

**Biochemische und physiologische Untersuchung der
Phytochelatinsynthesen von *Arabidopsis thaliana***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Dipl.-Biochemiker Pierre Tennstedt,
geboren am 07.06.1976 in Halle (Saale)

Gutachter:

1. Professor Doktor Stephan Clemens
2. Professor Doktor Klaus Humbeck
3. Professor Doktor Andrea Polle

Tag der mündlichen Prüfung 15.02.2007

urn:nbn:de:gbv:3-000011859

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011859>]

Für meine Familie und Stephanie.

Danke für Eure Liebe

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Das Metallhomöostase-Netzwerk	3
1.1.1 Mobilisierung von Metallen und Aufnahme in die Wurzeln	3
1.1.2 Komplexierung von Metallionen in den Wurzelzellen	6
1.1.3 Xylemtransport	9
1.1.4 Xylementladung, Verteilung im Gewebe und Detoxifizierung	10
1.2 Phytochelatine (PC)	12
1.3 Identifizierung der Phytochelatinsynthase-Gene	13
1.4 Funktion der PCS in der Detoxifizierung nicht-essenzieller Metalle	14
1.5 Die zweite PCS in <i>Arabidopsis</i> – <i>AtPCS2</i>	15
1.6 Stoffwechselweg der Phytochelatine	16
1.7 Enzymmechanismus der PCS	18
1.8 Die Verbreitung der PCS-Gene in der Natur	24
1.9 Die evolutionäre Konservierung der PCS-Gene	25
1.10 Zielstellung dieser Arbeit	27
2 Materialien und Methoden	30
2.1 Materialien	30
2.2 Zur wissenschaftlichen Arbeit verwendete Organismen und Plasmide	31
2.2.1 Pflanzen	31
2.2.2 Bakterien, Hefen und Plasmide	32
2.3 Nährlösungen für Bakterien und Hefen	33
2.4 Kultivierung von Bakterien und Hefen	34
2.4.1 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> und <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
2.4.2 Bakterien	35
2.5 Pflanzenanzucht und Pflanzenhaltung	35
2.5.1 Nährmedien	35
2.5.2 Samensterilisation	36
2.5.3 Vernalisation	36
2.5.4 Kultivierung von Pflanzen auf Erde	36
2.5.5 Hydroponische Pflanzenkulturen	37
2.5.6 <i>Arabidopsis</i> -Flüssigkulturen	37
2.5.7 Wachstum von <i>Arabidopsis</i> auf Agarplatten	37
2.6 Molekularbiologische Methoden	38

2.6.1 Oligonukleotide	38
2.6.2 Molekularbiologische Standardmethoden	39
2.6.3 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	39
2.6.4 Transformation von <i>S. pombe</i> -Zellen	40
2.6.5 Isolierung von RNA.....	41
2.6.6 RT-PCR	41
2.6.7 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	42
2.6.8 Quantitative Real-Time-PCR.....	42
2.6.9 Herstellung von mutierten <i>AtPCSI</i> -Versionen.....	43
2.7 Proteinbiochemische Methoden.....	43
2.7.1 Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial	43
2.7.2 Proteinbestimmung.....	43
2.7.3 Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	44
2.7.4 Westernanalysen.....	44
2.7.5 Überexpression und Aufreinigung von Proteinen	45
2.7.5.1 Überexpression in <i>Escherichia coli</i>	45
2.7.5.2 Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins	45
2.8 Enzymaktivitätstests	45
2.9 Thioextraktion.....	46
2.9.1 Thioextraktion aus Pflanzenproben	46
2.9.2 Thioextraktion aus Hefen	46
2.10 Derivatisierung mit mBrB	46
2.10.1 Derivatisierung von Pflanzenproben	46
2.10.2 Derivatisierung von Hefeproben.....	47
2.11 LC/MS-Analyse	47
2.12 HPLC-Analysen.....	48
2.13 AAS-Analysen.....	48
2.14 Statistische Auswertung.....	49
3 Ergebnisse	50
3.1 Die Beteiligung der PCS an der Homöostase essenzieller Metalle	50
3.1.1 Zn ²⁺ -Sensitivität der PC-defizienten <i>cad1-3</i> -Mutante.....	51
3.1.2 Isolierung und Charakterisierung der <i>cad1-6</i> -Mutante.....	53
3.1.3 <i>AtPCSIΔ409</i> , eine mutierte <i>AtPCSI</i> -Version von <i>cad1-6</i>	53
3.1.4 Metallsensitivität von <i>cad1-6</i>	57

3.1.5	Metallsensitivität der <i>cad1</i> -Mutanten auf MS-Medium	57
3.1.6	Quantifizierung der PC-Bildung <i>in vivo</i>	58
3.1.7	Analyse der Metallaufnahme in den <i>cad1</i> -Mutanten.....	63
3.1.8	Weitere Untersuchungen zur Zn ²⁺ -Aufnahme.....	65
3.1.9	Untersuchung der PC-Defizienz auf schwermetallbelastetem Boden.....	66
3.2	Untersuchungen zur Funktion von <i>AtPCS2</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>	69
3.2.1	Isolierung transgener <i>cad1-3</i> -Pflanzen	69
3.2.2	Metallsensitivität der transgenen Pflanzenlinien.....	70
3.2.3	Nachweis der PC-Bildung <i>in vivo</i>	73
3.2.4	Analyse der Metallaufnahme von <i>cad1-3:PCS2</i> -Pflanzen	75
3.2.5	<i>In-vitro</i> -Aktivierung von <i>AtPCS2</i>	77
3.3	Untersuchung zur Cu ²⁺ -Aktivierung der PCS	80
3.3.1	Generierung von <i>AtPCSI</i> -Mutationen.....	84
3.3.2	Physiologische Untersuchung der <i>AtPCSI</i> -Mutationen in $\Delta cup1$	85
3.3.2.1	Untersuchung des Zellwachstums bei erhöhten Cd ²⁺ - und Cu ²⁺ - Konzentrationen	85
3.3.2.2	PC-Bildung nach Cd ²⁺ - und Cu ²⁺ -Behandlung	88
4	Diskussion	91
4.1	Evolutionäre Konservierung der PCS.....	91
4.2	Die Metallaktivierung der PCS.....	96
4.3	Ein modifiziertes Modell der Metallaktivierung	100
4.4	<i>AtPCS2</i> – eine zweite funktionale PCS in <i>Arabidopsis</i>	103
5	Zusammenfassung.....	107
5.1	Beteiligung der PCS an der Homöostase essenzieller Metalle	107
5.2	Die Metallaktivierung der PCS.....	108
5.3	<i>AtPCS2</i> – die zweite funktionale PCS in <i>Arabidopsis</i>	109
6	Literaturverzeichnis.....	111

Abkürzungsverzeichnis

AAS	– Atomabsorptionsspektroskopie
ABC-Transporter	– „ATP-binding Cassette Transporter“
Abb.	– Abbildung
Accession No.	– Gendatenbank NCBI „Accession Number“
ANOVA	– „Analysis Of Variance“
At	– <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. thaliana</i>	– <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. halleri</i>	– <i>Arabidopsis halleri</i>
ATX1	– „Anti oxidant 1“
Bp	– Basenpaar
BSO	– Buthioninsulfoxid
CapLC-ESI-QTOF-MS	– „capillary liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry“
CCH1	– „Copper Chaperone 1“
<i>C. elegans</i>	– <i>Caenorhabditis elegans</i>
COT1	– „Cobalt Tolerance“
C-Terminus, C-terminal	– Carboxyterminus, carboxylendständiger Aminosäure-Rest
CUP1	– „Copper Binding Protein 1“
Da	– Dalton
CDF	– „Cation Diffusion Facilitator“
Col-0	– Columbia-0 (Wildtyp: <i>A. thaliana</i>)
DNA	– Desoxyribonukleinsäure
DTPA	– Diethylentriaminpentansäure
DTT	– Dithiothreitol
γ -EC	– γ -Glutamylcystein
<i>E. coli</i>	– <i>Escherichia coli</i>
EDTA	– Ethylendiamintetraacetat
EPPS	– 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-propanesulfonsäure
ESI(+)-CID-MS	– „Electrospray Ionisation-Collision Induced Dissociation-Massspectrometry“
EST	– „expressed sequence tag“
<i>et al.</i>	– <i>et alii</i> (und andere)
EXAFS	– „Extended X-ray Absorption Fine Structure“
GS	– Glutathion-Synthetase
GCS	– γ -Glutamylcystein-Synthetase
GSH	– Glutathion (reduziert), γ -Glu-Cys-Gly
GST	– Glutathion-S-Transferase
HA	– Hämagglutinin
HBED	– N,N'-di-(2-hydroxybenzoyl)-ethylendiamin-N,N'-diacetat
HMA	– „Heavy Metal ATPase“
HMW	– „High Molecular Weight“
IC ₅₀	– halbmaximale Inhibitorkonzentration
IRT	– „Iron Regulated Transporter“ (Eisen regulierter Transporter)
Kb	– „kilo base“ (kilo Base)
LB	– Luria-Bertani-Medium
LMW	– „Low Molecular Weight“

mBrB	– „Monobromobimane“
MRP	– „Multi-drug Resistance-associated Protein“
MS	– Massenspektrometrie
MSA	– Methansulfonsäure
MS-Medium	– „Murrashig-Skoog Medium“
MT	– Metallothionein(e)
AtMTP1	– „Metal-Tolerance Protein“
NA	– Nicotianamin
NAS	– Nicotianamin-Synthase
NRAMP	– „natural resistance associated macrophage proteins“
OD	– optische Dichte
PCR	– Polymerase-Ketten-Reaktion
PC	– Phytochelatine
PC2-NH ₂	– H- γ Glu-Cys- γ Glu-Cys-Gly-NH ₂
PC2-OH	– H- γ Glu-Cys- γ Glu-Cys-Gly-OH
PCS	– Phytochelatinsynthase
RAN1	– „Responsive-to-Antagonist 1“
RNA	– Ribonukleinsäure
ROS	– „Reactive Oxygen Species“ (reaktive Sauerstoffspezies)
RP-HPLC	– „Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography“
rpm	– Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	– „Reverse Rranscriptase Polymerase Chain Reaction“
RubisCO	– Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/Oxygenase
<i>S. cerevisiae</i>	– <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	– <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SDS	– „Sodiumdodecylsulfate“ (Natriumdodecylsulfat)
Tab.	– Tabelle
TCEP	– Tris-(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride
<i>T. caerulescens</i>	– <i>Thlaspi caerulescens</i>
T-DNA	– Transfer-DNA
TEMED	– N,N,N',N'-Tetramethylenthylendiamin
TG	– Trockengewicht
Tris	– 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1, 3-propandiol
WT	– Wildtyp
YCF1	– „Yeast Cadmium Factor 1“
Zhf	– „Zinc Homeostasis Factor“
ZIP	– „ZRT-, IRT-like Proteins“
ZRC1	– „Zinc Resistance Conferring“
ZRT	– „Zinc Related Transporter“ (Zink regulierter Transporter)

1 Einleitung

In den biochemischen Prozessen haben viele chemische Elemente wichtige biologische Funktionen. Sie werden aufgrund der Menge, in denen sie in den Organismen benötigt werden, in Makro- und Mikroelemente unterteilt. Makroelemente (z. B. K, Ca, Mg, Fe) sind Bestandteil von organischen Komponenten, wie z. B. Proteinen und Nukleinsäuren, während die Mikroelemente (z. B. B, Mn, Zn, Cu, Mo) in sehr geringen Konzentrationen in vielen Enzymen vorkommen. Diese Elemente sind für Algen und Pflanzen wie auch für alle anderen Organismen essenziell. Die Einteilung in Makro- und Mikroelemente ist jedoch nicht immer sehr treffend gewählt. Die Ansprüche der niederen Pflanzen weichen in manchen Fällen von denen der höheren stark ab. Für viele Algen ist Ca eher ein Mikro- als ein Makroelement, und für manche Pilze ist es sogar entbehrlich (Nultsch, 1996). Unter den Mikro- und Makroelementen befinden sich auch verschiedene Übergangsmetalle, dadurch gekennzeichnet, dass ihre äußeren d-Elektronenbänder nicht voll besetzt sind. Zu ihnen gehören die Elemente Vanadium bis Nickel in der 1. Reihe des Periodensystems und Molybdän in der 2. Reihe. Ähnliche Eigenschaften besitzen die Elemente Kupfer und Zink, die aufgrund des vollbesetzten d-Elektronenbandes nicht zu den Übergangsmetallen gehören. Kupfer und Zink zählen wie auch die Übergangsmetalle zu den Nebengruppenmetallen. Da die Dichte dieser Elemente mehr als 5 g/cm^3 ist, gehören sie auch zu den Schwermetallen. Diese eben genannten Elemente sind aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften, z. B. als redoxaktive Elemente unter physiologischen Bedingungen (Cu, Fe) oder als starke Lewis Säuren (Zn) in vielen biologischen Prozessen vorzufinden (Frausto da Silva und Williams, 2001). So sind ein Drittel aller strukturell aufgeklärten Proteine Metalloproteine (Finney und O'Halloran, 2003). Dies verdeutlicht die Wichtigkeit dieser Elemente. Als Beispiele werden die spezifischen Eigenschaften von Zink und Kupfer näher betrachtet.

Zink ist eines der wichtigsten Metalle und nach Eisen mengenmäßig das zweithäufigste Mikroelement in Organismen. Das Zn-Ion besitzt einen kleinen Radius und daher eine konzentrierte Ladung. Als starke Lewis-Säure hat es eine hohe Affinität zu schwefel-, stickstoff- und sauerstoffhaltigen Liganden (Frausto da Silva und Williams, 2001). Aufgrund des vollbesetzten d-Orbitales ist Zn^{2+} in der Lage, sehr flexibel mit Liganden zu interagieren (Berg und Shi, 1996). Da Zink nur als zweiwertiges Ion (Zn^{2+}) in biologischen Systemen vorkommt, nimmt es nicht an Redox-Reaktionen teil. Es besteht kaum eine Gefahr, dass freie Radikale durch Zn gebildet werden. Aufgrund dieser

Eigenschaften ist das Zn-Ion sowohl als Strukturelement in Proteinen, z. B. Zink-Finger-Proteine, als auch als katalytisches Element in Enzymen, z. B. vielen hydrolytischen Enzymen zu finden (Frausto da Silva und Williams, 2001). Von besonderer Bedeutung ist die Bereitstellung reaktiver Hydroxidionen unter physiologisch relevanten pH-Bedingungen, z. B. bei der Kohlensäure-Anhydrase. Die normalerweise langsam erfolgende Dissoziation des Wassers wird durch das Zn^{2+} beträchtlich beschleunigt (Schellenberger, 1989).

Cu gehört im Gegensatz zu Zn zu den redoxaktiven Übergangsmetallen. Aufgrund der zwei Oxidationsstufen Cu (I) und Cu (II) ist es hervorragend für Elektronentransferreaktionen geeignet, z. B. in Proteinen wie der Superoxiddismutase und dem Plastocyanin. Im Vergleich zu Zn^{2+} besitzt Cu^{2+} eine höhere Affinität zu organischen Liganden und zeigen deshalb eine starke Interaktion mit kleinen Molekülen wie Sauerstoff und Kohlendioxid. Aus diesem Grund ist Cu in vielen Enzymen (z. B. Oxidasen) zu finden, die molekularen Sauerstoff als Substrat verwenden (Frausto da Silva und Williams, 2001).

Die Eigenschaften von Zink und Kupfer und der Übergangsmetalle sind bei erhöhter Konzentration auch für ihre Toxizität verantwortlich. Die Toxizität beruht vor allem auf der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und freien Radikalen. Durch redoxaktive Metallionen (z. B. Cu) können hochreaktive Hydroxyl-Radikale (OH^\cdot) über die Fenton- oder Haber-Weiss-Reaktion gebildet werden (Halliwell und Gutteridge, 1984, 1990). Weiterhin kann eine hochaffine unkontrollierte Bindung zu schwefel-, stickstoff- und sauerstoffhaltigen funktionalen Gruppen zu einer biologischen Inaktivität von Proteinen führen. Die Metallionen binden an organische Liganden (z. B. Apo-Metalloproteine) mit unterschiedlicher Affinität (Frausto da Silva und Williams, 2001). Entsprechend der Irving-Williams-Reihe ($\text{Zn}^{2+} < \text{Cu}^+ > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$) besitzt Cu^+ die höchste Affinität und Mn^{2+} die niedrigste. So ist beispielsweise Cu^+ in der Lage, in Nicht-Cu-Bindestellen von Proteinen zu binden. Dementsprechend kann jedes Metallion dieser Serie den Platz eines anderen Metallions mit niedrigerer Affinität einnehmen. So führt eine erhöhte Zn^{2+} -Konzentration in der Pflanze durch Verdrängung des Mn^{2+} im wasserspaltenden Komplex des Fotosystems II zur Beeinträchtigung der Fotosynthese. Das Zn^{2+} ist nicht in der Lage, die Spaltung des Wassers zu katalysieren, wodurch der Elektronentransport inhibiert wird. Weiterhin kann durch eine partielle Verdrängung des Mg^{2+} im aktiven

Zentrum der RubisCO (Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/Oxygenase) die Dunkelreaktion inhibiert werden (Van Assche und Clijsters, 1986).

Neben den essenziellen Metallen nehmen Pflanzen auch Metalle, wie Cadmium, Quecksilber, Blei oder das Metalloid Arsen auf. Sie sind nicht-essenziell und wirken schon in geringen Konzentrationen toxisch. Als ein Beispiel soll hier Cd^{2+} erwähnt werden. Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit von Cd^{2+} zu Zn^{2+} sind mögliche Ziele einer Cd^{2+} -Toxizität vor allem Zn^{2+} -abhängige Prozesse und Zn^{2+} -bindende Moleküle. Das Cd^{2+} kann neben Zn^{2+} auch Fe^{2+} , Cu^{2+} und Ca^{2+} aus Proteinen verdrängen (Stohs und Bagchi, 1995). Die ähnlichen Eigenschaften nicht-essenzieller Metalle zu den essenziellen Metallen machen sie daher extrem toxisch für die Zelle (Frausto da Silva und Williams, 2001). Um die Verfügbarkeit von essenziellen Metallen in der Zelle und die schädlichen Eigenschaften von nicht-essenziellen Metallen zu kontrollieren, haben Pflanzen ein komplexes Netzwerk von homöostatischen Mechanismen entwickelt (Clemens, 2001).

1.1 Das Metallhomöostase-Netzwerk

Das Metallhomöostase-Netzwerk reguliert die Aufnahme von essenziellen Metallionen in Pflanzen durch die folgenden Prozesse: Mobilisierung von Metallen aus dem Boden, Aufnahme in die Wurzeln und Sequestrierung, Xylemtransport, Xylementladung und Verteilung im Gewebe, Speicherung und Detoxifizierung. Da die Kontrolle und Akkumulation essenzieller Metalle nicht immer perfekt verläuft und spezifische Aufnahme- und Verteilungssysteme für nicht-essenzielle Metalle fehlen, nehmen Organismen auch unerwünschte Elemente auf (Clemens *et al.*, 2002b). Wie die Aufnahme essenzieller Metalle reguliert wird und wie auch unerwünschte Metalle aufgenommen werden, wird in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

1.1.1 Mobilisierung von Metallen und Aufnahme in die Wurzeln

Einige Metalle sind aufgrund ihrer geringen Löslichkeit nur limitiert bioverfügbar. Das bekannteste Beispiel hierfür ist Fe, welches als Fe(III) vorliegt und unlösliche Hydroxide bildet. Die Mobilisierung von Fe(III) erfolgt entweder durch Reduktion zu Fe(II) oder durch die Komplexbildung von Fe(III) durch Phytosiderophore (Marschner, 1995). Über eine aktive Mobilisierung von anderen Metallen ist jedoch nur wenig bekannt. Dennoch gehören die Ansäuerung des Bodens und die Ausscheidung von

Chelatoren zu den möglichen Mechanismen. Einen großen Einfluss auf die Verfügbarkeit von Metallionen für die Pflanze haben auch im Boden lebende wurzelkolonisierende Bakterien und Mykorrhizapilze. Für z. B. *Thlaspi caerulescens* (Gebirgs-Hellerkraut) wurde gezeigt, dass wurzelkolonisierende Bakterien die Verfügbarkeit von wasserlöslichen Zn im Boden erhöhen und damit auch die Zn-Akkumulation von *T. caerulescens* (Whiting *et al.*, 2001).

Nach der Mobilisierung der Metalle erfolgt die Aufnahme in die Wurzelzellen. Die Metalle werden zunächst an der Zellwand gebunden. Anschließend erfolgt die Aufnahme über die Plasmamembran durch selektive Transportsysteme. Dieser Prozess wird durch intrazelluläre hochaffine Bindestellen unterstützt (Clemens *et al.*, 2002b). Da das Membranpotential auf der Innenseite der Plasmamembran stark negativ ist (Guerinot, 2000), wird die Aufnahme von Kationen durch sekundäre Transporter (Ionenkanäle, Carrier) erleichtert. Die meisten Aufnahmetransporter gehören der ZIP-Familie („ZRT-, IRT-like Proteins“) und der NRAMP-Familie („Natural Resistance-Associated Macrophage Protein“) an (Guerinot, 2000; Williams *et al.*, 2000).

Die Transporter der ZIP-Familie vermitteln die Aufnahme von Fe^{2+} und Zn^{2+} . Einer der bekanntesten ZIP-Transporter ist IRT1 („Iron Regulated Transporter 1“), welcher für die Fe^{2+} -Aufnahme wichtig ist. In der Hefemutante *fet3 fet4* von *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) (Dix *et al.*, 1994), die eine reduzierte Fe^{2+} -Aufnahme zeigt, wurde diese Transportaktivität von IRT1 nachgewiesen. *fet3* kodiert für eine Multi-Kupfer-Oxidase mit hoher Affinität für Fe(II) (Askwith *et al.*, 1994; Dancis *et al.*, 1994) und *fet4* für einen niedrigaffinen Fe(II)-Transporter (Dix *et al.*, 1994). Durch die heterologe Expression von IRT1 in dieser Mutante wurde eine vollständige Komplementation beobachtet (Eide *et al.*, 1996). Neben dem Transport von Fe^{2+} erfolgt aber auch eine Aufnahme von Mn^{2+} , Zn^{2+} und Co^{2+} durch diesen Transporter (Korshunova *et al.*, 1999). Damit besitzt IRT1 einen breiten Substratbereich. Dieser unspezifische Transport von anderen Metallionen ist vermutlich auch für die Aufnahme von Cd^{2+} verantwortlich. Wurde IRT1 in Hefen exprimiert, so konnte eine erhöhte Cd^{2+} -Sensitivität beobachtet werden (Rogers *et al.*, 2000). In *Arabidopsis* führte die Überexpression von IRT1 bei Eisenmangelbedingungen zu einer erhöhten Zn^{2+} - und Cd^{2+} -Aufnahme in die Wurzeln. Die Cd^{2+} -Aufnahme kann möglicherweise unspezifisch über IRT1 erfolgen (Connolly *et al.*, 2002). Die Annahme einer solchen Funktion von IRT1 wird von Beobachtungen gestützt, die in verschiedenen Pflanzenspezies eine erhöhte Cd^{2+} -Aufnahme unter Eisenmangel festgestellt haben. Eisenmangel führte unter

diesen Bedingungen zur Hochregulierung des Fe^{2+} -Aufnahmesystems, was auch die Aufnahme von Cd^{2+} in die Wurzelzellen erlaubt (Cohen *et al.*, 1998). Der Verlust von IRT1 in *Arabidopsis* führt zu Chlorosen und einem stark eingeschränkten Wachstum (Vert *et al.*, 2002), welche typische Symptome für Fe^{2+} -Mangel sind. In Pflanzen ist IRT1 somit für die Fe^{2+} -Homöostase wichtig.

Homologe Transporter von IRT1, ZRT1 und ZRT2 („Zinc Related Transporter“), konnten in *S. cerevisiae* identifiziert werden und repräsentieren hochaffine bzw. niedrigaffine Zn^{2+} -Transporter (Zhao und Eide, 1996a, 1996b). Durch die *zhy3-* (*zrt1 zrt2*) Hefemutante wurden die *Arabidopsis*-ZIP-Transporter 1-3 identifiziert, welche Zn^{2+} -Transport-Aktivität zeigten (Grotz *et al.*, 1998; Guerinot und Eide, 1999). Die Gene *Zip1* und *Zip3* werden hauptsächlich in der Wurzel exprimiert und unter Zn^{2+} -Mangel-Bedingungen induziert. Damit haben sie möglicherweise eine Funktion in der Zn^{2+} -Aufnahme. Diese mögliche Funktion der ZIP-Transporter in der Zn^{2+} -Aufnahme wurde durch die Identifikation von homologen Transportern der *Thlaspi*-Spezies bestätigt. So konnte in der *zhy3-* (*zrt1 zrt2*) Hefemutante durch einen homologen Zn^{2+} -Transporter aus *T. caerulescens* eine Komplementation des Phänotyps gezeigt werden (Pence *et al.*, 2000). Neben der möglichen Funktion in der Zn^{2+} -Homöostase könnten ZIP-Transporter auch eine Funktion in der Cu^{2+} -Homöostase besitzen. Eine Expression von *ZIP2* oder *ZIP4* in der $\Delta\text{ctr1-}$ (high affinity copper transporter 1) Hefemutante (Dancis *et al.*, 1994), in der die hochaffine Cu-Aufnahme gestört ist, führte zur Wiederherstellung des Wachstums dieser Mutante in einem nicht-gärbarem Medium. Im Vergleich zu Δctr1 -Hefezellen, die leeren Vektor exprimierten, war der Cu-Gehalt höher in Hefen, die entweder *ZIP2* oder *ZIP4* exprimierten (Wintz *et al.*, 2003). Wie für IRT1 bereits erwähnt, wird für *ZIP1*, *ZIP2* und *ZIP3* vorgeschlagen, dass sie an der unspezifischen Cd^{2+} -Aufnahme beteiligt sind. So wird die Zn^{2+} -Aufnahme durch die heterologe Expression in *S. cerevisiae* von Cd^{2+} partiell geblockt (Grotz *et al.*, 1998). Für den *ZNT1*-Transporter aus *T. caerulescens* konnte neben einer hochaffinen Zn^{2+} -Aufnahme auch eine niedrigaffine Cd^{2+} -Aufnahme in der *S. cerevisiae*-Mutante *zhy3* (*zrt1 zrt2*) nachgewiesen werden (Pence *et al.*, 2000).

Weitere Aufnahmetransporter gehören, wie bereits erwähnt, der NRAMP-Familie an. Das AtNRAMP1-Protein war ebenfalls in der Lage, die *zhy3-* (*zrt1 zrt2*) Hefemutante zu komplementieren. Eine starke Induktion im Transkriptlevel konnte unter Fe^{2+} -Mangel gezeigt werden. Damit hat AtNRAMP1 möglicherweise eine Funktion in der Fe^{2+} -Homöostase (Curie *et al.*, 2000). Weitere Transporter dieser Familie sind

AtNRAMP3 und AtNRAMP4, für die ebenfalls eine Fe²⁺-Transport-Aktivität bestätigt werden konnte (Thomine *et al.*, 2000). Auch über die NRAMP-Transporter ist eine unspezifische Cd²⁺-Aufnahme möglich. Für AtNRAMP1, 3 und 4 konnte eine Cd²⁺-Transport-Aktivität in einer heterologen Expression in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden. Weiterhin führte die Überexpression von AtNRAMP3 in *Arabidopsis* zur Cd²⁺-Hypersensitivität (Thomine *et al.*, 2000). Für AtNRAMP3 wurde später gezeigt, dass dieses Protein in der Vakuolenmembran lokalisiert ist (Thomine *et al.*, 2003). Es ist daher wahrscheinlicher dass AtNRAMP3 eine Funktion bei der Mobilisierung von Mikroelementen (z .B. Fe, Mn und Zn) aus der Vakuole besitzt. Ebenso wie AtNRAMP3 ist AtNRAMP4 in der Vakuolenmembran lokalisiert. In Doppel-Knock-out-Mutanten von *nramp3* und *nramp4* wird das Keimlingswachstum bei geringer Fe-Konzentration gestoppt und vollständig durch Fe-Zugabe wiederhergestellt. Die Vakuole dient als ein essenzielles Kompartiment für die Fe-Speicherung in Samen. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Mobilisierung von Fe aus der Vakuole entscheidend für die Entwicklung von *Arabidopsis*-Keimlingen ist und *nramp3* und *nramp4* entscheidend daran beteiligt sind (Lanquar *et al.*, 2005). Weiterhin ist ein Transport von Cd²⁺ aus der Vakuole über diese Transporter möglich. Dies könnte die Cd²⁺-Hypersensitivität von *Arabidopsis*-Pflanzen erklären, die *nramp3* überexprimieren (Thomine *et al.*, 2000; Clemens, 2006b).

Sind die Metalle in die Wurzelzelle aufgenommen werden sie sofort komplexiert.

1.1.2 Komplexierung von Metallionen in den Wurzelzellen

Die sofortige Komplexierung erfolgt durch Chelatoren und Chaperone (Clemens, 2001). Wie bereits erwähnt, ist dies aufgrund ihrer Reaktivität und ihrer limitierten Löslichkeit notwendig. Die Chelatoren sind für die Pufferung cytosolischer Metallionen verantwortlich. Zu ihnen gehören die Phytochelatine (PC), Metallothioneine (MT) und organische Säuren und Aminosäuren. Die Funktion der PC wird in einem späteren Kapitel (1.2) beschrieben. Die MT sind kleine cysteinreiche Proteine, welche Metallionen über die SH-Gruppen komplexieren (Hamer, 1986). Für die Klasse I MT von Säuger-Zellen konnte eine erhöhte Resistenz gegenüber Cd²⁺ gezeigt werden. Hauptsächlich binden sie Zn²⁺. Daher sind sie möglicherweise an der cytosolischen Zinkpufferung beteiligt. Die MT der Hefen, welche zur Klasse II gehören, binden hauptsächlich Cu. Sie bilden damit einen möglichen cytosolischen Cu-Speicher. Die MT sind weiterhin an der Cu-Detoxifizierung beteiligt. Eine solche Funktion wurde für

das MT Cup1 („**Cu-binding Protein 1**“) aus *S. cerevisiae* nachgewiesen (Hamer *et al.*, 1985). Cup1 ist auch in der Lage Cd^{2+} zu binden (Yu *et al.*, 1994). Das erste pflanzliche MT-Gen wurde aus Weizen identifiziert und war in der Lage, Zn^{2+} zu binden (Lane *et al.*, 1987). Die möglichen Funktionen der MT in der Metallhomöostase der Pflanzen beinhalten die Detoxifizierung von Metallen (hauptsächlich Cu), die cytosolische Zn-Pufferung, das Einfangen von Metallionen während der Blattseneszenz und die Beteiligung an der Sekretion von Metallen über die Trichome der Blätter (Robinson *et al.*, 1996; Garcia-Hernandez *et al.*, 1998; Rauser, 1999).

Aufgrund der Reaktivität von Metallionen zu Stickstoff-, Sauerstoff- und Schwefelatomen sind organische Säuren und Aminosäuren ebenfalls potentielle Chelatoren (Clemens, 2001). So könnten die organischen Säuren Zitrat, Malat und Oxalat eine Funktion in der Metalltoleranz, im Metalltransport durch das Xylem und die Sequestrierung in die Vakuole haben (Rauser, 1999). Eine Funktion von organischen Säuren in der Metalltoleranz der Pflanzen ist in der Aluminium-Toleranz bekannt (Ma *et al.*, 2001). In Weizen konnte infolge eines Al-Stresses die Ausscheidung von Oxalat in die Rhizosphäre und die Akkumulation von nicht-toxischem Al-Oxalat in den Blättern gezeigt werden (Ma, 1998). Eine mögliche Funktion in der Metalltoleranz besitzen auch Zitrat und Malat. Für Zitrat wurde vorgeschlagen, dass es einen Beitrag zur Zn^{2+} -Akkumulation und -Toleranz leisten kann (Godbold *et al.*, 1984). Es wurde später nachgewiesen, dass Zitrat mit Ni^{2+} Komplexe bildet (Sagner *et al.*, 1998). Für Malat wurde eine mögliche Funktion als cytosolischer Zn^{2+} -Speicher vorgeschlagen (Mathys, 1977; Sarret *et al.*, 2002).

Ein Zusammenhang zwischen der Erhöhung der Aminosäurekonzentration und einem Metallstress konnte in der Histidin-Antwort gezeigt werden (Krämer *et al.*, 1996). In der Ni-hyperakkumulierenden Spezies *Alyssum lesbiacum* (Gattung Steinkraut) führte Ni^{2+} -Stress zu einem starken und proportionalen Anstieg in der Histidinkonzentration. Die Komplexierung von Ni^{2+} im Xylem konnte weiterhin *in vivo* bestätigt werden. Die Histidin-Antwort ist jedoch nicht der generelle Ni^{2+} -Toleranz Mechanismus in Pflanzen. In einem anderen Ni^{2+} -Hyperakkumulierer der Spezies *Thlaspi goesingense* (Hellerkraut) wurde keine Histidin-Antwort gefunden (Persans *et al.*, 1999).

Die nicht-proteinogene Aminosäure Nicotianamin (NA) ist ein Vorläufer des Phytosiderophores Mugeninsäure und wird in allen höheren Pflanzen gebildet (Stephan und Scholz, 1993). NA ist ein Chelator für Fe^{2+} und andere Metallionen, z. B. Fe^{3+} , Ni^{2+} und Zn^{2+} (von Wiren *et al.*, 1999). In der NA-defizienten Tomatenmutante *Chloronerva*

wurden an den jungen Blättern Chlorosen zwischen den Blattadern festgestellt. Diese Chlorosen sind charakteristische Symptome für Eisenmangel. Somit konnte eine wichtige Funktion von NA in der Eisenhomöostase gezeigt werden (Pich und Scholz, 1991; Stephan und Scholz, 1993).

Abgesehen von den Chelatoren, erfolgt auch durch Chaperone eine Komplexierung von Metallionen in der Zelle. Die Chaperone übernehmen die Funktion eines spezifischen Transportes der Metallionen zu den Organellen und Apo-Metalloproteinen (Clemens, 2001). Die Metallionen liegen vermutlich in jeder pflanzlichen Zelle in komplexierter Form vor, um eine freie Diffusion und toxische Reaktionen zu verhindern. Diese Vermutung kann man aus der Erkenntnis schließen, dass in Hefezellen die Konzentration von freien Cu-Ionen weniger als 10^{-18} M beträgt. Das bedeutet, dass weniger als ein freies Cu-Ion pro Zelle vorkommt (Rae *et al.*, 1999). Cu-Chaperone konnten in *S. cerevisiae*, Menschen und in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden. Das ATX1 (**Anti Oxidant 1**) aus *S. cerevisiae* ist über die Interaktion mit CCC2, einer Cu-transportierenden P-type ATPase, im Cu-Transport zu den Post-Golgiesikeln beteiligt (Fu *et al.*, 1995; Pufahl *et al.*, 1997). Homologe von ATX1, die ebenfalls MXCXXC-Kupferbindemotive enthalten, wurden in Menschen (HAH1) (Klomp *et al.*, 1997) und in *Arabidopsis* (CCH) (Himmelblau *et al.*, 1998) gefunden. Für HAH1 konnte eine direkte Interaktion mit eng verwandten P-type ATPasen, die Wilson- und Menkes-Proteine gezeigt werden (Hamza *et al.*, 1999). Die Wilson- und Menkes-Krankheiten sind eine genetisch bedingte Cu-Transport-Störung, welche zur erhöhten Akkumulation von Cu in der Leber und im Gehirn führen. Ein zu den Wilson- und Menkes-Genen ähnliches Gen wurde in *Arabidopsis* entdeckt. Das RAN1 („**R**esponsive-to-**A**ntagonist“) besitzt eine Funktion im Ethylen-Signalweg (Hirayama *et al.*, 1999) und kodiert für eine Cu-transportierende P-type ATPase. RAN1 befindet sich möglicherweise in Post-Golgiesikeln und ist in den Transport von Cu zu den sekretorischen Proteinen involviert. Eine wichtige Funktion von RAN1 ist die Bereitstellung von Cu für die ETR1-Familie der Ethylenrezeptoren. Für die Proteine der ETR1-Familie ist bekannt, dass sie Cu für die Ethylenbindung benötigen (Rodriguez *et al.*, 1999). Die Identifizierung von RAN1 und CCH1 („**C**opper **C**haperone **1**“) lässt vermuten, dass in Pflanzen ein ähnliches Cu-Verteilungs-Netzwerk wie in Hefen und menschlichen Zellen existiert (Himmelblau und Amasino, 2000; Woeste und Kieber, 2000). RAN1 und CCH1 sind möglicherweise auch an anderen Prozessen als an der Cu-Verteilung beteiligt. Während der Blattseneszenz werden beide Gene hochreguliert und könnten eine

Funktion im Einfangen von Cu-Ionen haben, was bei der Mobilisierung von Cu wichtig ist (Himmelblau und Amasino, 2000)

Für einen weiteren Transport der Metallionen in die oberirdischen Bereiche der Pflanze erfolgt der Transport durch den Spross in die Blätter.

1.1.3 Xylemtransport

Die Metallionen werden dazu in das Xylemgewebe geladen. Der Casparische Streifen verhindert jedoch den apoplastischen Transport von Ionen. Alle aufgenommenen Stoffe müssen somit diese Zellen passieren, um in die Xylemleitbahnen zu gelangen (Nultsch, 1996). Die Metallaufnahme wird dabei durch die folgenden Prozesse bestimmt: durch die Sequestrierung der Metallionen in den Wurzelzellen, den symplastischen Transport in die Stele und die Abgabe in das Xylem (Clemens *et al.*, 2002b). Der Transport von Metallionen in das Xylem wird durch Membran-Transportproteine kontrolliert (Gaymard *et al.*, 1998). Dabei erfolgt die selektive Aufnahme vorrangig über die Bindung der Metallionen an Chelatoren, z. B. Histidin (Krämer *et al.*, 1996), Nicotianamin (Pich *et al.*, 1994) und Zitrat (Senden *et al.*, 1995). Eine Bindung an andere Chelatoren wie PC und MT könnte zur Sequestrierung der Metalle hauptsächlich in der Wurzel führen (Evans *et al.*, 1992). Indirekt nachgewiesen wurde die Translokation von Cd^{2+} durch PC. Nach Expression der *TaPCS* (*Triticum aestivum*, Accession No. AF093752) aus Weizen in der PC-defizienten *cad1-3*-Mutante unter der Kontrolle eines wurzelspezifischen Promotors konnten PC und Cd in den Blättern nachgewiesen werden. Zugleich wurde eine Reduktion der Cd-Menge in den Wurzeln festgestellt (Gong *et al.*, 2003). Ein derartiger Langstreckentransport wurde auch in umgekehrter Richtung durch die Expression von *TaPCS* in der *cad1-3*-Mutante und der Verwendung eines blattspezifischen Promotors gezeigt (Chen *et al.*, 2006). Was jedoch bisher nicht nachgewiesen wurde sind Metallkomplexe im Xylem (Clemens, 2006b). Dieser Nachweis wurde für Histidin gezeigt. Durch EXAFS- („Extended X-ray Absorption Fine Structure“) Analysen wurde nachgewiesen, dass Histidin Ni^{2+} im Xylem bindet (Krämer *et al.*, 1996). Für den Übergang der Metallionen und/oder Metall-Liganden-Komplexe vom Cytosol der Wurzelzellen in das vaskuläre Gewebe ist ein Transport durch die Zellmembran notwendig. Hierfür verantwortlich könnten Transporter der P-type AtPasen der 1_B-Unterfamilie sein, auch bezeichnet als „Heavy Metal transporting P-type ATPases“ (HMA) (Axelsen und Palmgren, 2001). In Bakterien sind Proteine dieser Familie wichtig für den Efflux der Metalle aus dem

Cytosol und essenziell für die Metalltoleranz (Nies, 2003). In Pflanzen werden zwei Gruppen der HMA-Familie exprimiert: Cu/Ag-transportierende Pumpen und Zn/Cd/Co/Pb-transportierende Pumpen. In *A. thaliana* sind HMA1 bis 4 bekannt, die zur letztgenannten Gruppe gehören. *AtHMA2* und *AtHMA4* sind wichtig für die Translokation von Zn. In einer *hma2 hma4*-Doppelmutante ist aufgrund einer ungenügenden Zn^{2+} -Versorgung das Wachstum verkümmert und durch Chlorosen geprägt. Durch Zn-Zugabe wird dieser Phänotyp verhindert (Hussain *et al.*, 2004). Beide Gene werden im vaskulären Gewebe exprimiert und sind wahrscheinlich dort für die Xylembeladung verantwortlich. Cd^{2+} könnte auch als Substrat dienen. Durch eine Expression von *HMA4* in der *S. cerevisiae ycf1*- (yeast cadmium factor) Mutante (Li *et al.*, 1996) Mutante wird die Cd^{2+} -Hypersensitivität komplementiert. Weiterhin zeigten *A. thaliana-hma4*-Pflanzen, die eine T-DNA-Insertion tragen, eine geringe Wachstumsinhibierung in Anwesenheit von Cd^{2+} im Vergleich zu WT-Pflanzen (Mills *et al.*, 2005). Und in der Cd^{2+} -hypersensitiven *cad1-3*-Mutante (Howden *et al.*, 1995a) wird durch die Expression von *hma2* oder *hma4* die Cd^{2+} -Hypersensitivität noch zusätzlich erhöht (Hussain *et al.*, 2004).

Innerhalb des Xylems gibt es ein pH-abhängiges Gleichgewicht zwischen Chelatoren, Metallionen und Metallkomplexen (Senden und Wolterbeek, 1990). Die Xylementladung ist der nachfolgende Prozess in der kontrollierten Verteilung und Detoxifizierung der Metalle im Spross. Eine Rückverteilung von Metallen über das Phloem ist jedoch möglich (Schmidke und Stephan, 1995).

1.1.4 Xylementladung, Verteilung im Gewebe und Detoxifizierung

Nachdem die Metallionen den Apoplasten der Blätter erreicht haben, beginnt die Entladung des Xylems in die Blattzellen und die Verteilung im Gewebe (Marschner, 1995). Die Verteilung in den Blättern erfolgt dabei sowohl über den Symplast als auch über den Apoplast (Karley *et al.*, 2000). Beteiligt an diesen Prozessen sind, wie bereits erwähnt, Chaperone (z. B. CCH1) und P-type ATPasen (z. B. RAN1). Innerhalb der Zellen werden die Metallionen zu den einzelnen Kompartimenten bzw. Apo-Metalloproteinen transportiert. Wichtige Transportproteine konnten bereits identifiziert werden und sind Mitglieder der ABC-Transporter-, NRAMP-, CDF- („Cation Diffusion Facilitator“) (Mäser *et al.*, 2001) und P-type ATPasen-Familie.

Der Transport der Metallionen und die Sequestrierung in die Vakuole ist ein wichtiger Prozess in der Metallhomöostase (Vogeli-Lange und Wagner, 1990; Krämer *et al.*,

2000). Transporter, die in diesen Prozess involviert sind, konnten bereits in *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* (Spaltheefe) und Pflanzen identifiziert werden (Clemens, 2001). Für die Sequestrierung von Cd in die Vakuole ist HMT1 („**H**eavy **M**etal **T**olerance **1**“) aus *S. pombe* bekannt. HMT1 gehört zur Familie der ABC-Transporter und vermittelt den Mg-ATP-abhängigen Transport von PC-Cd-Komplexen und Apo-PC (Ortiz *et al.*, 1992; Ortiz *et al.*, 1995). Die Detoxifizierung in die Vakuole über den PC-abhängigen Stoffwechselweg wird später im Kapitel 1.2 näher beschrieben. In Pflanzen konnte bisher noch kein homologer Transporter von HMT1 identifiziert werden. In *S. cerevisiae* wird die Cd²⁺-Toleranz über den ABC-Transporter YCF1 („**Y**east **C**admium **F**actor **1**“) vermittelt. Dieser Transporter zeigt eine Sequenzhomologie zu den MRPs („**M**ulti-**d**rug **R**esistance-associated **P**rotein“) von Menschen (Szczycka *et al.*, 1994). Aufgrund der Funktionen von YCF1 in *S. cerevisiae* (Li *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997) und MRP-ähnlichen Sequenzen in *Arabidopsis* (Lu *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1998; Tommasini *et al.*, 1998), könnten die MRPs den Transport von PC-Cd²⁺ über die Vakuolenmembran vermitteln (Rea *et al.*, 1998).

Proteine der CDF-Familie haben ebenfalls eine wichtige Funktion in der Detoxifizierung von Metallionen in die Vakuole. Für die Proteine COT1 („**C**obalt **T**olerance“) und ZRC1 („**Z**inc **R**esistance **C**onferring“) aus *S. cerevisiae* konnte eine erhöhte Toleranz gegenüber Co²⁺ bzw. Zn²⁺/Cd²⁺ nachgewiesen werden (Kamizono *et al.*, 1989; Conklin *et al.*, 1992). Beide Proteine sind in der Vakuolenmembran lokalisiert und an der Metallsequestrierung beteiligt (Li und Kaplan, 1998). Aus *S. pombe* wurde der CDF-Transporter Zhf (**Z**inc **h**omeostasis **f**actor) identifiziert, welcher im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist (Clemens *et al.*, 2002a). Für Zhf konnte ein Einfluss auf die Toleranz gegenüber verschiedenen Metallen gezeigt werden.

Der erste bekannte pflanzliche CDF-Transporter ist ZAT (= AtMTP1 – „**M**etal-**T**olerance **P**rotein“) aus *Arabidopsis*. Die Überexpression von *AtMTP1* in transgenen Pflanzen führte zu erhöhter Zn²⁺-Toleranz gegenüber Kontroll-Pflanzen und zu erhöhter Zn²⁺-Aufnahme in die Wurzeln (van der Zaal *et al.*, 1999). AtMTP1 ist in der Vakuolenmembran lokalisiert und besitzt eine Funktion in der Sequestrierung erhöhter cytosolischer Zn²⁺-Konzentrationen in die Vakuole (Kobae *et al.*, 2004). Für den homologen Transporter aus *A. halleri* AhMTP1 ist ebenfalls die Lokalisation in der Vakuolenmembran und eine Zn²⁺-Transport-Aktivität bekannt (Dräger *et al.*, 2004).

Ein wichtiger Detoxifizierungsweg von nicht-essenziellen Schwermetallen ist die Entgiftung in die Vakuole. Entscheidend beteiligt an diesem Prozess sind PC, welche

als Chelatoren in der Zelle Metallionen komplexieren können. Die Funktionen der PC wird in den folgenden Kapiteln ausführlich erklärt.

1.2 Phytochelatine (PC)

Die PC wurden zuerst in der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* entdeckt und ursprünglich als Cadystins bezeichnet (Kondo *et al.*, 1984). Sie sind metallbindende Peptide, welche nicht-ribosomal aus Glutathion (GSH) in einer Transpeptidase-Reaktion gebildet werden (Grill *et al.*, 1989). Ihre generelle Struktur ist $(\gamma\text{-Glutamyl-Cystein})_n$ ($n=2-11$) (Rauser, 1995) (Abb. 1).

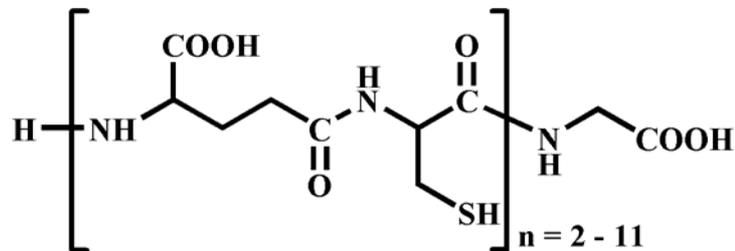


Abb. 1 Die Struktur der Phytochelatine in *Arabidopsis thaliana*. γ -Glutamyl-Cystein-Einheiten aus 2 bis 11 Wiederholungen mit einem carboxyterminalen Glycin.

Alle bekannten PC können in fünf Klassen eingeteilt werden (Zenk, 1996). Die 1. Klasse bilden PC, die dem Tripeptid Glutathion ähneln und am stärksten im Pflanzenreich vertreten sind. Weitere Klassen der PC wurden in verschiedenen Pflanzen entdeckt. In *Leguminosae* (Hülsenfrüchtler), welche Homoglutathion bilden, ist die 2. Klasse der PC zu finden, Homo-PC. Diese besitzen anstelle des Glycins ein Alanin $(\gamma\text{-Glutamyl-Cystein})_n\text{-}\beta\text{-Alanin}$. Als ein Hauptbestandteil in Mais und die 3. Klasse bildend, gehören PC mit der Struktur $(\gamma\text{-Glytamyl-Cystein})_n$ (Meuwly *et al.*, 1995). In Spezies der *Poaceae* (Süßgräser) sind PC mit einem carboxyterminalen Serin zu finden. Diese, zu der 4. Klasse gehörend, werden von Hydroxymethyl-Glutathion gebildet und als Hydroxymethyl-PC $(\gamma\text{-Glutamyl-Cystein})_n\text{-Serin}$ bezeichnet (Klapheck *et al.*, 1994). Die PC der 5. Klasse wurden wiederum in Mais entdeckt und besitzen ein carboxyterminales Glutamin $(\gamma\text{-Glytamyl-Cystein})_n\text{-Glutamin}$ (Meuwly *et al.*, 1995).

Die PC-Bildung wird durch verschiedene essenzielle und nicht-essenzielle Metallionen aktiviert. Für Cd-, Cu-, Ag- und As-Ionen konnte bereits *in vivo* eine Komplexbildung mit PC gezeigt werden (Maitani *et al.*, 1996; Schmöger *et al.*, 2000). Durch die

Isolierung der Cd^{2+} -sensitiven *Arabidopsis*-Mutanten *cad1* und *cad2* wurde die Funktion der PC in der Cd^{2+} -Detoxifizierung erstmals gezeigt (Howden *et al.*, 1995a; Howden *et al.*, 1995b).

1.3 Identifizierung der Phytochelatinsynthase-Gene

Die molekulare Identifizierung der kodierenden Gene erfolgte in drei unabhängigen Gruppen gleichzeitig. Sie wurden aus Weizen (*Triticum aestivum*, Accession No. AF093752), *S. pombe* (Accession No. Z68144) und *Arabidopsis* (Accession No. AF135155) isoliert (Clemens *et al.*, 1999; Ha *et al.*, 1999; Vatamaniuk *et al.*, 1999). Die aus Weizen isolierte cDNA *TaPCS1* („*Triticum aestivum* Phytochelatin Synthase 1“) führte zu einem starken Anstieg in der Cd^{2+} -Toleranz durch eine heterologe Expression in *S. cerevisiae*. Der GSH-Synthese-Inhibitor BSO (Buthioninsulfoxid) zeigte eine GSH-abhängige Cd^{2+} -Toleranz für TaPCS. Durch Sequenzanalysen konnten homologe Proteine von TaPCS in *Arabidopsis* (AtPCS1) und *S. pombe* (SpPCS) identifiziert werden. Diese führten ebenfalls zu einer stark erhöhten Cd^{2+} -Toleranz in einer heterologen Expression in *S. cerevisiae*. Die Funktion der PC-Synthese der PCS-Genprodukte konnte durch die Inaktivierung von *SpPCS* bestätigt werden. In der *S. pombe* Δpcs -Mutante wurde eine erhöhte Cd^{2+} -Sensitivität beobachtet, die mit einem Verlust der PC-Synthese verbunden war. In WT *S. pombe*-Zellen konnten große Mengen PC2 und PC3 nach Cd^{2+} -Behandlung nachgewiesen werden. Die PC-Akkumulation war in Δpcs -Hefezellen nicht mehr vorhanden. Im Gegensatz dazu konnte durch die Expression von *TaPCS* in *S. cerevisiae*, einem Organismus, der normalerweise keine PC bildet, die PC-Bildung durch Cd^{2+} aktiviert werden. Der Nachweis der PC-Bildung wurde letztendlich durch rekombinante Expression und Reinigung von SpPCS gezeigt (Clemens *et al.*, 1999). Durch zwei andere Gruppen wurde gleichzeitig das PCS-Gen aus *A. thaliana* (*AtPCS1*) identifiziert. Durch Vatamaniuk *et al.* (1999) erfolgte die Aufklärung der Funktion von *AtPCS1* durch die Expression in *S. cerevisiae* und durch den Nachweis der PCS-Aktivität von rekombinantem AtPCS1 *in vitro*. Ha *et al.* (1999) bestätigten die PCS-Aktivität für *AtPCS1* und *SpPCS* nach Aufreinigung der exprimierten Proteine in *Escherichia coli*. Das *AtPCS1*-Gen (*cad1*) wurde durch eine markergestützte Klonierung („positional cloning“) aus *A. thaliana* isoliert.

Das Molekulargewicht von TaPCS1 und AtPCS1 ist ungefähr 55 kDa, das von SpPCS 47 kDa. Alle drei Proteine zeigen eine hohe Homologie im N-terminalen Bereich,

während der C-terminale Bereich sehr variabel ist. Verschiedene Cysteine im N-Terminus sind hoch konserviert. Auch das aus *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm) identifizierte PCS-Homolog *CePCS1* (Vatamaniuk *et al.*, 2000) zeigt im N-terminalen Bereich diese Konservierung (Cobbett, 2000) (Abb. 2).

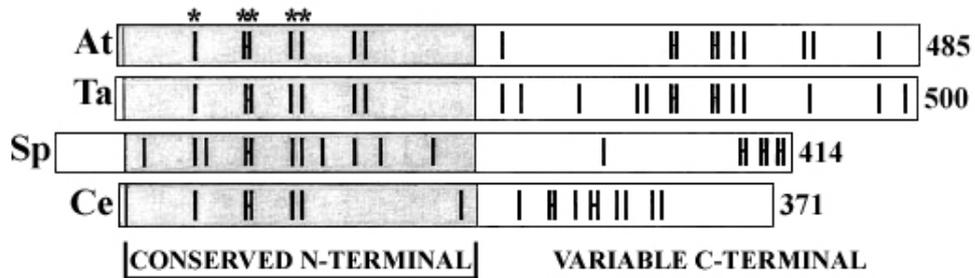


Abb. 2 Schematische Darstellung der PCS-Proteine von *Arabidopsis* (AtPCS1), Weizen (TaPCS1), *S. pombe* (SpPCS) und *C. elegans* (CePCS1). Die Anzahl der Aminosäuren ist rechts ablesbar. Die ungefähre Position der Cysteine ist durch schwarze Striche gekennzeichnet. Cysteine, die über alle vier Sequenzen konserviert sind, wurden mit einem Sternchen versehen (Cobbett, 2000).

Die Identifizierung einer homologen PCS in *C. elegans* war sehr überraschend angesichts der phylogenetischen Distanz von Nematoden zu Pflanzen. Das CePCS-Protein besitzt eine 30 %-Ähnlichkeit zu TaPCS und eine 29-prozentige zu AtPCS1. Nach Isolierung der cDNA erfolgte die Expression in Hefe. *S. cerevisiae*-Zellen wiesen eine erhöhte Cd²⁺-Toleranz auf (Vatamaniuk *et al.*, 2001), während die Expression in *S. pombe* den Cd²⁺-Phänotyp der Δpcs -Mutante komplementierte (Clemens *et al.*, 2001b).

1.4 Funktion der PCS in der Detoxifizierung nicht-essenzieller Metalle

Die Ausschaltung der Funktion der PCS-Gene führte in verschiedenen Organismen zur erhöhten Sensitivität gegenüber Cd- und As-Ionen (Clemens *et al.*, 1999; Ha *et al.*, 1999; Vatamaniuk *et al.*, 1999). So zeigen PC-defiziente Mutanten von *Arabidopsis*, *S. pombe* und *C. elegans* eine Cd²⁺-Hypersensitivität (Abb. 3). Wie bereits erwähnt, führt die Inaktivierung von *SpPCS* zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Cd²⁺ (Clemens *et al.*, 1999). Auch die aus *A. thaliana* isolierte *cad1-3*-Mutante ist Cd²⁺-hypersensitiv. Im Vergleich zu WT-Pflanzen wurde ein stark reduziertes Wachstum festgestellt (Howden *et al.*, 1995a). Auch wurde eine erhöhte As(V)-Sensitivität

beobachtet (Ha *et al.*, 1999). In *C. elegans* konnte nach Inaktivierung von *ce-pcs-1* durch RNA-Interferenz ebenfalls die Funktion der PCS-Gene in der Cd²⁺-Detoxifizierung gezeigt werden (Vatamaniuk *et al.*, 2002).

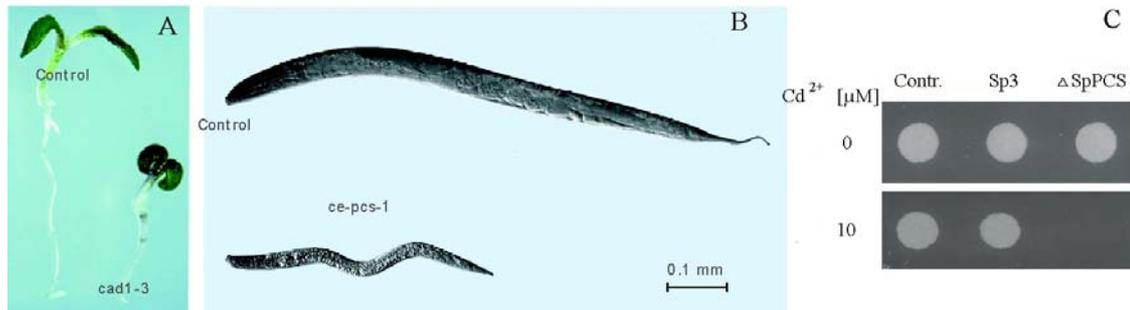


Abb. 3 PC-Synthese ist essenziell für die Detoxifizierung von Cd²⁺ in *Arabidopsis thaliana* (A), *Caenorhabditis elegans* (B) (Vatamaniuk *et al.*, 2002) und *Schizosaccharomyces pombe* (C) (Clemens *et al.*, 1999).

PC-defiziente Mutanten zeigen auch einen partiellen Verlust der As(III)-Toleranz in *S. pombe* (Clemens, 2006a) und *Arabidopsis* (Tennstedt und Clemens, unveröffentlicht). Für As(V) konnte ein unterschiedlicher Effekt in beiden Organismen festgestellt werden. Die *Arabidopsis cad1-3*-Mutante ist hypersensitiv (Ha *et al.*, 1999), während die *S. pombe Δpcs*-Mutante toleranter ist (Wysocki *et al.*, 2003).

Hinsichtlich anderer Metalle waren nur geringe Effekte feststellbar. Für die *cad1-3*-Mutante wurde eine zweifach erhöhte Kupfer- und Quecksilber-Sensitivität nachgewiesen. Eine erhöhte Zink-Sensitivität wurde nicht festgestellt – weniger als zweifach im Vergleich zur 20- bis 40-fach erhöhten Cd²⁺-Sensitivität (Ha *et al.*, 1999).

1.5 Die zweite PCS in *Arabidopsis* – *AtPCS2*

Im Genom von *Arabidopsis* konnte ein zweites PCS-Gen (*AtPCS2*, Accession No. AC003027) identifiziert werden. Dies war überraschend, weil alle untersuchten Cd²⁺-sensitiven *Arabidopsis*-Mutanten Allele von *cad1* oder defekt im GSH-Biosyntheseweg waren (Howden *et al.*, 1995a; Howden *et al.*, 1995b). Für die *cad1-3*-Mutante wurde experimentell bestätigt, dass sie keine nachweisbaren PC akkumuliert (Howden *et al.*, 1995a). Das *AtPCS2*-Gen ist jedoch kein Produkt der letzten Genomduplikation in *Arabidopsis*, und die geringe Sequenzübereinstimmung der Introns deuten auf eine lange Koexistenz beider PCS-Gene hin (Clemens, 2006a). Nach Isolierung der cDNA und der Expression in *S. cerevisiae* und *S. pombe Δpcs*-Mutante konnte gezeigt werden,

dass *AtPCS2* für eine funktionale PCS kodiert. Die Expression in *S. cerevisiae* und der *Δpcs*-Mutante führte zur Erhöhung der Cd^{2+} -Toleranz. Ebenso konnte die PC-Bildung nachgewiesen werden (Cazalé und Clemens, 2001). *AtPCS2* ist auch wie *AtPCS1* in *Arabidopsis* konstitutiv exprimiert, jedoch in geringeren Mengen (10-fach geringer, Genevestigator™) (Zimmermann *et al.*, 2004). Die schwache Expression von *AtPCS2* ist möglicherweise auf eine geringe Promotor-Aktivität und eine geringe Translationseffizienz der *AtPCS2*-mRNA zurückzuführen (Lee und Kang, 2005). Unabhängig der gezeigten Aktivität in heterologen Systemen ist *AtPCS2* in einer stark erhöhten Expression (35S Promoter) nicht in der Lage, den *cad1-3* Cd^{2+} -Phänotyp zu komplementieren (Lee und Kang, 2005). Eine Funktion von *AtPCS2* ist nicht bekannt. Weiterhin ist nun klar, dass auch in anderen Pflanzen wenigstens zwei PCS-Gene existieren. So wurde in Reis (*Oryza sativa*, Accession No. AAV32132), im Garten-Lattich (*Lactuca sativa*, Accession No. AF506284) und *Lotus japonicus* (Accession No. AY928091) ein zweites PCS-Gen identifiziert. Der Nachweis eines zweiten PCS-Gens in anderen Pflanzen verweist auf wichtige Funktionen, die zu einer evolutionären Konservierung geführt haben.

1.6 Stoffwechselweg der Phytochelatine

Das Genprodukt der PCS aus den oben genannten Organismen katalysiert die Bildung von Phytochelatinen (PC) aus Glutathion (GSH). Das Glutathion selbst wird aus seinen bestehenden Aminosäuren Glutamin, Cystein und Glycin in einem Zweistufenmechanismus durch die ATP-abhängigen Enzyme γ -Glutamylcystein-Synthetase (GCS, *CAD2*, E.C. 6.3.2.2) und Glutathion-Synthetase (GS, E.C. 6.3.2.3) gebildet (Rauser, 1995). Das GSH hat verschiedene Funktionen in der zellulären Abwehr (Noctor *et al.*, 2002), in der Regulation von Wachstum und Entwicklung (May *et al.*, 1998) und im Schwefelmetabolismus (Herschbach *et al.*, 1998). GSH ist durch die Komplexbildung von Metallen über die freie SH-Gruppe des Cysteins ein wichtiger Chelator in der Zelle. Aufgrund chemischer Reaktionen mit reaktiven Sauerstoffspezies wirkt es als Antioxidant. Es schützt Proteine vor Denaturierung, verursacht durch die Oxidation von Thiolgruppen. GSH dient nicht nur als Ausgangssubstrat für die PC-Synthese in der Metalldetoxifizierung, sondern auch für Glutathion-S-Transferasen, im Detoxifizierungsweg der Xenobiotika und Cytotoxine (Noctor *et al.*, 2002).

Nach der Induktion der PC-Bildung erfolgt die Komplexbildung der Metallionen im Cytosol. Der Enzymmechanismus, der zur PC-Synthese führt, wird im nächsten Kapitel

erklärt (Kapitel 1.7). Zunächst werden LMW-Komplexe („Low-Molecular-Weight“) gebildet, die in die Vakuole transportiert werden. In der Vakuole erfolgt die Einlagerung von Schwefel und die Bildung der HMW-Komplexen („High Molecular Weight“) (Verkleij und Schat, 1990; Ortiz *et al.*, 1992; Mehra *et al.*, 1994). Die Einlagerung von Schwefel erhöht die Menge an Schwermetall pro Molekül und die Stabilität des Komplexes. Dies konnte für die Bildung von LMW- und HMW-Komplexen des Cadmiums gezeigt werden (Dameron *et al.*, 1989a; Reese *et al.*, 1992). Der für die Bildung der HMW-Komplexe benötigte Schwefel wird möglicherweise aus der Adeninbiosynthese bereitgestellt. In diesem Stoffwechselweg wird ein schwefelhaltiges Analog des Aspartats synthetisiert, das Cysteinsulfinat. Aus diesem Analog werden andere schwefelhaltige Verbindungen gebildet, welche das Sulfid für die Bildung der HMW-Komplexe bereitstellen (Juang *et al.*, 1993). Maßgeblich beteiligt an der Bereitstellung des Sulfids sind die Enzyme der Adeninbiosynthese Adenylosuccinate-Synthetase (*ade2*), AIR-Carboxylase (5-Amino-Imidazole Ribonucleotide, *ade6*), AICAR-Synthetase (5-Amino-Imidazole-4-N-succinocarboxamide Ribonucleotide; *ade7*) und Adenylosuccinate-Lyase (*ade8*). Mutationen in diesen Genen führten zum Verlust der Bildung von HMW-Komplexen (Speiser *et al.*, 1992). In *S. pombe* wird der Transport von PC-Komplexen durch HMT1 vermittelt. *Hmt1* kodiert für ein ATP-bindendes Membrantransportprotein (ABC-Transporter, siehe auch Kapitel 1.1) und ist in der Vakuolenmembran lokalisiert. Der Transportmechanismus ist unabhängig vom Protonengradient über die Vakuolenmembran (Ortiz *et al.*, 1992; Ortiz *et al.*, 1995). Ein zu SpHMT1 homologer Transporter konnte auch in *C. elegans* identifiziert werden. Nach Inaktivierung von *cehmt-1* durch RNA-Interferenz wurde ebenso eine Hypersensitivität gegenüber Cd^{2+} festgestellt. (Vatamaniuk *et al.*, 2005). Ein ATP-abhängiger Transport von PC und PC- Cd^{2+} -Komplexen konnte in Tonoplastenvesikeln aus Hafer biochemisch charakterisiert werden (Salt und Rauser, 1995). In *Arabidopsis* sind bis jetzt keine Transporter für PC-Metall-Komplexe identifiziert. Die folgende Abbildung (Abb. 4) fasst die eben beschriebenen Gene und ihre Funktionen zusammen.

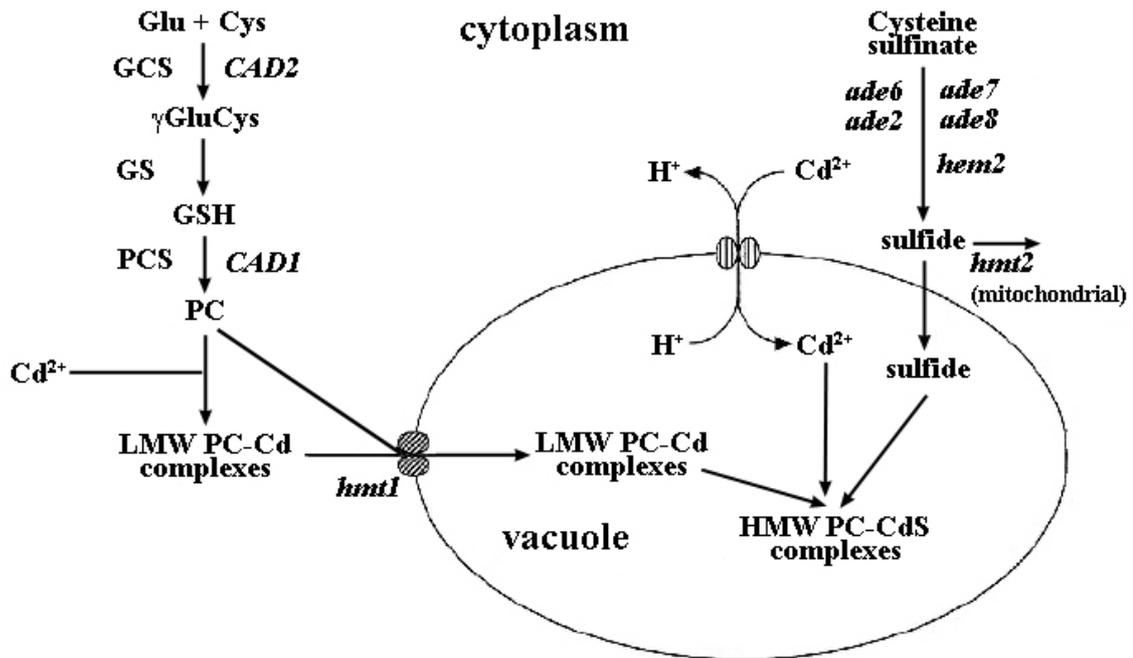


Abb. 4 Stoffwechselweg der PC in Hefen und Pflanzen. Dargestellt sind die Gene und ihre Funktionen, die an der Detoxifizierung von Cd^{2+} beteiligt sind (Cobbett, 2000).

1.7 Enzymmechanismus der PCS

Die PC-Synthese erfolgt in einer Transpeptidase-Reaktion durch die Übertragung eines γ -Glutamyl-Cysteins von GSH auf ein weiteres GSH-Molekül, welches zur Bildung von PC₂ führt (Abb. 5A). Sind ausreichende Mengen an PC gebildet, erfolgt die Transpeptidase-Reaktion durch Übertragung eines γ -Glutamyl-Cysteins von GSH auf ein bereits synthetisiertes PC-Molekül (PC_n) (Abb. 5B). Dadurch werden PC_{n+1}-Moleküle gebildet (Grill *et al.*, 1989). Das PCS-Enzym katalysiert in einem Zwei-Stufenprozess die Abspaltung des Glycins von GSH und die Übertragung des gebildeten γ -Glutamyl-Cysteins auf ein Akzeptormolekül. Daher wird es auch als γ -Glutamyl-Cystein-Dipeptidyl-Transferase bezeichnet. Vereinfacht dargestellt, wird folgende Reaktion katalysiert:



Die Kettenverlängerung erfolgt in C zu N-Richtung durch Spaltung der Peptidbindung des Donormoleküls und nicht des Akzeptormoleküls (Rea *et al.*, 2004) (Abb. 5). Durch die rekombinante Aufreinigung von AtPCS1 konnte die Funktion als Dipeptidyltransferase bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass ³H-markiertes

Glycin von ^3H -Gly-markiertem GSH in der Reaktion mit unmarkiertem PC2 in das gebildete PC3 eingebaut wird (Vatamaniuk *et al.*, 2004).

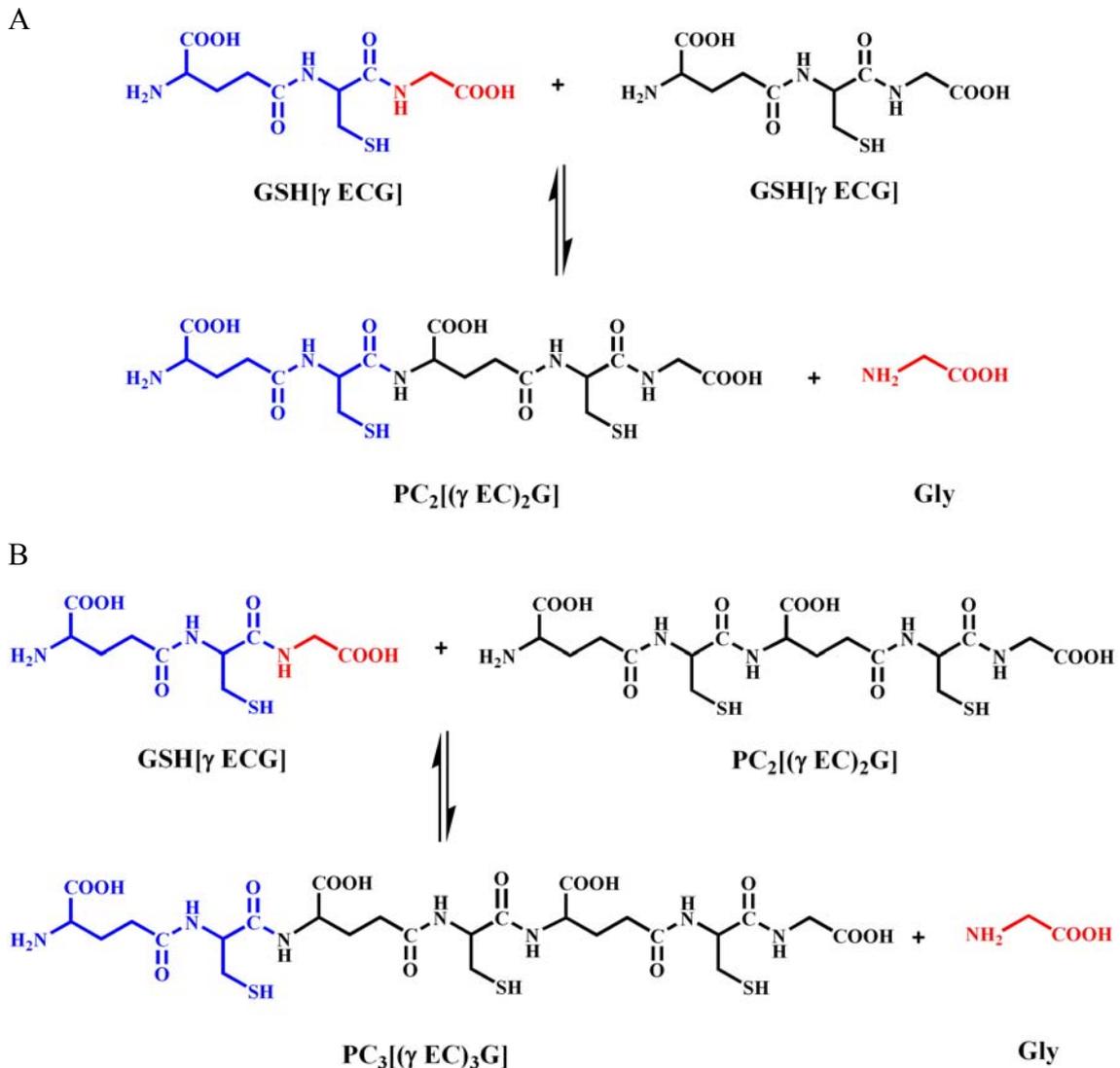


Abb. 5 Die PCS katalysieren die PC-Synthese von PC2 (A) und PC3 (B) (modifiziert nach Vatamaniuk *et al.*, 2004).

Weitere Untersuchungen durch Vatamaniuk *et al.* führten zu neuen Erkenntnissen in der PC-Synthese. Die Katalyse der PC-Bildung erfolgt nach dem Ping-Pong-Mechanismus (Vatamaniuk *et al.*, 2000). Bei diesem Mechanismus gibt es zwei stabile Enzymformen E und E'. Das Substrat A bildet zuerst mit der Enzymform E ein Enzym-Substrat-Komplex. Dieser Komplex wird unter Bildung des Produktes P (γ -Glu-Cys und Gly) in die Enzymform E' gespalten. Das Substrat B kann nur mit dieser Enzymform E' einen Enzym-Substrat-Komplex bilden, der dann in das Reaktionsprodukt Q gespalten wird. Bei diesem Schritt wird die Enzymform E' in die Enzymform E zurückgebildet

(Schellenberger, 1989). Es wird angenommen, dass zwei Substrat-Bindestellen für GSH, eine hochaffine und eine niedrigaffine, im Protein existiert (Vatamaniuk *et al.*, 2004) (Abb. 6). Die vermutete Enzymacylierung wurde durch die Inkubation von gereinigtem Enzym mit ^{35}S -markiertem GSH bestätigt. Das Cys⁵⁶, welches in allen bekannten PCS und PCS-ähnlichen Proteinen 100 % konserviert ist, ist für die PCS-Aktivität unbedingt nötig. Dies ist die erste Acylbindestelle für GSH, die Cd^{2+} -unabhängig ist. Nach Mutation von Cys⁵⁶ zu Serin wurde kein γ -Glu-Cys-Enzym-Intermediat auf eine Inkubation mit ^{35}S -GSH in Abwesenheit von Cd^{2+} gebildet. In Anwesenheit von Cd^{2+} erfolgt dann die zweite Acylierung an der zweiten Acylbindestelle für GSH. Es wird vermutet, dass zwei Acylierungen pro katalytischen Zyklus die Energie für die neu gebildete Peptidbindung bereitstellen (Vatamaniuk *et al.*, 2004).

Der Enzymmechanismus der PC-Synthese ist sehr ähnlich dem der Cys-Proteasen aus der Papain-Familie (Rea *et al.*, 2004). Das Papain besitzt eine niedrige Substratspezifität und enthält neben drei Disulfidbrücken eine einzige, zwischen zwei Domänen liegende freie SH-Gruppe. Entscheidend für den Enzymmechanismus ist die katalytische Triade, die über ein H-Brückensystem aus den zwei benachbarten Aminosäuren Histidin und Asparagin gebildet wird (Schellenberger, 1989). Eine katalytische Triade konnte durch eine zielgerichtete Mutagenese von AtPCS1 nachgewiesen werden. Ein Austausch von His¹⁶² und Asp¹⁸⁰ führte zur Inhibierung der katalytischen Aktivität (Rea *et al.*, 2004). Durch die Aufklärung der Kristallstruktur von NsPCS (*Nostoc spec.*, (Harada *et al.*, 2004; Tsuji *et al.*, 2004) wurden die katalytische Triade und damit auch der Enzymmechanismus der γ -Glu-Cys-Synthese bestätigt (Vivares *et al.*, 2005). Die Transpeptidase-Aktivität ist metallunabhängig und ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt.

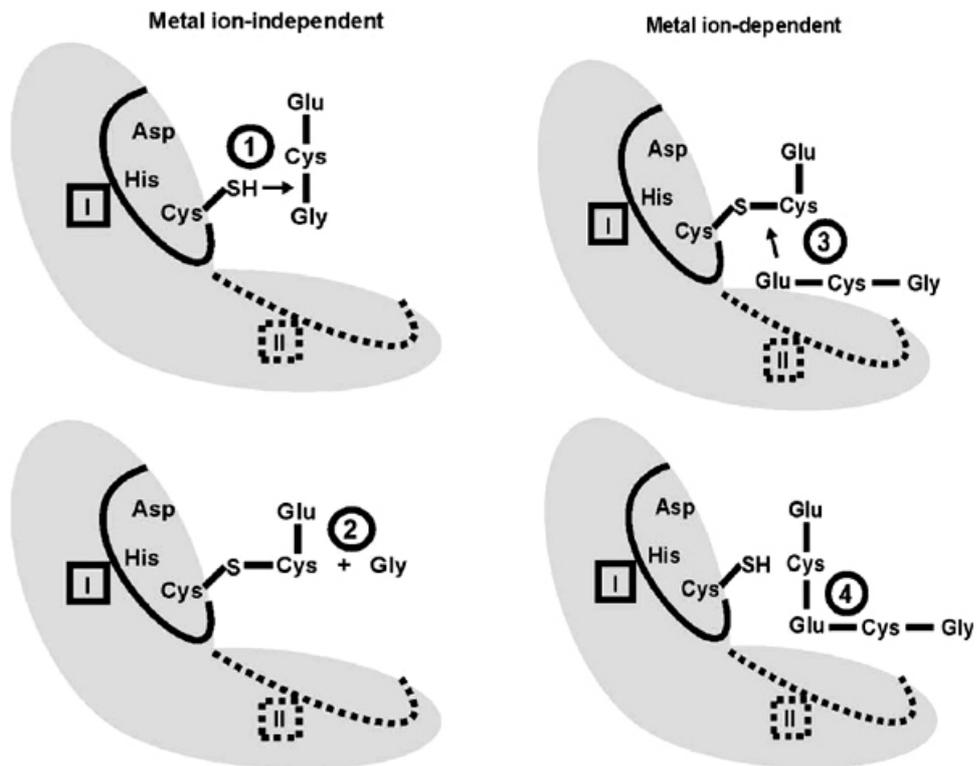


Abb. 6 Modell der Enzymacylierung. PCS besitzen zwei Substratbindestellen (I und II). Acylierung an der Bindestelle I erfolgt über ein Cys, welches in allen bekannten PCS und PCS-ähnlichen Proteinen zu 100 % konserviert ist. Die Bindestelle II ist bisher nicht identifiziert (Clemens, 2006a).

Eine biochemisch interessante Eigenschaft der eukaryontischen PCS ist ihre Aktivierung durch Metallionen. Diese Proteine sind in der Lage, durch Schwermetallionen, die für viele Enzyme toxisch sind, die Synthese von PC zu katalysieren. Eine Ausnahme ist eine Carboanhydrase Isoform aus der Diatomee *Thalassiosira weissflogii*, in der Cd^{2+} als Kofaktor dient (Lane und Morel, 2000). Die PC-Bildung kann nach Behandlung mit erhöhten Metallionen-Konzentrationen in *S. pombe*, pflanzlichen Zellkulturen und in gesamten Pflanzen nachgewiesen werden. *In-vitro*-Untersuchungen haben gezeigt, dass die PC-Synthese abhängig ist von Metall- und Metalloid-Ionen (Grill *et al.*, 1989). Cd^{2+} ist der stärkste Aktivator der PC-Synthese. Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Sb^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} , AsO_4^- und andere Metallionen sind auch in der Lage, die PC-Synthese zu aktivieren. Diese Ergebnisse wurden durch die Aufreinigung rekombinant exprimierter PCS bestätigt (Vatamaniuk *et al.*, 2000; Oven *et al.*, 2002). Aufgrund der metallabhängigen PC-Synthese wird angenommen, dass die Reaktion durch Komplexbildung der aktivierenden Ionen vom gebildeten Reaktionsprodukt sich selbst terminiert (Loeffler *et al.*, 1989). Die Cd^{2+} -Bindung von

AtPCS1 konnte *in vitro* gezeigt werden. Die Bindung von Cd^{2+} -Ionen erfolgte in einer Stoichiometrie von ca. 7 mol Cd^{2+} / mol Protein. Der gemessene K_M von ca. 0,5 μM war jedoch zu niedrig, um in Anwesenheit von millimolaren GSH-Konzentrationen eine direkte Metallbindung *in vivo* zu erklären. Für andere Metallionen wie Cu^{2+} , die ebenfalls effektive Aktivatoren *in vitro* sind, war der gemessene K_M noch niedriger. Das GSH ist ein hervorragender Metallionen-Chelator und liegt in millimolaren Konzentrationen vor, so dass in der Zelle extrem geringe Mengen „freier“ hydratisierter Ionen vorkommen. Aus diesem Grund wird angenommen, dass bis-Glutathion- Cd^{2+} -Komplexe ($\text{GS}_2\text{-Cd}$) als Substrate der PC-Synthese dienen. Die Theorie der blockierten Thiole wurde aufgestellt. Begründet wurde diese Theorie experimentell dadurch, dass in einem Medium ohne Metallionen die PC-Synthese in Anwesenheit von S-alkylierten GSH (Methyl-, Ethyl-, Propyl-) als Substrat katalysiert wird. In diesem Modell katalysieren PCS eine Zweisubstrat-Transpeptidase-Reaktion, in der freies GSH und GS-Metall-Komplexe als Substrate dienen. Freie Metallionen haben keine Funktion als direkte Aktivatoren der PC-Synthese. Nicht nachgewiesen wurde, dass die zweite Acylbindestelle in AtPCS1, die nur in Anwesenheit von Metallionen eine Acylierungsreaktion eingeht (siehe Kapitel 1.7.2), $\text{GS}_2\text{-Cd}$ mit hoher Affinität bindet (Vatamaniuk *et al.*, 2000). Die Theorie der blockierten Thiole und die metallunabhängige PC-Synthese wurde durch Oven *et al.* (2002) hinterfragt. So wurde nur eine sehr geringe Aktivität von AtPCS1 mit S-alkylierten GSH als Substrat in Abwesenheit von Cd^{2+} gefunden. Auch zeigte die Aktivierung der PCS durch metallbindende Thiole (Di-Thiothreitol, Cystein) keine Aktivität, welche definitiv keine Substrate sind.

Die Frage der Metallaktivierung durch eine direkte Metallbindung an das Enzym wurde später durch Meier *et al.* (2003) nochmals aufgegriffen. Es sollten Metallbindestellen im Protein identifiziert werden. Die Theorie zu diesen Überlegungen war, dass in anderen Proteinen die Metallbindung über kurze, aufeinander folgende Aminosäureabschnitte erfolgt. Bekannte Beispiele sind die Motive Cys-Xaa-Xaa-Cys und Cys-Cys der Metallothioneine (Robinson *et al.*, 1993; Cobbett und Goldsbrough, 2002), His-reiche cytoplasmatische Domänen der CDF- und ZIP-Transporter (Paulsen und Saier, 1997; Guerinot und Eide, 1999), die N-terminale Bindestelle von P-type ATPasen (Solioz und Vulpe, 1996) oder die Cu-Bindestellen in menschlichen Prion-Proteinen (Jackson *et al.*, 2001). Für die Identifizierung von Cd^{2+} -Bindestellen in TaPCS und SpPCS wurden 13-Aminosäuren-lange Peptide, die sich in elf Aminosäuren überlappen, auf

Cellulosefilter synthetisiert. Die Analyse erfolgte mit $^{109}\text{Cd}^{2+}$. Die Autoradiographie ergab Peptidbereiche mit Cd^{2+} -Bindungsaktivität. Die Anzahl der putativen Cd^{2+} -Bindestellen für TaPCS war sieben, welche mit der 7:1 Stoichiometrie für Cd^{2+} -Bindung zu AtPCS1 perfekt übereinstimmte. Viele der identifizierten Bindemotive enthielten Cysteine, was aufgrund der hohen Affinität von Cd^{2+} zu Thiolgruppen nicht überraschend ist. Jedoch hatte Cd^{2+} nicht an alle Cysteine gebunden. Es gab eine deutliche Korrelation zwischen der Signalstärke und dem Grad der Konservierung der Cysteine. So zeigten konservierte Cysteine Cd^{2+} -Bindung, nicht-konservierte Cysteine keine Bindung (Maier *et al.*, 2003).

Die Frage der Metallaktivierung der PCS konnte dennoch nicht geklärt werden. Auf der einen Seite steht das durch Vatamaniuk *et al.* (2000; siehe oben) vorgeschlagene Modell der Aktivierung durch GS-Metall- und PC-Metall-Komplexe. GS- und PC-Metall-Komplexe dienen als Substrat für den Dipeptid-Transfer. Auf der anderen Seite steht die Auffassung der Aktivierung durch die direkte Bindung der Metallionen an das Protein, erstmals vorgeschlagen durch Cobbett (2000). Da Cd^{2+} nicht als freies hydratisiertes Ion in der Zelle vorkommt, kann die Übertragung der Metallionen von GS-Metall-Komplexen auf das PCS-Protein ein möglicher Mechanismus sein, der zur Aktivierung führt. PCS-Proteine besitzen möglicherweise hochaffine Bindungs-/ Interaktions-Bereiche, so dass Metallionen von niedermolekularen Liganden auf das Protein übertragen werden können (Clemens, 2006a). Ein ähnlicher Mechanismus wird auch für die Metall-Efflux-Systeme diskutiert (Nies, 2003). Weitere Untersuchungen sprechen für den Mechanismus der direkten Metallbindung. *In-vivo*-Daten durch Ruotolo *et al.* (2004) gaben einen klaren Hinweis, dass eine Cd^{2+} -Bindung an AtPCS1 stattfindet. So kann der C-terminale Bereich von AtPCS1 die Cd^{2+} -Toleranz einer sensitiven *S. cerevisiae*-Mutante *in vivo* ohne PCS-Aktivität erhöhen. Das bedeutet, dass Cd^{2+} durch das Protein effizient in Anwesenheit von hohen Konzentrationen anderer Thiolliganden komplexiert werden kann (Ruotolo *et al.*, 2004). Ein ähnlicher Phänotyp wurde durch die stark erhöhte Expression von *AtPCS2* in *S. pombe* beobachtet. Die Expression von *AtPCS2* führte zu einer erhöhten Cu^{2+} -Toleranz ohne nachweisbare PC-Bildung (Clemens, 2006a).

Der erste Schritt der PC-Synthese ist metallunabhängig. Es erfolgt die Bildung von γ -Glu-Cys. Der zweite Schritt ist die metallabhängige Transpeptidase-Reaktion. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig, um den Mechanismus aufzuklären.

1.8 Die Verbreitung der PCS-Gene in der Natur

Heute ist bekannt, dass die PCS-Gene in der Natur weit verbreitet sind. Die nicht-ribosomal gebildeten PC der PCS wurden zuerst in *S. pombe* entdeckt und kurze Zeit später auch in Pflanzen (Kondo *et al.*, 1984; Grill *et al.*, 1985). In Pflanzen wurden konkrete Beweise gefunden, dass PC in Angiospermen (bedecktsamige Pflanzen), Gymnospermen (nacktsamige Pflanzen) und Bryophyta (Moose) vorkommen (Gekeler *et al.*, 1989). Nach der Klonierung von *TaPCS* und *AtPCS1* wurden in Datenbanken homologe Sequenzen in *S. pombe* und in *C. elegans* entdeckt. Während in *S. pombe* homologe Sequenzen erwartet wurden (siehe oben), war die Entdeckung in *C. elegans*, wegen der phylogenetischen Distanz zwischen Nematoden und Pflanzen überraschend. Die Verbreitung der *PCS*-Gene in der Natur wurde durch die Nutzung von zahlreichen Datenbanken weiter untersucht. Für das Pflanzenreich kann aufgrund von EST- („Expressed Sequence Tag“) Daten die Behauptung aufgestellt werden, dass die *PCS*-Gene in allen höheren Pflanzen vorkommen (Clemens, 2006a). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass *PCS*-Gene in Farnen (*Athyrium yokoscense*, Accession No. BAB64932, *Petris vittata* Accession No. AY542894) und Diatomeen (*Phaeodactylum tricorutum*, Accession No. CD379365) vorkommen. Für Moose wurde aber kein Hinweis gefunden, dass *PCS*-Gene exprimiert werden. Es wurden keine homologen Sequenzen in EST-Datenbanken für *Physcomitrella patens* gefunden. Ebenso wurden durch PCR-Analysen der genomischen DNA und cDNA von *P. patens* mit spezifischen Primern gegen konservierte Bereiche der PCS keine *PCS*-ähnlichen Sequenzen gefunden (Simm und Clemens, nicht veröffentlicht).

Durch die Nutzung der Daten aus EST- und Genomsequenzierungs-Programmen konnte eine noch weitere Verbreitung der *PCS*-Gene festgestellt werden. In zwei weiteren Nematoden, *Caenorhabditis briggsae* (Accession No. CAE59471) und *C. remanei* (Accession No. DR777421), wurden *PCS*-homologe Sequenzen entdeckt. EST-Sequenzanalysen lassen auch die Annahme zu, dass homologe *PCS*-Sequenzen in allen eukaryontischen Reichen vorkommen (Clemens, 2006a). Beispiele dafür sind unter anderem aus verschiedenen Stämmen der Metazoen (Vielzeller) bekannt, von den *Chordata* (Chordatieren) *Ciona intestinalis* (Accession No. BW266987) oder den *Echinodermata* (Stachelhäuter) *Strongylocentrotus purpuratus* (Accession No. DN561422).

Die Verbreitung der PCS-Gene in der Natur ist wirklich erstaunlich. Doch nicht in allen Organismen, die PCS-homologe Sequenzen besitzen, wurden auch PC nachgewiesen. Fern verwandte Proteine, die eine geringe Ähnlichkeit zu den PCS besitzen, wurden in Bakterien identifiziert. Durch Sequenzanalysen konnten diese PCS-ähnlichen Proteine z. B. in *Nostoc spec.*, *Trichodesmium erythraeum IMS101* und *Burkholderia fungorum* nachgewiesen werden. Durch spätere Datenbankanalysen wurden weitere PCS-ähnliche Proteine in Cyanobakterien und in Proteobakterien identifiziert (Clemens, 2006a). Diese bakteriellen Proteine haben eine Größe zwischen 23 bis 35 kDa und zeigen Ähnlichkeit zu der PCS-Pfam-Domäne 05023. Die Pfam-Domäne ist eine 133 Aminosäuren lange Sequenz, die einen Teil eines N-terminalen hoch konservierten Bereich der PCS einspannt (Harada *et al.*, 2004). Mögliche Funktionen und die Frage ob diese Proteine PC synthetisieren, sollten aufgeklärt werden. Für das Protein alr0975 von *Nostoc spec.* PCC 7120 (= NsPCS) konnte die Abspaltung von Gly aus GSH durch zwei Forschungsgruppen gezeigt werden. Dies erfolgte sowohl *in vitro* in *E. coli*, als auch *in vivo* in *S. pombe*. Während in der einen Gruppe sehr geringe Mengen PC₂ nachgewiesen wurden, konnte diese PC-Bildung in der anderen Gruppe nicht nachgewiesen werden (Harada *et al.*, 2004; Tsuji *et al.*, 2004).

In Datenbanken kommen immer weitere Organismen hinzu, die Gene für PCS oder PCS-ähnliche Proteine besitzen (siehe auch Anhang D). Allen gemeinsam ist die hoch konservierte Pfam-Domäne 05023 (siehe oben). Doch wieso sind die PCS kodierenden Gene in so vielen Organismen während der Evolution konserviert worden?

1.9 Die evolutionäre Konservierung der PCS-Gene

Aus den bisherigen Untersuchungen der PCS-Gene konnte eindeutig gezeigt werden, dass die PC-Synthese essenziell ist für die Schwermetalldetoxifikation der toxischen Metallionen Cd, Hg und As (Howden *et al.*, 1995a; Schmöger *et al.*, 2000; Cobbett und Goldsbrough, 2002). Dennoch konnte nicht geklärt werden, warum die PCS-Gene in der Nature so weit verbreitet sind und warum das Protein konstitutiv in der Pflanze exprimiert wird (Rea *et al.*, 2004).

Die Verbreitung der PCS-Gene in der Natur führt zu der Frage: Wie kann eine extrem geringe Notwendigkeit der Detoxifizierung der Schwermetallionen Cd und As die ubiquitäre Präsenz der PCS-Gene im Pflanzenreich erklären? (Clemens, 2006a). Während der Evolution waren die meisten Habitate der Landpflanzen frei von Cd-, Hg- und As-Kontaminationen. Ausnahmen sind z. B. vulkanische Gebiete und heiße

Quellen. Erhöhte Schwermetall-Konzentrationen von Cd, Hg oder As traten erst durch die Industrialisierung verstärkt hervor. Außerdem ist nicht bekannt, warum die PCS-Gene in der ganzen Pflanze konstitutiv exprimiert sind, auch in Geweben, die kaum mit den toxischen Schwermetallionen in Kontakt kommen. Nicht erklärbar ist z. B. eine konstitutive Expression in den Blättern. Erst durch erhöhte Schwermetallkonzentrationen, die zunächst in den Wurzelzellen sequestriert werden, erfolgt eine Translokation in die Blätter. Weiterhin kommt Zn in den meisten Böden in ca. 100-fach höherer Konzentration als Cd vor. Dies bedeutet, dass erhöhte Cd²⁺-Konzentrationen vermutlich mit einer viel stärkeren toxischen Zn²⁺-Konzentration verbunden sind (Chaney *et al.*, 1997).

Aufgrund dieser Überlegungen wurden drei Theorien beschrieben, die eine evolutionäre Konservierung der PCS erklären sollen (Clemens, 2006a). In der ersten Theorie wird die Möglichkeit der Beteiligung der PCS in der Homöostase essenzieller Metalle diskutiert. Der Nachweis einer geringen PC-Bildung in Tomaten-Zellkulturen in Abwesenheit von erhöhten Schwermetallen lässt eine Funktion der PCS in der Aufnahme und Verteilung dieser Metalle vermuten (Steffens *et al.*, 1986). Ebenso berichtete Grill *et al.* die Induktion der PC-Bildung durch Cu- und Zn-Ionen nach dem Transfer der kultivierten Zellen in frisches Medium. Die Menge gebildeter PC zeigte zudem eine lineare Korrelation mit der Zn²⁺-Konzentration im Medium (Grill, 1987; Grill *et al.*, 1988). Weiterhin wird AtPCS1 *in vitro* durch Cu²⁺ und Zn²⁺ aktiviert (Vatamaniuk *et al.*, 2000). Bisher wurde aber kein genetischer Nachweis beschrieben, der eine solche Funktion der PCS in der Metallhomöostase essenzieller Metalle wie z. B. Zn oder Cu erklärt. Auch in den isolierten *cad1*-Mutanten (siehe Kapitel 1.2) konnten keine signifikanten Unterschiede in der Sensitivität zu erhöhten oder zu erniedrigten Zn²⁺- und Cu²⁺-Konzentrationen im Vergleich zu WT-Pflanzen festgestellt werden (Howden *et al.*, 1995a; Ha *et al.*, 1999). In *S. pombe* dagegen wurde nach Verlust des funktionellen PCS-Gens eine erhöhte Cu²⁺-Sensitivität beobachtet (Clemens *et al.*, 1999). Möglicherweise gibt es andere, wichtigere Funktionen der PCS, welche in einer weiteren Theorie erklären werden soll. Einen Hinweis könnte eine Aktivität der bakteriellen NsPCS geben. Dieses Protein katalysiert *in vitro* die Abspaltung des Gly von GSH (Harada *et al.*, 2004). Diese Aktivität konnte bisher nicht *in vivo* gezeigt werden und eine physiologische Funktion ist auch nicht geklärt. Für das AtPCS1-Protein ist aber auch bekannt, dass es die Reaktion eines GS-Biman-Konjugates (γ -Glytamyl-Cystein-Glycin-Biman) zu einem γ -Glytamyl-Cystein-Biman-Konjugat

katalysiert (Beck *et al.*, 2003). Von dieser Reaktion wird angenommen, dass sie den ersten Schritt im Abbauweg von GS-Konjugaten in Pflanzen darstellt. Dieser Schritt der Reaktion ist der Aktivität der bakteriellen NsPCS ähnlich. Eine solche Aktivität von AtPCS1 konnte *in vivo* aber auch noch nicht nachgewiesen werden. Die Entgiftung von Glutathion-S-Konjugaten, z. B. von Xenobiotika (toxische, schwer abbaubare Stoffe) ist ein essenzieller Prozess in Eukaryonten (Meister, 1995). Für Pflanzen ist dieser Prozess aber nicht geklärt. Die dritte Theorie nimmt eine mögliche nützliche Funktion von Cd und As als Mikroelemente an (Clemens, 2006a). Für diese Funktion der Cd- und As-Ionen gibt es in Pflanzen keinen konkreten Hinweis. In marinen Ecosystemen ist aber bekannt, dass Cd sich ähnlich den Nährelementen verhält. Das Cd²⁺ ist in gleicher Konzentration vertreten wie die meisten Nährstoffe, z. B. Phosphat (Lane und Morel, 2000). Entdeckt wurde die Verwendung von Cd-Ionen als Mikroelement dadurch, dass unter einer geringen Zinkverfügbarkeit marine Diatomeen besser wuchsen, wenn Cd in das Medium zugeführt wurde. Cd-Ionen wurden dann als Kofaktor in einer Carboanhydrase-Isoform verwendet (Lane und Morel, 2000; Lane *et al.*, 2005). Aufgrund dieser Annahme wäre eine evolutionäre Konservierung der PCS-Gene erklärbar.

Für all drei Theorien, die eine evolutionäre Konservierung erklären sollen, gibt es bisher keine konkreten Beweise.

1.10 Zielstellung dieser Arbeit

Die Verbreitung der PCS-Gene in der Natur ist weiterhin rätselhaft. Aufgrund von Sequenzanalysen ist anzunehmen, dass die PCS-Gene in allen höheren Pflanzen vorkommen (Clemens, 2006a). Das Genprodukt, die Phytochelatinsynthase, ist konstitutiv exprimiert und bildet in einer metallabhängigen Reaktion kurze Cysteinreiche Peptide, die PC. Die PCS sind essenziell für eine Detoxifizierung von Cd- und As-Ionen (Cobbett und Goldsbrough, 2002). Beide toxische Elemente kommen in den meisten natürlichen Habitaten aber in sehr geringen Konzentrationen vor. Die geringe Notwendigkeit der Detoxifizierung von Cd und As erklärt nicht die weite Verbreitung der PCS-Gene in der Natur (Clemens, 2006a). Diskutiert wird eine Funktion der PCS in der Detoxifizierung essenzieller Metalle. Erste Hinweise kamen durch den Nachweis der PC-Bildung in Tomaten-Zellkulturen ohne erhöhte Schwermetallionen-Konzentrationen im Medium (Steffens *et al.*, 1986). Die Induktion der PC-Bildung wurde auch nach dem Transfer pflanzlicher Zellkulturen in frisches Medium gezeigt. Es

konnte eine Korrelation der Menge gebildeter PC und der Zn^{2+} -Konzentration beobachtet werden (Grill, 1987; Grill *et al.*, 1988). Ein genetischer Nachweis, der diese Funktion der PCS in der Homöostase essenzieller Metalle erklärt, wurde nicht beschrieben. Aufgrund von Beobachtungen in *S. pombe* und *S. cerevisiae*, einem Beitrag zur PCS-Expression an der Sequestrierung von Zn^{2+} (Tennstedt *et al.*, 2006), sollte die bereits bekannte *Arabidopsis cad1-3*-Mutante (Howden *et al.*, 1995a) und eine neu isolierte Mutante, *cad1-6* (Tennstedt *et al.*, 2006) in Bezug auf die Zink-Homöostase untersucht werden.

Im Genom von *Arabidopsis thaliana* wurde ein zweites PCS-Gen (*AtPCS2*) identifiziert. In Hefen konnte gezeigt werden, dass *AtPCS2* für eine funktionale PCS kodiert (Cazalé und Clemens, 2001). Unabhängig von dieser Aktivität in heterologen Systemen, ist die *Arabidopsis cad1-3*-Mutante, welche einen Defekt im *AtPCS1*-Gen besitzt und PC-defizient ist, Cd^{2+} -hypersensitiv trotz Anwesenheit von *AtPCS2* (Howden *et al.*, 1995a; Howden *et al.*, 1995b). Weiterhin ist *AtPCS2* in einer stark erhöhten Expression (35S Promoter) nicht in der Lage, diesen Cd^{2+} -Phänotyp von *cad1-3* vollständig zu komplementieren (Lee und Kang, 2005). Eine physiologische Funktion von *AtPCS2* ist bisher nicht bekannt. In dieser Arbeit sollten deshalb weitere Funktionen von *AtPCS2* durch eine stark erhöhte Expression in der *cad1-3*-Mutante *in vivo* identifiziert werden. Erste Ergebnisse wurden bereits durch Lee und Kang (2005) veröffentlicht, die eine ähnliche Strategie anwandten. Nicht bekannt ist eine Aktivierung von *AtPCS2* durch verschiedene Metalle. Über eine heterologe Expression in Hefen wurde bereits eine Cd^{2+} -Aktivierung gezeigt. Durch eine rekombinante Expression in *E. coli* und der Aufreinigung von *AtPCS2* sollte die Enzymaktivität für verschiedene Metalle *in vitro* mit *AtPCS1* verglichen werden.

Die Metallaktivierung der PCS ist auch bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Bekannt ist, dass sie *in vitro* durch verschiedene Metallionen aktiviert werden (Grill *et al.*, 1989; Vatamaniuk *et al.*, 2000; Oven *et al.*, 2002). Der Mechanismus dieser Aktivierung wird aber in zwei Modellen diskutiert. Im ersten Modell erfolgt eine direkte Metallbindung an das Protein (Cobbett, 2000). Dabei werden Metallionen, die als GS-Metallkomplexe vorliegen, auf das Protein übertragen (Clemens, 2006a). Im zweiten Modell erfolgt die Aktivierung durch Bindung von GS-Metallkomplexen, die neben GSH als Substrate der PC-Synthese dienen (Rea *et al.*, 2004; Vatamaniuk *et al.*, 2004). Aufgrund bisheriger Untersuchungen wird eine Aktivierung der PCS durch eine direkte Metallbindung favorisiert (Clemens, 2006a). Die Metallaktivierung war ein weiteres wichtiges

Aufgabengebiet dieser Arbeit. AtPCS1 und AtPCS2 in *Arabidopsis* zeigen eine unterschiedliche Metallaktivierung für Cu^{2+} . Während beide PCS durch Cd^{2+} aktiviert werden, zeigt AtPCS2 keine Aktivierung für Cu^{2+} (Cazalé und Clemens, 2001). Durch den Vergleich beider PCS sollten durch physiologische Untersuchungen in Hefen Aminosäuren identifiziert werden, die an der Cu^{2+} -Aktivierung beteiligt sind.

Die Ziele der Arbeit lassen sich zusammenfassend in die Antworten auf folgende Fragen unterteilen: a) Sind die PCS an der Homöostase essenzieller Metalle wie Zn^{2+} beteiligt? b) Welche Funktion besitzt *AtPCS2* in *Arabidopsis*? c) Wie erfolgt die Metallaktivierung der PCS?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad. Alle nicht aufgeführten Chemikalien in Tabelle 1 wurden von Sigma (Steinheim), Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

Tab. 1 Verwendete Materialien

Herkunft	Material
Sigma , Steinheim	MS Mixture mit Gamborg's Vitaminen, Anti-Mouse IgG Peroxidase Conjugate, Kodak BioMax MS Film
BD Otto Nordwald, Hamburg	Bacto-Tryptone, Bacto-Agar, Yeast Extract
Bio 101 Inc., Carlsbad, USA	YNB Drop-out Supplement Mix, YNB Drop-out Mix
Amersham Bioscience, Freiburg	Glutathione Sepharose TM 4B, FactorXa
Fluka, Buchs, Schweiz	Aminosäuren
QAIGEN, Hilden	QIAquick [®] Kits
Roth, Karlsruhe	Rotisolv [®] Methanol
Merck, Darmstadt	LiChrosolv [®] Wasser, Salpetersäure (Suprapure [®])
MBI Fermentas, St. Leon- Roth	Taq-Polymerase, Pfu-Polymerase, dNTP's, T4 DNA-Ligase, Restriktionsendonukleasen
Promega, Madison, USA	Anti-Mouse IgG - Alkalische Phosphatase
Convance, Münster	monoklonaler HA Antikörper

MWG, Ebersberg	Oligonukleotide
Cambrex Bio Science, Rockland, USA	SeaKem™ LE Agarose
J. T. Baker, Phillipsburg, USA	Trifluoressigsäure
Molecular Probes, Berlin	Monobrombiman
Invitrogen, Carlsbad, USA	Trizol® Reagent, AccuPrime™ Pfx SuperMix, Super Script II Reverse Transkriptase
Eurogentec, Seraing, Belgien	qPCR™ Mastermix for SYBR® Green I

2.2 Zur wissenschaftlichen Arbeit verwendete Organismen und Plasmide

2.2.1 Pflanzen

Für Untersuchungen zur Schwermetallresistenz in Pflanzen wurden Wildtyp *Arabidopsis thaliana* Ecotyp Columbia, die Mutanten *cad1-3* (Howden *et al.*, 1995a) und *cad1-6* (Tennstedt *et al.*, 2006) sowie die transgenen Linien *cad1-3 35S::AtPCS1* und *cad1-3 35S::AtPCS2* verwendet (Clemens, nicht veröffentlicht). Die Expression von *AtPCS1* und *AtPCS2* erfolgte konstitutiv unter der Kontrolle des 35S-Promoters des *Cauliflower-mosaic-virus* als Fusionsproteine mit einem C-terminalen HA-Tag.

2.2.2 Bakterien, Hefen und Plasmide

Tab. 2 Verwendete Bakterien- und Hefe-Stämme

Bezeichnung	besondere Merkmale	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α TM ,	F ⁻ , ϕ 80d, lacZ.M15, (lacZYA ⁻ argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺), phoA, supE44, λ ⁻ , thi-1, gyrA96, relA1	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Escherichia coli</i> DH10B TM	F ⁻ , mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), ϕ 80lacZ, Δ M15, Δ lacX74, recA1, endA1, ara Δ 139, Δ (ara, leu)7697, galU, galK, λ ⁻ , rpsL, (Str ^R) nupG	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ ompT, hsdS _b (r _b ⁻ , m _B), gal, dcm (DE3)	Novagen, San Diego, USA
<i>Sararomyces cerevisiae</i> Δ Cup1(DTY4)	<i>MATa trp1-1 leu2-3 leu2-112 His- Δcup1::URA3+</i>	Hamer <i>et al.</i> , 1985
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> Δ pcs	<i>h⁻ ade6-M216, leu1-32 ura4-Δ18 can 1-1 SpPCS::URA4</i>	Clemens <i>et al.</i> , 1999
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> FY261	<i>h⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4-Δ18, can 1-1</i>	S. Forsburg, Salk Institute, La Jolla, USA

Tab. 3 Verwendete Plasmide

Bezeichnung	besondere Merkmale	Referenz
pGEM [®] -T	f1 ori, <i>colE1</i> ori, <i>lacZ</i> , MCS, Amp ^r , SP6- und T7-Promotor	Promega, USA
pYX132	CEN, <i>Trp1</i> TPI Promotor, C-term. triple HA-Tag, Amp ^r	R&D Systems, Abingdon, UK
pSGP72	Amp ^r , <i>nmt1</i> Promotor, <i>Leu2</i> , C-term. triple HA-Tag	S. Forsburg, Salk Institute, La Jolla, USA Clemens <i>et al.</i> , 2001
pGEX	<i>tac</i> -Promotor, <i>lac</i> operator, β -lactamase-promotor, <i>lacI^q</i> , Amp ^r	Amersham Bioscience

2.3 Nährlösungen für Bakterien und Hefen

Tab. 4 Zusammensetzung von Nährlösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB (Luria Bertani)	10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, (50 μ g/ml Ampicillin)
YNB (yeast nitrogen base)	1,7 g/l YNB, 5 g/l Ammoniumsulfat, 20 g/l Glucose, 0,8 g/l Drop-out Mix, 30 mg/l Uracil, 30 mg/l Tryptophan, 30 mg/l Histidin, 30 mg/l Leucin
YPD (yeast extract peptone/ dextrose)	10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Bacto-Pepton, 20 g/l Glucose,

EMM (Edinburgh's minimal medium)	3 g/l Kalium-Hydrogen-Phtalat, 2,2 g/l Dinatriumhydrogen-phosphat, 5 g/l Ammoniumchlorid, 20 g/l Glucose, 20 ml/l Salzlösung (1,05 g/l Magnesiumchlorid-Hexahydrat, 14,7 mg/l Calciumchlorid-Dihydrat, 1 g/l Kaliumchlorid, 40 mg/l Natriumsulfat), 1 ml/l Vitaminlösung (1 g/l Pantothen säure, 10 g/l Nicotinsäure, 10 g/l Inositol, 10 mg/l Biotin), 0,1 ml Mikronährstoffe (5 g/l Borsäure, 4 g/l Magnesiumsulfat, 4 g/l Zinksulfat, 2 g/l Eisenchlorid, 0,4 g/l Molybdän säure, 1 g/l Kaliumiodid, 0,4 g/l Kupfersulfat, 10 g/l Citrat), 225 mg/l Adenin, 30 mg/l Uracil, 30 mg/l Tryptophan, 30 mg/l Histidin, 30 mg/l Leucin
YE5S (Yeast Extract)	5 g/l Hefeextrakt, 30 g/l Glucose, 100 mg/l Adenin 100 mg/l Histidin, 100 mg/l Leucin, 100 mg/l Uracil, 100 mg/l Lysin,

Für Platten wurde dem Medium 15 g/l Bacto-Agar zugegeben. Die Selektion von Hefemutanten erfolgte über die entsprechende Markeramino säure, die dem Medium nicht zugegeben wurden (*S. pombe*: ohne Leucin, *S. cerevisiae*: ohne Tryptophan). Für die Repression des *nmt1*-Promotors wurde 1 µM Thiamin zugegeben. Metalle wurden dem Medium als Chloridsalze zugesetzt.

2.4 Kultivierung von Bakterien und Hefen

2.4.1 *Schizosaccharomyces pombe* und *Saccharomyces cerevisiae*

Von einer Einzelkolonie wurde eine 2 ml Vorkultur angeimpft und diese über Nacht bei 30°C unter Schütteln (160 rpm) inkubiert. Um Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase zu erhalten, wurde eine Kultur mit einer Optischen Dichte (OD) bei 600 nm von 0,2 hergestellt und diese für drei bis vier Stunden bei 30°C inkubiert.

Für Experimente, in denen die Metallsensitivität untersucht wurde, wurde die Hefekultur auf eine OD₆₀₀ von 0,05 verdünnt. Die Metalle wurden dem Medium als Chloridsalze zugegeben. Nach 20 Stunden wurde die Zelldichte (OD₆₀₀) gemessen.

Für das Wachstum auf Agarplatten wurden 10 µl von verschiedenen Zellverdünnungen auf den Agar getropft. Die Platten wurden verschlossen und 48 Stunden bei 30°C inkubiert. In Untersuchungen der PC-Akkumulation durch HPLC-Analysen wurden die Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 wachsen gelassen. Für *S. pombe* wurden dem Medium 150 µM Cd²⁺ zugegeben, für *S. cerevisiae* 100 µM Cd²⁺ bzw. 80 µM Cu²⁺. Die Zellen wurden nach 24 Stunden geerntet.

2.4.2 Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte bei 37°C in LB-Medium mit dem selektiven Antibiotikum Ampicillin.

2.5 Pflanzenanzucht und Pflanzenhaltung

2.5.1 Nährmedien

Für die Pflanzenanzucht in hydroponischen Kulturen wurde das definierte Hoagland-Medium in einer 1/10-Konzentration verwendet (Hoagland und Arnon, 1939; Chaney, 1988). Die Inhaltsstoffe des Mediums sind in Tab. 5 zusammengefasst

Für das Wachstum von *Arabidopsis thaliana* auf Agarplatten wurde 1/10 Hoagland-Medium ohne Mikroelemente oder ½ MS-Medium („MS mixture“ mit Gamborg’s Vitaminen, Sigma) verwendet. Dazu wurde 1 bzw. 2 % Saccharose und 0,5 g/l MES zugegeben. Der pH-Wert wurde auf 5,7 eingestellt. Dem Medium wurde 0,7 % Agar (TypA, Sigma) zugegeben. Das Wachstum von *Arabidopsis* in Flüssigkulturen erfolgte in ½ MS-Medium. Dem Medium wurde 1 % Saccharose und 0,5 g/l MES zugegeben und der pH auf 5,7 eingestellt.

Tab. 5 Zusammensetzung des Hoagland-Mediums

	Name	Konzentration
Makroelemente	Ca(NO ₃) ₂	0,28 mM
	NH ₂ PO ₄	0,1 mM
	MgNO ₄	0,2 mM
	KNO ₃	0,6 mM
	Fe-HBED	5 µM
Mikroelemente	CuSO ₄	0,03 µM
	ZnSO ₄	0,08 µM
	MnCl ₂	0,5 µM
	H ₃ BO ₃	4,6 µM
	MoO ₃	0,01 µM

2.5.2 Samensterilisation

Die Oberflächensterilisation der Samen erfolgte für die Pflanzenanzucht in hydroponischen Kulturen, für Flüssigkulturen und für das Wachstum von *Arabidopsis* auf Agarplatten. Dazu wurden die Samen zwei Minuten in 70-prozentigen Ethanol und zehn Minuten in Bleichlauge (12 % NaHCl, 0,2 % Tween 20) sterilisiert und anschließend mehrmals mit sterilem Wasser gewaschen.

2.5.3 Vernalisation

Die Kältebehandlung von *Arabidopsis*-Samen zur Entwicklungsbeschleunigung erfolgte für zwei Tage bei 4°C im Dunkeln.

2.5.4 Kultivierung von Pflanzen auf Erde

Für die Vermehrung von *Arabidopsis thaliana* wurden Samen auf ein Vermikulit-Erde-Gemisch (1:2) ausgesät und unter Kurztagsbedingungen (8 Stunden Tag, 16 Stunden Nacht, 22°C) für drei bis vier Wochen angezogen. Für eine gute Samenentwicklung wurden die Pflänzchen einzeln in kleine Töpfe pikiert und unter Langtagsbedingungen (16 Stunden Tag, 8 Stunden Nacht, 22°C) bis zur Abreifung gehalten.

Für die Untersuchung des Wachstums der *cad1*-Mutanten, *cad1-3* (Howden *et al.*, 1995a) und *cad1-6* (Tennstedt *et al.*, 2006), auf schwermetallkontaminierten Erdproben aus Langelsheim (N 51°56.569', E 10°20.955') wurde diese Erde mit einem 1:4-Erde-Sand-Gemisch vermischt. Keimlinge wurden zunächst auf einem 1:4-Erde-Sand-Gemisch herangezogen und nach zwei Wochen auf die schwermetallkontaminierte Erde umgesetzt. Das Wachstum der Pflanzen erfolgte zunächst unter Kurztagsbedingungen und nach fünf Wochen unter Langtagsbedingungen bis zur Blütenbildung.

2.5.5 Hydroponische Pflanzenkulturen

Pflanzen für hydroponische Kulturen wurden in kleinen Spitzenkästen zunächst für zwei bis drei Wochen angezogen, bevor sie auf größere Töpfe umgesetzt wurden. Dazu wurden die Samen oberflächensterilisiert und auf PCR-Tubes, die mit Agarose gefüllt waren, verteilt. Die Enden der PCR-Tubes wurden abgeschnitten und in die Spitzenkästen verteilt. Die Kästen wurden mit 1/10 Hoagland-Medium gefüllt. Nachdem eine Wurzellänge von ca. 0,5 cm Länge erreicht war (ca. drei Wochen), wurden jeweils drei Pflanzen in einen 1,5-Liter-Topf überführt. Das Wachstum der Pflanzen erfolgte unter Kurztagsbedingungen bei 22°C in einem Kulturschrank (Percival, CLF Plant Climatics, Emersacker). Das Nährmedium wurde nach jeweils einer Woche ständig erneuert. Für Untersuchungen der Metallaufnahme und der PC-Akkumulation wurde den Pflanzen nach fünf Wochen 0,5 µM Cd²⁺ oder 20 µM Zn²⁺ als Chloridsalze zugesetzt und für weitere fünf Tage inkubiert. Den Kontrollen wurden keine zusätzlichen Metalle zugeführt.

2.5.6 Arabidopsis-Flüssigkulturen

Sterilisierte Samen wurden in einen Kolben mit ½ MS-Medium überführt und bei kontinuierlichem Schütteln unter Dauerlicht inkubiert. Nach vierzehn Tagen Wachstum wurden die Keimlinge für weitere Experimente bei -80°C eingefroren.

2.5.7 Wachstum von Arabidopsis auf Agarplatten

Die Metallsensitivität von Keimlingen wurde auf Agarplatten untersucht. Dem Medium wurden entweder 2 µM Cd²⁺ oder 50 µM Zn²⁺ (Hoagland-Medium) bzw.

20 μM Cd^{2+} oder 170 μM Zn^{2+} (MS-Medium) als Chloridsalze zugegeben. Den Kontrollen wurden keine zusätzlichen Metalle zugesetzt. Die oberflächensterilisierten Samen wurden ausgelegt und die Platten mit einem Tape (MicroporeTM Medizinische Pflaster, 3M Health Care Neuss) verschlossen. Die Entwicklung der Pflanzen erfolgte unter Langtagsbedingungen bei 22°C für zwölf Tage.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Oligonukleotide

Tab. 6 Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
pYX132-3b	5'-ccttattcagttagctagctg-3'	3' Mutagenese Vektorprimer
pYX132-5	5'-ttagtgaactgcaacatttac-3'	5' Mutagenese Vektorprimer
PCS1 A67S-3'	5'-cgatagaaagagaattcaaca-3'	3' Mutageneseprimer A67S
PCS1 A67S-5'b	5'-gtgttgaatagctttctatcg-3'	5' Mutageneseprimer A67S
PCS1 D89E-3'	5'-gttcgcagcattccaacattg-3'	3' Mutageneseprimer D89E
PCS1 D89E-5'	5'-caatgttgaatgctgcgaac-3'	5' Mutageneseprimer D89E
PCS1 C113S-3'	5'-tgctcctgaagaatgagccaa-3'	3' Mutageneseprimer C113S
PCS1 C113S-5'	5'-ttgctcattcttcaggagca-3'	5' Mutageneseprimer C113S
PCS1 V308L-3'	5'-cttcctcagaagcaattgctt-3'	3' Mutageneseprimer V308L
PCS1 V308L-5'	5'-aagcaattgcttctgaaggaa-3'	5' Mutageneseprimer V308L
PCS1 C342S-3'	5'-gatttcattctcctcacaataa-3'	3' Mutageneseprimer C342S
PCS1 C342S-5'	5'-aaggcttattgtgacggagat-3'	5' Mutageneseprimer C342S
EF1 α -fw	5'-caacctgactggtacaagg-3'	Real-Time-PCR
EF1 α -rev	5'-agaacgcctgtcaatcttgg-3'	Real-Time-PCR
NAS2-fw	5'-tattaaacgctaaggagggg-3'	Real-Time-PCR
NAS2-rev	5'-aattcttccataccacga	Real-Time-PCR
ZIP9-fw	5'-cgcttgagatcacatagcc-3'	Real-Time-PCR
ZIP9-rev	5'-cagcgataaatccacaagc-3'	Real-Time-PCR

2.6.2 Molekularbiologische Standardmethoden

Die Isolierung von Plasmid-DNA, die Extraktion von DNA aus Agarosegelen, und die Reinigung von PCR-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der QIAquick® Kits (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers. Die Methoden der Agarosegelelektrophorese, der Transformation von kompetenten Bakterien, die Restriktionsspaltung, die Dephosphorylierung und die Ligation erfolgten nach den Standardprotokollen nach Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989).

2.6.3 Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen

Von einer Einzelkolonie wurde eine Übernachtskultur unter Verwendung von YPD-Medium angeimpft. Von dieser Kultur wurde 1 ml in 100 ml YPD-Medium überimpft und bei 30°C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht war. Die Zellen wurden bei 3000 rpm (Eppendorf 5804 R, Rotor F34-6-38) für fünf Minuten abzentrifugiert und in 10 ml Lösung A (10 mM BICIN, pH 8,35, 1 M Sorbitol, 3 % Ethylenglykol) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 3000 rpm (Eppendorf 5804 R, Rotor F34-6-38) für fünf Minuten wurden die Zellpellets in 1ml Lösung A resuspendiert und in 100 µl Aliquots auf 1,5 ml Eppendorf-Gefäße verteilt. Die Zellen wurden bei -80°C aufbewahrt. Zu den gefrorenen kompetenten Hefe-Zellen wurde 1 µg Plasmid-DNA und 5 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml) gegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 5 Minuten bei mehrmaligem Durchmischen der Lösung. Nach Zugabe von 1 ml Lösung B (200 mM BICIN, 1 M Sorbitol, 3 % Ethylenglykol, pH 8,35) und vorsichtigem Durchmischen der Suspension erfolgte eine Inkubation bei 30°C für 60 Minuten. Die Zellen wurden anschließend fünf Minuten bei 3000 rpm abzentrifugiert und das Pellet zweimal in Lösung C (10 mM BICIN, pH 8,35, 150 mM NaCl) gewaschen. Nach der Resuspension des Pellets in 100 µl Lösung C erfolgte das Ausplattieren auf YNB-Platten ohne Markeramino-säure(n). Das Wachstum der transformierten Hefe-Zellen erfolgte für zwei bis drei Tage bei 30°C. Alle verwendeten Lösungen wurden autoklaviert oder sterilfiltriert.

Für eine verbesserte Hefe-Transformationsrate wurde das Protokoll der Liciumacetat-Methode angewandt. Aus einer Einzelkolonie wurde eine Übernachtskultur in 5 ml YPD-Medium angeimpft und bei 30°C inkubiert. Eine Vorkultur von 50 ml wurde am nächsten Tag durch Verdünnen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 in YPD-Medium hergestellt und diese bei 30°C inkubiert. Nachdem eine OD₆₀₀ von mindestens 0,4 erreicht war,

erfolgte die Ernte der Zellen durch Zentrifugation von fünf Minuten bei 3000 rpm (Eppendorf 5804 R, Rotor F34-6-38). Das Pellet wurde in 25 ml sterilem Bidest-Wasser resuspendiert und erneut bei 3000 rpm (Eppendorf 5804 R, Rotor F34-6-38) fünf Minuten zentrifugiert. Nun wurde das Pellet in 1 ml 0,1 M Liciumacetat resuspendiert. Die Suspension wurde in 1,5-ml-Eppendorf-Gefäße überführt und für 15 Sekunden bei 12000 rpm (Eppendorf 5804 R, Rotor F45-30-11) zentrifugiert. Nach der Resuspension der Zellen in 400 µl 0,1 M Liciumacetat wurden 50µl-Aliquots in 1,5-ml-Eppendorfgefäße verteilt. Nach 15 Sekunden Zentrifugation bei 12000 rpm (Eppendorf 5804 R, Rotor F45-30-11) wurde der Überstand entfernt. Zum Pellet wurde in Reihenfolge 240 µl PEG 3300 (50%), 36µl 1 M Liciumacetat, 25 µl Carrier-DNA (2mg/ml Heringssperma), 5 µl Plasmid-DNA und 45 µl Tridest-Wasser zugegeben. Nach dem Vortexen der Suspension für eine Minute erfolgte eine Inkubation bei 30°C für 30 Minuten. Der Hitzeschock bei 42°C dauerte 30 Minuten. Nach 15 Sekunden langem Zentrifugieren bei 7500 rpm (Eppendorf 5804 R, Rotor F45-30-11) wurde der Überstand vorsichtig entfernt. Das Zellpellet wurde in 500 µl Tridest-Wasser resuspendiert und 200 µl auf YNB-Platten ohne entsprechende Markeraminosäuren ausplattiert. Nach 15 Minuten wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und bei 30°C inkubiert.

2.6.4 Transformation von *S. pombe*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter *S. pombe*-Zellen wurde das Protokoll nach Bähler *et al.* (1998) verwendet. Von einer Einzelkolonie erfolgte die Herstellung einer neuen Kultur in YE-Medium über Nacht bei 30°C. Durch Überimpfen wurden mindestens 50 ml (pro Transformation) einer neuen Kultur hergestellt. Die Zellen wuchsen bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht war. Diese wurden bei 3000 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert und in sterilem Tridest-Wasser resuspendiert, zentrifugiert und nochmals mit Tridest-Wasser gewaschen. Nach einer Zentrifugation für fünf Minuten bei 3000 rpm (Eppendorf 5804 R, Rotor F34-6-38) wurden die Zellen in Puffer A (0,1 M Liciumacetat, 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7,5) resuspendiert. Nach einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 3000 rpm (Eppendorf 5804 R, Rotor F34-6-38) wurden die Zellen in Liciumacetat/Tris-EDTA-Puffer auf eine Zelldichte von 1×10^9 Zellen/ml verdünnt. Zu jedem Transformationsansatz von 100 µl wurden 10 µl Carrier-DNA (2 mg/ml Heringssperma) und 5 µg Plasmid-DNA zugegeben. Nach zehn Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde 260 µl Puffer B (40% PEG,

0,1 M Liciumacetat, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) zugegeben und die Suspension vorsichtig gemischt. Es erfolgte nun eine Inkubation von 30 bis 60 Minuten bei 30°C. Nach Zugabe von 43 µl DMSO und Durchmischen der Suspension folgte ein fünfminütiger Hitzeschock bei 42°C. Nach 15 Sekunden Zentrifugation wurden die Zellen vorsichtig in 1 ml sterilem Tridest-Wasser resuspendiert. Daran schloss sich eine erneute Zentrifugation 15-sekunden-Zentrifugation bei maximaler Umdrehung an. Die Zellen wurden vorsichtig in 0,5 ml sterilem Tridest-Wasser resuspendiert. Danach wurden 200 µl der Zellen auf EMM-Platten ohne die entsprechenden Marker-Aminosäuren ausplattiert. Die Platten wurden nach zehn Minuten unter der Impfbank mit Parafilm verschlossen und bei 30°C inkubiert.

2.6.5 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA erfolgte nach der Trizol-Methode der Firma Invitrogen. Eingefrorenes Pflanzenmaterial (0,1 bis 1,0 g) wurde in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff zerrieben. Zum pulverisierten Material wurde 1 ml Trizol-Reagenz zugegeben und eine Minute lang gut durchgemischt. Das Homogenat wurde mindestens fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach dem Vortexen der Suspension wurden 0,2 ml Chloroform zugegeben. Nach sofortigem Durchmischen erfolgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Durch 15 Minuten-Zentrifugation bei 13200 rpm (Eppendorf 5804 R, Rotor F45-30-11) und 4°C wird die organische und wässrige Phase separiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit 500 µl Isopropanol gemischt. Die RNA wurde innerhalb von zehn Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Nach einer Zentrifugation für 10 Minuten bei 13200 rpm (Eppendorf 5804 R, Rotor F45-30-11) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 1 ml 75-prozentigen Ethanol gewaschen. Nach weiterer Zentrifugierung von fünf Minuten bei 10000 rpm (Eppendorf 5804 R, Rotor F45-3011) wurde das Pellet zehn Minuten lang an der Luft getrocknet und mit Tridest-Wasser fünf Minuten lang bei 60°C gelöst. Die RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

2.6.6 RT-PCR

Für RT-PCR-Reaktionen wurde der „RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit“ der Firma MBI Fermentas und das „SuperScript II First Strand Synthesis System“ der Firma Invitrogen verwendet. Die Reaktionen wurden nach Angaben des Herstellers

durchgeführt. Die eingesetzte RNA von 1 µg wurde zuvor mit DNase I (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben behandelt. Die RT-PCR wurde am PTC-200-Thermocycler (MJ Research, USA) durchgeführt.

2.6.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA erfolgte am PTC-200-Thermocycler (MJ Research, USA). Für die Identifizierung der Genexpression von Zink-sensitiven Genen in *Arabidopsis thaliana* wurde Taq-Polymerase (MBI Fermentas) verwendet mit folgendem Amplifikationsprotokoll: fünf Minuten 95°C, 25 bis 32 Zyklen 95°C 30 Sekunden – 50 - 60°C 30 Sekunden – 72°C 30 Sekunden, 14°C. Für die zielgerichtete Mutagenese von AtPCS1 (AT5G44070) nach der Megaprimer-Methode (Ke und Madison, 1997; Tyagi *et al.*, 2004) wurde Pfu-Polymerase (MBI Fermentas) verwendet. Es wurde nach folgendem Protokoll verfahren: fünf Minuten 95°C, 40 Zyklen 95°C 30 Sekunden – 50°C 40 Sekunden – 72°C vier Minuten, 72°C sieben Minuten, 14°C. Die zielgerichtete Mutagenese mit dem AccuPrime™ Pfx SuperMix (Invitrogen) wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: fünf Minuten 95°C, 23 Zyklen 95°C 30 Sekunden – 55°C eine Minute – 72°C 7 Minuten, sieben Minuten 72°C, 14°C. Die verwendeten Primer sind in Tab. 6 zusammengefasst.

2.6.8 Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR wurde nach Angaben des Herstellers der Firma Eurogentec, mit dem „qPCR™ Mastermix for SYBR Green I“ durchgeführt. Die eingesetzte cDNA wurde 1:50 verdünnt. Die PCR-Reaktion (5 µl verdünnte cDNA, 25 µl „2x reaction buffer“, 100 nM pro Primer, 8,5 µl Wasser, 1,5 ml „SYBR Green I“, Endvolumen 50 µl) erfolgte mit dem „ABI Prism® 7000 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems, Foster City, USA). Die Amplifikation wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: zwei Minuten 50°C, 95°C zehn Minuten, 40 Zyklen 95°C 15 Sekunden – 60°C 60 Sekunden. Jede Probe wurde in dreifacher Ausführung analysiert. Die Rohdaten wurden mit Hilfe der AbiPrism® 7000 SDS Software (Applied Biosystem, Foster City, USA) analysiert. Die Ermittlung der Ct-Werte erfolgte über die Autofunktion. Der ΔCt-Wert wurde auf der folgenden Basis berechnet: $\Delta Ct = Ct_{\text{Kandidatengen}} - Ct_{\text{konstitutive Kontrolle}}$. Aus diesen Berechnungen wurde

die relative Transkripthäufigkeit $\Delta\Delta Ct$ ermittelt: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Behandlung}} - \Delta Ct_{\text{Kontrolle}}$. Die relative Veränderung der Transkriptmenge ergab sich nach Berechnung von $2^{\Delta\Delta Ct}$.

2.6.9 Herstellung von mutierten *AtPCSI*-Versionen

Die zielgerichtete Mutation von *AtPCSI* (AT5G44070) wurde nach der Megaprimer-PCR-Methode (Ke und Madison, 1997; Tyagi *et al.*, 2004) und der PCR-Amplifikation des kompletten Vektors mit dem AccuPrimeTM Pfx SuperMix der Firma Invitrogen (Sharkey *et al.*, 1994; Cline *et al.*, 1996; Takagi *et al.*, 1997) durchgeführt. Dazu wurden die in Tab. 6 aufgeführten Mutagenese-Primer verwendet und die unter 2.6.7 aufgeführten PCR-Bedingungen angewandt. Die amplifizierten mutierten Versionen von *AtPCSI* in der Megaprimermethode wurden aufgereinigt und in die Restriktionsschnittstelle XhoI/EcoRI des pYX132-Vektors kloniert.

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial

Eingefrorenes Pflanzenmaterial von *Arabidopsis*-Flüssigkulturen wurde mit flüssigem Stickstoff zerrieben und anschließend in einem eiskaltem Proteinextraktionspuffer (100 mM HEPES pH 7,5, 5 % Glycerol, 5 mM EDTA, 0,5 % PVP, 0,1 % Triton X100, 75 mM NaCl, 3 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 μ m Leupeptin) homogenisiert. Das Homogenat wurde 15 Minuten bei 13200 rpm (Eppendorf 5804 R, Rotor F45-30-11) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

2.7.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach dem BCA-Assay (PIERCE Rockford, USA). In einer Mikrotiterplatte wurden 90 μ l BCA Reagenz mit 10 μ l einer Proteinverdünnung 30 min bei 37°C inkubiert. Als Standard wurden verschiedene BSA-Konzentrationen verwendet. Die Vermessung erfolgte bei 562 nm mit einem „Microplate Reader“ (MRX Microplate Reader, Dynatech Deutschland GmbH, Denkendorf).

2.7.3 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in einem 12-prozentigen Polyacrylamidgel (siehe Tab. 7). Die Proteinproben wurden zunächst mit 1/5 Vol. SDS-Probenpuffer (2% SDS, 20 % Glycerin, 200 mM DTT, 100 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,2 % Bromphenolblau) gemischt und fünf Minuten gekocht. Die Trennung erfolgte in einem Elektrophoresepuffer (25 mM Tris-HCl, 200 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) bei 15 mA pro Gel in einer Gelelektrophoresekammer (Mighty Small, Hoefer Scientific Instruments, USA).

Tab. 7 Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamidgelen

Komponente	Trenngel (10 ml)	Sammelgel (2ml)
Tridest-Wasser	3,3 ml	1,4 ml
Rotiphorese [®] Gel 30 (Roth)	4,0 ml	0,33 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	-
1,0 M Tris-HCl pH 6.8	-	0,25 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,02 ml
10 % Ammoniumpersulfat	0,1 ml	0,02 ml
TEMED	0,004 ml	0,002 ml

2.7.4 Westernanalysen

Für die Detektion von Proteinen mit einem spezifischen Antikörper wurden die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nylonmembran (Protean 0,45 µm, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel) transferiert. Der Proteintransfer erfolgte für eine Stunde bei 1 mA/cm² in einer Blottingapparatur (BioTech Fischer, Reiskirchen). Der immunohistochemische Nachweis durch einen Antikörper und die Detektion erfolgten nach Angaben der Hersteller. Für den Nachweis eines HA-Fusionsproteins wurde ein monoklonaler Antikörper der Firma Covance (Münster) und für den Nachweis eines GST-Fusionsproteins ein Antikörper der Firma Amersham Bioscience (Freiburg) verwendet. Als zweiter Antikörper wurden eingesetzt ein Anti-Mouse IgG „Peroxidase Conjugate“ (Sigma), ein Anti-Mouse IgG Alkalische „Phosphatase Conjugate“ (Promega) bzw. ein Anti-Rabbit IgG „Peroxidase Conjugate“ (BIORAD). Die

Detektion der Antikörper wurde mit dem „ECL+Plus Western blotting detection reagents“ der Firma Amersham Bioscience (Freiburg) und einer Entwicklermaschine Protec C2 (Oberstenfeld) durchgeführt. Für die Detektion der Chemolumineszenz wurden die Kodak BioMax MS Röntgenfilme (Sigma, Steinheim) verwendet. Der Nachweis von Proteinen durch die Färbereaktion der alkalischen Phosphatase erfolgte durch Inkubation der Membran in einem Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 6,6 µl/ml NBT-Stammlösung (5 % Nitro-blue-tetrazolium in 70 % Dimethylformamid), 3,3 µl/ml BCIP-Stammlösung (5 % 5-bromo-4-chloro-3-indolyolphosphat in 100 % Dimethylformamid)) für fünf bis 60 Minuten.

2.7.5 Überexpression und Aufreinigung von Proteinen

2.7.5.1 Überexpression in *Escherichia coli*

Für die Überexpression von Proteinen wurde zunächst eine Übernachtskultur aus einer Einzelkolonie hergestellt. Durch Überimpfen wurde eine Hauptkultur hergestellt, die bis zu einer OD von 1,0 bis 1,5 bei 37°C inkubiert wurde. Nach Zugabe von 0,5 mM IPTG erfolgte eine weitere Inkubation für vier bis sechs Stunden bei 37°C. Danach wurden die Zellen bei 7000 rpm (Eppendorf 5804 R, Rotor 45-30-11) und 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden bei -20°C bis zur Weiterverwendung eingefroren.

2.7.5.2 Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins

Für die Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins wurde „Glutathione Sepharose 4B“ (Amersham Bioscience) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers nach der „Batch Purification“-Methode. Das gebundene Fusionsprotein wurde durch Inkubation mit „FactorXa“ (Amersham Bioscience) am Ende der Reinigung abgeschnitten.

2.8 Enzymaktivitätstests

Die PCS-Aktivität wurde in einer 125 µl Reaktionslösung mit folgenden Bestandteilen gemessen: 200 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM DTT, 5 mM GSH und 0,5 mM CdCl₂

oder 0,2 mM ZnCl₂. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µg Protein bei 35°C gestartet. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 12,5 µl 1 % TFA.

2.9 Thioextraktion

2.9.1 Thioextraktion aus Pflanzenproben

Das geerntete Pflanzenmaterial aus hydroponisch wachsenden Pflanzen wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und für 2 Tage gefriergetrocknet. Für die Extraktion wurde 20 bis 30 mg Material verwendet, welches mit 500 µl 0,1 N Salzsäure und ca. 50 mg Zirkonia/ Silica Beads (BioSpec Products, Inc) im Bead Beater (Biospec Products) eine Minute bei maximaler Leistung homogenisiert wurde. Als interner Standard wurde vor dem Aufschluss 5 µl 10 mM PC2-NH₂ (H-γGlu-Cys-γGlu-Cys-Gly-NH₂; entspricht 26,9 ng) zugesetzt. Nach zehnmütigem zentrifugieren bei 13200 rpm (Eppendorf 5804 R, Rotor 45-30-11) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

2.9.2 Thioextraktion aus Hefen

Nach dem Ernten der Hefen wurde dem Pellet 10,0 µl 2 mM *N*-Acetyl-Cystein als interner Standard zugesetzt. Die Proben wurden anschließend für einen Tag gefriergetrocknet. Durch Zugabe von 100 µl/mg Pellet 0,1-prozentiger Trifluoressigsäure wurden die Zellen durch mehrmaliges Vortexen aufgeschlossen. Das Homogenat wurde bei 13200 rpm (Eppendorf 5804 R, Rotor 45-30-11) zentrifugiert und der Überstand für die Derivatisierung verwendet.

2.10 Derivatisierung mit mBrB

2.10.1 Derivatisierung von Pflanzenproben

Für die Derivatisierung wurden zunächst 50 µl des Extraktes mit 18 µl Derivatisierungspuffer (200 mM EPPS pH 9,2, 6,3 mM DTPA) versetzt und mit 6 µl 20 mM TCEP für 30 Minuten bei Raumtemperatur reduziert. Die Derivatisierung startete durch Zugabe von 72 µl Derivatisierungspuffer und 10 µl einer 50 mM mBrB-Lösung bei 45°C im Dunkeln. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion mit 60 µl einer 1M Methansulfonsäure abgestoppt. Durch eine Filtrierung mit einem 0,45 µm PTFE-

Filter wurde die Lösung von Fällungsprodukten gereinigt. Das Endvolumen der derivatisierten Proben betrug 216 μl . Die Endkonzentration des internen Standards (PC2-NH₂) war 23,1 μM .

2.10.2 Derivatisierung von Hefeproben

Die aus der Extraktion erhaltene Probe wurde ohne Reduktion der Thiole direkt mit mBrB derivatisiert. Dazu wurden die 50 μl von der Extraktion in 90 μl Derivatisierungspuffer (200 mM EPPS pH 9,2, 6,3 mM DTPA) und 2,0 μl 20 mM mBrB bei 45°C für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 60 μl einer 1 M Methansulfonsäure abgestoppt. Die Proben wurden dann bei 13200 rpm (Eppendorf 5804 R, F45-30-11) zentrifugiert.

2.11 LC/MS-Analyse

Die Analyse der derivatisierten Pflanzenextrakte wurde mit der Methode der CapLC-ESI-QTOF-Massenspektrometrie (positiver Ionenmodus), aufgenommen am „API QSTAR Pulsar Hybrid Quadrupole TOF Instrument“ (Applied Biosystems, Foster City, USA), durchgeführt. Die Ionen-spray-Spannung war +5.5 kV, der detektierte Massenbereich 910-930 Da, Scanrate: 0.5 s⁻¹, Declustering-Potential 1 50 V. Es wurden 2 μl Extrakt auf eine Phenomenex Luna C8 Säule (Partikelgröße 3 μm , Porengröße 100 Å, Länge 150 mm, Durchmesser 3 mm) injiziert. Die Auftrennung wurde mit folgendem Gradientenprogramm durchgeführt: Lösungsmittel A = H₂O / 0.1 % HCO₂H, Lösungsmittel B = CH₃CN / 0.1 % HCO₂H; 0-5 min 95 % A, 5 % B; fünf bis 40 Minuten linear von 5 % B zu 22 % B; 40 bis 50 Minuten 95 % B; 50 bis 60 Minuten 5 % B. Die Flussrate betrug 5,5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die Messung jeder Probe erfolgte zweimal. Für die Kalibrationssgerade wurden Proben mit konstanter Menge an internen PC2-NH₂-Standard (25 μM) und verschiedenen Konzentrationen an PC2-OH (H- γ Glu-Cys- γ Glu-Cys-Gly-OH; 1 μM bis 75 μM) hergestellt und nach der Derivatisierung mit mBrB (siehe 2.9.1.2) analysiert. Die Kalibrationssgerade wurde durch eine lineare Regression über das Konzentrationsverhältnis [PC2-OH]/[PC2-NH₂] und das Flächenverhältnis der chromatographischen Signale (PC2-OH)/(PC2-NH₂) bestimmt. Der lineare Bereich für die Messung der PC2-OH-Konzentration war bis 75 μM gewährleistet. Das Detektionslimit entsprach 1 μM PC2-OH, die geringste Konzentration der Kalibrationssgerade. Die Injektion von 2 μl einer 1 μM PC2-OH-

Lösung mit 25 µM PC2-NH₂ ergab ein Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) von 3 und entspricht einer absoluten Menge von 2 pmol PC2-OH. Entsprechend dem Protokoll der Extraktion wurde eine Nachweisgrenze von 39 µg PC2-OH/g TG errechnet (Nachweisgrenze = $(1 * 10^{-6} \text{ mol} * \text{l}^{-1} \text{ PC2} * 216 * 10^{-4} \text{ l} * 539,6 \text{ g/mol}) / 0,003 \text{ g}$). Die Standards PC2-NH₂ und PC2-OH wurden am „Abimed Economy Peptide Synthesizer EPS 211“ (Langenfeld) synthetisiert.

2.12 HPLC-Analysen

Der Nachweis von Thiolen aus Extrakten erfolgte durch eine RP-HPLC-Analyse in einem Zweipumpensystem (HPLC Pumpe 422, Goebel, Ludwigshafen). Für die Trennung wurde eine C18-Säule „Nucleosil 100-5“ (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die Auftrennung erfolgte in einem Methanol-Wasser-Laufmittelsystem: Lösung A = 10 % Methanol, 90 % Wasser, 0,25 % Essigsäure, Lösung B = 90 % Methanol, 10 % Wasser, 0,25 % Essigsäure. Folgende Gradientensysteme wurden verwendet: a) für Enzymaktivitätstests: Null bis fünf Minuten 100 % A, fünf bis 33 Minuten 32 % B, 32 bis 40 Minuten 100 % B, 40 bis 45 Minuten 100 % B, 45 bis 50 Minuten 100 % A, 50 bis 55 Minuten 100 % A b) für den Nachweis von PCs in Hefen: Null bis fünf Minuten 100 % A, fünf bis 29 Minuten 26 % B, 29 bis 31 Minuten 28 % B, 31 bis 35 Minuten 33 % B, 35 bis 38 Minuten 44 % B, 38 bis 45 Minuten 100 % B, 45 bis 50 Minuten 100 % B, 50 bis 60 Minuten 100 % A. Die Flussrate war 1,0 ml/min. Die Detektion der derivatisierten Thiole erfolgte durch Messung der Fluoreszenz durch eine Anregungswellenlänge von 380 nm bei 480 nm an einem Fluoreszenzdetektor (FP-920, Jasco, Groß-Umstadt). Für die Identifizierung der Peaks wurden Standards verwendet, die am „Abimed Economy Peptide Synthesizer EPS 211“ (Langenfeld) synthetisiert wurden. Die Kalibrationssgeraden von PC2-NH₂, PC2-OH und *N*-Acetyl-Cystein wurden durch lineare Regression aus der Konzentration des Standards und der Fläche des Signals bestimmt (Anhang B).

2.13 AAS-Analysen

Das geerntete Wurzelmaterial der hydroponischen Pflanzen wurde mit Tridest-Wasser und 10 mM CaCl₂ mehrmals gewaschen. Das Pflanzenmaterial (Wurzeln und Blätter) wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und für zwei Tage gefriergetrocknet (Lyovac GT2, Steris, Hurth). Der Aufschluss von gefriergetrocknetem

Pflanzenmaterial erfolgte in einem Mikrowellensystem (microPREPA/Terminal 320, MLS GmbH Mikrowellen Laborsysteme, Leutkirch im Allgäu). Es wurde 30 mg Material mit 1 ml Tridest-Wasser und 4 ml 65-prozentiger Salpetersäure (Suprapure[®], Merck) aufgeschlossen. Die Analyse der Metallkonzentration erfolgte mit dem Perkin Elmer „AAAnalyst 800“ (Wellesley, USA). Unter Verwendung von Standards wurden Kalibrationssgeraden von verschiedenen Metallkonzentrationen und der erhaltenen Signalfläche bestimmt. Die Kalibration erfolgte über ein Standardprotokoll, welches vor jeder Messung neu durchgeführt wurde.

2.14 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit der Software „R“ (Version 2.2.0, <http://www.r-project.org>).

3 Ergebnisse

3.1 Die Beteiligung der PCS an der Homöostase essenzieller Metalle

Untersuchungen von verschiedenen Organismen bestätigten, dass die PC-Synthese essenziell ist für die Detoxifizierung von Cd- und As-Ionen (Clemens *et al.*, 1999; Ha *et al.*, 1999; Vatamaniuk *et al.*, 1999). So wurden PC-Metall-Komplexe für diese Metalle *in vivo* nachgewiesen (Maitani *et al.*, 1996). Es konnte bewiesen werden, dass die PCS eine Funktion in der Detoxifizierung von nicht-essenziellen Metallen besitzen. Weiterhin wurden auch PC-Cu-Komplexe nachgewiesen. Andere Metalle bildeten aber keine Komplexe mit PC (Maitani *et al.*, 1996). Ebenso nicht erklärt wie die PC-Cu-Komplexe war eine PC-Bildung in Zellkulturen, die in Abwesenheit von erhöhten Schwermetallen nur durch Cu^{2+} und Zn^{2+} aktiviert wurde (Steffens *et al.*, 1986; Grill, 1987; Grill *et al.*, 1988). Eine Beteiligung der PCS an der Metallhomöostase essenzieller Metalle konnte aber nicht bewiesen werden. Ergebnisse von Howden *et al.* (1995a) zeigten später, dass die PC-Defizienz der *Arabidopsis cad1-3*-Mutante keinen Einfluss auf die Zn^{2+} -Sensitivität bei erhöhten Zn^{2+} -Konzentrationen besitzt. Daher wurde vermutet, dass die PC keine Funktion bei der Detoxifizierung essenzieller Metalle haben.

Unabhängig von bisherigen Erkenntnissen deuteten Untersuchungen in *S. cerevisiae* und *S. pombe* aber auf eine mögliche Beteiligung der PCS an der Sequestrierung erhöhter Zn^{2+} -Konzentrationen (Tennstedt *et al.*, 2006). Die *S. pombe* Δpcs -Mutante ist PC-defizient und Cd^{2+} -hypersensitiv. Unter erhöhten Zn^{2+} -Konzentrationen konnte keine verringerte Toleranz beobachtet werden, obwohl die Zn^{2+} -Konzentration in WT-Zellen die PC-Synthese aktiviert (Clemens *et al.*, 1999). Wenn das PCS-Gen in der *S. pombe* *zhf*-Mutante, welche Zn^{2+} -sensitiver als WT-Zellen ist (Clemens *et al.*, 2002a), inaktiviert wird, konnte ein signifikanter Verlust in der Zn^{2+} -Toleranz im Vergleich zu *zhf*-Zellen beobachtet werden. Dieser Phänotyp war verbunden mit dem Verlust der PC-Synthese. In Anwesenheit von 50 μM Zn^{2+} war das Wachstum von *zhf*-Zellen unbeeinflusst, während das Wachstum von *zhf pcs*-Zellen zu ca. 50 % reduziert war. Weiterhin bewirkte die Expression von *TaPCS* in der Zn^{2+} -sensitiven *S. cerevisiae* *zrc1 cot1*-Mutante (MacDiarmid *et al.*, 2000) eine erhöhte Zn^{2+} -Toleranz (Tennstedt *et al.*, 2006). Aufgrund dieser Beobachtungen in Hefen, die auf eine Beteiligung der PCS an der Sequestrierung erhöhter Zn^{2+} -Konzentrationen hindeuten, sollte die bekannte *cad1-3*-Mutante in ihrer Zn^{2+} -Sensitivität erneut untersucht werden.

3.1.1 Zn²⁺-Sensitivität der PC-defizienten *cad1-3*-Mutante

Für die Untersuchung der Zn²⁺-Sensitivität wurde ein Medium (1/10 Hoagland) mit geringem Kationengehalt verwendet, welcher in vielen anderen Pflanzenmedien (z. B. MS-Medium) meist sehr hoch ist. Zusätzlich wurde ein Agar mit geringer Kationenaustauschkapazität verwendet. Die Zn²⁺-Toleranz konnte daher mit sehr niedrigen Zn²⁺-Konzentrationen untersucht werden, weil sowohl der Einfluss anderer Kationen als auch die Zn²⁺-Bindungskapazität des Agar gering waren. Samen von *Arabidopsis thaliana* keimten dazu auf vertikalen Agarplatten mit modifiziertem 1/10 Hoagland-Medium. Unter diesen experimentellen Bedingungen konnte eine erhöhte Zn²⁺-Sensitivität der *cad1-3*-Mutante beobachtet werden (Abb. 7). Die erhöhte Zn²⁺-Sensitivität war vergleichbar mit dem bekannten Cd²⁺-Phänotyp der Mutante. Dies konnte sowohl in der Wurzellänge, als auch im Keimlingsgewicht gezeigt werden. In 10 unabhängigen Experimenten wurden mehr als 200 Pflanzen auf Kontrollmedium und auf Medium mit 2 µM Cd²⁺ oder 50 µM Zn²⁺ analysiert. Für Cd²⁺ und Zn²⁺ wurden Konzentrationen gewählt, die nahe dem IC₅₀-Wert für WT Col-0 lagen. Die gemessene durchschnittliche Wurzellängen-Inhibierung für WT Col-0 war 57,6 % für 2 µM Cd²⁺ und 43,2 % für 50 µM Zn²⁺. Die dazugehörige Inhibierung des Keimlingsgewichtes betrug 59,5 % bzw. 42,4%. Für die *cad1-3*-Mutante wurde eine Wurzellängen-Inhibierung von 87,0 % für 2 µM Cd²⁺ und 66,2 % für 50 µM Zn²⁺ gemessen. Die dazugehörige Inhibierung des Keimlingsgewichtes war 91,0 % bzw. 77,0 %. Unter Kontrollbedingungen konnte kein Unterschied im Wachstum der *cad1-3*-Mutante zu WT Col-0 festgestellt werden. Die Cu²⁺-Sensitivität war nicht signifikant verschieden zwischen WT Col-0- und *cad1-3*-Keimlingen, wie bereits durch Ha *et al.* (1999) gezeigt. Für eine unabhängige Bestätigung dieses Zn²⁺-Phänotyps der *cad1-3*-Mutante wurde eine neue *Arabidopsis cad1*-Mutante isoliert.

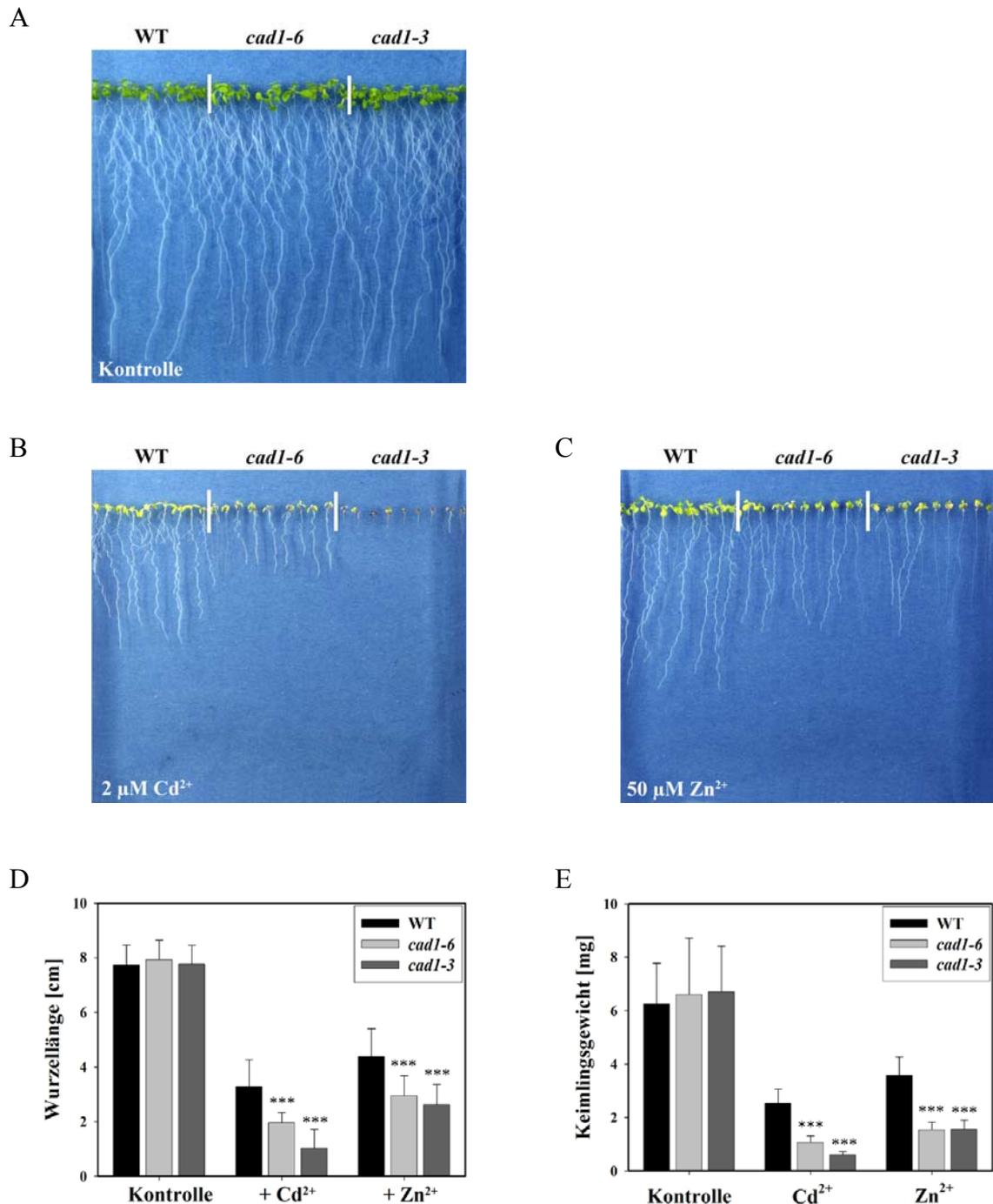


Abb. 7 Metallsensitivität von *Arabidopsis*-Keimlingen. Samen von *Arabidopsis* keimten auf vertikalen Agar-Platten mit 1/10 Hoagland-Medium ohne Zugabe von Schwermetallen, mit 2 μM Cd^{2+} oder 50 μM Zn^{2+} für 12 Tage (A - C). WT Col-0 (links), *cad1-6* (Mitte), *cad1-3* (rechts). Die Wurzellänge und das Keimlingsgewicht wurden bestimmt (D, E). *Arabidopsis* WT Col-0 (schwarze Balken), *cad1-6* (hellgraue Balken) und *cad1-3* (dunkelgraue Balken). Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (Stabwn.) dar. „Sternchen“ zeigen die Signifikanz der ANOVA aus dem Vergleich WT Col-0 mit *cad1*-Mutanten. (Anzahl der unabhängigen Experimente $n = 10$). Signifikanzlevel der ANOVA: nicht signifikant, „“ $> 0,05$; „*“ $< 0,05$; „**“ $< 0,01$; „***“ $< 0,001$.

3.1.2 Isolierung und Charakterisierung der *cad1-6*-Mutante

Für eine unabhängige Bestätigung des *cad1-3*-Phänotyps wurde eine T-DNA-Insertionslinie für *AtPCSI* von der Garlic- (SAIL) Kollektion (Sessions *et al.*, 2002) angefordert und eine homozygote Pflanze für diese Insertion isoliert (Tennstedt *et al.*, 2006; Abb. 8). Die Insertion zerstört Exon 8 von *AtPCSI*. Das Allel wurde als *cad1-6* bezeichnet, weil 5 Allele des *cad1*-Gens bereits beschrieben wurden (Howden *et al.*, 1995). Der Effekt der Insertion wurde zunächst in einer Mutantenversion von *AtPCSI* in Hefe untersucht.

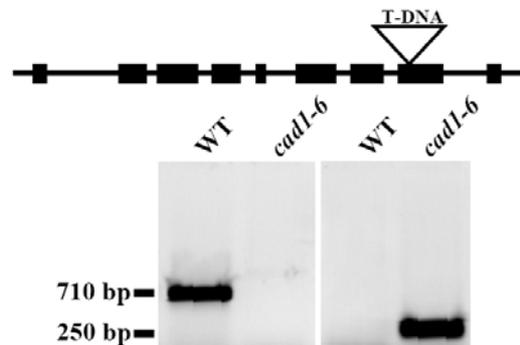


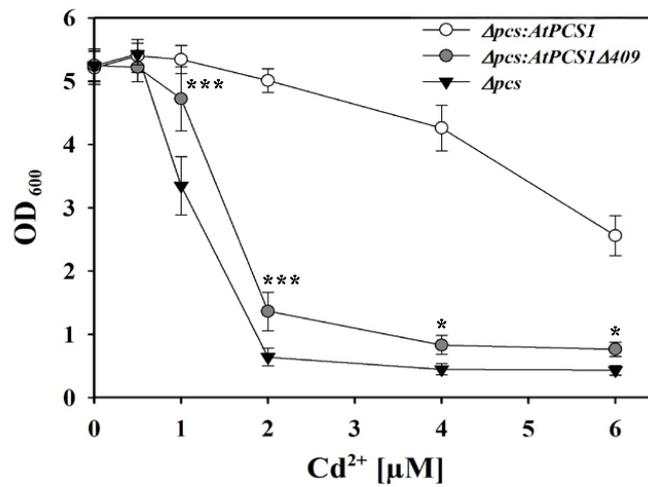
Abb. 8 Isolierung von *cad1-6*, einer homozygoten T-DNA-Insertionslinie. Das WT *AtPCSI*-Fragment von 710 Basenpaar (Bp) ist nicht in *cad1-6* nachweisbar. Stattdessen wurde mit einem Gen-spezifischen Primer und einem T-DNA-spezifischen Primer ein 250 Bp großes Fragment amplifiziert. Sequenzierung bestätigte die T-DNA Insertion in Exon 8 nach Bp 1229 der codierenden Sequenz (Tennstedt *et al.*, 2006).

3.1.3 *AtPCSI* Δ 409, eine mutierte *AtPCSI*-Version von *cad1-6*

Das *AtPCSI*-Gen wurde nach Aminosäure 409 verkürzt und als *AtPCSI* Δ 409 bezeichnet. Die Verkürzung nach Aminosäure 409 soll dem verkürzten Protein entsprechen, das nach Expression des *cad1*-Gens mit der T-DNA-Insertion in der *Arabidopsis cad1-6*-Mutante entsteht. Die T-DNA-Insertion ist in Exon 8 nach dem Basenpaar 1229. Diese verkürzte Version von *AtPCSI* wurde in der *S. pombe* Δpcs -Mutante (Clemens *et al.*, 1999) exprimiert (Tennstedt *et al.*, 2006). In Analysen zum Wachstum der Mutante wurde der Einfluss von Cd^{2+} untersucht. Die Ergebnisse deuteten eine Restaktivität von *AtPCSI* Δ 409 an (Abb. 9). Bei Konzentrationen von 1 μM und 2 μM Cd^{2+} in Flüssigkulturen wurde das Wachstum von Δpcs -Hefezellen, die leeren Vektor (Δpcs) tragen, zu 35,3 % bzw. zu 87,8 % inhibiert (Abb. 9A). In Δpcs -Hefezellen, die *AtPCSI* Δ 409 ($\Delta pcs:AtPCSI$ Δ 409) exprimieren, wurde das Wachstum zu 10,2 % bzw. 74,1 % inhibiert. Das Wachstum von Δpcs -Hefezellen, die

AtPCSI ($\Delta pcs:AtPCSI$) exprimieren, wurde nicht beeinflusst. Unterschiede im Wachstum von $\Delta pcs:AtPCSI\Delta 409$ zu Δpcs -Zellen wurde auch durch den Vergleich des Wachstums auf Agarplatten mit 30 $\mu\text{M Cd}^{2+}$ im Medium festgestellt (Abb. 9B). Diese mögliche Restaktivität von *AtPCSI* $\Delta 409$ wurde durch eine geringere PC-Bildung in $\Delta pcs:AtPCSI\Delta 409$ -Hefezellen nachgewiesen (Abb. 10). *S. pombe*-Hefezellen wuchsen ohne Schwermetallzugabe bzw. mit 150 $\mu\text{M Cd}^{2+}$ im Medium für 22 Stunden. Entsprechend der erhöhten OD (0,6) für die Cd^{2+} -Behandlung der Hefen musste dem Medium mehr Cd zugegeben werden als den Flüssigkulturen (OD 0,05) zur Untersuchung des Wachstums. Die Thiole der Hefe-Extrakte wurden mit mBrB derivatisiert und über eine RP-HPLC analysiert. Die Quantifizierung von PC2 und PC3 erfolgte über Standards (Abb. 30 im Anhang B). Als interner Standard wurde *N*-Acetyl-Cystein eingesetzt (siehe 2.9.2). Die Untersuchungen zeigten eine starke Reduktion von 76,2 % im PC3-Gehalt der $\Delta pcs:AtPCSI\Delta 409$ -Hefezellen im Vergleich zu $\Delta pcs:AtPCSI$ -Hefezellen unter diesen experimentellen Bedingungen. In Δpcs -Hefezellen konnte nach Cd^{2+} -Behandlung keine PC-Bildung nachgewiesen werden.

A



B

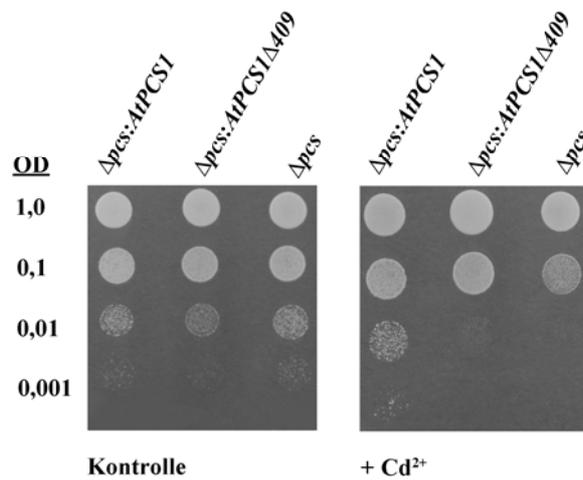


Abb. 9 Cd²⁺-Sensitivität von *S. pombe* Δpcs -Zellen mit *AtPCS1* $\Delta 409$. Wachstum von *Δ pcs:AtPCS1* (weiße Kreise), *Δ pcs:AtPCS1* $\Delta 409$ (dunkelgraue Kreise) und ΔPCS mit leerem Vektor (schwarze Dreiecke) bei verschiedenen Cd²⁺-Konzentrationen in Flüssigmedium (A; n = 4) und auf Agarplatten ohne bzw. mit 30 μM Cd²⁺ (B). Links dargestellt ist die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) der verschiedenen Zellverdünnungen, die für die Animpfung verwendet wurde (n = 3). Fehlerbalken stellen die Stabwn. dar. Signifikanzlevel der ANOVA aus dem Vergleich *Δ pcs:AtPCS1* $\Delta 409$ mit *Δ pcs* (Abb. 9A): nicht signifikant „“ > 0,05; „*“ < 0,05; „**“ < 0,01; „***“ < 0,001.

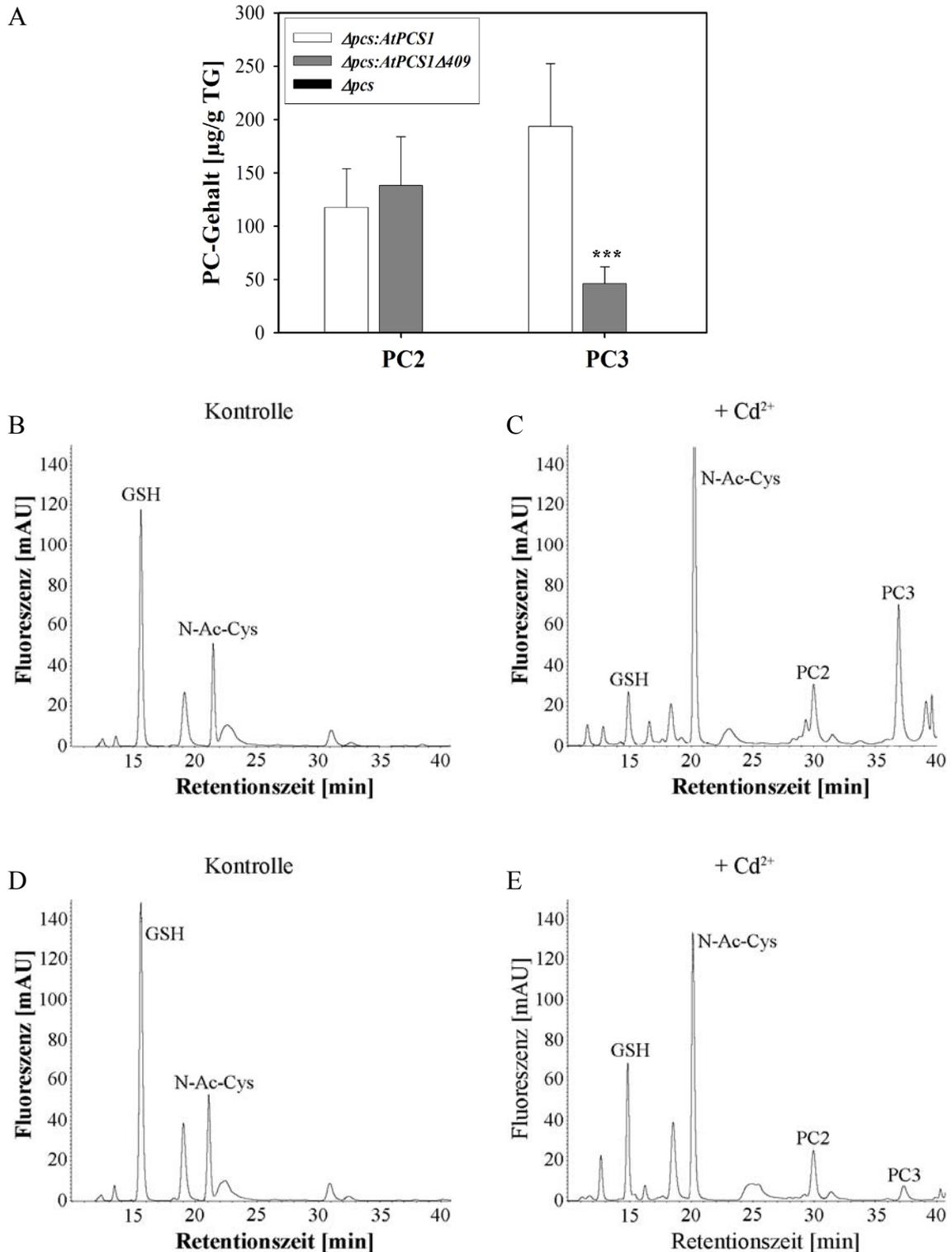


Abb. 10 Nachweis der PC-Bildung *in vivo* nach Cd²⁺-Stress in *Δpcs*-Hefen. **A**: Quantifizierung des PC-Gehalts von *Δpcs:AtPCS1* (weiße Balken), *ΔPCS:AtPCS1Δ409* (dunkelgraue Balken) und der *Δpcs*-Mutante (nicht sichtbar). Die Thiole der Hefeextrakte wurden mit mBrB derivatisiert, über eine RP-HPLC aufgetrennt und bei 480 nm detektiert. Fehlerbalken stellen die Stabwn dar. Signifikanzlevel der ANOVA aus dem Vergleich *Δpcs:AtPCS1Δ409* mit *Δpcs:AtPCS1*: nicht signifikant „^{ns}“ > 0,05; „^{*}“ < 0,05; „^{**}“ < 0,01; „^{***}“ < 0,001. (n = 4). Thiolchromatogramme der Extrakte von *Δpcs:AtPCS1*- (**B** + **C**) und *ΔPCS:AtPCS1Δ409*-Hefen (**D** + **E**), die ohne Schwermetallzugabe bzw. mit 150 µM Cd²⁺ im Medium wuchsen.

3.1.4 Metallsensitivität von *cad1-6*

Nach der Isolation einer homozygoten *cad1-6*-Mutante und der Charakterisierung der *AtPCS1Δ409*-Hefemutante die der T-DNA-Insertion von *cad1-6* entspricht, wurde die Metallsensitivität von *cad1-6*-Keimlingen getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zn^{2+} -Hypersensitivität nicht von der *cad1-3*-Mutante zu unterscheiden war. Die Cd^{2+} -Hypersensitivität von *cad1-6* war aber etwas weniger stark ausgeprägt (Abb. 7). Die durchschnittliche Inhibierung der Wurzellänge betrug 75,4 % bei 2 μM Cd^{2+} und 62,9 % bei 50 μM Zn^{2+} . Die Inhibierung des Keimlingsgewichtes lag bei 83,9 % und 77,0 %. Wie bei der *cad1-3*-Mutante konnte keine erhöhte Cu^{2+} -Sensitivität von *cad1-6*-Keimlingen beobachtet werden. Die *cad1-6*-Mutante bestätigte den Zn^{2+} -Phänotyp der *cad1-3*-Mutante. Dies steht im Widerspruch zu den experimentellen Daten von Howden *et al.* (1995a) in denen kein signifikanter Unterschied in der Zn^{2+} -Toleranz der *cad1-3*-Mutante zu WT Col-0-Pflanzen festgestellt wurde.

3.1.5 Metallsensitivität der *cad1*-Mutanten auf MS-Medium

Die Experimente wurden deshalb unter ähnlichen experimentellen Bedingungen von Howden *et al.* (1995a) wiederholt. Dem $\frac{1}{2}$ MS-Medium wurde aufgrund sehr viel höherer Kationenkonzentrationen (z. B. Ca^{2+} , Fe^{2+}) eine ca. 3fach höhere Zn^{2+} -Konzentration zugesetzt, um die gleichen Effekte in der Wurzelinhibierung des 1/10 Hoagland-Mediums zu erreichen. In den Analysen zeigte sich ein weniger deutlicher, aber dennoch signifikanter Unterschied in der Sensitivität der *cad1*-Mutanten zu WT Col-0 (Abb. 11). Die Reduktion des Wachstums von *cad1-3* in der Wurzellänge betrug 21,5 % bei 170 μM Zn^{2+} . Die Reduktion des Keimlingsgewichtes war 40,6 %. Für die *cad1-6*-Mutante wurde eine ähnliche Inhibierung des Wachstums beobachtet. Die Reduktion des Wachstums in der Wurzellänge betrug 31,0 % und des Keimlingsgewichtes 46,6 %.

Diese erhöhte Metallsensitivität der *cad1*-Mutanten lässt vermuten, dass die PCS an der Detoxifizierung erhöhter Zn^{2+} -Konzentrationen beteiligt sind. Daher musste nachgewiesen werden, dass die PC-Bildung in WT Col-0-Pflanzen nach Zn^{2+} -Behandlung aktiviert wird. Für die *cad1-6*-Mutante musste weiterhin bestätigt werden, dass sie PC-defizient ist.

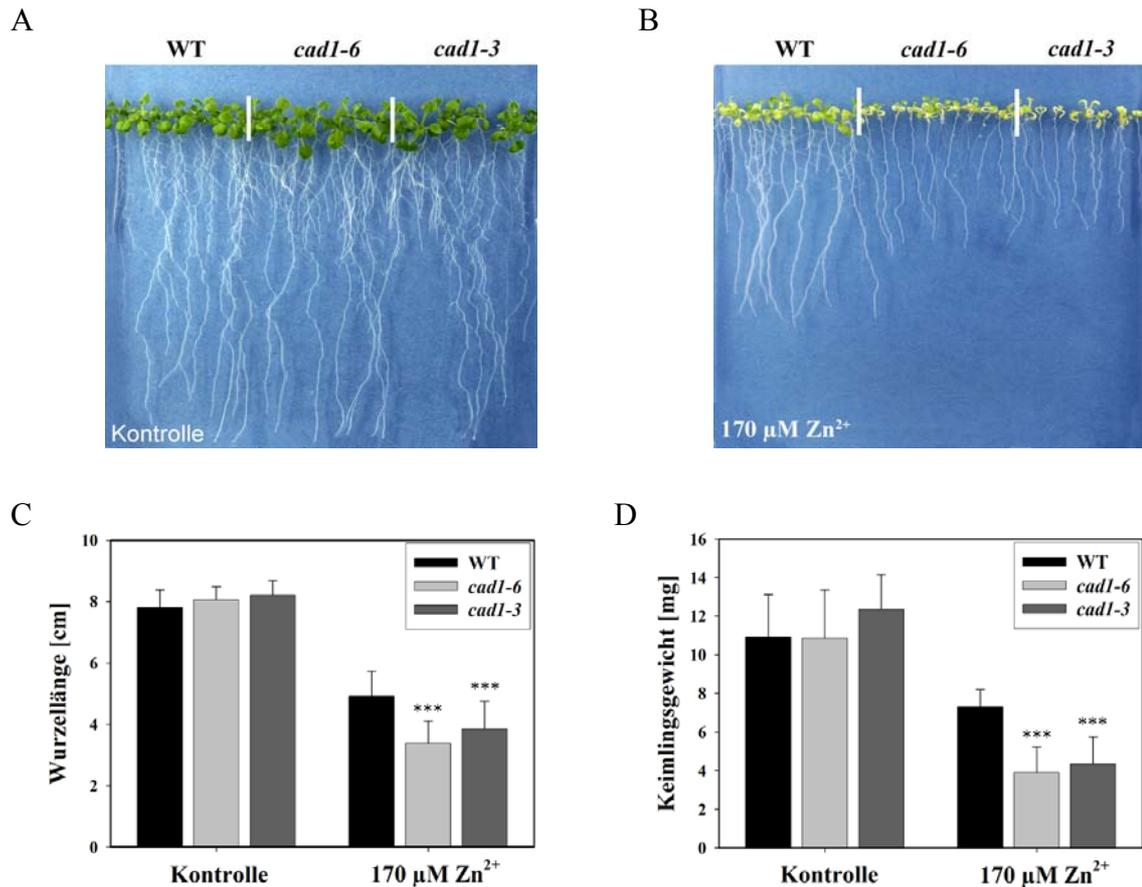


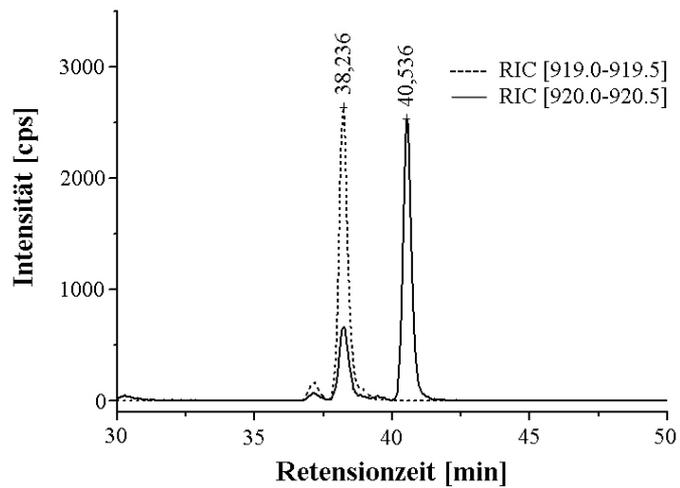
Abb. 11 Erhöhte Zn²⁺-Sensitivität der *cad1*-Mutanten auf MS-Medium. Pflanzen von WT Col-0 (schwarze Balken), *cad1-6* (hellgraue Balken) und *cad1-3* (dunkelgraue Balken) keimten auf ½ MS-Medium ohne Zugabe von Zn²⁺ (A) bzw. mit 170 μM Zn²⁺ (B) auf vertikalen Agarplatten. Nach zwölf Tagen wurden die Wurzellänge (C) und das Keimlingsgewicht (D) bestimmt. Fehlerbalken stellen die Stabw. dar. Signifikanzlevel der ANOVA aus dem Vergleich der *cad1*-Mutanten mit WT Col-0: nicht signifikant „“ > 0,05; „*“ < 0,05; „**“ < 0,01; „***“ < 0,001. (n = 4).

3.1.6 Quantifizierung der PC-Bildung *in vivo*

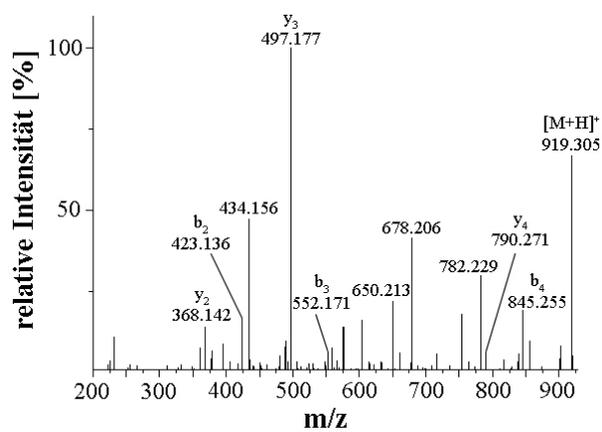
Die Analyse der PC-Bildung erfolgte in bisherigen Untersuchungen vor allem in metallbehandelten pflanzlichen Zellkulturen. Die Quantifizierung von PC in Pflanzen wurde nur in wenigen Berichten gezeigt. Verwendet wurde dazu vorwiegend Cd²⁺, als der stärkste Aktivator der PC-Synthese. Der Grund dafür ist eine deutlich geringere PC-Akkumulation in pflanzlichen Geweben als in Zellkulturen. Um eine Quantifizierung der PC-Bildung auch unter sehr geringen Konzentrationen zu gewährleisten wurde ein neuer PC2-Assay etabliert. Dazu wurden Extrakte eines PC2-OH Standards über eine Kapillar-Flüssigchromatographie (CapLC) aufgetrennt und durch Kopplung mit einer Elektrospray-Ionisation „Quadrupol-Time Of Flight“-Massenspektrometrie (ESI-QTOF-MS) detektiert. Als interner Standard wurde ein synthetisiertes PC2-NH₂-

Derivat verwendet. Für eine verbesserte Detektion und einer chromatographischen Separierbarkeit wurden die Standardproben vor der chromatographischen Auftrennung mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Monobrombiman, mBrB) markiert. Die beiden derivatisierten Verbindungen hatten eine theoretische Masse von 920,2913 Da (PC2-OH-Biman₂) und 919,3073 Da (PC2-NH₂-Biman₂) und wurden bis zur Basislinie aufgetrennt mit Retentionszeiten von 38,1 min (PC2-NH₂-Biman₂) und 40,5 min (PC2-OH-Biman₂) (Abb. 12A). Der Massenunterschied zwischen dem nachzuweisenden PC2-OH und dem internen Standard PC2-NH₂ ist ca. 1 Da. Aufgrund ihrer exakten Masse und der beobachteten Fragmentierungsprodukte im ESI(+)-CID-Massenspektrum („Electrospray Ionisation-Collision Induced Dissociation“) konnten die PC2-Biman₂-Derivate von PC2-NH₂ und PC2-OH identifiziert werden (Abb. 12B+C). Die analysierten y- und b-Fragmente entstanden durch die Spaltung der Peptidbindungen der derivatisierten Verbindungen. Die y-Fragmente (y₄ = CEC-G, y₃ = EC-G, y₂ = C-G) unterscheiden sich, aufgrund der NH₂- bzw. OH-Gruppe des C-terminalen Glycins von PC2-NH₂ und PC2-OH, um 1 Da. Die b-Fragmente (b₄ = EC-EC, b₃ = EC-E, b₂ = EC) zeigten aufgrund der Abspaltung des C-Terminus gleiche Masse-Ladungs-Verhältnisse. Für die Quantifizierung der PC2-Bildung *in planta* wurde eine Kalibrationssgerade für den PC2-OH-Standard erstellt (Abb. 12D). Die Kalibrationssgerade wurde durch eine lineare Regression über das Konzentrationsverhältnis [PC2-OH]/[PC2-NH₂] und das Flächenverhältnis der chromatographischen Signale (PC2-OH)/(PC2-NH₂) bestimmt. Die Konzentration von PC2-NH₂, welches als interner Standard verwendet wurde, war 25 µM. Die Analyse war im Bereich zwischen 1 µM und 75 µM linear. Das Detektionslimit (Verhältnis Signal zu Hintergrundrauschen) konnte für ein S/N ≈ 3 auf 39 µg PC2-OH/g TG festgelegt werden (siehe 2.9.1.3).

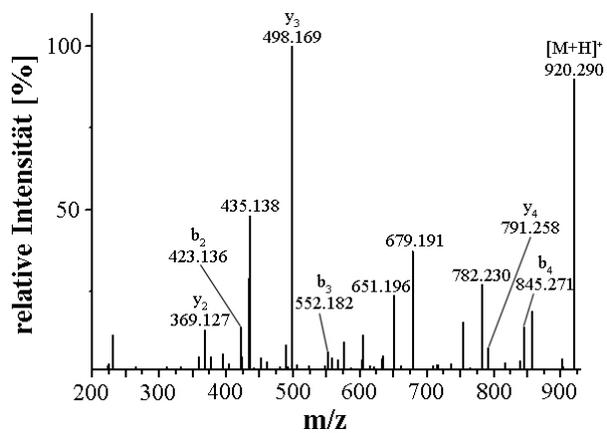
A



B



C



D

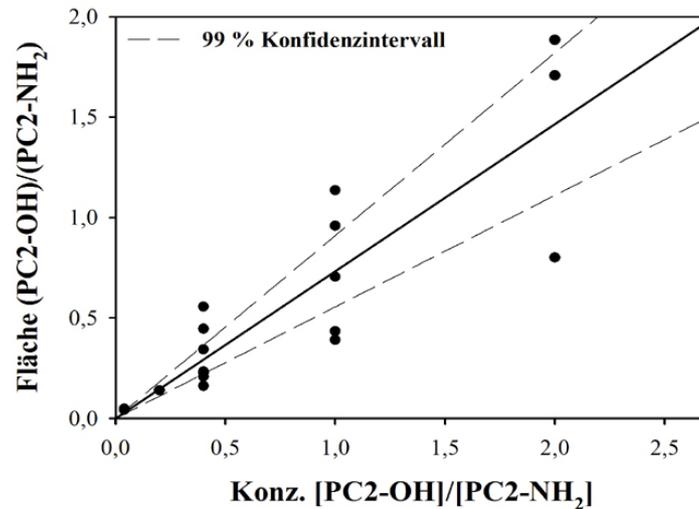


Abb. 12 Quantifizierung des verwendeten PC2-OH-Standards durch Cap-LC-ESI-QTOF-MS. PC2-NH₂ wurde als interner Standard verwendet. **A.** Die PC2-Biman-Derivate PC2-NH₂ (919,3073 Da) und PC2-OH (920,2913 Da) wurden bis zur Basislinie aufgetrennt. Dargestellt ist hier das rekonstruierte Ionenchromatogramm (RIC). **B.** ESI(+)-CID-Spektrum für PC2-NH₂-Biman₂ (γ EC-(Biman)- γ EC-(Biman)-G-NH₂). **C.** ESI(+)-CID-Spektrum für PC2-OH-Biman₂ (γ EC-Biman- γ EC-Biman-G-OH). **D.** Kalibrierungsgerade des PC2-OH Standards. Bestimmung der Kalibrierungsgerade durch eine lineare Regression über das Konzentrationsverhältnis [PC2-OH]/[PC2-NH₂] und dem Flächenverhältnis der Signale (PC2-OH)/(PC2-NH₂).

Auf der Basis dieses PC2-Assays wurde die PC2-Bildung von WT Col-0 und den *cad1*-Mutanten in hydroponischen Kulturen 5 Tage nach der Behandlung mit 0,5 μ M Cd²⁺ bzw. 20 μ M Zn²⁺ verglichen (Abb. 13). Es wurden Konzentrationen für Cd²⁺ und Zn²⁺ gewählt, die dieselben Effektkonzentrationen besitzen, wie sie für das Keimlingswachstum auf Agarplatten verwendet wurden. Die Konzentrationen sind entsprechend niedriger, aufgrund fehlender Kationenbindung, die durch den Agar verursacht wurde. In den Kontrollpflanzen wurden geringe Mengen PC2 nachgewiesen. Die gemessenen PC2-Mengen waren 10-fach höher in den Wurzeln (396,2 μ g/g TG) und 5-fach höher in den Blättern (156,2 μ g/g TG) als das Detektionslimit. Durch Cd²⁺-Behandlung wurde die PC2-Bildung in Wurzeln und Blättern von WT Col-0 stark aktiviert. In den Wurzeln wurden PC2-Mengen von 6720,7 μ g/g TG gemessen, die etwa 17-fach höher waren als in den Kontrollpflanzen. In den Blättern wurde ein ähnlicher Anstieg von etwa 19-fach nachgewiesen. Die PC2-Menge betrug 2930,8 μ g/g TG. Zn²⁺-Behandlung führte ebenso wie Cd²⁺-Behandlung zu einer starken Erhöhung der PC2-Menge (6-fach) in den Wurzeln von WT Col-0-Pflanzen. Die PC2-Menge war etwa 34 % (2314,4 μ g/g TG) der Menge, welche in den Wurzeln Cd²⁺-behandelter

Pflanzen nachgewiesen wurde. In den Blättern war der Unterschied ähnlich. Es wurden PC2-Mengen gemessen, die etwa 28 % (829,0 µg/g TG) der von Cd²⁺-behandelten WT Col-0-Pflanzen war. Der Anstieg im PC2-Gehalt der Blätter war im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen 5-fach höher. Für die *cad1-3*-Mutante wurde unter Kontrollbedingungen keine PC2-Bildung nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnte für die *cad1-6*-Mutante in Wurzeln und Blättern PC2-Mengen nachgewiesen werden, ähnlich wie in WT Col-0-Pflanzen. Die PC2-Menge betrug in den Wurzeln 340,8 µg/g TG und in den Blättern 156,9 µg/g TG. In der *cad1-3*-Mutante konnte in Wurzeln und Blättern Cd²⁺-behandelter Pflanzen geringe Mengen PC2 nachgewiesen werden, die etwa 5 % der Menge in WT entsprachen. Ebenso wurde in Wurzeln von Zn²⁺-behandelten *cad1-3*-Pflanzen PC2 nachgewiesen, was etwa 8 % der Menge in WT entsprach. In den Wurzeln Cd²⁺-behandelter *cad1-6*-Pflanzen konnte eine erhöhte PC2-Bildung beobachtet werden. Es wurden PC2-Mengen von 1751,9 µg/g TG gemessen. Dies entsprach etwa 26 % der PC2-Menge in den Wurzeln von WT Col-0 Pflanzen. In den Blättern Cd²⁺-behandelter *cad1-6*-Pflanzen wurden PC2-Mengen von 278,9 µg/g TG gemessen, die etwa 8 % der WT-Menge entsprach. In Zn²⁺-behandelten *cad1-6* Pflanzen wurden in den Wurzeln etwa 9 % (209,0 µg/g TG) und in den Blättern etwa 8 % (65,6 µg/g TG) der PC2-Menge von WT Col-0 gemessen.

Durch die Analyse der PC2-Bildung *in planta* wurde nachgewiesen, dass Cd²⁺ und Zn²⁺ die PC-Bildung in *Arabidopsis* induzieren können. Für die *cad1-3*-Mutante konnte nachgewiesen werden, dass sie nach Schwermetallbehandlung sehr geringe PC2-Mengen bildet. Der Einfluss der PC-Defizienz auf die Metallaufnahme sollte nun in weiteren Experimenten untersucht werden.

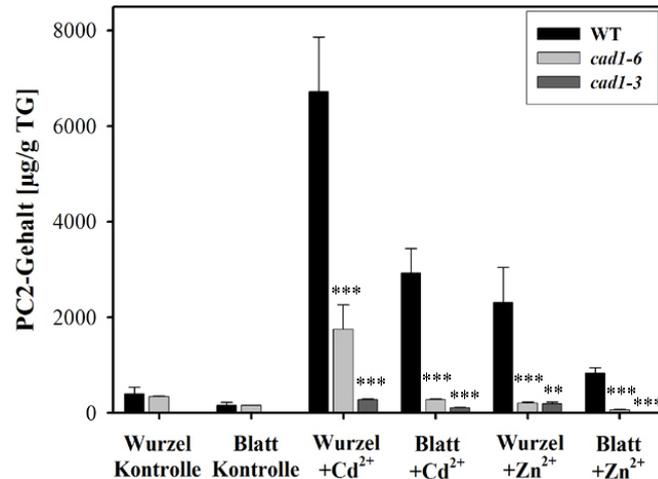


Abb. 13 PC2-Induktion nach Cd²⁺- und Zn²⁺-Behandlung in WT Col-0 und *cad1*-Mutanten. Die Analyse der PC2-Menge erfolgte in hydroponisch wachsenden Pflanzen fünf Tage nach Behandlung mit 0,5 µM Cd²⁺ oder 20 µM Zn²⁺. WT Col-0 (schwarze Balken), *cad1-6* (hellgraue Balken), und *cad1-3* (dunkelgraue Balken). Die gewonnenen pflanzlichen Extrakte wurden mit mBrB derivatisiert und mittels CapLC-ESI-QTOF-MS analysiert. Fehlerbalken stellen die Stabw. dar (n = 3). Signifikanzlevel der ANOVA aus dem Vergleich WT Col-0 mit den *cad1*-Mutanten: nicht signifikant „“ > 0,05; „*“ < 0,05; „**“ < 0,01; „***“ < 0,001.

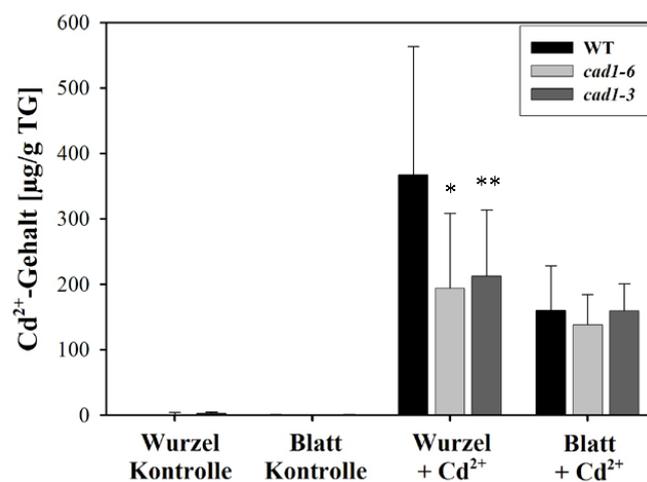
3.1.7 Analyse der Metallaufnahme in den *cad1*-Mutanten

Die Metallaufnahme wird unter anderem durch die Konzentration intrazellulärer hochaffiner Bindungsstellen bestimmt (Frausto da Silva und Williams, 2001). Die stark verringerte PC2-Bildung in den *cad1*-Mutanten ist möglicherweise mit einer veränderten Metallaufnahme und Translokation verbunden. Aufgrund der PC-Defizienz sollte die Metallaufnahme und die Verteilung für Cd²⁺ und Zn²⁺ untersucht werden. WT Col-0-Pflanzen und die *cad1*-Mutanten wurden in hydroponischen Kulturen nach fünf Wochen durch Zugabe von 0,5 µM Cd²⁺ oder 20 µM Zn²⁺ für fünf Tage behandelt. Die Metallkonzentration wurde in Wurzeln und Blättern durch die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) bestimmt.

Die Metallaufnahme in den Wurzeln zeigte, dass beide *cad1*-Mutanten signifikant weniger Cd²⁺ und Zn²⁺ aufnahmen als WT Col-0 (Abb. 14). WT-Pflanzen akkumulierten in den Wurzeln 367,1 µg Cd²⁺/g TG nach Cd²⁺-Behandlung und 3587,9 µg Zn²⁺/g TG nach Zn²⁺-Behandlung. In den Wurzeln der *cad1*-Mutanten wurden dagegen Cd²⁺-Konzentrationen gemessen, die etwa 52 bis 58 % der WT-Konzentration entsprachen. Die Cd²⁺-Menge betrug 212,3 µg Cd²⁺/g TG in der *cad1-3*-Mutante und 194,0 µg Cd²⁺/g TG in der *cad1-6*-Mutante. In den *cad1*-Mutanten wurde

auch nach Zn^{2+} -Behandlung eine reduzierte Aufnahme von ungefähr 50 % festgestellt. Es wurde eine Zn^{2+} -Konzentration von 1751,5 $\mu g Zn^{2+}/g TG$ in *cad1-3*, 2047,1 $\mu g Zn^{2+}/g TG$ in *cad1-6* gemessen. Der Unterschied in den Blättern der *cad1*-Mutanten zu WT Col-0 nach Cd^{2+} -Behandlung war sehr gering und wurde als nicht signifikant bewertet (ANOVA). Es wurden Konzentrationen von 176,4 $\mu g Cd^{2+}/g TG$ (WT Col-0), 159,0 $\mu g Cd^{2+}/g TG$ (*cad1-3*) und 138,0 $\mu g Cd^{2+}/g TG$ (*cad1-6*) gemessen. Nach Zn^{2+} -Behandlung wurde ebenfalls ein sehr geringer Unterschied festgestellt, der auch durch eine statistische Auswertung (ANOVA) als nicht signifikant bewertet wurde. Die Konzentrationen betragen 1046,7 $\mu g Zn^{2+}/g TG$ (WT Col-0), 755,8 $\mu g Zn^{2+}/g TG$ (*cad1-3*) und 873,0 $\mu g Zn^{2+}/g TG$ (*cad1-6*).

A



B

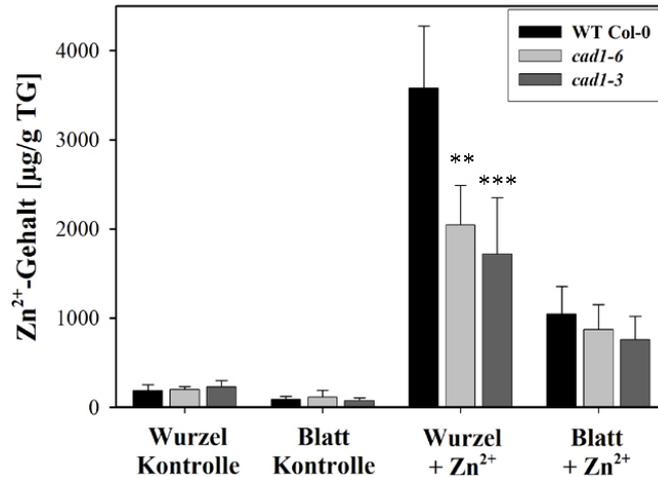


Abb. 14 Cd²⁺- (A) und Zn²⁺- (B) Aufnahme in WT Col-0 und den *cadl*-Mutanten. WT Col-0- (schwarze Balken), *cadl-6*- (hellgraue Balken) und *cadl-3*- (dunkelgraue Balken) Pflanzen wuchsen in hydroponischen Kulturen und wurden nach fünf Wochen durch Zugabe von 0,5 µM Cd²⁺ bzw. 20 µM Zn²⁺ für fünf Tage gestresst. Fehlerbalken stellen die Stabw. dar. Signifikanzlevel der ANOVA aus dem Vergleich WT Col-0 mit den *cadl*-Mutanten: nicht signifikant „“ > 0,05; „**“ < 0,05; „***“ < 0,01; „****“ < 0,001. (n = 3).

3.1.8 Weitere Untersuchungen zur Zn²⁺-Aufnahme

Die bisher durchgeführten Untersuchungen lassen die Vermutung zu, dass die PC an der Zn²⁺-Akkumulation bei extern erhöhten Zn²⁺-Konzentrationen beteiligt sind. Dies führte zu der Frage, ob die PC-Synthese auch für die Zn²⁺-Aufnahme bei Zn²⁺-Mangel bzw. unter physiologischen Zn²⁺-Bedingungen wichtig ist. Dazu wurde das Keimlingswachstum auf vertikalen Agarplatten mit 1/10 Hoagland-Medium unter Zugabe von EDTA untersucht. Zusätzlich wurden 5 Wochen alte hydroponisch wachsende Pflanzen Zn²⁺-Mangel ausgesetzt. Doch in keinem dieser Experimente war ein Phänotyp der *cadl*-Mutanten im Vergleich zu WT Col-0 erkennbar.

Die verringerte Zn²⁺-Aufnahme der *cadl*-Mutanten lässt die Frage aufkommen, ob unter normalen Wachstumsbedingungen ein Zn²⁺-Mangel vorliegt, der durch andere Prozesse in der Metallhomöostase kompensiert wird. Durch Real-Time-PCR-Analysen wurden die Transkriptmengen von *ZIP9* (At4g33020) und *NAS2* (At5g56080) untersucht. Für diese Gene wurde gezeigt, dass sie bei Zn²⁺-Defizienz hochreguliert werden (Wintz *et al.*, 2003; Lopez-Millan *et al.*, 2004). Pflanzen wurden unter normalen Wachstumsbedingungen in hydroponischen Kulturen in 1/10 Hoagland-Medium für fünf Wochen angezogen und anschließend Wurzeln und Blätter getrennt

analysiert. In der Expression dieser Gene konnte kein signifikanter Unterschied der *cad1*-Mutanten zu WT-Pflanzen festgestellt werden (Tab. 8 und Tab. 9).

Tab. 8 Untersuchung der Transkriptmengen von *Zip9* in *Arabidopsis*-Pflanzen

Name	ΔCt	$2^{\Delta\Delta Ct}$
WT Col-0	3,56	-
<i>cad1-3</i>	4,05	0,715
<i>cad1-6</i>	4,45	0,539

Tab. 9 Untersuchung der Transkriptmengen von *NAS2* in *Arabidopsis*-Pflanzen

Name	ΔCt	$2^{\Delta\Delta Ct}$
WT Col-0	3,39	-
<i>cad1-3</i>	3,08	1,24
<i>cad1-6</i>	3,52	0,91

3.1.9 Untersuchung der PC-Defizienz auf schwermetallbelastetem Boden

Untersuchungen zur PC-Defizienz von *cad1-3* und *cad1-6* beschäftigten sich weiterhin mit dem Einfluss verschieden erhöhter Schwermetallkonzentrationen in natürlich vorkommenden Böden. Dazu wurde schwermetallbelastete Erde aus Langelsheim (N 51°56.569', E 10°20.955') verwendet. Die Schwermetallbelastung dieser Erde ist in Tabelle 10 zusammengefasst. Es treten hohe Konzentrationen an Cd^{2+} , Cu^{2+} und Zn^{2+} auf, welche 30- bis 60-fach, 7- bis 10-fach bzw. 50- bis 120-fach über den normalen Konzentrationen liegen (Kabata-Pendias und Pendias, 2001; Weber *et al.*, 2006).

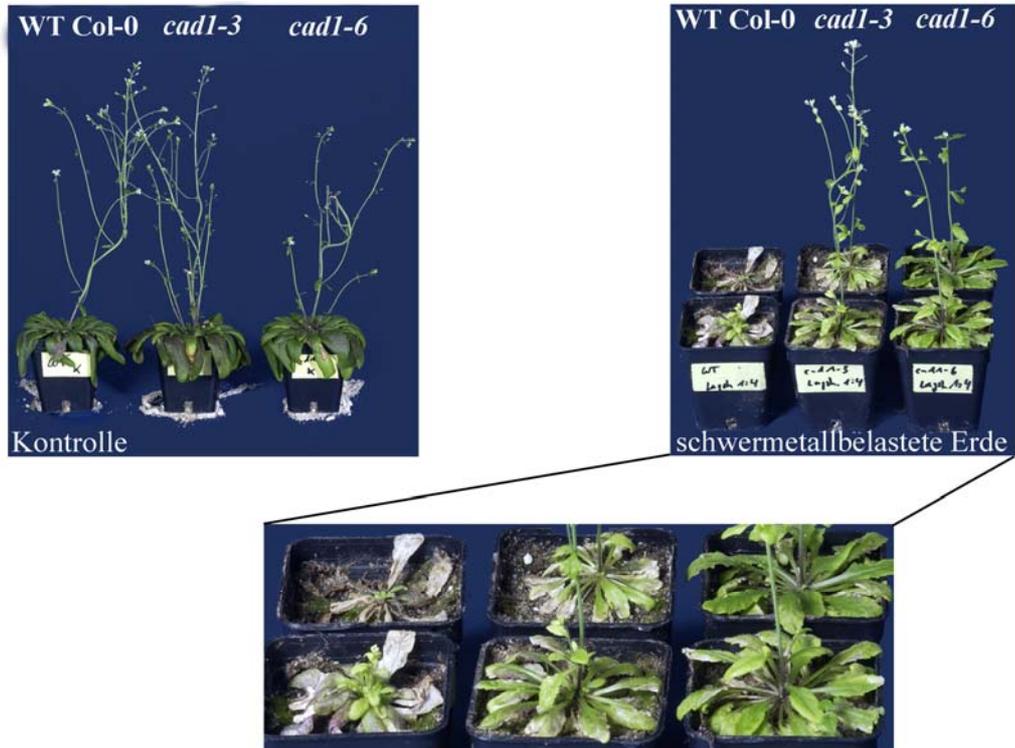
Tab. 10 pH und die Menge ($\mu g/g$ TG) von extrahierbaren Zn, Cd, und Cu des analysierten Bodens aus Langelsheim. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Stabwn. (n = 3). (modifiziert nach Weber *et al.*, 2006).

	extrahierbare Metalle im Boden			pH
	Zn	Cd	Cu	
kontaminierter Boden	4904,0 \pm 93,24	22,1 \pm 3,83	115,7 \pm 4,9	6,4

Aufgrund dieser hohen Schwermetallkonzentrationen, die für *Arabidopsis thaliana* bereits extrem toxisch ist, wurde die schwermetallbelastete Erde mit Sand gemischt. Die Pflanzen keimten zunächst auf unbelasteter Erde (Erde-Sand-Gemisch). Nach 2 Wochen wurden sie auf das schwermetallbelastete Erde-Sand-Gemisch umgesetzt und bis zur Blütenbildung beobachtet.

In drei unabhängigen Experimenten konnte eine erhöhte Toleranz der *cad1*-Mutanten gegenüber WT Col-Pflanzen festgestellt werden (Abb. 15). WT Pflanzen zeigten vermehrt Chlorosen und erhöhte Antocyanbildung, verursacht durch oxidative Schäden. Das Wachstum war aufgrund dieser Symptome im Vergleich zu den *cad1*-Mutanten stark beeinträchtigt. Unter Kontrollbedingungen wurde ein normales Wachstum beobachtet.

A



B

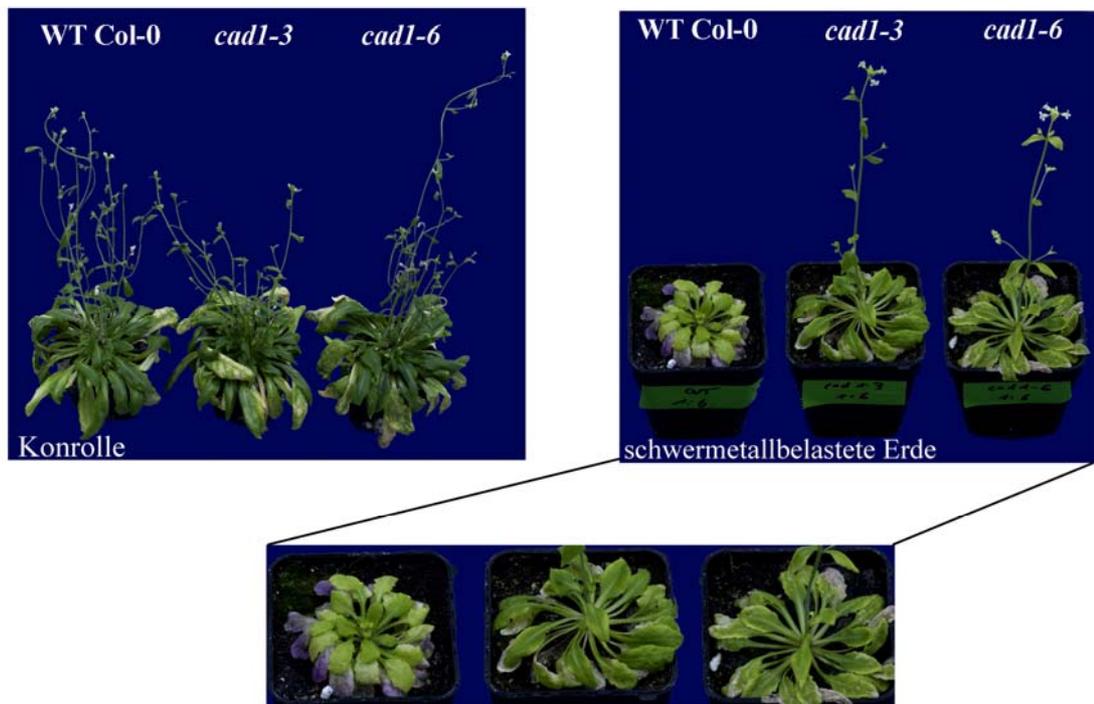


Abb. 15 Erhöhte Resistenz der *cad1*-Mutanten auf schwermetallbelasteter Erde aus Langelsheim. Einfluss verschiedener Metalle im Boden auf das Wachstum von WT Col-0-, *cad1-3*- und *cad1-6*-Pflanzen. Keimlinge wurden von normaler Erde auf ein schwermetallbelastetes Erde-Sand-Gemisch mit erhöhten Zn^{2+} -, Cd^{2+} - und Cu^{2+} -Konzentrationen umgesetzt. Gezeigt sind zwei Experimente, in denen das Wachstum bis zur Blütenbildung beobachtet wurde (A und B).

3.2 Untersuchungen zur Funktion von *AtPCS2* in *Arabidopsis thaliana*

AtPCS2 ist das zweite PCS-Gen in *Arabidopsis*. Untersuchungen in Hefen haben gezeigt, dass *AtPCS2* eine funktionale PCS kodiert (Cazalé und Clemens, 2001). Unabhängig von dieser Aktivität in heterologen Systemen ist eine Funktion von *AtPCS2* in *Arabidopsis* nicht bekannt. Das *AtPCS2*-Gen ist kein Produkt der letzten Genomduplikation in *Arabidopsis* und die geringe Sequenzübereinstimmung der Introns deuten auf eine lange Koexistenz beider PCS-Gene hin (Clemens, 2006a). Auch die zweite PCS in *Arabidopsis* besitzt möglicherweise wichtige Funktionen, die eine evolutionäre Konservierung erklären können. Um Funktionen von *AtPCS2* aufzuklären, wurde deshalb die bekannte *cad1-3*-Mutante verwendet. Es sollte geklärt werden, warum diese Mutante in Anwesenheit einer scheinbar funktionalen *AtPCS2* diesen Phänotyp besitzt. Weil diese Mutante nach Cd^{2+} - und Zn^{2+} -Behandlung nur sehr geringe bis keine PC bildet (siehe Kapitel 3.1) und eine erhöhte Cd^{2+} - und Zn^{2+} -Sensitivität besitzt (Howden *et al.*, 1995a; Tennstedt *et al.*, 2006), ist die Mutante hervorragend geeignet in einer stark erhöhten Expression Funktionen von *AtPCS2* aufzuklären.

3.2.1 Isolierung transgener *cad1-3*-Pflanzen

Für diese Untersuchungen wurden transgene Pflanzen durch die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation hergestellt (Clemens, nicht veröffentlicht). Dazu wurde ein bereits isolierter cDNA-Klon von *AtPCS2* verwendet (Cazalé und Clemens, 2001). Die stark erhöhte Expression von *AtPCS2* in der *cad1-3*-Mutante erfolgte unter Verwendung des 35S-Promotor des *Cauliflower-mosaic-virus*. Als eine Kontrolllinie wurden ebenfalls transgene Pflanzen hergestellt, die das *AtPCS1*-Gen unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimierten (Clemens, nicht veröffentlicht). Die Selektion erfolgte aufgrund der BASTA[®]-Resistenz. Die Proteine wurden als Fusionsproteine mit einem C-terminalen Hämagglutinin-Tag (HA-Tag) exprimiert. Nach Erhalt homozygoter Linien (3. Generation) wurden die Pflanzen der transgenen Linien (*cad1-3 35S::AtPCS1* und *cad1-3 35S::AtPCS2*) auf erhöhte *AtPCS1*- bzw. *AtPCS2*-Proteinmengen untersucht. Durch die Detektion des HA-Tags in Western-Blot-Analysen erfolgte der Nachweis der Proteine. Aufgrund der Größe des HA-Tags von 3,5 kDa wurden Signale bei etwa 60 kDa für *AtPCS1* und 55 kDa für *AtPCS2* detektiert (Abb. 16). Für WT Col-0 und die *cad1-3*-Mutante wurden keine Signale detektiert. Die in *S. pombe*

exprimierten PCS-Proteine von *Arabidopsis* wurden als Positivkontrolle verwendet. Die Expression erfolgte ebenfalls mit einem HA-Tag.

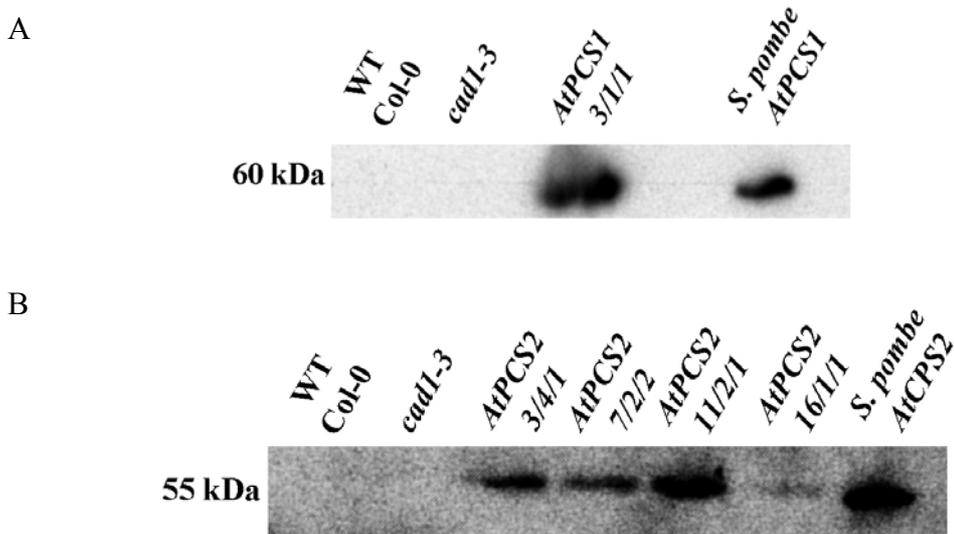


Abb. 16 Nachweis der Expression von *AtPCS1* oder *AtPCS2* in transgenen *cad1-3 35S::AtPCS1*- (A) und *cad1-3 35S::AtPCS2*- (B) Linien. Western-Blot-Analysen zeigen Signale von *AtPCS1* oder *AtPCS2* verschiedener isolierter transgener Linien. Als Positivkontrolle wurden die in *S. pombe* exprimierte PCS-Proteine von *Arabidopsis* verwendet. Aufgrund des HA-Tags sind die detektierten Signale um 3,5 kDa größer, als die erwarteten Proteingrößen für *AtPCS1* (56,5 kDa) und *AtPCS2* (51,7 kDa).

Für weitere Untersuchungen wurden vier transgene *cad1-3 35S::AtPCS2*-Linien und eine transgene *cad1-3 35S::AtPCS1*-Linie selektiert. Da für *AtPCS1* die Komplementation des *cad1-3*-Phänotypes bereits gezeigt wurde (Ha *et al.*, 1999), war eine Linie als Kontrolle ausreichend.

In allen nachfolgend dargestellten Experimenten ist nur eine transgene *cad1-3 35S::AtPCS2*-Linie gezeigt. Der Phänotyp dieser Linie war für alle vier isolierten Linien charakteristisch. Pflanzen der transgenen *cad1-3 35S::AtPCS1*-Linie und der *cad1-3 35S::AtPCS2*-Linie werden im folgendem als *cad1-3:PCS1* bzw. *cad1-3:PCS2* bezeichnet. Die transgenen Linien wurden zunächst in ihrer Metallsensitivität getestet.

3.2.2 Metallsensitivität der transgenen Pflanzenlinien

Wie aus den bereits durchgeführten Experimenten bekannt (Abb. 7), ist die *cad1-3*-Mutante Cd^{2+} - und Zn^{2+} -hypersensitiv auch in Anwesenheit einer scheinbar funktionalen *AtPCS2*. Aufgrund einer stark erhöhten Expression von *AtPCS2* sollte auch bei einer geringen Aktivität von *AtPCS2* in *Arabidopsis* eine erhöhte Toleranz

nachgewiesen werden. Deshalb wurde die Metallsensitivität der transgenen Linien für Cd^{2+} und Zn^{2+} getestet. Samen von *Arabidopsis* keimten dazu auf vertikalen Agarplatten mit modifiziertem 1/10 Hoagland-Medium. Für transgene *cad1-3:PCS2*-Pflanzen wurde im Vergleich zu WT Col-0 eine erhöhte Cd^{2+} - und Zn^{2+} -Sensitivität festgestellt (Abb. 17). Die Sensitivität war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie die der *cad1-3*-Mutante. Dies konnte sowohl in der Wurzellänge als auch im Keimlingsgewicht gezeigt werden. In neun voneinander unabhängigen Experimenten wurden mehr als 200 Keimlinge auf Kontrollmedium und auf Medium mit 2 μM Cd^{2+} oder 50 μM Zn^{2+} getestet. Die Konzentrationen für Cd^{2+} und Zn^{2+} lagen nahe dem IC_{50} -Wert für WT Col-0. Die durchschnittliche Inhibierung der Wurzellänge für WT Col-0 betrug 40,8 % für 2 μM Cd^{2+} und 40,6 % für 50 μM Zn^{2+} . Für das entsprechende Keimlingsgewicht ergab sich eine Inhibierung von 38,1 % und 43,6 %. Transgene *cad1-3:PCS2*-Pflanzen zeigten eine durchschnittliche Inhibierung des Wachstums in der Wurzellänge von 77,3 % für 2 μM Cd^{2+} und 52,7 % für 50 μM Zn^{2+} . Die durchschnittliche Inhibierung des Keimlingsgewichtes betrug 76,6 % bzw. 64,5 %. Für die *cad1-3*-Mutante wurde eine durchschnittliche Inhibierung der Wurzellänge von 87,6 % für 2 μM Cd^{2+} und 63,4 % für 50 μM Zn^{2+} und von 91,0 % bzw. 77,9 % im Keimlingsgewicht gemessen. In der *cad1-3:PCS1*-Kontrolllinie wurde eine vollständige Komplementation des *cad1-3*-Phänotyps beobachtet (Abb. 18).

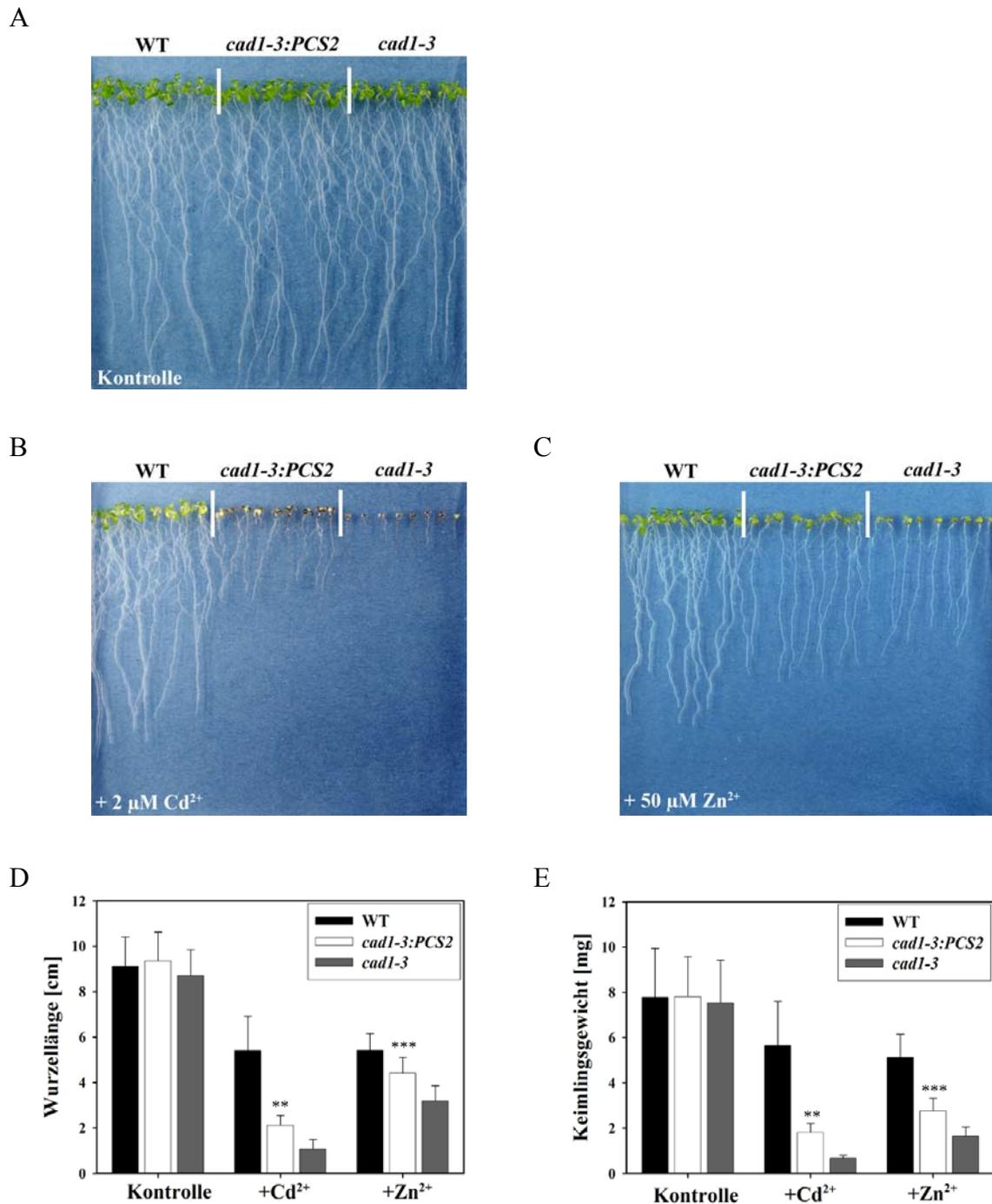


Abb. 17 Metallsensitivität transgener *cad1-3:PCS2*-Pflanzen. Samen von *Arabidopsis* keimten auf vertikalen Agar-Platten mit 1/10 Hoagland-Medium ohne Schwermetallzugabe und nach Zugabe von 2 μM Cd^{2+} oder 50 μM Zn^{2+} (A - C). WT Col-0 (rechts), *cad1-3:PCS2* (Mitte), *cad1-3* (links). Die Wurzellänge und das Keimlingsgewicht wurden nach zwölf Tagen bestimmt (D, E). *Arabidopsis* WT Col-0 (schwarze Balken), *cad1-3:PCS2* (weiße Balken) und *cad1-3* (dunkelgraue Balken). Die Fehlerbalken stellen die Stabwn. dar. Signifikanzlevel der ANOVA aus dem Vergleich der transgenen *cad1-3:PCS2*-Pflanzen mit der *cad1-3* Mutante: nicht signifikant „“ > 0,05; „**“ < 0,05; „***“ < 0,01; „****“ < 0,001. (n = 9).

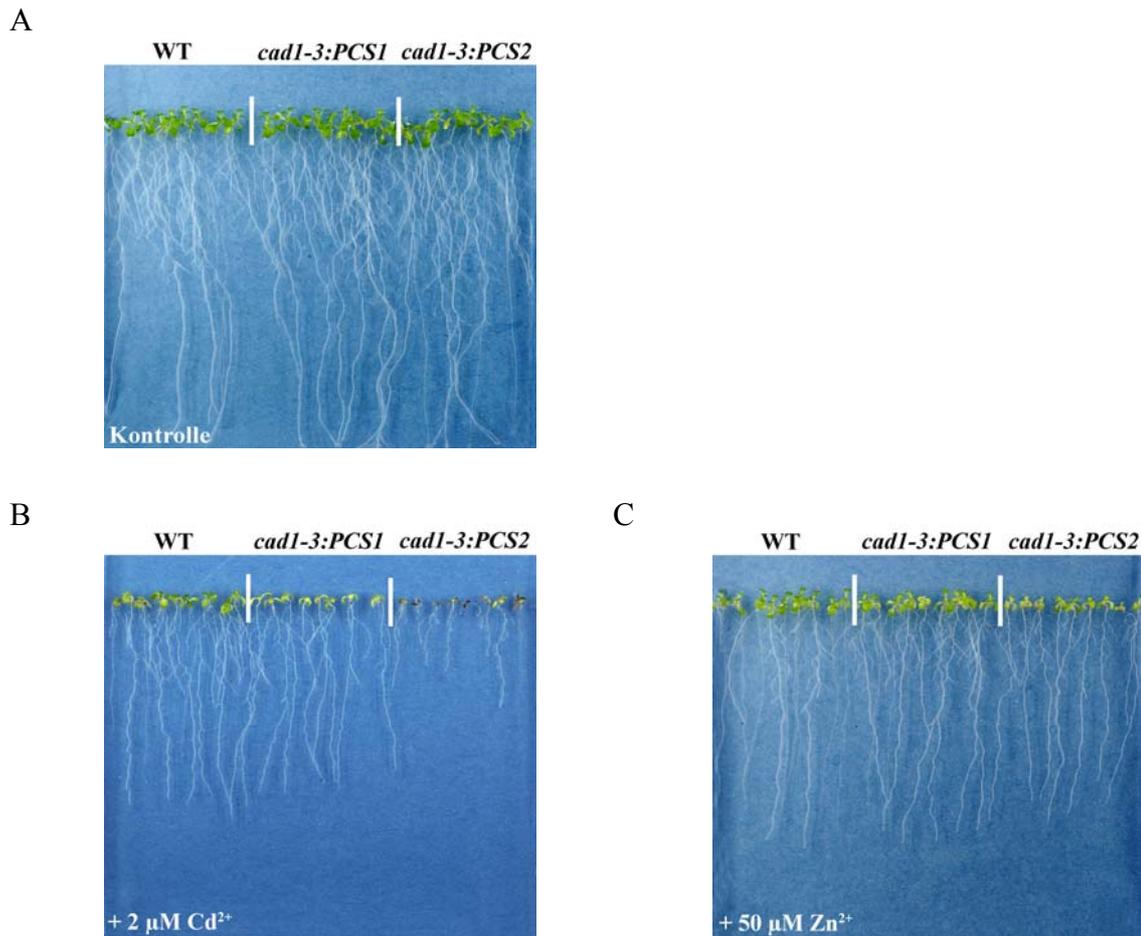


Abb. 18 Komplementation des *cad1-3*-Phänotyps durch Expression von *AtPCS1*. Samen von *Arabidopsis* keimten auf vertikalen Agar-Platten mit 1/10 Hoagland-Medium ohne Schwermetallzugabe (**A**) und nach Zugabe von 2 μM Cd^{2+} (**B**) oder 50 μM Zn^{2+} (**C**). WT Col-0 (rechts), *cad1-3:PCS1* (Mitte), *cad1-3:PCS2* (links) (n = 3).

3.2.3 Nachweis der PC-Bildung *in vivo*

Die Untersuchungen des Wachstums von *Arabidopsis*-Keimlingen haben gezeigt, dass eine stark erhöhte Expression von *AtPCS2* den Cd^{2+} - und Zn^{2+} -Phänotyp der *cad1-3*-Mutante nur partiell komplementieren kann. Dies wurde für vier unabhängige transgene *cad1-3:PCS2*-Linien nachgewiesen. Für *AtPCS1* konnte in einer *cad1-3:PCS1*-Kontrolllinie die Komplementation der *cad1-3*-Mutante gezeigt werden. Eine mögliche Ursache könnte eine Aktivität von *AtPCS2* sein, die zu schwach ist, um die PC-Bildung zu induzieren. Der Nachweis der PC-Bildung *in vivo* sollte die Aktivierung von *AtPCS2* durch Cd^{2+} und Zn^{2+} klären. Dazu wurden Pflanzen von *Arabidopsis* in hydroponischen Kulturen angezogen. Die PC-Bildung wurde fünf Tage nach Behandlung mit 0,5 μM Cd^{2+} bzw. 20 μM Zn^{2+} verglichen (Abb. 19). Die Quantifizierung der PC-Bildung erfolgte über die bereits etablierte Methode der CapLC-ESI-QTOF-MS, wie sie unter

Kapitel 3.1.6 beschrieben wurde. In den transgenen *cad1-3:PCS2*-Pflanzen konnten in den Wurzeln und Blättern nach Cd^{2+} - und Zn^{2+} -Behandlung erhöhte PC2-Mengen nachgewiesen werden. Auch unter Kontrollbedingungen wurden beachtliche Mengen PC2 gemessen. Die PC2-Mengen in Kontrollpflanzen waren mehr als 2-fach höher in den Wurzeln und mehr als 5-fach höher in den Blättern als in WT Col-0-Pflanzen. Eine Induktion der PC2-Bildung konnte nach Cd^{2+} -Behandlung in den Wurzeln und Blättern beobachtet werden. In den Wurzeln von *cad1-3:PCS2*-Pflanzen wurden PC2-Mengen von 1666,4 $\mu\text{g/g}$ TG gemessen, die etwa 24,8 % der Menge von WT Col-0 entsprechen. Die PC2-Menge in den Blättern war der von WT Col-0 vergleichbar. Es wurde ein Gehalt von 2837,2 μg PC2 /g TG gemessen. Eine Induktion der PC2-Bildung in *cad1-3:PCS2*-Pflanzen konnte auch nach Zn^{2+} -Behandlung beobachtet werden. In den Wurzeln wurden PC2-Mengen von etwa 62,3 % der Menge in WT Col-0 gemessen. In den Blättern wurde eine 2-fach höhere PC2-Menge als in WT Col-0 nachgewiesen. Für die transgenen *cad1-3:PCS1*-Pflanzen wurden ähnliche PC2-Mengen in Wurzeln und Blättern Cd^{2+} - und Zn^{2+} -behandelter Pflanzen wie für die *cad1-3:PCS2*-Pflanzen nachgewiesen. Ein geringer Unterschied wurde in den Wurzeln von Cd^{2+} -behandelten Pflanzen festgestellt. In den Wurzeln von *cad1-3:PCS1*-Pflanzen wurde eine PC2-Menge von 2597,6 $\mu\text{g/g}$ TG gemessen, in *cad1-3:PCS2*-Pflanzen 1666,4 $\mu\text{g/G}$ TG. Für die *cad1-3*-Mutante wurden, wie bereits gezeigt (Kapitel 3.1), geringe PC2-Mengen in Wurzeln und Blättern von Cd^{2+} -behandelten Pflanzen sowie in Wurzeln von Zn^{2+} -behandelten Pflanzen nachgewiesen. Unter Kontrollbedingungen wurde kein PC2 nachgewiesen.

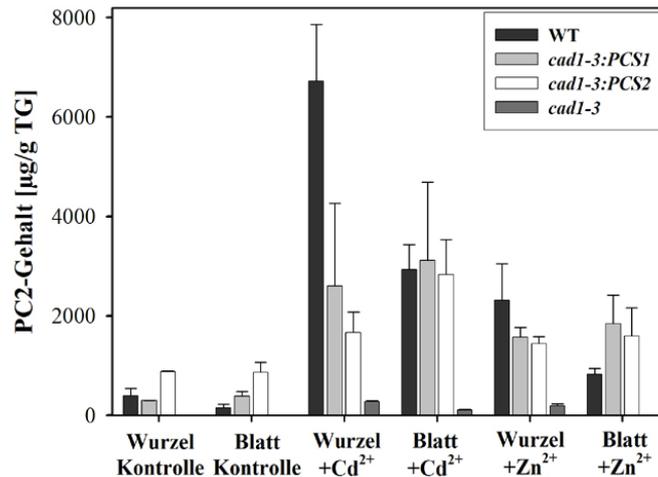


Abb. 19 PC2-Induktion in transgenen Pflanzen nach Cd²⁺- und Zn²⁺-Behandlung. Dargestellt ist die Quantifizierung der PC2-Bildung fünf Tage nach Behandlung mit 0,5 µM Cd²⁺ bzw. 20 µM Zn²⁺ in WT Col-0- (schwarze Balken), *cad1-3:PCS1*- (hellgraue Balken), *cad1-3:PCS2*- (weiße Balken) und *cad1-3*-Pflanzen (dunkelgraue Balken). Die Analyse erfolgte durch die Methode der CapLC-ESI-QTOF-MS. Fehlerbalken stellen die Stabwn. dar (n=3).

3.2.4 Analyse der Metallaufnahme von *cad1-3:PCS2*-Pflanzen

Aufgrund der nachgewiesenen PC2-Bildung in *cad1-3:PCS2*-Pflanzen sind intrazelluläre hochaffine Bindungsstellen vorhanden, die eine Metallaufnahme unterstützen könnten (Frausto da Silva und Williams, 2001). Daher wurde die Cd²⁺- und Zn²⁺-Aufnahme in den transgenen *cad1-3:PCS2*-Pflanzen untersucht. Pflanzen von *Arabidopsis* wurden in hydroponischen Kulturen angezogen und die Metallmenge in Wurzeln und Blättern fünf Tage nach Behandlung mit 0,5 µM Cd²⁺ oder 20 µM Zn²⁺ bestimmt. Die Analyse erfolgte durch die Methode der AAS. Die Metallmenge in den Wurzeln von *cad1-3:PCS2*-Pflanzen zeigte eine etwa 50-prozentige Reduktion im Vergleich zu WT Col-0. Die Reduktion in der Aufnahme von Cd²⁺ und Zn²⁺ war vergleichbar mit der von *cad1-3*-Pflanzen (Abb. 20). In den Wurzeln von Cd²⁺-behandelten WT Col-0-Pflanzen wurden Cd²⁺-Mengen von 367,1 µg/g TG gemessen, wogegen in *cad1-3:PCS2*-Pflanzen 170,76 µg/g TG gemessen wurde. Die Cd²⁺-Menge der *cad1-3*-Mutante war 212,3 µg/g TG. Nach Zn²⁺-Behandlung betrug die Zn²⁺-Menge in WT Col-0-Pflanzen 3578,0 µg/g TG und in den *cad1-3:PCS2*-Pflanzen 1526,8 µg/g TG. Für *cad1-3*-Pflanzen wurde eine Zn²⁺-Menge von 1721,5 µg/g TG gemessen. In *cad1-3:PCS2*-Pflanzen war der Unterschied in den Blättern nach Cd²⁺- oder Zn²⁺-Behandlung im Vergleich zu WT Col-0 weniger stark ausgeprägt und wurde durch statistische Analysen (ANOVA) als nicht signifikant bewertet. In den Blättern von Cd²⁺-

behandelten Pflanzen wurden Cd^{2+} -Mengen von 176,4 $\mu\text{g/g}$ TG für WT Col-0 und 136,5 $\mu\text{g/g}$ TG für *cad1-3:PCS2*-Pflanzen gemessen. Die Cd^{2+} -Menge der *cad1-3*-Mutante war 159,0 $\mu\text{g/g}$ TG. Nach Zn^{2+} -Behandlung betrug die Zn^{2+} -Menge in den Blättern von WT Col-0-Pflanzen 1046,7 $\mu\text{g/g}$ TG und 734,7 $\mu\text{g/g}$ TG in den Blättern von *cad1-3:PCS2*-Pflanzen. Für die *cad1-3*-Mutante wurde eine Zn^{2+} -Menge von 755,8 $\mu\text{g/g}$ TG gemessen.

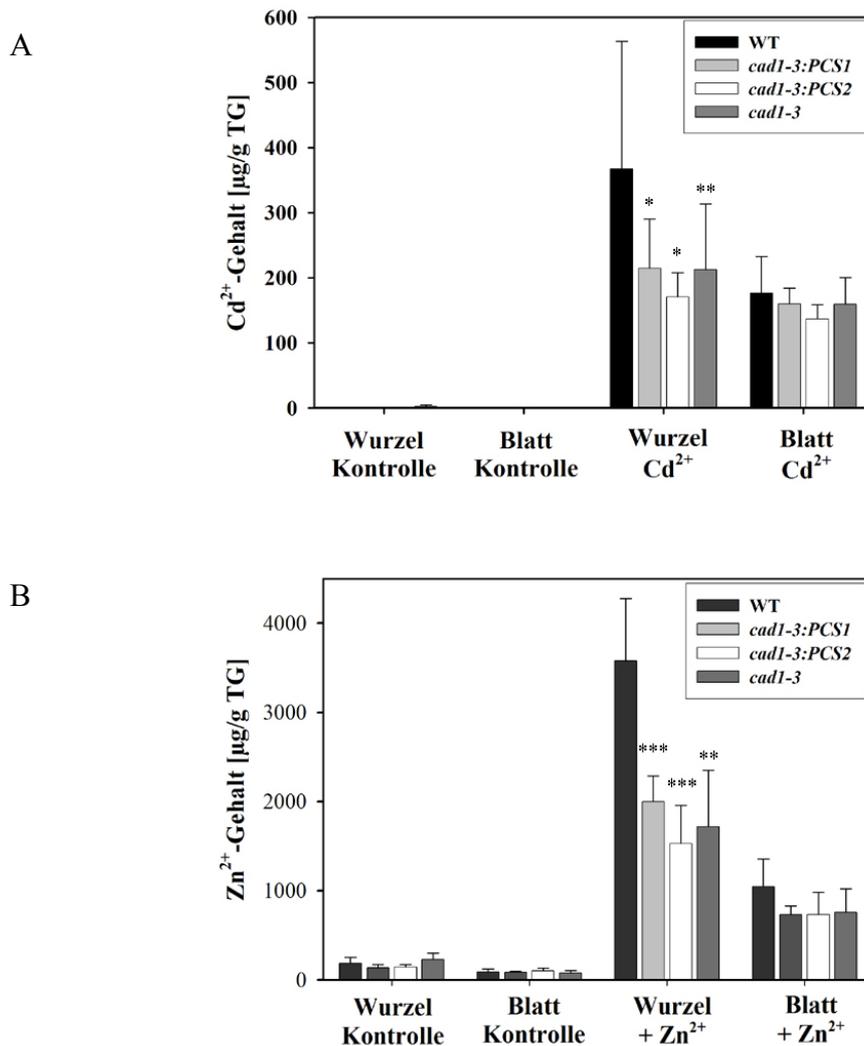


Abb. 20 Metallaufnahme transgener *cad1-3:PCS2*-Pflanzen nach Cd^{2+} - (A) bzw. Zn^{2+} -Behandlung (B). Pflanzen von WT Col-0 (schwarze Balken), *cad1-3:PCS1* (hellgraue Balken), *cad1-3:PCS2* (weiße Balken) und *cad1-3* (dunkelgraue Balken) wuchsen in hydroponischen Kulturen und wurden für 5 Tage mit 0,5 μM Cd^{2+} bzw. 20 μM Zn^{2+} behandelt. Die Fehlerbalken stellen die Stabwn dar. Signifikanzlevel der ANOVA aus dem Vergleich zu WT Col-0: nicht signifikant „“ > 0,05; „*“ < 0,05; „**“ < 0,01; „***“ < 0,001. (n = 3).

3.2.5 *In-vitro*-Aktivierung von AtPCS2

Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass AtPCS2 durch Cd^{2+} und Zn^{2+} *in planta* aktiviert wird. Eine Zn^{2+} -Aktivierung von AtPCS2 wurde in Hefen bisher nicht nachgewiesen (Cazalé und Clemens, 2001). Da bekannt ist, dass AtPCS1 durch verschiedene Metalle aktiviert wird (Vatamaniuk *et al.*, 2000; Oven *et al.*, 2002), sollte die katalytische Aktivität von AtPCS2 mit AtPCS1 verglichen werden. Die Aufreinigung von AtPCS2 erfolgte durch eine heterologe Expression in *E. coli* unter Verwendung des pGEX-Vektors (Cazalé und Clemens, nicht veröffentlicht). Der pGEX-Vektor wurde verwendet, um das AtPCS2-Protein mit einem GST-Tag zu fusionieren. Das Protein wurde über den GST-Tag gereinigt, welcher durch „Factor Xa“ vom Protein abgeschnitten wurde. Die Aufreinigung von AtPCS1 erfolgte in gleicher Weise. Die Expression in *E. coli* wurde vor der rekombinanten Aufreinigung durch Westernanalysen geprüft (Abb. 21A). Aufgrund des GST-Tags sind die Signale der Westernanalysen um 20 kDa größer. Nach der rekombinanten Aufreinigung konnten beide Proteine durch elektrophoretische Auftrennung und Anfärbung mit Coomassie Blau nachgewiesen werden (Abb. 21B).

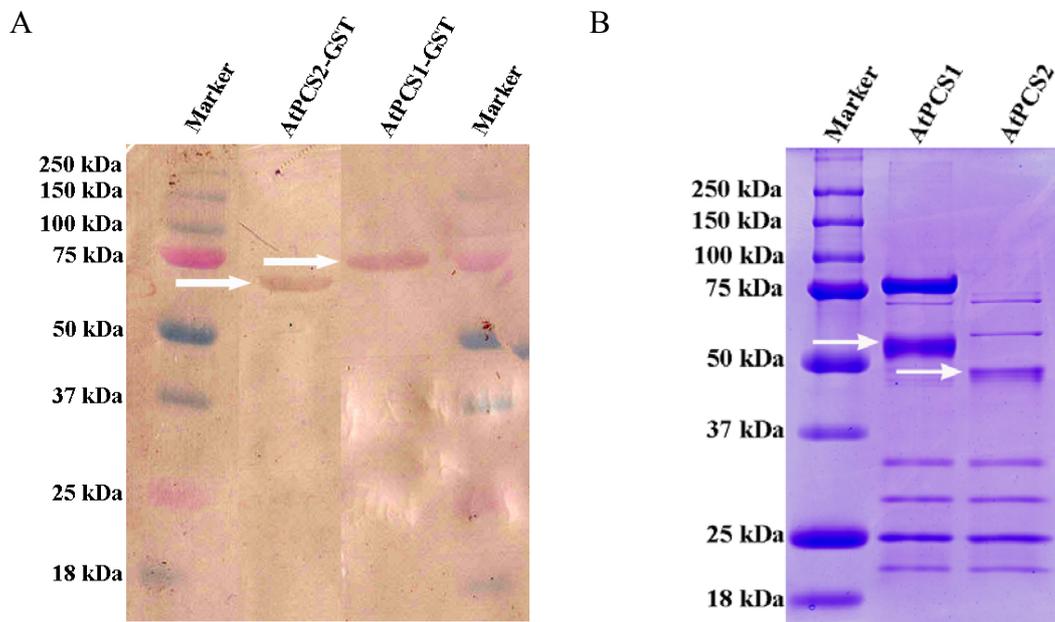


Abb. 21 Nachweis von AtPCS1 und AtPCS2. **A:** Detektion (Western) von AtPCS1-GST (76 kDa) und AtPCS2-GST (73 kDa) aus *E. coli*-Extrakten über einen spezifischen Antikörper, der gegen das GST-Tag gerichtet ist. **B:** Proteinmuster von *E. coli*-Extrakten, die AtPCS1 (56,5 kDa) und AtPCS2 (51,7 kDa) exprimierten, nach der rekombinanten Aufreinigung und der elektrophoretischen Auftrennung und Färbung mit Coomassie Blau.

In den durchgeführten *in-vitro*-Tests konnte für AtPCS2 keine Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 22), während für AtPCS1 die Aktivierung durch Cd^{2+} (Abb. 23) gezeigt werden konnte. Der Nachweis der Enzymaktivität erfolgte in einem Reaktionsmedium mit 5 mM GSH, 0,5 mM CdCl_2 , 1 mM DTT und 200 mM Tris-HCl (pH 8,0) bei 35°C. Es wurde 1,0 μg Protein eingesetzt. Die Berechnung der Katalysekonstante k erfolgte im linearen Bereich der Reaktion durch die Bestimmung der Konzentration des gebildeten Produktes (PC2) in Abhängigkeit von der Zeit ($t = 5$ bis 10 min) (Abb. 24). Für AtPCS1 errechnete sich daraus eine Enzymaktivität von 726,7 $\text{pkat}/\mu\text{g}$ Protein.

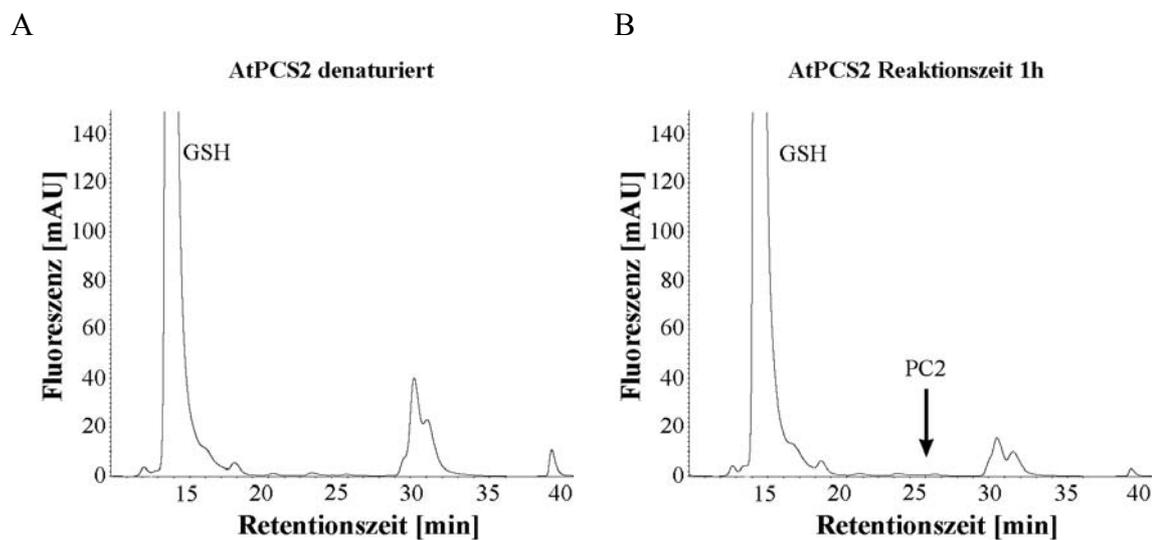


Abb. 22 Aktivität von AtPCS2 *in vitro*. **A** Thiolanalyse der Enzymreaktion mit denaturiertem AtPCS2-Protein. **B** Thiolanalyse eine Stunde nach Inkubation von rekombinant gereinigtem AtPCS2-Protein in Reaktionsmedium mit 5 mM GSH, 0,5 mM CdCl_2 und 200 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0). Die Thiole wurden mit mBrB derivatisiert und mit einer RP-HPLC analysiert. Die Detektion erfolgte bei 480 nm.

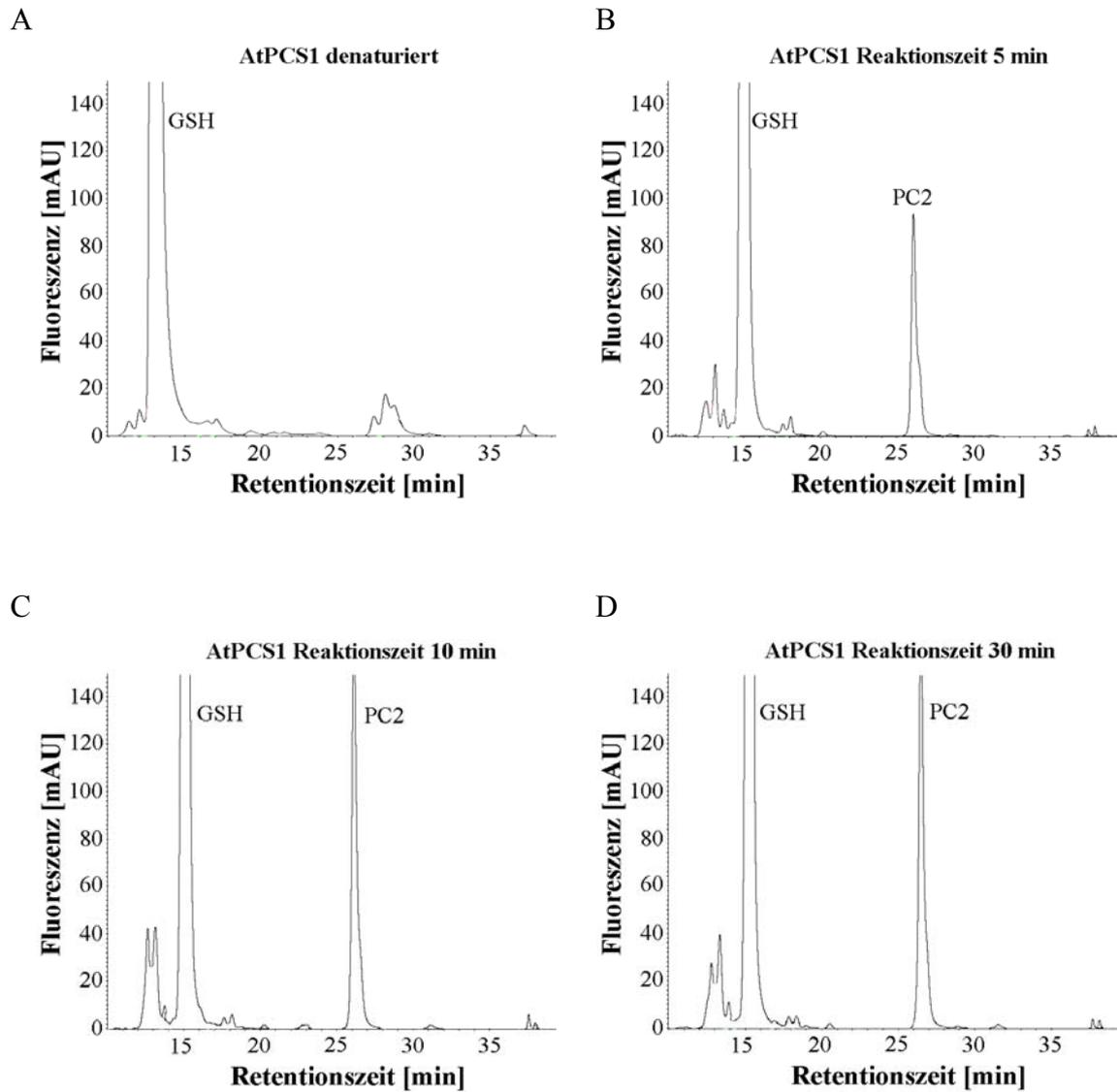


Abb. 23 Cd^{2+} -Aktivierung von AtPCS1 *in vitro*. A Thiolanalyse der Enzymreaktion mit denaturiertem AtPCS1-Protein. Analyse der zeitabhängigen Thiolbildung nach fünf (B), zehn (C) und 30 (D) Minuten. 1 μg Protein wurde in einem Reaktionsmedium mit 5 mM GSH, 0,5 mM CdCl_2 und 200 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) inkubiert. Die Thiole wurden mit mBrB derivatisiert und mit einer RP-HPLC analysiert. Die Detektion erfolgte bei 480 nm.

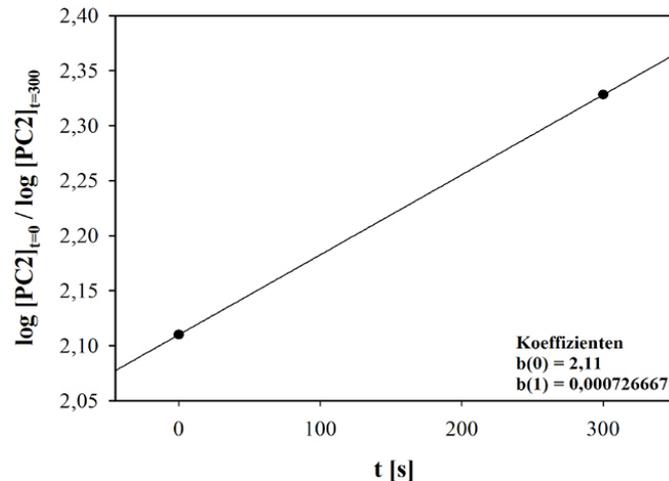


Abb. 24 Bestimmung der Katalysekonstante k für AtPCS1. Die Bestimmung erfolgte im linearen Bereich der Reaktion zwischen 5 und 10 Minuten.

3.3 Untersuchung zur Cu^{2+} -Aktivierung der PCS

Für beide PCS in *Arabidopsis* konnte die Aktivierung durch Cd^{2+} und Zn^{2+} *in vivo* gezeigt werden. Dies bestätigt, dass AtPCS1 und auch AtPCS2 funktionale PCS sind. Untersuchungen in Hefen verdeutlichen jedoch Unterschiede in ihrer Aktivierung. So wurde in einer heterologen Expression von *AtPCS1* und *AtPCS2* in *S. pombe* und *S. cerevisiae* nach Cu^{2+} -Behandlung nur in Hefen PCs nachgewiesen, die *AtPCS1* exprimierten. Für AtPCS2 konnte eine Cu^{2+} -Aktivierung nicht nachgewiesen werden (Cazalé und Clemens, 2001). Aufgrund der Unterschiede in der Cu^{2+} -Aktivierung war es möglich den Mechanismus der Aktivierung der PCS genauer aufzuklären und Aminosäuren zu identifizieren, die für die Cu^{2+} -Aktivierung wichtig sind. Um Unterschiede zwischen beiden PCS zu identifizieren, wurde in einer Sequenzanalyse die Proteinssequenz von AtPCS2 mit anderen pflanzlichen PCS verglichen (Abb. 25). Hier konnte festgestellt werden, dass fünf bestimmte Aminosäuren, konserviert in allen anderen PCS, verändert sind. Diese veränderten Aminosäuren sind in Bezug auf die AtPCS1-Sequenz A67S, D89E, C113S, V308L und C342Y, wobei die zweite Aminosäure nach der Zahl (Position) die veränderte Aminosäure in AtPCS2 angibt. Durch Mutationsanalysen sollten nun Aminosäuren identifiziert werden, die für die Cu^{2+} -Aktivierung mitverantwortlich sein könnten. Interessant ist, dass auch in *Arabidopsis halleri* die zweite PCS (AhPCS2; Cazalé und Clemens, nicht veröffentlicht) dieselben veränderten Aminosäuren besitzt, wie AtPCS2.

5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
MSMASLYRRSL	SPPAIDFAS	FEGKQIFNEALQKGTMEGF	FGLISYFQTQSEPAFCGLASL	AtPCS2							
MAMASLYRRSL	LPSPPAIDFSSAEGKLIFNEALQKGTMEGF	FRLISYFQTQSEPAYCGLASL	AtPCS1								
MAMASLYRRSL	LPSPPAIDFSSAEGKLIFNEALQKGTMEGF	FRLISYFQTQSEPAYCGLASL	AhPCS1								
MAMASLYRRSL	LPSPPAIDFSSAEGKIFNEALQKGTMEGF	FRLISYFQTQSEPAYCGLASL	BjPCS								
MAMAGLYRRV	LSPPAVDFASTE	GKQLFLEAIQNGTMEGF	FKLISYFQTQSEPAYCGLASL	NtPCS							
MAMASVYRRSL	LPSPPAIDFSSAEGKLIFNEALQKGTMEGF	FRLISYFQTQSEPAFCGLASL	TaPCS								
MAMASVYRRSL	LPSPPAIDFSSAEGKLIFNEALQKGTMEGF	FRLISYFQTQSEPAFCGLASL	TcPCS								
MATAGLYRRLL	PCPPAVEFAS	SQKQLFLESIQNGTMEGF	YKLVSYFQTQSEPAFCGLASL	GmPCS							
MAMASLYRRSL	LPSPPAIDFSSAEGKLIFNEALQKGTMEGF	FRLISYFQTQSEPAFCGLASL	TjPCS								
MALAGLYRRV	LSPPAVEFAST	EKKLFAEALQNGTMEGF	FKLISCFQTQSEPAYCGLASL	AsPCS							
MAVASVYKRV	LPCPPAIEFAS	QEGKVLFAEALSDGTMNGF	FRLISTFQTQAEPAFCGLSTL	AyPCS							
66	71	76	81	86	91	96	101	106	111	116	121
SMVLNLSL	IDPGRKWKGPWRWF	DESMLECC	PLEIVKDKG	ISFGKVVCLA	HSSGAKVEAFR	AtPCS2					
SVVLNALS	IDPGRKWKGPWRWF	DESMLDCC	PLEVVK	KEG	ISFGKVVCLA	HCSGAKVEAFR	AtPCS1				
SVVLNALS	IDPGRKWKGPWRWF	DESMLDCC	PLEVVK	KEG	ISFGKVVCLA	HCSGAKVEAFR	AhPCS1				
SVVLNALS	IDPGRKWKGPWRWF	DESMLDCC	PLEAVK	KEG	ISFGKVVCLA	HCSGAKVEAFR	BjPCS				
SMVLNALA	IDPGRKWKGPWRWF	DESMLDCC	PLEKVK	KAG	ISFGKVVCLA	HCAGAKVEAFR	NtPCS				
SVVLNALS	IDPGRKWKGPWRWF	DESMLDCC	VPLEVVK	DKG	ISFGKVVCLA	HCSGAKVEAFH	TaPCS				
SVVLNALS	IDPGRKWKGPWRWF	DESMLDCC	VPLEVVK	DKG	ISFGKVVCLA	HCSGAKVEAFH	TcPCS				
SMVLNALA	IDPGRKWKGPWRWF	DESMLDCC	PLETVK	KARG	ITFGKLVCLA	HCAGAKVEAFH	GmPCS				
SVVLNALS	IDPGRKWKGPWRWF	DESMLDCC	PLEVVK	DKG	ISFGKVVCLA	HCSGAKVEAFR	TjPCS				
SMVLNALA	IDPGRKWKGPWRWF	DESMLDCC	PLEKVK	KEEG	ITFGKVACLA	HCAGANVQA	IR	AsPCS			
TVVLNALS	IDPGRKWKGPWRWF	DESMLDCC	PLEKVK	KNG	ITFTKVTCLA	QCSGASVQA	FR	AyPCS			
127	132	137	142	147	152	157	162	167	172	177	182
TNQST	IDDFRK	YVVKCSTSDNCHM	ISTYHRQVLKQTGTGHFSP	IGGYNAERDMAL	ILDVAR	AtPCS2					
TSQST	IDDFRK	FVVKCTSS	ENCHMISTYHRSVFKQTGN	GHFSP	IGGYNAERDMAL	ILDVAR	AtPCS1				
TTQST	IEDFRK	FVLKCTSS	ENCHMIS	SYHKGVMQGTGTGHFSP	IGGYNAERDMAL	ILDVAR	AhPCS1				
TNQTT	IDDFRK	FVMKCTSS	ENCHMISTYHRGVFKQTGS	GHFSP	IGGYNAERDMAL	ILDVAR	BjPCS				
SNHST	IDDFRK	QVMAC	TTSDNCHL	ISSYHRGLFKQTGS	GHFSP	IGGYHVGKDMAL	ILDVAR	NtPCS			
TNQST	IDNFR	NFVVKCS	SDNCHMISTYHRE	IFKQTGTGHFSP	IGGYNAERDMAL	ILDVAR	TaPCS				
TNQST	IDNFR	NFVVKCS	SDNCHMISTYHRE	IFKQTGTGHFSP	IGGYNAERDMAL	ILDVAR	TcPCS				
ATHSS	IDDFRK	YVVKCSMS	DDCHV	ISSYHRAALKQTG	IGHFSP	IGGYHVGRDMAL	ILDVAR	GmPCS			
TNQST	IDNFR	NFVVKCSTSDNCHM	ISTYHRE	IFKQTGTGHFSP	IGGYNAERDMAL	ILDVAR	TjPCS				
TSQGS	LED	FRQHIR	CTSS	DDCHV	ITSYNRKA	FQGTGTGHFSP	IGGYHKGS	DMAL	ILD	TAR	AsPCS
ANQSS	LDLFR	SFVET	CVSS	DDHHL	IVSY	DRRPLKQTGTGHFSP	PLGGYHRQKDMAL	ILDVAR	AyPCS		

3.3.1 Generierung von *AtPCS1*-Mutationen

Die Aminosäuren, die in *AtPCS2* verändert sind, wurden im *AtPCS1*-Protein ausgetauscht. Nach den Methoden der Megaprimer-PCR-Mutagenese nach Tyagi *et al.* (2004) und der zielgerichtete Mutagenese in doppelsträngigen Plasmiden mit dem „AccuPrime™ Pfx SuperMix“ (Invitrogen) wurden die verschiedenen *AtPCS1*-Mutationen hergestellt (Tab. 11). Durch Sequenzierung wurde die Richtigkeit der Genkonstrukte überprüft und anschließend in der *S. cerevisiae* $\Delta cup1$ -Hefemutante exprimiert.

Tab. 11 Name und Mutation der hergestellten *AtPCS1*-Konstrukte

Name	Basenaustausch	Aminosäureaustausch
AtPCS1A67S	GCT → TCT	Ala → Ser
AtPCS1D89S	GAT → GAA	Asp → Ser
AtPCS1C113S	TGT → TCT	Cys → Ser
AtPCS1V308L	GTG → CTT	Val → Leu
AtPCS1C342Y	TGT → TAT	Cys → Tyr

Das *CUP1*-Genprodukt von *S. cerevisiae* gehört zur Familie der Metallothioneine. CUP1 bindet 8 Kupferatome über die Seitenkettengruppen von zwölf Cys. Neben Cu^+ und Cu^{2+} kann auch Cd^{2+} und Zn^{2+} gebunden werden (Hamer *et al.*, 1985; Winge *et al.*, 1985). Hefen, in denen *CUP1* defekt ist, zeigen neben einer erhöhten Cu^+ - und Cu^{2+} -Sensitivität auch eine erhöhte Cd^{2+} -Sensitivität (Hamer *et al.*, 1985). Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Cd^{2+} - und Cu^{2+} -Hypersensitivität der *S. cerevisiae* $\Delta cup1$ -Mutante durch eine heterologe Expression von *AtPCS1* komplementiert werden kann. Wegen dieses Phänotyps und der Komplementation durch *AtPCS1* wurde die $\Delta cup1$ -Hefemutante für die Untersuchung zur Cu^{2+} -Aktivierung der *AtPCS1*-Mutationen verwendet. Durch die Komplementation des $\Delta cup1$ -Phänotyps bei erhöhten Cd^{2+} -Konzentrationen würde gezeigt werden, dass die eingeführte Mutation in *AtPCS1* nicht zum Verlust in der Aktivität führt. Dadurch könnten Aminosäuren identifiziert werden, die an der Cu^{2+} -Aktivierung von *AtPCS1* beteiligt sind. Diese *AtPCS1*-Mutationen würden die Cu^{2+} -Sensitivität von $\Delta cup1$ nicht oder nur teilweise komplementieren.

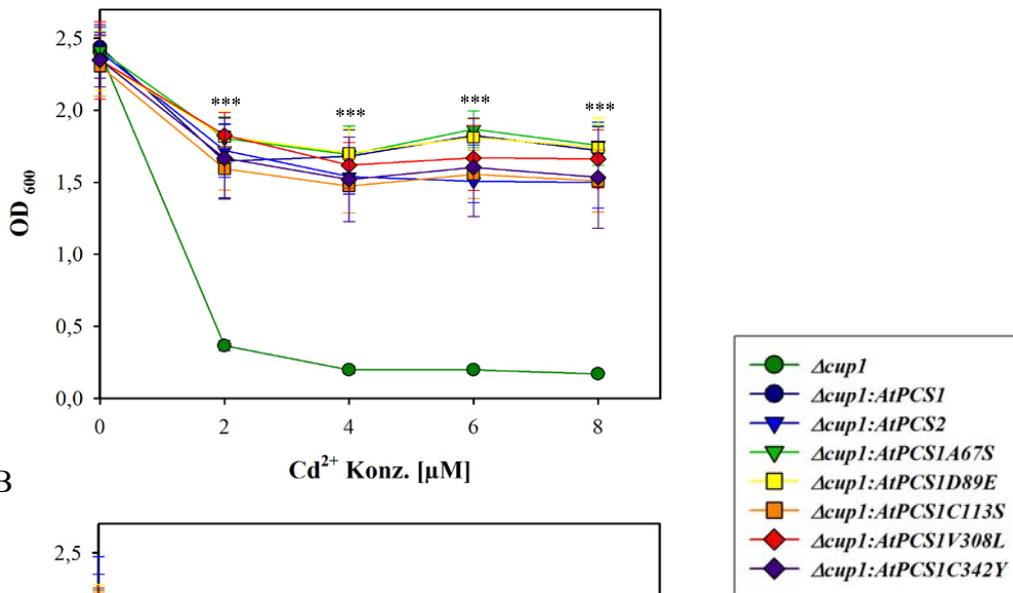
3.3.2 Physiologische Untersuchung der *AtPCS1*-Mutationen in $\Delta cup1$

3.3.2.1 Untersuchung des Zellwachstums bei erhöhten Cd^{2+} - und Cu^{2+} -Konzentrationen

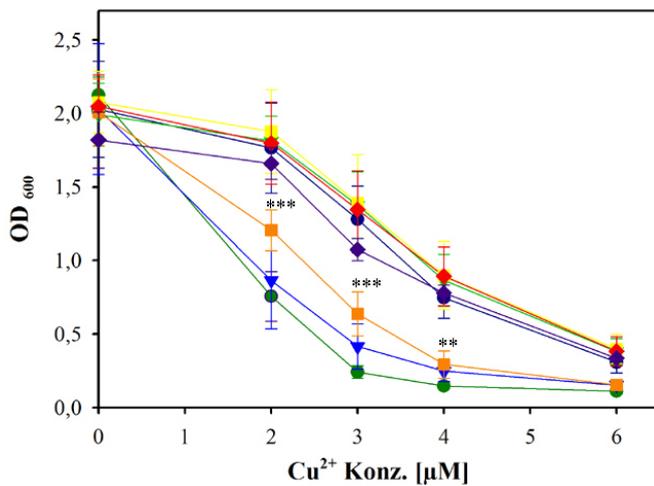
Physiologische Untersuchungen in $\Delta cup1$ -Hefezellen sollten nun Aufschluss über die Metallaktivierung der *AtPCS1*-Mutationen geben. Dazu wurde das Wachstum von Hefen nach Cd^{2+} - und Cu^{2+} -Behandlung verglichen. Keine verminderte Cd^{2+} -Toleranz wurde in $\Delta cup1$ -Hefezellen festgestellt, in denen die mutierten *AtPCS1*-Versionen für A67S, D89E, C113S, V308L und C342Y exprimiert wurden (Abb. 26A). Die Expression in $\Delta cup1$ zeigte eine vollständige Komplementation der Cd^{2+} -Hypersensitivität der $\Delta cup1$ -Mutante. Es wurden Cd^{2+} -Konzentrationen gewählt, die zu einer deutlichen Verminderung des Wachstums von $\Delta cup1$ mit leerem Vektor ($\Delta cup1$) führten. Das Wachstum wurde bereits durch Zugabe von 2 μM Cd^{2+} in das Medium zu 85 % inhibiert. Und nach 4 μM Cd^{2+} war das Wachstum schon über 90 % inhibiert. Für die Expression von *AtPCS2* in $\Delta cup1$ ($\Delta cup1:AtPCS2$) wurde nach Cd^{2+} -Behandlung eine vollständige Komplementation beobachtet, wie sie bereits in *S. pombe* Δpcs -Zellen gezeigt wurde (Cazalé und Clemens, 2001). Das Wachstum der $\Delta cup1$ -Hefen wurde zur Überprüfung auf Agarplatten untersucht. Hefezellen mit verschiedener Zellverdünnung (OD_{600}) wurden auf Agarplatten ohne Schwermetallzugabe bzw. mit 30 μM Cd^{2+} getropft und für 48 h bei 30°C inkubiert. Die Beobachtungen an den Flüssigkulturen wurden bestätigt (Abb. 26C). Nach Cu^{2+} -Behandlung konnte eine erhöhte Sensitivität von $\Delta cup1$ -Hefezellen festgestellt werden, die *AtPCS2* oder die mutierte *AtPCS1*-Version für C113S ($\Delta cup1:AtPCS1C113S$) exprimierten (Abb. 26B). Das Wachstum war in Flüssigkulturen mit 2 μM Cu^{2+} bei $\Delta cup1:AtPCS2$ zu 57 % und bei $\Delta cup1:AtPCS1C113S$ zu 40 % reduziert. Während bei $\Delta cup1:AtPCS1$ und $\Delta cup1$ mit den *AtPCS1*-Mutationen für A67S, D89E, V308L oder C342Y das Wachstum kaum beeinflusst war. Die Reduktion im Wachstum lag zwischen 9 und 13 %. $\Delta cup1$ -Hefezellen mit leerem Vektor zeigten eine Reduktion von 64 %. Eine fast 90-prozentige Reduktion im Wachstum von $\Delta cup1:AtPCS2$ und $\Delta cup1:AtPCS1C113S$ wurde nach Zugabe von 4 μM Cu^{2+} im Medium festgestellt. Für die $\Delta cup1$ -Mutante war bei dieser Konzentration die Wachstumsverminderung über 90 %. $\Delta cup1:AtPCS1$, und $\Delta cup1$ -Hefezellen mit den *AtPCS1*-Mutationen für A67S, D89E, V308L oder C342Y zeigten eine Reduktion von 63 % bzw. 56 bis 57 % im Wachstum. Zwischen $\Delta cup1:AtPCS1C113S$ -Hefezellen und der $\Delta cup1$ -Mutante konnten deutliche

Unterschiede im Wachstum bei niedrigen Cu^{2+} -Konzentrationen (2-3 μM) festgestellt werden. Diese Unterschiede, die durch statistische Analysen (ANOVA) als signifikant bewertet wurden, deuten auf eine Restaktivität der AtPCS1C113S-Mutation hin. Untersuchungen des Wachstums von Δcup1 -Hefen auf Agarplatten mit 40 μM Cu^{2+} im Medium bestätigten die Beobachtungen an den Flüssigkulturen (Abb. 26C).

A



B



C

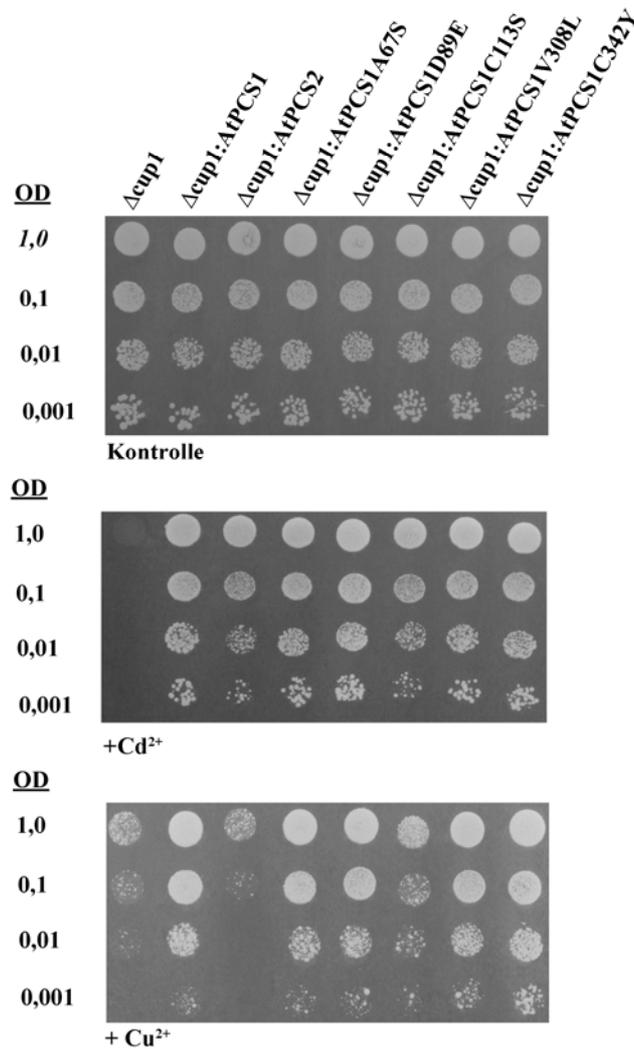
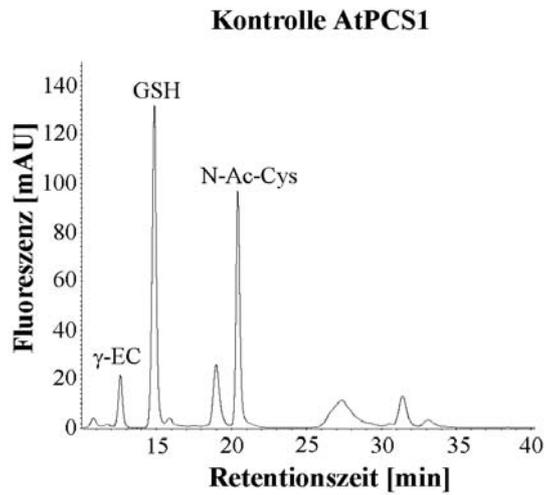


Abb. 26 Untersuchung von *AtPCS1*-Mutationen auf die Toleranz von $\Delta cup1$ -Hefezellen. Vergleich des Wachstums von $\Delta cup1$ -Hefezellen, in denen *AtPCS1* (dunkelblaue Kreise), *AtPCS2* (hellblaue Dreiecke), *AtPCS1A67S* (hellgrüne Dreiecke), *AtPCS1D89E* (gelbe Vierecke), *AtPCS1C113S* (orange Vierecke), *AtPCS1V308L* (rote Karos), *AtPCSC342Y* (blaue Karos) und leerer Vektor (grüne Kreise) exprimiert wurde. **A + B** Wachstum von $\Delta cup1$ -Hefen in Flüssigkulturen nach Zugabe von Cd^{2+} (**A**) bzw. Cu^{2+} (**B**). Fehlerbalken stellen die Stabwn. dar. Signifikanzlevel der ANOVA aus dem Vergleich zwischen $\Delta cup1::AtPCS1C113S$ -Hefen und der $\Delta cup1$ -Mutante: nicht signifikant „“ $> 0,05$; „*“ $< 0,05$; „**“ $< 0,01$; „***“ $< 0,001$. (n = 3 bis 6). **C** Wachstum von $\Delta cup1$ -Hefen auf Agarplatten ohne Schwermetalle, mit $30 \mu M Cd^{2+}$ bzw. $40 \mu M Cu^{2+}$ im Medium. Links dargestellt ist die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) der verschiedenen Zellverdünnungen, die für die Animpfung verwendet wurde.

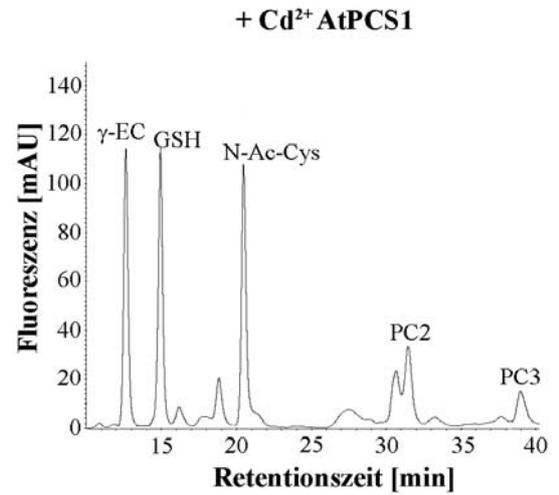
3.3.2.2 PC-Bildung nach Cd²⁺- und Cu²⁺-Behandlung

Untersuchungen von AtPCS1C113S in $\Delta cup1$ -Hefezellen zeigten, dass diese mutierte Version von *AtPCS1* die Cu²⁺-Sensitivität der $\Delta cup1$ -Mutante nicht mehr vollständig komplementieren kann. Nach Cd²⁺-Behandlung wurden jedoch keine Wachstumsunterschiede zu $\Delta cup1:AtPCS1$ festgestellt. Diese mögliche Restaktivität von AtPCS1C113S sollte durch den Nachweis der PC-Akkumulation nach Cd²⁺- und Cu²⁺-Behandlung gezeigt werden. $\Delta cup1$ -Hefezellen wurden dazu bei einer OD₆₀₀ von 0,6 mit 100 μ M Cd²⁺ bzw. 80 μ M Cu²⁺ für 24 h behandelt. Nach Erhalt der Hefeextrakte wurden die Thiole mit mBrB markiert, über eine RP-HPLC aufgetrennt und bei 480 nm nachgewiesen. Die Analysen ergaben für die AtPCS1C113S-Mutation eine verringerte PC-Akkumulation nach Cu²⁺-Behandlung, während die Cd²⁺-Aktivierung im Vergleich zu AtPCS1 unverändert war (Abb. 27). In $\Delta cup1:AtPCS1$ -Hefezellen wurden nach Cu²⁺-Behandlung geringe Mengen von PC2 und PC3 gebildet. $\Delta cup1:AtPCS1C113S$ -Hefezellen zeigten eine deutliche Reduktion im PC2-Gehalt. Eine PC3-Bildung konnte nicht nachgewiesen werden. Für $\Delta cup1:AtPCS2$ konnte, wie bereits durch Cazalé und Clemens (2001) gezeigt, die PC-Akkumulation nach Cd²⁺-Behandlung nachgewiesen werden, während nach Cu²⁺-Behandlung keine nachweisbaren PC akkumuliert wurden. Die mutierten *AtPCS1*-Versionen für A67S, D89E, V308L und C342Y zeigten nach Expression in $\Delta cup1$ eine Cd²⁺- und Cu²⁺-abhängige PC2- und PC3-Bildung ähnlich zu *AtPCS1*. Keine PC-Bildung konnte in $\Delta cup1$ -Hefezellen mit leerem Vektor nachgewiesen werden.

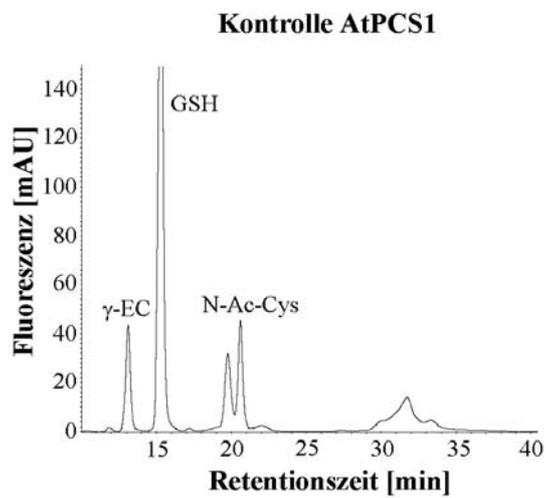
A



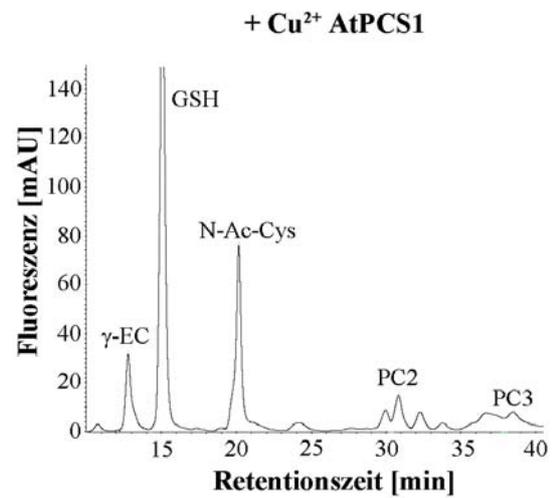
B



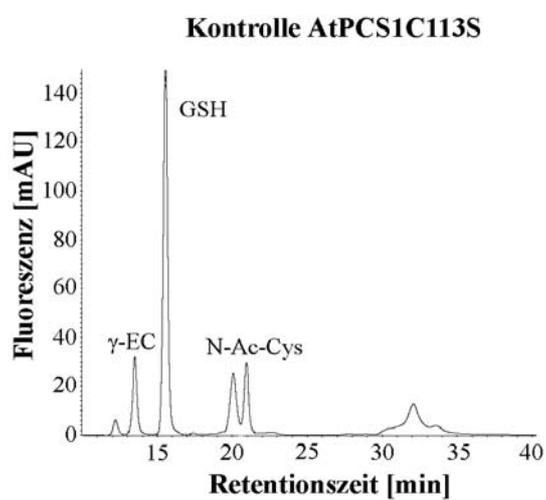
C



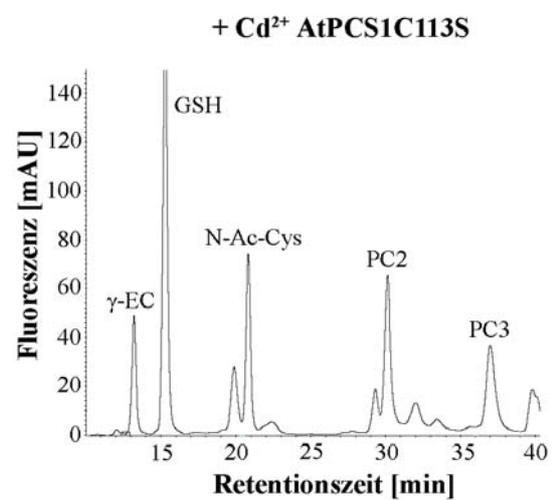
D



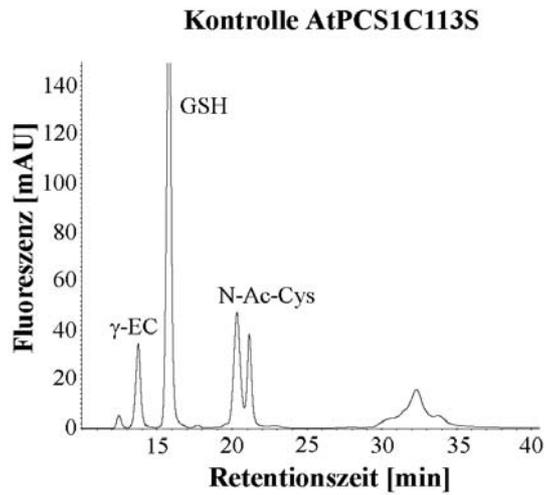
E



F



G



H

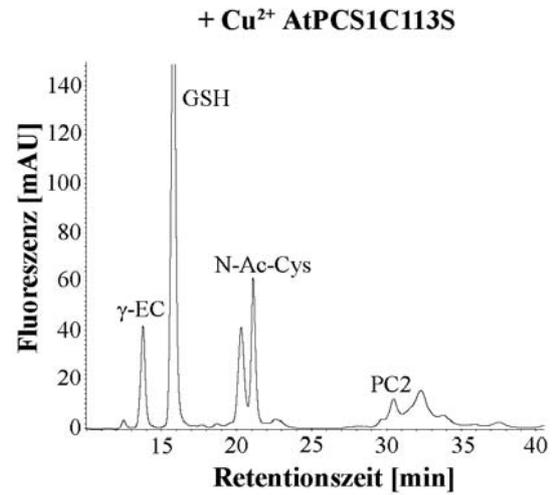


Abb. 27 Einfluss der Mutation C113S von AtPCS1 auf die Cu²⁺-abhängige PC-Bildung. Analyse der Thiolbildung nach Cd²⁺- und Cu²⁺-Behandlung von $\Delta cup1$ -Hefen, in denen *AtPCS1* (A - D) oder *AtPCS1C113S* (E - H) exprimiert wurde.

4 Diskussion

4.1 Evolutionäre Konservierung der PCS

Die Verbreitung der PCS-Gene im Pflanzenreich, aber auch in anderen Eukaryonten ist rätselhaft. Bekannt ist, dass in Pflanzen und Algen die PC-Synthese essenziell ist für die Toleranz gegenüber verschiedenen nicht-essenziellen Schwermetallen und Metalloiden wie Cd, Hg und As. Diese Elemente sind stark toxisch und kommen überall vor, jedoch nur in sehr geringen Konzentrationen. Erhöhte Schwermetallkonzentrationen waren während der Evolution auf wenige natürliche Habitate beschränkt. Erst durch die Industrialisierung traten sie verstärkt auf. Dies macht es schwer, die Konservierung der funktionalen PCS-Gene im Pflanzenreich auf die Toxizität der oben genannten Metalle zurückzuführen (Schat *et al.*, 2002; Clemens, 2006a). Außerdem ist ungeklärt, warum die PCS-Proteine in der gesamten Pflanze konstitutiv exprimiert werden. Drei Theorien die eine evolutionäre Konservierung erklären sollen, stehen zur Diskussion.

In marinen Ökosystemen kommt das Schwermetall Cd^{2+} in gleicher Konzentration vor wie die meisten Nährstoffe (Lane und Morel, 2000). Cd^{2+} ist den Mikroelementen chemisch ähnlich und wurde als ein essenzielles Element in einer Isoform der Carboanhydrase in Diatomeen nachgewiesen (Lane und Morel, 2000; Lane *et al.*, 2005). Aus diesem Grund ist es möglich, dass Cd eine nützliche Funktion als essenzielles Schwermetall hat und zu der Konservierung der PCS-Gene beitrug. Eine solche Funktion des Cd^{2+} wurde in Pflanzen bisher nicht nachgewiesen.

In einer neueren Theorie wird eine zusätzliche wichtige Funktion im Glutathionstoffwechsel angenommen. Aufgrund einer weiteren Aktivität von AtPCS1, der Abspaltung des Glycins von GS-Konjugaten (Beck *et al.*, 2003), ist die Konservierung der PCS-Gene möglicherweise erklärbar. Diese Reaktion ist der erste Schritt zum Abbau von GS-Konjugaten in Pflanzen (Beck *et al.*, 2003). Putative PCS-homologe Proteine wurden in Bakterien identifiziert, die möglicherweise die Vorläufer der heutigen eukaryontischen PCS sind. Das aus einem dieser Bakterien, Cyanobakterium *Nostoc sp.* PCC 7120, isolierte Protein (alr0975) katalysiert die Abspaltung des Glycins von GSH (Harada *et al.*, 2004; Tsuji *et al.*, 2004). Diese beiden Hinweise legen nahe, dass die PCS möglicherweise eine Aktivität als Peptidase für GSH und GS-Konjugate besitzen. Diese Aktivität ist aber *in planta* nicht bestätigt.

Eine weitere Theorie ist die Beteiligung der PCS an der Metallhomöostase essenzieller Metalle. Hinweise für eine Funktion der PC in der Toleranz oder Homöostase von

essenziellen Schwermetallen wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben. Es wurde aber vermutet, dass die PCS eine Funktion in der Homöostase essenzieller Metalle haben könnten. Erste Hinweise kamen durch den Nachweis einer geringen PC-Bildung in Zellkulturen in Abwesenheit von erhöhten Schwermetallkonzentrationen (Steffens *et al.*, 1986; Grill, 1987; Grill *et al.*, 1988). Doch für die *cad1-3*-Mutante von *Arabidopsis* hat die PC-Defizienz keinen Einfluss auf das Wachstum bei erhöhten oder erniedrigten Mikroelementen (Howden *et al.*, 1995a; Ha *et al.*, 1999). Es wurde daher angenommen, dass die PCS keine Funktion für die Homöostase essenzieller Metalle haben.

Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit konnten dies jedoch widerlegen. Für die *Arabidopsis cad1-3*-Mutante und die neu isolierte *cad1-6*-Mutante wurde ein signifikanter Verlust in der Zn^{2+} -Toleranz bei erhöhten Zn^{2+} -Konzentrationen festgestellt (Abb. 7). Die Zn^{2+} -Hypersensitivität war für beide *cad1*-Mutanten unter diesen experimentellen Bedingungen ähnlich. Die *cad1-6*-Mutante bestätigte bei gezieltem Ausschalten des *AtPCS1*-Gens (T-DNA-Insertion in Exon 8) den Phänotyp der *cad1-3*-Mutante. Unterschiede ergaben sich in der Cd^{2+} -Sensitivität. Die Inhibierung des Wachstums nach Cd^{2+} -Behandlung war für die *cad1-6*-Mutante nicht so stark ausgeprägt wie für *cad1-3*.

Aufgrund dieses Phänotyps beider *cad1*-Mutanten konnte die mögliche Funktion der PCS in der Zn^{2+} -Homöostase erneut untersucht werden. Untersuchungen von Tennstedt *et al.* (2006) in Hefen unterstützten diese Vermutung. In der $\Delta zhf-pcs$ -Mutante wurde ein zusätzlicher Verlust in der Zn^{2+} -Toleranz im Vergleich zur Δzhf -Mutante (Clemens *et al.*, 2002a) beobachtet. Weiterhin führte die Expression von *TaPCS* in der *zrc1 cot1*-Mutante zu einer partiellen Wiederherstellung der Zn^{2+} -Toleranz. Für diese Beobachtungen ist anzunehmen, dass erhöhte cytosolische Zn^{2+} -Konzentrationen auch in Anwesenheit von anderen potentiellen Liganden durch PC *in vivo* komplexiert werden (Tennstedt *et al.*, 2006). In *Arabidopsis* wurden bisher keine PC- Zn^{2+} -Komplexe *in vivo* nachgewiesen (Maitani *et al.*, 1996; Cobbett und Goldsbrough, 2002). Zn^{2+} ist aber ein Aktivator der PC-Synthese, was durch *in vitro*-Untersuchungen mit rekombinant gereinigter *AtPCS1* nachgewiesen wurde (Vatamaniuk *et al.*, 2000). Dass Zn^{2+} die PC-Synthese aktiviert, wurde nach Behandlung von *Arabidopsis* mit erhöhten Zn^{2+} -Konzentrationen *in planta* bestätigt. Die Quantifizierung der PC-Bildung erfolgte durch die Etablierung eines sehr sensitiven Nachweises von PC2 durch die Methode der CapLC-ESI-QTOF-MS. Unter diesen Nachweisbedingungen wurde nach Zn^{2+} -Behandlung in Wurzeln von WT Col-0 eine PC2-Akkumulation nachgewiesen, die

34 % der PC2-Menge von Cd²⁺-behandelten Pflanzen erreichte (Abb. 13). In den Blättern war die PC2-Akkumulation 28 %. Die Untersuchungen beschränkten sich auf die PC2-Analyse, weil ein geeigneter Standard synthetisiert werden konnte und das PC2-Biman-Konjugat im Nachweisbereich des ESI-QTOF-MS lag (100-1000 Da). Aufgrund der Sensitivität dieser Methode war es möglich, geringe Mengen an PC2 quantitativ zu analysieren. Damit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass geringe Mengen PC2 in den Wurzeln und Blättern auch in Abwesenheit von erhöhten Mikroelement-Konzentrationen synthetisiert werden. Interessanterweise wurden auch in den Wurzeln von Cd²⁺- und Zn²⁺-behandelten sowie in den Blättern Cd²⁺-behandelter *cad1-3*-Pflanzen geringe PC2-Mengen gemessen. Alle bisherigen Untersuchungen zur PC-Quantifizierung in der *cad1-3*-Mutante kamen zu dem Ergebnis, dass keine PC nachweisbar sind (Howden *et al.*, 1995a; Gong *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006). Die nachgewiesene PC2-Akkumulation in der *cad1-3*-Mutante ist entweder auf eine Restaktivität der *AtPCS1*-Mutation oder auf eine Aktivität von *AtPCS2* zurückzuführen. Für *AtPCS2*, die zweite PCS in *Arabidopsis*, konnte eine Aktivität in einer heterologen Expression in Hefen bereits gezeigt werden (Cazalé und Clemens, 2001). Die geringste PC2-Konzentration die durch die Methode CapLC-ESI-QTOF-MS nachgewiesen werden konnte war 2 pmol. Diese Konzentration entsprach der geringsten Standardkonzentration von 1 µM PC2. Entsprechend dem angewandten Protokoll der Extraktion aus Pflanzenproben entspricht dies einer Nachweisgrenze von 39 µg PC2/g TG. Die Nachweisgrenze war sehr niedrig und wurde von anderen Methoden nicht erreicht. Howden *et al.* (1995a) quantifizierten die PC-Akkumulation durch Verwendung der RP-HPLC in Verbindung mit einer Nachsäulenderivatisierung. Die erreichte Nachweisgrenze war lediglich 0,2 nmol PC2. Diese Methode, ebenfalls von Gong *et al.* (2003) verwendet, ist für einen Nachweis sehr geringer PC-Mengen nicht sensitiv genug. Eine PC-Akkumulation in der *cad1-3*-Mutante wurde nach Cd²⁺-Behandlung in einer ähnlichen Methode, wie in dieser Arbeit verwendet, durch Chen *et al.* (2006) nicht nachgewiesen. Die Analyse erfolgte in hydroponischen Kulturen drei Tage nach Behandlung mit 20 µM CdCl₂. Die Thiole der pflanzlichen Extrakte wurden mit mBrB derivatisiert und durch eine CapLC-MS analysiert. Jedoch konnte auch mit dieser sensitiven Methode eine PC-Akkumulation in den Wurzeln der *cad1-3*-Mutante nicht nachgewiesen werden. Aussagen über die Nachweisgrenze wurden nicht gemacht, so dass ein Vergleich nicht möglich ist. Unabhängig von der in dieser Arbeit nachgewiesenen geringen PC-Akkumulation in der *cad1-3*-Mutante ist die Ursache für

die erhöhte Cd^{2+} - und Zn^{2+} -Sensitivität eine stark verminderte PC-Akkumulation, die auf die Inaktivierung des *AtPCS1*-Gens zurückzuführen ist. Durch die neu isolierte *cad1-6*-Mutante wurde dieses Ergebnis bestätigt. Eine Verminderung der Aktivität von *AtPCS1* durch die T-DNA-Insertion im *cad1*-Gen führt zu einer verringerten PC-Bildung und zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Cd^{2+} und Zn^{2+} (Tennstedt *et al.*, 2006).

Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit dem Einfluss der PC-Defizienz auf die Zn^{2+} -Aufnahme. Die Metallaufnahme wird durch die Aktivität der Metallaufnahmetransporter und das Vorhandensein cytosolischer Komplexbildner bestimmt (Frausto da Silva und Williams, 2001). In *cad1-3*- und *cad1-6*-Pflanzen ist die Zn^{2+} -Aufnahme signifikant reduziert (Abb. 14). Die Reduktion in den Wurzeln war im Vergleich zu WT Col-0 ungefähr 50 %. Diese Beobachtung deutet auf eine Zn^{2+} -Komplexierung durch PC bei erhöhten Zn^{2+} -Konzentration hin. PC- Zn^{2+} -Komplexe wurden jedoch nicht direkt nachgewiesen. Dieser Nachweis würde die Annahme stark unterstützen, dass die PC an der Homöostase essenzieller Metalle beteiligt sind. Eine weitere Möglichkeit, diese Annahme zu stützen, wäre der Nachweis, dass eine Überexpression der PCS in *Arabidopsis*-WT-Pflanzen zu einer gesteigerten Zn^{2+} -Toleranz führt. Transgene WT Col-0-Pflanzen, in denen *CePCS* unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert wird, könnten dies zeigen. Erste Untersuchungen wurden bereits durchgeführt und deuten auf eine leicht erhöhte Zn^{2+} -Toleranz hin. Diese Experimente konnten aufgrund zu weniger Daten nicht für diese Arbeit berücksichtigt werden. Die Bindung von Zn^{2+} durch PC legt nahe, dass der PC-Syntheseweg ein mögliches Ziel zur genetischen Veränderung der Zn^{2+} -Akkumulation in bestimmten Geweben ist. Dies könnte von großer Bedeutung für genetisch veränderte Nutzpflanzen sein, ein Mittel im Kampf gegen Mikronährstoffdefizienz weltweit.

Ein wichtiger Schritt in der Detoxifikation erhöhter Schwermetallkonzentrationen ist neben der Ausscheidung aus dem Cytosol und der Sequestrierung in verschiedene Zellkompartimente die Komplexierung (Clemens, 2001). Die PC sind maßgeblich an der Detoxifizierung von nicht-essenziellen Schwermetallen beteiligt. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen aber vermuten, dass die PC an der Detoxifizierung und Akkumulation von essenziellen Metallen wie Zn beteiligt sind. Diese Funktion erklärt möglicherweise die evolutionäre Konservierung der PCS im Pflanzenreich. Es gibt Hinweise auf die Beteiligung von zwei Transportern an der Detoxifikation erhöhter Zn^{2+} -Konzentrationen. Der eine Transporter ist *AtMTP1* („Metal Tolerant Protein 1“),

welcher zur Familie der CDF-Transporter gehört und an der Sequestrierung von Zn^{2+} in die Vakuole beteiligt ist (Kobae *et al.*, 2004; Desbrosses-Fonrouge *et al.*, 2005). Der andere ist AtHMA4 („Heavy Metal-transporting p-type ATPase“) aus der Familie der P-type ATPasen der 1_B Unterfamilie und ist am Zn^{2+} -Efflux beteiligt (Mills *et al.*, 2005; Hussain *et al.*, 2004). Zu klären ist, wie der Transport von Zn^{2+} stattfindet. Möglicherweise wird Zn^{2+} als Zn^{2+} -PC-Komplex z. B. in die Vakuole transportiert. In der Vakuole erfolgt die Bildung der HMW-Komplexe durch die Einlagerung von Schwefel (Verkleij und Schat, 1990; Ortiz *et al.*, 1992; Mehra *et al.*, 1994).

Ungeklärt bleibt weiterhin, ob die geringe PC-Bildung, die in dieser (Abb. 13) und auch in anderen Untersuchungen unter nicht-toxischen, physiologischen Bedingungen nachgewiesen wurde, eine Funktion in der Metallhomöostase von Zn^{2+} und anderen essenziellen Mikroelementen besitzt (Schat *et al.*, 2002). Die PC könnten innerhalb der Zelle Metalle zu bestimmten Zielorten (z. B. Apo-Metalloproteine) transportieren. Ebenso ist ein Transport zwischen den Zellen oder auch zu den verschiedenen Pflanzengeweben möglich. Ein derartiger Langstreckentransport von PC-Metall-Komplexen konnte indirekt nachgewiesen werden. Nach Expression der *TaPCS* in der PC-defizienten *cad1-3*-Mutante unter der Kontrolle eines wurzelspezifischen Promotors konnten PC und Cd in den Blättern nachgewiesen werden. Zugleich wurde eine Reduktion der Cd-Menge in den Wurzeln festgestellt. In einem ähnlichen Experiment konnte nach Expression von *TaPCS* unter der Kontrolle eines blattspezifischen Promotors ein umgekehrter Langstreckentransport indirekt nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 2006). Die reduzierte Zn^{2+} -Aufnahme der *cad1*-Mutanten lässt weiterhin einen Zn^{2+} -Mangel vermuten. Ein nützlicher Effekt der PCS-Gene unter Zn^{2+} -Mangelbedingungen wurde nicht festgestellt (Kap. 3.1.8). Real-Time-PCR-Analysen der Gene *AtZIP9* und *AtNAS2* (Wintz *et al.*, 2003; Lopez-Millan *et al.*, 2004) haben gezeigt, dass sie unter normalen Wachstumsbedingungen in *cad1-3*- und *cad1-6*-Pflanzen nicht aktiviert werden. Zur vollständigen Klärung müssten weitere Zn^{2+} -abhängige Prozesse untersucht werden, die durch PC-Defizienz beeinflusst werden. Das Ausmass der PC-Defizienz auf weitere Zn^{2+} -abhängige Prozesse ist schwer vorhersagbar. Möglicherweise sind die PC nicht entscheidend an der Zn^{2+} -Mobilisierung bei Zn^{2+} -Mangel beteiligt, wie die Ergebnisse der Real-Time-PCR vermuten lassen. Ein nützlicher Effekt der PCS-Gene unter Zn^{2+} -Mangel könnte durch die Ausschaltung anderer Zn^{2+} -abhängiger Proteine erkennbar sein. Ein mögliches Ziel sind hier die Aufnahmetransporter der ZIP-Familie. Die Zn^{2+} -Defizienz könnte

zusätzlich durch eine PC-Defizienz verstärkt werden. Da Zn^{2+} für Transkriptionsfaktoren essenziell ist, führt ein Zn^{2+} -Mangel zu einer verlangsamten Zellteilung, welches wiederum zu einer Entwicklungsdefizienz führt.

Eine widersprüchliche Beobachtung zu den Untersuchungen des Wachstums von *cad1-3*- und *cad1-6*-Pflanzen mit definiertem Pflanzenmedium wurde im Wachstum auf Schwermetall-kontaminierter Erde aus Langelsheim festgestellt (Abb. 15). Unter diesen experimentellen Bedingungen zeigten beide *cad1*-Mutanten im Vergleich zu WT Col-0-Pflanzen eine erhöhte Toleranz. Im Gegensatz dazu wurde eine erhöhte Sensitivität beider *cad1*-Mutanten bei Untersuchungen des Keimlingswachstums auf Agarplatten mit 1/10 Hoagland-Medium nach Zugabe von Cd^{2+} oder Zn^{2+} festgestellt (Abb. 7). Die PC-Defizienz hat einen unerwarteten Einfluss auf die Toleranz gegenüber verschiedenen erhöhten Schwermetallkonzentrationen in natürlichen Böden. Eine Ursache könnte die verringerte Metallaufnahme in beiden *cad1*-Mutanten sein, wie sie in Experimenten mit definiertem Pflanzenmedium beobachtet wurde (Abb. 14). Die Aufnahmerate könnte aufgrund der Reduktion potentieller Bindungsstellen (PC) im Cytosol in der Pflanze reduziert sein. Um die Ursache dieser erhöhten Toleranz der *cad1*-Mutanten zu ermitteln, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Anzumerken ist, dass *cad1-6* keine „Nullmutante“ ist. Die T-DNA-Insertion in Exon 8 führt nicht zur vollständigen Inaktivierung des *cad1*-Gens. Dies haben die Untersuchungen im Keimlingswachstum und der PC2-Akkumulation nach Cd^{2+} -Behandlung gezeigt (Abb. 7 und Abb. 13). Eine andere T-DNA-Insertionsmutante, die eine Insertion im Gen trägt, stand nicht zur Verfügung. Aufgrund dieser Unterschiede der *cad1-6*- zur *cad1-3*-Mutante lassen sich aber wichtige Funktionen der PCS für die Metallaktivierung ableiten.

4.2 Die Metallaktivierung der PCS

Die PCS können durch verschiedene Metallionen aktiviert werden. Voneinander unabhängige *in-vitro*-Untersuchungen bestätigten die Aktivierung der PCS durch die Metall- und Metalloid-Ionen Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Sb^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} AsO_4^- und andere (Vatamaniuk *et al.*, 2000; Oven *et al.*, 2002). Wie eine Metallbindung stattfindet, wurde noch nicht identifiziert. In verschiedenen Proteinen erfolgt die Metallbindung über die SH-Gruppen der Cysteine oder über die Komplexbildung mit anderen Aminosäuren, z. B. His. Bekannte Motive sind Cys-Xaa-Xaa-Cys oder Cys-Cys der Metallothioneine, welche verschiedene Metalle komplexieren können (Robinson *et al.*, 1993; Cobbett und

Goldsbrough, 2002). Das Motiv Cys-Xaa-Xaa-Cys wurde auch in P-type ATPase-Transportern wie RAN1 (Solioz und Vulpe, 1996; Hirayama *et al.*, 1999) oder auch in Metallochaperone wie AtX1 und CCH (Himmelblau *et al.*, 1998; Huffman und O'Halloran, 2001) gefunden. Putative Metallbindestellen sind ebenso in verschiedenen Transportern der ZIP- und der CDF-Familien bekannt. Die Metallbindung erfolgt hier über die Histidin-reichen cytoplasmatischen Loops zwischen den Transmembrandomänen (Paulsen und Saier, 1997; Guerinot und Eide, 1999). Für AtPCS1 wurde die Bindung von Cd²⁺ in einer Stoichiometrie von ca. 7 mol Cd²⁺/ mol Protein *in vitro* nachgewiesen (Vatamaniuk *et al.*, 2000). Weiterhin konnten durch die Erstellung von Peptidbibliotheken putative Cd²⁺-Bindestellen in SpPCS und TaPCS identifiziert werden. Die Cd²⁺-Bindestellen sind sowohl im N-terminalen, als auch im C-terminalen Bereich verteilt (Maier *et al.*, 2003). Ergebnisse von Ruotolo *et al.* (2004) bestätigten die Cd²⁺-Bindung von AtPCS1 *in vivo*. *In-vivo*-Daten durch Ruotolo *et al.* (2004) gaben einen klaren Hinweis, dass eine Cd²⁺-Bindung an AtPCS1 stattfindet. So kann der C-terminale Bereich von AtPCS1 die Cd²⁺-Toleranz einer sensitiven *S. cerevisiae*-Mutante *in vivo* ohne PCS-Aktivität erhöhen. Das bedeutet, dass Cd²⁺ durch das Protein effizient in Anwesenheit von hohen Konzentrationen anderer Thiolliganden komplexiert werden kann (Ruotolo *et al.*, 2004).

Untersuchungen dieser Arbeit sind im Einklang mit den Argumenten der direkten Metallbindung an die PCS-Proteine. Die Metallbindung wird als ein möglicher Mechanismus der Aktivierung der PCS verstanden. Wie bereits erwähnt, wurde in den durchgeführten Experimenten ein Unterschied zwischen der *cad1-3*- und der *cad1-6*-Mutante nach Cd²⁺-Behandlung festgestellt. Beide Mutanten sind ähnlich in ihrer Zn²⁺-Hypersensitivität, während der Cd²⁺-Phänotyp der *cad1-6*-Mutante nicht so stark ausgeprägt war, wie von der *cad1-3*-Mutante (Abb. 7). Die Inhibierung des Wachstums der *cad1-3*-Mutante zeigte nach Cd²⁺-Behandlung eine Reduktion von 87,0 % in der Wurzellänge und 91 % im Keimlingsgewicht. Für *cad1-6* wurde eine Reduktion von 75,4 % bzw. 83,9 % festgestellt. Weiterhin wurde eine Induktion im PC2-Gehalt nach Cd²⁺-Behandlung nur in den Wurzeln der *cad1-6*-Mutante nachgewiesen (Abb. 13). Diese Restaktivität der *cad1-6*-Mutante steht im Einklang mit den Ergebnissen der Untersuchung der verkürzten Version von *AtPCS1* (*AtPCS1Δ409*) in *S. pombe*. (Abb. 9 und 10). Diese verkürzte Version entspricht etwa der T-DNA-Insertion von *cad1-6*. Für diese verkürzte Version von *AtPCS1* wurde nach Expression in Hefen ebenfalls eine geringe PC-Bildung nach Cd²⁺-Behandlung nachgewiesen. Diese Daten deuten auf eine

unterschiedliche Aktivierung der PCS durch Cd^{2+} und Zn^{2+} . Unterschiede in der Aktivierung durch Cd^{2+} und Zn^{2+} wurde in einer C-terminal verkürzten Version von AtPCS1 *in vitro* bereits festgestellt. Nach Verkürzung von AtPCS1 nach Aminosäure 372 konnte keine Zn^{2+} -Aktivierung nachgewiesen werden, während die Cd^{2+} -Aktivierung im Vergleich zu AtPCS1 unverändert war. Die erhaltenen Daten können als eine *in vivo* Bestätigung für die Hypothese interpretiert werden, dass der C-terminale Bereich der PCS für die Aktivierung eines breiteren Bereiches von Metallen einschließlich Zn^{2+} verantwortlich ist (Ruotolo *et al.*, 2004).

Für AtPCS1 und AtPCS2 wurde durch Cazalé und Clemens (2001) ein Unterschied in der Cu^{2+} -Aktivierung festgestellt. Beide PCS aus *Arabidopsis* werden durch Cd^{2+} aktiviert. Eine Aktivierung durch Cu^{2+} erfolgt jedoch nicht bei AtPCS2, so dass die PC-Bildung nicht aktiviert wird (Cazalé und Clemens, 2001). Durch einen Sequenzvergleich mit anderen pflanzlichen PCS wurden Aminosäuren identifiziert, die nicht in AtPCS2, aber in allen anderen PCS zu 100 % konserviert sind (Abb. 25). Mutationsanalysen in AtPCS1 sollten Aminosäuren identifizieren, die für die Cu^{2+} -Aktivierung wichtig sind. Durch physiologische Untersuchungen der verschiedenen mutierten AtPCS1-Versionen in der *S. cerevisiae* Δcup1 -Mutante wurde festgestellt, dass AtPCS1C113S die erhöhte Cu^{2+} -Sensitivität von Δcup1 nicht komplementieren kann (Abb. 26B und 26C). Die Cd^{2+} -Aktivierung dieser Mutation war unverändert und führte zur vollständigen Komplementation von Δcup1 (Abb. 26A und 26C). Im Gegensatz dazu wurde ein Verlust in der Cd^{2+} -Sensitivität in einer Mutation von C113 zu A113 in *S. pombe* gezeigt (Maier *et al.*, 2003). Der Nachweis einer starken PC-Akkumulation von Δcup1 -AtPCS1C113S-Hefen nach Cd^{2+} -Behandlung bestätigte jedoch diesen Phänotyp (Abb. 27F). Die Cu^{2+} -Sensitivität von Δcup1 dagegen wurde durch die Expression von AtPCS1C113S nicht komplementiert. Im Vergleich zu Hefezellen, die leeren Vektor exprimierten, war die Sensitivität jedoch nicht so stark ausgeprägt. Diese Restaktivität von AtPCS1C113S konnte durch eine geringe PC2-Bildung *in vivo* bestätigt werden (Abb. 27H). In Hefezellen, die AtPCS1 exprimierten, wurde die PC2- und PC3-Bildung aktiviert. Nach den Ergebnissen der Peptidanalysen für TaPCS durch Maier *et al.* (2003) liegt das Cys113 in der putativen Bindungsstelle III. Das Cys113 von AtPCS1 ist analog zu Cys113 von TaPCS. Dieses Cys ist in allen pflanzlichen PCS konserviert mit Ausnahme von AtPCS2. Ebenso sind die homologen Cysteine in CePCS (C114) und SpPCS (C148) konserviert. Weiterhin wurde für diese putative Bindestelle III Cu^{2+} -Bindung vorhergesagt. Diese Vermutung wurde jedoch nur

indirekt aus einer reduzierten Cd^{2+} -Bindung in Anwesenheit von Cu^{2+} geschlossen. Das identifizierte Bindemotiv ist Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Cys.

Für verschiedene Cu-bindende Proteine wurde bereits eine Cu^{2+} -Bindung über eine tetragonale Koordinationsgeometrie bestätigt. So erfolgt im Typ1-Kupferzentrum die Koordination des Cu über die Schwefelgruppe von Cystein und zwei Stickstoffatomen von Histidinen. Im Typ2-Kupferzentrum wird das Cu^{2+} über Stickstoff- und Sauerstoffatomen von Seitenkettengruppen der Aminosäuren Cystein, Histidin, Aspartat oder Glutamat koordiniert. Eine Ausnahme ist die trigonale Koordination des Cu in „Blue Copper-binding“-Proteinen (BCBP) z. B. des Plastocyanin aus *Anabaena variabilis* (Cyanobakterium) (Hansen und Led, 2006). Charakteristisch für die Metallbindestellen der BCBP ist vor allem eine kurze Kupfer-Schwefel-Bindung. Diese ungewöhnliche Geometrie ist verantwortlich für Elektronen-Transferreaktionen (Canters *et al.*, 1984; Lommen *et al.*, 1988; Jensen *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2003). Die Kupferbindung in Proteinen ist übrigens ein sehr wichtiges Thema im Hinblick auf neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer (Bush *et al.*, 2003) oder der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (Jackson *et al.*, 2001). Wir stehen erst am Anfang, im Bemühen altersabhängige Fehler metallhomöostatischer Mechanismen des Gehirns zu entschlüsseln, die zu Alzheimer führen (Maynard *et al.*, 2002). Auch die Funktion der PC in Pflanzen ist bis jetzt nicht vollständig aufgeklärt. Cu beispielsweise aktiviert die PC-Synthese und bildet mit PC Komplexe (Maitani *et al.*, 1996; Vatamaniuk *et al.*, 2000). Die *cad1-3*-Mutante zeigt jedoch im Gegensatz zu Zn^{2+} keinen Phänotyp bei erhöhten Cu^{2+} -Konzentrationen (Ha *et al.*, 1999; Tennstedt *et al.*, 2006). Die PC-Defizienz besitzt möglicherweise keinen entscheidenden Einfluss auf die Cu^{2+} -Homöostase bei erhöhten Cu^{2+} -Konzentrationen. Andere Metallchelatoren, vor allem die Metallothioneine, könnten diese Funktion übernehmen.

Der Austausch der anderen Aminosäuren (A67S, D89E, V308L, C342Y) in AtPCS1, die in AtPCS2 nicht konserviert sind, hatte keinen Einfluss auf die Cu^{2+} -Aktivierung. Die Expression der mutierten *AtPCS1*-Versionen in Δcup1 komplementieren den Cd^{2+} - und Cu^{2+} -Phänotyp dieser Mutante vollständig (Abb. 26). Aufgrund von Sequenzvergleichen könnten nur die Aminosäuren für eine Metallaktivierung verantwortlich sein, die auch in PCS außerhalb des Pflanzenreiches konserviert sind. Alle anderen Aminosäuren von AtPCS2, mit Ausnahme von E88 (entspricht der Mutation D89E in AtPCS1), die in AtPCS1 ausgetauscht wurden, sind nur in pflanzlichen PCS konserviert, aber nicht in anderen eukaryontischen PCS. So zeigen die homologen Aminosäuren in *C. elegans* und

S. pombe für A67, V308 und C342 von AtPCS1 keine Konservierung zu den pflanzlichen PCS. Eine Ausnahme ist D89, welche sowohl in pflanzlichen PCS als auch in *C. elegans* und *S. pombe* konserviert ist. Diese Aminosäure ist für die Cu^{2+} -Aktivierung nicht essenziell, könnte aber für eine andere Metallaktivierung wichtig sein. Die Ergebnisse der Mutationsanalysen sprechen, wie auch einige Ergebnisse anderer Gruppen für die Theorie der direkten Aktivierung der PCS durch Metallionen (siehe Kapitel 4.3). Die neuen Erkenntnisse, die unter anderem in dieser Arbeit gewonnen wurden, können in einem modifizierten Modell zusammengefasst werden.

4.3 Ein modifiziertes Modell der Metallaktivierung

Die PC-Synthese kann in zwei Schritte unterteilt werden. Der erste Schritt ist die metallunabhängige Abspaltung des Glycins von GSH. Das entstandene γ -Glu-Cys wird im zweiten Schritt auf ein Akzeptormolekül übertragen, das entweder GSH oder ein bereits synthetisiertes PC-Molekül ist. Die PCS übernehmen die Funktion einer Dipeptidyltransferase (Grill *et al.*, 1989). Der zweite Schritt des Enzymmechanismus ist metallabhängig. Für AtPCS1 wurde *in vitro* bewiesen, dass Cd^{2+} in einer Stoichiometrie von ca. 7 mol Cd^{2+} /mol Protein bindet. (Vatamaniuk *et al.*, 2000). Putative Cd^{2+} -Bindestellen wurden auch in TaPCS und SpPCS identifiziert. In Übereinstimmung mit der 7:1 Stoichiometrie für die Cd^{2+} -Bindung an AtPCS1 wurden sieben putative Cd^{2+} -Bindestellen für TaPCS identifiziert (Maier *et al.*, 2003). Durch kinetische Untersuchungen wurden für GSH zwei Substratbindestellen vorgeschlagen. Das Cys56, welches in allen bekannten PCS konserviert ist, wurde als erste Acylbindestelle für GSH identifiziert. Eine Mutation dieses Cys (C56S) verhindert die Bildung eines γ -Glu-Cys-Enzym-Intermediates, welches durch Abspaltung des Gly von GSH gebildet wird. In Anwesenheit von Cd^{2+} erfolgt die zweite Acylierung an einer noch unbekanntem Bindestelle (Vatamaniuk *et al.*, 2004). Wie auch bei den Cystein-Proteasen der Papain-Familie ist ein nukleophiles Cys für die Reaktivität der PCS verantwortlich. Für die Reaktivität der Cystein-Proteasen ist außerdem eine katalytische Triade entscheidend, die aus einem Cys und den benachbarten Aminosäuren His und Asp oder Glu gebildet wird. In AtPCS1 wurde diese katalytische Triade, bestehend aus den Aminosäuren Cys56, His162 und Asp180, bestätigt. Mutieren dieser Aminosäuren führt zur Inaktivität des Enzyms (Rea *et al.*, 2004). Dass der C-terminale Bereich für die eigentliche Enzymaktivität nicht unbedingt erforderlich ist, wurde durch die Cd^{2+} -Aktivierung verkürzter AtPCS1-Versionen nachgewiesen. Die Cd^{2+} -Bindung an AtPCS1 konnte

weiterhin *in vivo* bestätigt werden. Durch die Expression des C-terminalen Bereiches in einer Cd^{2+} -sensitiven *S. cerevisiae*-Mutante wurde eine erhöhte Toleranz beobachtet (Ruotolo *et al.*, 2004). Nach Aufklärung der Röntgenkristallstruktur der bakteriellen NsPCS wird vermutet, dass die zweite Substratbindestelle (Akzeptorbindestelle) nahe der ersten Acylbindestelle und im N-terminalen Bereich des Proteins liegt (Vivares *et al.*, 2005). Diese Vermutung ist auch eine Schlussfolgerung aus der Cd^{2+} -Aktivierung verkürzter AtPCS1 Proteine (Ruotolo *et al.*, 2004). Untersuchungen der *cad1-6*-Mutante bestätigten diese Vermutung. Auch nach Verkürzung von *AtPCS1* nach Basenpaar 1229 aufgrund der T-DNA-Insertion wurde eine PC2-Akkumulation nach Cd^{2+} -Behandlung *in planta* nachgewiesen (Abb.13). Der C-terminale Bereich von *AtPCS1*, welcher für die eigentliche Aktivität nicht gebraucht wird (beide Acylbindestellen sind wahrscheinlich im N-terminalen Bereich), ist aber für eine breitere Metallaktivierung wichtig. So konnte für verkürzte *AtPCS1*-Versionen weiterhin eine Cd^{2+} -Aktivierung, jedoch keine Zn^{2+} -Aktivierung *in vitro* nachgewiesen werden (Ruotolo *et al.*, 2004). Diese Beobachtungen wurden mit der fehlenden Zn^{2+} -Aktivierung von *cad1-6 in vivo* bestätigt (Abb. 13). Im Gegensatz zu Cd^{2+} konnte für Zn^{2+} keine PC2-Induktion nachgewiesen werden. Ein ähnlicher Verlust in der Aktivität der verkürzten *AtPCS1*-Versionen wurde für Hg festgestellt (Ruotolo *et al.*, 2004). In Analogie zu Zn^{2+} ist für die Hg^{2+} -Aktivierung der C-terminale Bereich der PCS wichtig. Die Zn^{2+} - und Hg^{2+} -Aktivierung der PCS sind wichtige Erkenntnisse, die gegen die Theorie sprechen, dass Metall-GSH-Komplexe als Substrate dienen (Vatamaniuk *et al.*, 2000). Nach dieser Theorie sollten Zn^{2+} - oder Hg^{2+} -GSH-Komplexe durch Bindung an die zweite Acylbindestelle im N-terminalen Bereich die PC-Synthese aktivieren. Dies kann ausgeschlossen werden, da verkürzte *AtPCS1*-Versionen weder durch Zn^{2+} noch durch Hg^{2+} aktiviert werden. Dagegen konnte weiterhin eine Cd^{2+} -Aktivierung nachgewiesen werden (Ruotolo *et al.*, 2004; Tennstedt *et al.*, 2006). Diese bedeutet, dass beide Acylbindestellen im N-terminalen Bereich der PCS sich befinden. Demnach sollte eine Aktivierung durch Zn^{2+} - und Hg^{2+} -GSH-Komplexe möglich sein. Dies erfolgt aber nicht.

Aufgrund eines indirekten Nachweises wurden erstmals putative Cu^{2+} -Bindestellen in TaPCS vorhergesagt. Diese liegen in den Bindungsstellen I (Aminosäuren 55-57), III (Aminosäuren 109-113) und VI (Aminosäuren 351-352) (Maier *et al.*, 2003). Cu^{2+} -Bindung konnte auch in Anwesenheit erhöhter Konzentrationen von Thiolliganden für *AtPCS2* indirekt nachgewiesen werden. Durch eine starke Expression von *AtPCS2*

wurde eine erhöhte Toleranz in *S. pombe* ohne messbaren Nachweis der PC-Bildung beobachtet (Cazalé und Clemens, unveröffentlicht). Weiterhin zeigte eine Verkürzung von AtPCS1 nach Aminosäure 283 *in vitro* eine unveränderte Cu^{2+} -Aktivität (Ruotolo *et al.*, 2004). Daraus ist zu schließen, dass die Cu^{2+} -Bindungsstelle VI, die für TaPCS vorhergesagt wurde, nicht für die Cu^{2+} -Aktivierung verantwortlich ist. Essenziell für die Cu^{2+} -Aktivierung ist die Aminosäure C113, die durch Mutationsanalysen von AtPCS1 in Hefen identifiziert wurde (Abb. 26B und 26C). Diese liegt in Übereinstimmung mit den experimentellen Daten für TaPCS in der Cu^{2+} -Bindungsstelle III (Maier *et al.*, 2003). Die Cu^{2+} -Aktivierung der PCS erfolgt somit ähnlich wie die Cd^{2+} -Aktivierung unabhängig vom C-Terminus.

Die neuen Erkenntnisse legen ein neues Modell der Metallaktivierung nahe, welches in Abb. 29 schematisch dargestellt ist. Der N-terminale Bereich der PCS ist für die eigentliche Aktivität verantwortlich. Hier befindet sich das katalytische Zentrum, bestehend aus der katalytischen Triade Cys56, His162 und Asp180, in dem die metallunabhängige Abspaltung des Glycins von GSH erfolgt. Ebenso kann angenommen werden, dass die zweite Acylbindestelle im N-terminalen Bereich liegt. Durch die Bindung des Akzeptormoleküls (GSH oder PC_n) an dieser Stelle erfolgt die metallabhängige PC-Synthese. Entscheidend dafür ist die direkte Metallbindung an das PCS-Protein. Die Funktion des C-terminalen Bereiches besteht daher nicht nur in der Stabilisierung des Proteins, sondern auch in der sensitiven Aktivierung durch eine Vielzahl von Metallen.

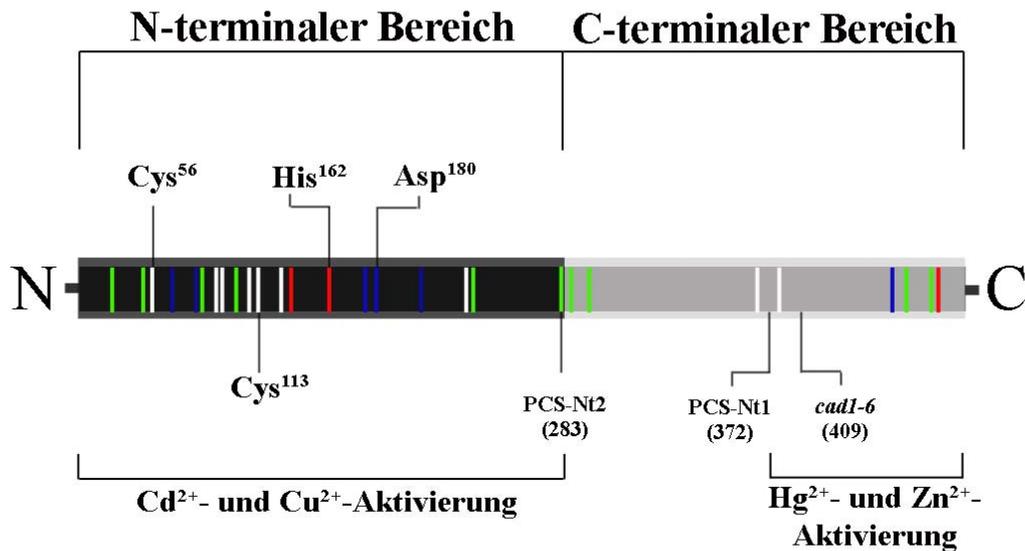


Abb. 29 Modell der Aktivierung der PCS (AtPCS1). Im N-terminalen Bereich befindet sich das katalytische Zentrum bestehend aus den Aminosäuren Cys⁵⁶, His¹⁶² und Asp¹⁸⁰, die eine katalytische Triade bilden. Das Cys¹¹³ ist für die Cu²⁺-Aktivierung wichtig. Der C-terminale Bereich ist für die Protein stabilisierung und eine sensitive Metallaktivierung verantwortlich. Farbige Linien zeigen konservierte Aminosäuren, die auch als Metallbindestellen fungieren könnten: Cysteine (weiße Striche), Histidine (rote Striche), Glutaminsäuren (grüne Striche) und Asparaginsäuren (blaue Linien). Die Zahlen geben die Position der Aminosäure an bzw. die Position der Verkürzung. (modifiziert nach Rea *et al.*, 2004).

4.4 *AtPCS2* – eine zweite funktionale PCS in *Arabidopsis*

AtPCS2 ist das zweite PCS-Gen in *Arabidopsis*. In einer heterologen Expression in *S. pombe* Δpcs und *S. cerevisiae* konnte bestätigt werden, dass auch *AtPCS2* eine funktionale PCS ist (Cazalé und Clemens, 2001). Die Ausschaltung des *AtPCS1*-Gens führt aber zu einer erhöhten Cd²⁺-Sensitivität in *Arabidopsis* auch in Anwesenheit einer scheinbar funktionalen *AtPCS2* (Howden *et al.*, 1995a). Die Ursache der PC-Defizienz in Pflanzen, in denen *AtPCS1* ausgeschaltet ist, wurde genauer untersucht. *AtPCS2* ist wie *AtPCS1* konstitutiv exprimiert (Cazalé und Clemens, 2001), aber im Vergleich zu *AtPCS1* deutlich schwächer (Lee und Kang, 2005). Mikroarrayanalysen zeigten, dass die Expression 10fach geringer ist (Genevestigator™) (Zimmermann *et al.*, 2004). Diese geringe Expression ist wahrscheinlich auf eine geringe Promotoraktivität zurückzuführen (Lee und Kang, 2005). In einer stark erhöhten Expression ist *AtPCS2* nicht in der Lage, den Cd²⁺-Phänotyp der *cad1-3*-Mutante zu komplementieren. Zu diesem Ergebnis sind auch die Untersuchungen in dieser Arbeit gekommen (Abb. 17B).

Außerdem konnte für Zn^{2+} -Behandlung der gleiche Phänotyp beobachtet werden (Abb. 17C). Im Vergleich zur *cad1-3*-Mutante wurden aber geringe Unterschiede in der Inhibierung des Wachstums nach Schwermetallbehandlung festgestellt. Der Phänotyp transgener *cad1-3*-Pflanzen, in denen AtPCS2 exprimiert wurde, war nicht so stark ausgeprägt. Dies wurde sowohl in der Wurzellänge (Abb. 17D) als auch im Keimlingsgewicht (Abb. 17E) nachgewiesen. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass eine geringe PC-Bildung für diesen Phänotyp verantwortlich ist. Über die etablierte Methode der CapLC-ESI-QTOF-MS wurde die PC-Bildung untersucht (Abb. 19). Und es bestätigte sich: AtPCS2 ist eine funktionale PCS *in planta*. So konnte in den Wurzeln und Blättern transgener *cad1-3:PCS2*-Pflanzen nach Cd^{2+} -Behandlung eine PC2-Induktion nachgewiesen werden. Es wurden in den Wurzeln PC2-Mengen gemessen, die etwa 25 % der Menge in WT Col-0-Pflanzen entspricht. In den Blättern war das Verhältnis ähnlich. Dieses Ergebnis bestätigt die Cd^{2+} -Aktivität von AtPCS2 *in planta*, wie sie in einer heterologen Expression in Hefen bereits gezeigt wurde (Cazalé und Clemens, 2001). Interessanterweise führte auch Zn^{2+} -Behandlung zu einer PC2-Induktion. In den Wurzeln wurden PC2-Mengen gemessen, die etwa 62 % der Menge in WT Col-0 erreichten. In den Blättern wurden sogar zweifach höhere PC2-Mengen als in WT Col-0 gemessen. Der Nachweis der PC2-Akkumulation in *cad1-3:PCS2*-Pflanzen bestätigt neben Cd^{2+} auch für Zn^{2+} die Aktivität von AtPCS2 *in planta*. Eine erhöhte PC-Bildung ist jedoch nicht ausreichend für eine erhöhte Schwermetallresistenz. So ist die im Cytosol stattfindende Komplexierung der Schwermetalle nicht entscheidend für die Entgiftung. Transgene *cad1-3:PCS2*-Pflanzen bildeten in den Wurzeln die sechsfache PC2-Menge nach Cd^{2+} -Behandlung bzw. eine fast achtfache PC2-Menge nach Zn^{2+} -Behandlung als *cad1-3*-Pflanzen. Dennoch wurde kein Unterschied in der Metallaufnahme zwischen *cad1-3*-Pflanzen und *cad1-3:PCS2*-Pflanzen festgestellt (Abb. 20). Bezogen auf WT Col-0, war die Metallaufnahme zu 50 % reduziert. Wichtig im PC-abhängigen Detoxifizierungsweg ist möglicherweise die Interaktion mit anderen Proteinen. So führte die Inaktivierung der ABC („ATP-Binding Cassette“) -type Transporter *hmt1* in *S. pombe* und *C. elegans* zur einer erhöhten Cd^{2+} -Sensitivität in Anwesenheit einer funktionellen PCS (Ortiz *et al.*, 1995; Vatamaniuk *et al.*, 2005). Die Cd^{2+} -Sensitivität von Nematoden mit einem inaktivierten *ce-hmt-1*-Gen war im Vergleich zur Inaktivierung von *ce-pcs-1* noch stärker ausgeprägt (Vatamaniuk *et al.*, 2005). Die gebildeten PC-Metall-Komplexe müssen für eine Detoxifikation im weiteren Stoffwechselweg metabolisiert werden. Dies erfolgt möglicherweise über die Interaktion

mit einem Transporter in der Vakuolenmembran, welcher in Pflanzen noch nicht identifiziert wurde. Ein möglicher Transporter ist AtMTP1 (siehe oben). Im Gegensatz zu AtPCS1 ist die zweite funktionelle PCS in *Arabidopsis* möglicherweise nicht in der Lage eine Interaktion mit anderen Proteinen auszuüben. Interessanterweise ist in *S. cerevisiae* eine cytosolische Bindung von Metallionen durch PC anscheinend ausreichend für die Toleranz. *S. cerevisiae* ist ein Organismus in dem kein PCS-Homolog gefunden wurde. Nach Expression von z. B. *TaPCS* konnte eine erhöhte Cd^{2+} -Toleranz beobachtet werden, welche mit einer PC-Bildung verbunden war (Clemens *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu ist in Pflanzen eine cytosolische Bindung nicht ausreichend für die Toleranz. Dies zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit. Nach Expression von *AtPCS2* in der *cad1-3*-Mutante wurde eine PC-Induktion nach Cd^{2+} - und Zn^{2+} -Behandlung nachgewiesen. Diese PC-Bildung war aber nicht ausreichend für die Komplementation der erhöhten Cd^{2+} - und Zn^{2+} -Sensitivität der *cad1-3*-Mutante. Entscheidend ist die Detoxifizierung in die Vakuole.

Die Funktion von *AtPCS2* in *Arabidopsis* konnte auch durch die Erkenntnisse dieser Arbeit nicht geklärt werden. Auch wurde nicht geklärt, welche Metalle *AtPCS2* *in vitro* aktivieren können. Die Cd^{2+} -Aktivierung, welche aus einer heterologen Expression in Hefen bekannt war (Cazalé und Clemens, 2001), konnte nicht bestätigt werden (Abb. 22). Nach Überexpression in *E. coli* war die Proteinmenge an *AtPCS2* im Vergleich zu *AtPCS1* deutlich geringer (Abb. 21). Eine Aktivität wurde nicht nachgewiesen. Die Ursache dafür ist möglicherweise eine geringe thermodynamische Stabilität. Für *AtPCS1* hingegen wurde eine Enzymaktivität von 726,7 pkat/ μg Protein errechnet. Die Berechnung der Katalysekonstante k erfolgte durch die Bestimmung der Konzentration von PC2 in Abhängigkeit von der Zeit und erfolgte im linearen Bereich (Abb. 24). Im Vergleich zu Oven *et al.* (2002), welche für die PCS aus *Glycine max* (Sojabohne) eine Aktivität von 1210 pkat/ μg Protein ermittelt haben, konnte für *AtPCS1* eine relativ gute Enzymaktivität bestimmt werden.

Inzwischen wurden auch in anderen Pflanzen ein zweites PCS-Gen entdeckt. So konnte bisher in *Oryza sativa* (Reis, Accession No. AAV32132), in *Lotus japonicus* (Accession No. AY928091) und in *Lactuca sativa* (Gartenlattich, Accession No. AF506284) ein zweites PCS-Gen identifiziert werden. Daher ist anzunehmen, dass auch in vielen anderen Pflanzen zwei PCS-Gene existieren (Clemens, 2006a). Die evolutionäre Konservierung der nicht-redundanten PCS-Gene verweist auf eine wichtige Funktion im Pflanzenreich. Es ist nicht auszuschließen, dass auch *AtPCS2* eine Funktion in der Zn^{2+} -

Homöostase besitzt. Demzufolge ist eine Analyse von *Knock-out*-Pflanzen notwendig. Dabei können zum einen *AtPCS2-Knock-out*-Pflanzen mit intaktem *AtPCS1*-Gen untersucht werden und zum anderen Pflanzen, in denen beide *PCS*-Gene ausgeschaltet sind.

5 Zusammenfassung

5.1 Beteiligung der PCS an der Homöostase essenzieller Metalle

Die Phytochelatinsynthasen sind wichtig für die Detoxifizierung von nicht-essenziellen Schwermetallen, wie Cd, As und Hg (Cobbett und Goldsbrough, 2002). Ihre kodierenden Gene wurde zuerst in *S. pombe*, Weizen und *Arabidopsis thaliana* identifiziert (Clemens *et al.*, 1999; Ha *et al.*, 1999; Vatamaniuk *et al.*, 1999). Heute ist bekannt, dass die PCS-Gene in der Natur weit verbreitet sind. Doch die Funktion in der Detoxifizierung von nicht-essenziellen Schwermetallen erklärt nicht ihre evolutionäre Konservierung. Die meisten Habitate waren frei von erhöhten Schwermetallkonzentrationen. Erst durch die Industrialisierung traten verstärkt erhöhte Konzentrationen dieser toxischen Elemente auf. Eine mögliche Funktion, die ihre evolutionäre Konservierung erklären könnte, ist die Beteiligung der PCS an der Homöostase essenzieller Metalle. Einen klaren Hinweis konnten Untersuchungen in dieser Arbeit aufzeigen. *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen, in denen das *cad1*-Gen inaktiviert wurde, zeigten eine erhöhte Zn^{2+} -Sensitivität gegenüber WT Col-0 Pflanzen. Diese erhöhte Zn^{2+} -Sensitivität der bekannten *cad1-3*-Mutante (Howden *et al.*, 1995a) konnte zuvor nicht nachgewiesen werden. Durch eine neu isolierte T-DNA-Insertions-Mutante (*cad1-6*) wurde dieser Phänotyp bestätigt. Die Zn^{2+} -Sensitivität beider *cad1*-Mutanten war vergleichbar. Die Cd^{2+} -Sensitivität der *cad1-6*-Mutante war aber nicht so stark ausgeprägt, wie von der *cad1-3*-Mutante. In Hefeexperimente wurde eine *cad1-6*-Version von *AtPCSI* untersucht, die an der Stelle der T-DNA-Insertion verkürzt ist. Diese verkürzte Version (*AtPCSI* Δ 409) wurde in der *S. pombe* PC-defizienten Δpcs -Mutante exprimiert. Nach Cd^{2+} -Behandlung wurde eine Restaktivität beobachtet. Die PC-Bildung war im Vergleich zu Hefen, die *AtPCSI* exprimierten, stark reduziert. Durch die Etablierung einer Methode (CapLC-ESI-QTOF-MS) zur Quantifizierung der PC2-Akkumulation *in planta* konnte die Induktion der PC2-Bildung nach Zn^{2+} -Behandlung für WT Col-0-Pflanzen untersucht werden. Zn^{2+} konnte ebenfalls wie Cd^{2+} die PC2-Bildung induzieren. Eindeutig nachgewiesen wurde auch eine geringe PC2-Menge in nicht behandelten WT Col-0-Pflanzen. Untersuchungen der PC2-Bildung in der *cad1-3*-Mutante zeigten eine geringe PC2-Bildung nach Cd^{2+} - und Zn^{2+} -Behandlung. Im Gegensatz zu bisherigen Untersuchungen die in der Literatur veröffentlicht wurden, konnten keine PC2-Mengen in dieser Mutante nachgewiesen werden. In der neu isolierten *cad1-6*-Mutante wurden ähnliche PC2-Mengen nach Zn^{2+} -

Behandlung nachgewiesen, während nach Cd^{2+} -Behandlung eine Erhöhung der PC2-Menge festgestellt wurde. In Übereinstimmung mit den Hefeexperimenten der verkürzten AtPCS1-Version (AtPCS1 Δ 409) zeigte die *cad1-6*-Mutante nach Cd^{2+} -Behandlung noch eine Restaktivität, während Zn^{2+} nicht die PC2-Bildung induzieren kann. In Analysen der Metallaufnahme konnte zudem eine 50-prozentige Reduktion der Cd^{2+} - bzw. Zn^{2+} -Menge in beiden *cad1*-Mutanten im Vergleich zu WT Col-0 festgestellt werden. Die PC-Defizienz besitzt einen direkten Einfluss auf die Aufnahme essenzieller Metalle. Diese Untersuchungen geben einen wichtigen Hinweis, dass die PC an der Detoxifizierung und Akkumulation von essenziellen Metallionen, wie Zn beteiligt sein können. Diese Funktion erklärt möglicherweise die evolutionäre Konservierung der PCS-Gene in der Natur. In Experimenten zum Einfluss der PC-Defizienz bei Zn^{2+} -Mangel konnte aber eine nützliche Funktion der PCS an der Zn^{2+} -Aufnahme nicht festgestellt werden.

5.2 Die Metallaktivierung der PCS

Die PCS katalysieren in einer Transpeptidase-Reaktion die Abspaltung des Glycin von GSH und die Übertragung des entstandenen γ -Glutamyl-Cysteins auf ein weiteres GSH oder ein bereits synthetisiertes PC_n-Molekül (Grill *et al.*, 1989). Der erste Schritt dieser Reaktion ist metallunabhängig, während der zweite Schritt metallabhängig ist. Die Aktivierung der PCS erfolgt durch verschiedene Metalle. Durch *in-vitro*-Untersuchungen an AtPCS1 konnte eine Aktivierung durch Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Sb^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} , AsO_4^- und andere Metall- bzw. Metalloid-Ionen nachgewiesen werden (Vatamaniuk *et al.*, 2000; Oven *et al.*, 2002). Die Aktivierung durch eine Vielzahl von Metallionen könnte durch eine direkte Bindung an das Protein erfolgen (Clemens, 2006a). Die Metallaktivierung der *cad1-6*-Mutante, die durch die PC2-Quantifizierung *in planta* nachgewiesen wurde, befürwortet dieses Model. Aufgrund einer T-DNA-Insertion im *cad1*-Gen in Exon 8 wird die PC2-Bildung durch Zn^{2+} nicht mehr aktiviert. Durch Cd^{2+} konnte aber noch eine geringe Restaktivität nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigten die Metallaktivierung von *in-vitro*-Untersuchungen verkürzter AtPCS1-Versionen (Ruotolo *et al.*, 2004). Der C-terminale Bereich der PCS ist für die Cd^{2+} -Aktivierung nicht essenziell. Eine Zn^{2+} -Aktivierung, welche den C-terminalen Bereich der PCS erfordert, konnte nicht mehr nachgewiesen werden. In weiteren Experimenten wurde eine Aminosäure identifiziert, die für die Cu^{2+} -Aktivierung verantwortlich ist. Die Identifizierung möglicher Cu^{2+} -aktivierender Aminosäuren

erfolgte über Sequenzvergleiche von AtPCS2 mit anderen PCS-Proteinen. Für AtPCS2 wurde nach Expression in Hefen eine PC-Bildung nach Cu²⁺-Behandlung nicht nachgewiesen. Die Cd²⁺-Aktivierung war im Vergleich zu AtPCS1 unverändert (Cazalé und Clemens, 2001). In einer Mutation von C113S in AtPCS1 wurde eine wichtige Aminosäure für die Cu²⁺-Aktivierung identifiziert. Nach Expression der mutierten *AtPCS1*-Version von AtPCS1C113S in der Cd²⁺- und Cu²⁺-sensitiven Hefemutante *Δcup1* wurde eine vollständige Komplementation des Phänotyps nach Cd²⁺-Behandlung festgestellt, während nach Cu²⁺-Behandlung keine Komplementation erfolgte. Die PC-Bildung wurde *in vivo* untersucht und zeigte eine starke PC2- und PC3-Bildung nach Cd²⁺-Behandlung, die vergleichbar mit der PC-Bildung in Hefen war die AtPCS1 exprimierten. Nach Cu²⁺-Behandlung wurden geringe PC2-Mengen nachgewiesen. Für Hefen mit AtPCS1 konnte nach Cu²⁺-Behandlung PC2 und PC3 nachgewiesen werden. Die Mutation von C113S in AtPCS1 führt nicht zur vollständigen Cu²⁺-Inaktivierung. Nach den Ergebnissen der Peptidanalysen von TaPCS liegt die Aminosäure C113 in einer Bindestelle, für die Cu²⁺-Bindung vorhergesagt wurde (Maier *et al.*, 2003). Dieses Cystein ist in anderen PCS konserviert, aber nicht in AtPCS2. Sequenzanalysen zeigten, dass auch AhPCS2 aus *A. halleri* diese veränderten Aminosäuren wie AtPCS2 besitzt (Cazalé und Clemens, nicht veröffentlicht). Diese Ergebnisse befürworten die Hypothese der direkten Metallbindung an die PCS. In Anwesenheit von anderen potentiellen Liganden werden die PCS durch verschiedene Metallionen *in vivo* aktiviert. Eine Übertragung der Metallionen von z. B. GSH, als ein Metallchelator in relativ hoher Konzentration in der Zelle, zum PCS-Protein ist ein möglicher Mechanismus der Metallaktivierung *in vivo*.

5.3 AtPCS2 – die zweite funktionale PCS in Arabidopsis

Das AtPCS2-Gen ist nicht durch eine Genomduplikation in *Arabidopsis* entstanden. Geringe Sequenzübereinstimmungen der Introns deuten auf eine lange Koexistenz mit dem AtPCS1-Gen hin (Clemens, 2006a). Untersuchungen in Hefen haben gezeigt, dass *AtPCS2* eine funktionale PCS ist (Cazalé und Clemens, 2001). Eine Funktion von *AtPCS2* in *Arabidopsis* ist bisher nicht bekannt. Unabhängig dieser Aktivität in einer heterologen Expression ist *AtPCS2* nicht in der Lage, in einer stark erhöhten Expression die Cd²⁺-Sensitivität der *cad1-3*-Mutante zu komplementieren (Lee und Kang, 2005). Die Daten zeigten aber eine partielle Komplementation des *cad1-3*-Phänotyps. Zu diesem Ergebnis sind auch die Untersuchungen in dieser Arbeit gekommen. Doch die

Ursache konnte nicht identifiziert werden. Untersuchungen dieser Arbeit haben gezeigt, dass AtPCS2 durch Cd^{2+} und durch Zn^{2+} *in planta* aktiviert wird. Dies bestätigt die Cd^{2+} -Aktivierung von AtPCS2, wie bereits in Hefen nachgewiesen wurde (Cazalé und Clemens, 2001). AtPCS2 zeigt auch wie AtPCS1 eine Aktivierung durch Zn^{2+} . Damit ist eine Funktion von AtPCS2 in der Detoxifizierung und Akkumulation von essenziellen Schwermetallen (z. B. Zn^{2+}) möglich. Diese Funktion könnte wie auch für AtPCS1 die evolutionäre Konservierung erklären. Die PC-Bildung ist für eine Detoxifizierung der Schwermetalle jedoch nicht ausreichend. Transgene *cad1-3:PCS2*-Pflanzen zeigten eine etwa 50-prozentige Reduktion in der Aufnahme von Cd^{2+} und Zn^{2+} im Vergleich zu WT Col-0-Pflanzen. Die Reduktion in der Metallaufnahme war vergleichbar mit der *cad1-3*-Mutante. Eine Interaktion mit anderen Proteinen könnte für die Detoxifizierung wichtig ist. AtPCS2 ist im Gegensatz zu AtPCS1 nicht in der Lage, eine solche noch unbekannte Interaktion einzugehen. Die Expression von *AtPCS1* führt zur vollständigen Komplementation des *cad1-3*-Phänotyps.

6 Literaturverzeichnis

- Askwith C, Eide D, Van Ho A, Bernard PS, Li L, Davis-Kaplan S, Sipe DM, Kaplan J** (1994) The *FET3* gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* **76**: 403-410
- Axelsen KB, Palmgren MG** (2001) Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**: 696-706
- Bähler J, Wu JQ, Longtine MS, Shah NG, McKenzie A, 3rd, Steever AB, Wach A, Philippsen P, Pringle JR** (1998) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**: 943-951
- Beck A, Lenzian K, Oven M, Christmann A, Grill E** (2003) Phytochelatin synthase catalyzes key step in turnover of glutathione conjugates. *Phytochemistry* **62**: 423-431
- Berg JM, Shi Y** (1996) The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science* **271**: 1081-1085
- Bush AI, Masters CL, Tanzi RE** (2003) Copper, beta-amyloid, and Alzheimer's disease: tapping a sensitive connection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 11193-11194
- Canters GW, Hill HA, Kitchen NA, Adman ET** (1984) The assignment of the ¹H nuclear magnetic resonance spectrum of azurin. An investigation of the ¹H NMR spectrum of the blue copper protein, azurin, from *Pseudomonas aeruginosa*, with reference to the previously determined crystal structure. *Eur. J. Biochem.* **138**: 141-152
- Cazalé AC, Clemens S** (2001) *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase. *FEBS Lett.* **507**: 215-219
- Chaney RL** (1988) Plants can utilize iron from Fe-N,N'-di-(2-hydroxybenzoyl)ethylenediamine-N,N'-diacetic acid, a ferric chelate with 10⁶ greater formation constant than Fe-EDDHA. *J. Plant Nutr.* **11**: 1033-1050
- Chaney RL, Malik M, Li YM, Brown SL, Brewer EP, Angle JS, Baker AJ** (1997) Phytoremediation of soil metals. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**: 279-284
- Chen A, Komives EA, Schroeder JI** (2006) Long distance shoot to root transport of phytochelatins in *Arabidopsis* and improved grafting in mature *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol.*
- Clemens S** (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**: 475-486
- Clemens S** (2006a) Evolution and function of phytochelatin synthases. *J. Plant. Physiol.* **163**: 319-332
- Clemens S** (2006b) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants and algae. *Biochimie in press*

- Clemens S, Bloss ., Vess C, Neumann D, Nies D H, Zur Nieden U** (2002a) A transporter in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells mediates zinc storage and differentially affects transition metal tolerance. *J. Biol. Chem.* **277**: 18215-18221
- Clemens S, Kim EJ, Neumann D, Schroeder JI** (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *Embo J.* **18**: 3325-3333
- Clemens S, Palmgren MG, Kramer U** (2002b) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci.* **7**: 309-315
- Clemens S, Schroeder JI, Degenkolb T** (2001b) *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. *Eur. J. Biochem.* **268**: 3640-3643
- Cline J, Braman JC, Hogrefe HH** (1996) PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **24**: 3546-3551
- Dancis A, Yuan DS, Haile D, Askwith C, Eide D, Moehle C, Kaplan J, Klausner RD** (1994) Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell* **76**: 393-402
- Dix DR, Bridgham JT, Broderius MA, Byersdorfer CA, Eide DJ** (1994) The FET4 gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**:26092-26099
- Cobbett C, Goldsbrough P** (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev. Plant Biol.* **53**: 159-182
- Cobbett CS** (2000) Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* **123**: 825-832
- Cohen CK, Fox TC, Garvin DF, Kochian LV** (1998) The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiol.* **116**: 1063-1072
- Conklin DS, McMaster JA, Culbertson MR, Kung C** (1992) COT1, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **12**: 3678-3688
- Connolly EL, Fett JP, Guerinot ML** (2002) Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* **14**: 1347-1357
- Curie C, Alonso JM, Le Jean M, Ecker JR, Briat JF** (2000) Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem J.* **347 Pt 3**: 749-755
- Dameron CT, Reese RN, Mehra RK, Kortan AR, Carroll PJ, Steigerwald ML, Brus LE, Winge DR** (1989a) Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites. *Nature* **338**: 596-597
- Dancis A, Yuan DS, Haile D, Askwith C, Eide D, Moehle C, Kaplan J, Klausner RD** (1994) Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell* **76**: 393-402

- Desbrosses-Fonrouge AG, Voigt K, Schroder A, Arrivault S, Thomine S, Kramer U** (2005) *Arabidopsis thaliana* MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation. *FEBS Lett.* **579**: 4165-4174
- Dräger DB, Desbrosses-Fonrouge AG, Krach C, Chardonnens AN, Meyer RC, Saumitou-Laprade P, Kramer U** (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**: 425-439
- Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML** (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5624-5628
- Evans KM, Gatehouse JA, Lindsay WP** (1992) Expression of metallothionein-like gene PsMT-alpha in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace metal ion accumulation: implications for PSMT-ALPHA function. *Plant Mol. Biol.* **20**: 1019-1028
- Finney LA, O'Halloran TV** (2003) Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* **300**: 931-936
- Frausto da Silva JJR, Williams RJP** (2001) *The biological chemistry of the elements*, 2nd. ed. Clarendon Press, Oxford
- Fu D, Beeler TJ, Dunn TM** (1995) Sequence, mapping and disruption of CCC2, a gene that cross-complements the Ca(2+)-sensitive phenotype of *csg1* mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the Cu(2+)-ATPase subfamily. *Yeast* **11**: 283-292
- Garcia-Hernandez M, Murphy A, Taiz L** (1998) Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **118**: 387-397
- Gaymard F, Pilot G, Lacombe B, Bouchez D, Bruneau D, Boucherez J, Michaux-Ferriere N, Thibaud JB, Sentenac H** (1998) Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell* **94**: 647-655
- Gekeler W, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH** (1989) Survey of the Plant Kingdom for the Ability to Bind Heavy-Metals through Phytochelatins. *Zeitschrift Für Naturforschung C-a Journal of Biosciences* **44**: 361-369
- Godbold DL, Horst WJ, Collins JC, Thurman DA, Marschner H** (1984) Accumulation of zinc and organic acids in roots of zinc tolerant and non-tolerant ecotypes of *Deschampsia caespitosa*. *J. Plant Physiol.* **116**: 59-69
- Gong JM, Lee DA, Schroeder JI** (2003) Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatins and cadmium in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 10118-10123
- Grill E** (1987) Phytochelatins, the heavy metal binding peptides of plants: characterization and sequence determination. *Experientia Suppl.* **52**: 317-322

- Grill E, Loffler S, Winnacker EL, Zenk MH** (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6838-6842
- Grill E, Thumann J, Winnacker E, Zenk MH** (1988) Induction of heavy-metal binding phytochelatins by inoculation of cell cultures in standard media. *Plant Cell Rep.* **7**: 375-378
- Grill E, Winnacker E-L, Zenk MH** (1985) Phytochelatins: The Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher Plants. *Science* **230**: 674-676
- Grotz N, Fox T, Connolly E, Park W, Guerinot ML, Eide D** (1998) Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 7220-7224
- Guerinot ML** (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochim. Biophys. Acta.* **1465**: 190-198
- Guerinot ML, Eide D** (1999) Zeroing in on zinc uptake in yeast and plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 244-249
- Ha SB, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS** (1999) Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* **11**: 1153-1164
- Halliwell B, Gutteridge JM** (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* **219**: 1-14
- Halliwell B, Gutteridge JM** (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**: 1-85
- Hamer DH** (1986) Metallothionein. *Annu Rev. Biochem.* **55**: 913-951
- Hamer DH, Thiele DJ, Lemontt JE** (1985) Function and autoregulation of yeast copperthionein. *Science* **228**: 685-690
- Hamza I, Schaefer M, Klomp LW, Gitlin JD** (1999) Interaction of the copper chaperone HAH1 with the Wilson disease protein is essential for copper homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 13363-13368
- Hansen DF, Led JJ** (2006) Determination of the geometric structure of the metal site in a blue copper protein by paramagnetic NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 1738-1743
- Harada E, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S** (2004) A cyanobacterial protein with similarity to phytochelatin synthases catalyzes the conversion of glutathione to gamma-glutamylcysteine and lacks phytochelatin synthase activity. *Phytochemistry* **65**: 3179-3185

- Herschbach C, Juanin L, and Rennenberg H** (1998) Overexpression of γ -glutamylcysteine synthetase, but not of glutathione synthetase elevates glutathione allocation in the phloem of transgenic poplar (*Populus tremula* β *Populus alba*) trees. *Plant Cell Physiol.* **39**: 447-451
- Himelblau E, Amasino RM** (2000) Delivering copper within plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**: 205-210
- Himelblau E, Mira H, Lin SJ, Culotta VC, Penarrubia L, Amasino RM** (1998) Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **117**: 1227-1234
- Hirayama T, Kieber JJ, Hirayama N, Kogan M, Guzman P, Nourizadeh S, Alonso JM, Dailey WP, Dancis A, Ecker JR** (1999) RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell* **97**: 383-393
- Hoagland DR, Arnon DI** (1939) The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Std. Circ.:* 37
- Howden R, Andersen CR, Goldsbrough PB, Cobbett CS** (1995b) A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **107**: 1067-1073
- Howden R, Goldsbrough PB, Andersen CR, Cobbett CS** (1995a) Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol.* **107**: 1059-1066
- Huffman DL, O'Halloran TV** (2001) Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **70**: 677-701
- Hussain D, Haydon MJ, Wang Y, Wong E, Sherson SM, Young J, Camakaris J, Harper JF, Cobbett CS** (2004) P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 1327-1339
- Jackson GS, Murray I, Hosszu LL, Gibbs N, Waltho JP, Clarke AR, Collinge J** (2001) Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 8531-8535
- Jensen MR, Hansen DF, Led JJ** (2002) A general method for determining the electron self-exchange rates of blue copper proteins by longitudinal NMR relaxation. *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 4093-4096
- Juang RH, McCue KF, Ow DW** (1993) Two purine biosynthetic enzymes that are required for cadmium tolerance in *Schizosaccharomyces pombe* utilize cysteine sulfinate in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.* **304**: 392-401
- Kabata-Pendias A, Pendias H** (2001) Trace elements in soil and plants (3rd ed). CRC Press, Boca Raton, USA
- Kamizono A, Nishizawa M, Teranishi Y, Murata K, Kimura A** (1989) Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen. Genet.* **219**: 161-167

- Karley AJ, Leigh RA, Sanders D** (2000) Where do all the ions go? The cellular basis of differential ion accumulation in leaf cells. *Trends Plant Sci.* **5**: 465-470
- Ke SH, Madison EL** (1997) Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube 'megaprimer' PCR method. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3371-3372
- Klapheck S, Fliegner W, Zimmer I** (1994) Hydroxymethyl-phytochelatins [(gamma-glutamylcysteine)n-serine] are metal-induced peptides of the Poaceae. *Plant Physiol.* **104**: 1325-1332
- Klomp LW, Lin SJ, Yuan DS, Klausner RD, Culotta VC, Gitlin JD** (1997) Identification and functional expression of HAH1, a novel human gene involved in copper homeostasis. *J. Biol. Chem.* **272**: 9221-9226
- Kobae Y, Uemura T, Sato MH, Ohnishi M, Mimura T, Nakagawa T, Maeshima M** (2004) Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. *Plant Cell Physiol.* **45**: 1749-1758
- Kondo N, Imai K, Isobe M, Goto T, Murasugi A, Wada-Nakagawa C** (1984) Cadystin A and B, major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced in a fission yeast-separation, revision of structure and synthesis. *Tetrahed Lett.* **25**: 3869-3872
- Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB** (1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol. Biol.* **40**: 37-44
- Krämer U, Cotter-Howels JD, Charnock LM, Baker AJM, Smith JA** (1996) Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* **379**: 635-638
- Krämer U, Pickering IJ, Prince RC, Raskin I, and Salt ED** (2000) Subcellular Localization and Speciation of Nickel in Hyperaccumulator and Non-Accumulator *Thlaspi* Species I. *Plant Physiol.* **122**: 1343-1353
- Lane B, Kajioka R, Kennedy T** (1987) The wheat germ Ec protein is a zinc-containing metallothionein. *Biochem. Cell. Biol.* **65**: 1001-1005
- Lane TW, Morel FM** (2000) A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 4627-4631
- Lane TW, Saito MA, George GN, Pickering IJ, Prince RC, Morel FM** (2005) Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* **435**: 42
- Lanquar V, Lelievre F, Bolte S, Hames C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schroder A, Kramer U, Barbier-Brygoo H, Thomine S** (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *Embo J.* **24**: 4041-4051
- Lee S, Kang BS** (2005) Expression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase 2 is too low to complement an *AtPCS1*-defective *Cad1-3* mutant. *Mol. Cells* **19**: 81-87

- Li L, Kaplan J** (1998) Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity. *J. Biol. Chem.* **273**: 22181-22187
- Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczypka M, Thiele DJ, Rea PA** (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 42-47
- Li ZS, Szczypka M, Lu YP, Thiele DJ, Rea PA** (1996) The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J. Biol. Chem.* **271**: 6509-6517
- Loeffler S, Hochberger A, Grill E, Winnacker E-L, Zenk MH** (1989) Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of heavy metals by the reaction product. *FEBS Lett.* **258**: 42-46
- Lommen A, Canters GW, van Beeumen J** (1988) A ¹H-NMR study on the blue copper protein amicyanin from *Thiobacillus versutus*. Resonance identifications, structural rearrangements and determination of the electron self-exchange rate constant. *Eur. J. Biochem.* **176**: 213-223
- Lopez-Millan AF, Ellis DR, Grusak MA** (2004) Identification and characterization of several new members of the ZIP family of metal ion transporters in *Medicago truncatula*. *Plant Mol. Biol.* **54**: 583-596
- Lu YP, Li ZS, Drozdowicz YM, Hortensteiner S, Martinoia E, Rea PA** (1998) AtMRP2, an *Arabidopsis* ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with Atmrp1. *Plant Cell* **10**: 267-282
- Lu YP, Li ZS, Rea PA** (1997) AtMRP1 gene of *Arabidopsis* encodes a glutathione S-conjugate pump: isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 8243-8248
- Ma JF, Hiradate, S. and Matsumoto, H.** (1998) High Aluminum Resistance in Buckwheat II. Oxalic Acid Detoxifies Aluminum Internally. *Plant Physiol.* **117**: 753-759.
- Ma JF, Ryan PR, Delhaize E** (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* **6**: 273-278
- MacDiarmid C, Gaither L and Eide D** (2000). Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, **19**: 2845-2855
- Maier T, Yu C, Kullertz G, Clemens S** (2003) Localization and functional characterization of metal-binding sites in phytochelatin synthases. *Planta* **218**: 300-308
- Maitani T, Kubota H, Sato K, Yamada T** (1996) The Composition of Metals Bound to Class III Metallothionein (Phytochelatin and Its Desglycyl Peptide) Induced by Various Metals in Root Cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol.* **110**: 1145-1150
- Marschner H** (1995) Mineral nutrition of higher plants. London, Academic press 2nd ed

- Mäser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis FJM, Sanders D, Harper JF, Tchiew J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA, Guerinot ML** (2001) Phylogenetic Relationships within Cation Transporter Families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**: 1646-1667
- Mathys W** (1977) The Role of Malate, Oxalate, and Mustard Oil Glucosides in the Evolution of Zinc-Resistance in Herbage Plants. *Physiologia Plantarum* **40**: 130-136
- May M, Vernoux T, Leaver C, Van Montagu M, Inze D** (1998) Review article. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J. Exp. Bot.* **49**: 649-667
- Maynard CJ, Cappai R, Volitakis I, Cherny RA, White AR, Beyreuther K, Masters CL, Bush AI, Li QX** (2002) Overexpression of Alzheimer's disease amyloid-beta opposes the age-dependent elevations of brain copper and iron. *J. Biol. Chem.* **277**: 44670-44676
- Mehra RK, Mulchandani P, Hunter TC** (1994) Role of CdS quantum crystallites in cadmium resistance in *Candida glabrata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**: 1193-1200
- Meister A** (1995) Glutathione biosynthesis and its inhibition. *Methods Enzymol.* **252**: 26-30
- Meuwly P, Thibault P, Schwan AL, Rauser WE** (1995) Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. *Plant J.* **7**: 857
- Mills RF, Francini A, Ferreira da Rocha PS, Baccarini PJ, Aylett M, Krijger GC, Williams LE** (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**: 783-791
- Nies DH** (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 313-339
- Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH** (2002) Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J. Exp. Bot.* **53**: 1283-1304
- Nultsch W** (1996) *Allgemeine Botanik*. 10. neu bearb. und erw. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York
- Ortiz DF, Kreppel L, Speiser DM, Scheel G, McDonald G, Ow DW** (1992) Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *Embo J.* **11**: 3491-3499
- Ortiz DF, Ruscitti T, McCue KF, Ow DW** (1995) Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J. Biol. Chem.* **270**: 4721-4728
- Oven M, Page JE, Zenk MH, Kutchan TM** (2002) Molecular characterization of the homo-phytochelatin synthase of soybean *Glycine max*: relation to phytochelatin synthase. *J. Biol. Chem.* **277**: 4747-4754

- Paulsen IT, Saier MH, Jr.** (1997) A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J. Membr. Biol.* **156**: 99-103
- Pence NS, Larsen PB, Ebbs SD, Letham DL, Lasat MM, Garvin DF, Eide D, Kochian LV** (2000) The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 4956-4960
- Persans MW, Yan X, Patnoe JM, Kramer U, Salt DE** (1999) Molecular dissection of the role of histidine in nickel hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense* (Halacsy). *Plant Physiol.* **121**: 1117-1126
- Pich A, Scholz G** (1991) Nicotianamin and the distribution of iron into apoplast and symplast of tomato (*Lycopersicon-esculentum mill*). *J. of Exp. Botany* **42**: 1517-1523
- Pich A, Scholz G, and Stephan UW** (1994) Iron-dependent changes of heavy metals, nicotianamine, and citrate in different plant organs and in the xylem exudate of two tomato genotypes. Nicotianamine as possible copper translocator. *Plant Soil* **165**: 189-196
- Pufahl RA, Singer CP, Peariso KL, Lin SJ, Schmidt PJ, Fahrni CJ, Culotta VC, Penner-Hahn JE, O'Halloran TV** (1997) Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science* **278**: 853-856
- Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV** (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **284**: 805-808
- Rausser WE** (1995) Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol.* **109**: 1141-1149
- Rausser WE** (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem. Biophys.* **31**: 19-48
- Rea PA, Li ZS, Lu YP, Drozdowicz YM, Martinoia E** (1998) From Vacuolar Gs-X Pumps to Multispecific Abc Transporters. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 727-760
- Rea PA, Vatamaniuk OK, Rigden DJ** (2004) Weeds, worms, and more. Papain's long-lost cousin, phytochelatin synthase. *Plant Physiol.* **136**: 2463-2474
- Reese RN, White CA, Winge DR** (1992) Cadmium-Sulfide Crystallites in Cd-(gammaEC)(n)G Peptide Complexes from Tomato. *Plant Physiol.* **98**: 225-229
- Robinson NJ, Tommey AM, Kuske C, Jackson PJ** (1993) Plant metallothioneins. *Biochem. J.* **295 (Pt 1)**: 1-10
- Robinson NJ, Wilson JR, Turner JS** (1996) Expression of the type 2 metallothionein-like gene MT2 from *Arabidopsis thaliana* in Zn(2+)-metallothionein-deficient *Synechococcus* PCC 7942: putative role for MT2 in Zn2+ metabolism. *Plant Mol. Biol.* **30**: 1169-1179

- Rodriguez FI, Esch JJ, Hall AE, Binder BM, Schaller GE, Bleecker AB** (1999) A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* **283**: 996-998
- Rogers EE, Eide DJ, Guerinot ML** (2000) Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 12356-12360
- Ruotolo R, Peracchi A, Bolchi A, Infusini G, Amoresano A, Ottonello S** (2004) Domain organization of phytochelatin synthase: functional properties of truncated enzyme species identified by limited proteolysis. *J. Biol. Chem.* **279**: 14686-14693
- Sagner S, Kneer R, Wanner G, Cosson JP, Deus-Neumann B, Zenk MH** (1998) Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in *Sebertia acuminata*. *Phytochemistry* **47**: 339-347
- Salt DE, Rauser WE** (1995) MgATP-Dependent Transport of Phytochelatins Across the Tonoplast of Oat Roots. *Plant Physiol.* **107**: 1293-1301
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York
- Sarret G, Saumitou-Laprade P, Bert V, Proux O, Hazemann JL, Traverse A, Marcus MA, Manceau A** (2002) Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiol.* **130**: 1815-1826
- Sato K, Kohzuma T, Dennison C** (2003) Active-site structure and electron-transfer reactivity of plastocyanins. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 2101-2112
- Schat H, Llugany M, Vooijs R, Hartley-Whitaker J, Bleeker PM** (2002) The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *J. Exp. Bot.* **53**: 2381-2392
- Schellenberger A** (1989) *Enzymkatalyse*. VEB Gustav Fischer Verlag Jena
- Schmidke I, Stephan UW** (1995) Transport of metal micronutrients in the phloem of castor bean (*Ricinus communis*) seedlings. *Physiologia Plantarum* **95**: 147-153
- Schmöger ME, Oven M, Grill E** (2000) Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiol.* **122**: 793-801
- Senden MHMN, van der Meer AJGM, Verburg T. G., Wolterbeek HT** (1995) Citric acid in tomato plant roots and its effect on cadmium uptake and distribution. *Plant Soil* **171**: 333-339
- Senden MHMN, Wolterbeek HAT** (1990) Effect of citric acid on the transport of cadmium through xylem vessels of excised tomato stem-leaf systems. *Acta Bot. Neerl.* **39**: 297-303
- Sessions A, Burke E, Presting G, Aux G, McElver J, Patton D, Dietrich B, Ho P, Bacwaden J, Ko C, Clarke JD, Cotton D, Bullis D, Snell J, Miguel T, Hutchison D, Kimmerly B, Mitzel T, Katagiri F, Glazebrook J, Law M, Goff SA** (2002) A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *Plant Cell* **14**: 2985-2994

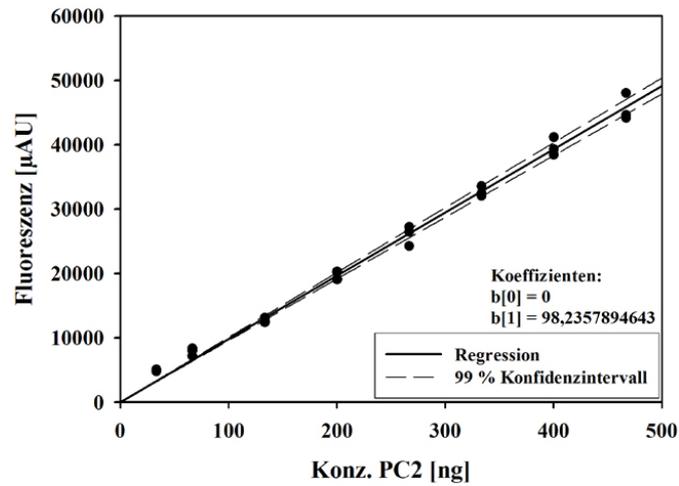
- Sharkey DJ, Scalice ER, Christy KG, Jr., Atwood SM, Daiss JL** (1994) Antibodies as thermolabile switches: high temperature triggering for the polymerase chain reaction. *Biotechnology (N Y)* **12**: 506-509
- Solioz M, Vulpe C** (1996) CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 237-241
- Speiser DM, Ortiz DF, Kreppel L, Scheel G, McDonald G, Ow DW** (1992) Purine biosynthetic genes are required for cadmium tolerance in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell Biol.* **12**: 5301-5310
- Steffens JC, Hunt DF, Williams BG** (1986) Accumulation of non-protein metal-binding polypeptides (gamma-glutamyl-cysteinyl)n-glycine in selected cadmium-resistant tomato cells. *J. Biol. Chem.* **261**: 13879-13882
- Stephan UW, Scholz G** (1993) Nicotianamine: mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem? *Physiol Plant.* **88**: 522-529
- Stohs SJ, Bagchi D** (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* **18**: 321-336
- Szczyпка M, Wemmie J, Moye-Rowley W, Thiele D** (1994) A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J. Biol. Chem.* **269**: 22853-22857
- Takagi M, Nishioka M, Kakihara H, Kitabayashi M, Inoue H, Kawakami B, Oka M, Imanaka T** (1997) Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4504-4510
- Tennstedt P, Böttcher C, Clemens S** (2006) Phytochelatin synthesis is essential for the detoxification of excess Zn²⁺ and contributes significantly to the accumulation of Zn. eingreicht
- Thomine S, Lelievre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier-Brygoo H** (2003) AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J.* **34**: 685-695
- Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM, Schroeder JI** (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 4991-4996
- Tommasini R, Vogt E, Fromenteau M, Hortensteiner S, Matile P, Amrhein N, Martinoia E** (1998) An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J.* **13**: 773-780
- Tsuji N, Nishikori S, Iwabe O, Shiraki K, Miyasaka H, Takagi M, Hirata K, Miyamoto K** (2004) Characterization of phytochelatin synthase-like protein encoded by alr0975 from a prokaryote, *Nostoc* sp. PCC 7120. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**: 751-755
- Tyagi R, Lai R, Duggleby R** (2004) A new approach to 'megaprimer' polymerase chain reaction mutagenesis without an intermediate gel purification step. *BMC Biotechnology* **4**: 2

- Van Assche F, Clijsters H** (1986) Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentrations of zinc: effects on electron transport and photophosphorylation. *Physiologia Plantarum* **66**: 717-721
- van der Zaal BJ, Neuteboom LW, Pinas JE, Chardonnens AN, Schat H, Verkleij JA, Hooykaas PJ** (1999) Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiol.* **119**: 1047-1055
- Vatamaniuk OK, Bucher EA, Sundaram MV, Rea PA** (2005) CeHMT-1, a putative phytochelatin transporter, is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **280**: 23684-23690
- Vatamaniuk OK, Bucher EA, Ward JT, Rea PA** (2001) A new pathway for heavy metal detoxification in animals. Phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **276**: 20817-20820
- Vatamaniuk OK, Bucher EA, Ward JT, Rea PA** (2002) Worms take the 'phyto' out of 'phytochelatins'. *Trends Biotechnol.* **20**: 61-64
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lang A, Chalasani S, Demkiv LO, Rea PA** (2004) Phytochelatin synthase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with gamma-glutamylcysteine during catalysis: stoichiometric and site-directed mutagenic analysis of *arabidopsis thaliana* PCS1-catalyzed phytochelatin synthesis. *J. Biol. Chem.* **279**: 22449-22460
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA** (1999) AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and in vitro reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 7110-7115
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA** (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase: blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *J. Biol. Chem.* **275**: 31451-31459
- Verkleij JA, Schat H** (1990) Mechanisms of metal tolerance in higher plants. In heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects. CRC Press
- Vert G, Grotz N, Dedaldechamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat JF, Curie C** (2002) IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* **14**: 1223-1233
- Vivares D, Arnoux P, Pignol D** (2005) A papain-like enzyme at work: native and acyl-enzyme intermediate structures in phytochelatin synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 18848-18853
- Vogeli-Lange R, Wagner GJ** (1990) Subcellular Localization of Cadmium and Cadmium-Binding Peptides in Tobacco Leaves : Implication of a Transport Function for Cadmium-Binding Peptides. *Plant Physiol.* **92**: 1086-1093
- von Wiren N, Klair S, Bansal S, Briat J-F, Khodr H, Shioiri T, Leigh RA, Hider RC** (1999) Nicotianamine Chelates Both FeIII and FeII. Implications for Metal Transport in Plants. *Plant Physiol.* **119**: 1107-1114

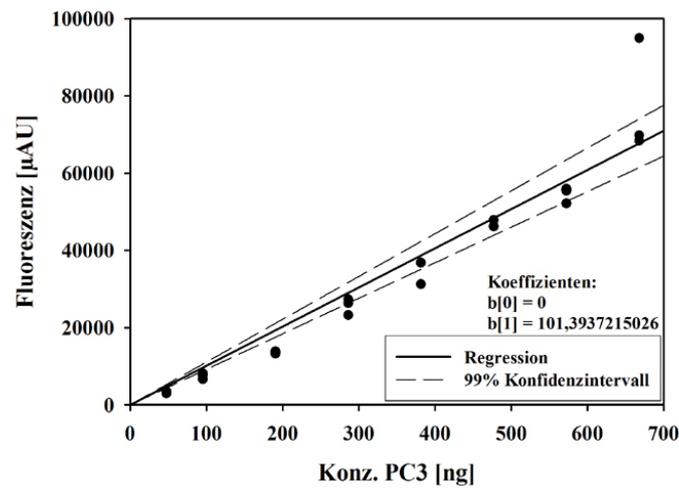
- Weber M, Trampczynska A, Clemens S** (2006) Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd²⁺-hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri*. *Plant, Cell & Environment* **29**: 950-963
- Whiting SN, de Souza MP, Terry N** (2001) Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environ. Sci. Technol.* **35**: 3144-3150
- Williams LE, Pittman JK, Hall JL** (2000) Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochim. Biophys. Acta.* **1465**: 104-126
- Winge DR, Nielson KB, Gray WR, Hamer DH** (1985) Yeast metallothionein. Sequence and metal-binding properties. *J. Biol. Chem.* **260**: 14464-14470
- Wintz H, Fox T, Wu YY, Feng V, Chen W, Chang HS, Zhu T, Vulpe C** (2003) Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *J. Biol. Chem.* **278**: 47644-47653
- Woeste KE, Kieber JJ** (2000) A strong loss-of-function mutation in RAN1 results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. *Plant Cell* **12**: 443-455
- Wysocki R, Clemens S, Augustyniak D, Golik P, Maciaszczyk E, Tamas MJ, Dziadkowiec D** (2003) Metalloid tolerance based on phytochelatins is not functionally equivalent to the arsenite transporter Acr3p. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **304**: 293-300
- Yu W, Santhanagopalan V, Sewell AK, Jensen LT, Winge DR** (1994) Dominance of metallothionein in metal ion buffering in yeast capable of synthesis of (gamma EC)_nG isopeptides. *J. Biol. Chem.* **269**: 21010-21015
- Zenk MH** (1996) Heavy metal detoxification in higher plants--a review. *Gene* **179**: 21-30
- Zhao H, 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. USA* **93**: 2454-2458
- Zhao H, Eide D** (1996b) The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**: 23203-23210
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W** (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.* **136**: 2621-2632

Anhang B: Standardgeraden für die Quantifizierung der PC-Bildung in *S. pombe*

1



2



3

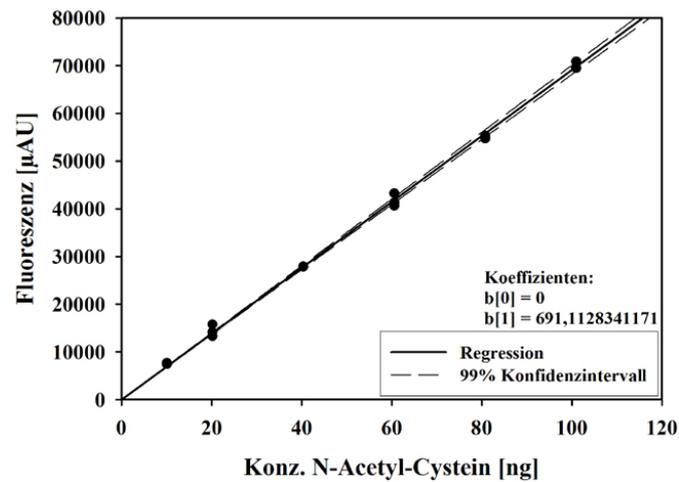


Abb. 30 Standardgeraden für PC2 (1), PC3 (2) und *N*-Acetyl-Cystein (3). Standards wurden mit mBrB derivatisiert und über eine RP-HPLC bei 480 nm nachgewiesen.

Danksagung

An erster Stelle einen großen Dank an Professor Doktor Dierk Scheel, Direktor des Leibniz-Institutes für Pflanzenbiochemie und Leiter der der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie, für die vorbildlichen Forschungsbedingungen, die für das Gelingen dieser Arbeit sehr wichtig waren. Einen besonderen Dank an Doktor Stephan Clemens das wir zusammen einen kleinen aber bedeutenden Schritt in der Aufklärung der Funktion der Phytochelatinsynthesen erarbeitet haben. Sein umfangreiches Wissen war ein Garant für den Erfolg. Bedanken möchte ich mich auch bei allen der Arbeitsgruppe Metallhomöostase. Ich habe mich sehr über die gegenseitige Hilfe und über das Interesse in der Klärung kleiner Probleme gefreut. Danke hier vor allem Doktor Alexandra Trampczynska. Einen großen Dank verpflichtet bin ich Doktor Christoph Böttcher für die gemeinsame Etablierung der Methode zur Quantifizierung der Phytochelatinbildung in *Arabidopsis thaliana*. Sehr bemerkenswert sind seine chemischen Kenntnisse und sein Wissen in die Massenspektrometrie. Für die Finanzierung diese Arbeit möchte ich mich weiterhin bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanken. Und Volker Weiske Danke ich für die Fertigstellung dieser Arbeit.

Sehr glücklich war ich, dass mir ein sehr guter Freund zu jeder Zeit an meiner Seite stand. Lars Bräuer, ich habe mich sehr gefreut mit dir im Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie zu arbeiten. Und ich hoffe auch weiterhin eine tolle Zeit mit dir verbringen zu können.

Ein großes Ziel habe ich nun endlich erreicht, auch wenn es nicht der Dokortitel der Medizin ist. Aber egal. Daher möchte ich Dank sagen an meine Familie, die mich großartig unterstützt hat.

Der wichtigste Dank an dich Stephanie. Vom ganzen Herzen danke ich dir für deine Liebe.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne andere als die aufgeführten Hilfsmittel angefertigt wurde. Die benutzten Werke wurden als solche kenntlich gemacht. Ich bewerbe mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades. Diese wissenschaftliche Arbeit wurde in keiner anderen Hochschule eingereicht.

Halle (Saale), August 2006

Pierre Tennstedt

Curriculum Vitae

Name: Tennstedt
Vorname: Pierre
Anschrift: Grellstaße 18
06120 Halle (Saale)

geboren am: 07.06.1976
geboren in: Halle (Saale)
Geschlecht: männlich
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: Bundesrepublik Deutschland

Schulische Ausbildung:

1983-1987 Polytechnische Oberschule Halle-Neustadt
1987-1990 Georgi-Dimitroff-Oberschule Halle-Neustadt
1990-1992 Sportschule Brüderstraße Leipzig
1992-1995 Sportgymnasium Leipzig (Abitur)

Studium:

Sep. 1995 – Aug. 1996 Studium Verfahrens- und Umwelttechnik an der FH Anhalt in Köthen. Beendigung des Studiums aus persönlichen Gründen.

Sep. 1996 – Aug. 2002 Studium Biochemie an der MLU Halle (Abschluss Diplom). Durchführung der Diplomarbeit am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle. Thema: Untersuchungen zur Abwehrgenexpression in „*Arabidopsis*-Mutanten“

Promotion:

Aug. 2002 - Sep. 2005 Promotion am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle,
Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie von Prof. Dr. D.
Scheel in der AG Metallhomöostase von PD Dr. S. Clemens

Publikationen:

Tennstedt *et al.* (2006). Phytochelatin synthesis is essential for the detoxification of
excess Zn^{2+} ions and contributes significantly to the accumulation of Zn. Eingereicht.

Halle (Saale), August 2006