	Nitrogen base (without amino acids)(6,7g/l), D(+)-Glukose (20g/l(0,2%w/v)), Drop out Supplement/-ura (0,77g/l)	<i>S. cerevisiae zhy3</i> , <i>pFL61-1</i> , 30°C

### Zusätze und Besonderheiten:

Zur Transkriptrepression, von Genen unter Kontrolle des *nmt1*-Promotors (*no message in thiamine*) in den verwendeten *S. pombe* Expressionsvektoren der pSLF-Serie, wurde 1-20 µM Thiamin hinzugefügt. In Proteinabbauexperimenten wurde dem Medium 200 mg/l Cykloheximid zugesetzt.

Dem Bedarf entsprechend wurden dem EMM Medium die Auxotrophiemarker Uracil und/oder Leucin in einer Konzentration von 225 mg/l eingesetzt. Verschiedene Zinkkonzentrationen wurden wie angegeben ausgehend von EMM-Zn eingestellt.

Für Kulturplatten wurden entweder 2 % Agar-Agar oder 1,5 % Agarose zugegeben.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

#### 2.3.1.1 Extraktion genomischer DNA aus *Schizosaccharomyces pombe* nach (Hoffman and Winston 1987)

Von einer Übernachtskultur wurden 20 ml Vollmedium (YE5S) oder Minimalmedium (EMM) mit entsprechenden Selektionsbedingungen angeimpft und die Kultur bis in die stationäre Wachstumsphase hinein (über Nacht) bei 30 °C inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte in einem 50 ml Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur (RT), 3000 rpm (Eppendorf 5804 R / 5810 R A-4-44) für 5 min. Die Zellen wurden dann in 0,5 ml sterilem Wasser aufgenommen und die Kultur in ein 1,5 ml Mikrozentrifugengefäß überführt. Nach der Zentrifugation bei 13000 rpm (Eppendorf 5415 C, F45-18-11) für 5 s wurde das Zellpellet in 0,2 ml

DNA-Präparationslösung (2 % v/v Triton X-100, 1 % SDS w/v, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert. 200 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) pH 8,0 (TE) (Roth) wurden für die DNA-Extraktion zugefügt und zum Zellaufschluss mit 0,3 g Glasperlen (säurebehandelt, 425-600 µm; Sigma-Aldrich) für 4 min gevortext. Nach der folgenden Zentrifugation bei 13000 rpm (Eppendorf 5415 C, F-45-18-11) für 5 min wurde die obere, wässrige Phase ohne Mitnahme der proteinhaltigen Interphase in ein neues 1,5 ml Mikrozentrifugengefäß überführt. Die Nukleinsäuren wurden mit 1 ml Ethanol (96 %) gefällt und nach Zentrifugation (13000 rpm, 2 min (Eppendorf 5415 C, F-45-18-11)) bei RT in 0,4 ml EB-Puffer (Qiagen) gelöst und mit 3 µl RNase-Lösung (10 mg/ml) für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die DNA konnte nun mit 10 µl 4 M Ammoniumacetat und 1 ml Ethanol präzipitiert und das getrocknete Pellet in 50 µl EB-Puffer (Qiagen, Hilden) aufgenommen werden. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA-Lösung bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.3.1.2 RNA-Extraktion aus *Schizosaccharomyces pombe* nach (Lyne et al. 2003)

Zellen zur RNA-Isolierung wurden in einem Volumen von 20 ml bis zu einer  $OD_{600} \sim 0,6$  (Biophotometer, Eppendorf RS232C) angezogen und dem angegebenen Metallstress unterzogen. Nach 2 h wurden die Zellen bei 3000 rpm (Eppendorf, 5804 R / 5810 R, A-4-44) für 5 min, 4 °C geerntet und mit 1 ml eisgekühltem H<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Lagerung wurden die Zellen bei -20 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet. Während der folgenden Schritte wurde nur mit separaten Lösungen und Plastikmaterial und wenn nicht anders angegeben auf Eis gearbeitet. Dabei wurden Handschuhe getragen. Zuerst wurden die Zellen in 750 µl TES (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA pH 8; 0,5 % (w/v) SDS) aufgenommen, in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und sofort mit 750 µl saurem Phenol / Chloroform 5:1 (Sigma, P-1944) versetzt. Anschließend wurde der Ansatz bei 65 °C in einem Heizblock unter dem Abzug für 1 h inkubiert. Während dieser Zeit wurde in 10 min Intervallen für 10 s gevortext (Eppendorf, Thermomixer comfort). Der Ansatz wurde dann für 1 min auf Eis inkubiert und nochmals für 20 s gevortext. Wässrige und phenolische Phasen wurden bei 14000 rpm (Eppendorf 5804 R / 5810 R F-45-30-11) bei 4 °C für 15 min voneinander getrennt. 700 µl des wässrigen Überstands wurden zu 700 µl saurem Phenol/Chloroform (5:1) gegeben. Die Ansätze wurden durch invertieren gemischt und für 5 min bei 14000 rpm (Eppendorf 5804 R / 5810 R F-45-30-11) bei 4 °C zentrifugiert. 700 µl des Überstands wurden zu 700 µl Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) gegeben. Nach dem Mischen wurde für 5 min bei 14000 rpm (Eppendorf 5804 R / 5810 R F-45-30-11) und 4 °C zentrifugiert. 500 µl der wässrige Phase wurde abgenommen und die Nukleinsäure in 100 %-igem Ethanol, das zuvor bei -20 °C vorgekühlt wurde, und 50 µM 3 M Natriumacetat pH 5,2 gefällt. Dies geschah für 30 min bei -70 °C. Die Proben wurden für 10 min bei RT und 14000 rpm (Eppendorf 5804 R / 5810 R F-45-30-11) zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 500 µl 70 %-igem Ethanol (4 °C), hergestellt mit DEPC-Wasser (Milliporewasser + 3 % DEPC, ÜN rühren und anschließend autoklavieren), überschichtet und für 1 min bei RT zentrifugiert (Eppendorf 5415 C, F-45-18-11). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet bei RT luftgetrocknet. Die Nukleinsäure wurde in 100 µM DEPC-Wasser aufgenommen und für 1-10 min bei 65 °C inkubiert. Das Pellet wurde durch auf- und abpipettieren gelöst. Zur Lagerung wurden die Proben bei -80 °C eingefroren.

### 2.3.1.3 Extraktion von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Neben der Präparation von Plasmid-DNA über Minipräp-Säulen (Qiagen, Hilden) wurde eine schnelle *boiling* Präparationsmethode angewendet. Dazu wurden 2-5 ml *E. coli* Kulturen auf LB-Medium mit entsprechender Antibiotikaselektion über Nacht bei 37 °C angezogen. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation bei 13000 rpm (Eppendorf 5415 C, F-45-18-11) für 30 s pelletiert und der Überstand entfernt. Die Zellen wurden dann in 100 µl Lysis-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8, 15 % (w/v) Saccharose, 2 mg/ml Lysozym, 0,2 mg/ml RNase A, 0,1 mg/ml BSA) aufgenommen und für 1-2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden zum Zellaufschluss für 1 min gekocht und für 5 min auf Eis abgekühlt. Die Zelltrümmer, genomische DNA und Proteine wurden bei 13000 rpm (Eppendorf 5415 C, F45-18-11) in 10 min abzentrifugiert. 5 µl des Überstandes konnten nun direkt in einen Kontrollverdau eingesetzt werden.

## 2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (Eppendorf, Biophotometer RS232 C) bei einer Wellenlänge von 260 nm, wobei einer optischen Dichte von 1 = 50 µg/ml DNA zu Grunde gelegt wurden. Bei RNA wurde eine optische Dichte von 1 = 45 µg/ml angenommen. Um die Reinheit der

jeweiligen Nukleinsäure zu verifizieren wurde zusätzlich die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen, dem Absorptionsmaximum von Proteinen. Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  entspricht dem Wert 2, wenn ein hoher Reinheitsgrad der Nukleinsäuren erreicht werden konnte.

### 2.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR verschiedener Gene wurden nach Standardmethoden mit den in Tabelle 5 aufgelisteten Primern durchgeführt.

**Tabelle 2.5: Primerliste.** Die unterstrichenen Sequenzen zeigen den 3' Überhang zur Klonierung in pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO (vgl. 2.3.4).

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
SpZIP1 5'	GCT TAA TTA AAC TAT TAT CCT C	Herstellung von <i>zrt1</i> <sup>+</sup> Insertionsmutanten
SpZIP1 3'	GCT TTA GTA AGA AAC TAC GAG	Herstellung von <i>zrt1</i> <sup>+</sup> Insertionsmutanten
ZIP1 diag	GTG AGA TTG CTG ATC ACT CCT	Identifizierung von <i>zrt1</i> <sup>+</sup> Insertionsmutanten
ENTR ZIP1 fw	<u>CAC CAT</u> GTC TTT AAA CAA TTT ATC TAA CTC	Herstellung von pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO Klonen
ENTR ZIP1 C rev	AGC CCA TTT ACC TAA CAA AGC C	Herstellung von pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO Klonen für die Rekombination in pGATEC
ENTR ZIP1 N rev	TCA AGC CCA TTT ACC TAA CAA AG	Herstellung von pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO Klonen für die Rekombination in pGATEN
SpZip2 5'	CTTC ACG AAT CAA GCC AAA C	Herstellung von <i>zip2</i> <sup>+</sup> Insertionsmutanten
SpZIP2 3'	CGC AGG TGT TAA TAA ACC GG	Herstellung von <i>zip2</i> <sup>+</sup> Insertionsmutanten
ZIP2 diag	CTT GTC AAA CTT AGG ATA CTA AGC	Identifizierung von <i>zip2</i> <sup>+</sup> Insertionsmutanten
ENTR ZIP2 fw	<u>CAC CAT</u> GAC TGA GAT GAG CAT ACG CC	Herstellung von pENTR D-TOPO Klonen
ENTR ZIP2 C rev	ATG GCT ATC AAA GAT TTC CAA AAA TAA G	Herstellung von pENTR D-TOPO Klonen für die Rekombination in pGATEC
ENTR ZIP2 N rev	CTA ATG GCT ATC AAA GAT TTC C	Herstellung von pENTR D-TOPO Klonen für die Rekombination in pGATEN
SpZIP3 5'	GAA GAA TTA ACG AGT TCC CAT	Herstellung von <i>zip3</i> <sup>+</sup> Insertionsmutanten
SpZIP3 3'	CAA TGG AGG TAT TGG TAA AGA	Herstellung von <i>zip3</i> <sup>+</sup> Insertionsmutanten
ZIP3 diag	TTC CTA TAA CAT TGG CTG TAA CC	Identifizierung von <i>zip3</i> <sup>+</sup> Insertionsmutanten
ENTR ZIP3 fw	<u>CAC CAT</u> GTT TTT ATT GCA ACG TTT TTC	Herstellung von pENTR D-TOPO Klonen
ENTR ZIP3 C rev	AAC ATA ATA TAA AAA AGA AAA ACC TC	Herstellung von pENTR D-TOPO Klonen für die Rekombination in pGATEC
ENTR ZIP3 N rev	TTA AAC ATA ATA TAA AAA AGA AAA ACC	Herstellung von pENTR D-TOPO Klonen für die Rekombination in pGATEN
Scleu2 5'	CGA TTC CTA ATT TGA TAT TG	Identifizierung von Insertionsmutanten mit <i>ScLeu2</i> Auxotrophiemarker
Scleu2 3'	CAT GAA CAA GGA AGT ACA GG	Identifizierung von Insertionsmutanten mit <i>ScLeu2</i> Auxotrophiemarker
KanMX56 3'	GCT AGG ATA CAG TTC TCA CAT CCG	Identifizierung von Transformanden mit <i>KanMX6</i> Insertion
C-term HA	AGC AGA GTA ATC TGG AAC GTC	Identifizierung von Transformanden mit HA-Tag Insertion
C-term GFP	GAA TAA TTC TTC ACC TTT AGA C	Identifizierung von Transformanden mit GFP-Tag Insertion

### 2.3.4 Klonierung mittels Gateway® Technologie

Für die Amplifikation der PCR- Produkte, die in den Shuttlevektor pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO® (Invitrogen, Karlsruhe) integriert werden sollten, wurden spezielle Primer verwendet. Der Primer, der das 5' Ende des Zielgens amplifizieren sollte beginnt am 5'-Ende mit den Basen CACC (Tabelle 2.5 unterstrichen). Diese Basen paaren mit dem 3' Überhang GTGG des pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO® Vektors und ermöglichen eine gerichtete Klonierung. Der Primer, der das 3' Ende des Zielgens amplifizieren sollte enthielt für die

## 2. Material und Methoden

anschließende Rekombination in pGATEC nicht das Stopp-Codons zu amplifizierenden Gens. Die mittels PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) gereinigten PCR Produkte wurden in die Isomerisierungsreaktion laut Herstellerangaben (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt. Anschließend wurde der Ansatz für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und danach zur Transformation in One shot<sup>®</sup> Competent *E. coli* (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt. Die Transformanden wurden auf LB + 50 µM Kanamycin selektiert. Nach Isolation und Sequenzierung der positiven Entryklone erfolgte die LR-Rekombination mit den Vektoren pGATEC und pGATEN. Die Reaktion wurde mit Gateway<sup>®</sup> LR Clonase<sup>™</sup> (Invitrogen, Karlsruhe) katalysiert.

### 2.3.5 cDNA Synthese

Gesamt-RNA mit einer Konzentration von 1 µg/µl wurden mit DNase I (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerempfehlung behandelt. 1 µl der Gesamt-RNA wurden für die cDNA-Synthese mittels "SuperScript II First Strand cDNA Synthesis for RT-PCR" (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die cDNA-Generierung erfolgt nach Herstellerangaben mittels Oligo-dT-Primern.

### 2.3.6 Quantitative *real time* PCR

Die wie oben generierte cDNA wurde mit Wasser 1:50 verdünnt. 5 µl cDNA wurden zusammen mit 5 µl Primermix (forward und reverse Primer mit einer Konzentration von je 0,5 µM Endkonzentration 0,125 µM) und 10 µM SYBR<sup>®</sup> Green PCR Mastermix (Applied Biosystems, Forster City, USA) in die Reaktion eingesetzt. Jede Probe wurde als technisches Triplikat mit dem Abi Prism<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Forster City, USA) amplifiziert und mit der Abi Prism<sup>®</sup> Sequenz Detection Software 1.2.3. ausgewertet. Als konstitutive Kontrolle wurde das *S. pombe act1<sup>+</sup>* Gen verwendet. Die Primer für die Reaktionen und deren ermittelte Effizienz sind in Tabelle 6 aufgelistet. Die Konzentration an Doppelsträngiger DNA pro Zeiteinheit (ct) wurde ab einem Schwellenwert von 0,2 bestimmt. Aus dem Verhältnis zwischen dem ct-Wert des zu untersuchenden Gens und dem ct-Wert der konstitutiven Kontrolle wurde der  $\Delta$ ct-Wert berechnet und der daraus resultierende relative Transkriptgehalt mittels der folgenden Formel bestimmt: relativer Transkriptgehalt =  $(2^{-\Delta ct}) * 1000$ .

PCR-Programm:

	Temperatur	Zeit
1.	50 °C	2 min
2.	95 °C	10 min
3.	95 °C	15 s
4.	60 °C	1 min
5.	95 °C	15 s
6.	60 °C	20 s

40 Zyklen

Tabelle 2.6: Primerliste für *real time* PCR.

zu amplifizierendes Gen	forward Primer (5'→3')	reverse Primer (5'→3')	Primereffizienz	Produktgröße
<i>zrt1<sup>+</sup></i>	CGTTATCTATTCGTTGGTTAC	GATAGCATCCAAAACACCTTG	110 %	100 bp
<i>act1<sup>+</sup></i>	CTCTGTCTGGATTGGTGGATC	CCAGGTCCGCTCTCATCATAC	90 %	100 bp
<i>zip2<sup>+</sup></i>	GCTAGCGTGATGCAAGAATCCT	CGCCGAAAAAGAAAGCACAA	95 %	100 bp

### 2.3.7 Methoden zum horizontalen Gentransfer

#### 2.3.7.1 Transformation von *E. coli* durch Calciumchlorid-Methode nach (Ausubel et al.)

Von einer Übernachtskultur wurden pro Transformationsansatz 1 ml LB-Flüssigmedium 1:50 inokuliert. Die Bakterien wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 angezogen und die Kulturen anschließend für 10 min auf Eis abgekühlt. Alle Folgeschritte erfolgten auf Eis. Danach wurden die Kulturen bei 4 °C und 3000 rpm (Eppendorf 5804 R / 5810 R A-4-44) zentrifugiert. Dann wurde das Pellet in 1/3 des

Ausgangsvolumen eiskühlem  $\text{CaCl}_2$  (100 mM) aufgenommen und für 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut 10 min bei 3000 rpm (Eppendorf 5804 R / 5810 R A-4-44) und 4 °C zentrifugiert und nun in 1/10 des Ausgangsvolumens in eiskaltem  $\text{CaCl}_2$  (100 mM) resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 4 °C und 3000 rpm (Eppendorf 5804 R / 5810 R A-4-44) für 5 min wurden die Zellen in 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung, versetzt mit 15 % Glycerin, aufgenommen. Die Zellen wurden nun mit einem Volumen von 100  $\mu\text{l}$  aliquotiert und entweder zur späteren Nutzung bei -80 °C eingefroren oder direkt im Anschluss transformiert. Dazu wurden der Probe 2 – 5  $\mu\text{l}$  eines 10  $\mu\text{l}$  Ligationsansatzes zugeführt und zusammen für 30 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 60 s. Die Zellen wurden dann für 2 min auf Eis abgekühlt und anschließend unter Zugabe von 1 ml LB für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden bei 6000 rpm (Eppendorf 5415 C F-45-18-11) für 5 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und in 100  $\mu\text{l}$  LB-Medium resuspendiert. Abschließend wurden die Zellen auf LB + Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrühtet.

### 2.3.7.2 Transformation von *S. pombe* nach (Keeney and Boeke 1994)

*S. pombe*-Stämme wurden bei 30 °C auf EMM oder YE5S Medium über Nacht angezogen. Am nächsten Tag wurden 20 ml Hauptkultur beimpft und bis zu einer Zelldichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml kultiviert. Anschließend wurde die Suspension für 5 min bei 3000 rpm (Eppendorf 5804 R / 5810 R A-4-44) und Raumtemperatur geerntet und zweimal mit 1 ml sterilem Wasser gefolgt von 1 ml Lithiumacetat/TE (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 100 mM Li-Acetat, 1 mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA} \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend wieder in Lithiumacetat aufgenommen und auf eine Zelldichte von  $2 \times 10^9$  Zellen/ml verdünnt. Dann wurden zu 100  $\mu\text{l}$  der kompetenten Kultur 10  $\mu\text{l}$  Carrier-DNA (2 mg/ml) und ~20  $\mu\text{g}$  der zu transformierenden DNA (Plasmid-DNA oder lineares *knock-out*-Fragment) gegeben. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 260  $\mu\text{l}$  40 % PEG/Lithiumacetat/TE (40 % (w/v) PEG in Lithiumacetat/TE) zugefügt, die Suspension sorgfältig gemischt und weitere 60 min bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von 43  $\mu\text{l}$  DMSO erfolgte die Transformation mittels Hitzeschock bei 42 °C für 5 min. Die so transformierten Zellen wurden nun mit sterilem Wasser gewaschen und auf Kulturplatten ausgestrichen, die für den entsprechenden Auxotrophie-Marker selektierten.

### 2.3.7.3 Elektrotransformation von *S. pombe*

Übernachtskulturen von *S. pombe* wurden in 20 ml EMM überführt und bis zu einer Zelldichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml angezogen. Die Zellen wurden bei 3000 rpm für 5 min (Eppendorf, 5804 R / 5810 R, A-4-44) bei Raumtemperatur geerntet und 1x mit eiskaltem  $\text{H}_2\text{O}$  und gefolgt von 1x eiskaltem 1 M Sorbitol gewaschen. Dem Ansatz wurde mit 25 mM DTT für 15 min inkubiert und anschließend erneut mit eiskaltem 1 M Sorbitol auf eine Zelldichte von  $1\text{-}5 \times 10^9$  Zellen/ml eingestellt. 40  $\mu\text{l}$  der Zellen wurden zu 100 ng zu transformierende DNA gegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Der Elektroporator (Biorad) wurde auf 1,5 kV, 200 Ohm und 25  $\mu\text{F}$  eingestellt. Nach dem Elektroschock wurden sofort 900  $\mu\text{l}$  eiskaltes 1 M Sorbitol in die Elektroporationsküvette gegeben. Die Suspension wurde in einem gekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäß aufbewahrt bis der Ansatz auf dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert wurde. Die Platten wurden bei 30 °C für 4-6 d bebrühtet.

### 2.3.7.4 Herstellung von *S. pombe* Mutanten

#### 2.3.7.4.1 Herstellung von Insertionsmutanten

Für die Generierung von ZIP-Insertionsmutanten im Genom von *S. pombe* wurden spezifisch ~ 1 kb große Fragmente aller drei *zip*-Gene mittels PCR von genomischer DNA amplifiziert. Die dazu verwendete Primerkombination wurde so gewählt, dass die Primer je ~ 500 bp von einer natürlichen *HindIII*- Restriktionsschnittstelle entfernt lagen. Die amplifizierten Fragmente wurden anschließend adenyliert um sie mit einem TA-Klonierungsvektor (pGEM-T, Promega) ligieren zu können. Unter Verwendung der vorhandenen *HindIII*-Restriktionsschnittstelle konnten die Markergene *ura4<sup>+</sup>* oder *Leu2* in die Gensequenz eingefügt werden. Die so gewonnenen *knock-out*-Konstrukte wurden nach der Klonierung in *E. coli* über die Enzyme *NcoI* und *SpeI* aus pGEM-T herausgeschnitten. Die linearisierten Fragmente wurden in die haploiden *S. pombe* Stämme transformiert. Die eingebrachten DNA-Fragmente konnten nun über den Mechanismus der homologen Rekombination in die jeweiligen Zielsequenzen integrieren und *zrt1<sup>+</sup>*, *zip2<sup>+</sup>* oder *zip3<sup>+</sup>* zerstören.

## 2. Material und Methoden

### 2.3.7.4.2 Herstellung von Deletionsmutanten und getaggtten Derivaten

Deletionsmutanten und getaggte Genprodukte von *S. pombe* wurden mit einem PCR gestützten Ansatz erzielt, der es erlaubte die Manipulationen in ihrer normalen chromosomalen Umgebung durchzuführen (Bähler *et al.* 1998). Dabei konnten PCR-Produkte, die einen kleinen homologen Abschnitt zur Zielsequenz besaßen über Rekombination ins Genom integriert werden. Als PCR-Templates wurden Plasmide verwendet, die den Selektionsmarker *kanMX6* enthielten. Für die Integration eines Tags hinter eine Gensequenz enthielten die Plasmide zusätzlich dreimal die Sequenz für Hämagglutinin (3xHA) (Green and Thomas 1981) beziehungsweise die Sequenz des grünfluoreszierenden Proteins (EGFP) (Tabelle 2.7). Die Primer für die PCR-Reaktion enthielten dabei am 5' Ende 80 Nukleotide der genspezifischen Sequenz gefolgt von ~ 20 Nukleotiden zur Amplifikation der Vektorsequenz. Sie wurden über PAGE gereinigt (Sigma-Aldrich, Steinheim). Der PCR-Ansatz wurde nach Standardmethode durchgeführt. Zur Polymerisation wurde ein Gemisch aus Taq- und Pfu-Polymerase (1:5) verwendet.

Das PCR-Programm wurde wie folgt durchgeführt:

	Temperatur	Zeit
1.	95 °C	5 min
2.	95 °C	45 s
3.	56 °C	45 s
4.	72 °C	6 min
5.	72 °C	2 min
6.	4 °C	∞

40 Zyklen

Die resultierenden PCR-Produkte wurden wie oben beschrieben in die entsprechenden *S. pombe* Stämme transformiert. Der Transformationsansatz wurde auf YE5S-Kulturplatten ausgestrichen bei 30 °C inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen auf Selektionsmedium YE5S mit 100 mg/l des Kanamycinderivates G418 (Geneticin, Sigma-Aldrich, Steinheim) replikaplattiert und für 2-3 d bei 30 °C inkubiert. Große Kolonien wurden erneut auf YE5S + 100 mg/l G418 Platten ausgestrichen.

**Tabelle 2.7: Templatevektoren der PCR- gestützten chromosomalen Genmanipulation.**

Bezeichnung	Eigenschaften
pFA6a-3HA-kanMX6	Module wurden in die MCS von pFA6a über <i>PacI</i> und <i>PmeI</i> integriert. Das <i>kanMX6</i> Modul besitzt die Promotor- und Terminatorsequenz des EF1 $\alpha$ aus <i>Ashbya gossypii</i> zusammen mit <i>kan<sup>R</sup></i> aus <i>E. coli</i> . (Bähler <i>et al.</i> 1998)
pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6	Module wurden in die MCS von pFA6a über <i>PacI</i> und <i>PmeI</i> integriert. Das <i>kanMX6</i> Modul besitzt die Promotor- und Terminatorsequenz des EF1 $\alpha$ aus <i>A. gossypii</i> zusammen mit <i>kan<sup>R</sup></i> aus <i>E. coli</i> . (Bähler <i>et al.</i> 1998)

**Tabelle. 2.8: Primerliste für die PCR-gestützte chromosomale Genmanipulation.** Die unterstrichenen Basen paaren mit der Vektorsequenz.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
ZIP1-DEL-Kan 5	TTC ACT CTC TTT AAC GTT TTT CGT TGA AAA CAA ACT TTG CCC TGT TGA GTT ATA TCT TGT ATC TTT CTC GTA CAT TAA AAC <u>GGA TCC CCG GGT TAA TTA A</u>
ZIP1-DEL-Kan 3	TAT TGA CAC TCA AAC TCA AAA GAA GAA AAC AGA TTT AAT GAA GAA TAT AAA ATG CAC GGA TCA TCG AAA AAG CCA <u>CCA AAG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C</u>
ZIP1TAG 5'	GTA ACT GGT ATA AGC TTA TTT ACC TTT TGG CAT GCT CGA TGG CTG GTA CTG GAG TTA TGG CTT TGT TAG GTA AAT GGG <u>CTC GGA TCC CCG GGT TAA A</u>
ZIP1-TAG3'	ACA ATT ATT ATT TAA AAT TGA AAG ATT GAT TGG TAC ATA TCA ATA CAA CCA ATG AAG CAT CTA ATT GTA CGA TAC <u>TAA AGG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C</u>
ZHF-DEL-Kan 5	TTT ACC TTA TTC CTT TTT CTC CCT GTG AAA TTC AAC CCT TAC CAT TTT TTT GAA ATT GGT GAC TTT TCG TTT TCA AAC <u>TAC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A</u>
ZHF-DEL-Kan 3	AAT ATA AAA TTT TAC CTC AAG AAT AAA TCA AAA GAT GTG ACA CAA TAG ATT AAC CAC GTT AAA TTT ATA ATG TTC <u>GCA AAG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C</u>

### 2.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.4.1 Zellaufschluss und Proteinrohextraktion aus *S. pombe*

20 ml Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation bei 3000 rpm (Eppendorf 5804 R / 5810 R A-4-44) pelletiert und anschließend mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zum Zellaufschluss wurde das Pellet mit Quarzsand und 0,5 ml eisgekühltem Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 % (v/v) TritonX 100) gemörsert. Das flüssige Extrakt wurde abgenommen und in Mikrozentrifugenröhrchen bei 14000 rpm (Eppendorf 5804 R / 5810 R F-45-30-11) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand entsprach dem Proteinrohextrakt und wurde zur Proteinkonzentrationsbestimmung eingesetzt.

#### 2.4.2 Quantifizierung von Proteinen

Die Proteinkonzentration wurde mit der BCA-Methode (BCA-Protein-Assay, Pierce, Rockford) ermittelt. Dazu wurden 10 µl verschiedener Verdünnungsstufen von Proteinrohextrakten mit 90 µl BCA-Reagenz vermischt. Die Proben wurden für 2 h bei RT inkubiert und ihre Absorption bei 562 nm gemessen. Über eine definierte BSA-Eichreihe wurden die Absorptionen mit den entsprechenden Proteinkonzentrationen abgeglichen. Die Proben wurden anschließend mit Extraktionspuffer auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

#### 2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, Western-Blot und Immundetektion

10 µg Proteinrohextrakt wurden mit Probenpuffer (5x (4 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10 % (w/v) SDS, 50 % Glycerin, 1 mM Mercaptoethanol, 1 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und zur Denaturierung für 5 min gekocht. Die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld erfolgte im SDS-Laufpuffer (2 % w/v SDS, 100 mM DTT, 60 mM Tris-HCl pH 6,8) mit einer Spannung von 30 mA bei einer Gelstärke von 1 mm. Die Acrylamidkonzentration des Sammelgels betrug 4 %, die des Trenngels 10 %. Als Größenstandard wurde der *prestained protein molecular weight marker* (Fermentas) mitgeführt. Nach der Auftrennung erfolgte der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (Protran 0.45 µm) mittels *semi-dry* Verfahren unter Anwesenheit von Transferpuffer (200 mM Glycin, 25 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol). Es wurde eine Spannung von 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Membran angelegt. Nach dem Transfer wurde die Membran 2 x 10 min in TBS-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit Blockierreagenz (5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer) geschüttelt. Danach wurde die Membran in 2x TBS-Tween/Triton (20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20, 0,2 % (v/v) Triton X-100) für je 10 min gewaschen und für weitere 10 min in TBS-Puffer äquilibriert. Die Membran wurde für 1 h mit dem primären Antikörper  $\alpha$ -HA (Covance, Berkeley, USA) in Blockierreagenz (1:10000) inkubiert. Die Waschschrte 2x TBS-Tween/Triton und 1x TBS-Puffer wurden wiederholt bevor der sekundäre Antikörper  $\alpha$ -Ratte (Sigma-Aldrich, Seinheim) in Blockierreagenz (1:3000) für eine Stunde mit der Membran inkubiert wurde. Nach 4x10 min Waschen in TBS-Tween/Triton erfolgte die Detektion HA-konjugierter Proteine mittels Peroxidaseaktivität des sekundären Antikörpers. Dazu wurde ein ECL<sup>TM</sup>-Kit verwendet (Amersham). Filme wurden für 1 min und für 5 min mit der Membran belichtet und anschließend entwickelt.

### 2.5 *S. pombe* Wachstumsassays

Die Anzucht der Stämme erfolgte bei 30 °C (160 rpm, Infors) in entsprechendem Selektivmedium EMM über Nacht. Die optische Dichte der Kulturen wurde bei 600 nm bestimmt. Für Flüssigkulturen wurden die Zellen mit einer optischen Dichte von 0,05 in Medium mit unterschiedlichen Metallkonzentrationen eingesetzt und bei 30 °C (160 rpm, Unitron, Infors) bebrütet. Die Wachstumsversuche dauerten, wenn nicht anders, angegeben 24 h. Abschließend wurde die optische Dichte (OD<sub>600</sub>) der Kulturen und mit der mitgeführten Kontrolle ins Verhältnis gesetzt.

## 2.6 Langzeitaufnahmeexperimente

### 2.6.1 Anzucht und Probenaufbereitung für Atomabsorbtionsspektroskopie (Flamme)

*S. pombe* Kulturen wurden auf Zinkmangelmedium EMM-Zn, angereichert mit verschiedenen Konzentrationen  $ZnCl_2$  für bis zu 24 h bei 30 °C und 150 rpm (Unitron, Infors) angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3000 rpm (Eppendorf 5804 R / 5810 R A-4-44) geerntet und in 20 ml sterilem Wasser für 10 min bei 4 °C gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet 2 x mit 10 mM  $CaCl_2$  für je 10 min bei 4 °C geschüttelt. Die Zellen wurden pelletiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mittels einer Gefriertrocknungsanlage (Lyovac GT2, Steris, Hurth) vollständig lyophilisiert. Es wurde nun das Trockengewicht des Zellen bestimmt. Sie wurden dann in 2 ml 30 %-igem Wasserstoffperoxid aufgenommen und resuspendiert. Zu den Proben wurde anschließend 3 ml 65 % Salpetersäure ( $HNO_3$ ) gegeben und vorsichtig gemischt. Die Proben mussten nun für mindestens 2 h unter dem Abzug ruhen bis die auftretende Gasentwicklung abgeschlossen war. Zusätzlich wurden die Proben durch ein Zellulosefilter passiert.

### 2.6.2 Probenanalyse mit Atomabsorbtionsspektroskopie (Flamme)

Die Zinkkonzentration der Proben wurde mit einem AAnalyst 800 (Perkin Elmer, Rödeau-Jügesheim) in einer Flamme aus einem Acetylen-Luftgemisch analysiert. Zuvor wurden definierte Zinklösungen zum Erstellen einer Eichgeraden vermessen. Die Absorption der Flamme wurde bei der für Zink charakteristischen Wellenlänge von 213,856 nm durch ein Spektrometer gemessen. Die gemessenen Absorptionen wurden mit der Eichgeraden korreliert und das Trockengewicht der einzelnen Proben auf 1 g eingerechnet.

### 2.6.3 Anzucht und Probenaufbereitung für ICP-OES (*inductively coupled plasma optical emission spectrometry*) nach (Eide, 2005)

Je 6 Einzelkolonien der verschiedenen Stämme aus Tabelle 3.1 (Tabelle 3.1) wurden als Inokulum für 20 ml Medium (Tabelle 3.1) verwendet. Die Zellen wurden für 24 h bei 30 °C und 160 rpm angezogen. Zur Herstellung des Mediums wurden während des gesamten Experiments die gleichen Stocklösungen verwendet. Die Kulturen wurden durch Zentrifugation (3000 rpm, 5 min, Eppendorf 5804 R / 5810 R, A-4-44) geerntet. Anschließend wurden die Zellen 3x mit 20 ml 1  $\mu$ M EDTA pH 8,0 und 3x mit 20 ml deionisiertem  $H_2O$  gewaschen. Die Kulturen wurden pelletiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mittels einer Gefriertrocknungsanlage (Lyovac GT2, Steris, Hurth) vollständig lyophilisiert. Es wurde nun das Trockengewicht des Zellen bestimmt. Sie wurden dann in 4 ml 30%-igem Wasserstoffperoxid aufgenommen und resuspendiert. Zu den Proben wurde anschließend 6 ml 65 % Salpetersäure ( $HNO_3$ ) gegeben und vorsichtig gemischt. Das Zellysate wurde nach 24 h durch ein Zellulosefilter passiert. Die Proben wurden mittels ICP-OES des Typs IRIS Advantage Duo (Thermo, Fisher) analysiert. Die zur Analyse verwendeten charakteristischen Wellenlängen der einzelnen Elemente sind in Tabelle 2.9 aufgeführt (Tabelle 2.9). Zur Kalibrierung des Geräts wurden die folgenden Eichlösungen verwendet (Tabelle 2.10)

**Tabelle 2.9: Charakteristische Wellenlängen der analysierten Elemente.**

Element	Ca	Cd	Co	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Ni	P	S	Zn
Wellenlänge (nm)	318,1	226,5	228,6	324,7	259,9	769,8	279,0	257,6	202,0	221,6	185,9	182,0	213,8

**Tabelle 2.10: Eichlösungen zur Kalibrierung der ICP-OES Messungen.**

Element	Eichlösung 1 Konzentration [ppm]	Eichlösung 2 Konzentration [ppm]	Eichlösung 3 Konzentration [ppm]	Eichlösung 4 Konzentration [ppm]	Eichlösung 5 Konzentration [ppm]
B	0,01	0,02	0,05	0,1	0
Ca	4	8	20	50	100
Cd	0,02	0,08	0,2	0,5	2
Co	0	0,005	0,01	0,02	0
Cu	0,01	0,04	0,1	0,25	1
Fe	0,01	0,04	0,1	0,25	1
K	5	20	80	150	200
Mg	1	4	10	25	50
Mn	0,01	0,04	0,1	0,25	1
Mo	0	0,005	0,01	0,02	0
Ni	0	0,005	0,01	0,02	0
P	5	20	80	150	200
S	4	8	20	50	25
Zn	0,2	0,08	2	8	20

### 2.7 Kurzzeitaufnahmeexperimente mit radioaktivem Zink

Für die Zinkaufnahme wurden die Zellen über Nacht in EMM-Zn + 5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  angezogen. 20 ml Zinkmangelmedium (EMM-Zn) wurden mit der Übernachtskultur auf eine optische Dichte (600 nm) von 0,3 inokuliert und 4 h, was einer Verdopplungszeit des Wildtyps entspricht, bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (3000 rpm, Eppendorf 5804R / 5810 R A-4-44) und 1x mit Aufnahmepuffer (10 mM MES, 2 % Glukose, pH 6,1) gewaschen. Anschließend wurde die Suspension auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen in 500  $\mu\text{l}$  in Aufnahmepuffer eingestellt. Die dazu notwendige Kurvengleichung für die Berechnung der Zellzahl anhand der optischen Dichte (Biophotometer RS 232C, Eppendorf) der Kultur ist: Zellzahl=(4E+06)optische Dichte. Die Aufnahmemessungen wurden in 50 ml Erlenmeyerkolben bei 30 °C und 140 rpm im Wasserbadschüttler (Gyrotory G76, new Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey) in einem Gesamtvolumen von 5 ml durchgeführt. Durch Zugabe der radioaktiven 10  $\mu\text{M}$  Zinkstammlösung ( $\text{ZnCl}_2$  gemischt mit  $^{65}\text{Zn}$  mit einer spezifischen Aktivität von 80,23 MBq/mg) wurde das Aufnahmeexperiment gestartet. Nach definierten Zeiten wurden Proben von je 0,5 ml entnommen und auf Nitrozellulosemembranen (NC45, Millipore) filtriert. Die Filter wurden mit 5 ml SSW-Puffer [1 mM NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM  $\text{Na}_3\text{-Citrat}$ , 1 mM EDTA pH 7) gewaschen und in eine Mini-Poly-Q Röhre überführt. Nach Zugabe von 4 ml Ready Safe™ wurde die Radioaktivität des zellassoziierten  $^{65}\text{Zn}^{2+}$  im Flüssigkeitsszintillationszähler (LS6500, Beckman, München) ausgezählt. Die Zählzeit betrug 2 min, die Radioaktivität wurde in cpm angegeben. Zur Bestimmung der Radioaktivität im Ansatz wurden 500  $\mu\text{l}$  Probe entnommen und direkt mit Ready Safe™ gemischt und gemessen.

Die Konkurrenzstudien wurden gleichzeitig durch die Zugabe von entweder 10  $\mu\text{M}$  der radioaktiven Stammlösung (Kontrolle) oder 10  $\mu\text{M}$  radioaktiver Stammlösung mit den angegebenen Konzentrationen an  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$  oder  $\text{CdCl}_2$  durchgeführt. Um  $\text{Fe}^{2+}$  im reduzierten Zustand zu halten, wurde 1 mM Natriumaskrobinsäure zum Aufnahmepuffer zugegeben, wenn eine Versuchsreihe mit  $\text{FeCl}_2$  durchgeführt wurde. Nach 5 min wurden, die 500  $\mu\text{l}$  dem Ansatz entnommen und wie zuvor beschrieben behandelt.

### 2.8. Lokalisationsstudien

#### 2.8.1 Immunlokalisierung und Elektronenmikroskopie nach (Clemens *et al.* 2002)

*S. pombe* Zellen, die ein N- beziehungsweise C- terminales HA-Tag am SpZrt1 Protein besitzen wurden über Nacht in EMM-Zn + 5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  angezogen und anschließend für 4 h in EMM-Zn inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und die Zellwand mittels Zymolyase 20T(ICN, Biomedicals, Inc., Aurora, Ohio, USA) für 1 h bei 30 °C in 1,2 M Sorbitol, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 2 mM DTT abgebaut. Die Spheroplasten wurden zweimal mit 1,2 M Sorbitol, 10 mM HEPES, pH 7,0 gewaschen und geerntet. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd/0,5 % Glutaraldehyd in Ethanol dehydriert und in Lowicryl K11M eingebettet. Es wurde Ultradünnschnitte angefertigt, die mit dem monoklonalen Antikörper anti-HA (Covance, Berkeley, USA), gefolgt von IgG1 anti-mouse Antikörper, Protein A/gold (15 nm) inkubiert wurden. Nach der Immunmarkierung wurden die Schnitte mit 5 % wässrigem Uranylacetat behandelt und durch das EM 912 OMEGA Transmissionselektronenmikroskop (LEO) analysiert.

#### 2.8.2 Fluoreszenzmikroskopie nach (Tran *et al.* 2004)

Zellen, die ein GFP-Fusionsprotein exprimieren wurden auf 2 verschiedene Weisen konstruiert. Zum einen wurde für stabile Integrationen eine GFP-Kassette in den Leserahmen des Zielgen mit Hilfe des pFA6-GFP-kanMX Vektors inseriert (s.h. 2.3.6.4.2.,(Bähler *et al.* 1998)). Zum anderen wurden Stämme mit dem Multicopy -Plasmiden pGATEN und pGATEC (Neil Bone, University of Sussex, Falmer, Brighton, UK) transformiert. Die Stämme wurden über Nacht bei Raumtemperatur in EMM-Zn unter niedrigen Zinkkonzentrationen (1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ ) beziehungsweise moderaten Zinkkonzentrationen (20  $\mu\text{M}$ ) angezogen. Im Fall der vektorexprimierten Fusionsproteine wurde 1  $\mu\text{M}$  Thiamin zum Medium gegeben, um die Expression teilweise zu reprimieren. 1 ml der Zellen wurde bei einer optischen Dichte  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 durch Zentrifugation geerntet und 1x in EMM-Zn gewaschen. Je nach Bedarf wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzmarker FM 4-64 (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe) behandelt. Dazu wurden 1,63 mM FM 4-64 in EMM-Zn 1:10000 verdünnt. 1 ml der Verdünnung wurde zu den Zellen gegeben und für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in EMM-Zn gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurden 50  $\mu\text{l}$  1% ige Agarose auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem weiteren Objektträger zu einer dünnen Schicht gepresst. Ein Objektträger wurde entfernt, 10  $\mu\text{l}$  Zellsuspension wurde aufgetragen und mit einem Deckgläschen bestückt. Die Zellen wurden nun mit dem Zeiss Konfokalmikroskop LSM 510 Meta analysiert.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Elementanalyse in *Schizosaccharomyces pombe* Wildtyp und ausgewählten Mutanten des Metallhaushalts

ZIP- und CDF- Transporter sowie die Phytochelatinsynthese (PCS) zeigten sich in den vorangegangenen Arbeiten als mögliche Kandidaten für molekulare Faktoren der Zinkhomöostase in *Schizosaccharomyces pombe* (Borrelly *et al.* 2002; Clemens *et al.* 2002; Chen *et al.* 2003; Bährecke 2004; Simm 2004; Tennstedt *et al.* 2009).

Um den Beitrag dieser Faktoren auf die Akkumulation von Zink und anderen Metallen zu testen, wurde ein Elementprofil von Wildtyp und Mutanten dieser Gene erstellt. Zu Beginn der Arbeit lagen bereits einige Mutanten vor (Tabelle 3.1). Neu generiert wurden die Doppelmutanten  $\Delta zrt1\Delta zip2$ ,  $\Delta zrt1\Delta zip3$ ,  $\Delta pcs\Delta zip2$  und  $\Delta pcs\Delta zip3$  (Tabelle 3.1). Die Zellen wurden unter 8 verschiedenen Wachstumsbedingungen angezogen. Zum einen sollte der Einfluss von niedrigen (10  $\mu\text{M}$ ) und hohen (30  $\mu\text{M}$ ) Zinkbedingungen getestet werden. Niedrige Zinkbedingungen wurden limitiert durch den Wachstumsphänotyp der  $Sp\Delta zrt1$  Mutante. Unter 10  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  im Medium ist das Wachstum der  $Sp\Delta zrt1$  Mutante bereits leicht eingeschränkt. Die Wahl hoher Zinkkonzentrationen wurde durch den Phänotyp der  $\Delta zhf$  Mutante begrenzt. Enthielt das Anzuchtmedium 30  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  oder mehr kam es leichten Wachstumseinbußen der  $\Delta zhf$  Mutante. Da bekannt war, dass einige ZIP-Transporter neben  $\text{Zn}^{2+}$  auch  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  transportieren können, sollte zum anderen auch der Einfluss dieser Metalle auf den zellulären Metallhaushalt der Mutanten getestet werden (Tabelle 3.1). Abschließend sollte mit der Behandlung durch 5  $\mu\text{M}$  EDTA Mangelbedingungen an zweiwertigen Kationen erzeugt werden. Für diesen Versuch wurde Vollmedium (YE5S) ausgewählt (Tabelle 3.1). Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen geerntet und der zelluläre Gehalt von 13 verschiedenen Elementen (Calcium, Cadmium, Cobalt, Kupfer, Eisen, Kalium, Magnesium, Mangan, Molybdän, Nickel, Phosphor, Schwefel und Zink) wurde mittels induktiv gekoppelter Plasmaatomemissionsspektroskopie (ICP-AES) gemessen (Abb. 3.1 und Anhang I).

Unterschiede im Elementprofil der getesteten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp konnten vor allem in der Zinkakkumulation festgestellt werden. Alle untersuchten Stämme wiesen unter Hochzinkbedingungen eine gesteigerte Aufnahme auf. Zellen die entweder eine Mutation im  $zrt1^+$  oder im  $zhf^+$  Gen tragen zeigten einen stark reduzierten Gesamtzinkgehalt. So beträgt unter niedrigen (10  $\mu\text{M}$ ) Zinkkonzentrationen der Zinkgehalt der  $Sp\Delta zrt1$  Mutante nur ca. 13 % und unter hohen Zinkbedingungen (30  $\mu\text{M}$ ) ca. 17 % des Wildtypniveaus (Abb. 3.1A,E). Auch unter den anderen getesteten Wachstumsbedingungen verbleibt der Zinkgehalt der  $\Delta zrt1$  Mutante auf einem ähnlich niedrigem Niveau (Anhang I). Andere Elementgehalte sind von der Mutation im  $zrt1^+$  Gen, mit Ausnahme von Cobalt, nicht oder nur geringfügig beeinflusst. Die Messung der Cobaltkonzentration erfolgte jedoch nahe des Detektionslimits.

### 3. Ergebnisse

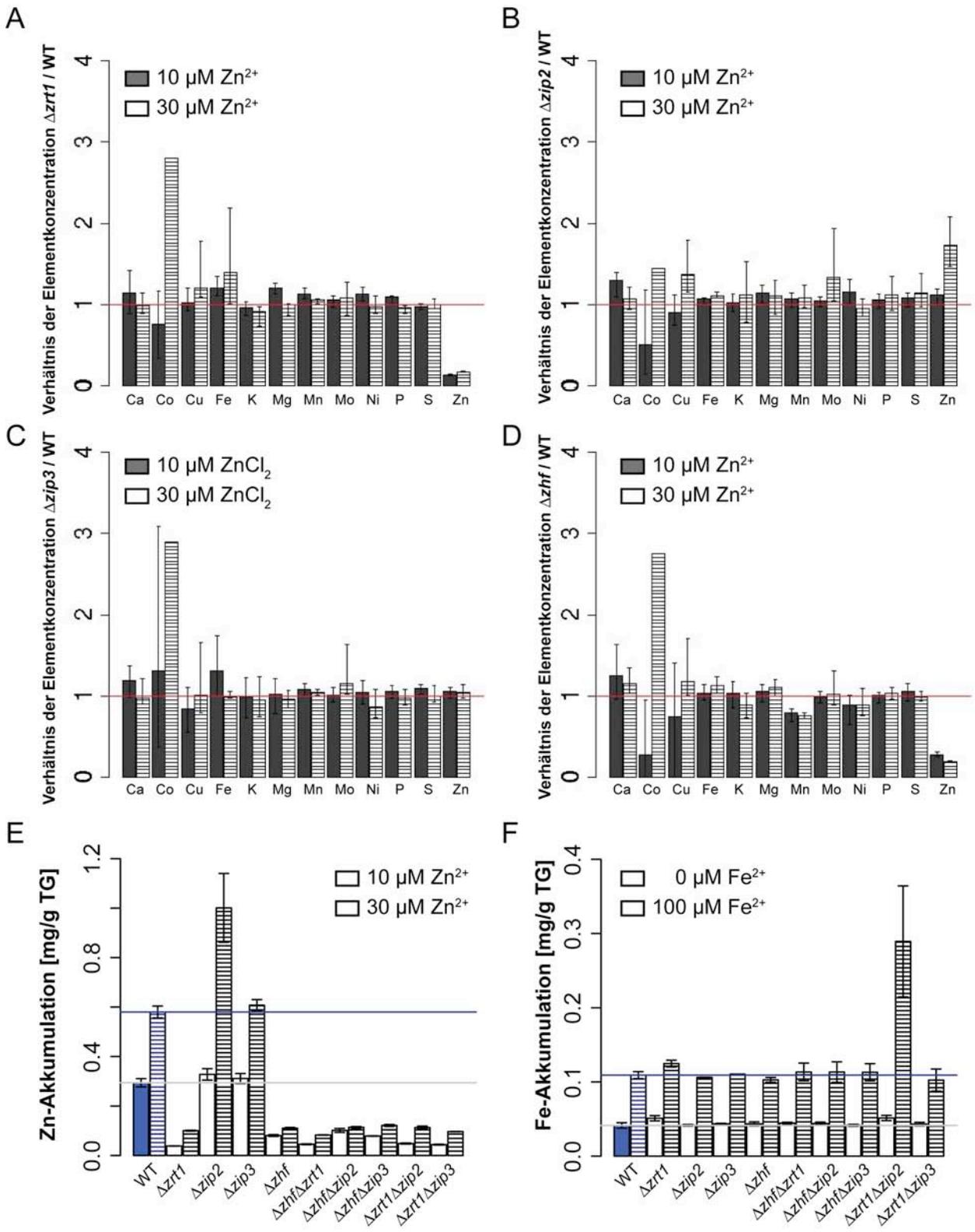
**Tabelle 3.1:** Experimentelle Versuchsanordnung der Elementanalyse. (+) erfolgte Analyse (-) Die Stämme konnten entweder unter den gewählten Bedingungen nicht angezogen werden oder wurden nicht analysiert.

Experimentelle Medium	A EMM-Zn		B EMM-Zn + 1 mM Na- ascorbinsäure, + 20 µM ZnCl <sub>2</sub>		C YE5S		D EMM-Zn, + 20 µM ZnCl <sub>2</sub>		
	Bedingungen	10 µM Zn(II)	30 µM Zn(II)	0 µM FeCl <sub>2</sub>	100 µM FeCl <sub>2</sub>	0 µM EDTA	5 µM EDTA	0 µM CdCl <sub>2</sub>	1 µM CdCl <sub>2</sub>
WT (254)		+	+	+	+	+	+	+	+
$\Delta zrt1$		+	+	+	+	+	-	+	+
$\Delta zip2$		+	+	+	+	+	+	+	+
$\Delta zip3$		+	+	+	+	+	+	+	+
$\Delta zhf$		+	+	+	+	+	+	+	+
$\Delta zrt1\Delta zip2$		+	+	+	+	+	-	+	+
$\Delta zrt1\Delta zip3$		+	+	+	+	+	-	+	+
$\Delta zhf\Delta zrt1$		+	+	+	+	+	-	+	+
$\Delta zhf\Delta zip2$		+	+	+	+	+	+	+	+
$\Delta zhf\Delta zip3$		+	+	+	+	+	+	+	+
$\Delta pcs$		-	-	-	-	-	-	+	+
$\Delta pcs\Delta zrt1$		-	-	-	-	-	-	+	+
$\Delta pcs\Delta zip2$		-	-	-	-	-	-	+	+
$\Delta pcs\Delta zip3$		-	-	-	-	-	-	+	+

Die Mutation von  $zhf^+$  bewirkte ebenfalls eine Reduktion des Gesamtzinkgehalts. In Medium mit 10 µM Zn<sup>2+</sup> ist in der  $\Delta zhf$  Mutante ca. 27 % Zink der Wildtypkonzentration enthalten (Abb. 3.1E, Tabelle 3.2). Bei 30 µM externer Zinkgabe steigt die Zinkkonzentration der Mutante zwar geringfügig an, beträgt aber nur ca. 19 % des Wildtyps (Abb. 3.1D,E). Vergleicht man  $\Delta zrt1$  und  $\Delta zhf$  Mutanten bei niedrigen Zinkkonzentrationen (10 µM), so beträgt der Zinkgehalt der  $\Delta zrt1$  Mutante nur 47,5 % der  $\Delta zhf$  Mutante. Unter hohen Zinkkonzentrationen waren die Zinkgehalte beider Mutanten nahezu ausgeglichen. Die Doppelmutanten mit  $\Delta zrt1$  oder  $\Delta zhf$  zeigen eine ähnlich niedrige Zinkakkumulation (Abb. 3.1E). Eine geringfügige Veränderung im Elementgehalt als Folge der  $\Delta zhf$  Mutation konnte zusätzlich für Mn<sup>2+</sup> erkannt werden (Abb. 3.1D). Die  $\Delta zhf$  Mutante akkumuliert 20 % weniger Mangan als der Wildtyp. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Zhf neben der Zn<sup>2+</sup> auch Mn<sup>2+</sup> zur Speicherung ins ER transportiert. Weitere Elementgehalte waren nicht durch eine Mutation im  $zhf^+$  Gen betroffen (Abb. 3.1, Anhang I).

**Tabelle 3.2:** Vergleichende Analyse der Gesamtzinkkonzentrationen von Wildtyp,  $\Delta zrt1$  und  $\Delta zhf$ .

Stamm	Gesamtzinkgehalt [Mittelwert (mg/g TG) +/- Standardabweichung]		Gesamtzinkgehalt in % zum Wildtyp		Verhältnis des Zinkgehalts WT / Mutante	
	10 µM ZnCl <sub>2</sub>	30 µM ZnCl <sub>2</sub>	10 µM ZnCl <sub>2</sub>	30 µM ZnCl <sub>2</sub>	10 µM ZnCl <sub>2</sub>	30 µM ZnCl <sub>2</sub>
WT	0.294 +/- 0.0167	0.580 +/- 0.0242	100	100	1	1
$\Delta zrt1$	0.038 +/- 0.0004	0.100 +/- 0.0017	13,0	17,3	7,7	5,8
$\Delta zhf$	0.080 +/- 0.0034	0.110 +/- 0.0029	27,4	19,0	3,6	5,2



**Abb. 3.1 ICP-OES-Elementanalyse ausgewählter Mutanten der Metallhomöostase. A-D)** Elementkonzentration der  $\Delta zrt1$ ,  $\Delta zip2$ ,  $\Delta zip3$  und  $\Delta zhf$  Mutanten im Verhältnis zum Wildtyp nach Wachstum in EMM-Zn + 10  $\mu\text{M}$  oder + 30  $\mu\text{M Zn}^{2+}$  für 24 h. Die rote Linie entspricht dem Verhältnis 1. Fehlerbalken repräsentieren die niedrigste und die höchste Differenz der Einzelwerte, (n=3). **E)** Zn-Akkumulation der getesteten Mutanten nach Wachstum in EMM-Zn + 10  $\mu\text{M}$  und + 30  $\mu\text{M Zn}^{2+}$ . **F)** Fe-Akkumulation der getesteten Mutanten in EMM-Zn+20  $\mu\text{M Zn}^{2+}$ +1 mM Na-Ascorbinsäure und 0  $\mu\text{M}$  bzw. 100  $\mu\text{M Fe}^{2+}$ . **E+F)** Die waagerechten Linien zeigen den Mittelwert der Wildtypkonzentration unter niedrigen (grau) und hohen (blau) Zink- bzw. Eisenkonzentrationen. Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Stdabw. (n=3)

Eine weitere Veränderung in der Zinkhomöostase von *S. pombe* Zellen bewirkte der Verlust des *zip2<sup>+</sup>* Gens. Während unter niedrigen Zinkbedingungen (10  $\mu\text{M}$ ) keine Auswirkungen auf den Gesamtzinkgehalt der Mutante im Vergleich zum Wildtyp zu verzeichnen sind, verursachen hohe Zinkkonzentrationen (30  $\mu\text{M}$ ) einen Anstieg der intrazellulären Zinkkonzentration über das Wildtypniveau hinaus. Unter diesen Bedingungen akkumuliert die  $\Delta\text{zip2}$  Mutante das 1,7-fache der Zinkkonzentration im Wildtyp (Abb. 3.1B). Die erhöhte Zinkakkumulation der  $\Delta\text{zip2}$  Mutante im Vergleich zum Wildtyp war auch unter moderater externer Zinkzugabe (20  $\mu\text{M}$ ) nicht zu beobachten (Anhang I), und war also charakteristisch für hohe Zinkkonzentrationen über 30  $\mu\text{M}$ . Durch die Mutation in *zip2<sup>+</sup>* werden andere intrazelluläre Elementkonzentrationen, mit Ausnahme von Cobalt nicht beeinflusst (Abb. 3.1B,E).

Eine Mutation im *zip3<sup>+</sup>* Gen hatte unter den getesteten Bedingungen keinen signifikanten Einfluss auf das Elementprofil der Zelle (Abb. 3.1C).

Neben einer Veränderung im zellulären Zinkgehalt wiesen zwei Mutanten auch eine erhöhte Eisenakkumulation auf. Unter moderaten Zinkbedingungen (20  $\mu\text{M}$ ) und hohen Eisenkonzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ) zeigte die  $\Delta\text{zrt1}$  Mutante eine leicht erhöhte und die  $\Delta\text{zrt1}\Delta\text{zip2}$  Doppelmutante eine um das 2,6-fache erhöhte Eisenakkumulation im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.1F). In den anderen getesteten Mutanten blieb der Eisengehalt im Vergleich zum Wildtyp konstant (Abb. 3.1F).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass  $\Delta\text{zrt1}$ ,  $\Delta\text{zhf}$  und  $\Delta\text{zip2}$  einen sehr spezifischen Einfluss auf die Zinkhomöostase zeigen, während andere intrazelluläre Elementkonzentrationen überwiegend unbeeinflusst bleiben. Bei gleichzeitiger Mutation von *zrt1<sup>+</sup>* und *zip2<sup>+</sup>* kommt es zu einer drastischen Erhöhung der intrazellulären Eisenkonzentration.

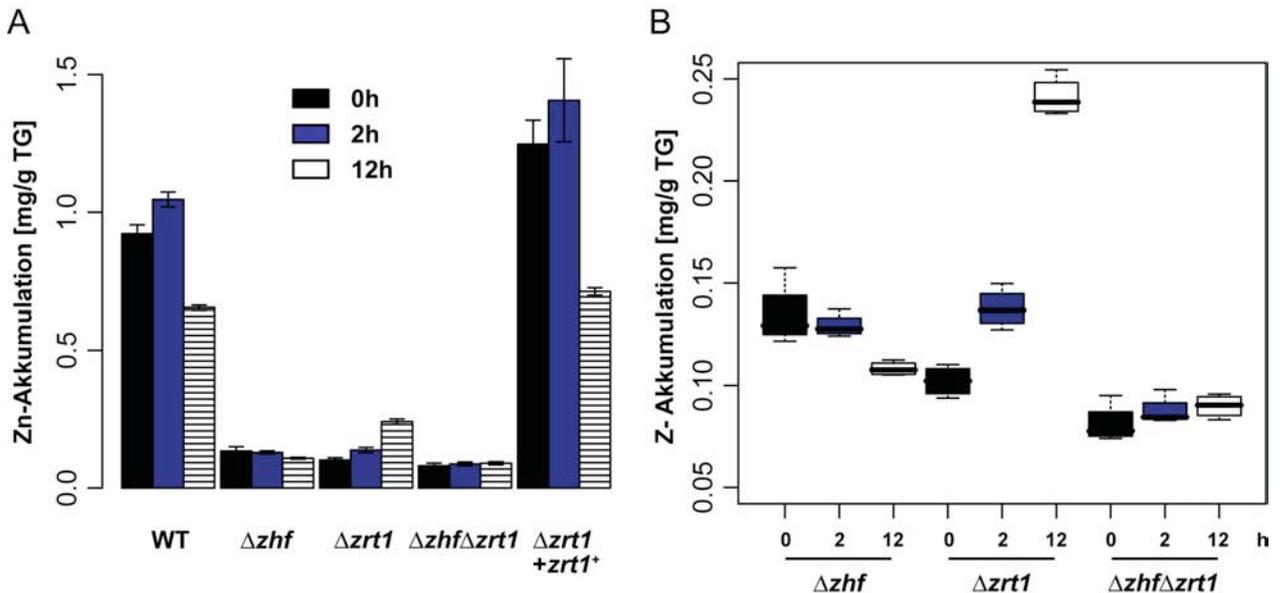
## 3.2 Charakterisierung des SpZrt1 Zinktransporters aus *S. pombe*

Die Elementanalyse der  $\Delta\text{zrt1}$  Mutante zeigte eine spezifische Reduktion des Gesamtzinkgehalts der Zelle. In weiteren Atomabsorptionsspektroskopie- (AAS) und ICP-Analysen sollte nun der Einfluss von SpZrt1 auf den Zinkgehalt der Zelle genauer untersucht werden.

### 3.2.1 Additiver Effekt der $\Delta\text{zrt1}$ und $\Delta\text{zhf}$ Mutationen

In der ICP-Analyse konnte gezeigt werden, dass sowohl die Deletion des *zrt1<sup>+</sup>* als auch die des *zhf<sup>+</sup>* Gens zu einer Reduktion der Zn-Akkumulation in der Zelle führen. In der  $\Delta\text{zhf}$  Mutante wird das Abfallen der internen Zinkkonzentration auf eine verminderte Speicherfähigkeit der Zelle im ER zurückgeführt (Borrelly *et al.* 2002; Clemens *et al.* 2002). Während SpZrt1 für das Wachstum unter niedrigen Zinkkonzentrationen benötigt wird, ermöglicht Zhf das Wachstum unter hohen Zinkkonzentrationen (Bährecke 2004). Die unterschiedlichen Wachstumsphänotypen beider Mutanten legt die Vermutung nahe, dass es sich um unterschiedliche Mechanismen handelt, die die Reduktion

des internen Zinkgehalts verursachen. Durch eine unabhängige Elementanalyse mittels AAS sollte der Zinkgehalt von Wildtyp,  $\Delta zhf$ ,  $\Delta zrt1$ , der  $\Delta zhf\Delta zrt1$  Doppelmutante und  $\Delta zrt1$  mit plasmidcodiertem  $zrt1^+$  Gen ( $\Delta zrt1+zrt1^+$ ) bestimmt werden.



**Abb. 3.2 Die Deletion in  $\Delta zrt1$  führt zur Reduktion des Zinkgehalts in  $\Delta zhf$ .** *S. pombe* WT,  $\Delta zhf$ ,  $\Delta zrt1$ ,  $\Delta zhf\Delta zrt1$  Mutanten und  $\Delta zrt1+zrt1^+$  wurden in niedrigen Zinkkonzentrationen (EMM + 5  $\mu\text{M Zn}^{2+}$ ) angezogen und zu Beginn des Experiments in EMM + 20  $\mu\text{M Zn}^{2+}$  überführt. Die Kulturen wurden nach 0 h (schwarzer Balken), 2 h (blauer Balken) und 12 h (gestreifter Balken) geerntet und gewaschen. **A)** Messungen des Gesamtzinkgehalts der Zellen durch AAS. Die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Stdabw., (n=4). **B)** Verteilung der einzelnen Datenpunkte mittels Boxplot. Als statistische Analyse wurde ein T-Test durchgeführt, die Ergebnisse werden in Tabelle 3.3 dargestellt.

**Tabelle 3.3: Statistischer Vergleich der Ergebnisse der AAS-Analyse.** Verglichen wurden die Zinkgehalte der Stämme  $\Delta zhf$  mit  $\Delta zhf\Delta zrt1$  und der Stämme  $\Delta zrt1$  mit  $\Delta zhf\Delta zrt1$  mittels T-Test unter der Bedingung  $\alpha = 0,05$ , (n=4). Statistisch signifikante Werte wurden mit \* gekennzeichnet.

Vergleich mittels t-Test	p-Wert, Konfidenzintervall
$\Delta zhf - \Delta zhf\Delta zrt1$ 0 h	0,02597, $\alpha = 0,05$ *
$\Delta zhf - \Delta zhf\Delta zrt1$ 2 h	0,02857, $\alpha = 0,05$ *
$\Delta zhf - \Delta zhf\Delta zrt1$ 12 h	0,02857, $\alpha = 0,05$ *
$\Delta zrt1 - \Delta zhf\Delta zrt1$ 0 h	0,05714, $\alpha = 0,05$
$\Delta zrt1 - \Delta zhf\Delta zrt1$ 2 h	0,02857, $\alpha = 0,05$ *
$\Delta zrt1 - \Delta zhf\Delta zrt1$ 12 h	0,02857, $\alpha = 0,05$ *

Die Zellen wurden auf Medium mit niedrigem Zinkgehalt (5  $\mu\text{M}$ ) angezogen und zu Beginn des Experiments in Medium mit moderater Zinkkonzentration (20  $\mu\text{M}$ ) überführt. Zu drei verschiedenen Zeitpunkten (0, 2 h, 12 h) wurden Proben entnommen, gewaschen und für die AAS-Analyse aufgearbeitet. Zum Zeitpunkt 0 h beträgt der Zinkgehalt des Wildtyps durchschnittlich 0.922 mg/g Trockengewicht (Abb. 2.2A). Der prozentuale Anteil der Zinkakkumulation der  $\Delta zhf$  Mutante im Vergleich zum Wildtyp ist 14,6 %, der der  $\Delta zrt1$  Mutante 11,1 %. Die interne Zinkkonzentration der Doppelmutante beträgt nur 8,8 % des Wildtyps. Der Boxplot und die anschließende statistische Analyse zeigen, dass sich die Zinkgehalte von  $\Delta zhf$  und der Doppelmutante  $\Delta zhf\Delta zrt1$  signifikant

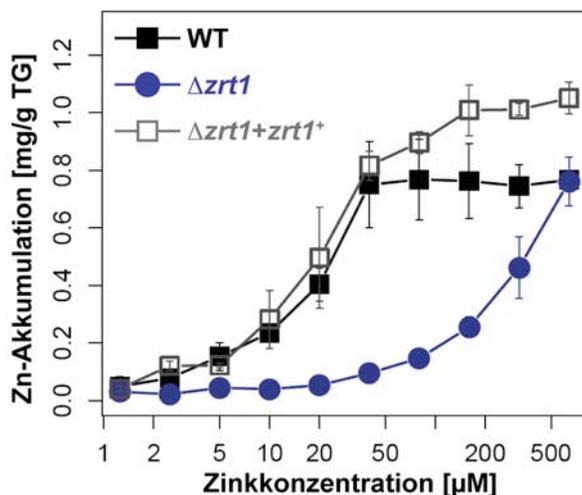
unterscheiden, während die Abweichungen in der Zinkakkumulation der Stämme  $\Delta zrt1$  und  $\Delta zhf\Delta zrt1$  zum Zeitpunkt 0 h nicht signifikant sind (Abb. 3.2B, Tabelle 3.3). Nach zweistündiger Inkubation der Zellen in 20  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  hatte sich der Durchschnittswert der Zinkkonzentration in der  $\Delta zhf$  Mutante und in der  $\Delta zhf\Delta zrt1$  Doppelmutante nicht signifikant verändert. Im Gegensatz dazu stieg die Zinkakkumulation des Wildtyps um 21,9 % und die der  $\Delta zrt1$  Mutante um 25,8 % im Vergleich zum 0 h Wert an. Nach 12 h Inkubation sanken die Zinkkonzentrationen in Wildtyp und  $\Delta zhf$ , während in der Doppelmutante die Zinkkonzentration weiterhin konstant blieb. In der  $\Delta zrt1$  Mutante kam es jedoch zu einer weiteren Zunahme der internen Zinkkonzentration auf das 2,4-fache der Ausgangskonzentration. Nach 2 h und 12 h war die Zinkkonzentration in der Doppelmutante  $\Delta zhf\Delta zrt1$  im Vergleich zu den beiden Einzelmutanten  $\Delta zhf$  und  $\Delta zrt1$  signifikant reduziert. Der niedrige interne Zinkgehalt in  $\Delta zrt1$  konnte durch die Expression von plasmidcodiertem *SpZrt1* unter Kontrolle des *nmt*-Promotors vollständig komplementiert werden. Dem Medium wurde 1  $\mu\text{M}$  Thiamin zugeführt, um den starken *nmt*-Promotor teilweise zu reprimieren. Die im Vergleich zum Wildtyp höheren Zinkgehalte in  $\Delta zrt1+zrt1^+$  werden auf die erhöhte Aktivität ausgehend vom *nmt*-Promotor zurückgeführt (Abb. 3.2A).

Diese Experimente zeigen, dass die  $\Delta zrt1$  Mutante weiterhin der Lage ist auf geringem Niveau Zink zu akkumulieren. Zellen, die eine Mutation im *zhf*<sup>+</sup> Gen tragen akkumulieren im Gegensatz dazu kein weiteres Zink. Die Doppelmutante weist gegenüber den Einzelmutanten eine geringere Zinkakkumulation auf.

#### 3.2.2 *SpZrt1* ist für den Anstieg des Zinkgehalts unter niedrigen Zinkkonzentrationen verantwortlich

In den AAS-Analysen konnte in der  $\Delta zrt1$  Mutante, ein Anstieg der Zinkkonzentration nach 12 h Inkubation in einer moderaten Zinkkonzentration beobachtet werden (Abb. 3.2). Um den Wirkungsbereich von *SpZrt1* einzugrenzen, wurde der intrazelluläre Zinklevel in Abhängigkeit der extrazellulären Zinkkonzentrationen in den Stämmen Wildtyp,  $\Delta zrt1$  und  $\Delta zrt1+zrt1^+$  verglichen. Die Zellen wurden dazu auf EMM-Zn mit Konzentrationen zwischen 1,25  $\mu\text{M}$  und 640  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  für 24 h angezogen. Nach der Ernte wurden der Gesamtzinkgehalt der Zellen mittels ICP-OES Analyse bestimmt (Abb. 3.3). Bei einem Zinkangebot zwischen 1,25  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  steigt im Wildtyp und in  $\Delta zrt1+zrt1^+$  Zellen also unter Anwesenheit von *SpZrt1*, der interne Gesamtzinkgehalt konzentrationsabhängig an. Steigt die externe Zinkkonzentration über 40  $\mu\text{M}$  erreicht der Zinkgehalt im Wildtyp und  $\Delta zrt1+zrt1^+$  ein Plateau mit einer durchschnittlichen Zinkkonzentration von 0,8 mg/g Trockengewicht. Hier sind die Zellen mit Zink gesättigt. Im Stamm  $\Delta zrt1$  dagegen sind zwischen einem Zinkangebot von 1,25  $\mu\text{M}$  bis 20  $\mu\text{M}$  keine grundlegenden Veränderungen am Gesamtzinkgehalt der Zelle zu verzeichnen. Der interne Zinkgehalt stagniert auf einer Konzentration von 0,044 mg/g Trockengewicht. Der größte Unterschied zwischen Wildtyp oder  $\Delta zrt1+zrt1^+$  und

$\Delta zrt1$  Mutante wurde bei einer Zinkkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  im Medium beobachtet. Der Zinkgehalt von  $\Delta zrt1$  beträgt nur noch 12 % im Vergleich zu den Stämmen die ein  $zrt1^+$  Gen tragen. Ab einer Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  Zink im Medium steigt aber auch die interne Zinkkonzentration von  $\Delta zrt1$  stetig an und erreicht bei 640  $\mu\text{M}$  den Zinkgehalt des Wildtyps. Wahrscheinlich würde die Zinkkonzentration von  $\Delta zrt1$  gemäß dem Wildtyp in einem Plateau münden, jedoch sind Zinkkonzentrationen über 1 mM im Minimalmedium nicht mehr löslich und wurden nicht untersucht. Die Zinkkonzentration des Stamms  $\Delta zrt1+zrt1^+$  erreichte in Medium mit Konzentrationen über 80  $\mu\text{M}$  eine Gesamtzinkkonzentration von bis zu 1 mg/g Trockengewicht und enthält somit rund 30 % mehr Zink als der Wildtyp (Abb. 3.3). Die Überakkumulation kann durch die konstitutive Expression des  $zrt1^+$  Gens unter Einfluss des *nmt*-Promotors begründet werden und wurde auch schon in Abb. 3.2 beobachtet (Abb. 3.2A).



**Abb. 3.3 SpZrt1 ist essentiell für die Akkumulation von  $\text{Zn}^{2+}$  unter niedrigen Zinkkonzentrationen.** WT,  $\Delta zrt1$  und  $\Delta zrt1$  mit plasmidexprimierten  $zrt1^+$  wurden auf Zinkkonzentrationen zwischen 1,25  $\mu\text{M}$  und 640  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  für 24 h angezogen. Nach dem Waschen wurden die Zellen gefriergetrocknet und der Gesamtzinkgehalt mittels ICP-OES bestimmt. Die x-Achse wurde logarithmisch aufgetragen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Stdabw., (n=3).

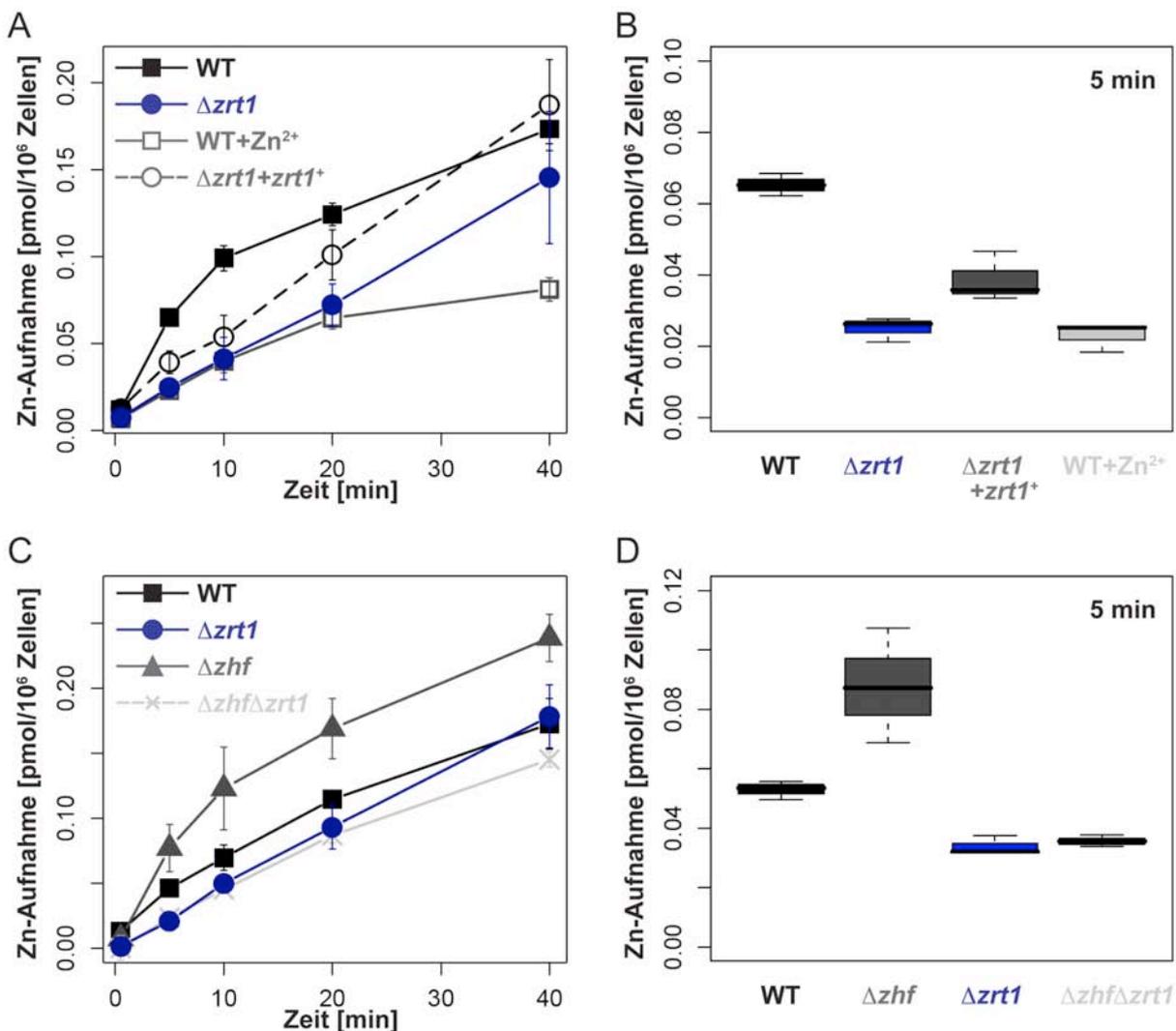
Die Untersuchung zeigte, dass sich im Wildtyp die externe und die interne Zinkkonzentration bis 20  $\mu\text{M}$  annähernd proportional verhalten. In Zellen die kein intaktes  $zrt1^+$  Gen besitzen erfolgt die Zinkakkumulation erst ab Konzentrationen über 20  $\mu\text{M}$ . Die Ergebnisse bestätigen, dass SpZrt1 einen starken Einfluss auf den Gesamtzinkgehalt der Zelle ausübt. Die Zinkakkumulation wird ab 20  $\mu\text{M}$  vermutlich von einem weiteren Faktor der Zinkhomöostase übernommen und erreicht erst ab 640  $\mu\text{M}$  Wildtypniveau.

#### 3.2.3 SpZrt1 ist für den Zinkaufnahmetransport in *S. pombe* verantwortlich

Aufgrund der Analyse der  $\Delta zhf$  Mutante war bekannt, dass niedrige zelluläre Zinkgehalte nicht unmittelbar auf den Defekt eines Aufnahmetransporters zurückzuführen sind, sondern dass auch der intrazelluläre Transport den Gesamtmetallgehalt der Zelle beeinflusst (Borrelly *et al.* 2002; Clemens *et al.* 2002). Ob SpZrt1 direkt am Aufnahmetransport beteiligt ist oder den Zinkgehalt der Zelle durch

### 3. Ergebnisse

den Transport über eine Kompartimentmembran unabhängig von Zhf beeinflusst, sollten die folgenden Kurzzeitaufnahmeexperimente klären. Zunächst wurden Wildtyp-,  $\Delta zrt1$ -, und  $\Delta zrt1+zrt1^+$  Zellen über Nacht in einer Zinkkonzentration von  $5 \mu\text{M}$  angezogen. Wie auch schon in den vorangegangenen AAS-Langzeitaufnahmeexperimenten entspricht dies der Zinkkonzentration die ein ausreichendes Wachstum der  $\Delta zrt1$  Mutante gewährleistet. Die Zellen wurden anschließend in Zinkmangelmedium (EMM-Zn) überimpft und für weitere 4h inkubiert, um auch in Wildtypzellen Zinkmangel hervorzurufen.

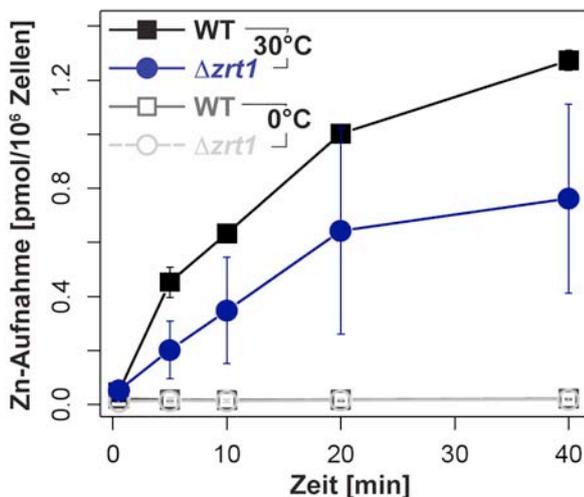


**Abb. 3.4 SpZrt1 wird für die Zinkaufnahme benötigt.** **A)** Zeitabhängige  $^{65}\text{Zn}$ -Akkumulation des Wildtyps (schwarzes Quadrat), der  $\Delta zrt1$  Mutante (blauer Kreis) und  $\Delta zrt1$  mit plasmidexprimiertem  $zrt1^+$  (grauer Kreis). Die Zellen wurden in Zinkmangelmedium angezogen. Vergleichend wird die  $^{65}\text{Zn}$ -Akkumulation von Wildtypzellen, die in Medium mittlerer Zinkkonzentration ( $20 \mu\text{M}$ ) kultiviert wurden (graues Quadrat) gezeigt. Die Aufnahmeexperimente erfolgten mit  $10 \mu\text{M}$   $^{65}\text{Zn}$  in Aufnahmebuffer über einen Zeitraum von 40 min, bei  $30^\circ\text{C}$ . Die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Stdabw., ( $n=3$ ). **B)** Zeitabhängige  $^{65}\text{Zn}$ -Akkumulation aus Abbildung A. Verteilung der einzelnen Datenpunkte nach 5 min mittels Boxplot. **C)** Zeitabhängige  $^{65}\text{Zn}$ -Akkumulation des Wildtyps (schwarzes Quadrat), der  $\Delta zrt1$  Mutante (blauer Kreis) der  $\Delta zhf$  Mutante (graues Dreieck) und der  $\Delta zhf\Delta zrt1$  Doppelmutante. Alle Stämme wurden in moderater Zinkkonzentration ( $20 \mu\text{M}$ ) angezogen und vor dem Experiment für 4 h in Zinkmangelmedium inkubiert. Die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Stdabw., ( $n=3$ ). **D)** Zeitabhängige  $^{65}\text{Zn}$ -Akkumulation aus Abbildung C. Verteilung der einzelnen Datenpunkte nach 5 min mittels Boxplot.

Als Kontrolle für den zinkabhängigen Transport wurden Wildtypzellen mitgeführt die während der gesamten Anzucht unter 20  $\mu\text{M}$  Zink wuchsen und deshalb keinen Zinkmangel aufwiesen.

Die Aufnahmeversuche wurden in Aufnahmebuffer ohne zusätzliche Metallionen durchgeführt und mit der Zugabe von 10  $\mu\text{M}$   $^{65}\text{Zn}$  gestartet. Diese Konzentration wurde aufgrund der vorangegangenen Wachstumsassays und AAS-Analysen als Bereich bestimmt, in dem SpZrt1 aktiv ist (Abb. 3.3)(Bährecke 2004). Nach 5 min Inkubation bei 30 °C mit 10  $\mu\text{M}$  radioaktiv markiertem  $^{65}\text{Zn}$  wurden vom Wildtyp ca. 0,065 pmol/  $10^6$  Zellen Zink aufgenommen und der Zinkgehalt stieg auf 0,17 pmol/ $10^6$  Zellen nach 40 min an (Abb.3.4A,B). Bei der Zinkaufnahme in *S. pombe* handelt es sich also um einen aktiven Prozess. Wildtypzellen, die bis zum Beginn des Experiments unter moderater Zinkkonzentration (20  $\mu\text{M}$ ) angezogen wurden, erreichten nach 5 min nur ca. 35 % der Zinkaufnahme von Wildtypzellen unter Mangelbedingungen. Somit erfolgte eine erhöhte Zinkaufnahme im Wildtyp nur unter Zinkmangel. Die ebenfalls unter Zinkmangel kultivierten Zellen, die eine Mutation im *zrt1*<sup>+</sup> Gen tragen erreichen nach 5 min Zinkaufnahme ca. 38 % des Wildtypgehalts unter gleichen Bedingungen. Der Verlust von Zrt1 schränkt die Zinkaufnahme ein. Die Expression von *zrt1*<sup>+</sup>, unter der Kontrolle des *nmt*-Promotors, führte dagegen zur teilweisen Komplementation des  $\Delta\text{zrt1}$  Phänotyps. Diese Zellen konnten ca. 60 % der Wildtypakkumulation 5 min nach dem Start des Experiments erreichen. Nach 40 min Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$   $^{65}\text{Zn}$  erreicht auch die  $\Delta\text{zrt1}$  Mutante ein Zinkniveau von 84 % der Wildtypzellen, die unter Zinkmangel angezogen wurden. Der zinkgesättigte Wildtyp hingegen behält den niedrigen Zinklevel von ca. 47 % bei (Abb. 3.4A,B). Darüber hinaus wurde der Zinktransport in der Zinkaufnahmemutante  $\Delta\text{zrt1}$  und der Zinkspeichermutante  $\Delta\text{zhf}$  verglichen. Als Kontrollen wurden der Wildtyp und die Doppelmutante  $\Delta\text{zhf}\Delta\text{zrt1}$  mitgeführt. Im Gegensatz zum vorangegangenen Experiment wurden alle Stämme unter moderaten Zinkkonzentrationen (20  $\mu\text{M}$ ) angezogen, anschließend in Zinkmangelmedium überführt und für 4 h inkubiert. Unter den gegebenen Anzuchtbedingungen konnten Zellen mit funktionalem Zhf ausreichend Zink im ER speichern und zeigten im Experiment keinen Zinkmangel. So konnte in der Aufnahmemutante  $\Delta\text{zrt1}$  nach 5 min Inkubation mit  $^{65}\text{Zn}$  nur ca. 53 % der Zinkkonzentration im Wildtyp detektiert werden (Abb. 3.4C,D). Zum gleichen Zeitpunkt weist die Speichermutante  $\Delta\text{zhf}$  aber eine im Vergleich zum Wildtyp um das 1,9-fach und im Vergleich zur  $\Delta\text{zrt1}$  Mutante eine um das 2,6-fach höhere Zinkakkumulation auf. Da bereits eine bedarfsabhängige Zinkaufnahme in *S. pombe* festgestellt werden konnte (Abb. 3.4A), kann man davon ausgehen, dass der Verlust des *zhf*<sup>+</sup> Gens und der damit einhergehende Verlust der Speicherfähigkeit zu einem erhöhten Zinkbedarf und somit zur erhöhten Zinkaufnahme führt. Die erhöhte Zinkakkumulation der  $\Delta\text{zhf}$  Mutante in Kurzeitenaufnahmeexperimenten ist SpZrt1 abhängig, da die  $\Delta\text{zhf}\Delta\text{zrt1}$  Doppelmutante nach 5 min vergleichbar geringe Mengen Zink aufnimmt wie die  $\Delta\text{zrt1}$  Mutante (Abb. 3.4C,D). Die Unterschiede zwischen  $\Delta\text{zhf}$  und den anderen untersuchten Stämmen setzen sich über die getestete Zeitspanne von 40 min fort. Weiterhin wurde überprüft, ob es sich bei der SpZrt1 abhängigen Zinkaufnahme um einen aktiven Prozess handelt, oder ob eine Veränderung der Zinkbindekapazität durch die Mutation im *zrt1*<sup>+</sup> Gen vorliegt. Dazu wurden der

Wildtyp und die  $\Delta zrt1$  Mutante unter  $5 \mu\text{M ZnCl}_2$  angezogen und anschließend für 4 h unter Zinkmangelbedingungen inkubiert. Während des Aufnahmeexperiments wurden ein Teil der Kulturen bei  $30^\circ\text{C}$  geschüttelt. Der andere Teil der Stämme wurde im Eisbad inkubiert. Eine Zinkaufnahme von Wildtyp und  $\Delta zrt1$  unter  $0^\circ\text{C}$  konnte nicht beobachtet werden (Abb. 3.5), was auf einen temperaturabhängigen und somit proteinvermittelten Zinktransport hindeutet. Die Ergebnisse zeigen eine direkte Beteiligung von SpZrt1 am Zinkaufnahmetransport.



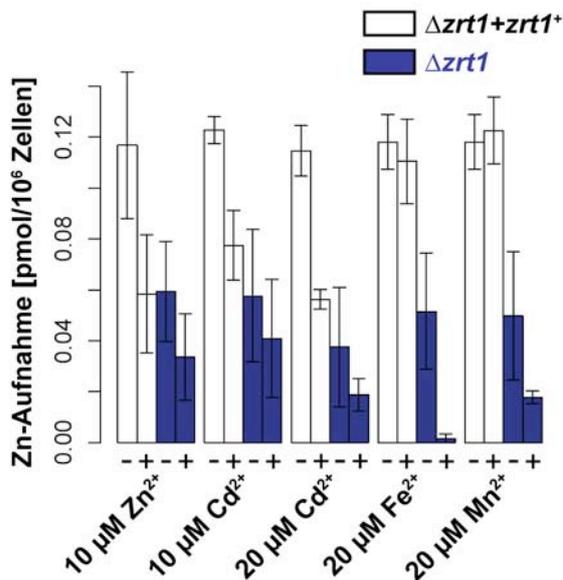
**Abb. 3.5 Temperaturabhängige <sup>65</sup>Zn -Akkumulation.** Wildtyp und  $\Delta zrt1$  Mutante wurden in Medium mit niedrigem Zinkgehalt angezogen und anschließend in Zinkmangelmedium für 4 h inkubiert. Das Aufnahmeexperiment erfolgte in Aufnahmebuffer +  $10 \mu\text{M } ^{65}\text{Zn}$  über einen Zeitraum von 40 min. Wildtypzellen wurden dazu bei  $30^\circ\text{C}$  (schwarzes Quadrat) und  $0^\circ\text{C}$  (graues Quadrat) inkubiert. Die  $\Delta zrt1$  Mutante wurde ebenfalls bei  $30^\circ\text{C}$  (blauer Kreis) und  $0^\circ\text{C}$  (grauer Kreis) getestet. Die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Stdabw., (n=3).

Die Experimente zeigen das SpZrt1 verantwortlich für die Zinkaufnahme in *S. pombe* ist. Dennoch ist die  $\Delta zrt1$  Mutante weiterhin in der Lage Zink auf geringem Niveau aufzunehmen. Die SpZrt1 abhängige Zinkaufnahme ist konzentrations-, zeit- und temperaturabhängig.

#### 3.2.4 Die SpZrt1 abhängige Zinkaufnahme wird durch Cadmium inhibiert

In einem weiteren Aufnahmeversuch sollte unter Anwesenheit anderer Kationen getestet werden, in welchem Umfang sich die Zinkaufnahmeaktivität von SpZrt1 beeinflussen lässt, beziehungsweise wie hoch die Spezifität von SpZrt1 für  $\text{Zn}^{2+}$  ist. Die Stämme  $\Delta zrt1$  und  $\Delta zrt1+zrt1^+$  wurden jeweils unter  $5 \mu\text{M ZnCl}_2$  angezogen und anschließend für 4 h Zinkmangelbedingungen (EMM-Zn) inkubiert. Die Zinkaufnahme von  $10 \mu\text{M } ^{65}\text{Zn}$  wurde unter Anwesenheit nichtradioaktiver Kationenkonzentrationen über 5 min verfolgt (Abb. 3.6). Unter diesen Bedingungen betrug die Zinkakkumulation von  $\Delta zrt1+zrt1^+$  in 5 min bei  $30^\circ\text{C}$   $0,118 \pm 0,003 \text{ pmol}/10^6 \text{ Zellen}$ . In  $\Delta zrt1$  Zellen war die Aufnahme um ca. 56 % auf  $0,051 \pm 0,009$  reduziert. Wurden die Stämme mit einer äquimolaren Konzentration an  $\text{Zn}^{2+}$  behandelt reduzierte sich die Zinkaufnahme erwartungsgemäß sowohl in  $\Delta zrt1$  als auch in  $\Delta zrt1+zrt1^+$  um ca. die Hälfte. Unter der Anwesenheit einer äquimolaren  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration wurde die Zinkakkumulation um 37 % in  $\Delta zrt1+zrt1^+$  und um 29 % in Spzrt1 gehemmt. Die  $\Delta zrt1$  Mutante zeigte dabei aber eine große Standardabweichung. Durch die doppelte

Cadmiumkonzentration im Aufnahmeassay konnte die Zinkinflux in  $\Delta zrt1+zrt1^+$  und  $\Delta zrt1$  um die Hälfte reduziert werden. Durch  $20 \mu\text{M Fe}^{2+}$  beziehungsweise  $\text{Mn}^{2+}$  im Aufnahmebuffer wurde die Zinkaufnahme in  $\Delta zrt1+zrt1^+$  nicht beeinträchtigt. Interessanterweise war die Zinkakkumulation der  $\Delta zrt1$  Mutante in Anwesenheit von  $20 \mu\text{M Fe}^{2+}$  um 97 % verringert. Es konnte ebenfalls eine Konkurrenz der Zinkakkumulation in der Aufnahmemutante SpZrt1 durch  $20 \mu\text{M Mn}^{2+}$  beobachtet werden. Es kam zu einer Reduktion der Zinkakkumulation um 64,2 % (Abb. 3.6).



**Abb. 3.6 Konkurrenz der  $^{65}\text{Zn}$ -Aufnahme durch verschiedene Metallkationen.** Die Stämme  $\Delta zrt1$  (blau) und  $\Delta zrt1$  komplementiert durch plasmidcodiertes  $zrt1^+$  (weiß) wurden in EMM +  $5 \mu\text{M Zn}^{2+}$  vorkultiviert und anschließend für 4 h in Zinkmangelmedium inkubiert. Die Aufnahme von  $^{65}\text{Zn}$  wurde nach 5 min bei  $30^\circ\text{C}$  in Aufnahmebuffer gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Stdabw., ( $n=3$ ).

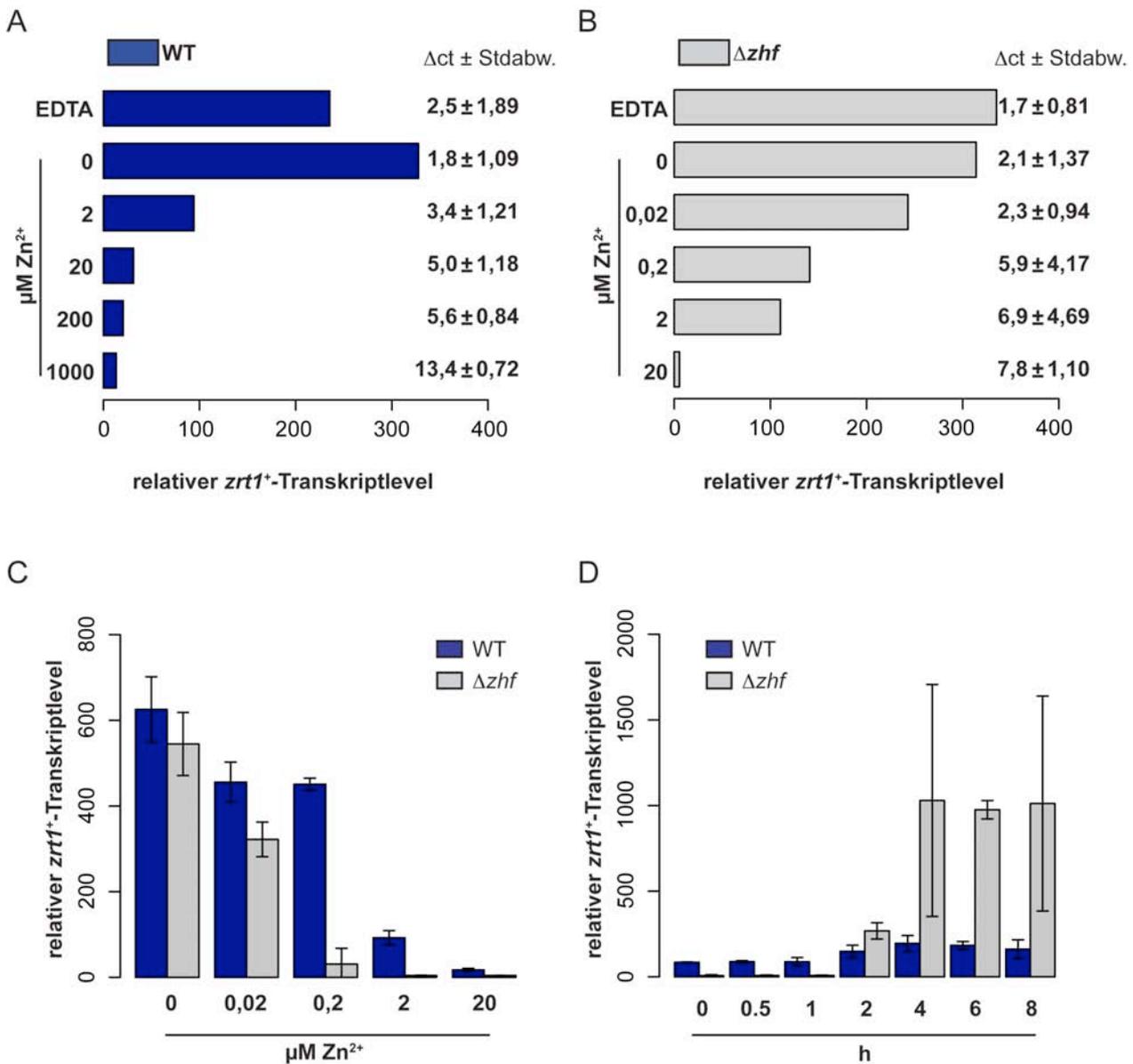
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Zinkaufnahme des SpZrt1 Transporters durch  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  nicht aber durch  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  inhibiert wird. Der SpZrt1 unabhängige Zinktransport hingegen wird in hohem Maße durch  $\text{Fe}^{2+}$ , aber auch durch  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  beeinflusst.

### 3.2.5 Transkriptionelle Regulation des Zinkaufnahmetransporters SpZrt1

Zahlreiche Studien konnten bereits zeigen, dass die Expression von Metallaufnahmetransportern der ZIP-Familie von der Verfügbarkeit ihrer Substrate abhängt (Zhao and Eide 1996a; Zhao and Eide 1996b; Connolly *et al.* 2002; Dufner-Beattie *et al.* 2003a). Die vorangegangenen Lang- und Kurzaufnahmeexperimente wiesen SpZrt1 eine Rolle im Zinkaufnahmetransport zu, die abhängig von der Zinkkonzentration im Medium war (Abb. 3.3, Abb. 3.4A,B, Abb. 3.6). Die Aufnahmeexperimente zeigten auch eine bedarfsabhängige Zinkakkumulation des Wildtyps, die auf eine Regulation des Zinkaufnahmetransports hinweist. Unabhängig davon konnte in Mikro- und Makroarray Experimenten eine metallabhängige Transkriptakkumulation von  $zrt1^+$  gezeigt werden (Chen *et al.* 2003; Simm 2004). In den nun folgenden quantitativen Transkriptanalysen sollte untersucht werden, ob  $zrt1^+$  zinkabhängig und somit in Abhängigkeit des Substrats exprimiert wird. Wildtypzellen wurden dazu über Nacht in EMM Medium mit niedriger Zinkkonzentration ( $1,39 \mu\text{M}$ ) angezogen und anschließend für 2 h in EMM-Zn Medium mit den

### 3. Ergebnisse

angegebenen Zinkkonzentrationen überführt (Abb. 3.7). Dann wurde die relative mRNA-Konzentration von *zrt1*<sup>+</sup> mittels quantitativer *real time* PCR bestimmt. Als Kontrolle wurde das konstitutiv exprimiert *S. pombe* Actingen *act1*<sup>+</sup> verwendet (Labbé *et al.* 1999). Wurde den Zellen im zinkarmen Medium kein zusätzliches Zink zugeführt kam es zur *zrt1*<sup>+</sup> Transkriptakkumulation (Abb. 3.7A).



**Abb. 3.7 Das Zinkangebot beeinflusst die *zrt1*<sup>+</sup> Transkriptabundanz zeit- und konzentrationsabhängig.** Das *zrt1*<sup>+</sup> Transkript wurde mittels *real time* PCR quantifiziert und ins Verhältnis zum konstitutiv exprimierten *act1*<sup>+</sup> Gentranskript gesetzt. A), B), C) Wildtyp und Δ*zhf* Mutante wurden unter niedrigen Zinkkonzentrationen (EMM incl. 1,39 μM Zn<sup>2+</sup>) angezogen und anschließend in Medium mit unterschiedlichen Zinkkonzentrationen überimpft. Die Probennahme erfolgte nach 2 h. D) Wildtyp und Δ*zhf* Mutante wurden unter moderaten Zinkkonzentrationen (EMM+20 μM) kultiviert und anschließend in Zinkmangelmedium (EMM-Zn) überführt. Die Probennahme erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert ± Stdabw. (n=3).

Mit zunehmender Zinkkonzentration nahm die Menge des *zrt1*<sup>+</sup> Transkripts im Vergleich zur *act1*<sup>+</sup> Kontrolle ab. Bei einer Konzentration von 1000 μM Zn<sup>2+</sup> im Medium beträgt der relative Transkriptlevel nur noch ca. 4 % des Ausgangswertes (0 μM). Die deutlichste Transkriptreduktion ist zwischen 0 und 2 μM Zink zu beobachten. Hier kommt es zu einer Abnahme von rund 70 %. Die *zrt1*<sup>+</sup> mRNA

akkumuliert also unter Zinkmangelbedingungen, während sie unter Zinksättigung ihr niedrigstes Niveau erreicht (Abb. 3.7A).

Langzeit Akkumulationsstudien in  $\Delta zhf$  und  $\Delta zrt1$  Mutanten zeigen in beiden Stämmen ein deutlich reduziertes Zinkniveau im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.2). Aufgrund der Rolle von Zhf in der Zinkspeicherung und -detoxifizierung, sollte geklärt werden, ob die  $zrt1^+$  Transkriptmenge auch im Hintergrund einer  $\Delta zhf$  Mutation in Abhängigkeit zur Zinkkonzentration steht. Der  $\Delta zhf$  Stamm wurde dazu unter oben genannten Bedingungen angezogen und der  $zrt1^+$  Transkriptlevel untersucht (Abb. 3.7B). Auch hier konnte gezeigt werden, dass es zu einer Akkumulation des  $zrt1^+$  Transkriptes unter Zinkmangelbedingungen kommt. Da  $\Delta zhf$  Zellen bei Konzentrationen über  $20 \mu\text{M Zn}^{2+}$  im Medium cytoplasmatisches  $\text{Zn}^{2+}$  nicht mehr in ausreichendem Maße detoxifizieren können und zu Wachstumseinbußen führen, wurden zur Transkriptanalyse niedrigere Konzentrationen gewählt. Unter diesen Bedingungen zeigte sich, dass schon sehr geringe Zinkgaben den  $zrt1^+$  Transkriptlevel beeinflussen. Bereits die Zugabe von  $0,02 \mu\text{M Zn}^{2+}$  verringerte den Transkriptlevel um ca. 23 %. Die stärkste Reduktion konnte zwischen  $0,02 \mu\text{M}$  und  $0,2 \mu\text{M Zn}^{2+}$  im Medium beobachtet werden (33 %) (Abb. 3.7B).

Ob die  $zrt1^+$  Transkriptionsrate in  $\Delta zhf$  sensitiver reguliert wird als im Wildtyp, sollte eine vergleichende Transkriptanalyse ergeben. Beide Stämme wurden unter den bereits bekannten Bedingungen in einem parallel verlaufenden Experiment angezogen und der  $zrt1^+$  Transkriptlevel unter geringen Zinkkonzentrationen zwischen 0 und  $20 \mu\text{M}$  untersucht (Abb. 3.7C). Ab einer Konzentration  $0,02 \mu\text{M}$  Zinkchlorid im Medium konnte sowohl im Wildtyp als auch in der  $\Delta zhf$  Mutante ein reduziertes Level an  $zrt1^+$  beobachtet werden. Ab einer Konzentration von  $0,2 \mu\text{M}$  zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und  $\Delta zhf$  im  $zrt1^+$  Transkriptlevel. Während im Wildtyp lediglich 38 % weniger  $zrt1^+$  Transkript im Vergleich zu  $0 \mu\text{M Zn}^{2+}$  zu verzeichnen war, reagierten  $\Delta zhf$  Zellen mit einer Abnahme von 94 % deutlich sensitiver. Ab einer Konzentration von  $2 \mu\text{M}$  war in der  $\Delta zhf$  Mutante kaum noch  $zrt1^+$  Transkript nachweisbar (Abb. 3.7C). Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass  $\Delta zhf$  Zellen auf Änderungen der äußeren Zinkkonzentration empfindlicher mit der Reduktion des  $zrt1^+$  Transkripts reagieren als Wildtypzellen.

Die Akkumulation des  $zrt1^+$  Transkripts unter Zinkdefizienzbedingungen in  $\Delta zhf$  Zellen sollte in einem zeitabhängigen Versuchsansatz näher analysiert werden. Dazu wurden Wildtyp und Zellen der  $\Delta zhf$  Mutante parallel über Nacht in Medium moderater Zinkkonzentration ( $20 \mu\text{M}$ ) kultiviert und anschließend in Zinkmangelmedium überimpft. Nach 0, 0,5, 1, 2, 4, 6 und 8 h wurden den Kulturen Proben entnommen und der  $zrt1^+$  Transkriptlevel mittels quantitativer *real time* PCR bestimmt. Eine merklicher Anstieg des  $zrt1^+$  Transkriptniveaus in Wildtyp und  $\Delta zhf$  trat nach 2 h im zinkarmen Minimalmedium ein, der in beiden Stämmen schon nach 4 h in ein Plateau mündet (Abb. 3.7D). Der Transkriptlevel in  $\Delta zhf$  beträgt bis zum Zeitpunkt 1 h durchschnittlich nur 10 % des Wildtyps was auf eine stärkere Reduktion von  $zrt1^+$  in den gegebenen  $20 \mu\text{M Zn}^{2+}$  in der Vorkultur zurückzuführen ist. Ab 2 h Inkubation ist das  $zrt1^+$  Transkriptniveau der  $\Delta zhf$  Mutante um ca. 44 % höher als das des

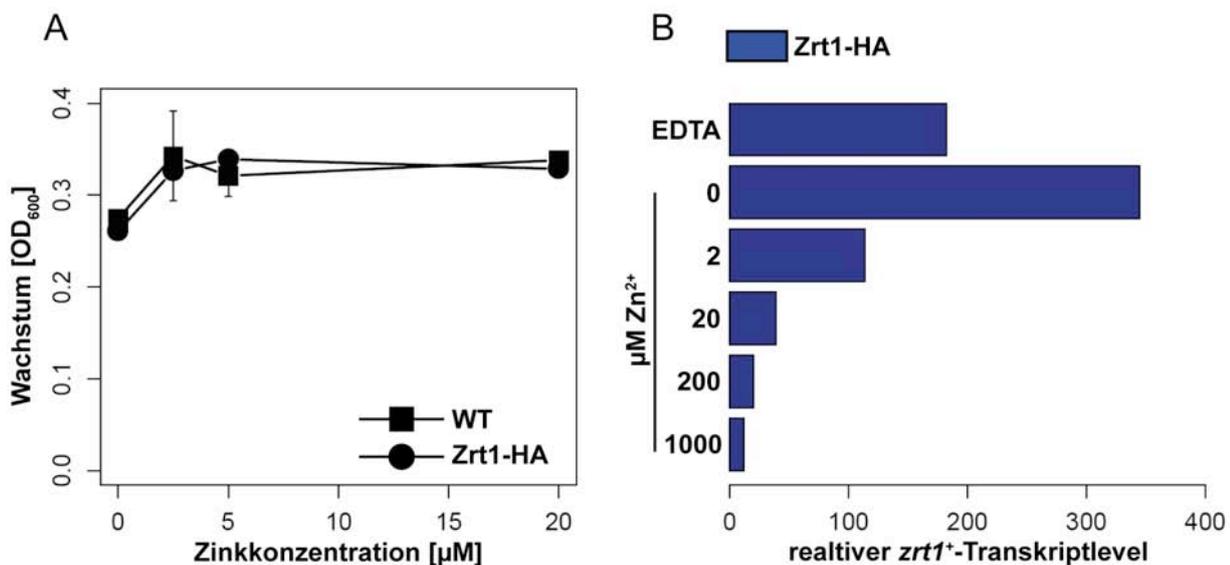
### 3. Ergebnisse

Wildtyps. Besonders deutlich wird die Diskrepanz zwischen dem *zrt1*<sup>+</sup> Transkriptniveau in Wildtyp und Zinkmangelmutter nach 6 h im zinkarmen Medium. Hier ist im Wildtyp nur 18 % des *zrt1*<sup>+</sup> Transkripts im Vergleich zu  $\Delta zhf$  zu beobachten. Während sich die *zrt1*<sup>+</sup> Transkriptmenge in Wildtypzellen im Experimentverlauf verdoppelt hat, hat sie sich in Zellen ohne Zhf um mehr als das hundertfache erhöht (Abb. 3.7D).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der *zrt1*<sup>+</sup> Transkriptlevel durch die externe Zinkkonzentration beeinflusst wird. Ein Zinkmangel bewirkt eine Induktion des Transkriptlevels, während hohe Zinkkonzentrationen den Level stark verringern. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass  $\Delta zhf$  Zellen bei Zugabe einer Konzentration von 0,2  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  mit einer größeren Reduktion der *zrt1*<sup>+</sup> mRNA reagieren als der Wildtyp. Im Gegensatz dazu wird das *zrt1*<sup>+</sup> Transkriptniveau in der  $\Delta zhf$  Mutante unter Zinkmangel stärker induziert als im Wildtyp.

#### 3.2.6 Einfluss von Zink auf die SpZrt1 Proteinabundanz

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Expression des *zrt1*<sup>+</sup> Gens in zinkgesättigten Zellen herunterreguliert ist, sollte nun überprüft werden, ob eine Korrelation mit der SpZrt1-Proteinakkumulation besteht.



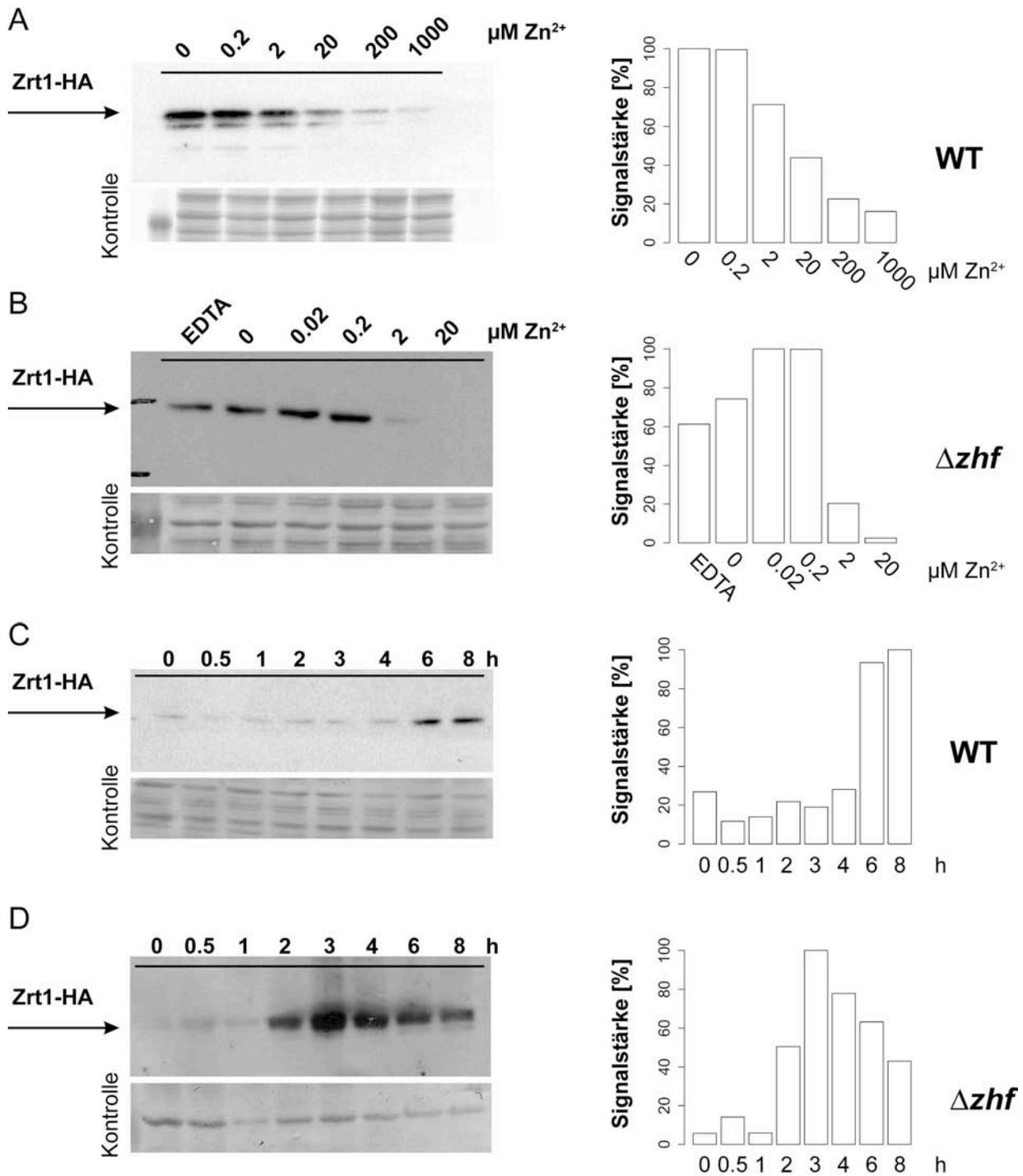
**Abb. 3.8 SpZrt1-HA Fusionsprotein beeinflusst weder Wachstum noch Transkriptakkumulation. A)** Wildtyp- und SpZrt1-HA Zellen wurden in EMM+20  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  kultiviert und anschließend für 24 h in Zinkmangelmedium (EMM-Zn) unter verschiedenen Zinkkonzentrationen bei 30 °C getestet. Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Stdabw., (n=3). **B)** Der SpZrt1-HA Stamm wurde in EMM angezogen und anschließend in Zinkmangelmedium (EMM-Zn) bei verschiedenen Zinkkonzentrationen für 2 h inkubiert. Der relative *zrt1*<sup>+</sup>-Transkriptgehalt im Vergleich zu *act1*<sup>+</sup> wurde mittels quantitativer *real time* PCR überprüft und ist vergleichbar mit dem relativen *zrt1*<sup>+</sup>-Transkriptlevel des Wildtyps aus Abb. 3.7A.

Die codierende Sequenz eines triple HA (Hämagglutinin)- Tags wurde im Leserahmen am 3' - Ende des endogenen *zrt1*<sup>+</sup> Gens ins Genom integriert. Das resultierende *zrt1*<sup>+</sup>-HA Gen steht weiterhin unter der Kontrolle des nativen Promotors. Die Stämme SpZrt1-HA und  $\Delta zhf$ Zrt1-HA wurden mittels Wachstumsversuch auf die Funktionalität des HA getaggten Proteins SpZrt1-HA untersucht.

Außerdem wurde die zinkabhängige Transkriptakkumulation von *zrt1*<sup>+</sup>-HA getestet. Es konnte weder eine Wachstumsinhibierung noch eine Änderung im zinkresponsiven Transkriptionsmuster in SpZrt1-HA im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Abb. 3.8, vgl. auch Abb. 3.7A). Nun sollte durch eine Zinkkonzentrationsreihe die Induktion der *zrt1*<sup>+</sup> Expression im Wildtyp und  $\Delta zhf$  Hintergrund untersucht werden. Die Stämme SpZrt1-HA und  $\Delta zhf$ Zrt1-HA wurden unter Zinkmangelbedingungen angezogen und anschließend für 6 h unter verschiedenen Zinkkonzentrationen kultiviert. In einer vergleichenden Westernblotanalyse wurde dann das SpZrt1-HA Protein mittels eines HA-Antikörpers detektiert und mit der Scion image Software semiquantifiziert (Abb. 3.9A,B). Analog zum *zrt1*<sup>+</sup> Transkriptlevel wurde auch das SpZrt1-HA Proteinlevel unter hohen Zinkkonzentrationen, sowohl im Wildtyp als auch in der  $\Delta zhf$  Mutante herunterreguliert (Abb. 3.9A,B). Im Wildtyp erreichte die Menge an SpZrt1-HA bei einer Konzentration von 1 mM Zinkchlorid im Medium die Nachweisgrenze. In der  $\Delta zhf$  Mutante konnte das SpZrt1-HA Protein schon bei einer Zinkkonzentration von 20  $\mu$ M im Medium nicht mehr detektiert werden, während die gleiche Konzentration nur zu einer Reduktion um 50 % in Wildtypzellen führte (Abb. 3.9A,B). Bei einer Exposition des Wildtyps mit 2  $\mu$ M Zinkchlorid wurde die SpZrt1-HA Konzentration um ca. 20 % reduziert, während es bei der Inkubation von  $\Delta zhf$  Zellen mit der gleichen Zinkmenge zu einer Abnahme von SpZrt1-HA um ca. 80 % kam.

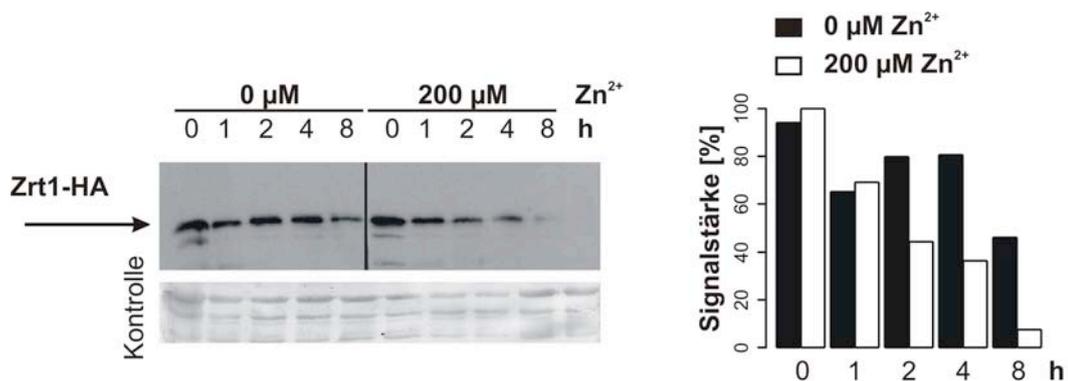
Um die Kinetik der zinkabhängigen SpZrt1-HA Induktion zu untersuchen wurde mit SpZrt1-HA Zellen und  $\Delta zhf$ Zrt1-HA Zellen ein Zeitverlaufsexperiment durchgeführt. Zellen, die mit Zink gesättigt waren (20  $\mu$ M) wurden dazu in Zinkmangelmedium (EMM-Zn) überführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, die im Westernblot analysiert wurden. Ein Zuwachs an Zrt1-HA konnte in SpZrt1-HA nach 6 h in  $\Delta zhf$ Zrt1-HA bereits nach 2 h festgestellt werden (Abb. 3.9C,D). Die größte SpZrt1-HA Abundanz konnte im Wildtyphintergrund am Ende des Experiments nach 8 h beobachtet werden. In der  $\Delta zhf$ Zrt1-HA Mutante erreichte die SpZrt1-HA Proteinmenge nach 3 h einen Scheitelpunkt.

In einem komplementären Versuch sollte nun untersucht werden, ob Änderungen in der SpZrt1-HA Konzentration ausschließlich auf die transkriptionelle Kontrolle des *zrt1*<sup>+</sup> Gens zurückzuführen sind, oder ob die Proteininstabilität selbst durch veränderte Zinkkonzentration beeinflusst wird. Dazu wurden Zellen mit Wildtyphintergrund (SpZrt1-HA) unter Zinkmangelbedingungen (EMM) angezogen. Zu Beginn des Experiments wurden die Zellen auf Medium mit 0 und 200  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup> umgesetzt und mit dem Proteinbiosynthesehemmstoff Cycloheximid (200  $\mu$ g/ml) behandelt. Anschließend wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben den beiden Kulturen entnommen. Während in Zinkmangelmedium nach achtstündiger Inkubation 50 % von SpZrt1-HA degradiert waren, konnte unter hohen Zinkkonzentrationen lediglich 10 % an SpZrt1-HA Protein nachgewiesen werden (Abb. 3.10). Das SpZrt1-HA Protein wurde offenbar unter hohen Zinkkonzentrationen schneller abgebaut und verhielt sich in Zinkmangelmedium etwas stabiler als bei hohen Zinkkonzentrationen (Abb. 3.10). Die Wachstumsinhibierung der Zellen nach Cycloheximidzugabe war unter hohen und niedrigen Zinkkonzentrationen gleich.



**Abb. 3.9** Zink beeinflusst die SpZrt1-HA Proteinabundanz. **A+B**) Die konzentrationsabhängige SpZrt1-HA Proteinakkumulation im Wildtyp- (SpZrt1-HA) und  $\Delta zhf$  ( $\Delta zhf$ Zrt1-HA) Hintergrund. SpZrt1-HA und  $\Delta zhf$ Zrt1-HA Zellen wurden in Zinkmangelmedium (EMM-Zn) kultiviert und in Medium mit verschiedenen Zinkkonzentrationen für 6 h inkubiert. **C+D**) Die zeitabhängige SpZrt1-HA Proteinakkumulation im Wildtyp- (SpZrt1-HA) und  $\Delta zhf$  ( $\Delta zhf$ Zrt1-HA) Hintergrund. SpZrt1-HA und  $\Delta zhf$ Zrt1-HA Zellen wurden mit Zink gesättigt (20  $\mu$ M) und anschließend in Zinkmangelmedium überführt. Innerhalb von 8 h wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Alle Analysen erfolgten mittels SDS-PAGE und Westernblot mit  $\alpha$ -HA Antikörper. 10  $\mu$ g Gesamtprotein wurden geladen. Die Signalstärke der ECL Immunfärbung wurde mittels Scion Image Software analysiert. Gezeigt wird ein repräsentatives Bild aus 3-4 unabhängigen Experimenten. Als Ladekontrolle wird ein Ausschnitt aus der amidoblackgefärbten Membran abgebildet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Expression von SpZrt1-HA in höchstem Maße zinkabhängig ist, wobei  $\Delta zhf$  Zellen um das 100-fache sensitiver auf die externe Zinkkonzentration reagierten. Eine Ursache der unterschiedlichen Reaktionsstärke liegt in der schnelleren Induktion von SpZrt1-HA in  $\Delta zhf$ . Die Proteinmenge verhält sich proportional zur Transkriptmenge, wobei unter hohen Zinkkonzentrationen SpZrt1-HA verstärkt abgebaut wird. Die Regulation der SpZrt1-HA Proteinkonzentration durch die zinkinduzierte Proteindegradation scheint jedoch eine untergeordnete Rolle im Vergleich zum Transkriptlevel zu spielen.



**Abb. 3.10 Einfluss der Zinkkonzentration auf die SpZrt1-HA Proteinestabilität.** SpZrt1-HA Zellen wurden in Zinkmangelmedium angezogen und zum Zeitpunkt 0 h wurden Cycloheximid (200 μg/ml) und zwei verschiedenen Zinkkonzentrationen zugegeben. Innerhalb von 8 h wurden Proben entnommen. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Westernblot mittels  $\alpha$ -HA Antikörper. 10 μg Gesamtprotein wurden geladen. Die Signalstärke der ECL Immunfärbung wurde mittels Scion Image Software analysiert. Gezeigt wird ein repräsentatives Bild aus 3 unabhängigen Experimenten. Als Ladekontrolle wird ein Ausschnitt aus der amidoblackgefärbten Membran abgebildet.

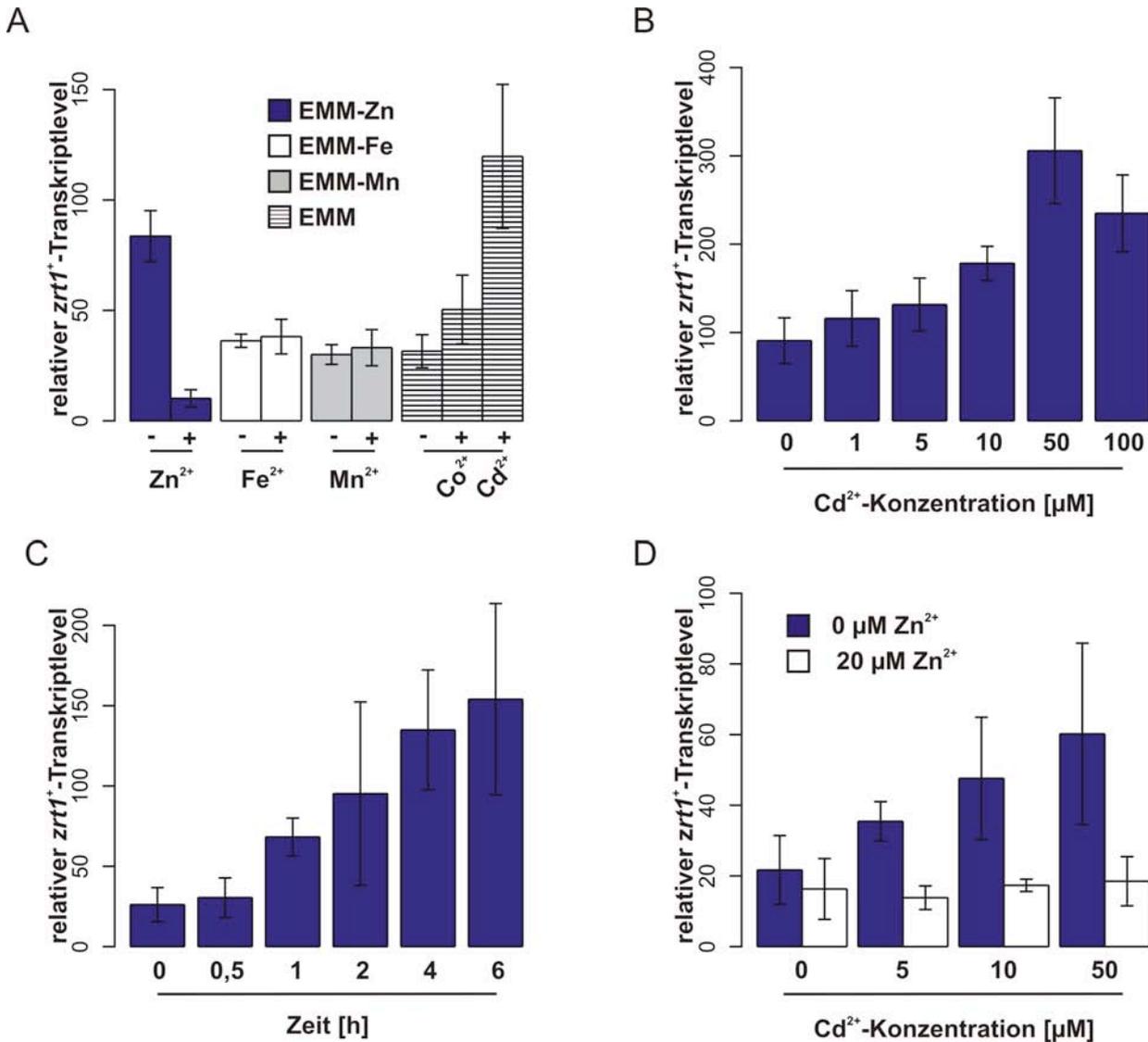
#### 3.2.7 Transkriptionelle Regulation von *zrt1*<sup>+</sup> durch Cadmium

Nachdem die substratabhängige, transkriptionelle Regulation des *zrt1*<sup>+</sup> Gens in *S. pombe* gezeigt werden konnte, sollte nun geklärt werden, ob andere bekannte Substrate von ZIP-Transportern ebenfalls Einfluss auf das *zrt1*<sup>+</sup> Transkript ausüben. Hinweise auf eine transkriptionelle Regulation von *zrt1*<sup>+</sup> durch das nichtessentielle Übergangsmetall Cd<sup>2+</sup> waren bereits durch Mikro- beziehungsweise Makroarrayexperimente bekannt (Chen *et al.* 2003; Simm 2004).

Zur *zrt1*<sup>+</sup> Transkriptanalyse als Antwort auf Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> und Cd<sup>2+</sup> wurden unterschiedliche Medien hergestellt, um sowohl Defizienz als auch Überangebot zu testen. Da Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> und Mn<sup>2+</sup> zu den Bestandteilen des standardmäßig verwendeten EM-Medium gehören, wurden gesondert EMM-Zn, EMM-Mn und EMM-Fe hergestellt. Co<sup>2+</sup> und Cd<sup>2+</sup> sind nicht in der ursprünglichen Medienzusammensetzung enthalten und wurden zum Standard EM-Medium zugegeben. Wildtypzellen wurden in den verschiedenen Medien für 2 h inkubiert und der *zrt1*<sup>+</sup> Transkriptlevel mittels quantitativer *real time* PCR bestimmt. Abbildung 3.11A zeigt zunächst den bereits bekannten Effekt der Zinkkonzentration auf den *zrt1*<sup>+</sup> Transkriptlevel. Die Transkriptexpression wird unter hoher Zinkzugabe herunterreguliert (Abb. 3.11A). Darüber hinaus zeigte sich, dass weder ein Mangel noch der Überschuss an Fe<sup>2+</sup>- und Mn<sup>2+</sup>-Kationen einen Einfluss

### 3. Ergebnisse

auf das *zrt1*<sup>+</sup> Transkriptniveau hat. Die Zugabe von Co<sup>2+</sup> zum EM-Medium führte zu einem geringfügig erhöhten *zrt1*<sup>+</sup> Transkriptlevel, welcher allerdings innerhalb der Standardabweichung liegt. Neben Zn<sup>2+</sup> hatte die Zugabe von Cd<sup>2+</sup> einen deutlichen Effekt auf die *zrt1*<sup>+</sup> Transkriptmenge. Sie erfuhr unter 10 µM Cd<sup>2+</sup> eine Erhöhung um 380 % im Vergleich zum Minimalmedium (Abb. 3.11A).



**Abb. 3.11 Cadmium beeinflusst das *zrt1*<sup>+</sup> Transkriptlevel zeit- und konzentrationsabhängig.** **A)** Der Einfluss verschiedener Metallkationen im Medium auf den Transkriptlevel von *zrt1*<sup>+</sup> wurde relativ zu *act*<sup>+</sup> analysiert. Wildtypzellen wurden in EMM angezogen und für 2 h in Medium unter Defizienz (EMM-Zn, EMM-Fe, EMM-Mn, EMM) beziehungsweise Überschuss der entsprechenden Kationen angezogen (EMM-Zn+100 µM Zn<sup>2+</sup>, EMM-Fe+100 µM Fe<sup>2+</sup>, EMM-Mn+100 µM Mn<sup>2+</sup>, EMM+100 µM Co<sup>2+</sup>, EMM+10 µM Cd<sup>2+</sup>). **B)** Konzentrationsabhängige *zrt1*<sup>+</sup> Transkriptakkumulation. Wildtypzellen wurden in EMM angezogen und für 2 h in EMM unter verschiedenen Cadmiumkonzentrationen inkubiert. Der relative *zrt1*<sup>+</sup> Transkriptlevel wurde mittels quantitativer *real time* PCR bestimmt. **C)** Zeitabhängig *zrt1*<sup>+</sup> Transkriptakkumulation. Wildtypzellen wurden in EMM angezogen, in EMM + 50 µM Cd<sup>2+</sup> überführt und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Der relative *zrt1*<sup>+</sup> Transkriptlevel wurde mittels quantitativer *real time* PCR bestimmt. **D)** Zn<sup>2+</sup> beeinflusst die cadmiumabhängige Transkriptakkumulation. Nach Anzucht in EMM wurde der WT für 2 h in An- (20 µM) und Abwesenheit (0 µM) von Zn<sup>2+</sup> in Medium mit verschiedenen Cadmiumkonzentrationen inkubiert. Der Transkriptlevel von *zrt1*<sup>+</sup> wurde relativ zu *act1*<sup>+</sup> bestimmt.

Alle Experimente wurden bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 gestartet. Die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert ± Stdabw. (n=3).

Nach diesen Ergebnissen sollte die cadmiumabhängige *zrt1*<sup>+</sup> Transkriptakkumulation näher untersucht werden. Dazu wurden *S. pombe* Wildtypzellen einem konzentrationsabhängigen

Cadmiumstressexperiment für 2 h unterzogen (Abb. 3.11B). In einer quantitativer RT-PCR Analyse zeigten Zellen die mit zunehmenden  $\text{CdCl}_2$  behandelt wurden eine damit einhergehende Akkumulation des *zrt1<sup>+</sup>* Transkripts, die bei einer Inkubation mit  $50 \mu\text{M Cd}^{2+}$  das 3-fache des Ausgangswertes erreicht hat. Bei einer Konzentration von  $100 \mu\text{M Cd}^{2+}$  sinkt der Anteil an *zrt1<sup>+</sup>* Transkript in der Zelle leicht ab. Der Unterschied liegt allerdings innerhalb der Standardabweichung (Abb. 3.11B).

Nach der Konzentrationsabhängigkeit sollte die Dynamik der Transkriptakkumulation nach Cadmiumzugabe gemessen werden. Wildtypzellen wurden dazu in Minimalmedium (EMM incl.  $1,39 \mu\text{M Zn}^{2+}$ ) angezogen und mittels *real time* Analyse untersucht. Erste Unterschiede im Transkriptlevel zeigten sich bereits 1 h nach  $50 \mu\text{M Cd}^{2+}$ -Zugabe (Abb. 3.11C). Die Induktion des Transkripts war damit schneller als die Reaktion auf Zinkmangel (Abb. 3.7D). Der Transkriptlevel erhöhte sich weiterhin bis 6 h nach Cadmiumzugabe auf rund das 6-fache des Ausgangswerts zum Zeitpunkt 0 h (Abb. 3.11C). Die cadmiumabhängige Induktion des *zrt1<sup>+</sup>* Transkripts ist somit auch zeitabhängig.

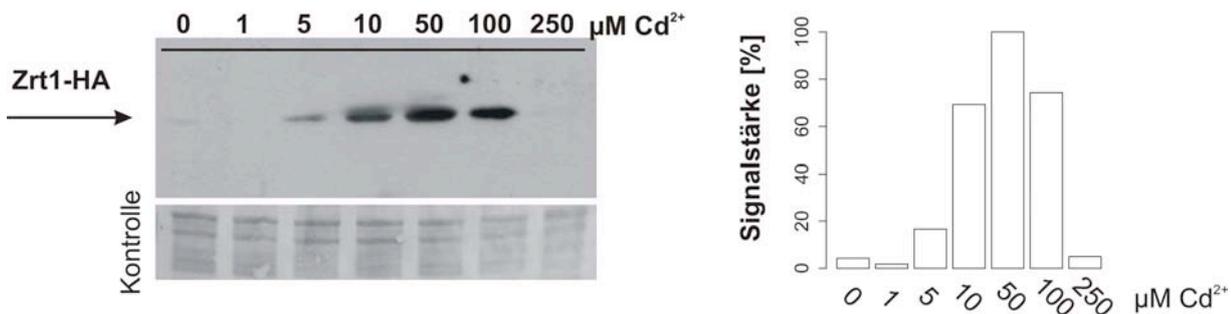
Aus Kurzeitenaufnahmeexperimenten war bekannt, dass die Zinkaufnahme durch  $\text{Cd}^{2+}$  inhibiert wird (Abb. 3.6). Deshalb wurde vermutet, dass es sich bei der cadmiumabhängigen Transkriptakkumulation um eine Konkurrenzreaktion zwischen  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$ , entweder bei der Aufnahme oder an intrazellulären Bindestellen handelt. Um dies zu überprüfen wurden Wildtypzellen mit  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen zwischen 0 und  $50 \mu\text{M}$  in An- und Abwesenheit von  $20 \mu\text{M Zn}^{2+}$  für 2 h inkubiert und deren Transkriptlevel ebenfalls mittels *real time* PCR überprüft. Zellen, die ohne zusätzliches  $\text{Zn}^{2+}$  im Medium inkubiert wurden reagierten wie im vorangegangenen Experiment mit einer Induktion des *zrt1<sup>+</sup>* Transkripts (Abb. 3.11D). Nach Zugabe von  $50 \mu\text{M Cd}^{2+}$  stieg der Transkriptlevel auf den dreifachen Ausgangswert. Enthielt das Medium aber zusätzlich  $20 \mu\text{M Zn}^{2+}$  blieb die Transkriptinduktion unter den getesteten Cadmiumkonzentrationen aus. Der Unterschied zwischen zinkbehandelten und zinkunbehandelten Zellen beträgt unter  $50 \mu\text{M Cd}^{2+}$  ca. 70% (Abb. 3.11B).

Die Experimente zeigten, dass das *zrt1<sup>+</sup>* Transkript zeit- und konzentrationsabhängig durch  $\text{Cd}^{2+}$  induziert wird und diese Induktion durch die Zugabe von  $\text{Zn}^{2+}$  unterdrückt werden kann.

#### 3.2.8 Einfluss von Cadmium auf die SpZrt1-HA Abundanz

Die Antwort des *zrt1<sup>+</sup>* Transkripts auf die Anwesenheit verschiedener Cadmiumkonzentrationen sollte auf Ebene der Proteinakkumulation überprüft werden. *S. pombe* Zellen, die SpZrt1-HA unter der Kontrolle des endogenen Promotors exprimieren wurden dazu mit verschiedenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen in EMM inkubiert und nach 6 h geerntet. Anschließend wurden die Proben aufgeschlossen und in einer Westernblotanalyse untersucht. Die Abbildungen wurden mittels Scion Image Software (Abb. 3.12) semiquantifiziert. Die transkriptionelle Cadmiumresponsivität von *zrt1<sup>+</sup>* spiegelt sich auch in der Proteinakkumulation wider (Abb. 3.12). Die größte Menge an SpZrt1-HA konnte unter  $50 \mu\text{M Cd}^{2+}$  beobachtet werden. Sowohl unter höheren, als auch unter

niedrigeren Konzentrationen wurde weniger SpZrt1-HA Protein detektiert. Bei 5  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  beträgt die Proteinmenge weniger als 20 % des Wertes bei 50  $\mu\text{M}$ . Ab einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  war das SpZrt1-HA Protein nicht mehr nachweisbar, vermutlich infolge des durch hohe  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen ausgelösten Wachstumsstopp, dem sich ein Proteinabbau anschließt (Abb. 3.12) (Harrison *et al.* 2005).

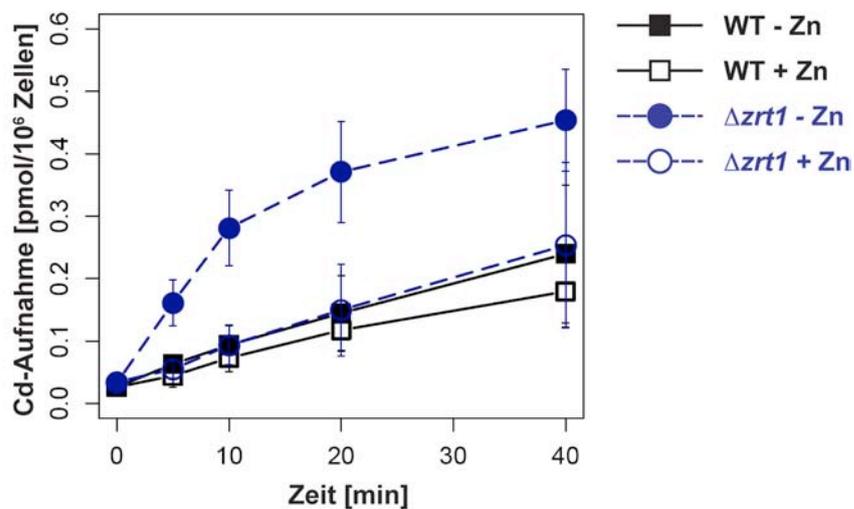


**Abb. 3.12 Cadmium beeinflusst die SpZrt1-HA Proteinabundanz.** SpZrt1-HA Zellen wurden in EMM angezogen und mit den abgebildeten Cadmiumkonzentrationen für 6 h inkubiert. 10  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein wurden mittels SDS-Gel aufgetrennt und im Westernblot mit einem Antikörper gegen das HA-Tag analysiert. Das mittels ECL-Methode detektierte Protein wurde mit der Scion Image Software quantifiziert. Die gleichmäßige Ladung der Proteine wurde durch Amidoblackfärbung kontrolliert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Bild aus 3 unabhängigen Experimenten.

#### 3.2.9 In *S. pombe* erfolgt ein Cadmumeintrag unter Zinkmangel

Cadmium ist in der Lage Zinkionen aus aktiven Zentren von Proteinen, aufgrund ähnlicher Eigenschaften zu verdrängen (Stohs and Bagchi 1995; Clemens 2006). ZIP-Aufnahmetransporter stellen potentielle Eintrittswege für  $\text{Cd}^{2+}$  dar (Clemens 2006). Nachdem die Konkurrenz der Zinkaufnahme durch  $\text{Cd}^{2+}$  und die cadmiumabhängige Transkriptregulation des Zinkaufnahmetransporters SpZrt1 erkannt worden ist, sollte ein Cadmiumaufnahmeexperiment die Beteiligung von SpZrt1 am Cadmiumtransport klären. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob die externe Zinkkonzentration einen Einfluss auf den Transport von  $\text{Cd}^{2+}$  ausübt. Für den Versuch wurden Wildtypzellen und die  $\Delta zrt1$  Mutante unter Zinkmangelbedingungen und moderaten Zinkkonzentrationen angezogen. Zinkmangel wurde erzeugt, indem die beiden Stämme in 5  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  kultiviert und anschließend für 4 h in Zinkmangelmedium (EMM-Zn) inkubiert wurden. Die Anzucht unter moderaten Zinkkonzentrationen erfolgte bei 20  $\mu\text{M}$ . Die Cadmiumaufnahme wurde in Aufnahmepuffer bei 30 °C über einen Zeitraum von 40 min durchgeführt. Das Experiment wurde mit 5  $\mu\text{M}$   $^{109}\text{Cd}$  gestartet. Alle getesteten Stämme waren in der Lage, Cadmium in geringem Maße aufzunehmen (Abb. 3.13). Wildtypzellen, die unter Zinkmangel angezogen wurden zeigten eine geringfügig erhöhte Cadmiumakkumulation gegenüber Wildtypzellen die unter moderaten Zinkkonzentrationen kultiviert wurden. Die Unterschiede lagen aber innerhalb der Standardabweichung. Eine vergleichbare leicht erhöhte Cadmiumakkumulation, wie die  $\Delta zrt1$  Mutante auf, die unter moderaten Zinkkonzentrationen angezogen wurde. Allerdings lag die Differenz auch hier innerhalb der Standardabweichung. Überraschenderweise zeigte die  $\Delta zrt1$  Mutante, die in

Zinkmangelmedium inkubiert wurde eine deutlich erhöhte Cadmiumaufnahme gegenüber den anderen getesteten Stämmen und Bedingungen. Innerhalb der ersten 5 min des Experiments wurde in zinkdefizienten  $\Delta zrt1$  Zellen 66 % mehr Zink aufgenommen als in der zinkgesättigten  $\Delta zrt1$  Mutante. Nach 40 min hatte die zinkdefiziente Mutante das 14-fache ihres Ausgangsgehalts an Cadmium akkumuliert. Im selben Zeitraum nimmt die  $\Delta zrt1$  Mutante, die unter moderaten Zinkbedingungen angezogen wurde nur das 7-fache ihrer Ursprungscadmiumkonzentration auf (Abb. 3.13).

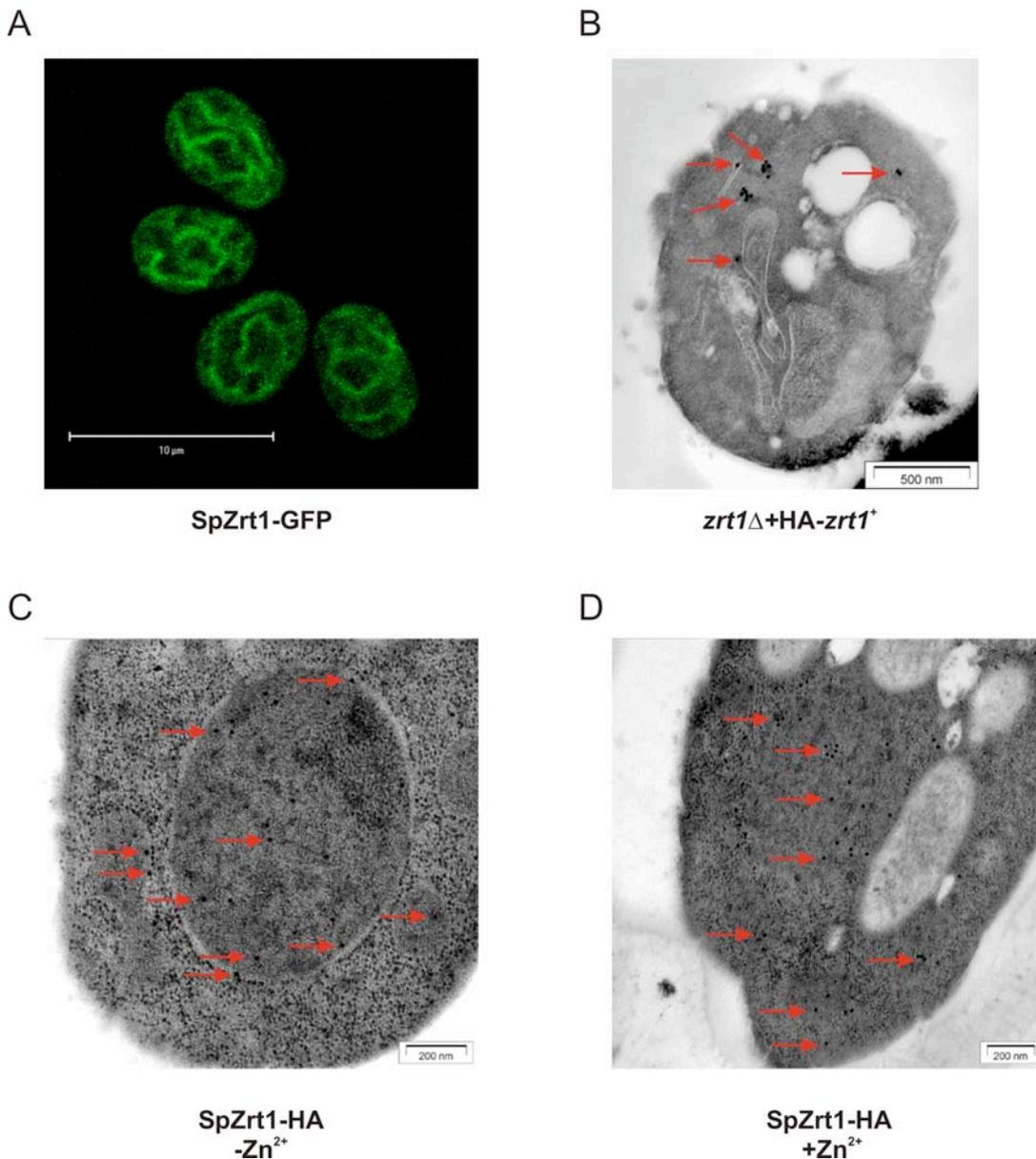


**Abb. 3.13 Die Cadmiumakkumulation ist zinkabhängig und in der  $\Delta zrt1$  Mutante stark erhöht.** Zeitabhängige <sup>109</sup>Cd Akkumulation in Wildtyp (schwarzes Quadrat) und  $\Delta zrt1$  Mutante (blauer Kreis). Die Stämme wurden sowohl unter Zinkmangel (gefüllte Symbole), als auch unter moderater Zinkkonzentration (20  $\mu$ M) (weiße Symbole) angezogen und in Aufnahmebuffer inkubiert. Der Aufnahmeversuch wurde mit 5  $\mu$ M <sup>109</sup>Cd gestartet. Die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Stdabw., (n = 3).

Unter Zinkmangel kommt es nur zu einer leicht erhöhten Cadmiumaufnahme im Wildtyp, während sie sich in der  $\Delta zrt1$  Mutante verdoppelt. Der erhöhte Cadmiumtransport erfolgt demnach nicht ausschließlich über SpZrt1, sondern über einen bisher unbekanntem Transporter, die in der  $\Delta zrt1$  Mutante induziert sind.

#### 3.2.10 Subzelluläre Lokalisation des SpZrt1-Proteins

Die Beteiligung von SpZrt1 am Zinkaufnahmetransport von *S. pombe* deutet darauf hin, dass SpZrt1 in der Plasmamembran lokalisiert ist. Um die subzelluläre Lokalisierung von SpZrt1 zu untersuchen, wurde das Gen für ein Zrt1-GFP Fusionsprotein anstelle von  $zrt1^+$  ins Genom integriert. Das  $zrt1^+$  -GFP Gen befindet sich unter der Kontrolle des nativen  $zrt1^+$  Promotors. Der resultierende Stamm SpZrt1-GFP wurde bei Raumtemperatur angezogen, um die Faltung des GFP-Proteins zu gewährleisten. Aufgrund der zinkabhängigen Promotoraktivität des  $zrt1^+$  Gens wurden die Zellen unter niedrigen Zinkkonzentrationen (5  $\mu$ M) kultiviert. Die GFP-Fluoreszenz wurde im Konfokalmikroskop untersucht. Es zeigte sich eine intrazelluläre Lokalisation, vermutlich an der ER-Membran (Abb. 3.14A).



**Abb. 3.14 Subzelluläre Lokalisation des SpZrt1-Proteins.** **A)** SpZrt1-GFP Zellen wurden unter niedrigen Zinkkonzentrationen (5  $\mu$ M) bei Raumtemperatur angezogen und bei 488 nm im Konfokalmikroskop analysiert. **B)** *Spzrt1+zrt1*<sup>+</sup> Zellen wurden unter niedrigen Zinkkonzentrationen (5  $\mu$ M) angezogen und protoplastiert. Die in Lowcryl eingebetteten Zellen wurden mit monoklonalem  $\alpha$ -HA Antikörper inkubiert, mit anti-Maus IgG1 A/gold (15 nm) als zweiten Antikörper markiert und im Rasterelektronenmikroskop analysiert. Die roten Pfeile deuten auf die Goldmarkierungen. **C) + D)** SpZrt1-HA Zellen wurden unter Zinkmangel (EMM-Zn) und moderaten Zinkkonzentrationen (20  $\mu$ M) angezogen und mittels Gefriersublimation fixiert. Die Ultradünnschnitte wurden mit monoklonalem  $\alpha$ -HA Antikörper inkubiert, mit anti-Maus IgG1 A/gold (15 nm) als zweiten Antikörper markiert und im Rasterelektronenmikroskop analysiert. Die roten Pfeile deuten auf die Goldmarkierungen.

Allerdings konnte beobachtet werden, dass die Zellen klein und rund geformt waren und nicht wie für *S. pombe* beschrieben eine länglich Zellform besaßen (Lindner 1893), was auf Stressbedingungen hindeuten könnte. In einem Wachstumsversuch konnte gezeigt werden, dass es in SpZrt1-GFP Zellen zu einer Wachstumsreduktion von 35 % gegenüber Wildtypzellen unter Zinkmangelbedingungen (EMM-Zn) kam. Das C-terminale GFP-Tag beeinflusst wahrscheinlich die Faltung oder Stabilität des SpZrt1 Proteins. Alternativ wurden nun Zrt1-Fusionsproteine mit einem triple HA-Tag untersucht. Das

HA-Tag hat aufgrund seiner geringeren Größe weniger sterische Einflüsse auf die Proteinkonformation. Die Zinkaufnahme der  $\Delta zrt1$  Mutante konnte durch ein plasmidcodiertes Gen für ein N-terminal getaggetes HA-Fusionsprotein komplementiert werden (Bährecke 2004) (Abb. 3.4A). Da die Funktionalität dieses Fusionsproteins bekannt war wurde der Stamm  $\Delta zrt1+zrt1^+$  unter Zinkmangel (5  $\mu\text{M}$ ) angezogen und für die anschließende Einbettung protoplastiert. Dann wurden die Zellen für die Elektronenmikroskopie von Sylvia Krüger und Mandy Birschwilks vorbereitet und analysiert. Die mittels  $\alpha$ -HA Antikörper immunogoldmarkierten Zellen zeigten ebenfalls eine Lokalisation des SpZrt1-HA Proteins an intrazellulären Membranen, vermutlich am ER oder am Golgi-Apparat (Abb. 3.14 B).

Da vermutet wurde, dass die 2 h dauernde Protoplastierung gefolgt von einer längeren Einbettungsprozedur einen Einfluss die Lokalisation des SpZrt1 Proteins haben könnte, wurde in Zusammenarbeit mit Gerd Hause eine Gefriersublementierung von *S. pombe* Zellen vorgenommen. Für diesen Versuch wurden Zellen unter Zinkmangel (EMM-Zn) und moderaten Zinkkonzentrationen angezogen (20  $\mu\text{M}$ ), die das Gen für ein funktionelles SpZrt1-HA Fusionsprotein im Genom trugen (Abb. 3.8). Die folgende Analyse im Rasterelektronenmikroskop wurde ebenfalls von Mandy Birschwilks durchgeführt. Wiederholt zeigte sich eine intrazelluläre Lokalisation, die unabhängig von der Zinkkonzentration des Anzuchtmediums war (Abb. 3.14C,D). Viele der Immunmarkierungen befanden sich im Zellkern.

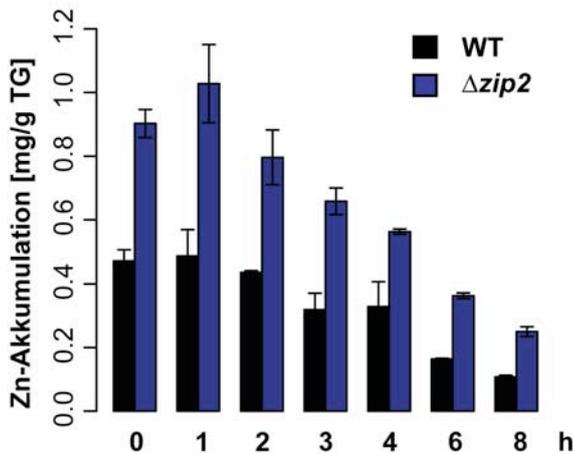
### 3.3 Charakterisierung des Zip2 Zinktransporters aus *S. pombe*

Aufgrund von Homologievergleichen wurde das Zip2 Protein in die Untergruppe der GufA Transporter der ZIP-Familie eingeordnet. Es zeigt hohe Homologie zum *S. cerevisiae* Transporter Zrt3 (Gaither and Eide 2001). Unter Zinkmangel ist Zrt3 für die Remobilisierung von Zink aus dem Vakuolenspeicher verantwortlich (MacDiarmid *et al.* 2000). In der Elementanalyse verschiedener ZIP-Mutanten konnte unter hohen Zinkbedingungen (30  $\mu\text{M}$ ) ein erhöhter Gesamtzinkgehalt in der  $\Delta zip2$  Mutante im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden, während unter niedrigen Zinkkonzentrationen (10  $\mu\text{M}$ ) kein Unterschied beobachtet werden konnte (Abb. 3.1B,E). Die mögliche Beteiligung von Zip2 am Zinktransport und in der Zinkhomöostase von *S. pombe* sollte im Folgenden analysiert werden.

#### 3.3.1 Verlust von Zip2 führt zu einer höheren zellulären Zinkkonzentration

Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeiten der  $\Delta zip2$  Mutation im Vergleich zur *S. cerevisiae* Mutante  $\Delta zrt3$  wurde vermutet, dass Zip2 an der Remobilisierung von Zink aus einem Kompartiment beteiligt ist (Abb. 3.1E)(MacDiarmid *et al.* 2000). In einer weiteren Messung des Gesamtzinkgehalts mittels AAS sollte diese Beobachtung näher untersucht werden. Wildtyp und Zellen der  $\Delta zip2$

Mutante wurden unter hohen Zinkkonzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ) angezogen, anschließend gewaschen und in Zinkmangelmedium (EMM-Zn) überimpft. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und deren Zinkgehalt ermittelt (Abb. 3.15). Zum Zeitpunkt 0 h war die zelluläre Zinkkonzentration von  $\Delta zip2$  um circa das Doppelte gegenüber der des Wildtyps erhöht. Das Verhältnis des Zinkgehalts zwischen Wildtyp und Mutante änderte sich auch nicht nach 8 h Inkubation in Zinkmangelmedium.



**Abb. 3.15 Der Verlust von  $zip2^+$  führt zu einer höheren zellulären Gesamtzinkkonzentration.** Wildtyp (schwarze Balken) und  $\Delta zip2$  Mutante (blaue Balken) wurden unter hohen Zinkkonzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ) angezogen und anschließend in Zinkmangelmedium für 8 h inkubiert. Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen, gewaschen, lyophilisiert und der Gesamtzinkgehalt mittels AAS analysiert. Die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Stdabw., (n=3).

Der Gesamtzinkgehalt beider Stämme reduziert sich auf ein Viertel, was der Verdopplungszeit von *S. pombe* im Minimalmedium (ca. 4 h) entspricht. Durch den Verlust des  $zip2^+$  Gens kommt es also zu einem erhöhten Gesamtzinkgehalt in *S. pombe*, wenn die Zellen zuvor in Medium mit hohen Zinkkonzentrationen angezogen wurden. In Zinkmangelmedium bleibt der erhöhte Gesamtzinkgehalt der  $\Delta zip2$  Mutante gegenüber dem Wildtyp mindestens über einen Zeitraum von 8 h bestehen.

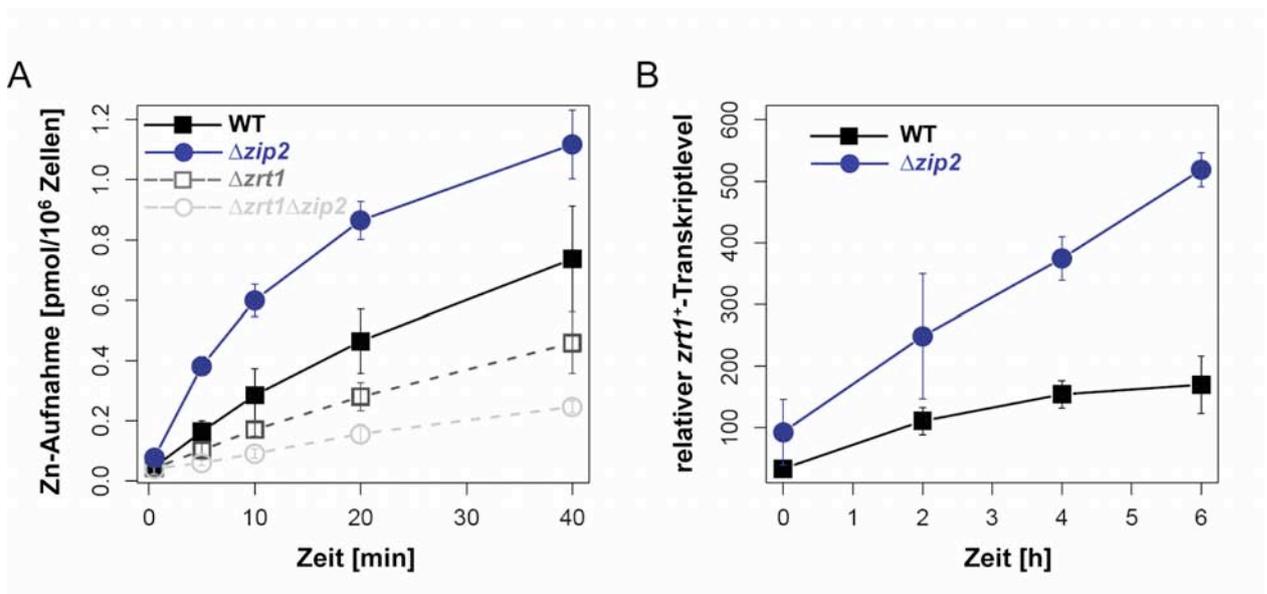
#### 3.3.2 Die SpZrt1 Aktivität ist in der $\Delta zip2$ Mutante erhöht

Durch den erhöhten Gesamtzinkgehalt in der  $\Delta zip2$  Mutante wurde angenommen, dass Zip2 eine Funktion im Zinktransport ausübt. Ob die erhöhte Zinkakkumulation in  $\Delta zip2$  auf eine erhöhte Zinkaufnahme zurückzuführen ist, sollte ein Kurzzeitaufnahmeexperiment prüfen. Für dieses Experiment wurden Wildtyp,  $\Delta zip2$ , die Zinkaufnahmemutante  $\Delta zrt1$ , und die Doppelmutante  $\Delta zrt1\Delta zip2$  unter 5  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  über Nacht angezogen und anschließend für 4 h in Zinkmangelmedium (EMM-Zn) inkubiert. Das folgende Aufnahmeexperiment mit  $^{65}\text{Zn}$  wurde bei 30 °C in Aufnahmebuffer durchgeführt. Nach 5-minütiger Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$   $^{65}\text{Zn}$  war die Zinkaufnahme in  $\Delta zip2$  um das 2,3-fache gegenüber dem Wildtyp erhöht und beträgt nach 20 min noch das 1,6-fache des Wildtyps (Abb. 3.16A). Die  $\Delta zrt1$  Mutante zeigte erwartungsgemäß eine reduzierte Zinkaufnahme die nach 5 min 60 % und nach 20 min 40 % der Zinkakkumulation des Wildtyps entspricht. Bereits nach 5 min weist die Doppelmutante  $\Delta zrt1\Delta zip2$  im Vergleich zum Wildtyp eine 64 %ige Reduktion in der Zinkakkumulation auf. Über den gesamten Zeitverlauf des Experiments nahm die  $\Delta zrt1\Delta zip2$

### 3. Ergebnisse

Doppelmutante am wenigsten Zink auf, während die Einzelmutante  $\Delta zip2$  die höchste Zinkakkumulation zeigte. Die erhöhte intrazelluläre Zinkkonzentration in  $\Delta zip2$  geht also mit einer gesteigerten Zinkaufnahme einher. Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse, dass die erhöhte Zinkaufnahme in der  $\Delta zip2$  Mutante von der Funktion des Zinkaufnahmetransporters SpZrt1 abhängig ist (Abb. 3.16A).

Wenn die Ursache für den erhöhten Zinkaufnahmetransport auf einer höheren Aktivität des SpZrt1 Zinkaufnahmetransporters beruht, könnte die  $zrt1^+$  Expression in der  $\Delta zip2$  Mutante hochreguliert sein. Für diesen Versuch wurden Wildtyp und  $\Delta zip2$  Mutante unter hohen Zinkkonzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ) angezogen und anschließend in Zinkmangelmedium (EMM-Zn) überimpft. Dann wurden nach verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und mittels quantitativer *real time* PCR der  $zrt1^+$  Transkriptlevel in beiden Stämmen bestimmt (Abb. 3.16B). Schon zum Zeitpunkt 0 ist das Transkriptniveau des Zinkaufnahmetransporters SpZrt1 in  $\Delta zip2$  um das 2-fache höher als im Wildtyp. Allerdings überschneiden sich zu Beginn der Messung noch die Standardabweichungen der relativen Transkriptlevel. Während die  $zrt1^+$  Transkriptmenge in  $\Delta zip2$  während des gesamten Experiments linear stark ansteigt, verläuft die zeitabhängige Kurve im Wildtyp flacher. So konnte nach 6-stündiger Inkubation in Zinkmangelmedium die 3-fache Menge an  $zrt1^+$  Transkript in  $\Delta zip2$  im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Abb. 3.16B). Da die Expression von  $zrt1^+$  typischerweise unter Zinkmangelbedingungen induziert ist (Abb. 3.7), deutet die  $zrt1^+$  Transkriptaktivierung in  $\Delta zip2$  möglicherweise auf einen Zinkmangel hin.



**Abb. 3.16** Effekte der  $\Delta zip2$  Mutation in der Zinkaufnahme sind durch eine höhere SpZrt1 Aktivität begründet. **A**) Zeitabhängige Zinkaufnahme zinkdefizient angezogener Zellen des Wildtyps (schwarzes Quadrat), der Aufnahmemutante  $\Delta zrt1$  (graues Quadrat), der  $\Delta zip2$  Mutante (blauer Kreis) und der  $\Delta zrt1\Delta zip2$  Doppelmutante (hellgrauer Kreis). Die Zinkakkumulation wurde bei 30 °C in Aufnahmebuffer mit 10  $\mu\text{M}$   $^{65}\text{Zn}$  durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Stdabw., (n=3). **B**) Quantitative Analyse des  $zrt1^+$  Transkripts im Wildtyp (schwarzes Quadrat) und in der  $\Delta zip2$  Mutante (blauer Kreis). Die Stämme wurden unter hohen Zinkkonzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ) angezogen und für 6 h unter Zinkmangel (EMM-Zn) kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und der Transkriptlevel von  $zrt1^+$  in einer quantitativen *real time* Analyse bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Stdabw., (n=3).

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der höhere Zinkaufnahme in  $\Delta zip2$  Zellen mit einer höheren Expression des Gens für den Zinkaufnahmetransporter Zrt1 verbunden ist.

#### 3.3.3 Einfluss der $\Delta zip2$ Mutation auf das Wachstum von *S. pombe* unter verschiedenen Zinkkonzentrationen

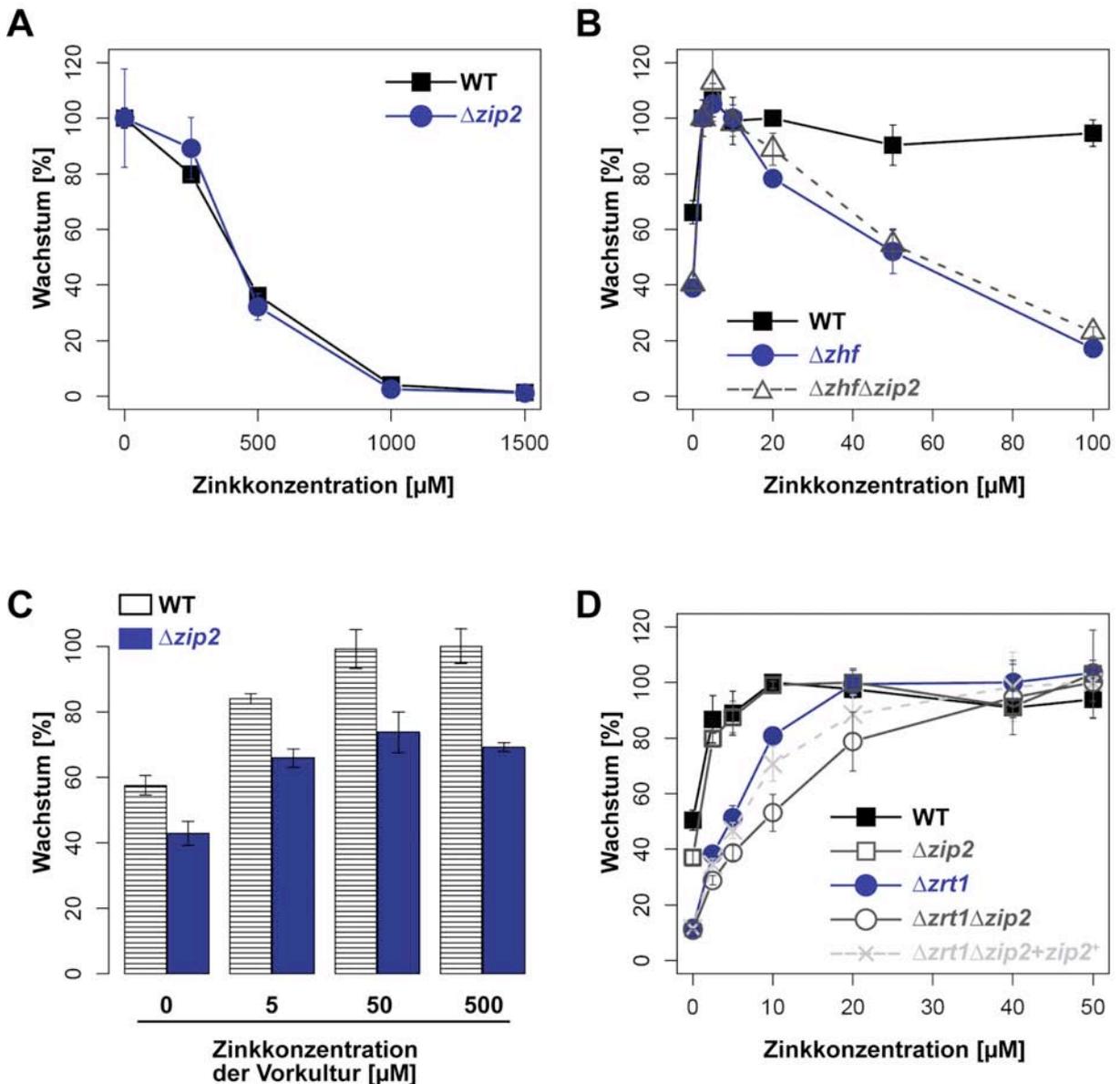
Unter niedrigen Zinkkonzentrationen konnten keine Unterschiede im Zinkgehalt zwischen Wildtyp und Zellen, die eine Insertion in  $zip2^+$  trugen, festgestellt werden. Dagegen konnte unter hohen Zinkkonzentrationen die doppelte intrazelluläre Zinkkonzentration in der Mutante bei der ICP-Analyse beobachtet werden (Abb. 3.1B,E). Aufgrund dieser Beobachtung wurde vermutet, dass die erhöhte Zinkakkumulation das Wachstum der  $\Delta zip2$  Mutante unter hohen Zinkkonzentrationen beeinträchtigt. Für einen Wachstumsversuch wurden Wildtyp und  $\Delta zip2$  Mutante in YE5S-Medium angezogen. Das Vollmedium erlaubt die Einstellung höherer Zinkkonzentrationen als das bisher verwendete Minimalmedium. Das Wachstum der Zellen wurde in einem Konzentrationsbereich zwischen 0 und 1,5 mM  $Zn^{2+}$  über einen Zeitraum von 20 h untersucht. Es wurden jedoch keine Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen Wildtyp und Mutante beobachtet (Abb. 3.17A). In einem Folgeversuch wurde das Wachstum der  $\Delta zhf$  Mutante und der  $\Delta zhf\Delta zip2$  Doppelmutante in Minimalmedium verglichen. Die  $\Delta zhf$  Mutante weist einen zinksensitiveren Wachstumsphänotyp im Vergleich zum Wildtyp auf und ermöglichte die Verwendung von Minimalmedium. Auch hier zeigte sich kein Unterschied im Wachstum zwischen zinksensitiver  $\Delta zhf$  Mutante und der  $\Delta zhf\Delta zip2$  Doppelmutante die auf Zinkkonzentrationen zwischen 0 und 100  $\mu M$  wuchsen (Abb. 3.17B). Obwohl unter hohen Zinkkonzentrationen im Medium der Zinkgehalt von  $\Delta zip2$  ca. das Doppelte des Wildtyps entspricht (Abb. 3.1B,E), haben erhöhte Zinkkonzentrationen keinen Einfluss auf das Wachstum der  $\Delta zhf\Delta zip2$  Doppelmutante im Vergleich zur  $\Delta zhf$  Mutante.

Infolge der erhöhten  $zrt1^+$  Transkriptaktivierung in  $\Delta zip2$  unter Zinkmangel wurde ein höherer Zinkbedarf der  $\Delta zip2$  Mutante vermutet (Abb. 3.16B), der sich mit einer Zip2 Funktion im der Remobilisierungstransport erklären ließe. Um dies zu testen wurden zunächst Zellen von Wildtyp und  $\Delta zip2$  Mutante mit verschiedenen Zinkkonzentrationen zwischen 0 und 500  $\mu M$  Zink angezogen. Unter den hohen extrazellulären Zinkkonzentrationen sollten somit die Zellen mit  $Zn^{2+}$  beladen werden. Anschließend wurden die Stämme nach einem Waschschrift in Zinkmangelmedium (EMM-Zn) für 24 h inkubiert, um ihre Remobilisierungsfähigkeit zu testen. Das Wachstum der  $\Delta zip2$  Mutante war im Vergleich zum Wildtyp unter Zinkdefizienz um ca. 30 % vermindert. Diese Reduktion war unabhängig von der Zinkkonzentration der Vorkultur (Abb. 3.17C).

Aus Kurzaufnahmeexperimenten war bekannt, dass die gesteigerte Zinkaufnahme der  $\Delta zip2$  Mutante abhängig vom SpZrt1-Aufnahmetransporter ist. Weiterhin kommt es zu einer erhöhten  $zrt1^+$  Transkription in  $\Delta zip2$ , wahrscheinlich in Folge einer Zinkdefizienz der Zellen. Im anschließenden Versuch sollte nun getestet werden, ob eine Mutation im  $zip2^+$  Gen einen Effekt auf das Wachstum unter Zinkmangelbedingungen in Abhängigkeit von SpZrt1 hat. Dazu wurden Wildtyp,  $\Delta zip2$ , die

### 3. Ergebnisse

Zinkaufnahmemutante  $\Delta zrt1$  und die Doppelmutante  $\Delta zrt1\Delta zip2$  auf Zinkkonzentrationen zwischen 0 und 50  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  für 22 h in Minimalmedium angezogen.



**Abb. 3.17 Zip2 wird für das Wachstum unter Zinkdefizienz benötigt.** **A)** Wildtyp (schwarzes Quadrat) und  $\Delta zip2$  Mutante (blauer Kreis) wurden auf Vollmedium (YE5S) angezogen und für 20 h unter verschiedenen Zinkkonzentrationen getestet. **B)** Wildtyp (schwarzes Quadrat),  $\Delta zhf$  Mutante (blauer Kreis) und  $\Delta zhf\Delta zip2$  Doppelmutante (graues Dreieck) wurden auf EMM mit moderater Zinkkonzentration (20  $\mu\text{M}$ ) kultiviert und anschließend unter verschiedenen Zinkkonzentrationen 24 h inkubiert. **C)** Wildtyp (gestreifter Balken) und  $\Delta zip2$  Mutante (blauer Balken) wurden in EMM mit den angegebenen Zinkkonzentrationen vorkultiviert und anschließend für 24 h auf Zinkmangelmedium (EMM-Zn) angezogen. **D)** Wildtyp (schwarzes Quadrat),  $\Delta zip2$  Mutante (graues Quadrat),  $\Delta zrt1$  Mutante (blauer Kreis),  $\Delta zrt1\Delta zip2$  Doppelmutante (grauer Kreis) und  $\Delta zrt1\Delta zip2$  Doppelmutante mit plasmidcodiertem  $zip2^+$  Gen (hellgraues Kreuz) wurden in moderater Zinkkonzentration (20  $\mu\text{M}$ ) und 1  $\mu\text{M}$  Thiamin vorinkubiert und anschließend für 22 h in EMM mit unterschiedlichen Zinkkonzentrationen getestet. Alle Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Stdabw. (n=3).

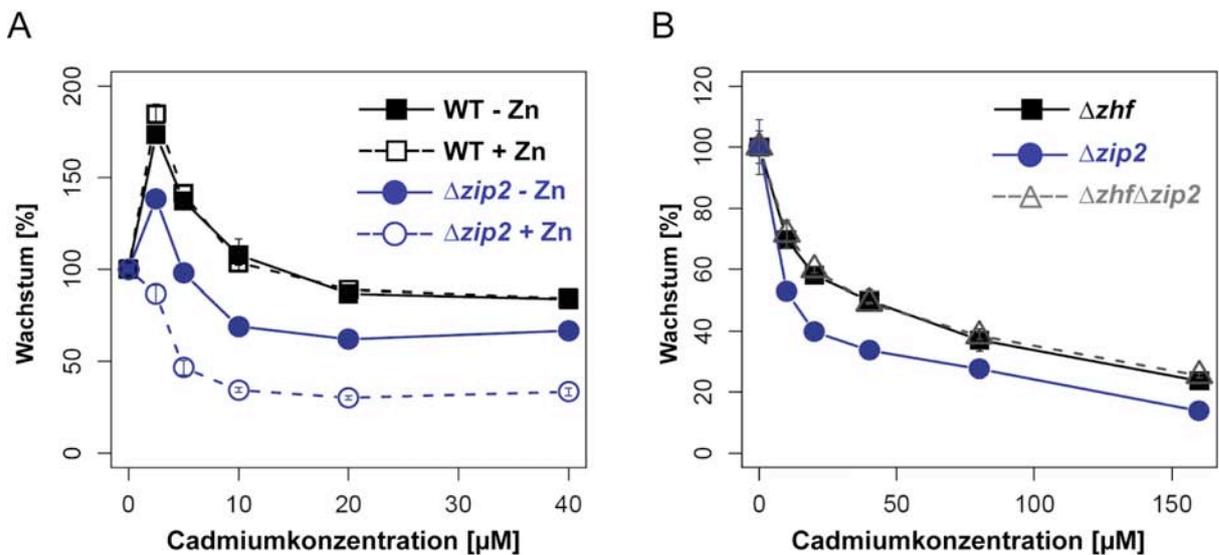
Im Vergleich zum Wildtyp zeigt die  $\Delta zip2$  Mutante auch in diesem Versuch nur eine Einschränkung ausschließlich unter Zinkmangelbedingungen (EMM-Zn) (Abb. 3.17D). Das Wachstum von  $\Delta zip2$  unter

den verschiedenen anderen Zinkkonzentrationen entspricht dem Wildtyp. Zwischen 0 und 20  $\mu\text{M Zn}^{2+}$  ist, wie bereits bekannt, das Wachstum von  $\Delta zrt1$  reduziert. Ab 20  $\mu\text{M Zn}^{2+}$  erreicht die  $\Delta zrt1$  Mutante Wildtypniveau. Die Doppelmutante  $\Delta zrt1\Delta zip2$  unterscheidet sich unter Zinkmangelbedingungen (EMM-Zn) nicht vom  $\Delta zrt1$  Wachstum. Bei Konzentrationen zwischen 2,5  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$  erreicht die Doppelmutante aber eine geringere Zelldichte als  $\Delta zrt1$ . Es kommt also zu einer Verstärkung des  $\Delta zrt1$  Phänotyps, was ein weiterer Hinweis auf eine Funktion von Zip2 unter Zinkdefizienzbedingungen ist. Der Phänotyp der Doppelmutante konnte durch eine plasmidcodierte Expression des  $zip2^+$  Gens teilweise komplementiert werden (Abb. 3.17D).

Aufgrund einer Mutation im  $zip2^+$  Gen ist das Wachstum der Zellen unter Zinkmangelbedingungen (EMM-Zn) eingeschränkt. Weiterhin wird durch den Verlust von  $zip2^+$  das Wachstum der  $\Delta zrt1\Delta zrt2$  Doppelmutante unter niedrigen Zinkkonzentrationen im Vergleich zu  $\Delta zrt1$  weiter reduziert. Unter hohen Zinkkonzentrationen gleicht sich das Wachstum aller Mutanten wieder dem des Wildtyps an. Diese Ergebnisse zusammen mit den Ergebnissen aus den Abschnitten 3.3.1 und 3.3.2 weisen auf eine mögliche Funktion von Zip2 im Remobilisierungstransport hin.

#### 3.3.4 Einfluss der $\Delta zip2$ Mutation auf das Wachstum von *S. pombe* unter verschiedenen Cadmiumkonzentrationen

$\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  zeigen eine enge physikalische und chemische Verwandtschaft und können beide über verschiedene ZIP-Transporter in die Zelle aufgenommen werden. Eine Rolle von Zip2 in der zellulären Cadmiumverteilung sollte nun überprüft werden. Dazu wurden Wildtyp und  $\Delta zip2$  Mutante unter verschiedenen Cadmiumkonzentrationen angezogen. Da  $\Delta zip2$  Zelle vermutlich eine verminderte Zinkremobilisierungsfähigkeit haben wurden Wildtyp und Mutantenzellen unter Zinkmangel (EMM-Zn) und niedrigen Zinnkonzentrationen (EMM incl. 1,39  $\mu\text{M}$ ) angezogen. Anschließend wurden das Wachstum der Stämme in EMM versetzt mit verschiedenen Cadmiumkonzentrationen getestet. Ob der Wildtypstamm unter Zinkmangel oder in EMM angezogen wurde übte keinen Einfluss auf dessen Wachstum unter verschiedenen Cadmiumkonzentrationen aus (Abb. 3.18A). Die  $\Delta zip2$  Mutation hingegen führte zur Wachstumsreduktion von 70 % unter 10  $\mu\text{M Cd}^{2+}$ , wenn die Zellen zuvor in EMM incl. 1,39  $\mu\text{M Zn}^{2+}$  inkubiert wurden. Wurden die Mutantenzellen zuvor in Zinkmangelmedium (EMM-Zn) kultiviert kam es zur Wachstumsinhibierung durch  $\text{Cd}^{2+}$  um nur 30 % gegenüber dem Wildtyp. Bei einer Konzentration von 2,5  $\mu\text{M Cd}^{2+}$  zeigen sowohl die Wildtypkulturen als auch die  $\Delta zip2$  Mutante, die in der Vorkultur auf EMM kultiviert wurde, einen Wachstumsanstieg (Abb. 3.18). Die Wachstumssteigerung auf niedrigen Cadmiumkonzentrationen ist wahrscheinlich auf den unspezifischen Eintrag von Zinkionen durch die Cadmiumzugabe zurückzuführen. Generell konnte eine höhere Sensitivität der  $\Delta zip2$  Mutante gegenüber  $\text{Cd}^{2+}$  beobachtet werden, wobei ein vorangegangener Zinkmangel sich überraschender Weise positiv auf das Wachstum unter  $\text{Cd}^{2+}$  auswirkt.



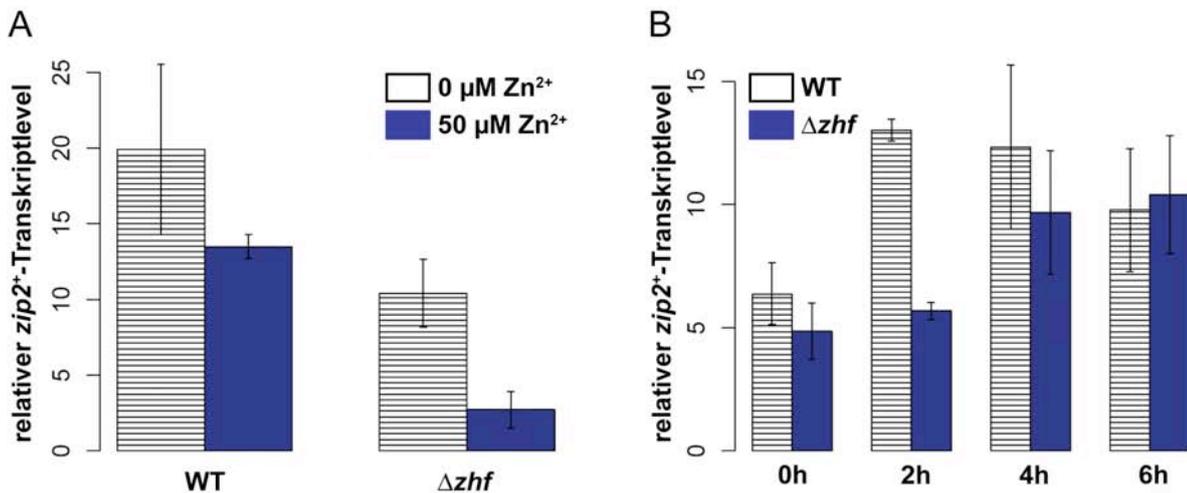
**Abb. 3.18 Eine Mutation im  $zip2^+$  Gen führt zu erhöhter Cadmiumsensitivität. A)** Wildtyp (schwarz) und  $\Delta zip2$  Zellen (blau) wurden in Zinkmangelmedium (EMM-Zn) und bei niedrigen Zinkkonzentrationen (EMM incl.  $1,39 \mu\text{M Zn}^{2+}$ ) angezogen. Das Wachstum der Stämme wurde für 24 h in EMM mit verschiedenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen bei  $30^\circ\text{C}$  getestet. **B)** Zellen mit Mutation im  $zhf^+$  oder  $l$  und  $zip2^+$  Gen wurden in EMM angezogen und deren Wachstum unter verschiedenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen für 24 h getestet. Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Stdabw., ( $n=3$ ).

Durch den Verlust des  $zhf^+$  Gens werden *S. pombe* Zellen toleranter gegenüber  $\text{Cd}^{2+}$ . Das Kation wird nicht mehr ins ER transportiert und kann im Cytoplasma entgiftet werden (Clemens *et al.* 2002). In einem weiteren Experiment sollte nun geklärt werden, wie sich cadmiumsensitive Phänotyp der  $\Delta zip2$  Mutante zur höheren Cadmiumtoleranz der  $\Delta zhf$  Mutation verhält. Dazu wurde die  $\Delta zhf^-$ , die  $\Delta zip2^-$  und die  $\Delta zhf\Delta zip2$  Doppelmutante in EMM ( $1,39 \mu\text{M}$ ) angezogen und deren Wachstum für 24 h bei verschiedenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen beobachtet. Auch in diesem Versuch zeigt sich die  $\Delta zip2$  Mutante sensitiv gegenüber  $\text{Cd}^{2+}$  (Abb. 3.18B). Wird hingegen zusätzlich auch das  $\Delta zhf$  Gen mutiert wächst die entsprechende Doppelmutante  $\Delta zhf\Delta zip2$  wie die  $\Delta zhf$  Einzelmutante. Die  $\Delta zhf$  Mutation verhält sich epistatisch zur  $\Delta zip2$  Mutation. Ohne ein funktionales Zhf Protein hat die  $\Delta zip2$  Mutation keinen Einfluss auf das Wachstum der *S. pombe* Zelle unter verschiedenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen.

### 3.3.5 $zip2^+$ Transkriptregulation

Nachdem eine Beteiligung von Zip2 am Wachstum unter Zinkmangel erkannt wurde, sollte nun untersucht werden, ob das  $zip2^+$  Transkript auch zinkabhängig reguliert wird. Es wurden Wildtyp und  $\Delta zhf$  Zellen in EMM (incl.  $1,39 \mu\text{M Zn}^{2+}$ ) bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,6 angezogen und in Zinkmangelmedium (EMM-Zn) oder unter hohen Zinkkonzentrationen ( $50 \mu\text{M}$ ) für 2 h inkubiert. Die Proben wurden gewaschen und der relative  $zip2^+$  Transkriptlevel in Bezug zum Aktinentranskript  $act1^+$  bestimmt. Es zeigte sich, dass  $zip2^+$  auf niedrigem Niveau im Vergleich zu  $act1^+$  exprimiert wird (Abb. 3.19A). Durch die Zugabe von  $50 \mu\text{M Zn}^{2+}$  reduzierte sich der  $zip2^+$  Transkriptlevel sowohl in Wildtyp- als auch in  $\Delta zhf$  Zellen. Zum einen war die  $zip2^+$  m-RNA Menge in  $\Delta zhf$  ca. 30 % niedriger als im Wildtyp. Zum anderen reduzierte sich durch die Zugabe von  $50 \mu\text{M Zn}^{2+}$  zum Medium. Mit 80 %

fällt die *zip2<sup>+</sup>* Transkriptabnahme in  $\Delta zhf$  deutlicher aus als im Wildtyp mit 45 %, was mit der erhöhten Zinksensitivität der  $\Delta zhf$  Mutante erklärt werden kann. Weiterhin konnte ein reduziertes *zip2<sup>+</sup>* Transkriptlevel in  $\Delta zhf$  Zellen im Vergleich zum Wildtyp unter Zinkmangel (EMM-Zn + 0  $\mu$ M) beobachtet werden.

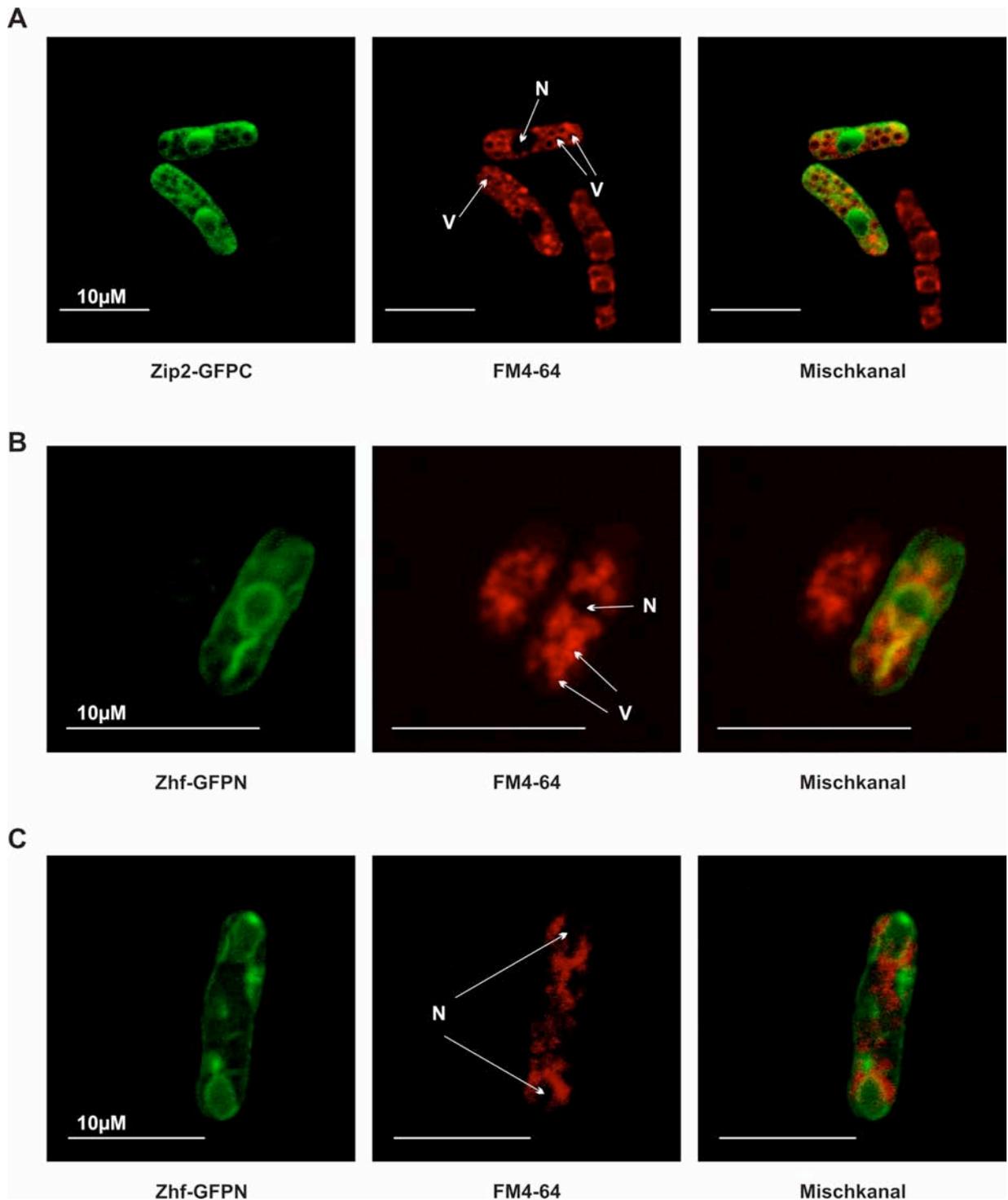


**Abb. 3.19 Die *zip2<sup>+</sup>* Expression ist zinkabhängig. A)** Wildtyp und  $\Delta zhf$  Mutante wurden in EMM kultiviert und für 2 h unter Zinkmangel (gestreifter Balken) bzw. hohen Zinkkonzentrationen (blauer Balken) inkubiert. Die Transkriptmenge wurde mittels quantitativer *real time* PCR ermittelt und der relative Level von *zip2<sup>+</sup>* zum *act1<sup>+</sup>* Transkript aufgetragen **B)** Zeitabhängige Induktion des *zip2<sup>+</sup>* Transkripts in Wildtyp (gestreifter Balken) und  $\Delta zhf$  Mutante (blauer Balken). Die Zellen wurden in 20  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup> angezogen und anschließend in Zinkmangelmedium (EMM-Zn) überimpft. Die Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und mittels quantitativer *real time* PCR analysiert. Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Stdabw., (n=3).

Das *zip2<sup>+</sup>* Transkript wird unter Zinkdefizienz exprimiert. In einem weiteren Versuch, sollte die zeitabhängige Induktion des *zip2<sup>+</sup>* Gens im Wildtyp im Vergleich zur  $\Delta zhf$  Mutante unter Zinkmangel untersucht werden. Wildtyp und  $\Delta zhf$  Mutante wurden in Medium mit 20  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup> angezogen, im Anschluss in Zinkmangelmedium (EMM-Zn) überimpft und es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Im Wildtyp erreicht der *zip2<sup>+</sup>* m-RNA Level schon nach 2 h sein Maximum (Abb. 3.19B). Dabei verdoppelte sich die Transkriptmenge gegenüber dem Zeitpunkt 0. In  $\Delta zhf$  Zellen ist die doppelte Menge an *zip2<sup>+</sup>* erst nach 4 h erreicht. Der *zip2<sup>+</sup>* Transkriptlevel im Wildtyp und  $\Delta zhf$  gleichen sich nach 6 h einander an (Abb. 3.19B). Die  $\Delta zhf$  Zellen reagieren verzögert auf den Zinkmangel mit der *zip2<sup>+</sup>* Transkriptakkumulation nach dem Transfer von Medium mit 20  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup> auf Zinkmangelmedium (EMM-Zn).

#### 3.3.8 Subzelluläre Lokalisation des Zip2 Proteins.

Die vorangegangenen Experimente weisen auf eine Funktion des Zip2 Proteins im Zinktransport hin. Möglicherweise spielt dieses Protein eine Rolle bei der Remobilisierung eines intrazellulären Zinkpools. Um diese Theorie zu testen, wurde die subzelluläre Verteilung des Zip2 Proteins mit einem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop untersucht.



**Abb. 3.20 Lokalisation von Zip2-GFP.** **A)** Lokalisation von Zip2-GFP in Wildtypzellen. **B) +C)** Lokalisation von Zhf-GFP in Wildtypzellen. Alle Stämme wurden über Nacht bei RT angezogen. Das Grünfluoreszierende Protein wurde im Zeiss Confocal LSM 510 meta mit 488 nm Filter abgebildet, während das rotfluoreszierende FM4-64 unter 543 nm abgebildet wurde. N = Nukleus, V = Vakuole.

Dazu wurden mittels GATEWAY Technologie Konstrukte für GFP-Fusionsproteine erstellt und in Wildtypzellen transformiert. Die Funktionalität des resultierenden C-terminal getaggetem Zip2-GFP Protein konnte bereits zuvor in Wachstumsanalysen der  $\Delta zrt1\Delta zip2$  Doppelmutante gezeigt werden (Abb. 3.17D). In Abbildung 3.20A ist die intrazelluläre Lokalisation des Zip2-GFP Proteins zu erkennen

(Abb. 3.20A). Für eine weitere Differenzierung der Zellkompartimente wurden die Zellen vor der Analyse mit dem rotfluoreszierenden Endocytosemarker FM4-64 behandelt. Eine Kolokalisation von Zip2-GFP und FM4-64 konnte aber ausgeschlossen werden. Das Zip2 Protein lokalisiert nicht an endosomalen beziehungsweise vakuolären Membranen. Zip2 wäre demnach nicht an der Zinkremobilisierung aus der Vakuole beteiligt. Vielmehr zeigte das Verteilungsmuster der Grünfluoreszenz des GFP getaggten Zip2 Proteins eine Ähnlichkeit zu Zhf-GFP. Zum Vergleich wurden Konstrukte für N-terminale GFP-Fusionsproteine vom Zhf-Transportproteins erstellt und in Wildtypzelle transformiert. Das GFP-Zhf Protein ist in der Kernmembran und in den Membranen des ER lokalisiert (Abb. 3.20B,C)(Clemens *et al.* 2002). Auch hier konnte keine Kolokalisation mit dem Vakuolenmarker FM4-64 festgestellt werden. Da sich die Verteilungsmuster beider Zinktransporter ähneln, könnte Zip2 bei der Remobilisierung von Zink aus dem ER eine Rolle spielen.

#### 3.4 Charakterisierung des ZIP-Transporters Zip3 aus *S. pombe*

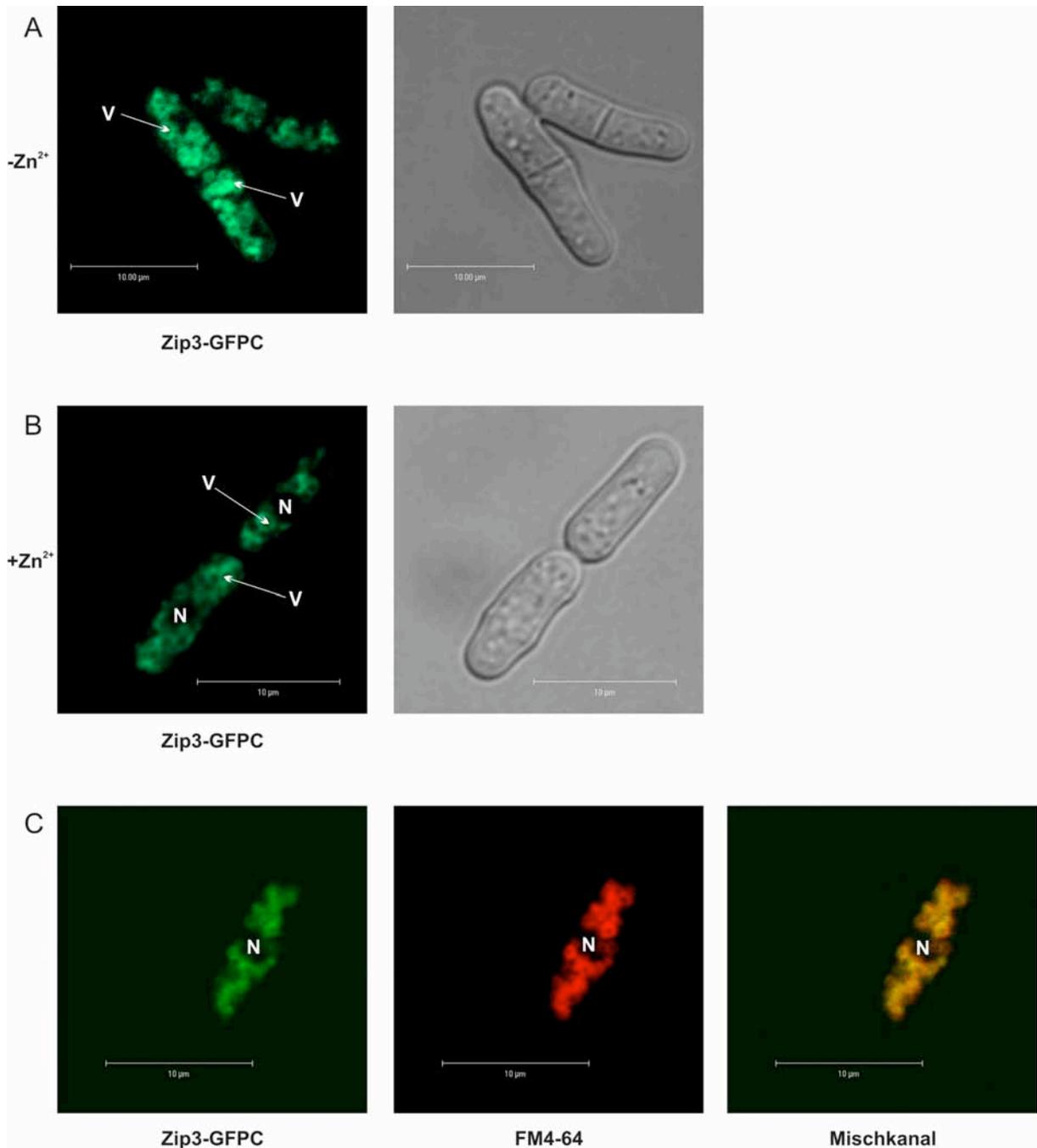
Zip3 wurde nach Homologievergleichen der LIV1/KE4 Familie der ZIP-Transporter zugeordnet. Die beiden charakterisierten Vertreter dieser Gruppe aus Maus mKe4 und *Sacharomyces cerevisiae* YKe4 wurden entgegen der bisherigen Auffassung, das ZIP-Transporter den cytosolischen Zinkgehalt erhöhen, als bidirektionale Transporter beschrieben (Huang *et al.* 2005; Kumánovics *et al.* 2006). MKe4 und YKe4 sind im Golgi-Apparat beziehungsweise im ER lokalisiert. Die Mutation des dritten in *S. pombe* vorhandenen Homolog der ZIP-Transporter-Familie zeigte in der Elementanalyse und auch in ersten Wachstumsversuchen keine Unterschiede zum Wildtyp (Bährecke 2004)(Abb. 3.1C,E).

##### 3.4.1 Subzelluläre Lokalisation von Zip3

Aufgrund der Einteilung in die Gruppe der LIV1/KE4 Proteine, von denen zwei Mitglieder als endoplasmatische Zinktransporter beschrieben wurden (Huang *et al.* 2005; Kumánovics *et al.* 2006) sollte nun die Lokalisation des Zip3 Proteins in *S. pombe* vorgenommen werden. Wildtypzellen wurden mit einem Plasmid transformiert, das das Gen für ein C-terminales Fusionsprotein Zip3-GFP trägt. Dieser Stamm wurde sowohl unter Zinkmangel (EMM-Zn), als auch unter moderaten Zinkkonzentrationen (20 µM) über Nacht bei Raumtemperatur angezogen. Die Ergebnisse zeigen, dass das Zip3-GFP Protein an intrazelluläre Membranen der *S. pombe* Zelle lokalisiert (Abb. 3.21A). Änderungen der Zinkkonzentration im Medium zeigen keine Änderung in der Lokalisation des Zip3-GFP Proteins (Abb. 3.21 A,B). Da die intrazelluläre Verteilung des Zip3-GFP Proteins ein vakuoläres Muster aufweist, wurden die Zellen vor der mikroskopischen Analyse mit FM4-64 markiert. Der rotfluoreszierende Farbstoff wird über Endocytose internalisiert und verbleibt in der

### 3. Ergebnisse

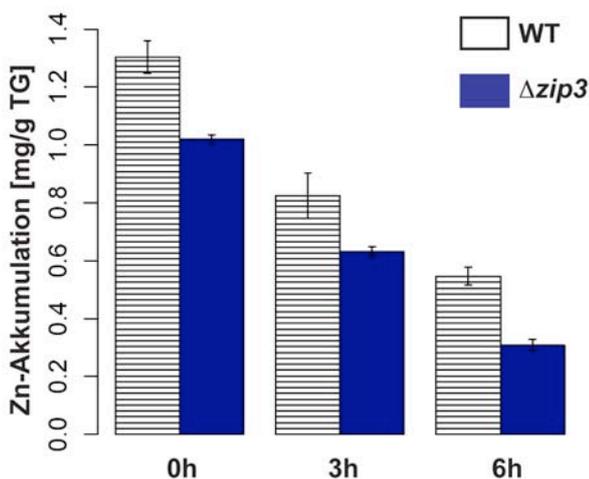
Vakuolenmembran. Die Überlagerung der grünen ZIP3-GFP Fluoreszenz und der roten FM4-64 Fluoreszenz zeigen eine Kolokalisation (Abb. 3.21C). Das Zip3 Protein ist somit in der Vakuolenmembranen der *S. pombe* Zellen lokalisiert.



**Abb. 3.21 Kolokalisation von Zip3-GFP mit Vakuolenmarker. A)** Lokalisation von Zip3-GFP in Wildtypzellen, die unter Zinkmangelbedingungen (EMM-Zn) angezogen wurden. **B)** Lokalisation von Zip3-GFP in Wildtypzellen, die unter 20 µM Zn<sup>2+</sup> angezogen wurden. **C)** Kolokalisation von Zip3-GFP mit FM4-64 in Wildtypzellen. Das grünfluoreszierende Protein wurde im Zeiss Confocal LSM 510 meta mit 488 nm Filter abgebildet, während das rotfluoreszierende FM4-64 unter 543 nm abgebildet wurde. N = Nukleus, V = Vakuole, Mischkanal = beide Bilder überlagert

### 3.4.2 Analyse des zellulären Zinkgehalts der $\Delta zip3$ Mutante

In den vorangegangenen Untersuchungen zur Zinkhomöostase in *S. pombe* gab es bislang keine Hinweise auf einen vakuolären Zinkspeicher analog zum *S. cerevisiae* System. Unter der Annahme, dass es sich bei Zip3 um einen Zinktransporter handelt, der für die Remobilisierung von Zink aus der Vakuole verantwortlich ist, wurden Wildtyp und  $\Delta zip3$  Zellen unter hohen Zinkkonzentrationen ( $100 \mu\text{M}$ ) angezogen und anschließend auf Zinkmangelmedium (EMM-Zn) überimpft. Nach 0, 3 und 6 h wurden die Zellen geerntet und der Zinkgehalt der Zellen mittels AAS bestimmt. Entgegen der Erwartung eines höheren Zinkgehalts in der  $\Delta zip3$  Mutante war der Gesamtzinkgehalt im Vergleich zum Wildtyp verringert (Abb. 3.22). Zu Beginn des Experiments betrug der Zinkgehalt von Zellen, die eine Insertion im  $zip3^+$  Gen tragen, 78 % des Wildtyps. Nach 6 h in Zinkmangelmedium sank der Anteil am Zinkgehalt von  $\Delta zip3$  im Vergleich zum Wildtyp weiter auf 56 % ab (Abb. 3.22).



**Abb. 3.22 Die Deletion von  $zip3^+$  führt zur geringfügigen Reduktion des Zinkgehalts.** *S. pombe* Wildtyp (gestreifte Balken) und  $\Delta zip3$  Mutante (blaue Balken) wurden unter hohen Zinkkonzentrationen ( $100 \mu\text{M}$ ) angezogen und anschließend in Zinkmangelmedium (EMM-Zn) überimpft. Zu drei verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und der Zinkgehalt der Zellen mittels AAS bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Stdbw., ( $n=4$ ).

Gemäß der Charakterisierung homologer Proteine könnte man vermuten, dass Zip3 unter hohen Zinkkonzentrationen  $\text{Zn}^{2+}$  über den Transport in die Vakuole entgiftet.

#### 3.5 Charakterisierung von AtIRT3 und AhIRT3 in *S. cerevisiae* und *S. pombe* Mutanten

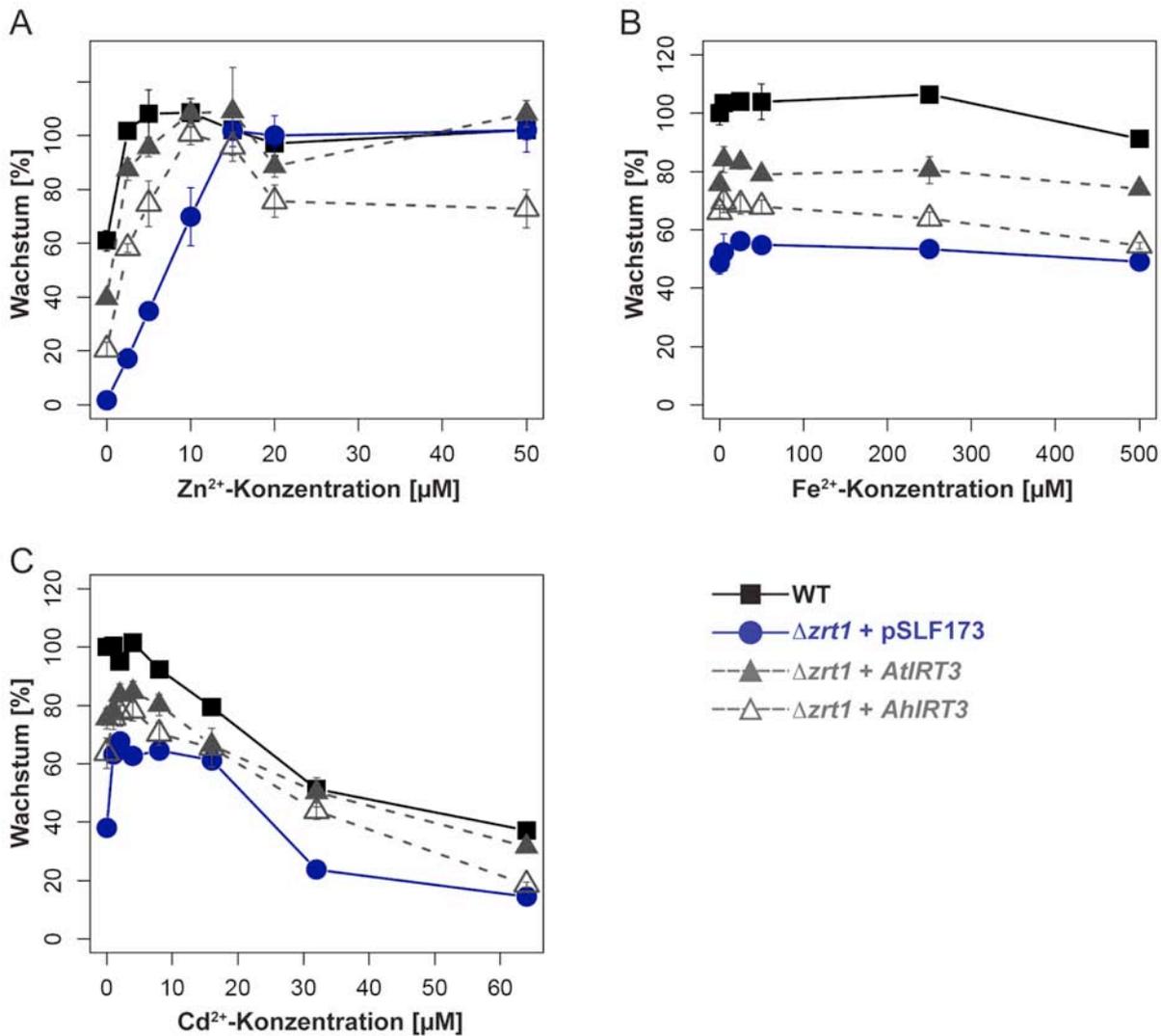
In einem weiteren Teil dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob es möglich ist pflanzliche ZIP-Transportproteine in *S. pombe* zu exprimieren und zu charakterisieren.

Zur funktionellen Charakterisierung der ZIP-Transporter IRT3 aus *A. thaliana* und *A. halleri* wurden Komplementationsstudien in der *S. pombe* Sp $\Delta zrt1$  Zinkaufnahmemutante durchgeführt. Plasmidcodiertes AtIRT3 und AhIRT3 wurde in die  $\Delta zrt1$  Mutante eingeführt und unter der Kontrolle des *nmt*-Promotors exprimiert. Der Wildtyp, eine  $\Delta zrt1$  Mutante mit leerem Vektor (pSLF173) und die Stämme  $\Delta zrt1+AtIRT3$  sowie  $\Delta zrt1+AhIRT3$  wurden auf verschiedenen Zinkkonzentrationen (0-50  $\mu\text{M}$ ) und 1  $\mu\text{M}$  Thiamin angezogen. Sowohl  $\Delta zrt1+AtIRT3$  als auch  $\Delta zrt1+AhIRT3$  zeigten unter niedrigen Zinkkonzentrationen im Medium nach 24 h eine höhere Zelldichte als die Kontrolle (Abb. 3.23A). Das Wachstum der Zellen war bei 5  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  im Medium in Zellen mit AtIRT3 um 64 % und mit AhIRT3 um 54 % im Vergleich zur  $\Delta zrt1$  Mutante erhöht. Bei 10  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  im Medium erreichen  $\Delta zrt1$  Mutantenzellen die mit AtIRT3 komplementiert wurden Wildtypniveau, während die  $\Delta zrt1$  Mutante noch Wachstumsdefizite aufweist.

*S. pombe* Zellen, die ein pflanzliches IRT3 Gen exprimieren, waren also in der Lage, die Zinkdefizienz der  $\Delta zrt1$  Mutante unter niedrigen Zinkkonzentrationen teilweise zu komplementieren.

In weiterführenden Experimenten sollte nun untersucht werden, ob andere Metallionen bei der Komplementation des Zinkaufnahmephänotyps interferieren und damit die Substratspezifität von AtIRT3 und AhIRT3 beschreiben. Dazu wurden die verschiedenen Stämme unter 5  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  und zusätzlich unter verschiedenen  $\text{Fe}^{2+}$ - (0-500  $\mu\text{M}$ ) und  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen (0-50  $\mu\text{M}$ ) angezogen. Die höchste Eisenkonzentration betrug das 100-fache der Zinkkonzentration.  $\text{Cd}^{2+}$  wurde bis zum 12,8-fachen Überschuss zugegeben. Der Wachstumsversuch unter verschiedenen  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentrationen wurde zusätzlich bei einer Konzentration von 1 mM Ascorbinsäure durchgeführt, um die Eisenkationen in reduzierter Form zu halten. In Medium ohne zusätzliche  $\text{Fe}^{2+}$ -Zugabe können die Stämme  $\Delta zrt1+AtIRT3$  und  $\Delta zrt1+AhIRT3$  durch das vorhandene  $\text{Zn}^{2+}$  im Medium besser wachsen als die  $\Delta zrt1$  Mutante (Abb. 3.23B). So liegt das Wachstum unter 0  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  der  $\Delta zrt1$  Mutante bei 48 %, des  $\Delta zrt1+AhIRT3$  Stamms bei 66 % und des  $\Delta zrt1+AtIRT3$  Stamms bei 75 % des Wildtypniveaus. Durch die Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$  zum Medium verändert sich das Wachstum der Stämme nur sehr geringfügig und liegt im Rahmen experimenteller Unterschiede. Unter verschiedenen Eisenkonzentrationen bleibt das Wachstum der Zellen unverändert. Auch im Wachstumsversuch unter verschiedenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen, waren die Unterschiede in der Zelldichte bei 0  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  auf das Wachstum unter niedrigen Zinkkonzentrationen (5  $\mu\text{M}$ ) zurückzuführen (Abb. 3.23C). Das gesteigerte Wachstum der Zellen unter niedrigen  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen (1  $\mu\text{M}$ -8  $\mu\text{M}$ ) wird durch einen unspezifischen Eintrag von  $\text{Zn}^{2+}$  durch die Cadmiumzugabe begründet. Keines der getesteten Metallsalze konnte den spezifischen Einfluss von

5  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  auf das Wachstum von  $\Delta zrt1+AtIRT3$  oder  $\Delta zrt1+AhIRT3$  signifikant hemmen (Abb. 3.23 B,C).



**Abb. 3.23** Wachstum der *AtIRT3*- und *AhIRT3*- exprimierenden  $\Delta zrt1$  Mutante unter verschiedenen  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentrationen und Kompetitionsanalyse mit  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$ . Der Wildtyp, die  $\Delta zrt1$  Mutante und die Stämme  $\Delta zrt1+AtIRT3$  sowie  $\Delta zrt1+AhIRT3$  wurden über Nacht in Medium mit moderater Zinkkonzentration (20  $\mu\text{M}$ ) und 1  $\mu\text{M}$  Thiamin angezogen. **A)** Das Wachstum der Stämme auf verschiedenen Zinkkonzentrationen wurde in EMM-Zn + 1  $\mu\text{M}$  Thiamin bestimmt. **B)** Das Wachstum der Stämme unter verschiedenen Eisenkonzentrationen wurde in EMM-Zn Medium + 5  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  + 1  $\mu\text{M}$  Thiamin + 1mM Na-Ascorbinsäure bestimmt. **C)** Das Wachstum der Stämme auf verschiedenen Cadmiumkonzentrationen wurde in EMM-Zn + 5  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  und 1  $\mu\text{M}$  Thiamin bestimmt. Alle Versuche wurden bei 30 °C für 24 h durchgeführt und anschließend die optische Dichte ( $\text{OD}_{600}$ ) der Kulturen gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Stdabw., (n=3-4).

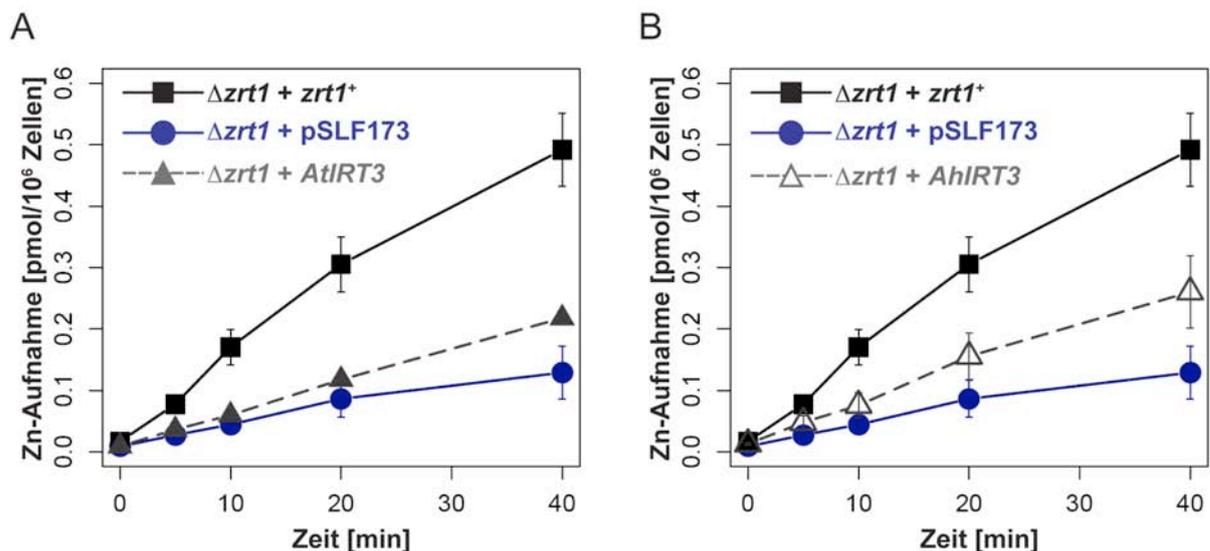
### 3.5.1 Zinktransport durch *AtIRT3* und *AhIRT3*

Aufgrund der erfolgreichen Komplementation der Zinkaufnahmemutante  $\Delta zrt1$  durch *AtIRT3* und *AhIRT3* in Wachstumsversuchen unter  $\text{Zn}^{2+}$ -Mangelbedingungen wurde vermutet, dass IRT3 wie auch *SpZrt1* am Zinkaufnahmetransport beteiligt ist. Um dies zu untersuchen wurden Kurzeintaufnahmeexperimente mit dem Radioisotop  $^{65}\text{Zn}$  durchgeführt. Als Kontrolle wurde der Stamm  $\Delta zrt1+zrt1^+$  mitgeführt, von dem bekannt war, dass er Zinkaufnahme zeigt (Abb. 3.4A,B). Die

### 3. Ergebnisse

Stämme wurden unter niedrigen Zinkkonzentrationen 5  $\mu\text{M}$  angezogen und dann für 4 h in Zinkmangelmedium (EMM-Zn) inkubiert. Der Aufnahmeversuch erfolgte unter Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$   $^{65}\text{Zn}$ , bei 30 °C, in Aufnahmepuffer über einen Zeitraum von 40 min. Wie erwartet zeigt der Stamm  $\Delta zrt1+zrt1^+$  eine erhöhte Zinkakkumulation im Vergleich zur  $\Delta zrt1$  Aufnahmemutante (Abb. 3.24A). Sowohl  $\Delta zrt1+AtIRT3$  als auch  $\Delta zrt1+AhIRT3$  waren in der Lage nach 40 min mehr Zink zu akkumulieren als die Aufnahmemutante. Die Aufnahme von  $\Delta zrt1+AtIRT3$  betrug innerhalb des getesteten Zeitabschnitts jedoch nur das 1,6-fache der Aufnahmemutante  $\Delta zrt1$ , während der Stamm  $\Delta zrt1+zrt1^+$  das 3,7-fache der Mutante akkumuliert (Abb. 3.24).

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl AtIRT3 als auch AhIRT3 in der Lage sind Zink zu transportieren. Im heterologen *S. pombe* System war die Aufnahme rate der pflanzlichen ZIP-Transporter deutlich niedriger als die des systemeigenen Aufnahmetransporters SpZrt1.



**Abb. 3.24 Zinkaufnahme durch AtIRT3 und AhIRT3 in der *S. pombe* Aufnahmemutante  $\Delta zrt1$ .** Die Stämme  $\Delta zrt1$ ,  $\Delta zrt1+zrt1^+$ ,  $\Delta zrt1+AtIRT3$  (A),  $\Delta zrt1+AhIRT3$  (B) wurden unter niedrigen Zinkkonzentrationen (5  $\mu\text{M}$ ) angezogen, für 4 h in Zinkmangelmedium kultiviert und anschließend die zeitabhängige Aufnahme von 10  $\mu\text{M}$   $^{65}\text{Zn}$  in Aufnahmepuffer über 40 min bei 30 °C gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Stdbw., (n=3).

In der *Saccharomyces cerevisiae* Zinkaufnahmemutante  $\Delta zrt1\Delta zrt2$  (*zhy3*) sind bereits mehrere pflanzliche Zinkaufnahmetransporter charakterisiert worden (Grotz *et al.* 1998; Rogers *et al.* 2000) und *S. cerevisiae* stellt somit ein etabliertes System für ein Zinkaufnahmeexperimente dar. Für weitere Experimente zur Zinkaufnahmeaktivität von IRT3 wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Kuo-Chen Yeh die Gene für IRT3 in *S. cerevisiae* *zhy3* exprimiert und Zinkaufnahmestudien durchgeführt (Abb.3.25A,B)(Lin *et al.* 2009). Als Positivkontrolle wurde der bereits charakterisierte pflanzliche Aufnahmetransporter AtIRT1 verwendet (Eide *et al.* 1996; Korshunova *et al.* 1999). Die Stämme *zhy3*+pFL61 (leerer Vektor), *zhy3*+AtIRT1, *zhy3*+AtIRT3 und *zhy3*+AhIRT3 wurden in SD Medium bis in die exponentielle Wachstumsphase angezogen. Die Zinkaufnahme wurde in Aufnahmepuffer mit 10  $\mu\text{M}$   $^{65}\text{Zn}$  über einen Zeitraum von 40 min durchgeführt. In den ersten 20 min

kann der Stamm *zhy3+AtIRT3* die Zinkakkumulation der *zhy3+AtIRT1* Positivkontrolle erreichen. Die Transportrate war doppelt so hoch wie die der Aufnahmemutante. Obwohl die Zinkakkumulation im Stamm *zhy3+AhIRT3* nicht so stark ausfällt wie in *zhy3+AtIRT1* war sie nach 20 min um 35 % gegenüber der Aufnahmemutante erhöht (Abb. 3.25A,B). Auch in *S. cerevisiae* konnte also gezeigt werden, dass es sich bei AtIRT3 und AhIRT3 um Zinkaufnahmetransporter handelt. Dabei konnte AtIRT3 Zinkaufnahmeraten erreichen die vergleichbar waren mit der AtIRT1 Kontrolle.

#### 3.5.2 Konkurrenz der IRT3 abhängigen Zinkaufnahme

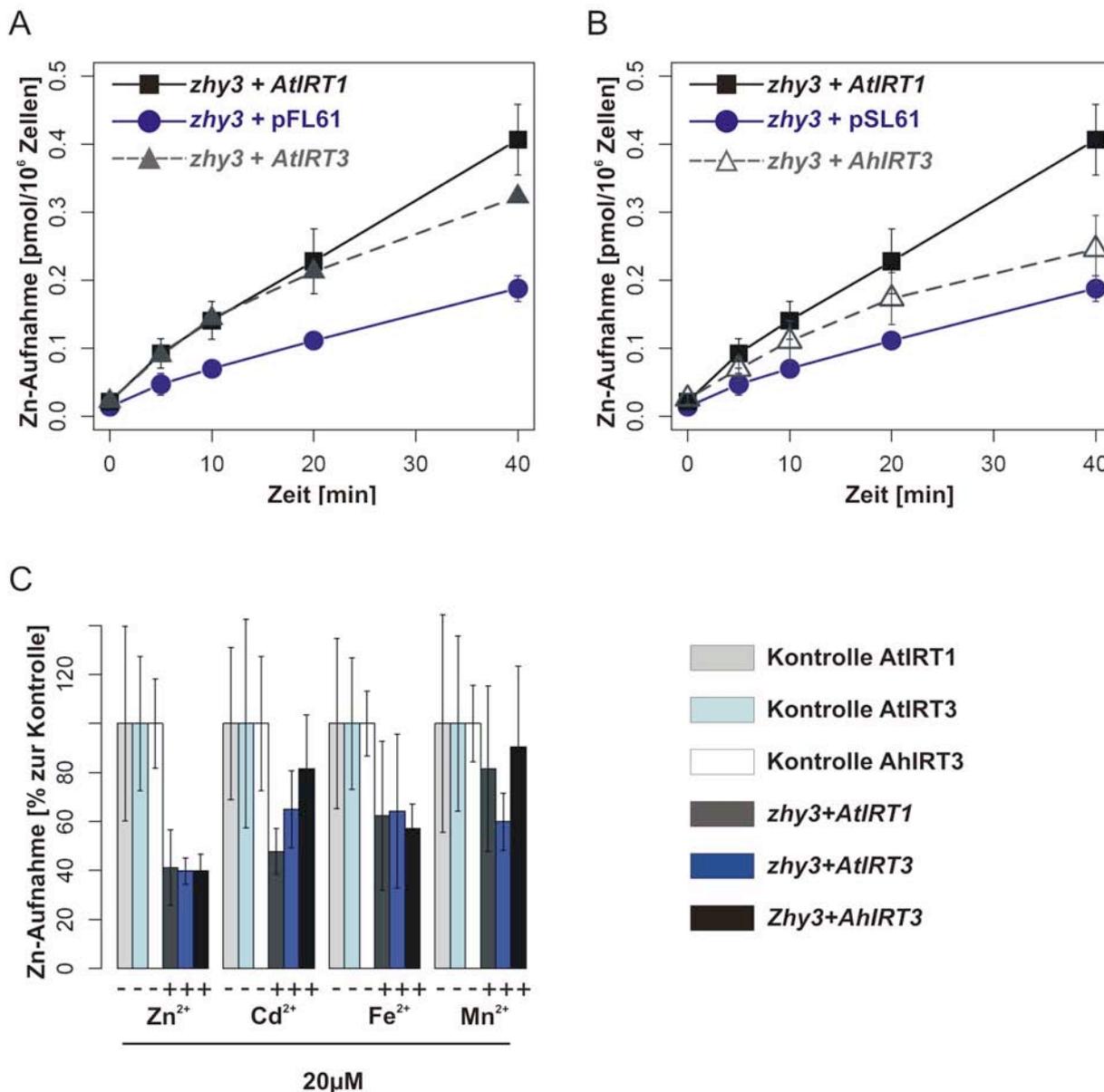
Die Aminosäuresequenzen von AtIRT3 und AhIRT3 ist zu 77 % identisch mit Ausnahme einer Deletion im N-Terminus. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Zink- und Eisenaufnahme des pflanzlichen ZIP-Transporters AtIRT1 in adäquaten *S. cerevisiae* Mutanten durch die Zugabe von Eisen, Zink und Mangan im Überschuss gehemmt werden kann (Eide *et al.* 1996; Korshunova *et al.* 1999). Darüber hinaus zeigten Rogers *et al.* dass der spezifische Austausch einzelner Aminosäuren von AtIRT1 zur Änderung des Substratspektrums führt und es somit auch zur Änderung im Konkurrenzverhalten bei der Zink- und Eisenaufnahme kommt (Rogers *et al.* 2000). *Arabidopsis halleri* und *Arabidopsis thaliana* wachsen auf unterschiedlichen Standorten mit unterschiedlichen Bodenmetallgehalten. Daher wurde die Arbeitshypothese erstellt, dass AtIRT3 und AhIRT3 ein abweichendes Substratspektrum aufgrund von Sequenzunterschieden aufweisen könnten.

Um zu testen, ob auch die Zinkaufnahme von IRT3 durch andere Metalle inhibiert wird, wurde das *S. cerevisiae* Modellsystem verwendet. Mit diesen Experimenten sollten auch mögliche Unterschiede im Konkurrenzverhalten zwischen den IRT3 Transportern aus *A. thaliana* und *A. halleri*, aufgrund ihrer unterschiedlichen Aminosäuresequenzen, untersucht werden. In der *S. cerevisiae* Aufnahmemutante *zhy3* wurden die Gene der pflanzlichen ZIP-Transporter AtIRT3, AhIRT3 und als Kontrolle AtIRT1 exprimiert. Die Stämme wurden bis zur exponentiellen Wachstumsphase in SD-Medium angezogen. Die Zinkaufnahmeversuche wurden über einen Zeitraum von 5 min unter Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$   $^{65}\text{Zn}$  durchgeführt. Die Konkurrenz wurde mit den bekannten Substraten von ZIP-Transportern,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  in zweifacher Konzentration zum radioaktiven  $\text{Zn}^{2+}$  untersucht. Zusammen mit  $\text{Fe}^{2+}$  wurde gleichzeitig 1 mM Ascorbinsäure zum Versuchsansatz und zur Kontrolle zugegeben. Die Zinkaufnahme von AtIRT3 wurde durch die nichtradioaktiven Kationen  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  inhibiert (Abb. 3.25C). Die Inhibierung war vergleichbar zu Zellen die AtIRT1 exprimieren. Auch die AhIRT3-abhängige Zinkaufnahme wurde durch zusätzliches  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{2+}$  in gleichem Maße wie die AtIRT1 abhängige Zinkaufnahme inhibiert. Die Konkurrenz durch  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  viel allerdings weniger stark aus (Abb. 3.25C).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Zinkaufnahme von IRT3 durch  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  inhibiert werden kann. Unterschiede zwischen AtIRT3 und AhIRT3 zeigten sich in der Stärke der Konkurrenz der  $\text{Zn}^{2+}$ -Aufnahme durch  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$ . Dabei wurde die Zinkaufnahme von AtIRT3 stärker durch

### 3. Ergebnisse

$\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  gehemmt als die von *AhIRT3*.



**Abb. 3.25 Zinkaufnahme und Konkurrenz der *AtIRT3* und *AhIRT3* exprimierenden *S. cerevisiae* Aufnahmevarianten *zhy3*.** Die Stämme *zhy3+pFL61*, *zhy3+AtIRT1* und *zhy3+AtIRT3* (A), bzw. *zhy3+AhIRT3* (B) wurden bis zur exponentiellen Wachstumsphase in SD-Medium kultiviert und die zeitabhängige <sup>65</sup>Zn-Aufnahme (10 µM) in Aufnahmebuffer über 40 min bei 30 °C gemessen. C) Konkurrenz der Zinkakkumulation. Die Stämme *zhy3+AtIRT1*, *zhy3+AtIRT3* und *zhy3+AhIRT3* wurden bis zur exponentiellen Wachstumsphase in SD-Medium kultiviert. Zu den Ansätzen wurden je 20 µM Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> und Cd<sup>2+</sup> zugegeben und die <sup>65</sup>Zn-Aufnahme nach 5 min gemessen. Die Zinkaufnahmeaktivität wird in Prozent zur Kontrollkultur angegeben. Die Zinkaufnahme der Kontrollen beträgt durchschnittlich 0,215 pmol/10<sup>6</sup> Zellen/5 min für *zhy3+AtIRT1*, 0,111 pmol/10<sup>6</sup> Zellen/5 min für *zhy3+AtIRT3* und 0,071 pmol/10<sup>6</sup> Zellen/5 min für *zhy3+AhIRT3*. Die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert ± Stdbw., (n=3-4).



### 4. Diskussion

Transportprozesse sind ein wichtiger Bestandteil der Metallhomöostase. Zum einen wird durch den Transport die Zelle mit den notwendigen Metallen aus dem extrazellulären Raum versorgt. Zum anderen hilft der Transport aus dem Cytoplasma hinaus bei essentiellen Entgiftungs- und Speicherungsprozessen überschüssiger Konzentrationen. Auch bei der Remobilisierung gespeicherter Metallionen spielen Transportprozesse eine entscheidende Rolle. In den letzten Jahren wurden viele Fortschritte in der Aufklärung der Metallhomöostase des eukaryotischen Modellsystems *Schizosaccharomyces pombe* erzielt (Clemens and Simm 2003). Diese Arbeit liefert einen weiteren Beitrag zu den molekularen Grundlagen der Zinkhomöostase in *S. pombe*. Der Fokus dieser Arbeit lag vor allem auf der Untersuchung von Mitgliedern der ZIP-Transporter-Familie und deren Zusammenspiel mit anderen Metallhomöostasefaktoren. Dabei konnten Erkenntnisse über die Zinkaufnahme, -speicherung und -remobilisierung gewonnen werden.

#### 4.1 SpZrt1 der Haupteintrittsweg für Zink in die *Schizosaccharomyces pombe* Zelle

Lebewesen benötigen hochaffine Transportsysteme um essentielle Kationen aufzunehmen. Unter den Mitgliedern der ZIP-Familie befinden sich in überwiegender Mehrzahl Vertreter, die den cytosolischen Zinkgehalt erhöhen (Gaither and Eide 2001). Darunter fallen auch eine Vielzahl von Aufnahmetransportern aus allen eukaryotischen Reichen - Pflanzen, Tiere und Pilze.

Aufgrund dieser Arbeit kann postuliert werden, dass es sich bei SpZrt1 um den Hauptaufnahmetransporter für Zink in *S. pombe* handelt. SpZrt1 besitzt eine hohe Affinität zu Zink und ist unter Zinklimitierung induziert. Außerdem ist SpZrt1 notwendig für das Wachstum unter zinklimitierenden Bedingungen. Folgende Experimente vor Beginn dieser Arbeit lieferten erste Hinweise darauf, dass SpZrt1 eine Funktion im Aufnahmetransport von *S. pombe* haben könnte. Aufgrund von Aminosäurevergleichen konnten in *S. pombe* drei homologe Mitglieder der ZIP-Familie erkannt werden (Gaither and Eide 2001; Bährecke 2004). Dabei zeigte SpZrt1 die größte Homologie zum hochaffinen Aufnahmetransporter Zrt1 aus *S. cerevisiae*. Eine Wachstumsanalyse der *S. pombe*  $\Delta zrt1$  Mutante auf verschiedenen Zinkkonzentrationen zeigte die Notwendigkeit von SpZrt1 für das Wachstum unter niedrigen Zinkkonzentrationen (Bährecke 2004). Bei einer ersten Analyse wurde der Einfluss von SpZrt1 auf den Gesamtzinkgehalt der *S. pombe* Zelle erkennbar. Die  $\Delta zrt1$  Mutante war gegenüber dem Wildtyp in ihrem Zinkgehalt um das 10-fache reduziert (Bährecke 2004). In der zinksensitiven  $\Delta zhf$  Mutante führte der Verlust des  $zrt1^+$  Gens zu einer erhöhten Zinktoleranz. Aufgrund der Ähnlichkeit zum Phänotyp der *S. cerevisiae* Mutante  $\Delta zrt1$  (Zhao and Eide 1996a) wurde für SpZrt1 die Arbeitshypothese erstellt, dass es sich hier um einen Aufnahmetransporter handeln könnte (Bährecke 2004).

Neben der Wachstumsreduktion auf Medium mit niedrigen Zinkkonzentrationen begleitet von einer Reduktion der Zinkakkumulation in der  $\Delta zrt1$  Mutante unterstützen weitere Analysen der vorliegenden Arbeit die Rolle von SpZrt1 als hochaffinen *S. pombe* Zinkaufnahmetransporter. Dabei liefern Kurzeitenaufnahmeexperimente den wohl stärksten Beweis für eine direkte Beteiligung von SpZrt1 am Zinkaufnahmetransport (Abb. 3.4A,B).

Der hochaffine *S. pombe* Aufnahmetransport wurde in Wildtypzellen, die unter zinkdefizienten Bedingungen angezogen wurden, gemessen. Die Zinkaufnahmerate betrug hier in den ersten 5 min der linearen Reaktion  $0,0130 \text{ pmol/min}/10^6$  Zellen (Abb. 3.4A,B). In Wildtypzellen, die vor dem Experiment bei moderaten Zinkkonzentrationen wuchsen, reduzierte sich die Aufnahmerate auf zirka  $1/3$  des hochaffinen Zinktransports auf  $0,0046 \text{ pmol/min}/10^6$  Zellen. Eine Mutation im  $zrt1^+$  Gen reduzierte die Zinkaufnahmerate auf  $0,0050 \text{ pmol/min}/10^6$  Zellen und ist vergleichbar mit der Aufnahmerate zinkgesättigter Wildtypzellen. Dies zeigt, dass für den hochaffinen Zinkaufnahmetransport in *S. pombe* ein funktionales SpZrt1-Protein notwendig ist. Weiterhin deuten diese Daten auf eine Regulation des hochaffinen Zinkaufnahmetransporters hin, da durch die Vorinkubation der Wildtypzellen mit verschiedenen Zinkkonzentrationen die Zinkaufnahmerate beeinflusst werden konnte. Der von SpZrt1 vermittelte Transport ist zudem zeit- und temperaturabhängig (Abb.4, Abb. 3.5).

Auch die Mutation des  $zrt1^+$  Gens aus *S. cerevisiae* führt zum Verlust der hochaffinen Zinkaufnahme (Zhao and Eide 1996a). Bei dem zu SpZrt1 homologen Aufnahmetransporter ScZrt1 führte die Anzucht auf Zinkmangelmedium zur Erhöhung der Zinkaufnahmerate, da es zu einer Induktion des hochaffinen Aufnahmesystems unter Zinkmangel kommt (Zhao and Eide 1996a)(vgl. Abb. 4.1).

Dass es sich bei der SpZrt1-abhängigen Zinkaufnahme um einen sehr spezifischen Prozess handelt, zeigten anschließende Kompetitionsanalysen der Kurzzeitzinkaufnahme. Kein anderes getestetes Metallkation war in der Lage die Aufnahme von radioaktivem  $^{65}\text{Zn}$  so effektiv zu inhibieren wie  $\text{Zn}^{2+}$  selbst. Nur  $\text{Cd}^{2+}$  zeigte in doppelter Konzentration eine ähnlich starke Reduktion der Zinkaufnahme. Die bekannten Substrate von ZIP-Transportern  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  behinderten die SpZrt1-abhängige Zinkaufnahme unter den getesteten Konzentrationen nicht. Aus den ICP-Analysen gibt es weitere Ergebnisse zur Metallakkumulation, die auf die hohe Spezifität von SpZrt1 für Zink hinweisen. Im Vergleich zum Wildtyp reduziert sich der intrazelluläre Zinkgehalt der  $\Delta zrt1$  Mutante drastisch, andere Metallgehalte bleiben aber weitgehend unbeeinflusst. Die Rolle von SpZrt1 in der Metallhomöostase stellte sich in der ICP-Analyse als zinkspezifisch dar (Abb. 3.1A).

ZIP-Transporter werden in der Literatur nicht ausschließlich mit dem Transport von  $\text{Zn}^{2+}$  in Verbindung gebracht, auch der Transport von  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  wurde beschrieben (Gaither and Eide 2001; Grass *et al.* 2005). Dennoch sind Spezifität und Affinität zu verschiedenen Kationen spezifisch für die einzelnen Vertreter der ZIP-Familie (Guerinot 2000; Gaither and Eide 2001). So kann

man zwischen Transportern mit einem breiten Substratspektrum und zinkspezifischen Transportern unterscheiden. Bei AtIRT1 handelt es sich um einen ZIP-Transporter mit breitem Substratspektrum der neben  $Zn^{2+}$  und  $Fe^{2+}$  auch  $Mn^{2+}$  und  $Cd^{2+}$  transportiert (Korshunova *et al.* 1999; Rogers *et al.* 2000). Auch ZupT, ein prokaryotischer Vertreter der ZIP-Familie aus *E. coli*, besitzt ein breites Substratspektrum. Neben  $Zn^{2+}$  und  $Fe^{2+}$  konnte für ZupT die Aufnahme von  $Co^{2+}$  nachgewiesen werden. Weiterhin führte die Deletion von *zupT* zu einer zusätzlichen Reduktion des  $Ni^{2+}$ - und  $Cu^{2+}$ -Gehalts in  $\Delta znuABC$  Zellen (Grass *et al.* 2002; Grass *et al.* 2005). Dagegen zeigt sich die Zinkaufnahmeaktivität des hochaffinen Aufnahmesystem ScZrt1 durch die Anwesenheit von  $Mn^{2+}$  und  $Fe^{2+}$  unbeeinflusst, während  $Cd^{2+}$  die Zinkaufnahme inhibieren konnte (Gitan *et al.* 1998). Auch die Zinkaufnahmetransporter AtZIP1 und AtZIP3 weisen eine große Spezifität für  $Zn^{2+}$  auf und sind nicht in der Lage  $Fe^{2+}$  zu transportieren (Grotz *et al.* 1998). In ähnlicher Weise sind die Säugerproteine hZip1, mZip1, mZip2 und mZip3 aktive Zinkaufnahmetransporter, die weitestgehend spezifisch für ihr Substrat sind (Gaither and Eide 2000; Gaither and Eide 2001; Dufner-Beattie *et al.* 2003a). Wie auch für SpZrt1 beobachtet wurde trotz großer Spezifität der einzelnen ZIP-Transporter zu Zink, eine Konkurrenz der Zinkaufnahme durch  $Cd^{2+}$  häufig beschrieben. Zum Beispiel für die ZIP-Transporter ScZrt1, hZIP2, AtZIP1, AtZIP3 und TcZNT1 (Gitan *et al.* 1998; Grotz *et al.* 1998; Gaither and Eide 2000; Pence *et al.* 2000; Gaither and Eide 2001). Es wird vermutet, dass es sich hierbei vor allem um einen antagonistischen Effekt handelt, aufgrund der ähnlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften beider Elemente.

### 4.1.1 Kontrolle der Zinkaufnahme durch Regulation von SpZrt1

Viele Organismen sind die meiste Zeit ihres Lebens mit Defizienzbedingungen konfrontiert. Deshalb sind für das Wachstum unter Mangelbedingungen effiziente Aufnahmesysteme notwendig. Die Induktion von Genen für Aufnahmetransporter unter Defizienzbedingungen stellt die erste und wichtigste Ebene der Metallhomöostaseregulation dar. Gleichzeitig kann es unter hohen Substratkonzentrationen zur Überakkumulation kommen. Aufnahmetransporter werden deshalb in Antwort auf den zellulären Spurenelementstatus reguliert.

So konnte in *S. pombe* die hochaffine Zinkaufnahme in Kurzzeitexperimenten im Wildtyp nur dann beobachtet werden, wenn die Zellen in nicht mehr als  $5 \mu M ZnCl_2$  angezogen und anschließend noch für 4 h in Zinkmangelmedium ( $0 \mu M$ ) kultiviert wurden (Abb. 3.4A,B). Die Zinkaufnahme erfolgte somit nur unter zinklimitierenden Bedingungen. Wurden die Zellen zuvor mit ausreichend  $Zn^{2+}$  versorgt ( $20 \mu M$ ), konnte lediglich eine Zinkaufnahme auf dem niedrigen Niveau der  $\Delta zrt1$  Mutante beobachtet werden (Abb. 3.4A,B), was auf eine Regulation des hochaffinen Transports hindeutet. Zum Abschluss des Experiments (nach 40 min) war die Aufnahme des zinkgesättigten Wildtyps sogar geringer als die der Aufnahmemutante, die keine Zinksättigung erfahren hatte (Abb. 3.4A,B). Übereinstimmend mit dieser Beobachtung steht, dass Zellen, die eine Mutation in *zrt1*<sup>+</sup> tragen bei

20  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  im Medium gleiche Wachstumsraten wie der Wildtyp erreichen, während sie unter niedrigeren Zinkkonzentrationen Wachstumseinbußen erleiden (Bährecke 2004). Das bedeutet, dass unter Bedingungen von über 20  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  kein SpZrt1 benötigt wird.

Weiterführend wurde die *zrt1*<sup>+</sup> Transkriptabundanz in Wildtypzellen in Abhängigkeit zur extrazellulären Zinkkonzentration untersucht. Dabei kam es zu einer für einen Aufnahmetransporter typischen Transkriptakkumulation unter Zinkdefizienz (Abb. 3.7A,C,D). Im Gegensatz dazu bedingten schon geringfügig erhöhte externe Zinkkonzentrationen eine Abnahme der *zrt1*<sup>+</sup> mRNA. Die Expression des Gens für Zrt1 wird somit substratabhängig reguliert und korreliert mit der hochaffinen Aufnahmeaktivität (Abb. 3.4A, Abb. 3.7A). Es konnte eine schnelle *zrt1*<sup>+</sup> Transkriptinduktion bereits 2 h nach Transfer der zinkgesättigten Wildtypzellen in Zinkmangelmedium beobachtet werden (Abb.3.7D). Auch in Mikroarrayanalysen konnte gezeigt werden, dass in Zellen, die unter Zinklimitierung wuchsen der *Spzrt1*<sup>+</sup> Transkriptlevel rund 10-fach höher exprimiert war im Vergleich zu Zellen, die unter normalen Medienbedingungen (1,39  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$ ) angezogen wurden (Dainty *et al.* 2008). Mit der Untersuchung zur Transkriptakkumulation konnte man *zrt1*<sup>+</sup> als eines der ersten zinkregulierten Gene in *S. pombe* erkennen (Abb. 3.7). Beim Gen für das Metallothionein *zym1*<sup>+</sup> konnte man ebenfalls eine zinkabhängige Transkriptakkumulation in *S. pombe* erkennen (Borrelly *et al.* 2002). Allerdings wird das *zym1*<sup>+</sup> Transkript im Gegensatz zu *zrt1*<sup>+</sup> unter hohen Zinkkonzentrationen exprimiert. Außerdem wurde die Transkriptakkumulation von *zym1*<sup>+</sup> nur in Vollmedium nicht aber in Minimalmedium beobachtet und war hier auch nicht zinkspezifisch (Simm 2004). Die zinkabhängige Regulation von *zrt1*<sup>+</sup> impliziert die Frage nach dem zinksensorischen Regulator. Dainty und Mitarbeiter haben festgestellt, dass die Transkriptregulation von *zrt1*<sup>+</sup> unabhängig von Sty1/Spc1 ist (Dainty *et al.* 2008). Bei Sty1/Spc1 handelt es sich um eine stressaktivierte MAP-Kinase Kaskade die in Antwort auf unterschiedliche Umweltbedingungen eine Anzahl von Genen exprimiert (Toone and Jones 1998). Außerdem zeigte sich die *Spzrt1*<sup>+</sup> Induktion auch unabhängig von Zip1 (Dainty *et al.* 2008), einem Transkriptionsfaktor, der nach Cadmiumstress eine Reihe von Gene zur Detoxifikation und zum Zellzyklusarrest induziert (Harrison *et al.* 2005). Man kann also vermuten, dass *zrt1*<sup>+</sup> durch einen eigenständigen, speziell auf die Zinkdefizienz ausgerichteten Weg reguliert wird.

In *S. cerevisiae* wird der hochaffine Aufnahmetransporter ScZrt1 unter Zinklimitierung durch den Zap1 Transkriptionsaktivator induziert (Zhao and Eide 1996a; Zhao and Eide 1997; Lyons *et al.* 2000). Das Zap1-Protein besitzt 7 Zinkfinger motive (ZF1-ZF7) (Zhao and Eide 1997), von denen ZF3-ZF7 für die DNA-Bindung an das zinkresponsive Element (ZRE) (Bird *et al.* 2000b), in der Promotorregion Zap1-regulierter Gene (Zhao *et al.* 1998), verantwortlich sind. Die Aktivität wird durch zwei Aktivierungsdomänen gesteuert (AD1, AD2). AD2 enthält zwei zinksensorische Zinkfinger motive (ZF1, ZF2) die notwendig für die zinkabhängige Regulation sind (Bird *et al.* 2003). Sowohl unter hohen als auch unter niedrigen Zinkkonzentrationen befindet sich das Zap1 Protein im Zellkern (Bird *et al.*

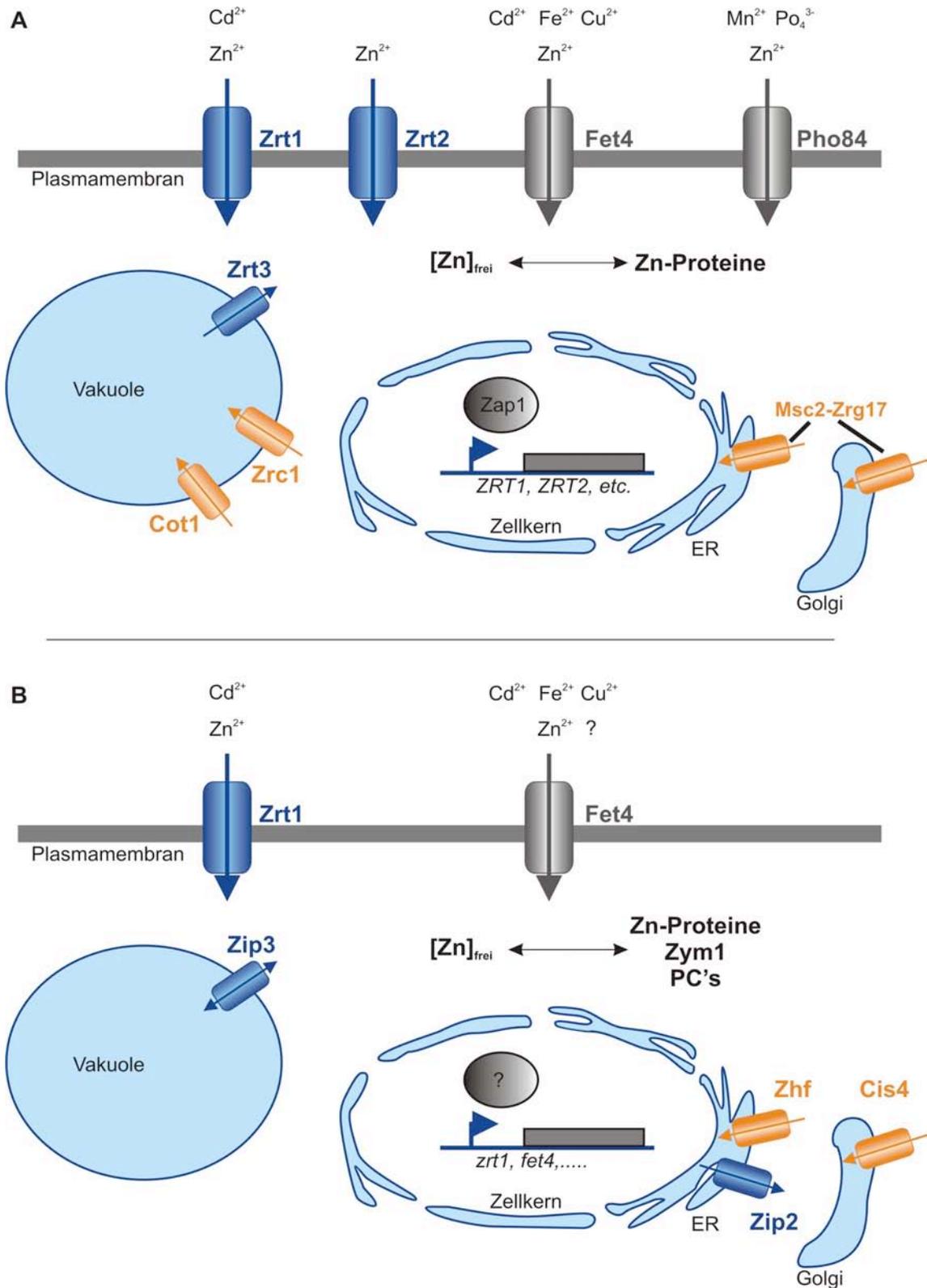
2000a). Ein Homolog des Zap1 Transkriptionsfaktors in anderen Systemen ist nicht bekannt. Jedoch stellt die Theorie, dass gepaarte Zinkfingerdomänen eine sensorische Rolle in der Zinkmetalloregulation spielen können, eine neue Möglichkeit der Identifikation zinkabhängiger Regulatoren dar (Bird *et al.* 2006). So könnte es in Zukunft auch für *S. pombe* möglich sein, durch eine computergestützte Analyse Zinkregulatoren zu entdecken.

In *Arabidopsis thaliana* sind die Transkripte der Zinkaufnahmetransporter AtZIP1 und AtZIP3 in den Wurzeln zinkdefizienter Pflanzen exprimiert, wohingegen in Pflanzen die hinreichend mit Zink versorgt wurden wenig oder keine AtZIP1- und AtZIP3- mRNA detektiert werden konnten (Grotz *et al.* 1998). AtZIP4 und AtZIP9 werden ebenfalls in den Wurzeln von *A. thaliana* zinkabhängig reguliert (Weber *et al.* 2004). Der verantwortliche Regulator ist allerdings auch hier noch nicht bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression des Gens für den Eisen- und Zinkaufnahmetransporter AtIRT1 durch den Fit1 Transkriptionsfaktor als Antwort auf Eisenmangel reguliert wird (Colangelo and Guerinot 2004; Jakoby *et al.* 2004; Bauer *et al.* 2007; Yuan *et al.* 2008). Obwohl AtIRT1 neben Fe<sup>2+</sup> auch Zn<sup>2+</sup> und Mn<sup>2+</sup> transportiert, wird das AtIRT1 Transkript nur unter Eisenmangel induziert (Eide *et al.* 1996; Korshunova *et al.* 1999; Connolly *et al.* 2002). Die breite Substratspezifität des Proteins scheint durch seine strikte transkriptionelle Kontrolle durch das Hauptsubstrat gegenreguliert zu werden (Wintz *et al.* 2003). Auch in anderen Systemen ist die zinkregulierte Expression von Genen für ZIP-Transporter bekannt, jedoch der verantwortliche Regulator nicht. So wird auch in *Thlaspi arvense* und *Thlaspi caerulescens* das Transkript des ZIP-Transporters ZNT1 unter Zinkmangel induziert (Pence *et al.* 2000). Die Transkription des Maus Zinkaufnahmetransporters mZIP4 wird ebenfalls durch eine Zinkdiät im Darm der Mäuse induziert, wohingegen die zinktransportierenden ZIP-Transporter mZIP1, mZIP2 und mZIP3 nicht transkriptionell durch Zinkmangel reguliert wurden (Dufner-Beattie *et al.* 2003a; Dufner-Beattie *et al.* 2003b). Die Autoren schließen eine Regulation durch Zink aber nicht vollständig aus, sondern vermuten eine Gewebespezifität.

Neben der substratabhängigen Expression von *Spzrt1*<sup>+</sup> konnte ebenfalls eine zeit- und konzentrationsabhängige Regulation der *Spzrt1*<sup>+</sup> mRNA durch Cd<sup>2+</sup> erkannt werden (Abb. 3.11). Aus Mikro- und Makroarray-Analysen war die erhöhte Expression in Antwort auf Cadmiumstress bereits zuvor bekannt und konnte hier näher untersucht werden (Chen *et al.* 2003; Simm 2004). Die *zrt1*<sup>+</sup> Transkriptakkumulation findet sowohl unter niedrigen Zinkkonzentrationen, als auch unter hohen Cadmiumkonzentrationen (50 µM) statt. Vermutlich kommt es bei hohen Cd<sup>2+</sup>-Konzentrationen zur Konkurrenz der chemischen Isomorphe Zn<sup>2+</sup> und Cd<sup>2+</sup>, so dass die Zelle zinkdefizient wird. Tatsächlich konnte die cadmiumabhängige Induktion des *zrt1*<sup>+</sup> Transkripts durch die Zugabe von Zn<sup>2+</sup> zum Medium gemindert werden (Abb. 3.11D). Es könnte sich bei diesem Effekt um eine Aufnahmekompetition handeln. Durch die Bindung von Cd<sup>2+</sup> an den Aufnahmetransporter oder durch den Transport von Cd<sup>2+</sup> über SpZrt1 wird die Zinkaufnahme behindert. Die inhibitorische Wirkung von

$\text{Cd}^{2+}$  auf die Zinkaufnahme konnte in Wettbewerbsversuchen zur Zinkaufnahme beobachtet werden (Abb. 3.6). Die Inhibierung des Hauptaufnahme-Transporters würde dann zum Zinkmangel in der Zelle führen und diese reagiert darauf mit der Induktion ihrer Zinkaufnahmesysteme, darunter SpZrt1. Zusätzlich zur Aufnahmekompetition kann es sich auch um eine Konkurrenz von  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  an intrazellulären Bindestellen handeln.  $\text{Cd}^{2+}$  ist in der Lage,  $\text{Zn}^{2+}$  von aktiven Enzymzentren zu verdrängen und sie dadurch zu inaktivieren (Stohs *et al.* 2001). Der Verlust funktioneller Enzyme, die als Kofaktor  $\text{Zn}^{2+}$  benötigen, könnte einen Zinkmangel in der Zelle auslösen, den die Zelle durch die Geninduktion der Aufnahmesysteme zu kompensieren versucht. Auch in *A. thaliana* sind die Transkripte der putativen Zinktransporter AtZIP4 und AtZIP9 nicht nur unter Zinkmangel sondern auch unter Cadmiumstress induziert (Weber *et al.* 2004; Weber *et al.* 2006). Der Transkriptlevel des Transporters AtIRT1, der neben  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  auch in der Lage ist  $\text{Cd}^{2+}$  zu transportieren, bleibt durch die Zugabe von Cadmium dagegen unbeeinflusst (Connolly *et al.* 2002). Wie bereits erwähnt, wird das Transkript von AtIRT1 nur durch das Fehlen des Hauptsubstrats  $\text{Fe}^{2+}$ , nicht aber durch  $\text{Zn}^{2+}$ -Mangel induziert (Connolly *et al.* 2002; Colangelo and Guerinot 2004). Ein Wettbewerbseffekt zwischen  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$ , wie er bei den zinkspezifischen und  $\text{Zn}^{2+}$  regulierten ZIP-Transportern zu beobachten ist, wirkt sich daher nicht auf das AtIRT1-Transkriptlevel aus. Dainty und Mitarbeiter beobachteten kürzlich die Induktion des Spzrt1<sup>+</sup> Transkripts durch  $\text{Cu}^{2+}$  (Dainty *et al.* 2008). Auch hier könnte es sich möglicherweise um einen Wettbewerbseffekt handeln, der aber nicht näher untersucht wurde.

Das zrt1<sup>+</sup> Transkript wurde nicht durch die externe Gabe von  $\text{Fe}^{2+}$  oder  $\text{Mn}^{2+}$  reguliert (Abb. 3.11A). Neben den Wettbewerbsexperimenten zeigt dieses Ergebnis, dass SpZrt1 spezifisch für den Zinktransport ist und sein Transkript nicht durch weitere mögliche Substrate reguliert wird (Abb. 3.6, Abb. 3.11A). In weiterführenden Experimenten kann die zinkspezifische Regulation von zrt1<sup>+</sup> nun als Marker für die cytoplasmatische Zinkkonzentration in *S. pombe* genutzt werden, da das Transkript nur unter Zinkdefizienzbedingungen exprimiert wird. Auch in *A. thaliana* wird die Expression einiger ZIP-Transporter als Marker für Zinkdefizienz verwendet (Talke *et al.* 2006; Hanikenne *et al.* 2008). Denkbar sind zrt1<sup>+</sup> Promotor-lacZ Konstrukte, die eine Zinkdefizienz von *S. pombe* Zellen über die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase farblich anzeigen könnten.



**Abb. 4.1 Vergleichender Überblick über Zinkaufnahme und intrazellulärer -homöostase von *S. cerevisiae* (A) und *S. pombe* (B)** (verändert nach (Eide 2006)). Transporter der ZIP-Familie sind blau gekennzeichnet während Transporter der CDF-Familie orange sind. Andere Transportfamilien sind grau abgebildet. In *S. cerevisiae* wurde der Zap1 Transkriptionsaktivator als Regulatorprotein der Zinkhomöostase erkannt. Ein homologer Gegenspieler in *S. pombe* konnte bisher nicht gefunden werden.

### 4.1.2 posttranskriptionelle Regulation von SpZrt1

Außer der transkriptionellen Regulation des SpZrt1 Zinkaufnahmetransports ist auch eine posttranskriptionelle Regulation möglich. Regulierter Proteinabbau von Membrantransportern hat sich als ein allgemein gültiger Mechanismus in Hefe und Säugern herausgestellt (Ooi *et al.* 1996; Liu and Culotta 1999; Katzmann *et al.* 2002; Hicke and Dunn 2003; Kim *et al.* 2004; Wang *et al.* 2004a; Felice *et al.* 2005). In semiquantitativen Western-Blot Analysen konnte in dieser Arbeit ein direkter Zusammenhang zwischen Transkriptlevel und Proteinlevel des SpZrt1 Transporters festgestellt werden (Abb. 3.9). Unter hohen Zinkkonzentrationen kommt es zur Reduktion des SpZrt1 Proteins. Um diese Reduktion näher zu untersuchen, wurden Transkript- und Proteinsynthese durch die Zugabe des Translationshemmers Cycloheximid funktionell entkoppelt und der Abbau des SpZrt1 Proteins unter Zinkmangel (EMM-Zn) und hohen Zinkkonzentrationen (200  $\mu$ M) überprüft. Tatsächlich zeigte sich unter Zinkmangel das SpZrt1 Protein stabiler als unter Zinküberangebot (Abb. 3.10). Im Vergleich zu anderen Systemen erfolgte der Abbau des SpZrt1 Proteins bei hohen Zn-Konzentrationen jedoch vergleichsweise langsam. So konnte zum Beispiel in *S. cerevisiae* eine deutliche Reduktion des ScZrt1 Proteins bereits nach 30 min festgestellt werden (Gitan *et al.* 1998), während SpZrt1 erst 2 h nach der externen Zinkkonzentration degradiert wurde. Allerdings gibt es Unterschiede in den verwendeten Zinkkonzentrationen. So wurden die *S. cerevisiae* Zellen mit 2 mM  $ZnCl_2$  behandelt, während *S. pombe* nur einer externen Zinkkonzentration von 200  $\mu$ M ausgesetzt war. Zinkkonzentrationen von 2 mM können in EMM nicht erreicht werden, da dann Medienbestandteile ausfallen.

Dennoch kann vermutet werden, dass die SpZrt1-Aktivität posttranslational durch zinkstimulierte Endocytose kontrolliert wird, zumal Zrt1-HA an intrazellulären Membranen lokalisiert wurde (Abb. 3.14). Die metallinduzierte Endocytose dient der umgehenden Reduktion der Aufnahmeaktivität von Metalltransportern um eine Akkumulation der Metalle über ein toxisches Level hinaus zu verhindern (Kerkeb *et al.* 2008). ScZrt1 ist in *S. cerevisiae* Zellen die unter Zinklimitierung angezogen wurden, ein Plasmamembranprotein. Eine anschließende Inkubation in Medium mit hohen Zinkkonzentrationen beschleunigt die Endocytose von ScZrt1, gefolgt von einem Verlust der Zinkaufnahmefähigkeit (Gitan *et al.* 1998). Das Signal für die Endocytose erfolgt über Ubiquitinierung eines Lysinrestes in der cytoplasmatischen Domäne von ScZrt1 zwischen TM III und TM IV (Gitan and Eide 2000). Nach der Internalisierung wird das Protein zur Vakuole transportiert und dort durch Proteasen abgebaut (Gitan *et al.* 1998). Auch in anderen Organismen ist die posttranslationale Regulation der Zinkaufnahmetransporter bekannt. Das Vorkommen von mZIP4 an der Plasmamembran von Mauszellen wird durch das Füttern der Mäuse mit einer zinkangereicherten Diät schnell vermindert (Dufner-Beattie *et al.* 2003b). Das humane hZIP4 akkumuliert in der Plasmamembran unter Zinkdefizienz und wird endocytotiert bei Zinkkonzentrationen von 1  $\mu$ M (Kim *et al.* 2004). Die Endocytose ist Voraussetzung für den lysosomalen ZIP4 Proteinabbau, der ab

Zinkkonzentrationen von 10-20  $\mu\text{M}$  stattfindet (Mao *et al.* 2007).

Für SpZrt1 besteht ebenfalls die Möglichkeit eines konzentrationsabhängigen Proteinabbaus, der eventuell für den vergleichsweise späten Beginn des Abbaus unter hohen Zinkkonzentrationen verantwortlich ist. Die Wiederholung der Versuche zum Proteinabbau mit dem Hintergrund der *zhf*<sup>+</sup> Mutation, könnte die Zellen für den zinkabhängigen Abbau von SpZrt1 sensibilisieren, da die  $\Delta\text{zhf}$  Zellen deutlich zinksensitiver sind als der Wildtyp. So könnte die Beobachtung, dass der Proteinlevel von SpZrt1 nach Induktion durch Zinkmangel innerhalb weniger Stunden wieder abnimmt, auf eine solche sensitivere Regulation hindeuten (Abb. 3.9D). Dass metallregulatorische Endocytose und Proteinabbau durch verschiedene sensorische Mechanismen reguliert werden könnten, zeigte die Mutagenesestudie an hZIP4. Die 5 Histidine des histidinreichen Motivs zwischen TM III und TM IV waren nicht für die Endocytose, jedoch für den Abbau von hZIP4 verantwortlich (Mao *et al.* 2007). Dies könnte ein weiterer Hinweis für die vermutete Funktion der Histidinmotive als Metallsensoren darstellen. Erst die Mutation aller 5 Histidine konnte den zinkstimulierten Abbau von hZIP4 unterdrücken. ScZrt1 und SpZrt1 besitzen hohe Homologien in der Aminosäuresequenz der Transmembrandomänen, jedoch enthält SpZrt1 in der variablen Region zwischen TM III und TM IV 5 Histidine mehr als ScZrt1 (Bährecke 2004). Ob diese Beobachtung signifikant für die posttranslationale Regulation durch Proteinabbau der hochaffinen Zinkaufnahmetransporter beider Hefen ist müsste in Mutagenesestudien untersucht werden. Obwohl auch das Gründungsmitglied der ZIP-Transporter AtIRT1 in Abhängigkeit des Substrats  $\text{Fe}^{2+}$  posttranslational reguliert wird, zeigte eine Mutation aller 4 Histidine der variablen Region keinen Einfluss auf den Proteinabbau von AtIRT1 (Kerkeb *et al.* 2008). Die zusätzlich zur transkriptionellen Kontrolle auftretende Regulation der ZIP-Proteine durch Endocytose und Proteinabbau unterstreicht die Bedeutung der Aufnahmekontrolle von essentiellen aber potentiell toxischen Metallen.

### 4.1.3 Der Verlust des *zhf* Gens führt zu einer sensitiven Regulation der *zrt1*<sup>+</sup> Expression

Die Speichermutante  $\Delta\text{zhf}$  zeigt eine veränderte Regulation der Zinkaufnahme und -akkumulation in *S. pombe*. Wird die Zinkakkumulation der  $\Delta\text{zhf}$  Mutante über einen längeren Zeitraum beobachtet (2 h, 12 h, 22 h), so ist diese im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Dies zeigt sowohl die Bestimmung der Gesamtzinkkonzentration (Abb. 3.2), als auch die zeitabhängige Messung der Aufnahmerate von <sup>65</sup>Zn (Bloß 2001). Der Verlust des Zhf-Transporters führt zur verminderten Zinkakkumulation in *S. pombe*, da die Mutante nicht mehr in der Lage ist, durch den Transport über die Kompartimentenmembran Zink im ER zu speichern (Bloß 2001; Clemens *et al.* 2002). Gleichzeitig führt der fehlende Entgiftungstransport in der  $\Delta\text{zhf}$  Mutante zu einem cytoplasmatischen Zinküberschuss. Dieses wird dadurch deutlich, dass es schon beim Wachstum in 0,2  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  zur 14-fachen Reduktion des *Spzrt1*<sup>+</sup> Transkripts im Vergleich zum Wildtyp kommt (Abb. 3.7C). Ab 20  $\mu\text{M}$

$Zn^{2+}$  sind Transkript und Protein des Aufnahmetransporters SpZrt1 nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.7C, Abb. 3.9B). Der cytoplasmatische Zinkpool ist gesättigt, so dass der Aufnahmetransporter SpZrt1 nicht mehr benötigt wird. Im Wildtyp hingegen führt der Transport über die intrazelluläre Membran kontinuierlich zu einer Verringerung der cytoplasmatischen Zinkkonzentration und SpZrt1 ist auch bis zu Konzentrationen von 200  $\mu M$  noch detektierbar (Abb. 3.9A). Darauf, dass im Cytoplasma von  $\Delta zhf$  Zellen unter bestimmten Bedingungen eine höhere Zinkkonzentration vorhanden sein könnte, weisen auch Untersuchungen zur Bildung von Phytochelatinen hin (Tennstedt *et al.* 2009). Die Bildung von Phytochelatinen erfolgt im Cytoplasma und wird durch verschiedene Kationen, darunter auch Zink, induziert (Grill *et al.* 1987; Maitani *et al.* 1996; Tennstedt *et al.* 2009). In der  $\Delta zhf$  Mutante konnte nicht nur nach externer Zinkgabe, sondern auch unter Kontrollbedingungen die Bildung von Phytochelatinen beobachtet werden (Tennstedt *et al.* 2009). Die Bildung von Phytochelatinen deutet auf eine Detoxifikationsreaktion hin, die wahrscheinlich auf eine erhöhte Zinkkonzentration im Cytoplasma zurückzuführen ist. Externe Zinkkonzentrationen über 20  $\mu M$  führen außerdem zur Wachstumsreduktion der  $\Delta zhf$  Mutante (Clemens *et al.* 2002; Bährecke 2004). Im Cytoplasma ist hier die toxische Zinkkonzentration erreicht. Auch in *S. cerevisiae* führt die Mutation von  $\Delta zrc1$  und  $\Delta cot1$  zur Zinksensitivität der Zellen und zeigt, dass das ER in *S. pombe* einen Zinkspeicher vergleichbar zur Vakuole von *S. cerevisiae* darstellt (Ellis *et al.* 2004) (vgl. Abb. 4.1). Aus dem Säugersystem ist der CDF-Transporter Znt7 bekannt. Er wurde im Golgi-Apparat lokalisiert. Der Verlust der *Znt7* Allele führt zur Reduktion der Zinkakkumulation. Ein Verlust der Zinkaufnahmefähigkeit konnte dabei nicht beobachtet werden (Huang *et al.* 2007). Obwohl es durch die Mutation in *Znt7* zu einer Reduktion der Zinkakkumulation kommt wird die cytoplasmatische Zinkkonzentration erhöht. Dies führt zur transkriptionellen Aktivierung von *Znt1* (Huang *et al.* 2007). Bei ZNT1 handelt es sich um einen Effluxtransporter, der Zink über die Plasmamembran transportiert (Palmiter and Findley 1995). Die *Znt1* mRNA wird unter hohen zellulären Zinkkonzentrationen durch den Transkriptionsfaktor MTF-1 induziert (Langmade *et al.* 2000). Auch in diesem System zeigt sich, dass der Transport über intrazelluläre Membranen, hier dem Golgi-Apparat einen Einfluss auf die Regulation von Plasmamembrantransportern ausübt.

Kurzzeitaufnahmeexperimente über einen Zeitraum von 6 min, in denen die Zellen unter niedrigen Zinkkonzentrationen angezogen wurden (EMM incl. 1,39  $\mu M$   $Zn^{2+}$ ), zeigen keine Unterschiede in der Zinkaufnahme zwischen Wildtyp und  $\Delta zhf$  (Bloß 2001). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass durch die Mutation im *zhf<sup>+</sup>* Gen zwar die Speicherung von  $Zn^{2+}$  beeinträchtigt ist, jedoch nicht die  $Zn^{2+}$ -Aufnahme. In weiteren Kurzzeitexperimenten zur Zinkaufnahme wurden *S. pombe* Wildtyp-,  $\Delta zhf$ - und  $\Delta zrt1$ -Zellen in Medium mit moderaten Zinkkonzentrationen (20  $\mu M$ ) vorinkubiert und anschließend unter Zinkmangel gesetzt. In diesem Fall betrug die Zinkaufnahme von  $\Delta zhf$  mehr als das Doppelte der Zinkaufnahme von Wildtyp und  $\Delta zrt1$  Mutante (Abb. 3.4C). Dieser anscheinende Gegensatz zu den Zinkakkumulationsexperimenten (Abb. 3.2A, Abb. 3.1E) kann damit

erklärt werden, dass die  $\Delta zhf$  Mutante bei moderaten externen Zinkkonzentrationen nicht in der Lage war einen intrazellulären Speicher anzulegen, auf den sie unter den Zinkmangelbedingungen zurückgreifen kann. So ist bekannt, dass  $\Delta zhf$  Zellen unter  $20 \mu\text{M Zn}^{2+}$  nur zirka 1/10 der Gesamtzinkkonzentration des Wildtyps akkumulieren (Bährecke 2004)(Abb. 3.2A, Abb. 3.1E). Durch die Mutation in  $zhf^+$  und dem daraus resultierenden Verlust der Speicherfähigkeit ist die Zelle hauptsächlich auf ihren cytoplasmatischen Zinkpool beschränkt. Die anschließenden Zinkmangelbedingungen führten zu einem unterschiedlichen Zinkbedarf bei Wildtyp und  $\Delta zhf$  Mutante. Die  $\Delta zhf$  Mutante reagiert kurzzeitig mit einer höheren Zinkaufnahme. Diese Zinkaufnahme ist abhängig vom SpZrt1 Aufnahmetransporter, da die Doppelmutante  $\Delta zhf\Delta zrt1$  insgesamt weniger  $^{65}\text{Zn}$  aufnimmt als die  $\Delta zrt1$  Einzelmutante (Abb. 3.4C, Abb. 3.4D).

Aus anderen Systemen sind Kurzeitenaufnahmeexperimente bekannt, in denen der Transport über intrazelluläre Membranen einen indirekten Einfluss auf den Aufnahmetransport ausübt, der sich im Gesamtzinkgehalt der Zelle widerspiegelt. So vermitteln die beiden CDF-Transporter Cot1 und Zrc1 den Transport von  $\text{Zn}^{2+}$  in die Vakuole von *S. cerevisiae* (Kamizono *et al.* 1989; Conklin *et al.* 1992). Die Zinkaufnahme rate zinkdefizienter  $\Delta cot1$ ,  $\Delta zrc1$  und  $\Delta zrc1\Delta cot1$  Zellen ist in den ersten 5 min vergleichbar mit der des Wildtyps. Die Speichermutanten  $\Delta zrc1$  und  $\Delta cot1$  sind weiterhin zinkaufnahmefähig. Während die Zinkakkumulation im Wildtyp über einen Zeitraum von 20 min linear verläuft mündet die Akkumulation der  $\Delta zrc1$  und  $\Delta cot1$  Mutanten aber nach 5 min in einem Plateau (MacDiarmid *et al.* 2003). Der Gesamtzinkgehalt der Mutantenzellen bleibt niedriger als im Wildtyp. Da Cot1 und Zrc1 das aufgenommene Zink nicht mehr aus dem Cytoplasma entfernen können, kommt es zur Sättigung des cytoplasmatischen Zinkpools und es wird kein weiteres Zink mehr aufgenommen. Trotz der Unterschiede im Speicherort von *S. pombe* (ER) und *S. cerevisiae* (Vakuole), wirkt sich eine Mutation der Speichertransporter Zhf bzw. Cot1 und Zrc1 auf die Zinkakkumulation nicht aber auf die Kurzzeitzinkaufnahme in ähnlicher Weise aus (Bloß 2001; Clemens *et al.* 2002; MacDiarmid *et al.* 2003; Ellis *et al.* 2004). Die Ergebnisse von MacDiarmid und Koautoren weisen darauf hin, dass Zinkionen aus dem extrazellulären Raum zunächst in den cytoplasmatischen Zinkpool gelangen (MacDiarmid *et al.* 2000). Hier werden Defizienz-, aber auch toxische Zinkkonzentrationen von Sensoren wahrgenommen und verfügbares, "freies" Zink wird anschließend in ein entsprechendes Kompartiment zur Speicherung und Entgiftung weitertransportiert (Conklin *et al.* 1994; Zhao and Eide 1997; MacDiarmid *et al.* 2003). Im Speicherkompartiment wird der Zinkstatus nicht mehr durch den cytoplasmatischen Zinkregulator wahrgenommen und die Zelle kann hohe Konzentrationen an Zink tolerieren. Eine Remobilisierung unter Defizienzbedingungen bleibt dennoch möglich (MacDiarmid *et al.* 2000). Ist die Speicherung aufgrund von Mutationen in den CDF-Transportern Cot1 und Zrc1 in *S. cerevisiae* oder Zhf in *S. pombe* nicht möglich so führt dies zu einer Reduktion des cytoplasmatischen Zinkpools, der nur durch den Aufnahmetransport ausgeglichen werden kann (vgl Abb. 4.1).

Die erhöhte Zinkaufnahme der  $\Delta zhf$  Mutante nach dem Wechsel der externen Zinkkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  zu Zinkmangel wird wahrscheinlich zum größten Teil durch die erhöhte Transkription von  $zrt1^+$  gewährleistet. In einem zeitabhängigen Experiment, bei dem die Zellen von moderaten Zinkkonzentrationen (20  $\mu\text{M}$ ) auf Zinkmangel (EMM-Zn) überimpft wurden, erfolgte eine erhöhte  $zrt1^+$  mRNA-Akkumulation sowohl im Wildtyp als auch in  $\Delta zhf$  Zellen nach 2 h (Abb. 3.7D). Nach 4 h zeigte die  $\Delta zhf$  Mutante im Vergleich zum Wildtyp aber ein deutlich erhöhtes  $Spzrt1^+$ -Transkriptlevel. Da Zeitraum und Anzuchtbedingungen von Zinkaufnahmeexperiment und Transkriptquantifizierung übereinstimmen, kann von einer Korrelation der erhöhten  $zrt1^+$ -Transkriptexpression und der Zinkaufnahme in  $\Delta zhf$  ausgegangen werden (Abb. 3.4C, Abb. 3.4D, Abb. 3.7D). Da die  $zrt1^+$  Expression als ein Marker für den cytoplasmatischen Zinkstatus genutzt werden kann (vgl. Abschnitt 4.1.1), deutet die  $zrt1^+$  Induktion auf einen Zinkmangel in der  $\Delta zhf$  Mutante hin. Gleichzeitig bedeutet das, dass die Funktion von Zhf nicht nur eine Entgiftung hoher Zinkkonzentrationen, sondern auch die Anlage eines Zinkspeichers für Zinkdefizienzbedingungen ist. So wird auch der CDF-Transporter Zrc1 aus *S. cerevisiae*, der für den Zinktransport in die Vakuole verantwortlich ist, unter zinklimitierenden Bedingungen benötigt (Miyabe *et al.* 2000). Im Gegensatz zu  $zhf^+$ , dessen Expression unabhängig von der äußeren Zinkkonzentration erfolgt (Clemens *et al.* 2002), wird die  $Sczrc1^+$  Expression durch den Zap1 Transkriptionsfaktor unter Zinklimitierung induziert (MacDiarmid *et al.* 2003). Möglicherweise wird die Aktivität von Zhf posttranslational reguliert.

Aufgrund der Tatsache das Mikroorganismen ständig wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt sind birgt die Kompartimentierung von Mikronährelementen einen evolutionären Fortschritt. Das Speicherorganell, ob Vakuole oder ER, bietet einen Puffer gegenüber dem cytoplasmatischen Zinkpool und indirekt auch externem  $\text{Zn}^{2+}$ . Wenn der Speicher aufgrund von Mutation nicht mehr bedient werden kann, hat dies direkte Auswirkungen auf die Zinkhomöostase der Zellen. Sie reagieren sensitiver gegenüber Änderungen der externen Zinkkonzentration.

### 4.1.4 SpZrt1 Lokalisation

Die Studien zur Lokalisation verschiedener SpZrt1 Fusionsproteine zeigten, dass diese sich an internen Membranstrukturen befinden, die auf ER oder Golgi-Apparat schließen lassen (Abb. 3.14). Diese Ergebnisse scheinen auf den ersten Blick nicht mit einer Funktion von SpZrt1 als Aufnahmetransporter übereinzustimmen. In einer allgemeinen Proteinlokalisationsstudie der gesamten proteinkodierenden offenen Leserahmen des *Schizosaccharomyces pombe* Genoms wurde SpZrt1-YFP ebenfalls in der ER-Membran detektiert (Matsuyama *et al.* 2006). Desweiteren wurde eine sich ändernde Lokalisation mehrfach für ZIP-Aufnahmetransporter beschrieben. Für viele ZIP-Aufnahmetransporter konnte eine Internalisierung in Abhängigkeit der äußeren Metallionenkonzentration gezeigt werden, so dass die Proteine je nach Umweltbedingungen in Plasmamembran oder an inneren Membranen vorliegen (Gitan *et al.* 1998; Gitan and Eide 2000; Kim

*et al.* 2004; Mao *et al.* 2007). So könnte auch die Aktivität von SpZrt1 durch Endocytose reguliert werden und der größte Anteil des Fusionsproteins deshalb an intrazellulären Membranen vorkommen. Allerdings konnte bei keinem der getesteten SpZrt1 Fusionsproteine eine Lokalisation an der Plasmamembran festgestellt werden, auch wenn die Zellen in Zinkmangelmedium angezogen wurden. Da SpZrt1 sowohl für das Wachstum unter niedrigen Zinkkonzentrationen als auch für die Zinkaufnahme in niedrigen Konzentrationsbereichen verantwortlich ist, sollte unter diesen Bedingungen der Aufnahmetransporter an der Plasmamembran zu finden sein. Eine weitere Vermutung ist, dass die verschiedenen Proteintags einen Einfluss auf die Lokalisation ausüben. Für Zellen, die das Gen für ein SpZrt1-GFP Fusionsprotein tragen, konnte eine Wachstumsreduktion unter Zinkmangel beobachtet werden, was darauf hindeuten könnte, dass das Fusionsprotein die Aktivität des ungetaggen Wildtyp SpZrt1 nicht vollständig komplementieren kann. Im Gegensatz dazu wuchsen Zellen, die anstelle des Wildtypgens das Gen für ein C-terminales SpZrt1-HA Fusionsprotein trugen auf Wildtypniveau (Abb. 3.8A). Das HA-Fusionsprotein war demnach funktional, zeigte aber dennoch lediglich eine Lokalisation an intrazellulären Membranen. Außerdem konnte die mangelnde Zinkaufnahme der  $\Delta zrt1$  Mutante durch die Expression eines plasmidkodierten N-terminal getagtem HA-SpZrt1 Protein komplementiert werden (Abb. 3.2, Abb. 3.3, Abb. 3.4 (Bährecke 2004)). Auch N-terminal HA-getaggtes SpZrt1 Protein ist somit funktional. Auch diese Zellen zeigten eine Lokalisation von SpZrt1 an internen Membranen. Wurde in der  $Zn^{2+}$ -Aufnahmemutante  $\Delta zrt1$  von einem plasmidkodierten Gen ein C-terminales Zrt1 HA-Fusionsprotein exprimiert konnte die Mutante jedoch nicht komplementiert werden, was darauf hindeutet, dass in diesem Fall das C-terminale Fusionsprotein nicht funktional ist (Bährecke 2004). Die ZIP-Transporter AtIRT3 und AhIRT3 konnten mit einem C-terminalen HA Tag die  $\Delta zrt1$  Mutante ebenfalls nicht komplementieren. Generell scheint es sich hierbei möglicherweise um ein technisches Problem, der plasmidkodierten C-terminalen Fusionsproteine zu handeln. Auch die Expression der Proteine wurde mittels Westernblotanalyse überprüft (Bährecke 2004). Obwohl Lokalisationssignaturen sich im allgemeinen am N-Terminus von Proteinen befinden, könnte auch der C-Terminus einen Einfluss auf die Funktion von SpZrt1 haben. Von den zinktransportierenden CDF-Transportern ist bekannt, dass sie als Homo- oder Heterodimer vorkommen (Bloß *et al.* 2002; Blaudez *et al.* 2003; Ellis *et al.* 2005; Wei and Fu 2006). Für die Homodimerisierung des CDF-Transporters YiiP aus *E. coli* ist der C-Terminus verantwortlich (Lu and Fu 2007). Für ZIP-Transporter ist eine Dimerisierung allerdings nicht bekannt. Blaudez *et al.* diskutieren in diesem Zusammenhang ein leucinreiches Motiv am C-Terminus, das aufgrund seiner Ähnlichkeit zum Leucinzippermotiv für eine Protein-Protein Interaktion verantwortlich sein könnte (Blaudez *et al.* 2003). Es konnte ein Einfluss der Leucinreste auf die Funktion des CDF-Transporters PtMTP1, jedoch keine Notwendigkeit für dessen Oligomerisierung festgestellt werden (Blaudez *et al.* 2003). In ZIP-Transportern, so auch in SpZrt1 befinden sich am C-Terminus mehrere konservierte Leucinreste. Eventuell könnten manche C-terminale Tags diese konservierten Leucine in ihrer

Funktion behindern. Um den Einfluss, der Proteintags auf C- oder N-Terminus zu unterbinden könnte alternativ ein HA-Tag in die große cytoplasmatische Schleife von SpZrt1 zwischen TM III und TM IV integriert werden. Da in der Literatur aber noch keine gesicherten Erkenntnisse über die Funktion dieser Schleife vorliegen, könnte es auch hier zu einer Beeinträchtigung der Funktion von SpZrt1 kommen. Um generell den Einfluss von Proteintags auszuschließen, könnte die Lokalisation des SpZrt1-Proteins durch einen nativen Antikörper erfolgen. Dazu würde sich die Herstellung eines Peptidantikörpers anbieten. Ein für diese Anwendung geeignetes Peptid könnte ebenfalls in der cytoplasmatischen Schleife von SpZrt1 zwischen TM III und TM IV liegen. In diesem Bereich weisen ZIP Transporter untereinander eine große Variabilität auf. So befindet sich bei SpZrt1 in diesem Bereich das 15 Aminosäuren große Peptid (HECVKDDLEEVKLEP), das spezifisch für SpZrt1 in *S. pombe* ist. Die Herstellung eines Peptidantikörpers gegen ein Peptid aus der cytoplasmatischen Domäne zwischen TM III und TM IV eines ZIP-Transporters war bereits für AtIRT1 erfolgreich (Vert *et al.* 2002), liefert aber dennoch keine Garantie für den Erfolg dieses Versuchs. Mit einem funktionalen Antikörper gegen die cytoplasmatische Domäne von SpZrt1 könnte über die Methode der Membranfraktionierung und anschließendem Westernblot die Lokalisation von SpZrt1 überprüft werden. Ein weiteres Problem bei der Lokalisation kann die Überexpression der Fusionsproteine darstellen. Zwar war N-terminal getaggtetes HA-SpZrt1-Fusionsprotein in der Lage die  $\Delta zrt1$  Mutante zu komplementieren, dies geschah allerdings nur wenn die Expression vom thiaminsensitiven *nmf*-Promotor aus reprimiert wurde, beziehungsweise der schwächere *nmf*<sup>\*\*\*</sup>-Promotor verwendet wurde (Bährecke 2004). Wurde das HA-SpZrt1 Fusionsprotein überexprimiert kam es zur Wachstumsreduktion der Zellen über das Maß der Mutante hinaus (Bährecke 2004). Man kann also davon ausgehen, dass auch die Proteinkonzentration von SpZrt1 einen großen Einfluss auf die Vitalität der Zellen ausübt. Bei geringer Expression von *zrt1*<sup>+</sup>, konnte die Mehrheit der Proteine durch die Methode der Immunlokalisation nur an internen Membranstrukturen erkannt werden (Abb. 14B). Ob eine Minderheit, die die Funktionalität des SpZrt1-Fusionsproteine bestimmt, sich allerdings an der Plasmamembran befanden, konnte mit den gegebenen mikroskopischen Methoden nicht nachgewiesen werden. Auch hier bietet eine Membranfraktionierung mit anschließender Westernblot-Analyse eine Möglichkeit quantitative Unterschiede in der Verteilung von HA-SpZrt1 in den Membranen zu untersuchen.

### 4.2 Die Hintertür, Zinkaufnahme ohne SpZrt1

Der Transport essentieller Nährstoffe ist durch hoch- und niederaffine Systeme in genetisch und biochemisch getrennte Aufnahmewege eingeteilt. In *S. cerevisiae* wird die hochaffine Zinkaufnahme durch den ZIP-Transporter ScZrt1 gewährleistet (Zhao and Eide 1996a). Der niederaffine Zinkaufnahmetransport wird dagegen vom ZIP-Transporter ScZrt2 übernommen (Zhao and Eide 1996b). Mit SpZrt1 konnte in der vorliegenden Arbeit das funktionelle Analogon zu ScZrt1

charakterisiert werden. Bei Abwesenheit des hochaffinen Zinkaufnahmetransporters SpZrt1, konnte in verschiedenen Experimenten die Aktivität eines weiteren Zinkaufnahmesystems niedriger Affinität in *S. pombe* beobachtet werden. Zum einen zeigte die Mutante im Gen des Zinkaufnahmetransporters SpZrt1 zwar ein eingeschränktes Wachstum unter niedrigen Konzentrationen, ist aber dennoch lebensfähig. Das Wachstum der  $\Delta zrt1$  Mutante kann durch die externe Gabe moderater Zinkkonzentrationen (20  $\mu\text{M}$ ) auf Wildtypniveau angeglichen werden (Bährecke 2004). Man kann davon ausgehen, dass das zum Wachstum benötigte  $\text{Zn}^{2+}$  nun über ein niederaffines Transportsystem in ausreichender Konzentration das Cytoplasma der Zelle erreicht. Auch die Mutation des hochaffinen Zinkaufnahmetransporters ScZrt1 aus *S. cerevisiae* war nicht letal, führte aber zur Wachstumsreduktion bei niedriger Zinkversorgung (Zhao and Eide 1996a). Die *S. pombe*  $\Delta zrt1$  Mutante ist außerdem weiterhin in der Lage zumindest unter hohen Zinkkonzentrationen Zink zu akkumulieren (Abb. 3.3). Langzeitstudien zur Zinkakkumulation zwischen Wildtyp- und  $\Delta zrt1$ -Zellen, die unter verschiedenen Zinkkonzentrationen angezogen wurden, zeigen, dass die interne Zinkkonzentration über weite Zinkkonzentrationsbereiche im Medium deutlich niedriger liegt als im Wildtyp. Dennoch steigt sie ab 40  $\mu\text{M}$  Zink im Medium in  $\Delta zrt1$  proportional zu externen Zinkkonzentration an, bis bei 640  $\mu\text{M}$  die Gesamtzinkkonzentration des Wildtyps erreicht ist (Abb. 3.3). Der Aufnahmetransport muss in diesem Fall von einem zweiten Transportsystem niedriger Affinität übernommen werden.

Die niederaffine Zinkaufnahmerate konnte unter Abwesenheit des hochaffinen Aufnahmetransporters SpZrt1 gemessen werden. Kurzeitenaufnahmeexperimente mit  $^{65}\text{Zn}^{2+}$  zeigen eine Zinkaufnahme der  $\Delta zrt1$  Mutante, die deutlich niedriger liegt als im Wildtyp, jedoch nach 40 min ca. 80 % des Wildtyps erreicht (Abb. 3.4A,B). Auch in kürzeren Zeitabschnitten nimmt  $\Delta zrt1$   $\text{Zn}^{2+}$  auf. Nach 5 min erreicht der niederaffine Zinkaufnahmetransport unter Abwesenheit von SpZrt1 38 % des Wildtyps und erreicht somit einen vergleichbaren Wert zum zinkgesättigten Wildtyp. Auch in *S. cerevisiae* wurde der niederaffine Transport in Abwesenheit des hochaffinen Aufnahmetransporters ScZrt1 beobachtet und hauptsächlich auf die Aktivität des ZIP-Transporters ScZrt2 zurückgeführt (Zhao and Eide 1996b). Um die Substratspezifität des niederaffinen Systems in *S. pombe* zu testen, wurden Wettbewerbsversuche zur Zinkaufnahme durchgeführt. Das niederaffine System lässt sich genauso wie das hochaffine System durch  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  inhibieren, zeigt aber im Gegensatz zu SpZrt1 zusätzlich eine Inhibierung durch  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$ . In *S. cerevisiae* konnte sowohl hoch- als auch niederaffiner Zinktransport über ScZrt1 und ScZrt2 durch  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  inhibiert werden (Zhao and Eide 1996b). Die Autoren schlossen aufgrund der Wettbewerbsexperimente auf die enge Verwandtschaft zwischen hoch- und niederaffinen System in *S. cerevisiae*, die mit Charakterisierung von ScZrt1 und ScZrt2 auch bestätigt wurde (Zhao and Eide 1996a; Zhao and Eide 1996b). Im Umkehrschluss kann davon ausgegangen werden, dass die unterschiedliche Konkurrenz der Zinkaufnahme von hoch- und niederaffinen System in *S. pombe* auf verwandtschaftlich entfernte

Transporter hindeutet. Die radioaktive Zinkaufnahme der hochaffinen Transporter AtZIP1 und AtZIP3 aus *A. thaliana* wurde nach heterologer Expression in *S. cerevisiae* nur leicht durch  $\text{Cd}^{2+}$  kompetitiv gehemmt. Im Gegensatz dazu wurde das niederaffine System AtZIP2 aus *A. thaliana* im heterologen System durch  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  in gleichem Maße gehemmt wie durch  $\text{Zn}^{2+}$  (Grotz *et al.* 1998). Hier zeichnet sich das niederaffine System durch ein breiteres Substratspektrum aus als das hochaffine. Ein Defekt des hochaffinen Eisenaufnahmetransportsystems Fet3 aus *S. cerevisiae* führt zur erhöhten Metallsensitivität, die aus der erhöhten Expression von niederaffinen Transportern mit breitem Substratspektrum herrührt (Li and Kaplan 1998). Auch der Verlust des hochaffinen Zinkaufnahmetransporters SpZrt1 könnte so zur veränderten Spezifität der Zinkaufnahme in *S. pombe* führen. Genomweite Aminosäuresequenzanalysen in *S. pombe* zeigen kein direktes Homolog zum ScZrt2 Zinkaufnahmetransporter, so dass sich die Frage stellt welcher Transporter für die niederaffine Zinkaufnahme verantwortlich ist. In dieser Arbeit wurde ein weiteres ZIP-Homolog aus *S. pombe* charakterisiert. Eine Mutante im *zip2<sup>+</sup>* Gen weist eine Wachstumsreduktion unter Zinkmangel (EMM-Zn) auf (Abb. 3.17C). Diese Wachstumsreduktion wird durch die zusätzliche Mutation des Gens für den Aufnahmetransporter SpZrt1 verstärkt (Abb. 3.17D). Dennoch kann es sich bei Zip2 voraussichtlich nicht um einen Aufnahmetransporter niedriger Affinität handeln, da die Mutante unter hohen Zinkkonzentrationen mehr Zink akkumuliert als der Wildtyp (Abb. 3.1E, Abb. 3.15). Auch Wachstum und Elementprofil der ebenfalls untersuchten  $\Delta\text{zip3}$  Mutante weisen nicht auf eine Beteiligung des Proteins am  $\text{Zn}^{2+}$ -Aufnahmetransport hin (Bährecke 2004)(Abb. 3.1E). Wegen der geringeren Substratspezifität des niederaffinen Transporters konkurrieren wahrscheinlich verschiedene Metalle mit der Zinkaufnahme. Diese Konkurrenz würde wiederum zu einer relativ niedrigen intrazellulären Zinkkonzentration führen und in einer erhöhten Expression der zur Verfügung stehenden niederaffinen Transporter münden. So könnten auch andere Metalle verstärkt akkumuliert werden.

In der vorliegenden Arbeit lassen sich zwei Hinweise auf ein Transportprotein finden, das neben seiner niederen Affinität zu Zink möglicherweise an der Eisenaufnahme in *S. pombe* beteiligt ist. Neben der starken Konkurrenz der niederaffinen Zinkaufnahme durch  $\text{Fe}^{2+}$ , die nahezu 100 % beträgt, ist unter niedrigen Zinkkonzentrationen (10  $\mu\text{M}$ ) die Eisenakkumulation der  $\Delta\text{zrt1}$  Mutante leicht erhöht (Abb. 3.1A,F Abb. 3.6). Die Eisenakkumulation der Doppelmutante  $\Delta\text{zrt1}\Delta\text{zip2}$  ist sogar ca. 45 % höher als die des Wildtyps (Anhang I). Führt man dem Medium nun ausreichen  $\text{Zn}^{2+}$  zu (30  $\mu\text{M}$ ) beträgt der Unterschied im Eisengehalt zwischen Wildtyp und  $\Delta\text{zrt1}\Delta\text{zip2}$  Doppelmutante nur noch ca. 20 % (Anhang I). Unter moderater Zinkkonzentration (20  $\mu\text{M}$ ) und zusätzlich 100  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  im Medium ist die Eisenakkumulation der  $\Delta\text{zrt1}\Delta\text{zip2}$  Mutante sogar ca. 60 % höher als im Wildtyp (Abb. 3.1F). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der niederaffine Zinktransport über einen Eisentransporter abläuft. In *S. cerevisiae* stellt Fet4 einen niederaffinen Eintrittsweg für Eisen dar (Dix *et al.* 1994). Vor allem unter anaeroben Bedingungen deckt die Zelle ihren Eisenbedarf über Fet4,

denn die an das hochaffine Eisenaufnahmesystem Fet3 gekoppelte Reduktase Ftr1 benötigt Sauerstoff zur Katalyse (ter Linde *et al.* 1999; Jensen and Culotta 2002). Unter Eisendefizienz wird *fet4<sup>+</sup>* durch den Transkriptionsfaktor Aft1 reguliert (Waters and Eide 2002). Unter Zinkdefizienz wird das *fet4<sup>+</sup>* Transkript dagegen durch den zinkregulatorischen Aktivator Zap1 induziert (Waters and Eide 2002). ScFet4 übernimmt in Abwesenheit der Aufnahmetransporter ScZrt1 und ScZrt2 den Zinktransport in die *S. cerevisiae* Zelle (Waters and Eide 2002). Es existiert ein *fet4<sup>+</sup>* Homolog in *S. pombe* (SPBP26C9.03c)(vgl. Abb. 4.1). Das Transkript von SpFet4 wird sowohl unter Zinkmangel, als auch unter Abwesenheit von SpZrt1 induziert (Dainty *et al.* 2008). Die Deletion von *Spfet4<sup>+</sup>* allein führte weder zu Sensitivität bei zinklimitierenden Wachstumsbedingungen noch beeinflusste sie die intrazelluläre Zinkkonzentration. Die Doppelmutante  $\Delta zrt1 \Delta fet4$  verstärkte jedoch die Sensitivität der *Sp\Delta zrt1* Mutante gegenüber Zinkmangel und war nicht in der Lage auf EMM-Agar ( $1,39 \mu\text{M Zn}^{2+}$ ) zu wachsen (Dainty *et al.* 2008). Dieses deutet darauf hin, dass SpFet4 eine Rolle in der Zinkakkumulation spielt. Die zinkabhängige Regulation sowohl von *Spzrt1<sup>+</sup>* als auch von *fet4<sup>+</sup>* stellt die Frage nach dem verantwortlichen Regulator der Zinkhomöostase von *S. pombe*. Für die transkriptionelle Regulation in der Eisenhomöostase ist der Repressor Fep1 verantwortlich (Pelletier *et al.* 2002). Der Zinkfingertranskriptionsfaktor bindet als Antwort auf Eisenüberschuss in der Promotorregion des reduktiven Eisenaufnahmesystems Frp1, Fio1. Ob auch die Transkription von *fet4<sup>+</sup>* durch Fep1 reprimiert wird ist nicht bekannt. In Mikroarrayanalysen konnte keine eisenabhängige Expression von *Spfet4* festgestellt werden (Rustici *et al.* 2007). Allerdings wird auch *fet4* aus *S. cerevisiae* erst in Abwesenheit des hochaffinen Aufnahmetransporters Fet3 hochreguliert (Li and Kaplan 1998; Waters and Eide 2002).

### 4.3 Kompartimentierung: Zip2 ist ein Zinkaufnahmetransporter, der für die Remobilisierung des internen Zinkspeichers verantwortlich ist

Die Zinkakkumulation im ER von *S. pombe* wurde zuerst in Wildtypzellen, die unter hohen Zinkkonzentrationen angezogen wurden, durch ESI (electron spectroscopic image) beobachtet (Clemens *et al.* 2002). Gleichzeitig konnte der für die Zinkakkumulation verantwortliche Transporter Zhf, ein Mitglied der CDF-Familie, identifiziert werden (Borrelly *et al.* 2002; Clemens *et al.* 2002). Mit der Charakterisierung von Zip2 konnte nun in dieser Arbeit ein Transporter identifiziert werden, der an der Remobilisierung dieses intrazellulären Zinkspeichers beteiligt ist. Sowohl Zhf-GFP als auch Zip2-GFP wurden an perinukleären Membranstrukturen und an intrazellulären Membranen, die nicht der Vakuole angehören, beobachtet (Abb. 3.20). Die Abbildungen weisen auf eine ER Lokalisation von Zip2 hin (Abb. 3.20). Auch Matsuyama *et al.* konnten Zip2-YFP im ER lokalisieren (Matsuyama *et al.* 2006). Da es sich beim ER-Lumen von *S. pombe* um das Zinkreservoir der Zelle handelt, wurde vermutet, dass Zip2 Zink aus dem ER dem Cytoplasma zur Verfügung stellt. Von allen drei ZIP-

Homologen in *S. pombe* weist Zip2 die größte Homologie zum Remobilisierungstransporter Zrt3 aus *S. cerevisiae* auf (Gaither and Eide 2001; Bährecke 2004). ScZrt3 ist unter Zinkdefizienzbedingungen exprimiert und vermittelt den Zinktransport aus der Vakuole (MacDiarmid *et al.* 2000). Unter Standardkulturbedingungen hat eine Mutation des *zip2<sup>+</sup>* Gens keinen Einfluss auf das Wachstum der Zelle (Abb. 3.17A). Erst unter Zinkmangel reduziert sich das Wachstum der Mutante um ca. 20 % gegenüber dem Wildtyp (Abb. 3.17C). Auch das Wachstum der  $\Delta zhf$  Mutante ist unter Zinkmangelbedingungen reduziert (Bährecke 2004, Abb. 3.17B). Eine Doppelmutation von *zhf<sup>+</sup>* und *zip2<sup>+</sup>* zeigt keine zusätzliche Wachstumseinschränkung im Vergleich zur  $\Delta zhf$  Einzelmutation unter Zinkdefizienz, was darauf hinweist, dass beide Transporter am selben Prozess beteiligt sein könnten (Speicherung bzw. Remobilisierung) und unter Zinkdefizienz benötigt werden (Abb. 3.17B). Eine Funktion von Zip2 unter Zinkmangelbedingungen zeigt sich auch in der Doppelmutation mit dem Gen des Aufnahmetransporters SpZrt1. Das geringe Wachstum der  $\Delta zrt1$  Mutante unter niedrigen Zinkkonzentrationen wird durch die zusätzliche Mutation des *zip2<sup>+</sup>* Gens vertieft (Abb. 3.17D). Die Doppelmutante ist nicht in der Lage, ihren Zinkbedarf zu decken, da der Aufnahmetransporter SpZrt1 fehlt. Gleichzeitig kann auch Zip2 nicht zur Erhöhung der cytoplasmatischen Zinkkonzentration durch Remobilisierung aus dem Speicher beitragen.

Die zinkabhängige transkriptionelle Regulation von *zip2<sup>+</sup>* bestätigt eine Funktion beim Wachstum unter niedrigen Zinkkonzentrationen (Abb. 3.19A). Das *zip2<sup>+</sup>* Transkript wird in Wildtyp und  $\Delta zhf$  Mutante unter hohen externen Zinkkonzentrationen herunterreguliert (Abb. 3.19A). Außerdem kommt es zu einer Induktion der *zip2<sup>+</sup>* mRNA beim Transfer der Zellen von moderaten Zinkkonzentrationen (20  $\mu$ M) in Medium mit Zinkdefizienzbedingungen (EMM-Zn). Das könnte bedeuten, dass unter Zn-Mangel die Zelle versucht verstärkt  $Zn^{2+}$  aus dem Speicher zu mobilisieren. Interessanterweise kommt es zu einer Verzögerung der *zip2<sup>+</sup>* Transkriptakkumulation in der  $\Delta zhf$  Mutante (Abb. 3.19B). Wenn man davon ausgeht, dass das ER nicht zugänglich für einen regulatorischen Zinksensor ist und die Messung des Zinkgehalts im Cytoplasma beziehungsweise im Zellkern stattfindet, tritt in der  $\Delta zhf$  Mutante vermutlich eine höhere cytoplasmatische Zinkkonzentration auf als im Wildtyp (vgl. Abschnitt 4.1.3.). Durch den fehlenden Zinktransport über die ER-Membran in  $\Delta zhf$  Zellen sind unter den gegebenen 20  $\mu$ M Kulturbedingungen der cytoplasmatische Zinkpool und potentielle andere Speicherkompartimente (Vakuole, Mitochondrien) stärker gesättigt als im Wildtyp. Beim Überimpfen in Zinkmangelmedium kommt es infolge des Wachstums zu einem verzögerten cytoplasmatischen Zinkbedarf, dem mit der späteren *zip2<sup>+</sup>* Transkriptakkumulation entsprochen wird. Aus diesem Grund kommt es wahrscheinlich auch zu einer stärkeren Reduktion in  $\Delta zhf$  bei der Zugabe von 50  $\mu$ M Zink als im Wildtyp (Abb. 3.19A).

Auch für ScZrt3 konnte gezeigt werden, dass der Remobilisierungstransporter nicht nur für das Wachstum unter zinklimitierenden Bedingungen in der Doppelmutante  $\Delta zrt1\Delta zrt2$  benötigt wird, sondern auch unter Zinkdefizienz Zap1-abhängig exprimiert wird (MacDiarmid *et al.* 2000). Auf der

anderen Seite führt die Deletion von *zip3<sup>+</sup>* zur Abnahme des cytoplasmatischen Zinkpools in *S. cerevisiae* (MacDiarmid *et al.* 2000). Dass es sich bei SpZip2 um einen ZIP-Transporter handelt, der für die Remobilisierung des Zinkspeichers verantwortlich ist, zeigen auch Elementanalysen der  $\Delta zip2$  Mutante. Während unter niedrigen Zinkkonzentrationen (10  $\mu\text{M}$ ) die Zinkakkumulation in gleichem Maße stattfindet wie im Wildtyp, also der Aufnahmetransport nicht betroffen ist, kommt es unter hohen Zinkkonzentrationen (30  $\mu\text{M}$ ) zu einer doppelt so hohen Zinkakkumulation der  $\Delta zip2$  Mutante gegenüber dem Wildtyp (Abb. 3.1E). Wurden die Zellen auf hohen externen Zinkkonzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert und anschließend in Zinkmangelmedium kultiviert nimmt zwar der Gesamtzinkgehalt von Wildtyp und  $\Delta zip2$  Zellen gemäß der Verdopplungszeit im Medium ab. Die 2-fache Gesamtzinkkonzentration der  $\Delta zip2$  Mutante bleibt gegenüber dem Wildtyp über einen Zeitraum von mindestens 8 h bestehen (Abb. 3.15). Die  $\Delta zip2$  Zelle kann das akkumulierte Zink jedoch nicht nutzen. Bei niedrigen externen Zinkkonzentrationen bindet das aufgenommene  $\text{Zn}^{2+}$  an cytoplasmatische Zinkbindeproteine. Diese cytoplasmatischen Bindestellen stehen in Konkurrenz mit der Bindung an Transporter, die  $\text{Zn}^{2+}$  über intrazelluläre Membranen transportieren. Steigt die externe Zinkkonzentration über 20  $\mu\text{M}$  sind die cytoplasmatischen Zinkbindestellen gesättigt und dies führt zur Znfvermittelten Zinkakkumulation im ER. Im Fall des Verlusts des Transporters, der für den Rücktransport von Zink ins Cytoplasma verantwortlich ist, also in der  $\Delta zip2$  Mutante, verbleibt  $\text{Zn}^{2+}$  im ER Lumen und wird dort akkumuliert. Die Zirkulation von Zink über intrazelluläre Membranen ist unterbrochen. Das führt trotz ausreichender externer Zinkversorgung zum cytoplasmatischen Zinkmangel, dem durch die verstärkte Expression des Zinkaufnahmetransporters SpZrt1 entgegengewirkt wird (vgl. Abb. 4.1).

In vergleichenden *real time* Experimenten zwischen Wildtyp und  $\Delta zip2$  Mutante konnte eine erhöhte *Spzrt1<sup>+</sup>* Transkriptakkumulation nach dem Transfer von  $\Delta zip2$  Zellen in Zinkmangelmedium beobachtet werden (Abb. 3.16B). Diese erhöhte Akkumulation der mRNA des Aufnahmetransporters korreliert mit der erhöhten Aufnahmeaktivität der  $\Delta zip2$  Mutante in  $^{65}\text{Zn}$ -Aufnahmeexperimenten (Abb. 3.16A). Die Zinkaufnahme ist abhängig von SpZrt1, da die Doppelmutante  $\Delta zrt1\Delta zip2$  weniger  $\text{Zn}^{2+}$  aufnimmt als der Wildtyp und  $\Delta zrt1$ . Die höhere Aufnahme in der  $\Delta zip2$  Mutante über SpZrt1 ist auch eine Bestätigung der Vermutung, dass das Zip2 Protein wichtig für die Zelle unter Zinkdefizienz ist. Gleichzeitig zeigt es, dass die  $\Delta zip2$  Mutante unter einem cytoplasmatischen Zinkmangel leidet. Die Zinkaufnahme führt anschließend zum Weitertransport des Kations in das ER-Lumen. In  $\Delta zip2$  Zellen wird daher doppelt so viel Zink akkumuliert wie im Wildtyp, ohne dass die Zelle auf ihren intrazellulären Zinkpool zugreifen kann. Schließlich kommt es offenbar zur Zinksättigung im ER. Sowohl bei einer Zinkkonzentration von 30  $\mu\text{M}$  als auch bei 100  $\mu\text{M}$  wurde in der  $\Delta zip2$  Mutante nicht mehr als die doppelte Zinkkonzentration gegenüber dem Wildtyp detektiert (Abb. 3.1E, Abb. 3.15). Der Transport über die intrazelluläre Membran kommt zum Erliegen und gleichzeitig verliert die Zelle damit eine wichtige Antriebskraft für den Aufnahmetransport. Möglicherweise kommt es zur

Regulation der weiteren Zinkakkumulation des Aufnahmetransporters SpZrt1 über transkriptionelle und posttranskriptionelle Mechanismen. In diesem Fall wäre die Transportaktivität von Zhf stark von der Zinkaufnahme durch SpZrt1 abhängig. Da *zhf<sup>+</sup>* nicht transkriptionell reguliert wird, könnte es alternativ auch zur zinkabhängigen posttranskriptionellen Regulation der Aktivität von Zhf kommen.

Der erhöhte Zinkakkumulationsphänotyp der  $\Delta zip2$  Mutante ist an ein funktionales Zhf Protein gekoppelt. Die  $\Delta zip2$  Mutation hat unter hohen Zinkkonzentrationen keinen Effekt auf die Zinkakkumulation in einer  $\Delta zhf\Delta zip2$  Doppelmutante (Abb. 3.1E). Die Mutation in *zhf<sup>+</sup>* verhält sich also epistatisch zu  $\Delta zip2$ . Auch dies ist ein Hinweis darauf, dass es sich bei Zip2 um die funktionalen Antagonisten des Zhf Transporters handelt und für die Remobilisierung des von Zhf kompartimentierten Zinks verantwortlich ist.

Die Kompartimentierung von Metallionen hat drei große Vorteile. Zum einen kann durch den Weitertransport von Kationen aus dem Cytoplasma in Kompartimente deren toxische Wirkung gemindert werden, da es nur in begrenztem Maße zu einer Kompetition an funktionellen Gruppen cytoplasmatischer Metallenzyme kommt. Des weiteren können auf diesem Weg gespeicherte Kationen unter Mangelbedingungen, durch den Rücktransport in das Cytoplasma remobilisiert werden. Zusätzlich kann unter den Bedingungen des Kationenschocks, bei dem die Zellen nach einer Kationendefizienz mit einem Überangebot konfrontiert werden, ein schneller Weitertransport der Ionen gewährleistet werden. Diese Weiterleitung über intrazelluläre Membranen liefert einen schnelleren Schutz gegenüber einer Toxifikation als beispielsweise eine Regulation der Expression verantwortlicher Aufnahmetransporter (Eide 2006).

Die Anlage eines intrazellulären Zinkspeichers wurde bereits für mehrere eukaryotische Modellorganismen beschrieben. Zinktransporter, die Kationen aus dem Cytoplasma in Zellkompartimente mobilisieren, gehören häufig der CDF-Transportfamilie an. In *S. cerevisiae* transportieren die Zhf Homologen Zrc1 und Cot1 Zink zur Speicherung in die Vakuole (Li and Kaplan 1998; MacDiarmid *et al.* 2000; MacDiarmid *et al.* 2003). Dieser Speicher kann durch den Transport über den ZIP-Transporter ScZrt3 remobilisiert werden (MacDiarmid *et al.* 2000). Sowohl ScZrt3 als auch ScZrc1, nicht aber ScCot1 werden durch den Zap1-Transkriptionsfaktor unter zinklimitierenden Bedingungen aktiviert (MacDiarmid *et al.* 2000; MacDiarmid *et al.* 2003). In *S. cerevisiae* erfüllt die Vakuole die Aufgabe des Hauptzinkspeichers und die Doppelmutante  $\Delta zrc1\Delta cot1$  zeigt einen vergleichbaren Phänotyp zu  $\Delta zhf$  in *S. pombe*. Zwei weitere Mitglieder der CDF-Familie, Msc2 und Zrg17, transportieren als heteromerer Komplex in *S. cerevisiae*  $Zn^{2+}$  in das ER und den Golgi-Apparat (Ellis *et al.* 2004; Ellis *et al.* 2005). Dieser Zinktransport ist notwendig für die Prozessierung von Proteinen im sekretorischen Weg und führt im Fall einer Mutation der Zinktransporter zur UPR (unfolded protein response). Im Gegensatz zum Zinktransport in das ER-Lumen durch Zhf in *S. pombe* hat der Transport in den sekretorischen Weg in *S. cerevisiae* nicht die Funktion einer Zinkspeicherung und Detoxifizierung. Während die *Sp* $\Delta zhf$  Mutation in einer reduzierten zellulären

Zinkakkumulation und höheren Zinksensitivität endet, konnte dieser Phänotyp nicht bei  $\Delta msc2$  oder  $\Delta zrg17$  Mutanten in *S. cerevisiae* beobachtet werden (Borrelly *et al.* 2002; Clemens *et al.* 2002; Ellis *et al.* 2004; Ellis *et al.* 2005).

Kürzlich konnten zwei weitere CDF-Transporter in *S. pombe* lokalisiert werden, die wahrscheinlich am Zinktransport in den sekretorischen Weg verantwortlich sind. SpCis4 und SpZrg17 wird ein Mitwirken in der Regulation des Membrantransports zugeschrieben (Fang *et al.* 2008). ZIP-Transporter, die für die Remobilisierung interner Zinkpools des sekretorischen Wegs verantwortlich sind, sind auch aus Säugern bekannt. Das Mausprotein ZIP7 transportiert Zink aus dem Golgi Apparat in das Cytoplasma. Wurde mZIP7 in der *S. cerevisiae* Mutante  $\Delta zrt3$  exprimiert, konnte der cytoplasmatische Zinkpool erhöht werden (Huang *et al.* 2005). Das humane Homolog zum mZIP7 Protein, HKE4, ist an der Membran des ER zu finden und vermittelt dort den Transport in das Cytoplasma (Taylor *et al.* 2004). Da Säugerzellen keine Vakuole besitzen, ist es möglich, dass in diesen Systemen das ER und die Golgivesikel als Zinkspeicher der Zelle fungieren.

### 4.4 Die Konkurrenz zwischen $Zn^{2+}$ und $Cd^{2+}$

Trotz aller Fortschritte zu Aufklärung der Cadmiumdetoxifizierung in *S. pombe* (Clemens and Simm 2003) ist bis jetzt der Eintrittsweg für Cadmium in die Zelle noch unbekannt.

Es wird angenommen, dass  $Cd^{2+}$ , und andere Kationen ohne biologische Funktion, über Transporter für essentielle Elemente aufgenommen werden, die einen Mangel an Spezifität aufweisen. In Konkurrenzexperimenten zur Zinkaufnahme durch SpZrt1 konnte gezeigt werden, dass eine äquimolare Konzentration an  $Cd^{2+}$  die Zinkaufnahme um 37 % hemmt (Abb. 3.6). Wurde die doppelte Konzentration an  $Cd^{2+}$  gegenüber  $^{65}Zn$  zum Experiment zugeführt kam es zu einer Konkurrenz der Zn-Aufnahme um 50 %. Unter den getesteten Kationen zeigte sich  $Cd^{2+}$  als stärkster und einziger Inhibitor der Zrt1-abhängigen Zinkaufnahme und stellt deshalb ein mögliches Substrat für SpZrt1 dar (Abb. 3.6.). Die Aufnahmekompetition durch  $Cd^{2+}$  ist auch von anderen ZIP-Transportern aus Hefe, Pflanzen und Mensch bekannt. Im *S. cerevisiae* System gilt der ZIP-Transporter ScZrt1 als einer der Eintrittswege für  $Cd^{2+}$  in die Zelle. Dementsprechend ist die *Sc* $\Delta zrt1$  Mutante nicht in der Lage  $Cd^{2+}$  aus der Umgebung zu absorbieren und zeichnet sich daher durch eine hohe Cadmiumtoleranz aus (Gomes *et al.* 2002). Zinkaufnahme und -kompetitionsversuche pflanzlicher ZIP-Transporter wurden hauptsächlich im heterologen *S. cerevisiae* System durchgeführt. Die Transporter wurden in der Zinkaufnahmemutante *zhy3* ( $\Delta zrt1 \Delta zrt2$ ) exprimiert. So zeigte sich die Zinkaufnahme von IRT1 aus *A. thaliana* in der *S. cerevisiae* Mutante *zhy3* um 75 % durch die Zugabe der 10-fachen  $Cd^{2+}$ -Konzentration inhibiert (Korshunova *et al.* 1999). Die Überexpression von IRT1 in transgenen *A. thaliana* Linien, die unter Eisendefizienz wuchsen, führte zur Sensitivität gegenüber Cadmium und zur verstärkten Akkumulation von Cadmium in den Wurzeln im Vergleich zum Wildtyp (Connolly *et al.* 2002). Der Eisen- und Zinktransporter AtIRT1 transportiert demzufolge offenbar ebenfalls  $Cd^{2+}$ . Auch

die Zinkaufnahme der Zinktransporter AtZIP1, AtZIP2 und AtZIP3 aus *A. thaliana* wurde nach Expression in *S. cerevisiae* durch die 10-fache Konzentration an  $\text{Cd}^{2+}$  inhibiert. Interessanterweise wurde der AtZIP2 Transporter, der die geringste Zinkaufnahme der drei getesteten Transporter besaß, am stärksten durch Cadmium gehemmt, was darauf hindeutet, dass der niederaffine Zinktransporter gleichzeitig eine hohe Affinität zu  $\text{Cd}^{2+}$  besitzt (Grotz *et al.* 1998). In *S. cerevisiae* wurde auch der ZIP-Transporter GmZIP1 aus der Sojabohne *Glycine max* cv. Stevens untersucht. Die Zinkaufnahme durch den Transporter konnte durch die 10-fache  $\text{Cd}^{2+}$  Dosis um 51-69 % gehemmt werden (Moreau *et al.* 2002). Die direkte Untersuchung der Zn- und Cd-Aufnahmeaktivität von ZNT1 aus dem Zn/Cd Hyperakkumulierer *Thlaspi caerulescens* in *S. cerevisiae* zeigte, dass ZIP-Transporter eine Doppelrolle sowohl im hochaffinen Zinkaufnahmetransport, als auch im niederaffinen Cadmiumtransport spielen können (Pence *et al.* 2000). Das Zusammenfallen von  $\text{Zn}^{2+}$ - und  $\text{Cd}^{2+}$ -Hyperakkumulation in Pflanzen wie *Thlaspi caerulescens*, *Sedum alfredii* oder *Arabidopsis halleri* (Baker *et al.* 1994; Yang *et al.* 2004; Zhao *et al.* 2006) ist ein Indiz für die gleichen Eintrittswege von  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  in die genannten Organismen. Neben pflanzlichen Transportern konnte auch in humanen Zellkulturen eine Konkurrenz von  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  um die Aufnahme über hZip1 und hZip2 beobachtet werden (Gaither and Eide 2000; Gaither and Eide 2001). Im Gegensatz dazu zeigten sich die Maus homologen ZIP-Transporter mZIP1, mZIP2, mZIP3 und mZIP4 sehr spezifisch für Zink. Die Zinkaufnahme konnte nicht, oder nur in geringem Maße, durch die Zugabe der 10- bzw. 50-fachen Konzentration an  $\text{Cd}^{2+}$  gehemmt werden. Diese Beobachtung könnte aber abhängig sein von den untersuchten Maus (HEK293) beziehungsweise den humanen (K562) Zelltypen, die in diesem Experimenten verwendet wurden (Dufner-Beattie *et al.* 2003b; Dufner-Beattie *et al.* 2004). Sie zeigt aber auch, dass die Konkurrenz zwischen  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  bedingt durch die enge physikalische und chemische Verwandtschaft der Kationen zwar sehr wahrscheinlich aber nicht notwendigerweise stattfinden muss. mZIP8 vermittelt  $\text{Cd}^{2+}$ -Sensitivität und  $\text{Cd}^{2+}$ -Aufnahme wenn es in Mausfibroblasten exprimiert wird (Dalton *et al.* 2005). Die Cadmiumaufnahme von mZIP8 konnte durch die Zugabe der 50-fachen  $\text{Zn}^{2+}$  um 50 % inhibiert werden. Eine Konkurrenz der Cadmiumaufnahme um 50 % konnte allerdings schon durch die 10-fache  $\text{Mn}^{2+}$  Konzentration hervorgerufen werden, was auf eine höhere Affinität des Transporters zu Mangan schließen lässt. Der Transport von  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  durch mZIP8 wird diskutiert.

In *S. pombe* ist die Zinkaufnahme des hochaffinen SpZrt1 Systems zwar durch  $\text{Cd}^{2+}$  stark gehemmt, die Cadmiumaufnahme in die Zelle erfolgt aber auch unabhängig von SpZrt1. Die Cadmiumaufnahme der zinkdefizienten *SpΔzrt1* Mutante beträgt das Doppelte des Wildtyps (Abb. 3.13). Generell ist die Cadmiumaufnahme abhängig vom Zinkstatus der Zelle. Im zinkgesättigten Wildtyp konnte die niedrigste Cadmiumakkumulation beobachtet werden während unter Zinkmangel die höchsten Werte erzielt wurden. Die *SpΔzrt1* Mutante weist aufgrund des Verlusts des hochaffinen Aufnahmetransporters das größte Zinkdefizit auf und akkumuliert in diesem Versuch am meisten

Cadmium (Abb. 3.13). Auch Gitan *et al.* konnten eine erhöhte Cadmiumsensitivität in *S. cerevisiae* Zellen feststellen, die unter Zinkmangel angezogen wurden (Gitan *et al.* 2003). Der niederaffine Transporter ist weniger spezifisch für die  $Zn^{2+}$  Aufnahme. Wenn unter Zinkmangel in Folge der Abwesenheit des hochaffinen Systems, das niederaffine System verstärkt exprimiert wird, wird eine relativ hohe Cadmiumaufnahme vermittelt. Diese Beobachtung spricht für den Eintritt von  $Cd^{2+}$  in die Zelle über einen Transporter, der zum einen  $Zn^{2+}$  transportiert zum anderen aber auch zinkabhängig reguliert wird. Die mögliche Rolle von SpFet4 im niederaffinen Zinktransport von *S. pombe* wurde bereits in Kapitel 4.2 diskutiert. Darüber hinaus wird das Transkript von SpFet4 neben dem von SpZrt1 unter Zinkmangel induziert. Außerdem ist aus Mikroarrayanalysen bekannt, dass das *Spfet4<sup>+</sup>* Transkript in der *SpΔzrt1* Mutante ca. 5-fach induziert ist (Dainty *et al.* 2008). Es ist daher möglich, dass SpFet4 tatsächlich für den Influx von  $Cd^{2+}$  in die *S. pombe* Zelle verantwortlich ist. Der Verlust des hochaffinen Aufnahmetransporters führt zur erhöhten Metallsensitivität aufgrund der erhöhten Expression von Transportern mit größerem Substratspektrum (Li and Kaplan 1998). Aus Komplementationsstudien ist bekannt, dass das niederaffine Zinkaufnahmesystem, das vermutlich durch *fet4<sup>+</sup>* codiert wird (Dainty *et al.* 2008) sowohl durch  $Cd^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  und in starken Maße durch  $Fe^{2+}$  inhibiert werden kann (Abb. 3.6). Für das *S. cerevisiae* Homolog ScFet4 konnte bereits eine Beteiligung am Cadmiumtransport nachgewiesen werden. Neben  $Fe^{2+}$  ist Fet4 aus *S. cerevisiae* in der Lage auch  $Cd^{2+}$  zu transportieren (Dix *et al.* 1997). Eine Mutation in *Scfet4<sup>+</sup>* mindert die Cadmiumtoxizität in *S. cerevisiae* (Jensen and Culotta 2002).

Außer der transkriptionellen Regulation durch  $Zn^{2+}$  ist auch eine Regulation von *Spfet4<sup>+</sup>* durch  $Cd^{2+}$  festgestellt worden (Chen *et al.* 2003). Ähnlich wie der Aufnahmetransporter SpZrt1 wird die Expression von *fet4<sup>+</sup>* durch hohe Cadmiumkonzentrationen induziert (Chen *et al.* 2003; Simm 2004)(Abb. 3.11). Auch hier wird wie schon bei SpZrt1 eine Konkurrenz zwischen  $Zn^{2+}$  und  $Cd^{2+}$  Ionen vermutet. Hohe Cadmiumkonzentrationen führen durch Aufnahmekompetition und Inaktivierung von Zinkenzymen zum Zinkmangel in der Zelle der dann die Aufnahmetransporter induziert. In *S. pombe* ist der Zip1 Transkriptionsfaktor für die Induktion von 27 Genen als Antwort auf Cadmiumstress verantwortlich. Eine direkte cadmiumabhängige Induktion von *Spfet4<sup>+</sup>* über den Zip1 Transkriptionsfaktor ist jedoch nicht bekannt (Harrison *et al.* 2005).

Im Gegensatz zur transkriptionellen Induktion durch Cadmium werden sowohl Transkript- als auch Proteinlevel des ZIP-Transporters AtIRT1 durch die Applikation von Cadmium im Vergleich zu den Kontrollen reduziert (Connolly *et al.* 2002). Wahrscheinlich handelt es sich hier um eine Cadmiumstressreaktion aufgrund hoher Cadmiumkonzentrationen. Eine ähnliche Stressreaktion kann in *S. pombe* beobachtet werden, bei Konzentrationen über 50  $\mu M$   $Cd^{2+}$  im Medium nehmen sowohl Transkript- als auch Proteinlevel von SpZrt1 ab (Abb. 3.11B, Abb.3.12). Ergebnisse zur Transkriptomanalyse von Drosophilalarven zeigten, dass Zink- und Cadmiumstressantworten sich mehrere Kenndaten teilen. Die regulatorischen Mechanismen, die dafür verantwortlich sind Zink zu

detoxifizieren, sind auch funktionell wenn es um Cadmiumentgiftung geht (Yepiskoposyan *et al.* 2006).

Ein weiteres Beispiel für die zinkabhängige Cadmiumkompetition liefern Wachstumsversuche der *SpΔzip2* Mutante auf verschiedenen Cadmiumkonzentrationen (Abb. 3.18A). SpZip2 ist vorraussichtlich für die Remobilisierung von  $Zn^{2+}$  aus dem ER verantwortlich (vgl. Abschnitt 4.3). Es konnte gezeigt werden, dass  $\Delta zip2$  Zellen sensitiver gegenüber hohen Cadmiumkonzentrationen sind als der Wildtyp. Vermutlich führt die cytoplasmatische Zinkdefizienz dieser Mutante, zur Induktion von Genen für Zinkaufnahmetransporter. Gleichzeitig führt  $Cd^{2+}$  selbst zur Induktion von *Spzrt1<sup>+</sup>* und *Spfet4<sup>+</sup>* (Chen *et al.* 2003), so dass über diese Transporter mehr  $Cd^{2+}$  akkumuliert wird. Die Zellen werden somit sensitiver gegenüber Cadmiumionen. Allerdings gibt es auch hier Hinweise darauf, dass der hochaffine Zinkaufnahmetransporter SpZrt1 möglicherweise nur in geringen Maße an der  $Cd^{2+}$ -Akkumulation beteiligt ist. Wie bereits diskutiert weist die  $\Delta zip2$  Mutante in EMM-Zn einen Zinkmangel auf, dem durch die erhöhte Expression von *zrt1<sup>+</sup>* entgegen gewirkt wird. Werden  $\Delta zip2$  Zellen in Zinkmangelmedium vorinkubiert sind sie im Vergleich zu  $\Delta zip2$  Zellen, die in EMM angezogen wurden, toleranter gegenüber  $Cd^{2+}$ . Unter EMM-Zn Bedingungen ist Zrt1 höher exprimiert als in EMM. Offenbar bietet die Vorinkubation in EMM-Zn und die damit verbundene höhere Kopienzahl des hochaffinen Zinktransporter Zrt1 einen Schutz gegenüber  $Cd^{2+}$ . Dies führt dazu, dass beim eigentlichen Experiment in EMM entweder weniger  $Cd^{2+}$  oder mehr  $Zn^{2+}$  zum Schutz der Zelle aufgenommen wird. Auf der anderen Seite wird die Cadmiumsensitivität der  $\Delta zip2$  Mutante durch eine zweite Mutation im *zhf<sup>+</sup>* Gen aufgehoben (Abb. 3.18B). Für die  $\Delta zhf$  Mutante wurde ein cytoplasmatischer Zinküberschuss im Vergleich zum Wildtyp postuliert, da die Zellen cytoplasmatisches  $Zn^{2+}$  nicht durch den Transport über die ER-Membran entfernen können (vgl. Kapitel 4.1.1, Kapitel 4.3). Die  $\Delta zhf$  Mutante ist beim Wachstum auf Medium mit hohen  $Cd^{2+}$  Konzentrationen toleranter im Vergleich zum Wildtyp (Clemens *et al.* 2002; Clemens and Simm 2003). Aufgrund höherer cytoplasmatischer Zinkkonzentrationen werden Zinkaufnahmetransporter vergleichsweise niedrig exprimiert (Abb. 3.7C, D). Als Folge dessen gelangt weniger Cadmium in die Zelle. Auch eine posttranslationale Regulation von ZIP-Transportern in Antwort auf Cadmiumstress ist möglich. So wird zum Beispiel der Zinkaufnahmetransporter ScZrt1 nicht nur durch hohe Zinkkonzentrationen über Endocytose und Proteinabbau inaktiviert, sondern auch durch die Zugabe von Cadmium (Gitan *et al.* 2003). Da ScZrt1 mit für den Cadmиеintrag in die *S. cerevisiae* Zelle verantwortlich ist könnten so möglicherweise die Konkurrenzigenschaften von Zink- und Cadmiumionen zur Minimierung des unspezifischen Cadmиеintrags führen.

### 4.5 Zip3, ein Transporter in der Vakuolenmembran

Über das dritte Homolog der ZIP-Transporter, Zip3, aus *S. pombe* ist nur sehr wenig bekannt. Hinweise auf dessen Funktion lassen sich vor allem aus Homologievergleichen ableiten, die durch wenige funktionelle Daten dieser Arbeit gestützt werden. Das Zip3 Protein wurde der LZT-Subfamilie der ZIP-Transporter zugeordnet (Taylor *et al.* 2004). Zip3 enthält sowohl das für ZIP-Transporter typische HNF Motiv der IV. TM, als auch das Metalloproteasemotiv (HEXPHEXGD) der LZT Subfamilie in der V. TM, dessen Eingangshistidin ebenfalls in der ZIP-Familie konserviert ist. Neben den acht Membrandomänen der ZIP-Familie legen die konservierten Aminosäuren nahe, dass ZIP3 im Metall- bzw. im Zinktransport eine Rolle spielen könnte. Gleichzeitig gruppiert sich nach der Aminosäuresequenz ZIP3 zur Untergruppe der KE4-Proteine. Dabei weist Zip3 die größte Homologie zum Arabidopsis Protein IAR1 auf. Die IAR1 Allele wurde innerhalb eines Mutantenscreens gefunden in dem man Pflanzen suchte, die resistent gegenüber dem inhibitorischen Einfluss von Indole-3-Essigsäure (IAA)-Aminosäurekonjugaten auf die Wurzelelongation sind. In höheren Pflanzen liegt IAA in konjugierter Form mit Zuckern, Peptiden und Aminosäuren vor. Hydrolytische Enzyme spalten diese Konjugate und setzen dann das pflanzliche Hormon Auxin (IAA) frei. Die entsprechenden Hydrolasen benötigen als Metallkofaktor Mangan oder Cobalt. Es wurde vorgeschlagen, dass IAR1 die für die Hydrolyse notwendigen Metallionen bereitstellt. Die Arabidopsis IAR1 Mutante konnte durch das Maus KE4-Protein komplementiert werden (Lasswell *et al.* 2000). Das deutet darauf hin, dass es sich bei mKE4 und IAR1 um funktionelle Orthologe handelt. Bei mKE4 handelt es sich um einen Transporter, der Zink aus dem Golgi Apparat remobilisiert (Huang *et al.* 2005).

Das Zip3-GFP-Fusionsprotein wurde in *S. pombe* in der Membran der Vakuole lokalisiert (Abb. 3.21). Dies steht im Gegensatz zu den Daten von Matsuyama *et al.*, die Zip3-YFP im ER detektieren konnten (Matsuyama *et al.* 2006). Unterschiede in der Lokalisation könnten auf die Überexpression von Zip3-YFP ausgehend vom *nmt*-Promotor zurückzuführen sein, der während der hier vorgestellten Experimente durch Thiamin reprimiert wurde. Bisher charakterisierte Mitglieder der KE4-Gruppe aus Säugern und Hefen wurden ebenfalls an intrazellulären Membranen detektiert (Taylor *et al.* 2004; Huang *et al.* 2005; Kumánovics *et al.* 2006). Die Lokalisation sowohl von SpZip3 als auch von HKE4 und mKE4 wurde nicht durch veränderte Zinkkonzentrationen im Medium beeinflusst (Huang *et al.* 2005; Kumánovics *et al.* 2006)(Abb. 3.21). Unterschiede zeigen sich aber in der Art der Lokalisation. Während SpZip3 in der Vakuole der *S. pombe* Zelle gefunden wurde, lokalisiert mKE4 an Membranen des Golgi-Apparats. YKE4 und HKE4 konnten an der ER-Membran gefunden werden (vgl. Abb. 4.1). Die unterschiedliche Lokalisation an intrazellulären Membranen schließt aber nicht aus, dass es sich bei den charakterisierten Transportern um funktionelle Orthologe handelt. Zum Beispiel wurde das Golgi-lokalisierte mKE4-Protein in der *S. cerevisiae* Mutante  $\Delta zrt3$  exprimiert. Zrt3 ist in der Hefezelle für die Remobilisierung von Zink aus der Vakuole verantwortlich (MacDiarmid *et al.* 2000). Eine Deletion von *zrt3* führt zur Abnahme des cytosolischen Zinkgehalts, der

offenbar durch die Expression des mKE4 Gens aufgehoben werden kann (Huang *et al.* 2005). Auch aus der Familie der CDF-Transporter ist eine unterschiedliche Lokalisation zwischen Säuger und Hefeorthologen bekannt (Kumánovics *et al.* 2006). Das Msc2-Protein aus *S. cerevisiae* ist im ER lokalisiert, wohingegen das Säugerhomolog ZnT5 im Golgi-Apparat gefunden wurde (Suzuki *et al.* 2005).

Die Homologievergleiche und die Lokalisation von SpZip3 an intrazellulären Membranen lassen darauf schließen, dass es sich hier um ein funktionelles Ortholog zu den bisher charakterisierten Vertretern der KE4 Familie mit einer Beteiligung an der Remobilisierung von Zink handelt (Taylor *et al.* 2004; Huang *et al.* 2005). Der Vergleich des Zinkgehalts zwischen Wildtyp und  $\Delta zip3$  Mutante nach Inkubation der Zellen in hohen Zinkkonzentrationen zeigte einen niedrigeren Zinkgehalt von  $\Delta zip3$ . So konnte bestätigt werden, dass Zip3 eine Rolle in der Zinkhomöostase spielt. Bei einer Beteiligung von Zip3 an der Zinkremobilisierung würde man aber den entgegengesetzten Phänotyp erwarten. Ähnlich der  $\Delta zip2$  Mutante sollte unter hohen Zinkkonzentrationen eine Akkumulation des Kations erfolgen, da in der Mutante keine Remobilisierung stattfinden kann (vgl. Kapitel 4.3, Abb. 3.22). Der Phänotyp lässt vermuten, dass unter hohen Zinkkonzentrationen auch ein Transport von Zink in die Vakuole erfolgt, der in der  $\Delta zip3$  Mutante beeinträchtigt ist. Für den *S. cerevisiae* Transporter konnte gezeigt werden, dass er für den Export von Zink aus dem sekretorischen Weg verantwortlich ist. Gleichzeitig gibt es klare Beweise dafür, dass sowohl YKE4 als auch mKE4, wenn es in *S. cerevisiae* exprimiert wird unter bestimmten Bedingungen Zink in den sekretorischen Weg importieren (Kumánovics *et al.* 2006). Die Autoren diskutieren, dass es sich bei den bidirektionalen Transportern um Zink austauscher handelt, die je nach Konzentrationsgradienten Zink im- oder exportieren, und die als Reaktion auf Zinkstress agieren. Die Theorie des Zinkstress wird durch Mikroarrayanalysen unterstützt, in denen die *Yke4* mRNA unter Überexpression der Proteinkinase C1 50-fach induziert wird (Agarwal *et al.* 2003). Die Proteinkinase C1 kann in *S. pombe* zur direkten Aktivierung einer MAP-Kinasekaskade führen, die ihrerseits zur Transkription einiger Stressantwortgene führt. Es wurde spekuliert, dass Zellen unter erhöhten Stressbedingungen eine erhöhte Konzentration an vesikulären Zink benötigen, das durch Yke4 zur Verfügung gestellt wird. Die  $\Delta zip3$  Mutante in *S. pombe* zeigt keinerlei Phänotyp beim Wachstum auf verschiedenen Zinkkonzentrationen (Bährecke 2004). Auch unter hohen Temperaturen veränderte sich dieser Phänotyp nicht. Die Deletion von *Yke4* aus *S. cerevisiae* hingegen führt unter zusätzlichen Stressbedingungen von hohen Temperaturen zu einer zinksensitiven Mutante (respiratory substrate) (Kumánovics *et al.* 2006). Es ist möglich, dass Zip3 aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation im Vergleich zu Yke4 nicht an der Bereitstellung von Zink unter Stressbedingungen beteiligt ist, sondern ein zusätzlicher Entgiftungstransporter zu Zhf aus dem Cytoplasma darstellt. Generell kann davon ausgegangen werden, dass die vakuoläre Organisation in den beiden Hefen *S. pombe* und *S. cerevisiae* fundamentale Unterschiede aufweist. Während *S. cerevisiae* zwei bis drei große

Vakuolen besitzt (Wickner 2002), gibt es in der Spalthefe bis zu 80 kleine vakuoläre Vesikel (Bone *et al.* 1998; Mulvihill *et al.* 2001; Takegawa *et al.* 2003). Diese Unterschiede könnten auch ein Indiz dafür sein, dass beide Hefen ihre Zinkhomöostase unterschiedlich organisieren und Transporter mit eventuell orthologer Funktion unterschiedlich lokalisieren.

### 4.6 AtIRT3 und AhIRT3 sind pflanzliche Zinkaufnahmetransporter der ZIP-Familie

In vergleichenden Mikroarrayanalysen zwischen dem konstitutiven Zink- und Cadmium-Hyperakkumulierer *A. halleri* (Bert *et al.* 2000; Macnair 2002) und seinem nahe verwandten Nichtakkumulator *A. thaliana* konnte aufgrund hoher Expressionsraten in *A. halleri* IRT3 als möglicher Faktor für die Metallhyperakkumulation festgestellt werden (Talke *et al.* 2006). Auch das Transkript des IRT3 Homologs ZNT2 aus dem Hyperakkumulierer *T. caerulescens* ist gegenüber dem verwandten Nichtakkumulator *T. arvense* höher exprimiert (Assunção *et al.* 2001). Eine Beteiligung am Aufnahmetransport in den Pflanzen wurde postuliert (Assunção *et al.* 2001; Talke *et al.* 2006).

Als Mitglieder der ZIP-Transportfamilie sollte der mögliche Einfluss der pflanzlichen Proteine AtIRT3 und AhIRT3 aus *A. thaliana* und *A. halleri* auf die Zinkaufnahme im heterologen Systemen getestet werden. In Wachstumsversuchen auf unterschiedlichen Zinkkonzentrationen ist die *S. pombe* Aufnahmemutante *SpΔzrt1* nicht in der Lage, auf niedrigen Zinkkonzentrationen zu wachsen (Bährecke 2004). Exprimiert man nun die Gene für die Transporter AtIRT3 und AhIRT3 in *SpΔzrt1* so befähigen beide zum Wachstum in Medium mit niedrigen Zinkkonzentrationen (Abb. 3.23). Zusätzlich sind sowohl AtIRT3 als auch AhIRT3, wenn sie in der *S. cerevisiae* Mutante *Δzrt1Δzrt2 (zhy3)* exprimiert werden, in der Lage das Wachstum unter zinkdefizienten Bedingungen zu ermöglichen (Lin *et al.* 2009). Die dabei verwendete *zhy3* Mutante ist sowohl im hochaffinen ScZrt1 als auch im niederaffinen Zinkaufnahmesystem ScZrt2 defekt (Zhao and Eide 1996b). Darüber hinaus konnte in Kurzzeitaufnahmeexperimenten der Zinktransport sowohl von AtIRT3 als auch von AhIRT3 in beiden heterologen Systemen beobachtet werden (Abb. 3.24, Abb. 3.25). Bei AtIRT3 und AhIRT3 handelt es sich also um funktionelle Zinktransporter. Bisher wurden eine Vielzahl pflanzlicher ZIP-Transporter mit Hinblick auf die Zinkaufnahme im heterologen *S. cerevisiae* System charakterisiert. In der *zhy3* Mutante konnten unter anderen die Zinkaufnahmeraten von AtIRT1, AtZIP1, AtZIP2, AtZIP3 und TcZNT1 bestimmt werden (Grotz *et al.* 1998; Korshunova *et al.* 1999; Pence *et al.* 2000). Zusätzlich zu *S. cerevisiae* konnte nun ein weiteres Expressionssystem für die Zinkaufnahme etabliert werden. Das heterologe Expressionssystem *S. pombe* für pflanzliche ZIP-Transporter bietet Vorteile bei der Aufklärung der Zink- und Cadmium-Hyperakkumulation. In den Untersuchungen zum Phänotyp der Zink-Hyperakkumulation konnte in der Vergangenheit mehrfach eine gleichzeitige Cadmiumhyperakkumulation festgestellt werden (Baker *et al.* 1994; Yang *et al.* 2004; Zhao *et al.* 2006), was auf ähnliche Mechanismen in der Homöostase der Metallionen schließen lässt. Während

Pflanzen und *S. pombe* die Entgiftung von Cadmium über die effektive Bindung an kleine durch die Phytochelatinsynthese hergestellte Peptide, den Phytochelatinen, verfolgen, kompensiert *S. cerevisiae* die schädliche Wirkung des Zinkantagonisten ausschließlich durch die Bindung an Glutathion. Pflanzen und *S. pombe* besitzen also eine ähnliche molekulare Ausstattung für die Entgiftung von  $\text{Cd}^{2+}$ . Gleichzeitig konnten Phytochelatine aus *S. pombe* und *A. thaliana* auch mit der Detoxifizierung von hohen Zinkkonzentrationen in Verbindung gebracht werden (Tennstedt *et al.* 2009). Die Parallelen in den Entgiftungsmechanismen für hohe Zink- und Cadmiumkonzentrationen in Pflanzen und *S. pombe* machen die Zinkaufnahmemutante *Sp $\Delta$ zrt1* zu einem geeigneten Testsystem für pflanzliche Komponenten der Zinkaufnahme.

Die Überexpression von *AtIRT3* in *A. thaliana* führte zur Zinkakkumulation in den Wurzeln. Weiterhin konnte heterolog exprimiertes *AtIRT3*-GFP und *AhIRT3*-GFP an der Plasmamembran von Tomatenwurzelzellen detektiert werden (Lin *et al.* 2009). Diese Ergebnisse lassen auf eine Beteiligung von IRT3 an der Zinkaufnahme in *A. thaliana* und *A. halleri* schließen.

Um das Phänomen der Hyperakkumulation zu verstehen, sind neben der prä- und posttranslationalen Regulation auch die Substratspezifitäten funktioneller Orthologe aus Hyperakkumulierern und Nichthyperakkumulierern von Interesse. In Konkurrenzstudien konnte gezeigt werden, dass die doppelte Konzentration an  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  sowie  $\text{Mn}^{2+}$  die Zinkaufnahme der IRT3 Proteine inhibieren kann (Abb. 3.25 C). Unterschiede zwischen *AtIRT3* und *AhIRT3* in der Hemmung der Zinkaufnahme treten durch die Zugabe von  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  zum Aufnahmeassay auf. *AtIRT3* weist eine leicht erhöhte Sensitivität im Vergleich zu *AhIRT3* gegenüber den genannten Kationen auf. Ebenso konnte die Konkurrenz der Zinkaufnahme durch  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  des *AtIRT1* Proteins beobachtet werden (Abb. 3.25C), wie zuvor durch Rogers *et al.* beschrieben wurde (Rogers *et al.* 2000). *AtIRT1* wurde als ZIP-Transporter mit einem breiten Substratspektrum beschrieben, dessen Hauptkompetenz in der Eisenaufnahme liegt (Eide *et al.* 1996; Rogers *et al.* 2000). *AtIRT1* ist in der Lage das Wachstum drei verschiedener Aufnahmemutanten in *S. cerevisiae* zu komplementieren. Dazu zählen die Eisenaufnahmemutante  $\Delta\text{fet3}\Delta\text{fet4}$ , die Zinkaufnahmemutante *zhy3* und die Manganaufnahmemutante  $\Delta\text{smf1}$ . Gleichzeitig führt die Expression von *AtIRT1* zur  $\text{Cd}^{2+}$ -Sensitivität im *S. cerevisiae* Wildtyp (Korshunova *et al.* 1999).

Die Hefekomplementationsstudien wurden durch Aufnahmeexperimente gestützt und zeigen, dass *AtIRT1*  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  transportiert. Obwohl auch die Zinkaufnahme der IRT3 Proteine durch alle 3 Kationen inhibiert wurde (Abb. 3.25C), konnte die Expression von *AtIRT3* und *AhIRT3* nur die Zinkaufnahmemutante *zhy3* und teilweise die Eisenaufnahmemutante  $\Delta\text{fet3}\Delta\text{fet4}$  aber nicht die Manganaufnahme komplementieren (Lin *et al.* 2009). Eine Konkurrenz der Metallaufnahme bedeutet also nicht zwangsläufig, dass die inhibierenden Ionen auch ins Cytoplasma gelangen. Durch den Austausch einzelner Aminosäuren konnte die Substratspezifität von *AtIRT1* verändert werden (Rogers *et al.* 2000). Der Wechsel des Aspartats an Position 100 zu Alanin führt zum Verlust der

Transportfähigkeit von  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$ . AtIRT1 ist danach aber immer noch in der Lage, die *S. cerevisiae* Mutante *zhy3* zu komplementieren und demzufolge Zink zu transportieren (Rogers *et al.* 2000). Vergleicht man nun die Aminosäuresequenzen von AtIRT1, AtIRT3 und AhIRT3, findet man an der Position, die in AtIRT1 der Aminosäure 100 entspricht, ein Glycin in beiden IRT3 Proteinen (Anhang II). Man kann spekulieren, dass die fehlende  $\text{Mn}^{2+}$ -Transportaktivität von IRT3 und die geringe Komplementationsfähigkeit von der  $\Delta\text{fet3}\Delta\text{fet4}$  Mutante auf das Fehlen dieses Aspartats zurückzuführen sein könnte. Die Überexpression von AtIRT3 in *A. thaliana* führte zur Akkumulation von  $\text{Zn}^{2+}$  im Sproß und  $\text{Fe}^{2+}$  in den Wurzeln. So dass vermutet werden kann, das zumindest AtIRT3 noch eine Restaktivität im Eisentransport besitzt. Ob auch AhIRT3 außer  $\text{Zn}^{2+}$  noch  $\text{Fe}^{2+}$  transportieren kann müssten weitere Transport- und Mutagenesestudien klären. Denn die IRT3 Proteine aus *A. halleri* und *A. thaliana* zeigen einen Unterschied an der Position 136. Hier befindet sich in AhIRT3 Glutaminsäure während in AtIRT3 und AtIRT1 ein Aspartat steht. Ist dieses Aspartat in AtIRT1 nun zu einem Alanin mutiert kommt es zum Verlust der Eisen- und Mangantransportaktivität (Rogers *et al.* 2000). Außerdem sind Hefestämme die AtIRT1 D136A exprimieren nicht mehr sensitiv gegenüber  $\text{Cd}^{2+}$ . Auch die Zinkaufnahme von AhIRT3 konnte im Gegensatz zu AtIRT1 und AtIRT3 weniger durch  $\text{Cd}^{2+}$  gehemmt werden (Abb. 3.25).

Die weiteren durch Rogers *et al.* identifizierten Aminosäuren, die für die Substratspezifität und die Transportaktivität allgemein verantwortlich sind, sind auch in AtIRT3 und AhIRT3 konserviert (Anhang II) (Rogers *et al.* 2000). Es wird davon ausgegangen, dass aufgrund des breiten Substratspektrums des zentralen Eisenaufnahmetransporters IRT1, Pflanzen die auf Böden mit hohen Zinkkonzentrationen wachsen, durch Aufnahmekompetition potentiell unter Eisenmangel leiden. Da es sich bei *A. halleri* um einen Hyperakkumulierer für Zink handelt, wäre die genaue Klärung der Substratspezifität von AhIRT3 mit Augenmerk auf die Eisenaufnahme von besonderem Interesse. Neuste Erkenntnisse über die Spezifität bei CDF-Transportern zeigen ebenfalls, dass sich durch den Austausch einer einzigen Aminosäure das Substratspektrum von Kationentransportern ändern kann. Wird bei Zrc1 aus *S. cerevisiae* an Position 44 ein Asparagin durch ein Isoleucin ersetzt, wechselt der Transporter seine Spezifität von  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  (Lin *et al.* 2008).

Die Transkriptlevel von *IRT3* werden sowohl in *A. thaliana* als auch in *A. halleri* zinkabhängig reguliert, obwohl unter allen Zinkkonzentrationen das Transkriptlevel in *A. halleri* höher ausfällt. Besonders hoch wird das IRT3 Transkript im Spross von *A. halleri* exprimiert, was auf eine Beteiligung von IRT3 am Zink-Hyperakkumulationsphänotyp schließen lässt (Talke *et al.* 2006).

### 4.7 Untersuchungen zur Zinkhomöostase in *S. pombe*: ein Ausblick

Mit der Untersuchung an drei verschiedenen ZIP-Transportern konnten neue Einblicke in die Zinkhomöostase von *S. pombe* gewonnen werden. So konnte in dieser Arbeit der hochaffine Zinkaufnahmetransporter SpZrt1 charakterisiert werden. Weiterführend ist nun die Aufklärung des

niederaffinen Transports in *S. pombe* von Interesse. Da es bereits Hinweise auf eine Beteiligung von SpFet4 am niederaffinen Zinkaufnahmetransport gibt, ist nun das genaue Substratspektrum dieses Transporters auch in Bezug auf  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  zu ermitteln (Abb 4.1). Besonders der Zusammenhang zwischen Zinkaufnahme und Cadmiumakkumulation über gleiche beziehungsweise unterschiedliche Transportwege würde zum Verständnis der Substratspezifitäten von Transportmolekülen beitragen. Mit der Expression von AtIRT3 und AhIRT3 wurde begonnen pflanzliche Transportsysteme in *S. pombe* zu charakterisieren. Besonders interessant ist dabei der Vergleich von Substratspezifitäten zwischen Transportern, aus Hyperakkumulierern und Nicht-Hyperakkumulieren. Während aufgrund der multigenen Struktur in Pflanzen eine genaue Charakterisierung der Transportspezifität nur in heterologen Systemen möglich ist, können spezifische Aussagen über die Bedeutung der Transporter bei der Hyperakkumulation zusätzlich durch Lokalisationsstudien im pflanzlichen System erkannt werden.

In dieser Arbeit konnte eine sensitive transkriptionelle Regulation des hochaffinen SpZrt1 Aufnahmetransporters durch  $\text{Zn}^{2+}$  beobachtet werden. Wie  $\text{Zn}^{2+}$  die eigene Aufnahme reguliert und welche molekularen Faktoren dafür verantwortlich sind, müssen Folgeexperimente klären. Der zinksensitive *zrt1*<sup>+</sup> Promotor bietet die Möglichkeit einer Mutagenesestudie analog zu der, die zur Identifikation des Zap1 Transkriptionsfaktor aus *S. cerevisiae* geführt hat, um in *S. pombe* die Regulation von *zrt1*<sup>+</sup> zu identifizieren (Zhao and Eide 1997). Der Promotor eines weiteren zinksensitiven Gens *adh4*<sup>+</sup> der Alkoholdehydrogenase aus *S. pombe* wurde bereits als Reporter verwendet, um in einer Mutantenanalyse weitere zinkregulierte Gene zu identifizieren. Unter ihnen befand sich *zrt1*<sup>+</sup> und eine weitere noch nicht näher charakterisierte Mutante V7 (Dainty *et al.* 2008). Es ist möglich, dass es sich bei V7 um eine Mutante eines weiteren zinkregulierten Gens oder aber eines Zinkregulators handelt. Da auch der mögliche niederaffine Zinktransporter SpFet4 transkriptionell zinkabhängig reguliert wird, stellt sich zusätzlich die Frage, ob sowohl hoch als auch niederaffiner Zinktransport durch den gleichen oder einen anderen Regulator kontrolliert wird. Der Mechanismus einer solchen Regulation würde durch die Entdeckung des verantwortlichen metallsensorischen Regulators zur Aufklärung der Zinkhomöostase in *S. pombe* beitragen. Darüber hinaus könnten vergleichende Analysen des *S. pombe* Regulators mit den beiden bekannten zinksensorischen, eukaryotischen Transkriptionsfaktoren Zap1 aus *S. cerevisiae* und MTF-1 aus höheren Eukaryoten allgemeine Erkenntnisse über eine zinkabhängige Regulation erbringen.

Die in dieser Arbeit gewonnene Erkenntnis der Beteiligung von Zip2 am Remobilisierungstransport aus dem ER könnte durch weiterführende Arbeiten zur Zinkakkumulation, besonders in Kombination mit dem Zhf Transporter ergänzt werden. Die Besonderheit der Entgiftung und Speicherung von Zink im ER von *S. pombe* steht im Kontrast zum vakuolären *S. cerevisiae* System und stellt eine Neuerung in pilzlichen Systemen dar. Ob das ER lediglich als Zinkspeicher funktioniert oder ob Zink in diesem Kompartiment eine Funktion einnimmt müssen zukünftige

Experimente klären. Aus Säugerzellen und *S. cerevisiae* ist bekannt, dass Zink für die Prozessierung im ER von Proteinen die Zink als Cofaktor benötigen eine große Bedeutung hat (Ellis *et al.* 2004; Ishihara *et al.* 2006). Werden diese Proteine nicht mit Zink beladen kommt es zur UPR (unfolded protein reaction). Eine Reaktion auf die Akkumulation ungefalteter Proteine, die die Induktion von einem typische Set von Genen zur Folge hat, und der Zelle das Überleben sichert (Patil and Walter 2001). In *S. pombe* gehört zum Beispiel das Chaperon Calnexin zur UPR- Reaktion (Guérin *et al.* 2008). Mit solchen Markerprotein könnte man den Einfluss von Zinkmangel im ER von  $\Delta zhf$  Zellen untersuchen. Ob Zink eventuell über das ER und dem sekretorischen Weg aus der Zelle ausgeschleust wird könnten Studien an Exocytosemutanten wie zum Beispiel  $\Delta Sec6$ ,  $\Delta Sec8$ ,  $\Delta Sec10$  oder  $\Delta Exo70$  zeigen (Wang *et al.* 2003). Die Bedeutung des ER für die Zinkhomöostase in *S. pombe* führt anschließend zu der Frage der Bedeutung des dritten ZIP-Transporters Zip3, der am vakuolären Zinktransport beteiligt ist. Eine Untersuchung des möglichen bidirektionalen Transports über die Vakuolenmembran könnte auf einen zusätzlichen Zinkspeicher hindeuten.

## 5. Literaturverzeichnis

- Agarwal, A. K., Rogers, P. D., *et al.* (2003). "Genome-wide expression profiling of the response to polyene, pyrimidine, azole, and echinocandin antifungal agents in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **278**(37): 34998-35015.
- Alloway, B. J. and Ayres, D. C. (1996). *Schadstoffe in der Umwelt: chemische Grundlagen zur Beurteilung von Luft-, Wasser- und Bodenverschmutzung*. Heidelberg, Spektrum, Akad. Verl.
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I. and Rosato, A. (2006). "Counting the zinc-proteins encoded in the human genome." *J Proteome Res* **5**(1): 196-201.
- Andres-Colas, N., Sancenon, V., *et al.* (2006). "The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots." *Plant J* **45**(2): 225-236.
- Andrews, G. K. (2001). "Cellular zinc sensors: MTF-1 regulation of gene expression." *Biometals* **14**(3-4): 223-237.
- Anton, A., Große, C., Reißmann, J., Pribyl, T. and Nies, D. H. (1999). "CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH34." *J Bacteriol* **181**(22): 6876-6881.
- Anton, A., Weltrowski, A., *et al.* (2004). "Characteristics of zinc transport by two bacterial cation diffusion facilitators from *Ralstonia metallidurans* CH34 and *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **186**(22): 7499-7507.
- Aravind, L., Watanabe, H., Lipman, D. J. and Koonin, E. V. (2000). "Lineage-specific loss and divergence of functionally linked genes in eukaryotes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(21): 11319-11324.
- Archibald, F. S. (1983). "*Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron." *FEMS Microbiology Letters* **19**: 29-32.
- Arrivault, S., Senger, T. and Krämer, U. (2006). "The Arabidopsis metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply." *Plant J* **46**(5): 861-879.
- Assunção, A. G. L., da Costa Martins, P., *et al.* (2001). "Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*." *Plant, Cell and Environment* **21**: 217-226.
- Atar, D., Backx, P. H., Appel, M. M., Gao, W. D. and Marban, E. (1995). "Excitation-transcription coupling mediated by zinc influx through voltage-dependent calcium channels." *J Biol Chem* **270**(6): 2473-2477.
- Ausubel, F. M., Brent, R., *et al.*, Eds. *Current protocols in molecular biology*, Wiley InterScience.
- Axelsen, K. B. and Palmgren, M. G. (2001). "Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in Arabidopsis." *Plant Physiol* **126**(2): 696-706.
- Bähler, J., Wu, J. Q., *et al.* (1998). "Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*." *Yeast* **14**(10): 943-951.
- Bährecke, A. (2004). *Funktionelle Charakterisierung von ZIP-Transportern aus Arabidopsis thaliana und Arabidopsis halleri - Etablierung eines Expressionssystems in Schizosaccharomyces pombe*. Halle / Saale, Martin-Luther-Universität, Halle- Wittenberg. **Dipl.-Biol.**
- Baker, A., Reeves, R. and Hajar, A. (1994). "Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl (Brassicaceae)." *New Phytol* **127**: 61-68.
- Baker, A. J. M. and Brooks, R. R. (1989). "Terrestrial Higher Plants which Hyperaccumulate Metallic Elements—A Review of their Distribution, Ecology and Phytochemistry." *Biorecovery* **1**: 81-126.
- Banci, L., Bertini, I., *et al.* (2002). "A new zinc-protein coordination site in intracellular metal trafficking: solution structure of the Apo and Zn(II) forms of ZntA(46-118)." *J Mol Biol* **323**(5): 883-897.
- Bauer, P., Ling, H. Q. and Guerinot, M. L. (2007). "FIT, the FER-LIKE IRON DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR in Arabidopsis." *Plant Physiol Biochem* **45**(5): 260-261.
- Baxter, I., Tchieu, J., *et al.* (2003). "Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in Arabidopsis and rice." *Plant Physiol* **132**(2): 618-628.
- Beard, S. J., Hashim, R., Membrillo-Hernandez, J., Hughes, M. N. and Poole, R. K. (1997). "Zinc(II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the *zntA* gene (o732) encodes a cation transport ATPase." *Mol Microbiol* **25**(5): 883-891.

- Becher, M., Talke, I. N., Krall, L. and Krämer, U. (2004). "Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*." *Plant J* **37**(2): 251-268.
- Bereczky, Z., Wang, H. Y., Schubert, V., Ganai, M. and Bauer, P. (2003). "Differential regulation of *nramp* and *irt* metal transporter genes in wild type and iron uptake mutants of tomato." *J Biol Chem* **278**(27): 24697-24704.
- Berg, J. M. and Shi, Y. (1996). "The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc." *Science* **271**(5252): 1081-1085.
- Bert, V., Macnair, M. R., de Laguère, P., Saumitou-Laprade, P. and Petit, D. (2000). "Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and non metallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae)." *New Phytol* **146**: 225-233.
- Beyersmann, D. and Haase, H. (2001). "Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells." *Biometals* **14**(3-4): 331-341.
- Bird, A., Evans-Galea, M. V., *et al.* (2000b). "Mapping the DNA binding domain of the Zap1 zinc-responsive transcriptional activator." *J Biol Chem* **275**(21): 16160-16166.
- Bird, A. J., Blankman, E., Stillman, D. J., Eide, D. J. and Winge, D. R. (2004). "The Zap1 transcriptional activator also acts as a repressor by binding downstream of the TATA box in ZRT2." *Embo J* **23**(5): 1123-1132.
- Bird, A. J., McCall, K., *et al.* (2003). "Zinc fingers can act as Zn<sup>2+</sup> sensors to regulate transcriptional activation domain function." *Embo J* **22**(19): 5137-5146.
- Bird, A. J., Swierczek, S., Qiao, W., Eide, D. J. and Winge, D. R. (2006). "Zinc metalloregulation of the zinc finger pair domain." *J Biol Chem* **281**(35): 25326-25335.
- Bird, A. J., Zhao, H., *et al.* (2000a). "A dual role for zinc fingers in both DNA binding and zinc sensing by the Zap1 transcriptional activator." *Embo J* **19**(14): 3704-3713.
- Bittel, D., Dalton, T., Samson, S. L., Gedamu, L. and Andrews, G. K. (1998). "The DNA binding activity of metal response element-binding transcription factor-1 is activated in vivo and in vitro by zinc, but not by other transition metals." *J Biol Chem* **273**(12): 7127-7133.
- Blaudez, D., Kohler, A., Martin, F., Sanders, D. and Chalot, M. (2003). "Poplar metal tolerance protein 1 confers zinc tolerance and is an oligomeric vacuolar zinc transporter with an essential leucine zipper motif." *Plant Cell* **15**(12): 2911-2928.
- Bloß, T. (2001). Charakterisierung von CDF-Transportern aus *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Arabidopsis thaliana*. Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät. Halle / Saale, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg. **Dr. rer. nat.**
- Bloß, T., Clemens, S. and Nies, D. H. (2002). "Characterization of the ZAT1p zinc transporter from *Arabidopsis thaliana* in microbial model organisms and reconstituted proteoliposomes." *Planta* **214**(5): 783-791.
- Bone, N., Millar, J. B., Toda, T. and Armstrong, J. (1998). "Regulated vacuole fusion and fission in *Schizosaccharomyces pombe*: an osmotic response dependent on MAP kinases." *Curr Biol* **8**(3): 135-144.
- Borrelly, G. P., Harrison, M. D., *et al.* (2002). "Surplus zinc is handled by Zym1 metallothionein and Zhf endoplasmic reticulum transporter in *Schizosaccharomyces pombe*." *J Biol Chem* **277**(33): 30394-30400.
- Bovet, L., Feller, U. and Martinoia, E. (2005). "Possible involvement of plant ABC transporters in cadmium detoxification: a cDNA sub-microarray approach." *Environ Int* **31**(2): 263-267.
- Callahan, D. L., Baker, A. J., Kolev, S. D. and Wedd, A. G. (2006). "Metal ion ligands in hyperaccumulating plants." *J Biol Inorg Chem* **11**(1): 2-12.
- Camak, I., Öztürk, L., Marschner, H., Karanlik, S. and Ekiz, H. (1996). "Zinc-efficient wild grasses enhance release of phytodiderophores under zinc deficiency." *J. Plant Nutrition* **19**: 551-563.
- Campoy, S., Jara, M., *et al.* (2002). "Role of the high-affinity zinc uptake znuABC system in *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence." *Infect Immun* **70**(8): 4721-4725.
- Cellier, M., Privé, G., *et al.* (1995). "Nramp defines a family of membrane proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(22): 10089-10093.
- Chao, Y. and Fu, D. (2004). "Kinetic study of the antiport mechanism of an *Escherichia coli* zinc transporter, ZitB." *J Biol Chem* **279**(13): 12043-12050.
- Chen, D., Toone, W. M., *et al.* (2003). "Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress." *Mol Biol Cell* **14**(1): 214-229.
- Clemens, S. (2006). "Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in

- plants." *Biochimie* **88**(11): 1707-1719.
- Clemens, S., Antosiewicz, D. M., Ward, J. M., Schachtman, D. P. and Schroeder, J. I. (1998). "The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(20): 12043-12048.
- Clemens, S., Bloß, T., *et al.* (2002). "A transporter in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells mediates zinc storage and differentially affects transition metal tolerance." *J Biol Chem* **277**(20): 18215-18221.
- Clemens, S., Kim, E. J., Neumann, D. and Schroeder, J. I. (1999). "Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast." *Embo J* **18**(12): 3325-3333.
- Clemens, S., Palmgren, M. G. and Krämer, U. (2002). "A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation." *Trends Plant Sci* **7**(7): 309-315.
- Clemens, S., Schroeder, J. I. and Degenkolb, T. (2001). "*Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase." *Eur J Biochem* **268**(13): 3640-3643.
- Clemens, S. and Simm, C. (2003). "*Schizosaccharomyces pombe* as a model for metal homeostasis in plant cells: the phytochelatin-dependent pathway is the main cadmium detoxification mechanism." *New Phytol* **159**: 323-330.
- Cobbett, C. and Goldsbrough, P. (2002). "Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis." *Annu Rev Plant Biol* **53**: 159-182.
- Colangelo, E. P. and Gueriot, M. L. (2004). "The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response." *Plant Cell* **16**(12): 3400-3412.
- Conklin, D. S., Culbertson, M. R. and Kung, C. (1994). "Interactions between gene products involved in divalent cation transport in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Gen Genet.* **244**(3): 303-311.
- Conklin, D. S., McMaster, J. A., Culbertson, M. R. and Kung, C. (1992). "*COT1*, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **12**(9): 3678-3688.
- Connolly, E. L., Fett, J. P. and Gueriot, M. L. (2002). "Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation." *Plant Cell* **14**(6): 1347-1357.
- Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C. and Rofe, A. M. (2002). "Metallothionein: the multipurpose protein." *Cell Mol Life Sci* **59**(4): 627-647.
- Culotta, V. C., Klomp, L. W., *et al.* (1997). "The copper chaperone for superoxide dismutase." *J Biol Chem* **272**(38): 23469-23472.
- Curie, C., Panaviene, Z., *et al.* (2001). "Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake." *Nature* **409**(6818): 346-349.
- Dainty, S. J., Kennedy, C. A., Watt, S., Bähler, J. and Whitehall, S. K. (2008). "Response of *Schizosaccharomyces pombe* to zinc deficiency." *Eukaryot Cell* **7**(3): 454-464.
- Dalton, T. P., He, L., *et al.* (2005). "Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(9): 3401-3406.
- Desbrosses-Fonrouge, A. G., Voigt, K., *et al.* (2005). "*Arabidopsis thaliana* MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation." *FEBS Lett* **579**(19): 4165-4174.
- Dix, D., Bridgham, J., Broderius, M. and Eide, D. (1997). "Characterization of the FET4 protein of yeast. Evidence for a direct role in the transport of iron." *J Biol Chem* **272**(18): 11770-11777.
- Dix, D. R., Bridgham, J. T., Broderius, M. A., Byersdorfer, C. A. and Eide, D. J. (1994). "The *FET4* gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **269**(42): 26092-26099.
- Dräger, D. B., Desbrosses-Fonrouge, A. G., *et al.* (2004). "Two genes encoding *Arabidopsis halleri* MTP1 metal transport proteins co-segregate with zinc tolerance and account for high MTP1 transcript levels." *Plant J* **39**(3): 425-439.
- Dufner-Beattie, J., Kuo, Y. M., Gitschier, J. and Andrews, G. K. (2004). "The adaptive response to dietary zinc in mice involves the differential cellular localization and zinc regulation of the zinc transporters ZIP4 and ZIP5." *J Biol Chem* **279**(47): 49082-49090.
- Dufner-Beattie, J., Langmade, S. J., Wang, F., Eide, D. and Andrews, G. K. (2003a). "Structure, function, and regulation of a subfamily of mouse zinc transporter genes." *J Biol Chem* **278**(50): 50142-50150.
- Dufner-Beattie, J., Wang, F., *et al.* (2003b). "The acrodermatitis enteropathica gene *ZIP4* encodes a tissue-specific, zinc-regulated zinc transporter in mice." *J Biol Chem* **278**(35): 33474-33481.
- Ecker, D. J., Butt, T. R., *et al.* (1986). "Yeast metallothionein function in metal ion detoxification." *J Biol*

- Chem **261**(36): 16895-16900.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J. and Guerinot, M. L. (1996). "A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(11): 5624-5628.
- Eide, D. J. (2004). "The SLC39 family of metal ion transporters." *Pflugers Arch* **447**(5): 796-800.
- Eide, D. J. (2006). "Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc." *Biochim Biophys Acta* **1763**(7): 711-722.
- Eisen, J. A. (2002). "Brouhaha over the other yeast." *Nature* **415**(6874): 845-848.
- Ellis, C. D., MacDiarmid, C. W. and Eide, D. J. (2005). "Heteromeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells." *J Biol Chem* **280**(31): 28811-28818.
- Ellis, C. D., Wang, F., *et al.* (2004). "Zinc and the Msc2 zinc transporter protein are required for endoplasmic reticulum function." *J Cell Biol* **166**(3): 325-335.
- Eren, E. and Argüello, J. M. (2004). "Arabidopsis HMA2, a divalent heavy metal-transporting P<sub>1B</sub>-type ATPase, is involved in cytoplasmic Zn<sup>2+</sup> homeostasis." *Plant Physiol* **136**(3): 3712-3723.
- Fallert-Müller, A., Falkenburg, P. and Maid, U., Eds. (2004). *Lexikon der Biochemie in zwei Bänden*, Spektrum-Akademischer Verlag.
- Fang, Y., Sugiura, R., *et al.* (2008). "Cation Diffusion Facilitator Cis4 Is Implicated in Golgi Membrane Trafficking via Regulating Zinc Homeostasis in Fission Yeast." *Mol Biol Cell* **19**(4): 1295-1303.
- Felice, M. R., De Domenico, I., *et al.* (2005). "Post-transcriptional regulation of the yeast high affinity iron transport system." *J Biol Chem* **280**(23): 22181-22190.
- Filatov, V., Dowdle, J., *et al.* (2007). "A quantitative trait loci analysis of zinc hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*." *New Phytol* **174**(3): 580-590.
- Forsburg, S. L. (1999). "The best yeast?" *Trends Genet* **15**(9): 340-344.
- Forsburg, S. L. and Sherman, D. A. (1997). "General purpose tagging vectors for fission yeast." *Gene* **191**(2): 191-195.
- Fraústo da Silva, J. J. R. and Williams, P. J. R. (2001). *The biological chemistry of the elements - The inorganic chemistry of life*. Oxford, Oxford University Press.
- Gaither, L. A. and Eide, D. J. (2000). "Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter." *J Biol Chem* **275**(8): 5560-5564.
- Gaither, L. A. and Eide, D. J. (2001). "Eukaryotic zinc transporters and their regulation." *Biometals* **14**(3-4): 251-270.
- Gaither, L. A. and Eide, D. J. (2001). "The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells." *J Biol Chem* **276**(25): 22258-22264.
- Gaxiola, R. A., Fink, G. R. and Hirschi, K. D. (2002). "Genetic manipulation of vacuolar proton pumps and transporters." *Plant Physiol* **129**(3): 967-973.
- Gitan, R. S. and Eide, D. J. (2000). "Zinc-regulated ubiquitin conjugation signals endocytosis of the yeast ZRT1 zinc transporter." *Biochem J* **346 Pt 2**: 329-336.
- Gitan, R. S., Luo, H., Rodgers, J., Broderius, M. and Eide, D. (1998). "Zinc-induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation." *J Biol Chem* **273**(44): 28617-28624.
- Gitan, R. S., Shababi, M., Kramer, M. and Eide, D. J. (2003). "A cytosolic domain of the yeast Zrt1 zinc transporter is required for its post-translational inactivation in response to zinc and cadmium." *J Biol Chem* **278**(41): 39558-39564.
- Glerum, D. M., Shtanko, A. and Tzagoloff, A. (1996a). "Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase." *J Biol Chem* **271**(24): 14504-14509.
- Glerum, D. M., Shtanko, A. and Tzagoloff, A. (1996b). "SCO1 and SCO2 act as high copy suppressors of a mitochondrial copper recruitment defect in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **271**(34): 20531-20535.
- Gomes, D. S., Fragoso, L. C., Riger, C. J., Panek, A. D. and Eleutherio, E. C. (2002). "Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochim Biophys Acta* **1573**(1): 21-25.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. and Hanahan, D. (1990). "Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(12): 4645-4649.
- Grass, G., Franke, S., *et al.* (2005). "The metal permease ZupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum." *J Bacteriol* **187**(5): 1604-1611.
- Grass, G., Wong, M. D., Rosen, B. P., Smith, R. L. and Rensing, C. (2002). "ZupT is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **184**(3): 864-866.
- Gravot, A., Lieutaud, A., *et al.* (2004). "AtHMA3, a plant P1B-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in

- yeast." FEBS Lett **561**(1-3): 22-28.
- Green, C. P. and Thomas, V. L. (1981). "Hemagglutination of human type O erythrocytes, hemolysin production, and serogrouping of Escherichia coli isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis, and asymptomatic bacteriuria." Infect Immun **31**(1): 309-315.
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E. L. and Zenk, M. H. (1989). "Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatase)." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(18): 6838-6842.
- Grill, E., Winnacker, E. L. and Zenk, M. H. (1987). "Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(2): 439-443.
- Grotz, N., Fox, T., et al. (1998). "Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 7220-7224.
- Guérin, R., Arseneault, G., Dumont, S. and Rokeach, L. A. (2008). "Calnexin is involved in apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress in the fission yeast." Mol Biol Cell **19**(10): 4404-4420.
- Guerinot, M. L. (2000). "The ZIP family of metal transporters." Biochim Biophys Acta **1465**(1-2): 190-198.
- Guerinot, M. L. and Salt, D. E. (2001). "Fortified foods and phytoremediation. Two sides of the same coin." Plant Physiol **125**(1): 164-167.
- Guffanti, A. A., Wei, Y., Rood, S. V. and Krulwich, T. A. (2002). "An antiport mechanism for a member of the cation diffusion facilitator family: divalent cations efflux in exchange for K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup>." Mol Microbiol **45**(1): 145-153.
- Günes, C., Heuchel, R., et al. (1998). "Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal-responsive transcriptional activator MTF-1." Embo J **17**(10): 2846-2854.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., et al. (1997). "Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter." Nature **388**(6641): 482-488.
- Ha, S. B., Smith, A. P., et al. (1999). "Phytochelatase synthase genes from Arabidopsis and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*." Plant Cell **11**(6): 1153-1164.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1992). "Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update." FEBS Lett **307**(1): 108-112.
- Hamer, D. H. (1986). "Metallothionein." Annu Rev Biochem **55**: 913-951.
- Hammond, J. P., Bowen, H. C., et al. (2006). "A comparison of the *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi arvense* shoot transcriptomes." New Phytol **170**(2): 239-260.
- Hanas, J. S., Hazuda, D. J., Bogenhagen, D. F., Wu, F. Y. and Wu, C. W. (1983). "Xenopus transcription factor A requires zinc for binding to the 5 S RNA gene." J Biol Chem **258**(23): 14120-14125.
- Hanikenne, M., Talke, I. N., et al. (2008). "Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of *HMA4*." Nature **453**(7193): 391-395.
- Hao, Q., Hong, S. H. and Maret, W. (2007). "Lipid raft-dependent endocytosis of metallothionein in HepG2 cells." J Cell Physiol **210**(2): 428-435.
- Harrison, C., Katayama, S., et al. (2005). "SCF(Pof1)-ubiquitin and its target Zip1 transcription factor mediate cadmium response in fission yeast." Embo J **24**(3): 599-610.
- Haydon, M. J. and Cobbett, C. S. (2007). "A novel major facilitator superfamily protein at the tonoplast influences Zn tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*." Plant Physiol **143**(4): 1705-1719.
- Heinz, U., Kiefer, M., Tholey, A. and Adolph, H. W. (2005). "On the competition for available zinc." J Biol Chem **280**(5): 3197-3207.
- Hell, R. and Stephan, U. W. (2003). "Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants." Planta **216**(4): 541-551.
- Hicke, L. and Dunn, R. (2003). "Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 141-172.
- Ho, E. and Ames, B. N. (2002). "Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFkappa B, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 16770-16775.
- Hoffman, C. S. and Winston, F. (1987). "A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli." Gene **57**(2-3): 267-272.
- Howden, R., Goldsbrough, P. B., Andersen, C. R. and Cobbett, C. S. (1995b). "Cadmium-sensitive, cad1 mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatase deficient." Plant Physiol **107**(4): 1059-1066.
- Huang, L. and Gitschier, J. (1997). "A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse." Nat Genet **17**(3): 292-297.

- Huang, L., Kirschke, C. P., Zhang, Y. and Yu, Y. Y. (2005). "The *ZIP7* gene (*Slc39a7*) encodes a zinc transporter involved in zinc homeostasis of the Golgi apparatus." *J Biol Chem* **280**(15): 15456-15463.
- Huang, L., Yu, Y. Y., Kirschke, C. P., Gertz, E. R. and Lloyd, K. K. (2007). "*Znt7* (*Slc30a7*)-deficient mice display reduced body zinc status and body fat accumulation." *J Biol Chem* **282**(51): 37053-37063.
- Hussain, D., Haydon, M. J., *et al.* (2004). "P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*." *Plant Cell* **16**(5): 1327-1339.
- Irving, H. M. N. H. and Williams, P. J. R. (1948). "Order of stability of metal complexes." *Nature* **162**: 746-747.
- Ishihara, K., Yamazaki, T., *et al.* (2006). "Zinc transport complexes contribute to the homeostatic maintenance of secretory pathway function in vertebrate cells." *J Biol Chem* **281**(26): 17743-17750.
- Jakoby, M., Wang, H. Y., Reidt, W., Weisshaar, B. and Bauer, P. (2004). "FRU (BHLH029) is required for induction of iron mobilization genes in *Arabidopsis thaliana*." *FEBS Lett* **577**(3): 528-534.
- Jensen, L. T. and Culotta, V. C. (2002). "Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* *FET4* by oxygen and iron." *J Mol Biol* **318**(2): 251-260.
- Kamizono, A., Nishizawa, M., Teranishi, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1989). "Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Gen Genet* **219**(1-2): 161-167.
- Katzmann, D. J., Odorizzi, G. and Emr, S. D. (2002). "Receptor downregulation and multivesicular-body sorting." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(12): 893-905.
- Keeney, J. B. and Boeke, J. D. (1994). "Efficient targeted integration at *leu1-32* and *ura4-294* in *Schizosaccharomyces pombe*." *Genetics* **136**(3): 849-856.
- Keilin, D. and Mann, T. (1940). "Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme." *Biochem J* **34**(8-9): 1163-1176.
- Kerkeb, L., Mukherjee, I., *et al.* (2008). "Iron-induced turnover of the *Arabidopsis* IRON-REGULATED TRANSPORTER1 metal transporter requires lysine residues." *Plant Physiol* **146**(4): 1964-1973.
- Kim, B. E., Wang, F., *et al.* (2004). " $Zn^{2+}$ -stimulated endocytosis of the mZIP4 zinc transporter regulates its location at the plasma membrane." *J Biol Chem* **279**(6): 4523-4530.
- Kim, D. Y., Bovet, L., *et al.* (2006). "AtATM3 is involved in heavy metal resistance in *Arabidopsis*." *Plant Physiol* **140**(3): 922-932.
- Kobae, Y., Uemura, T., *et al.* (2004). "Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis." *Plant Cell Physiol* **45**(12): 1749-1758.
- Koh, J. Y., Suh, S. W., *et al.* (1996). "The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia." *Science* **272**(5264): 1013-1016.
- Korshunova, Y. O., Eide, D., Clark, W. G., Guerinot, M. L. and Pakrasi, H. B. (1999). "The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range." *Plant Mol Biol* **40**(1): 37-44.
- Krämer, U. (2005). "MTP1 mops up excess zinc in *Arabidopsis* cells." *Trends Plant Sci* **10**(7): 313-315.
- Krämer, U., Cotter-Howells, J. D., Charnock, J. M., Baker, A. J. M. and Smith, J. A. C. (1996). "Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel." *Nature* **379**: 635-638.
- Krämer, U., Talke, I. N. and Hanikenne, M. (2007). "Transition metal transport." *FEBS Lett* **581**(12): 2263-2272.
- Kumánovics, A., Poruk, K. E., Osborn, K. A., Ward, D. M. and Kaplan, J. (2006). "*YKE4* (YIL023C) encodes a bidirectional zinc transporter in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **281**(32): 22566-22574.
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F. J. and McGrath, S. P. (2000). "Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*." *Planta* **212**(1): 75-84.
- Küpper, H., Zhao, F. J. and McGrath, S. P. (1999). "Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*." *Plant Physiol* **119**: 305-311.
- Labbé, S., Pelletier, B. and Mercier, A. (2007). "Iron homeostasis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *Biometals* **20**(3-4): 523-537.
- Labbé, S., Peña, M. M., Fernandes, A. R. and Thiele, D. J. (1999). "A copper-sensing transcription factor regulates iron uptake genes in *Schizosaccharomyces pombe*." *J Biol Chem* **274**(51): 36252-36260.

- Lane, T. W. and Morel, F. M. (2000). "A biological function for cadmium in marine diatoms." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4627-4631.
- Langmade, S. J., Ravindra, R., Daniels, P. J. and Andrews, G. K. (2000). "The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse *ZnT1* gene." *J Biol Chem* **275**(44): 34803-34809.
- Lasat, M. M., Baker, A. and Kochian, L. V. (1996). "Physiological Characterization of Root Zn<sup>2+</sup> Absorption and Translocation to Shoots in Zn Hyperaccumulator and Nonaccumulator Species of *Thlaspi*." *Plant Physiol* **112**(4): 1715-1722.
- Lasat, M. M., Baker, A. J. and Kochian, L. V. (1998). "Altered Zn compartmentation in the root symplasm and stimulated Zn absorption into the leaf as mechanisms involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*." *Plant Physiol* **118**(3): 875-883.
- Lasat, M. M., Pence, N. S., Garvin, D. F., Ebbs, S. D. and Kochian, L. V. (2000). "Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*." *J Exp Bot* **51**(342): 71-79.
- Lasswell, J., Rogg, L. E., Nelson, D. C., Rongey, C. and Bartel, B. (2000). "Cloning and characterization of *IAR1*, a gene required for auxin conjugate sensitivity in Arabidopsis." *Plant Cell* **12**(12): 2395-2408.
- Lee, J. W. and Helmann, J. D. (2007). "Functional specialization within the Fur family of metalloregulators." *Biometals* **20**(3-4): 485-499.
- Li, L. and Kaplan, J. (1997). "Characterization of two homologous yeast genes that encode mitochondrial iron transporters." *J Biol Chem* **272**(45): 28485-28493.
- Li, L. and 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**(35): 22181-22187.
- Li, L. and Kaplan, J. (2001). "The yeast gene *MSC2*, a member of the cation diffusion facilitator family, affects the cellular distribution of zinc." *J Biol Chem* **276**(7): 5036-5043.
- Li, Z. S., Lu, Y. P., *et al.* (1997). "A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(1): 42-47.
- Lin, H., Kumanovics, A., *et al.* (2008). "A single amino acid change in the yeast vacuolar metal transporters ZRC1 and COT1 alters their substrate specificity." *J Biol Chem* **283**(49): 33865-33873.
- Lin, S. J. and Culotta, V. C. (1995). "The *ATX1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(9): 3784-3788.
- Lin, S. J., Pufahl, R. A., Dancis, A., O'Halloran, T. V. and Culotta, V. C. (1997). "A role for the *Saccharomyces cerevisiae* *ATX1* gene in copper trafficking and iron transport." *J Biol Chem* **272**(14): 9215-9220.
- Lin, Y.-F., Liang, H.-M., *et al.* (2009). "Arabidopsis IRT3 is a Zn-regulated and plasma membrane localized Zn/Fe transporter." *New Phytol* **182**: 392-404.
- Lindner, P. (1893). "*Schizosaccharomyces pombe* n. sp., ein neuer Gahrungserreger." *Mitteilungen aus dem Vereinslaboratorium*: 1298-1300.
- Liu, X. F. and Culotta, V. C. (1999). "Post-translation control of Nramp metal transport in yeast. Role of metal ions and the *BSD2* gene." *J Biol Chem* **274**(8): 4863-4868.
- Liuzzi, J. P. and Cousins, R. J. (2004). "Mammalian zinc transporters." *Annu Rev Nutr* **24**: 151-172.
- Lu, M. and Fu, D. (2007). "Structure of the zinc transporter YipP." *Science* **317**(5845): 1746-1748.
- Lyne, R., Burns, G., *et al.* (2003). "Whole-genome microarrays of fission yeast: characteristics, accuracy, reproducibility, and processing of array data." *BMC Genomics* **4**(1): 27.
- Lyons, T. J., Gasch, A. P., *et al.* (2000). "Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14): 7957-7962.
- Ma, J. F., Ueno, D., Zhao, F. J. and McGrath, S. P. (2005). "Subcellular localisation of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*." *Planta* **220**(5): 731-736.
- MacDiarmid, C. W., Gaither, L. A. and Eide, D. (2000). "Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*." *Embo J* **19**(12): 2845-2855.
- MacDiarmid, C. W., Milanick, M. A. and Eide, D. J. (2002). "Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **277**(42): 39187-39194.
- MacDiarmid, C. W., Milanick, M. A. and Eide, D. J. (2003). "Induction of the ZRC1 metal tolerance gene in zinc-limited yeast confers resistance to zinc shock." *J Biol Chem* **278**(17): 15065-15072.
- Macnair, M. R. (2002). "Within and between population genetic variation for zinc accumulation in *Arabidopsis halleri*." *New Phytol* **155**: 59-66.
- Maitani, T., Kubota, H., Sato, K. and 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**(4): 1145-1150.
- Mao, X., Kim, B. E., Wang, F., Eide, D. J. and Petris, M. J. (2007). "A histidine-rich cluster mediates the ubiquitination and degradation of the human zinc transporter, hZIP4, and protects against zinc cytotoxicity." *J Biol Chem* **282**(10): 6992-7000.
- Maret, W. (2007). "Metallothionein redox biology in the cytoprotective and cytotoxic functions of zinc." *Exp Gerontol* **43**(5): 363-369.
- Marschner, H. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. London, Academic Press.
- Matsuyama, A., Arai, R., *et al.* (2006). "ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *Nat Biotechnol* **24**(7): 841-847.
- Mattatall, N. R., Jazairi, J. and Hill, B. C. (2000). "Characterization of YpmQ, an accessory protein required for the expression of cytochrome c oxidase in *Bacillus subtilis*." *J Biol Chem* **275**(37): 28802-28809.
- Merian, E., Anke, M., Ichnat, M. and Stoeppler, M., Eds. (2004). *Elements and their compounds in the environment: occurrence, analysis and biological relevance*, WILEY-VCH Verlag GMBH & Co. KGaA.
- Mills, R. F., Francini, A., *et al.* (2005). "The plant P1B-type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels." *FEBS Lett* **579**(3): 783-791.
- Mills, R. F., Krijger, G. C., Baccarini, P. J., Hall, J. L. and Williams, L. E. (2003). "Functional expression of AtHMA4, a P1B-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass." *Plant J* **35**(2): 164-176.
- Milner, M. J. and Kochian, L. V. (2008). "Investigating heavy-metal hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a model system." *Ann Bot (Lond)* **102**(1): 3-13.
- Miyabe, S., Izawa, S. and Inoue, Y. (2000). "Expression of ZRC1 coding for suppressor of zinc toxicity is induced by zinc-starvation stress in Zap1-dependent fashion in *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochem Biophys Res Commun* **276**(3): 879-884.
- Moreau, S., Thomson, R. M., *et al.* (2002). "GmZIP1 encodes a symbiosis-specific zinc transporter in soybean." *J Biol Chem* **277**(7): 4738-4746.
- Mortimer, C. E. (1996). *Chemie: Das Basiswissen der Chemie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Mulvihill, D. P., Pollard, P. J., Win, T. Z. and Hyams, J. S. (2001). "Myosin V-mediated vacuole distribution and fusion in fission yeast." *Curr Biol* **11**(14): 1124-1127.
- Mutoh, N. and Hayashi, Y. (1988). "Isolation of mutants of *Schizosaccharomyces pombe* unable to synthesize cadystin, small cadmium-binding peptides." *Biochem Biophys Res Commun* **151**(1): 32-39.
- Nanamiya, H., Akanuma, G., *et al.* (2004). "Zinc is a key factor in controlling alternation of two types of L31 protein in the *Bacillus subtilis* ribosome." *Mol Microbiol* **52**(1): 273-283.
- Nelbach, M. E., Pigiet, V. P., Jr., Gerhart, J. C. and Schachman, H. K. (1972). "A role for zinc in the quaternary structure of aspartate transcarbamylase from *Escherichia coli*." *Biochemistry* **11**(3): 315-327.
- Nies, D. H. (1992). "CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (czc system) in *Alcaligenes eutrophus*." *J Bacteriol* **174**(24): 8102-8110.
- Nies, D. H. (2003). "Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes." *FEMS Microbiol Rev* **27**(2-3): 313-339.
- Nordberg, G. F. (2004). "Cadmium and health in the 21st century--historical remarks and trends for the future." *Biometals* **17**(5): 485-489.
- Ooi, C. E., Rabinovich, E., Dancis, A., Bonifacino, J. S. and Klausner, R. D. (1996). "Copper-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis." *Embo J* **15**(14): 3515-3523.
- Oomen, R. J., Wu, J., *et al.* (2009). "Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*." *New Phytol* **181**(3): 637-650.
- Outten, C. E. and O'Halloran, T. V. (2001). "Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis." *Science* **292**(5526): 2488-2492.
- Outten, C. E., Tobin, D. A., Penner-Hahn, J. E. and O'Halloran, T. V. (2001). "Characterization of the metal receptor sites in *Escherichia coli* Zur, an ultrasensitive zinc(II) metalloregulatory protein." *Biochemistry* **40**(35): 10417-10423.
- Pahl, H. L. and Baeuerle, P. A. (1996). "Control of gene expression by proteolysis." *Curr Opin Cell Biol* **8**(3): 340-347.

- Palmiter, R. D. and Findley, S. D. (1995). "Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc." *Embo J* **14**(4): 639-649.
- Papoyan, A., Pineros, M. and Kochian, L. V. (2007). "Plant Cd<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> status effects on root and shoot heavy metal accumulation in *Thlaspi caerulescens*." *New Phytol* **175**(1): 51-58.
- Patil, C. and Walter, P. (2001). "Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals." *Curr Opin Cell Biol* **13**(3): 349-355.
- Patzner, S. I. and Hantke, K. (1998). "The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **28**(6): 1199-1210.
- Patzner, S. I. and Hantke, K. (2000). "The zinc-responsive regulator Zur and its control of the znu gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **275**(32): 24321-24332.
- Paulsen, I. T. and Saier, M. H., Jr. (1997). "A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins." *J Membr Biol* **156**(2): 99-103.
- Pelletier, B., Beaudoin, J., Mukai, Y. and Labbé, S. (2002). "Fep1, an iron sensor regulating iron transporter gene expression in *Schizosaccharomyces pombe*." *J Biol Chem* **277**(25): 22950-22958.
- Pence, N. S., Larsen, P. B., *et al.* (2000). "The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4956-4960.
- Pittman, J. K. and Hirschi, K. D. (2001). "Regulation of CAX1, an Arabidopsis Ca(2+)/H<sup>+</sup> antiporter. Identification of an N-terminal autoinhibitory domain." *Plant Physiol* **127**(3): 1020-1029.
- Prasad, A. S. (2001). "Discovery of human zinc deficiency: impact on human health." *Nutrition* **17**(7-8): 685-687.
- Prévéral, S., Gayet, L., *et al.* (2009). "A common highly conserved cadmium detoxification mechanism from bacteria to humans: heavy metal tolerance conferred by the ATP-binding cassette (ABC) transporter SpHMT1 requires glutathione but not metal-chelating phytochelatin peptides." *J Biol Chem* **284**(8): 4936-4943.
- Radtke, F., Heuchel, R., *et al.* (1993). "Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter." *Embo J* **12**(4): 1355-1362.
- Raulin, J. (1869). "Etudes cliniques sur la vegetation." *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.* **11**(93).
- Rauser, W. E. (1990). "Phytochelatin." *Annu Rev Biochem* **59**: 61-86.
- Rauser, W. E. (1995). "Phytochelatin and related peptides. Structure, biosynthesis, and function." *Plant Physiol* **109**(4): 1141-1149.
- Rea, P. A., Li, Z. S., Lu, Y. P., Drozdowicz, Y. M. and Martinoia, E. (1998). "From Vacuolar Gs-X Pumps to Multispecific Abc Transporters." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 727-760.
- Rensing, C., Ghosh, M. and Rosen, B. P. (1999). "Families of soft-metal-ion-transporting ATPases." *J Bacteriol* **181**(19): 5891-5897.
- Rensing, C., Mitra, B. and Rosen, B. P. (1997). "The zntA gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(26): 14326-14331.
- Roberts, L. A., Pierson, A. J., Panaviene, Z. and Walker, E. L. (2004). "Yellow stripe1. Expanded roles for the maize iron-phytosiderophore transporter." *Plant Physiol* **135**(1): 112-120.
- Rogers, E. E., Eide, D. J. and Guerinot, M. L. (2000). "Altered selectivity in an Arabidopsis metal transporter." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(22): 12356-12360.
- Rustici, G., van Bakel, H., *et al.* (2007). "Global transcriptional responses of fission and budding yeast to changes in copper and iron levels: a comparative study." *Genome Biol* **8**(5): R73.
- Salt, D. E., Blaylock, M., *et al.* (1995). "Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants." *Biotechnology (N Y)* **13**(5): 468-474.
- Sarret, G., Saumitou-Laprade, P., *et al.* (2002). "Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*." *Plant Physiol* **130**(4): 1815-1826.
- Schaaf, G., Ludewig, U., *et al.* (2004). "ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals." *J Biol Chem* **279**(10): 9091-9096.
- Schmöger, M. E., Oven, M. and Grill, E. (2000). "Detoxification of arsenic by phytochelatin in plants." *Plant Physiol* **122**(3): 793-801.
- Sekler, I., Sensi, S. L., Hershinkel, M. and Silverman, W. F. (2007). "Mechanism and regulation of cellular zinc transport." *Mol Med* **13**(7-8): 337-343.
- Shigaki, T., Barkla, B. J., *et al.* (2005). "Identification of a crucial histidine involved in metal transport activity in the Arabidopsis cation/H<sup>+</sup> exchanger CAX1." *J Biol Chem* **280**(34): 30136-30142.
- Simm, C. (2004). Das Metallothionein Zym1 aus *Schizosaccharomyces pombe*: Untersuchungen zur Funktion des Metallothioneins in einem phytochelatin-bildenden Organismus. Mathematisch-

- naturwissenschaftlich-Technische Fakultät. Halle (Saale), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. **Dr. rer. nat.**
- Simm, C., Lahner, B., *et al.* (2007). "*Saccharomyces cerevisiae* vacuole in zinc storage and intracellular zinc distribution." *Eukaryot Cell* **6**(7): 1166-1177.
- Sinclair, S. A., Sherson, S. M., Jarvis, R., Camakaris, J. and Cobbett, C. S. (2007). "The use of the zinc-fluorophore, Zinpyr-1, in the study of zinc homeostasis in *Arabidopsis* roots." *New Phytol* **174**(1): 39-45.
- Sipiczki, M. (2000). "Where does fission yeast sit on the tree of life?" *Genome Biol* **1**(2): REVIEWS1011.
- Smirnova, I. V., Bittel, D. C., Ravindra, R., Jiang, H. and Andrews, G. K. (2000). "Zinc and cadmium can promote rapid nuclear translocation of metal response element-binding transcription factor-1." *J Biol Chem* **275**(13): 9377-9384.
- Solioz, M. and Vulpe, C. (1996). "CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals." *Trends Biochem Sci* **21**(7): 237-241.
- Stohs, S. J. and Bagchi, D. (1995). "Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions." *Free Radic Biol Med* **18**(2): 321-336.
- Stohs, S. J., Bagchi, D., Hassoun, E. and Bagchi, M. (2001). "Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions." *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **20**(2): 77-88.
- Suhy, D. A. and O'Halloran, T. V. (1996). "Metal-responsive gene regulation and the zinc metalloregulatory model." *Met Ions Biol Syst* **32**: 557-578.
- Supek, F., Supekova, L., Nelson, H. and Nelson, N. (1996). "A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(10): 5105-5110.
- Suzuki, T., Ishihara, K., *et al.* (2005). "Two different zinc transport complexes of cation diffusion facilitator proteins localized in the secretory pathway operate to activate alkaline phosphatases in vertebrate cells." *J Biol Chem* **280**(35): 30956-30962.
- Szczyпка, M. S., Wemmie, J. A., Moye-Rowley, W. S. and Thiele, D. J. (1994). "A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein." *J Biol Chem* **269**(36): 22853-22857.
- Takegawa, K., Iwaki, T., *et al.* (2003). "Vesicle-mediated protein transport pathways to the vacuole in *Schizosaccharomyces pombe*." *Cell Struct Funct* **28**(5): 399-417.
- Talke, I. N., Hanikenne, M. and Krämer, U. (2006). "Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*." *Plant Physiol* **142**(1): 148-167.
- Taylor, K. M., Morgan, H. E., Johnson, A. and Nicholson, R. I. (2004). "Structure-function analysis of HKE4, a member of the new LIV-1 subfamily of zinc transporters." *Biochem J* **377**(Pt 1): 131-139.
- Taylor, K. M., Morgan, H. E., Johnson, A. and Nicholson, R. I. (2005). "Structure-function analysis of a novel member of the LIV-1 subfamily of zinc transporters, ZIP14." *FEBS Lett* **579**(2): 427-432.
- Taylor, K. M., Morgan, H. E., *et al.* (2007). "The emerging role of the LIV-1 subfamily of zinc transporters in breast cancer." *Mol Med* **13**(7-8): 396-406.
- Tennstedt, P., Peisker, D., Böttcher, C., Trampczynska, A. and Clemens, S. (2009). "Phytochelatin synthesis is essential for the detoxification of excess zinc and contributes significantly to the accumulation of zinc." *Plant Physiol* **149**(2): 938-948.
- ter Linde, J. J., Liang, H., *et al.* (1999). "Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bacteriol* **181**(24): 7409-7413.
- Thomine, S., Lelievre, F., Debarbieux, E., Schroeder, J. I. and Barbier-Brygoo, H. (2003). "AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency." *Plant J* **34**(5): 685-695.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J. M., Crawford, N. M. and 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 U S A* **97**(9): 4991-4996.
- Thumann, J., Grill, E., Winnacker, E. L. and Zenk, M. H. (1991). "Reactivation of metal-requiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes." *FEBS Lett* **284**(1): 66-69.
- Toone, W. M. and Jones, N. (1998). "Stress-activated signalling pathways in yeast." *Genes Cells* **3**(8): 485-498.
- Trampczynska, A., Böttcher, C. and Clemens, S. (2006). "The transition metal chelator nicotianamine is synthesized by filamentous fungi." *FEBS Lett* **580**(13): 3173-3178.
- Tran, P. T., Paoletti, A. and Chang, F. (2004). "Imaging green fluorescent protein fusions in living fission

- yeast cells." *Methods* **33**(3): 220-225.
- Truong-Tran, A. Q., Carter, J., Ruffin, R. E. and Zalewski, P. D. (2001). "The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death." *Biometals* **14**(3-4): 315-330.
- Vallee, B. L. and Auld, D. S. (1989). "Short and long spacer sequences and other structural features of zinc binding sites in zinc enzymes." *FEBS Lett* **257**(1): 138-140.
- Vallee, B. L. and Auld, D. S. (1990). "Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins." *Biochemistry* **29**(24): 5647-5659.
- Vallee, B. L. and Falchuk, K. H. (1993). "The biochemical basis of zinc physiology." *Physiol Rev* **73**(1): 79-118.
- van Assche, F. and Clijsters, H. (1990). "A biological test system for the evaluation of the phytotoxicity of metal-contaminated soils." *Environ Pollut* **66**(2): 157-172.
- van de Mortel, J. E., Almar Villanueva, L., *et al.* (2006). "Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*." *Plant Physiol* **142**(3): 1127-1147.
- van der Zaal, B. J., Neuteboom, L. W., *et al.* (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**(3): 1047-1055.
- Vatamaniuk, O. K., Mari, S., Lu, Y. P. and Rea, P. A. (1999). "AtPCS1, a phytochelatin synthase from Arabidopsis: isolation and in vitro reconstitution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 7110-7115.
- Verret, F., Gravot, A., *et al.* (2004). "Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance." *FEBS Lett* **576**(3): 306-312.
- Verret, F., Gravot, A., *et al.* (2005). "Heavy metal transport by AtHMA4 involves the N-terminal degenerated metal binding domain and the C-terminal His11 stretch." *FEBS Lett* **579**(6): 1515-1522.
- Vert, G., Grotz, N., *et al.* (2002). "IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth." *Plant Cell* **14**(6): 1223-1233.
- Vidal, S. M., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E. and Gros, P. (1993). "Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for *Bcg*." *Cell* **73**(3): 469-485.
- Vogt, K., Mellor, J., Tong, G. and Nicoll, R. (2000). "The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses." *Neuron* **26**(1): 187-196.
- von Wirén, N., Marschner, H. and Römheld, V. (1996). "Roots of Iron-Efficient Maize also Absorb Phytosiderophore-Chelated Zinc." *Plant Physiol* **111**(4): 1119-1125.
- von Wirén, N., Mori, S., Marschner, H. and Römheld, V. (1994). "Iron Inefficiency in Maize Mutant *ys1* (*Zea mays* L. cv Yellow-Stripe) Is Caused by a Defect in Uptake of Iron Phytosiderophores." *Plant Physiol* **106**(1): 71-77.
- Wang, F., Dufner-Beattie, J., *et al.* (2004a). "Zinc-stimulated endocytosis controls activity of the mouse ZIP1 and ZIP3 zinc uptake transporters." *J Biol Chem* **279**(23): 24631-24639.
- Wang, H., Tang, X. and Balasubramanian, M. K. (2003). "Rho3p regulates cell separation by modulating exocyst function in *Schizosaccharomyces pombe*." *Genetics* **164**(4): 1323-1331.
- Waters, B. M., Chu, H. H., *et al.* (2006). "Mutations in Arabidopsis *yellow stripe-like1* and *yellow stripe-like3* reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds." *Plant Physiol* **141**(4): 1446-1458.
- Waters, B. M. and Eide, D. J. (2002). "Combinatorial control of yeast *FET4* gene expression by iron, zinc, and oxygen." *J Biol Chem* **277**(37): 33749-33757.
- Weber, M., Harada, E., Vess, C., Roepenack-Lahaye, E. and Clemens, S. (2004). "Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors." *Plant J* **37**(2): 269-281.
- Weber, M., Trampczynska, A. and Clemens, S. (2006). "Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd(2+)-hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri*." *Plant Cell Environ* **29**(5): 950-963.
- Wei, Y. and Fu, D. (2006). "Binding and transport of metal ions at the dimer interface of the *Escherichia coli* metal transporter YiiP." *J Biol Chem* **281**(33): 23492-23502.
- Weidauer, E. (2001). Der Einfluss von oxidativem Stress auf die antioxidativen Enzyme von Lungenzellen und Aspekte zum Mechanismus der Paraquattoxizität. Medizinische Fakultät. Halle, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. **Dr. med.**
- West, A. K., Stallings, R., *et al.* (1990). "Human metallothionein genes: structure of the functional locus at

- 16q13." Genomics **8**(3): 513-518.
- Wickner, W. (2002). "Yeast vacuoles and membrane fusion pathways." EMBO J **21**(6): 1241-1247.
- Wintz, H., Fox, T., *et al.* (2003). "Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis." J Biol Chem **278**(48): 47644-47653.
- Wixon, J. (2002). "Featured Organism: *Schizosaccharomyces pombe*, The Fission Yeast." Comp Funct Genomics **3**(2): 194-204.
- Wood, V., Gwilliam, R., *et al.* (2002). "The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*." Nature **415**(6874): 871-880.
- Wu, C. Y., Bird, A. J., Winge, D. R. and Eide, D. J. (2007). "Regulation of the yeast TSA1 peroxiredoxin by ZAP1 is an adaptive response to the oxidative stress of zinc deficiency." J Biol Chem **282**(4): 2184-2195.
- Xu, Y., Feng, L., Jeffrey, P. D., Shi, Y. and Morel, F. M. (2008). "Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms." Nature **452**(7183): 56-61.
- Yanagida, M. (2002). "The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*." Genome Biol **3**(3): COMMENT2003.
- Yang, X. E., Long, X. X., *et al.* (2004). "Cadmium tolerance and hyperaccumulation in a new Zn-hyperaccumulating plant species (*Sedum alfredii* Hance)." Plant and Soil **259**: 181-189.
- Yang, Y., Maret, W. and Vallee, B. L. (2001). "Differential fluorescence labeling of cysteinyl clusters uncovers high tissue levels of thionein." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(10): 5556-5559.
- Yepiskoposyan, H., Egli, D., *et al.* (2006). "Transcriptome response to heavy metal stress in *Drosophila* reveals a new zinc transporter that confers resistance to zinc." Nucleic Acids Res **34**(17): 4866-4877.
- Yuan, Y., Wu, H., *et al.* (2008). "FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in Arabidopsis." Cell Res **18**(3): 385-397.
- Zhao, F. J., Jiang, R. F., Dunham, S. J. and McGrath, S. P. (2006). "Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*." New Phytol **172**(4): 646-654.
- Zhao, H., Butler, E., *et al.* (1998). "Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the ZAP1 transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements." J Biol Chem **273**(44): 28713-28720.
- Zhao, H. and Eide, D. (1996a). "The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(6): 2454-2458.
- Zhao, H. and Eide, D. (1996b). "The *ZRT2* gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **271**(38): 23203-23210.
- Zhao, H. and Eide, D. J. (1997). "Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **17**(9): 5044-5052.
- Zhou, H. and Thiele, D. J. (2001). "Identification of a novel high affinity copper transport complex in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." J Biol Chem **276**(23): 20529-20535.

## Danksagung

Auch ich möchte die nun wirklich letzte Seite dieser Arbeit nutzen, um mich bei allen Unterstützern; Helfern, Förderern und Kollegen zu bedanken, ohne die eine Promotionsarbeit schlicht nicht möglich ist.

Mein erstes Dankeschön gilt deshalb Prof. Dr. habil Stephan Clemens, der mich schon während meiner Diplomarbeit betreute und mir auch bei der Konzeption, beim Vorantreiben und der Umsetzung dieser Arbeit half. Vielen Dank für die Motivation, die Denkanstöße und die entspannte, kreative Arbeitsatmosphäre.

Für die Möglichkeit in der Abteilung Stress- und Entwicklung forschen zu dürfen, auch noch nach dem Umzug der Arbeitsgruppe Metallhomöostase nach Bayreuth, möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. D. Scheel bedanken.

Für die kleinen und großen Hilfestellungen bei den AAS- und ICP- Analysen möchte ich mich bei Dr. habil Ute Krämer und Dr. Aleksandra Tramcynska bedanken.

Nadine Taudte, Dr. habil. G. Grass und Prof. Dr. D.H. Nies gilt mein Dank für die Ermöglichung und Unterstützung bei den Zinkaufnahmeassays.

Desweiteren danke ich Dr. Mandy Birschwilks, Sylvia Krüger, Dr. G. Hause und Dr. B. Hause für die praktische Hilfe bei den mikroskopischen Aufnahmen sowohl am Elektronenmikroskop als auch am Confocal.

Ich danke dem DFG-Graduiertenkolleg „Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe“ für die finanzielle Förderung und den Kollegiaten, unserem Sprecher Prof. Dr. G. J. Krauß sowie den Mitwirkenden ProfessorInnen für viele Diskussionen und Gespräche und Anregungen.

Auch danke ich der Arbeitsgruppe von Prof. John Armstrong für die Unterweisungen am Confocalmikroskop und den vielen Tips zum Umgang und der Physiologie von Pombe.

Ich danke Gerit Bethke für die erbaulichen, nächtlichen Gespräche über Zink, Ethylen und den Leuten die alles alle machen, Thomas Spielau für die sich immer wiederholende Nutzung seiner Arbeitsrechner (Viele Grüße auch an Küken), Daniel Peiskau für die Erduldung meiner verschlungen Gedankengänge, nochmals Aleksandra Tramcynska diesmal für die vielen Denkanstöße (jak się masz?) und allen KollegInnen im Großraumlabor für die nette Zusammenarbeit.

Ein großes Dankeschön geht nicht zuletzt an meinen Mann Jens, der während der gesamte Arbeit unterstützend, aufmunternd und geduldig an meiner Seite stand. Und auch wenn unser Sohn Jonathan in seinem jungen Leben nichts mit der Entstehung dieser Arbeit zu tun hatte, bin ich dankbar, dass es ihn gibt.

Besonders Danken möchte ich auch meinen Eltern Christel und Axel Bährecke. Ihr wart immer für mich da.

## Lebenslauf

### persönliche Daten

Name: Annegret Boch,  
geborene Bährecke

Geburtsdatum: 28.12.1977  
Geburtsort: Schönebeck  
Familienstand: verheiratet, 1Kind

### Schulbildung

1984 - 1990 POS W.I. Lenin, Schönebeck  
1990 - 1996 Dr. Tolberg Gymnasium, Schönebeck  
Schulabschluss: Abitur

### freiwillige soziale Hilfstätigkeit

1996-1997 Freiwilliges Soziales Jahr, Internationaler Bund, Magdeburg

### Berufsausbildung

10/1997-05/2004 Studium der Biologie,  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Abschluss: Diplom-Biologin

### Promotion

06/2004-06/2007 DFG-Doktorandenstipendium im Graduiertenkolleg  
„Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch  
relevante Wirkstoffe“,  
Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle  
Betreuer: PD Dr. Stephan Clemens

Thema: Funktionelle Charakterisierung von ZIP-Transproteinen aus  
Arabidopsis und *Schizosaccharomyces pombe*

06/2005-08/2005 EU Marie-Curie Fellowship  
Training Site: Functional Genomics of Fission Yeast  
University of Sussex, Brighton  
supervisor: Prof. Dr. John Armstrong

08/2007-11/2007 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Leibniz-Institute für Pflanzenbiochemie.  
Halle

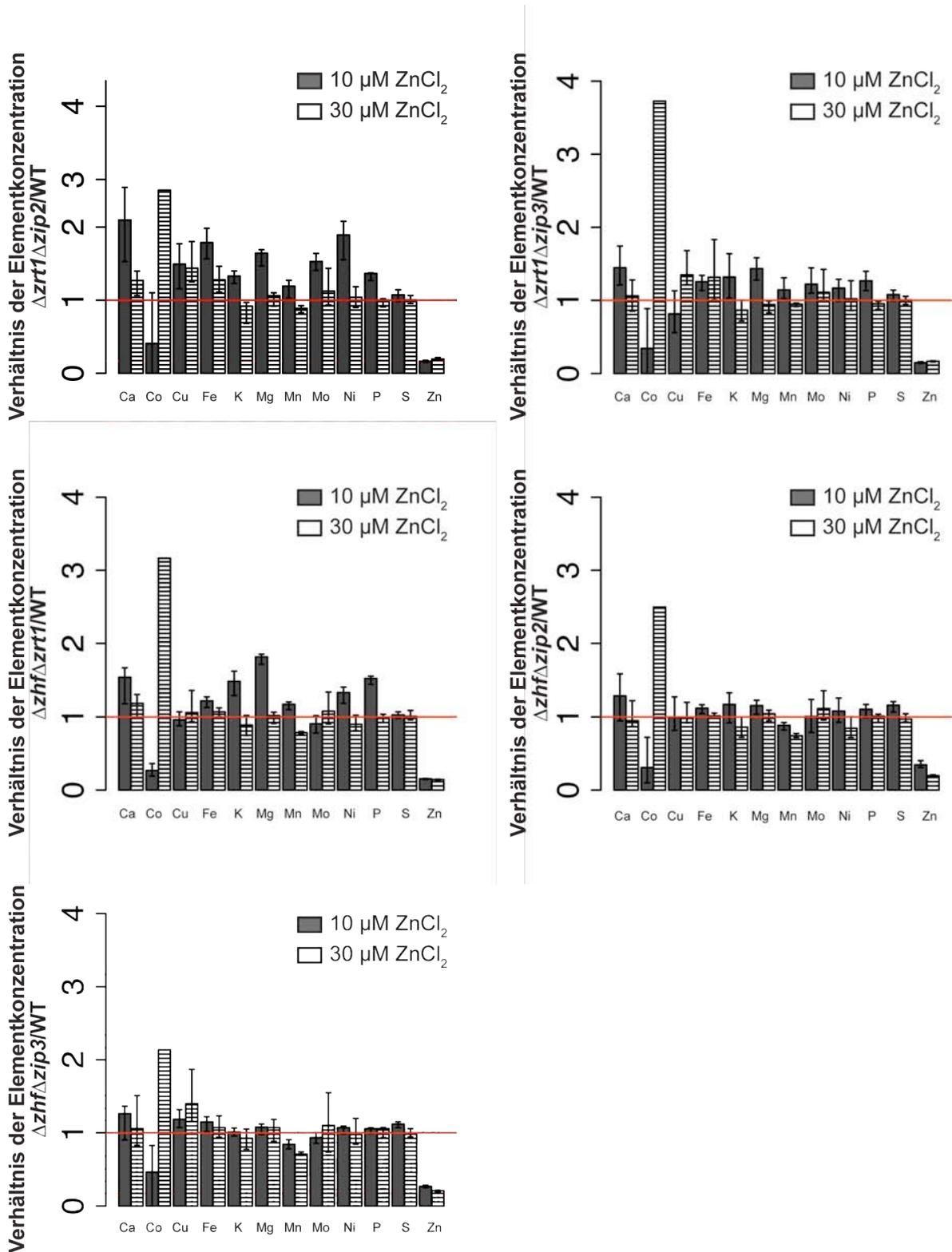
---

Erklärung:

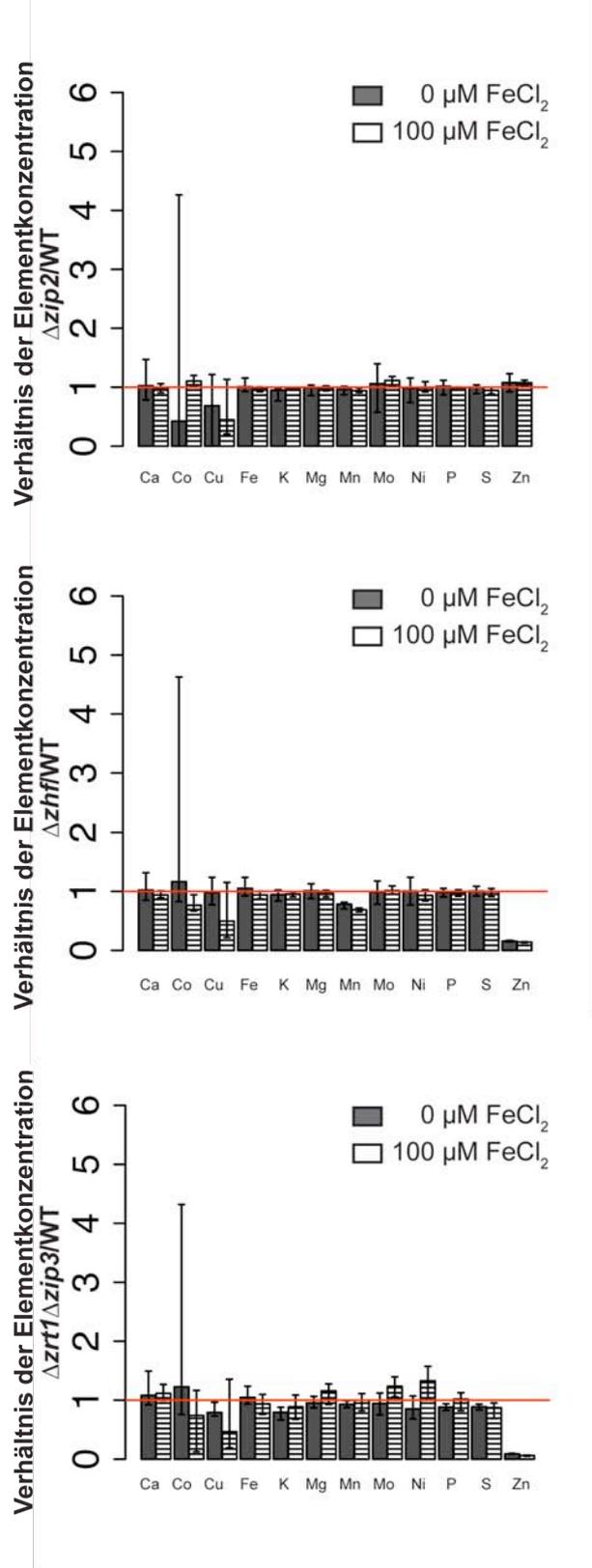
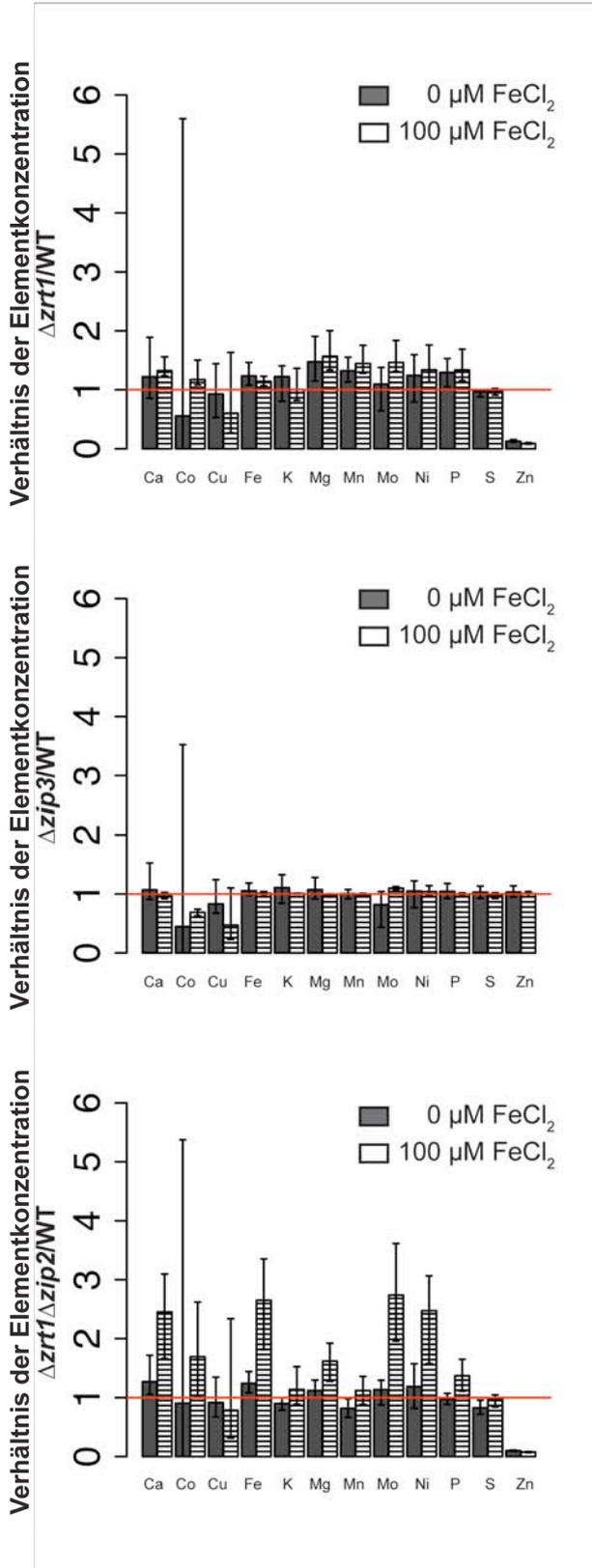
Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Promotionsarbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich erkläre weiterhin, dass andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht wurden. Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

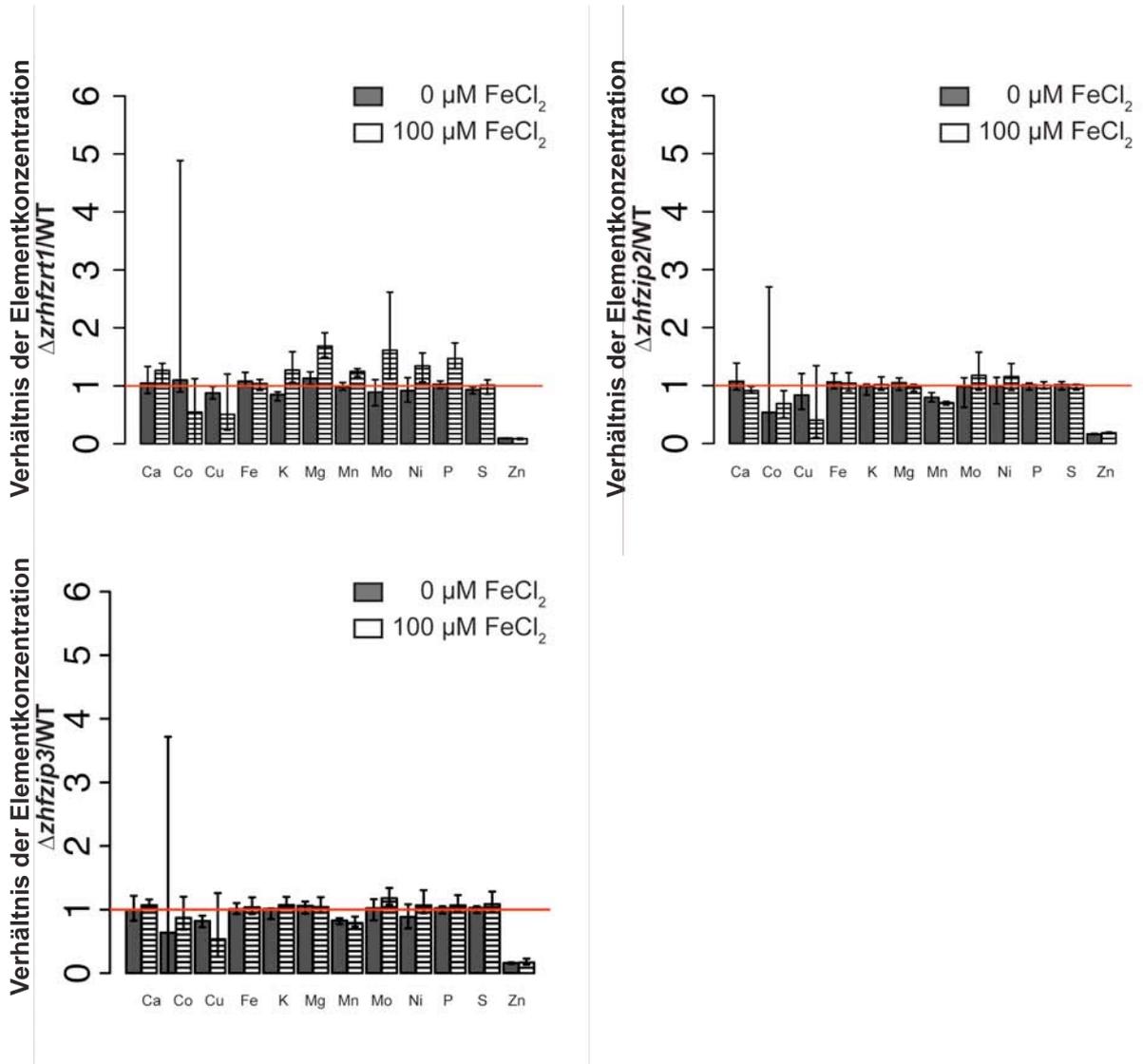
Halle/Saale,

Annegret Boch

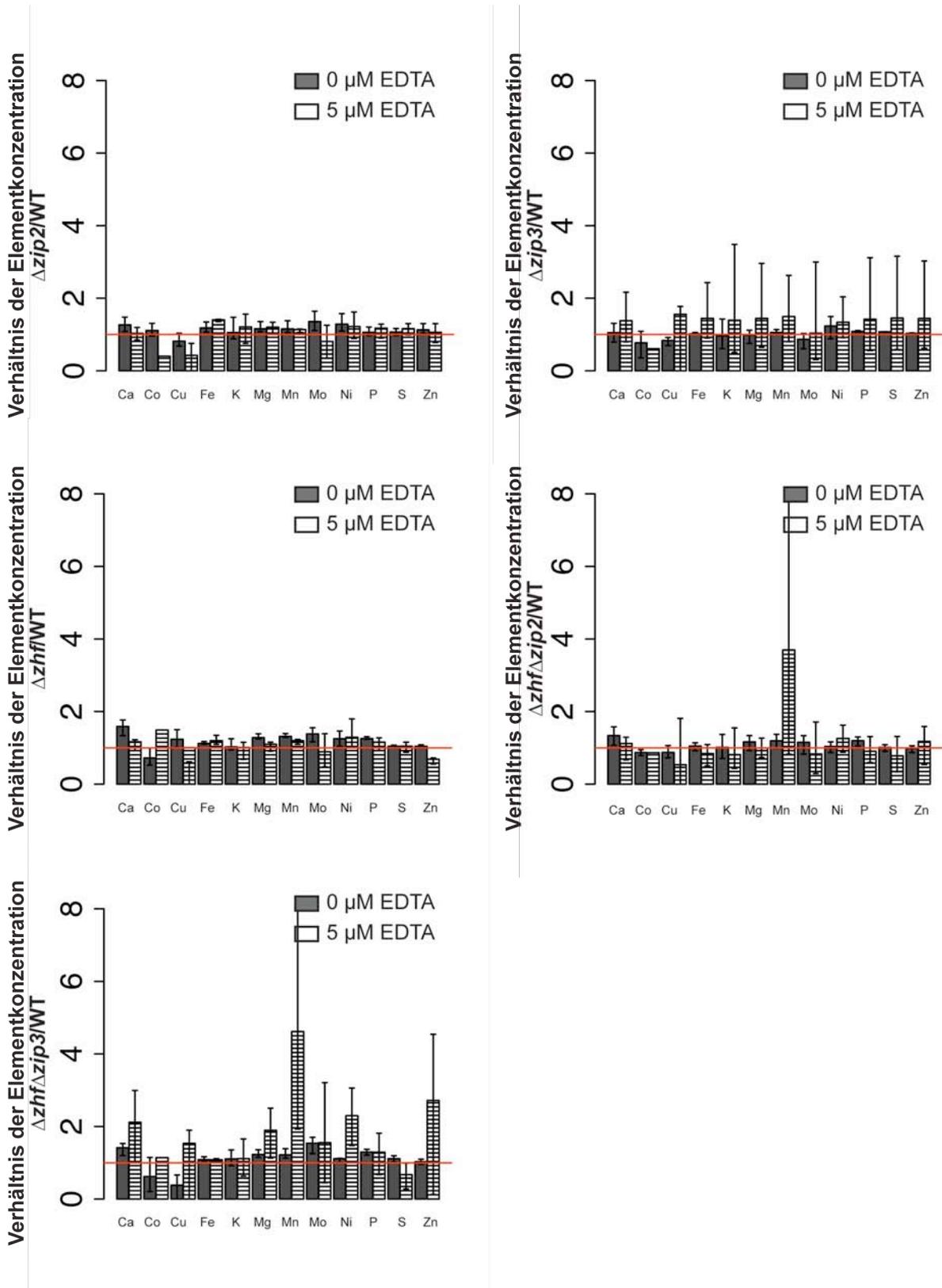


**ICP-OES-Elementanalyse ausgewählter Mutanten der Metallhomöostase.** Elementkonzentration der  $\Delta zrt1\Delta zip2$ ,  $\Delta zrt1\Delta zip3$ ,  $\Delta zhf\Delta zrt1$ ,  $\Delta zhf\Delta zip2$  und  $\Delta zhf\Delta zip3$  Mutanten im Verhältnis zum Wildtyp nach Wachstum in EMM-Zn + 10 μM oder + 30 μM Zn<sup>2+</sup> für 24 h. Die rote Linie entspricht dem Verhältnis 1. Fehlerbalken repräsentieren die niedrigste und die höchste Differenz der Einzelwerte, (n=3).

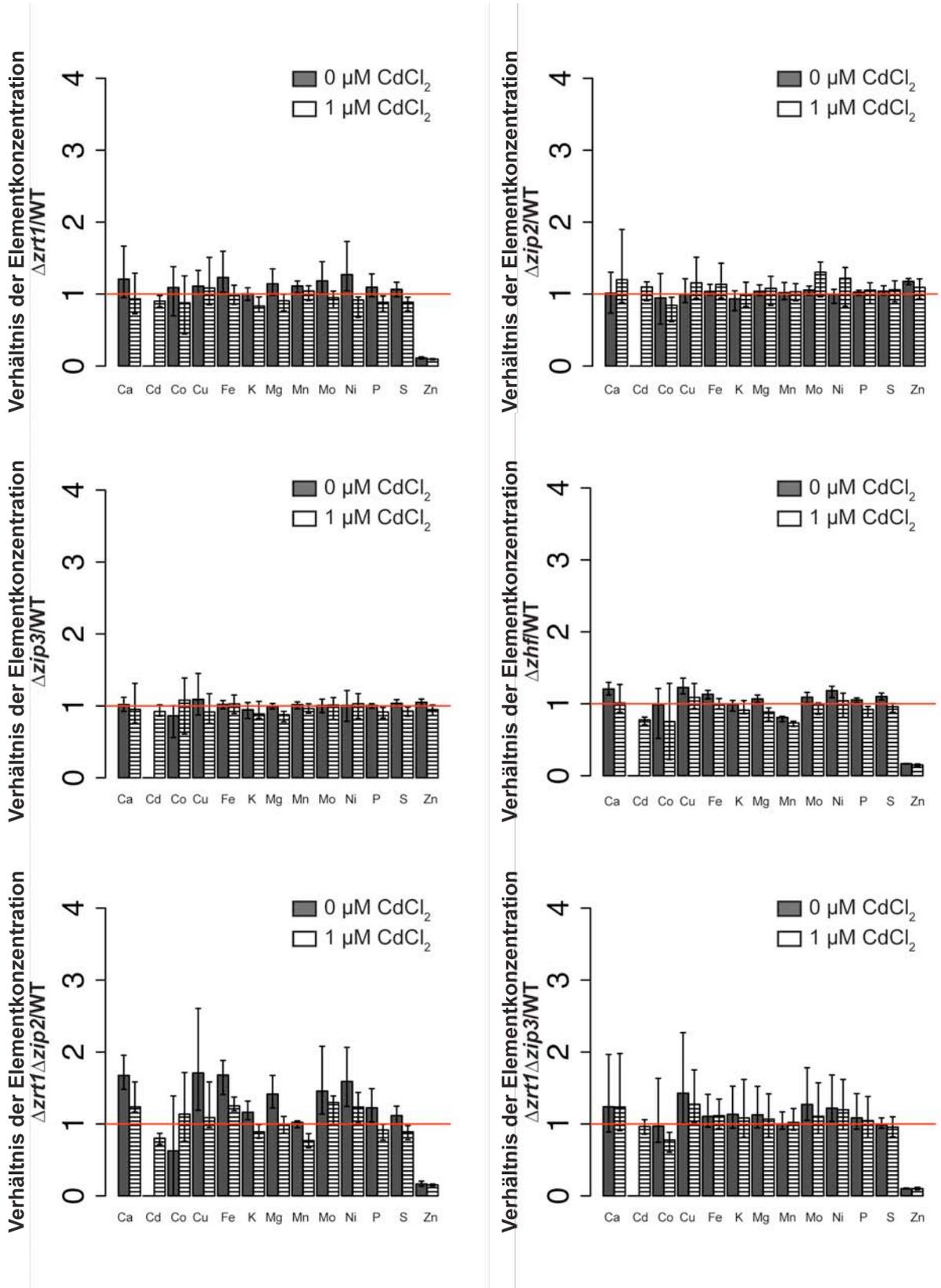


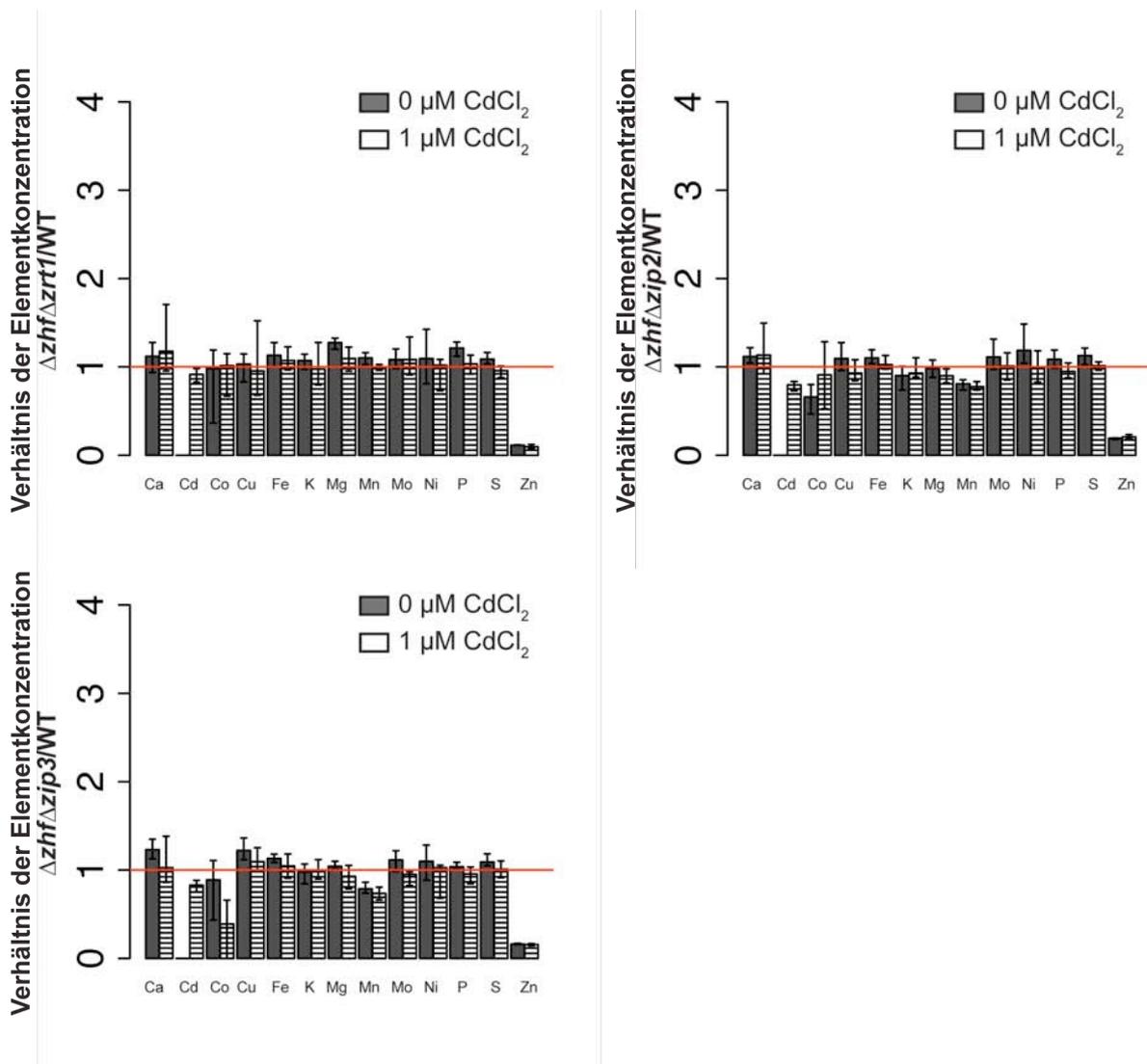


**ICP-OES-Elementanalyse ausgewählter Mutanten der Metallhomöostase.** Elementkonzentration der  $\Delta zrt1$ ,  $\Delta zip2$ ,  $\Delta zip3$ ,  $\Delta zhf$ ,  $\Delta zrt1\Delta zip2$ ,  $\Delta zrt1\Delta zip3$ ,  $\Delta zhf\Delta zrt1$ ,  $\Delta zhf\Delta zip2$  und  $\Delta zhf\Delta zip3$  Mutanten im Verhältnis zum Wildtyp nach Wachstum in EMM + 0 μM oder + 100 μM Fe<sup>2+</sup>, 1mM Ascorbinsäure für 24 h. Die rote Linie entspricht dem Verhältnis 1. Fehlerbalken repräsentieren die niedrigste und die höchste Differenz der Einzelwerte, (n=3).



**ICP-OES-Elementanalyse ausgewählter Mutanten der Metallhomöostase.** Elementkonzentration der  $\Delta zip2$ ,  $\Delta zip3$ ,  $\Delta zhf$ ,  $\Delta zhf\Delta zrt1$ ,  $\Delta zhf\Delta zip2$  und  $\Delta zhf\Delta zip3$  Mutanten im Verhältnis zum Wildtyp nach Wachstum in YE5S + 0  $\mu\text{M}$  oder + 5  $\mu\text{M}$  Na-EDTA für 24 h. Mutanten die eine Mutation im  $zrt1^+$  Gen tragen wurden aufgrund mangelndem Wachstums in YE5S + Na-EDTA nicht mitgeführt. Die rote Linie entspricht dem Verhältnis 1. Fehlerbalken repräsentieren die niedrigste und die höchste Differenz der Einzelwerte, (n=3).





**ICP-OES-Elementanalyse ausgewählter Mutanten der Metallhomöostase.** Elementkonzentration der  $\Delta zrt1$ ,  $\Delta zip2$ ,  $\Delta zip3$ ,  $\Delta zhf$ ,  $\Delta zrt1\Delta zip2$ ,  $\Delta zrt1\Delta zip3$ ,  $\Delta zhf\Delta zrt1$ ,  $\Delta zhf\Delta zip2$  und  $\Delta zhf\Delta zip3$  Mutanten im Verhältnis zum Wildtyp nach Wachstum in EMM + 0  $\mu\text{M}$  oder + 1  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  für 24 h. Die rote Linie entspricht dem Verhältnis 1. Fehlerbalken repräsentieren die niedrigste und die höchste Differenz der Einzelwerte, (n=3).

