

**UNIVERSITÄT
BAYREUTH**

**Aktivitäten und physiologische Rollen von
Phytochelatinsynthasen: bifunktionale Enzyme
in Metallhomöostase und Nichtwirtsresistenz**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

vorgelegt der

Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und

Naturwissenschaften (BayNAT)

von

Tanja Kühnlenz, geb. Kundt

geboren am 30.4.1985 in Mölln

Bayreuth, im November 2015

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2009 bis November 2015 in Bayreuth am Lehrstuhl Pflanzenphysiologie unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Stephan Clemens angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 17.11.2015

Zulassung durch das Leitungsgremium: 25.11.2015

Wissenschaftliches Kolloquium: 11.03.2016

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Stephan Kümmel

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Stephan Clemens (Erstgutachter)

Prof. Dr. Angelika Mustroph (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Benedikt Westermann (Vorsitz)

Prof. Dr. Britta Planer-Friedrich

Teile dieser Arbeit wurden in den Artikeln

"*Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase 2 is constitutively active *in vivo* and can rescue the growth defect of the *AtPCS1*-deficient *cad1-3* mutant on Cd-contaminated soil."

Kühnlenz T, Schmidt H, Uraguchi S, Clemens S (2014)

Journal of Experimental Botany, **65**, 4241-4253

"Expression of *Caenorhabditis elegans* PCS in the *AtPCS1*-deficient *Arabidopsis thaliana cad1-3* mutant separates the metal tolerance and nonhost resistance functions of phytochelatin synthases."

Kühnlenz T, Westphal L, Schmidt H, Scheel D, Clemens S (2015)

Plant, Cell & Environment, **38**, 2239-2247

veröffentlicht.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Metalle.....	1
1.1.1 Das essentielle Schwermetall Zn.....	1
1.1.2 Cadmium.....	3
1.1.3 Arsen.....	5
1.2 Das Metallhomöostase-Netzwerk in Pflanzen.....	6
1.2.1 Mobilisierung und Aufnahme.....	7
1.2.2 Chelatierung.....	9
1.2.3 Sequestrierung & Translokation.....	11
1.3 Phytochelatine.....	12
1.3.1 Struktur und Vorkommen.....	12
1.3.2 PC-Cd-Komplexe: Bildung, Transport und Sequestrierung.....	14
1.3.3 Enzymaktivierung, Katalysemechanismus und Struktur der PCS.....	16
1.4 AtPCS2.....	20
1.5 Verbreitung der PCS und alternative Aktivität.....	21
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	22
2 Material und Methoden.....	24
2.1 Materialien.....	24
2.1.1 Chemikalien.....	24
2.1.2 Medien.....	24
2.1.3 Pflanzenlinien.....	25
2.2 Kultivierung.....	25
2.2.1 <i>A. thaliana</i> Anzucht auf Erde.....	25
2.2.1.1 Anzucht zur Samengenerierung.....	25
2.2.1.2 Experimente auf artifiziell kontaminierter Erde.....	26
2.2.2 <i>A. thaliana</i> Anzucht in Flüssigkultur.....	27
2.2.2.1 Samensterilisierung.....	27
2.2.2.2 Metalltoleranzassays.....	27
2.2.2.3 Anzucht für Metall- und Metabolitanalysen.....	28
2.2.2.4 Callosedeposition.....	28
2.2.2.5 Zinkspeziierung.....	28
2.2.2.6 Transkriptanalyse unter Zinkdefizienz.....	29
2.3 Molekularbiologische Standardmethoden.....	29
2.3.1 gDNA-Isolation.....	30
2.3.2 RNA-Isolation.....	30
2.3.3 Proteinisolation.....	31
2.3.4 Proteinbestimmung.....	31
2.3.5 SDS-Gel.....	31
2.3.6 Westernblot.....	32
2.3.7 DNA-Sequenzierung.....	32
2.3.8 PCR.....	33
2.3.9 Restriktionsverdau.....	34
2.4 Transkriptanalyse.....	34
2.5 Elementanalyse.....	35
2.5.1 Vorbereitung von Pflanzenmaterial.....	35
2.5.2 Vorbereitung von Erdproben.....	36
2.5.3 Elementmessung.....	36
2.6 Metabolitanalyse.....	37
2.6.1 PC-Extraktion und Derivatisierung.....	37

2.6.2	PC-Quantifizierung mittels UPLC-ESI-QTOF-MS.....	38
2.6.3	Messung des Nicotianamingehalts	39
2.7	Zinkspeziierung.....	39
2.8	pH Messung Boden.....	40
2.9	Bestimmung Callosedeposition	40
2.10	Pflanzentransformation und Selektion	40
2.11	Berechnung der Blattfläche	41
2.12	Statistische Analysen.....	41
3	Ergebnisse	42
3.1	AtPCS1.....	42
3.1.1	Vergleich des Effekts verschiedener Zusammensetzungen des Kulturmediums auf den Zn- und Cadmiumphänotyp	42
3.1.2	Experimente auf künstlich kontaminierter Erde.....	47
3.1.3	PC-Bildung in <i>cad1-6</i>	55
3.1.4	Eingrenzung kritischer Aminosäuren für die Aktivierung durch unterschiedliche Metalle	56
3.1.5	Die Rolle der PCS in der generellen Zinkhomöostase	57
3.1.6	Die Rolle der PCS bei Zinkdefizienz	59
3.1.7	Langstreckentransport bei induzierter Seneszenz	62
3.2	AtPCS2.....	64
3.2.1	Verbreitung der PCS2 im Pflanzenreich	64
3.2.2	Entwicklung einer sensitiven Methode zur PC-Detektion	65
3.2.3	Detektion von PCs in <i>cad1-3</i>	67
3.2.4	Vergleich verschiedener Testsysteme zur Feststellung der Metalltoleranz liefert unterschiedliche Phänotypen	70
3.2.5	AtPCS2 zeigt höhere Aktivität als AtPCS1 in Abwesenheit des aktivierenden Schwermetalls Cd.....	77
3.3	Trennung von Transpeptidase und Peptidaseaktivität	77
3.3.1	Generierung von Überexpressionslinien mit phylogenetisch diverser PCS.....	78
3.3.2	CePCS vermittelt Cadmiumtoleranz in <i>cad1-3</i>	79
3.3.3	Transpeptidaseaktivität <i>in planta</i>	83
3.3.4	Peptidaseaktivität <i>in planta</i>	85
3.3.4.1	Callosedeposition.....	85
3.3.4.2	<i>Phytophthora infestans</i> Inokulationsversuche	89
3.4	Der ABC-Transporter PEN3	90
3.4.1	Genotypisierung der vier <i>pen3</i> Mutantenallele.....	91
3.4.2	<i>PEN3</i> Mutanten sind Zn- und cadmiumhypersensitiv.....	92
3.4.2.1	Metalltoleranz der <i>pen3</i> Allele in Flüssigkultur	92
3.4.2.2	Metalltoleranz der <i>pen3</i> Allele auf Agarplatten	93
3.4.3	Identifizierung einer homozygoten <i>cad1-3 pen3-1</i> Doppelmutante	94
3.4.4	Doppelmutante <i>cad1-3 pen3-1</i> zeigt einen additiven Effekt in Zinkhypersensitivität	96
3.4.5	<i>PEN3</i> Mutanten besitzen veränderte Zinkakkumulation	98
3.4.6	<i>PEN3</i> spielt nur untergeordnete Rolle in der Arsentoleranz	99
4	Diskussion	101
4.1	Die Rolle der AtPCS1 in der Zinkhomöostase.....	101
4.1.1	Effekt verschiedener Testsysteme und Komponenten des Kulturmediums auf die Ausprägung von metallabhängigen Phänotypen	101
4.1.2	Experimente auf zinkkontaminierter Erde	103
4.1.3	Zinkspeziierung	105
4.1.4	Erweitertes Metallprofil von Pflanzen auf zinkkontaminierter Erde	106
4.1.5	Funktion von PCS in der generellen Zinkhomöostase.....	107

4.1.6	Funktion von PCS unter zinklimitierenden Bedingungen	108
4.1.7	Vergleich der Zinkakkumulation in Wildtyp und <i>cad</i> Mutanten auf verschiedenen Bodentypen	109
4.1.8	PC-abhängige Remobilisierung und Langstreckentransport bei induzierter Seneszenz	110
4.2	Verhalten von <i>cad</i> Mutanten auf cadmiumkontaminierter Erde	112
4.2.1	PC-Gehalte von <i>AtPCS1</i> Mutanten aus Flüssigkultur	115
4.3	Eingrenzung kritischer Aminosäuren für die Aktivierung durch unterschiedliche Metalle	116
4.4	<i>AtPCS2</i>	118
4.4.1	Nachweis von PCs in <i>cad1-3</i>	118
4.4.2	<i>AtPCS2</i> -abhängige Komplementation der Metallhypersensitivität von <i>cad1-3</i> in verschiedenen Testsystemen	119
4.5	Trennung von Peptidase- und Transpeptidaseaktivität der PCS	123
4.5.1	Untersuchung der Transpeptidaseaktivität	124
4.5.2	Untersuchung der Peptidaseaktivität.....	125
4.5.2.1	Analyse der PCS-abhängigen Callosedeposition.....	125
4.5.2.2	Untersuchung der PCS-abhängigen Penetrationsresistenz.....	126
4.5.3	Mögliche physiologische Aktivitäten der PCS-Peptidaseaktivität.....	127
4.6	Der ABC-Transporter <i>PEN3</i>	128
4.6.1	<i>PEN3</i> vermittelt Cd- und Zinktoleranz.....	129
4.6.2	Koaktivität von <i>PEN3</i> und <i>PCS1</i> in Cadmiumentgiftung	131
4.6.3	Zn- und Cadmiumakkumulation.....	132
4.6.4	Beitrag von <i>PEN3</i> zur Arsentoleranz	132
4.7	Schlussbemerkung und Ausblick.....	133
5	Zusammenfassung	135
6	Summary.....	137
	Danksagung	138
	Literatur.....	140
	Eidesstattliche Erklärung.....	158

Abkürzungen

A_λ Absorption bei der Wellenlänge λ	Fig22Δ2 inaktive Variante des Flg22-Peptids, welchem 2 konservierte Reste fehlen
ABC "ATP-binding cassette"	FLS2 "flagellin-sensitive-2"
A. halleri <i>Arabidopsis halleri</i>	gDNA genomische DNA
ANOVA "analysis of variance"	GSH Glutathion
APS Ammoniumpersulfat	GUS β-Glucuronidase
A. thaliana <i>Arabidopsis thaliana</i>	HA Hämagglutinin
BCA Bicinchoninsäure	HMW "high molecular weight"
bp Basenpaar	HSD "honestly significant difference"
BSO Buthionin Sulfoximin	ICP-OES "inductively coupled plasma optical emission spectroscopy"
cad "cadmium-sensitive"	IRT "iron-regulated transporter"
CAPS "cleaved amplified polymorphic sequence"	kb Kilobase
CDF "cation diffusion facilitator"	LB "lysogeny broth"
cDNA "complementary DNA"	LLOD "lower limit of detection"
C. elegans <i>Caenorhabditis elegans</i>	LLOQ "lower limit of quantification"
C. intestinalis <i>Ciona intestinalis</i>	LMW "low molecular weight"
Col-0 Columbia-0 (<i>A. thaliana</i> Wildtyp)	MAMP "microbe-associated molecular patterns"
C_T "cycle threshold"	MATE "multidrug and toxin extrusion"
DMSO Dimethylsulfoxid	mBrb Monobromobiman
DNA Desoxyribonukleinsäure	MCS "multiple cloning site"
DNase Desoxyribonuklease	MES 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
DTPA Diethylentriaminpentaessigsäure	MFS "major facilitator superfamily"
DTT Dithiothreitol	mRNA "messenger RNA"
ECL "enhanced chemiluminescence"	MRP "multi-drug resistance associated protein"
E.coli <i>Escherichia coli</i>	MS Murashige-Skoog
EDTA Ethylendiamintetraessigsäure	MT Metallothionein
EF1α Elongationsfaktor 1α	MTP "metal tolerance/transport protein"
EMM Edinburgh Minimal Medium	NAC N-Acetylcystein
EPSPS 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-propansulfonsäure	NA Nicotianamin
EXAFS "extended X-ray absorption fine structure"	NAS Nicotianaminsynthase
Fmoc Fluorenylmethoxycarbonyl	NIP "Nodulin26-like intrinsic membrane protein"
HBED N,N'-Di-(2-hydroxybenzyl)-ethylendiamin-N,N'-diessigsäure	NRAMP "natural resistance-associated macrophage protein"
HMA "heavy metal ATPase"	OPT Oligopeptid Transporter
FG Frischgewicht	PC(n) Phytochelatin der Länge n
Flg22 Peptid, das 22 Aminosäuren im hochkonservierten N-terminalen Teil des bakteriellen Flagellins umspannt	PCR "polymerase chain reaction"
	PCS Phytochelatinsynthase

PDR "*pleiotropic drug resistance*"
PEN "*penetration*"
P. infestans *Phytophthora infestans*
qPCR "*quantitative real-time PCR*"
RNA Ribonukleinsäure
rpm "*revolutions per minute*"
RTL "*relative transcript level*"
RT-PCR "*reverse transcriptase PCR*"
SAIL "*Syngenta Arabidopsis insertion library*"
S. cerevisiae *Saccharomyces cerevisiae*
SDS-PAGE Natriumdodecylsulfat-
Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC-ICP-MS "*size exclusion chromatography
inductively coupled plasma mass spectrometry*"
S/N "*signal-to-noise ratio*"
S. pombe *Schizosaccharomyces pombe*
Stdabw Standardabweichung
TBS "*Tris-buffered saline*"
TCEP Tris(2-carboxyethyl)phosphin
T-DNA Transfer-DNA
TEMED Tetramethylethyldiamin
TFA Trifluoressigsäure
TG Trockengewicht
TRIS Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPLC-ESI-QTOF-MS "*ultra performance
electrospray ionization quadrupole time-of-flight
mass spectrometry*"
UTR "*untranslated region*"
v/v "*volume per volume*"
Ws-0 Wassilewskija (*Arabidopsis thaliana*
Wildtyp)
w/v "*weight per volume*"
YSL "*yellow stripe-like*"
ZIF "*zinc-induced facilitator*"
ZIP "*ZRT-, IRT-like protein*"

1 Einleitung

Aufgrund ihrer sessilen Lebensweise sind Pflanzen vielfältigen biotischen und abiotischen Stresssituationen ausgesetzt. Sich verändernde Schwermetallkonzentrationen zählen zur letzteren Kategorie und stellen eine beträchtliche Herausforderung für pflanzliche Organismen dar. Dabei werden definitionsgemäß alle Metalle mit einer Dichte größer als 5 g/cm^3 als Schwermetall bezeichnet [1]. Zunächst müssen essentielle Mikroelemente wie Fe, Zn, Cu, Mn und Mo, deren Verfügbarkeit häufig eingeschränkt ist, in ausreichenden Mengen aufgenommen werden, da sie entweder als Cofaktoren in Enzymen oder als strukturgebende Komponenten bei Proteinen (z.B. Zink-Finger-Motiv) dienen [2,3]. Da sie für die Orientierung und Positionierung von Substraten wie auch für die korrekte Enzymkonformation ausschlaggebend sind, ist ihre Anwesenheit für viele enzymatische Reaktionen unerlässlich. Zweitens müssen ihre toxischen Eigenschaften eingeschränkt werden, wenn sie in supraoptimalen Konzentrationen vorliegen. Dazu zählen die Blockade essentieller Gruppen für die biologische Funktion, die Verdrängung essentieller Metallionen aus dem aktiven Zentrum eines Enzyms sowie die Modifizierung der aktiven Konformation eines Proteins [4]. Hinzu kommt, dass redox-aktive Schwermetallionen die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach der Fentonreaktion katalysieren [5]. Drittens erfordert die Anwesenheit nicht-essentieller Schwermetalle und Metalloide, wie Cd und As, welche bereits in geringen Mengen toxisch wirken und aufgrund ihrer chemischen Ähnlichkeit zu essentiellen Elementen von Transportern mit einer weiten Substratspezifität aufgenommen werden, ein schnelles und flexibles, zugleich aber auch spezifisches Netzwerk an Entgiftungsmechanismen.

1.1 Metalle

1.1.1 Das essentielle Schwermetall Zn

Zn ist ein essentielles Element und nach Fe das zweithäufigste Übergangsmetall in allen Organismen. In seiner Funktion als Cofaktor in allen sechs Enzymklassen [2,6,7] ist es entweder, wie in den meisten Fällen, direkt in die Katalyse durch Interaktion mit dem Substratmolekül (z.B. Carboanhydrase) eingebunden [8] oder aber es hat eine ausschließlich strukturelle Aufgabe wie in der ATCase aus *Escherichia coli* [9]. Zudem ist Zn in mehreren Klassen regulatorischer Proteine vertreten, wobei seine strukturelle Rolle in den sogenannten "Zink-Finger-Motiven" erstmals im Transkriptionsfaktor IIIA aufgedeckt wurde [10]. Insgesamt konnte bisher eine große Zahl an Proteinen in den Domänen der Eukaryoten, Bakterien und Archaeen identifiziert werden, die zumindest ein Zinkion enthalten. Dabei beläuft sich die Menge der mit Zn assoziierten Proteine durchschnittlich auf ca. 8.8 %, 4.9 % bzw. 6 % bezogen auf das jeweilige Gesamtproteom. Während das menschliche Proteom mit etwa 10 % den höchsten Anteil an zinkbindenden Proteinen innerhalb

der Eukaryoten aufweist, finden sich im Proteom der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* ca. 8 % an Zinkproteinen [11,12]. Die Assoziation mit einer solchen Vielzahl an Proteinen lässt die Frage nach den besonderen Eigenschaften dieses Elements aufkommen, die ihm die Ausübung dieser Funktionen erlauben.

Anders als andere Übergangsmetalle verfügt Zn über eine komplett gefüllte d-Elektronenschale mit 10 d Elektronen. Dadurch bedingt, besitzt dieses Übergangsmetall bei Koordination mit Liganden in beliebiger Geometrie keine Ligandenfeldstabilisierungsenergie. Bei Ionen mit einer teilweise gefüllten d-Schale hingegen kann dieser Energieterm bestimmte Anordnungen an Liganden begünstigen. Zn weist daher eine besonders flexible Koordinationssphäre auf, die es von anderen Schwermetallionen unterscheidet [13]. Des Weiteren wird es in der Säure-Base-Theorie nach Lewis als Grenzsäure eingestuft, wodurch die Wechselwirkung mit einer großen Bandbreite an Ligandentypen ermöglicht wird. Dazu zählen weiche Basen wie S (aus Cys), Grenzbasen wie N (aus His) und harte Basen wie O (aus Glu, Asp oder H₂O) [14]. In der Natur existiert Zn als divalentes Kation Zn²⁺, wobei unter physiologischen Bedingungen weder die oxidierte noch die reduzierte Form verfügbar ist, so dass Zn nicht redox-aktiv ist [2,13]. Da es die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies nicht katalysiert, ist es für den strukturellen Einsatz in nukleinsäurebindenden und genregulatorischen Proteinen besonders geeignet. Zuletzt ist Zn aus kinetischer Sicht relativ labil, so dass schnelle Austauschreaktionen von Liganden möglich sind [15].

Zusammengefasst machen es die erwähnten Eigenschaften verständlich, dass spezifische Bindungsdomänen für Zn leicht evolvieren konnten. Nichtsdestotrotz hat auch Zn toxische Eigenschaften, wenn es im Überschuss verfügbar ist. So kann es aufgrund seiner Eigenschaft als Grenzsäure an S- bzw. N-Atome funktioneller Cys- oder His-Reste binden und auf diese Weise deren katalytische Eigenschaften inhibieren [4]. Außerdem ist bekannt, dass Zn essentielle Ionen aus dem aktiven Zentrum von Enzymen verdrängen und deren Aktivität hemmen kann, so z.B. die Verdrängung von Mg²⁺ aus dem aktiven Zentrum der RubisCo [16,17].

Zinkdefizienz hingegen führt in Pflanzen zu Symptomen, die von Beeinträchtigung der Proteinbiosynthese bis hin zu einer Reihe von Anzeichen reichen, die der Antwort auf Auxinmangel ähneln. Dazu zählen Verkürzung der Internodien, Epinastie, Einrollen der Blätter und ein verringertes Blattwachstum. Zudem kann es zu einer erhöhten Eisenakkumulation kommen und damit einhergehenden Schäden an Membranen, Membranproteinen, Chlorophyll und Enzymen, wodurch eine Störung der Photosynthese sowie Chlorosen und Wachstumsinhibierung resultieren [7,18]. Beim Menschen führt Zinkmangel zu Einschränkungen der kognitiven Funktionen, des Wachstums und der Entwicklung bei Kindern sowie bei Erwachsenen zu Hautproblemen, Störungen des Gastrointestinaltraktes, Haarausfall und Schwächung des Immunsystems je nach Stärke der Defizienz.

Schätzungen zufolge leiden ca. 33 % der Weltbevölkerung unter Zinkmangel, wobei dieser Wert zwischen 4-73 % je nach Herkunftsland variieren kann [19].

Die Zinkmenge im Boden ist abhängig von der Zusammensetzung des verwitternden Muttergesteins, auf welchem sich der Boden entwickelt hat. Die Lithosphäre, also die Erdkruste und der äußerste Teil des Erdmantels, beinhalten zwischen 70-80 mg Zn kg⁻¹_{Boden}. Landwirtschaftlichen Nutzflächen weisen zwischen 10-300 mg Zn kg⁻¹_{Boden} auf, wobei eine durchschnittliche Konzentration von 50-66 mg Gesamtzink kg⁻¹_{Boden} in Erde zu finden ist [7,20]. Die Zinkkonzentration in Bodenlösungen hingegen ist eher gering mit Werten zwischen 4-270 µg l⁻¹ [21]. Flächen mit hoher Metallbelastung, darunter auch Zn, sind meist auf wenige Hektar beschränkt und bestehen entweder aus Gestein mit hohen Mengen an Zinkmineralien (Sulfide, Sulfate, Oxide, Carbonate, Phosphate und Silikate) oder liegen im Einzugsgebiet von Sickerwasser benachbarter Erzvorkommen. Zusätzlicher natürlicher Zinkeintrag ergibt sich aus atmosphärischen oder biotischen Einflüssen, wie Vulkantätigkeit, Waldbränden oder Verwitterung und Auswaschung von Laub. Der größte Eintrag von Zn ist allerdings anthropogenen Ursprungs. Dazu zählen Bergbau, Verhüttung, Klärschlämme, industrielle Abfälle sowie die Verwendung von fossilen Brennstoffen, Phosphatdüngern, Düngemitteln und anderweitigen landwirtschaftlichen Chemikalien [7,20,22]. Auf solch kontaminierten Böden kann daher Zinktoxizität bei Nutzpflanzen auftreten. Dennoch ist ein Großteil der landwirtschaftlichen Nutzflächen weltweit eher zinkdefizient. Betroffen ist vor allem ein Großteil Afrikas, Nord- und Südamerikas sowie Asiens [21,23].

Zn liegt im Boden in verschiedenen Fraktionen vor: (i) wasserlöslich als Zn²⁺ in der Bodenlösung, (ii) austauschbar, als Ion an Bodenpartikel mit elektrischen Ladungen gebunden, (iii) adsorbiert, chelatiert oder komplexiert mit organischen Liganden, (iv) adsorbiert und austauschbar in der kolloidalen Fraktion (assoziiert mit Tonpartikeln, Humusverbindungen und Fe- oder Al-Hydroxiden) oder (v) in unlöslichen Zinkkomplexen und Mineralien. Dabei macht unlösliches Zn (v) mehr als 90 % des Gesamtgehaltes im Boden aus und ist nicht verfügbar für die Aufnahme durch Pflanzen. Verfügbar für die Pflanze ist nur das Zn in der Bodenlösung bzw. in labiler Form Adsorbiertes (i-iv). Zu den Bodenfaktoren, welche die Menge an Zn in der Bodenlösung kontrollieren, zählen pH-Wert und Redoxpotential, Gesamtgehalt an Zn und anderen Metallen (v.a. Fe, Mn), Bodentyp, Feuchtigkeit, Art und Gehalt von Mineral und Ton, Verwitterung, Menge an organischen Bestandteilen, Calciumcarbonat und anderen Makroelementen (v.a. P) sowie die mikrobielle Aktivität [7,20,21,24,25].

1.1.2 Cadmium

Ebenso wie Zn besitzt Cd eine komplett gefüllte 10 d-Elektronenschale und kommt daher nur in der Oxidationsstufe +2 vor. Cd ist in den meisten Zinkerzen in geringem Anteil enthalten (0.2-0.4 %).

Beide Elemente sind sich chemisch sehr ähnlich, wobei Cd^{2+} mit einem Ionenradius von 95 pm (bei einer Koordinationszahl von 6) deutlich größer ist als Zn^{2+} (74 pm). Zudem ist es mit einer Atommasse von 112 u deutlich schwerer als Zn (65 u) [14]. Eingestuft als weiches Metall, sind schwefelhaltige Gruppen als Liganden favorisiert. Allerdings konnten in organischen Bodenproben Assoziationen von Cd sowohl mit schwefel- als auch mit sauerstoff- bzw. stickstoffhaltigen Gruppen gefunden werden. Letztere sind in höheren Konzentrationen vorhanden und dienen als Bindungspartner, wenn Thiole gesättigt sind [26–28].

In der Natur kommt es in der Erdkruste als Teil von cadmiumreichem geologischen Material vor (z.B. schwarzem Schiefer) sowie durch vulkanische Aktivität, Minerale und Verwitterung von Gestein [29]. Mehr als 90 % des in der Natur oberflächlich vorkommenden Cd ist anthropogenen Ursprungs [30], wobei die Quellen des Cadmиеintrags ähnlich wie bei Zn auf Gebrauch von Phosphatdüngern und fossilen Brennstoffen, Abfall aus Zement- und Metallerzeugung, Kommunalmüll durch Nickel-Cadmiumbatterien bzw. cadmiumenthaltendes Plastik, Klärschlämme und atmosphärische Ablagerungen durch Verbrennung von Müll zurückzuführen sind. Schätzungen zufolge resultieren Cadmiumablagerungen in westlichen Ländern zu 90 % aus Phosphatdüngern und atmosphärischen Ablagerungen [31,32]. In Phosphorit, welches Ausgangsmaterial für die Produktion von Phosphatdüngern ist, können bis zu $300 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ enthalten sein, die durch Verwendung der Düngemittel in landwirtschaftliche Nutzflächen eingetragen werden. Des Weiteren kann durch den Gebrauch von Phosphatdüngern der Boden pH verringert und die Bioverfügbarkeit des Cd erhöht werden [33]. Weltweit gesehen soll die Schmelze von nicht-eisenhaltigen Metallerzen die größte anthropogene Quelle für Cadmиеintrag in Gewässer sein [22]. Dabei wird ein Großteil des Cd im Frischwasser schnell an Partikel adsorbiert und ist nur im Sediment zu finden. Erst bei Überflutungen stellt dieser Anteil ein Risiko für den Eintrag in Anbauflächen bzw. Weideland dar. Ebenso wie für Zn ist auch für Cd der pH-Wert des Bodens der entscheidendste Faktor für die Bioverfügbarkeit, da er die Adsorptionsmechanismen und Spezierung in der Bodenlösung beeinflusst [30]. In Europa finden sich im Oberboden Cadmiumkonzentrationen zwischen $0.01\text{-}14 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{Boden}}$, wobei ein Mittelwert von $0.145\text{-}0.284 \text{ mg Cd kg}^{-1}_{\text{Boden}}$ auftritt, der somit die internationalen Richtlinien für Bodenwerte unterschreitet. Kontaminierte Stellen können über $1500 \text{ mg Cd kg}^{-1}_{\text{Boden}}$ enthalten. Für die nicht-rauchende Bevölkerung stellt die Nahrung, dabei v.a. Getreide und Gemüse, den Hauptaufnahmeweg für Cd dar [30,34].

Zeichen akuter Cadmiumvergiftung reichen von schweren Bauchkrämpfen bis zu Erbrechen, Übelkeit, Durchfall, Kopfschmerzen und Schwindel und kann innerhalb von 24 Stunden zum Tod führen. Chronische Vergiftung kann Atemprobleme und Nierenversagen, Störungen im Calciummetabolismus und Knochenkrankheiten wie Osteoporose hervorrufen [31]. Cd akkumuliert vor allem in Nieren und kann dort sehr hohe Konzentrationen erreichen. Des Weiteren gibt es

Studien, dass die chronische Exposition mit Cd die Bildung von Brust-, Prostata- und Lungenkrebs begünstigt. Auch von einer endokrinen Wirkung durch Bindung an Östrogenrezeptoren wurde berichtet [35–38].

Cd ist nicht essentiell und daher schon in sehr geringen Mengen toxisch. Nur im Fall des marinen Diatoms *Thalassiosira weissflogii* kann Cd bei Zinkmangel als Cofaktor in der Carboanhydrase fungieren [39]. Auf zellulärer Ebene ist die Cadmiumtoxizität nicht vollständig verstanden. Es gibt Hinweise auf die Verdrängung von Zn^{2+} und Fe^{2+} aus Enzymen und damit einhergehender Freisetzung von Fe^{2+} , was zur Fentonreaktion und ROS-Bildung führen kann. Der auf diese Weise ausgelöste oxidative Stress kann DNA-Schäden und Lipidperoxidierung verursachen [40,41]. Durch die entstandene Änderung in der Lipidzusammensetzung wiederum ergeben sich Einschränkungen der Membranfunktionen, wodurch membranassoziierte Enzymaktivitäten gehemmt werden können [42,43]. Zudem wird durch den Abbau und die Inhibierung der Biosynthese von Chlorophyll wie auch durch die Störung der CO_2 -Fixierung die Photosynthese beeinträchtigt [44–46]. Zuletzt, obwohl nicht redox-aktiv, trägt Cd indirekt zur Generierung von oxidativem Stress bei. Dies ergibt sich durch das Herabsetzen von Enzymaktivitäten, darunter Superoxiddismutase und Katalase, die dem Antioxidationsystem angehören [47–49].

1.1.3 Arsen

Als Mitglied der 15. Hauptgruppe kommt As mit seiner Valenzelektronenkonfiguration s^2p^3 am häufigsten mit den Oxidationszahlen -3, +3 und +5 vor. In der Natur finden sich überwiegend Arsensulfide und Metallarsenide mit Fe, Co und Ni [14]. Anorganisches As wirkt dabei stark toxisch und führt bei Exposition des Menschen zu chronischer Arsenvergiftung mit Symptomen von wunder Haut, Krankheiten des peripheren Nervensystems, Störungen des Gastrointestinaltraktes, Diabetes, Nierenproblemen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen bis hin zu Haut-, Blasen- und Lungenkrebs [50]. Organische Arsenverbindungen, wie sie Meeresfrüchte beinhalten, sind weniger gesundheitsschädlich und können vom Körper abgebaut werden. Die Aufnahme erfolgt hauptsächlich durch arsenhaltiges Grundwasser und Nahrungsmittel wie Fisch, Schalentiere, Fleisch, Milchprodukte sowie Getreide und Tabakrauch.

As ist ein toxisches, nicht-essentielles Element. Zwar findet sich in der Literatur der Bericht eines Bakterienstamms, GFAJ-1 aus der Familie der Halomonadaceae, der aus einem arsenreichen und zugleich phosphatarmen Habitat stammt und angeblich As anstelle von Phosphat in Makromoleküle wie DNA einbaut [51]. Allerdings zeigten andere Gruppen in weiterführenden Studien, dass es sich bei diesem Bakterium um einen arsenresistenten aber Phosphat-abhängigen Stamm handelt, wobei kein Hinweis auf den Einbau von As in die DNA gefunden wurde [52–54]. Die ursprünglichen

Resultate von Wolfe-Simon *et al.* [51] beruhen wahrscheinlich nur auf einer Verunreinigung der DNA mit As [55].

Der natürliche Eintrag in Böden erfolgt durch vulkanische Tätigkeit und Mobilisierung geologischer Ablagerungen in das Trinkwasser. Der anthropogene Arseneintrag hingegen hat seinen Ursprung in der Produktion und Verwendung von Holzschutzmitteln, Legierungen, Farben und Agrarchemikalien v.a. in Obst- und Weinplantagen, im Bergbau wie auch in der pharmazeutischen und Glasindustrie [56]. Nichtkontaminierte Standorte können bis zu $6 \text{ mg As kg}^{-1}_{\text{Boden}}$ enthalten, während kontaminierte Standorte bis zu $1500 \text{ mg As kg}^{-1}_{\text{Boden}}$ aufweisen können. Die anorganischen Arsenformen Arsenit [As(III)] und Arsenat [As(V)] galten lange Zeit als die einzigen für Pflanzen verfügbaren Arsenformen in Bodenlösungen [57]. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass auch methylierte Arsenderivate, welche vor allem unter anaeroben Bedingungen vorkommen [58] und wahrscheinlich mikrobiellen Ursprungs sind [59], von Pflanzen aufgenommen werden können [59,60]. Unter aeroben Bedingungen ist As(V) die dominierende Arsenform im Boden und konkurriert als Phosphat analogon um die gleichen Aufnahmetransporter in die Pflanze. Die As(V)-Sensitivität ist somit eng mit dem Phosphatstatus der Pflanze verbunden. Dementsprechend führt ein erhöhtes Phosphatlevel zu einer verringerten Aufnahme von As(V), da das hochaffine Phosphataufnahmesystem unterdrückt wird [61–63]. In der Zelle konkurriert As(V) weiter mit Phosphat und kann dieses z.B. in ATP unter Bildung von instabilem ADP-As ersetzen. Dies zieht eine Störung der zellulären Energieflüsse nach sich [64]. Allerdings erfolgt nach dem Eintritt in die Zelle die Reduktion von As(V) zu As(III), welches oxidativen Stress auslösen kann [65]. Ebenso wie Cd bindet As(III) an Thiolgruppen funktioneller Cys-Reste und inhibiert deren Funktion [66]. Makroskopisch führt As zu Inhibierung des Wurzelwachstum und zum Absterben [57,62,67,68]. Dabei ist die Toxizität abhängig von der Spezierung, wobei anorganische Formen toxischer wirken als organische Derivate [57,65].

1.2 Das Metallhomöostase-Netzwerk in Pflanzen

Pflanzen besitzen mehrere Strategien, um sich gegen supraoptimale Schwermetallkonzentrationen zu schützen. Ein erster Schritt ist es, Metallionen am Eintritt in das Cytoplasma, den Symplast, zu hindern. Dies geschieht zum einen durch Bindung an sezernierte organische Säuren im Apoplast oder an anionische Gruppen in der Zellwand [69–71]. Der Hauptteil an Metallionen, die in den Symplast gelangen, wird in der Wurzel durch Komplexierung und Sequestrierung entgiftet, so dass die Translokation in den Spross und somit in die photosynthetisch aktiven Gewebe verhindert wird. Zudem wird das antioxidative System verstärkt, welches durch Enzyme wie Superoxid-dismutase, Katalase und Ascorbat-Peroxidase gegen oxidativen Stress arbeitet [72]. Zur Aufrechterhaltung des homöostatischen Netzwerks ist die koordinierte Aktion zahlreicher Transportproteine notwendig. Im Folgenden soll auf die Grundzüge des Metallhomöostase-

Netzwerks eingegangen werden (vgl. Abb. 1), wobei der Fokus auf den in dieser Arbeit verwendeten Metallen Zn und Cd und dem Metalloid As liegt, wenngleich der Begriff der Homöostase essentiellen Elementen vorbehalten ist.

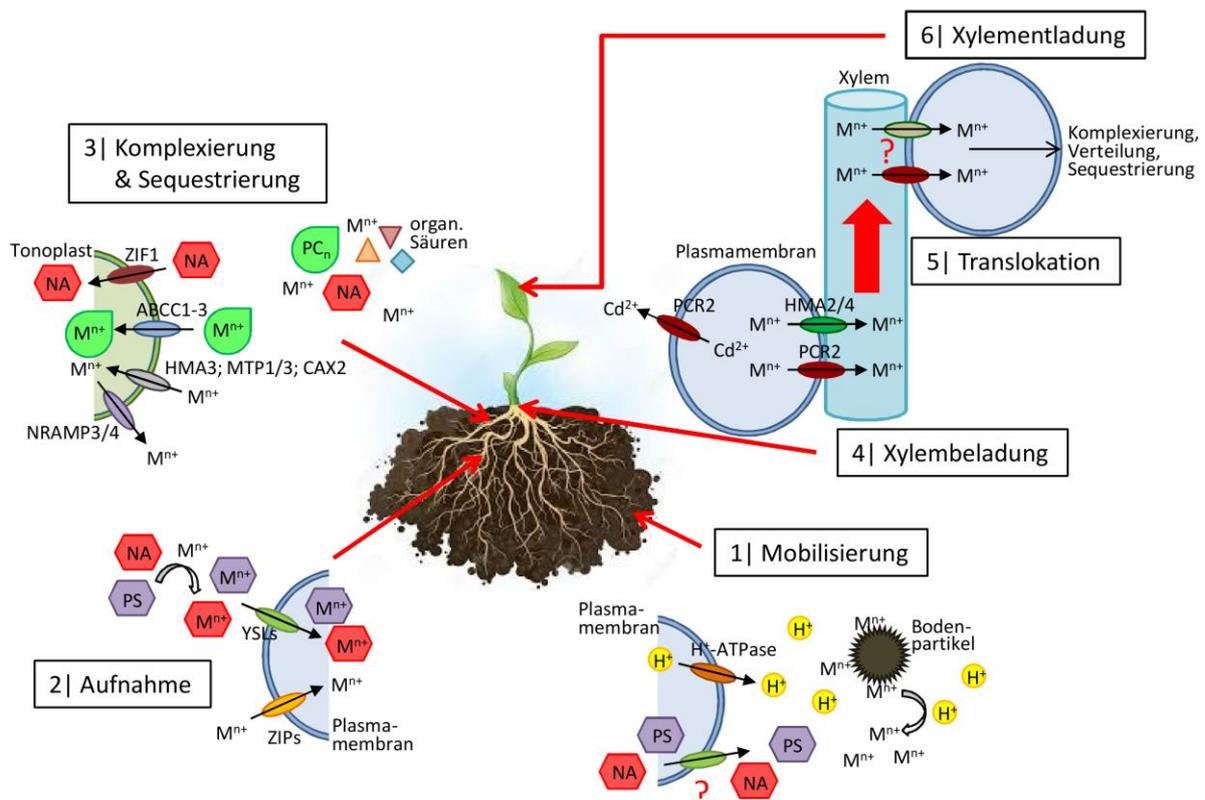


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung des Metallhomöostase-Netzwerks von Pflanzen. (1) Metallionen werden im Boden durch Ansäuern der Rhizosphäre und durch Sekretion von Chelatoren (Sechsecke) mobilisiert. (2) Aufnahme der freien Metallionen oder Metall-Chelat-Komplexe über verschiedene Aufnahmetransporter (Ellipsen mit Pfeil) in der Plasmamembran. (3) Komplexbildung der Metallionen durch cytosolische Chelatoren und Sequestrierung in der Vakuole. (4-6) Transport der Metallionen von der Wurzel in den Spross über das Xylem. Abkürzungen: NA, Nicotianamin; PS, Phytosiderophor; M, Metallion; PC, Phytochelatin.

1.2.1 Mobilisierung und Aufnahme

Wie bereits erwähnt, liegt ein großer Teil der Mikroelemente an Partikel gebunden im Boden vor. Um für die Pflanze verfügbar zu werden, müssen sie mobilisiert und aufgenommen werden. Allerdings kann die Nährstoffaufnahme durch Pflanzen nicht isoliert betrachtet werden. Mikroorganismen treten dabei als essentielle Partner auf, die seltene, wenig lösliche oder fest an Bodenbestandteile gebundene essentielle Elemente akquirieren. Beispiele hierfür sind stickstofffixierende Rhizobien sowie spezialisierte Bodenpilze, die zusammen mit Pflanzenwurzeln eine symbiotische Gemeinschaft, die sogenannte Mycorrhiza bilden [73,74]. Zudem sind Elemente heterogen im Boden verteilt, was Einfluss auf die Wurzelarchitektur nimmt. Dabei ist der Effekt von Makroelementmangel im Boden auf das Wurzelwachstum beschrieben [75–77], während die

Auswirkungen von Mikroelementdefizienzen auf die Plastizität der Wurzel, mit Ausnahme von Mn und Fe, weitestgehend unbekannt sind [78–80].

Grasartige Pflanzen sondern zur Mobilisierung von Metallionen nicht-proteinogene Aminosäuren wie Muginsäure als Chelatoren, auch Phytosiderophore genannt, ab, welche vor allem aus der Eisenhomöostase bekannt sind, aber auch zur Chelatierung der meisten Übergangsmetalle fähig sind. Die gebildeten Fe(III)-Muginsäure-Komplexe sind starke Chelate und erhöhen die Löslichkeit wie auch die Mobilität der Eisenionen zur Wurzel [81]. Die Aufnahme erfolgt anschließend, wie für Mais gezeigt, über den YS1-Transporter ("*yellow stripe*") [82,83]. Auch für Zn konnte die Aufnahme von Zn-MA-Komplexen über YS1 nachgewiesen werden [84]. Da dikotyle Pflanzen keine Phytosiderophore bilden, aber trotzdem YSL-Proteine ("*yellow stripe-like*") besitzen, geht man davon aus, dass diese Schwermetall-Nicotianamin (NA)-Komplexe transportieren [85,86]. Die Effluxproteine für Phytosiderophore wurden mit Ausnahme des Reistransporters TOM1 aus der MFS-Familie ("*major facilitator superfamily*") noch nicht identifiziert [87].

Dikotyle und monokotyle nicht-grasartige Pflanzen säuern die Rhizosphäre an, um die Metalllöslichkeit zu erhöhen [82]. Dies erfolgt über die Aktivität von H⁺-ATPasen, die in der Plasmamembran von Rhizodermiszellen lokalisiert sind, und unter ATP-Verbrauch Protonen in den Apoplast transportieren, welcher einen pH-Wert zwischen 5 und 6 erreichen kann. In Pflanzen können an der Membrannenseite Potentiale von über -200 mV anliegen, welche Schwermetallkationen anziehen und treibende Kraft für deren Aufnahme in die Zelle darstellen [88]. Die ausgeschiedenen Protonen wiederum nehmen am Kationenaustausch teil und können Metallionen, die fest an Bodenpartikel (Ton, CaCO₃, organ. Substanzen) oder in unlöslichen Fe-/Mn-Hydroxiden gebunden sind, herauslösen [3]. Unter Eisenmangelbedingungen wurden zudem Phenolderivate in Wurzelexsudaten nachgewiesen, welche für die Remobilisierung von apoplastisch gebundenem Fe entscheidend sind [89,90].

Einmal in Lösung können Schwermetallionen von Transportproteinen aufgenommen werden, wobei die Selektivität dieser Transporter eher gering ist. Die wichtigste Gruppe von Aufnahmetransportern sind ZIP-Proteine ("*ZRT-, IRT-like proteins*"), wobei 16 Mitglieder in *A. thaliana* zu finden sind. Das am besten charakterisierte Mitglied ist IRT1 ("*iron regulated transporter*"), welches in der Plasmamembran lokalisiert ist und der Hauptaufnahmetransporter für Fe in die Wurzel ist [91,92]. Allerdings konnte mittels heterologer Expression in Hefe ein breites Substratspektrum für divalente Schwermetallionen, darunter auch Zn und Cd, nachgewiesen werden [93]. Die Expression von IRT1 wird unter Eisendefizienz induziert, wodurch es unter dieser Bedingung leicht zur Akkumulation überschüssiger Mengen an Mn, Co, Zn und Cd kommen kann [92–96]. Hinweise für die Beteiligung anderer ZIPs an der Zinkaufnahme gibt es für ZIP1-4 und ZIP9, wobei die Expression von ZIP1, ZIP3, ZIP4 und ZIP9 unter Zinkmangel in Wurzeln gezeigt wurde [97,98].

Verglichen mit *A. thaliana* ist die Genexpression von *ZIP4* und *ZIP9* in der zinkhyperakkumulierenden Spezies *Arabidopsis halleri* generell erhöht [99,100]. Zudem konnten erhöhte Transkriptmengen von *IRT3*, welches ebenfalls in der Plasmamembran lokalisiert ist, unter Zinkmangel detektiert werden. Überexpression führte zu einer erhöhten Zinkakkumulation im Blatt [101].

Da Cd kein essentielles Element ist und somit kein spezifisches Aufnahmesystem besitzt, scheint die Hauptaufnahme aufgrund seiner chemischen Ähnlichkeit zu Zn über die Importsysteme dieses Elements zu laufen. Dies wird gestützt durch die Beobachtung, dass der Hyperakkumulierer *Noccaea caerulescens* mit zunehmender Zinkaufnahme auch mehr Cd akkumuliert [102]. Außerdem häufen die meisten Zinkhyperakkumulierer auch verstärkt Cd an [103]. Zusätzlich weist die Inhibierung der Zinkaufnahme in Hefezellen durch überschüssiges Cd auf eine Transportaktivität von *ZIP1* und *ZIP3* für dieses nicht-essentielle Metallion hin [97].

Ebenso wie für Cd wurde für As eine Aufnahme über Transporter essentieller Elemente nachgewiesen. Durch seine chemische Ähnlichkeit zu Phosphat gelangt As(V) über das hoch- und niedrigaffine Phosphataufnahmesystem in die Zelle. Dies konnte zumindest für zwei Pflanzenspezies aus der Familie der Poaceae und Araceae gezeigt werden [61,63]. In der Zelle wird As(V) durch die Arsenatreduktase *HAC1* zu As(III) reduziert [104]. Nicht-hyperakkumulierende Spezies transportieren anschließend einen Großteil des Arsenits über ein Effluxsystem in die Rhizosphäre [105]. Mit Ausnahme des Siliciumtransporters *LSI1* aus Reis, welcher gleichzeitig als bidirektionaler As(III)-Transporter agiert [106], konnten die entsprechenden Transporter in Pflanzen bisher nicht identifiziert werden. In *Saccharomyces cerevisiae* erfolgt dieser As(III)-Efflux durch den Plasmamembrantransporter *ACR3* [107,108]. Unter reduzierenden Bedingungen, z.B. auf überfluteten Reisfeldern, liegt As hauptsächlich als As(III) im Boden vor und tritt über die NIP-Untergruppe ("*Nodulin26-like intrinsic membrane protein*") der Aquaporine, darunter *LSI1*, in die Pflanze ein [109–111]. Letztere fungieren im Transport neutraler Moleküle wie Wasser, Glycerin oder Harnstoff.

1.2.2 Chelatierung

Durch das breite Substratspektrum vieler Aufnahmetransporter gelangt eine Mischung aus Metallionen in die Zelle. Erst innerhalb der Zelle scheint eine Differenzierung zwischen Metallionen durch selektive Chelatierung bzw. Export aus dem Cytosol zu erfolgen [112]. Nur ein geringer Anteil der in der Zelle vorkommenden Metallionen liegt in freier Form vor. So wurde für *Escherichia coli* eine Konzentration an freiem Zn im femtomolaren Bereich berechnet, während die Gesamtkonzentration in der Zelle im millimolaren Bereich liegt [6]. Für das Cytosol in Wurzeln von *A. thaliana* konnte unter Kontrollbedingungen eine labile Zinkmenge von ca. 400 pM experimentell

ermittelt werden [113]. Im Fall von Cu gaben Experimente mit *S. cerevisiae* darüber Aufschluss, dass es in der Zelle überhaupt nicht in freier Form existiert [114].

Für die Bewegung innerhalb der Zelle sind demnach Austauschreaktionen zwischen Liganden und ein Verteilungssystem erforderlich. Metallionen, die nicht spezifisch an Proteine gebunden sind, so die Vermutung, werden hauptsächlich von niedermolekularen Liganden, sogenannten Chelatoren, komplexiert. Zu den Hauptaufgaben dieser Moleküle zählen die konstante Komplexierung von Schwermetallionen, um deren toxische Eigenschaften einzuschränken, wie auch der Erhalt der Löslichkeit. Zudem tragen sie durch Puffern cytosolischer Metallkonzentrationen zur Detoxifizierung bei [115].

Aminosäuren dienen als Liganden für essentielle Elemente. Bekannt aus der Eisenhomöostase ist hier die nicht-proteinogene Aminosäure Nicotianamin aus Pflanzen und filamentösen Pilzen als hochaffiner Metallchelator für Fe, Cu, Zn und Mn zu nennen [116–122]. Auch freies Histidin bindet mit hoher Affinität Übergangsmetalle. So konnte eine entscheidende Rolle in der Nickelhyperakkumulation nachgewiesen werden. Zudem stellt His die häufigste Ligandenspezies für Zn in Wurzeln des Hyperakkumulierers *N. caerulescens* dar [123–125]. Auch Komplexe aus Metallionen und organischen Säuren wie Malat, Citrat und Oxalat sind bekannt, jedoch verglichen mit NA/His-Komplexen thermodynamisch weniger stabil. Ihre höhere Säurestabilität hingegen ist für die vakuoläre Speicherung von Nutzen. Des Weiteren liegt Zn im Spross hyperakkumulierender Spezies vor allem mit Malat und Citrat koordiniert vor, was aufgrund der hohen Metallkonzentrationen einen energetischen Vorteil zu starken Liganden wie NA bringt [125–127].

Ein weiterer wichtiger Chelator, hauptsächlich bekannt aus der Detoxifizierung nicht-essentieller Elemente wie Cd, As und Pb sind Phytochelatine, auf welche in späteren Abschnitten näher eingegangen wird. Metallothioneine (MTs) sind niedermolekulare cysteinreiche Proteine, die in Vertebraten, Invertebraten, eukaryotischen Mikroorganismen und einigen Prokaryoten vorkommen und Schwermetalle, darunter v.a. Cd, Cu und Zn über ihre Thiolgruppen binden. Sie weisen in allen Spezies eine hochkonservierte Primärstruktur auf und werden daraufhin in zwei Klassen eingeteilt [128]. Pilze verwenden für die Schwermetallkomplexierung fast ausschließlich MTs, mit Ausnahme von *Schizosaccharomyces pombe* und *Candida glabrata*. Letzterer besitzt sowohl MTs als auch PCs, wobei in Anwesenheit von Cu MTs induziert und PCs als Antwort auf Cd synthetisiert werden [129,130]. In Pflanzen gibt es MT-ähnliche Proteine, die aber nur wenig Sequenzähnlichkeit zu MTs aus anderen Organismen aufweisen. In *Arabidopsis* existieren sieben Gene für MTs [131]. Da die Cadmiumdetoxifizierung in Pflanzen hauptsächlich über PCs abläuft, bleibt die Funktion dieser kleinen Proteine in Pflanzen ungeklärt. Mögliche Funktionen in der Cu- und Zinkhomöostase wie auch in der Remobilisierung von Mikroelementen aus seneszenten Blättern wurden angedeutet [132–135].

Die letzte Gruppe cytosolischer Metallliganden sind Metallochaperone, welche als lösliche Metallrezeptorproteine agieren. Sie tragen nicht zur Detoxifizierung von Schwermetallen bei, sondern wurden als Vermittler für den sicheren Transfer von Kupferionen zu ihrem Zielprotein entdeckt [136]. Für den Transport anderer Metallionen zu Apoproteinen sind bisher keine Metallochaperone bekannt.

1.2.3 Sequestrierung & Translokation

Schwermetalle werden im Symplast chelatiert und anschließend entweder in der Vakuole immobilisiert oder über Plasmodesmata in Richtung Leitbündel für die nachfolgende Translokation in oberirdische Pflanzenteile transportiert. Die Vakuole stellt hierbei den Hauptspeicherort für überschüssige Schwermetallionen dar. So wurde in Vakuolen über 80 % des zellulären Zn- und ca. 50 % des zellulären Eisenlevels gefunden. Cd war gänzlich in der Vakuole zu detektieren [137,138]. Gleichzeitig mit der Sequestrierung werden die Metallionen aus dem Wurzel-Spross-Transport entfernt. Ein solcher Beitrag zur basalen Metalltoleranz konnte für Zn gezeigt werden [139]. Dabei entscheidet die Speziierung im Cytosol über das Ausmaß der Sequestrierung bzw. das weitere Transportschicksal [117–119,140].

Exportproteine aus dem Cytoplasma scheinen wesentlich spezifischer für die Unterscheidung der Schwermetallionen zu sein, als die Aufnahmetransporter [112]. So sind die CDF-Transporter ("*cation diffusion facilitator*") MTP1 und MTP3 ("*metal tolerance/ transport protein*") weitestgehend selektiv für den Export von Zn^{2+} in die Vakuole [141,142]. Ein weiterer tonoplastidärer Transporter ist HMA3 ("*heavy metal ATPase*"). Zusammen mit HMA2 und HMA4 bildet er einen phylogenetischen Cluster unter den acht P_{1B} -ATPasen in *Arabidopsis*, was wahrscheinlich auf das gleiche Substratspektrum (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+}) zurückzuführen ist [143–145]. Ebenfalls im Tonoplast lokalisiert sind NRAMP3 und NRAMP4 ("*natural resistance-associated macrophage protein*"). Sie vermitteln den Export von Fe, Mn, Zn und Cd aus der Vakuole, hauptsächlich zur Remobilisierung essentieller Metalle bei Fe- und Mangandefizienz. Dies ermöglicht die Aufrechterhaltung der Photosynthese und der Keimungsfähigkeit von Samen [137,146–148]. *A. thaliana nramp3 nramp4* Doppelmutanten waren stark zink- und cadmiumhypersensitiv, wahrscheinlich bedingt durch eine generelle Störung der Remobilisierung von Fe und Mn [149].

ZIF1 ("*zinc-induced facilitator*"), ein Mitglied der MFS-Familie, transportiert NA in die Vakuole. Überexpression dieses Transporters führt zur Immobilisierung von Zn-, nicht aber Fe-NA-Komplexen, in der Wurzel, wodurch weniger Zink im Spross landet. Auf diesem Weg trägt ZIF1 zur Zinkdetoxifizierung bei, unter gleichzeitiger Aufrechterhaltung der Eisenhomöostase bei Eisenmangel, wenn durch Aktivität von IRT1 auch verstärkt Zn aufgenommen wird [118,150].

Demnach scheint ZIF1 eine wichtige Rolle für die Unterscheidung beider Metalle innerhalb der Zelle, als Ausgleich für ihre unspezifische Aufnahme, auszufüllen.

Metallionen, die über das Xylem in den Spross translociert werden sollen, müssen in den Symplast aufgenommen werden. Dies ist eine Folge der verstärkten Zellwand der Endodermis, dem sogenannten Casparischen Streifen, welcher die Diffusion von Stoffen aus dem Apoplast in die Leitbündel verhindert [151]. Ob ein Metall translociert wird, hängt von Sequestrierungs- und Transportprozessen in den Zentralzylinder und von der apoplastischen Xylembeladung ab.

Die bereits erwähnten Transportproteine HMA2 und HMA4 wurden hauptsächlich in der Plasmamembran von Leitbündeln in Wurzel, Stiel und Blatt lokalisiert. Experimentelle Befunde deuten auf eine Beteiligung an der Translokation in den Spross von Zn und Cd, nicht aber von Fe oder Mn, über das Xylem hin [152–156]. Ein weiterer Transporter, der unabhängig davon an der Zinktranslokation teilnehmen soll, ist PCR2 ("*plant cadmium resistance*"), der in Wurzeln in der Plasmamembran von Epidermis- und in Xylemparenchymzellen zu finden ist. In Blättern ist er hauptsächlich in den Leitbündeln exprimiert. Experimente deuten auf den Export überschüssiger Zinkionen in den Apoplast hin, bevor diese zum Leitbündel transportiert werden. Außerdem scheint der Transporter unabhängig von HMA2 und HMA4 zur Xylembeladung von Zn beizutragen [157]. Ein weiteres Mitglied dieser Familie, PCR1, wurde in der Plasmamembran oberirdischer Pflanzenteile gefunden, wo er sich durch Effluxaktivität an der Cadmiumtoleranz beteiligt [158]. Die Translokation von As(V) und As(III) über das Xylem erfolgt wahrscheinlich ebenfalls wie die Aufnahme durch Phosphattransporter bzw. Aquaporine [159]. So vermittelt der Siliciumtransporter LSI2 in Reis den Efflux von As(III), welches die vorherrschende intrazelluläre Arsenform darstellt, aus Exodermis- und Endodermiszellen in Richtung des Zentralzylinders [111].

Einmal im Xylem, bewegen sich Metallionen mit dem Transpirationsstrom in den Spross. Die anschließende Xylementladung und Wiederaufnahme in den Symplast ist ein weiterer Schritt in der kontrollierten Verteilung und Detoxifizierung von Schwermetallen [140]. Dabei ist über die interzelluläre Verteilung der Ionen nur wenig bekannt. Zn und Cd wurden hauptsächlich in Epidermis und Trichomen gefunden. In den hyperakkumulierenden Spezies *A. halleri* und *N. caerulea* wurde ein Großteil der Zn- und Cadmiumionen in Mesophyll- bzw. Epidermiszellen detektiert [127,138,160–163].

1.3 Phytochelatine

1.3.1 Struktur und Vorkommen

Phytochelatine (PCs) stellen eine Schlüsselfunktion in der Entgiftung von Cd und As in allen höheren Pflanzen dar. Hierbei handelt es sich um kleine cysteinreiche Peptide mit der generellen Struktur $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, wobei Kettenlängen von $n=2$ bis 11 [164] gebildet werden (vgl. Abb. 2). *In*

in vivo wurden PCs mit einer Kettenlänge bis zu $n=7$ gefunden [165]. Ihre nicht-ribosomale Synthese erfolgt aus Glutathion (GSH; γ -Glu-Cys-Gly) durch das Enzym Phytochelatinsynthase (PCS), welches als Homodimer mit einer Größe zwischen 41-55 kDa aktiv ist [166–169]. Die Aktivierung erfolgt durch eine Reihe von Schwermetallionen darunter Ag^+ , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Sb^{3+} , Zn^{2+} sowie durch das Metalloid As, wobei Cd als stärkster Aktivator gilt [164,165,167,169,170]. Die Metallionen werden anschließend durch die freien Thiolgruppen der gebildeten Peptide komplexiert [164,171].

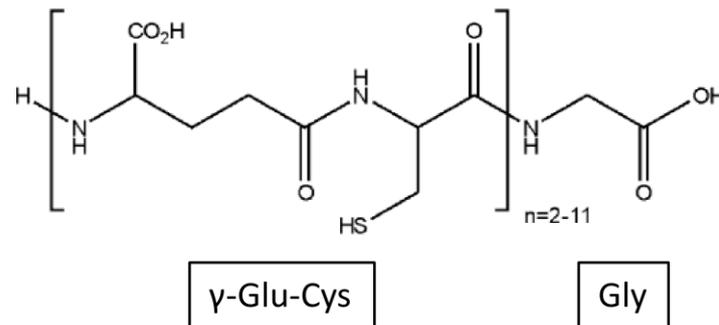


Abb. 2: Struktur von Phytochelatinen. Die schwermetallbindenden Peptide werden nicht-ribosomal aus Glutathion synthetisiert und aus mehreren Einheiten des Dipeptids γ -Glutamylcystein mit terminalem Glycin aufgebaut. Kettenlängen bis $n=7$ wurden *in vivo* gefunden (Abbildung nach [172]).

Erstmals wurden PCs in der Spaltheefe *S. pombe* als cadmiumbindende Peptide unter dem Namen Cadystine beschrieben [129,173,174]. Die weitere Charakterisierung in höheren Pflanzen nahmen Grill *et al.* vor [164,165]. Da sie sich als die einzigen thiolreichen und schwermetallbindenden Peptide in allen untersuchten Pflanzen herausstellten, erfolgte die Umbenennung in Phytochelatine.

Zusätzlich zu den oben genannten Gly-haltigen PCs wurden in Pflanzen, abhängig von der untersuchten Spezies, auch Peptide mit variierender terminaler Aminosäure gefunden. So wurden in der Familie der Fabaceae PCs der Struktur $(\gamma$ -Glu-Cys) $_{2-7}$ - β -Ala detektiert, welche aufgrund ihrer Homologie zu normalen Gly-haltigen PCs, homo-PCs genannt wurden [170]. Des Weiteren wurden bei Mitgliedern aus der Familie der Poaceae die Ser-haltigen Peptide $(\gamma$ -Glu-Cys) $_{2-4}$ -Ser identifiziert, welche, abgeleitet von hydroxymethyl-GSH hydroxymethyl-PCs genannt wurden. Spezies wie Reis, Weizen, Roggen und Hafer produzieren in Anwesenheit von Cd sowohl hydroxymethyl-PCs als auch PCs und Peptide ohne terminale Aminosäure, sogenannte des(Gly)-PCs [175]. Letztere wurden erstmals in Mais [176], später auch in *S. pombe* [177] detektiert. Eine vierte PC-Klasse mit der Zusammensetzung $(\gamma$ -Glu-Cys) $_{2-3}$ -Glu wurde ebenfalls in Mais entdeckt, welcher gleichzeitig PCs und des(Gly)-Peptide bildete [178]. Da es sich bei den aufgeführten PC-Varianten mit anderer terminaler Aminosäure um Isoformen der am weitesten verbreiteten Glycin-haltigen PCs handelt, wurde vorgeschlagen, diese iso-PCs zu nennen [179].

1.3.2 PC-Cd-Komplexe: Bildung, Transport und Sequestrierung

Da sich Studien zur PC-Metall-Komplexbildung hauptsächlich auf Cd gründen, beschränkt sich der folgende Abschnitt auf dieses Element. Es kann aber angenommen werden, dass die Abläufe für andere Metalle analog sind. Die Synthese der PCs erfolgt aus der Polymerisierung von γ -EC Einheiten, welche von GSH bereitgestellt werden. Letzteres wird in zwei Stufen aus den Aminosäuren Glu, Cys und Gly durch die Enzyme γ -Glutamylcystein-Synthetase (EC 6.3.2.2) und GSH-Synthetase (EC 6.3.2.3) unter ATP-Hydrolyse gebildet (vgl. Abb. 3) [180–182]. Die Transkription beider Gene wird bei Cu- oder Cadmiumüberschuss erhöht und führt zur verstärkten GSH-Biosynthese [183,184].

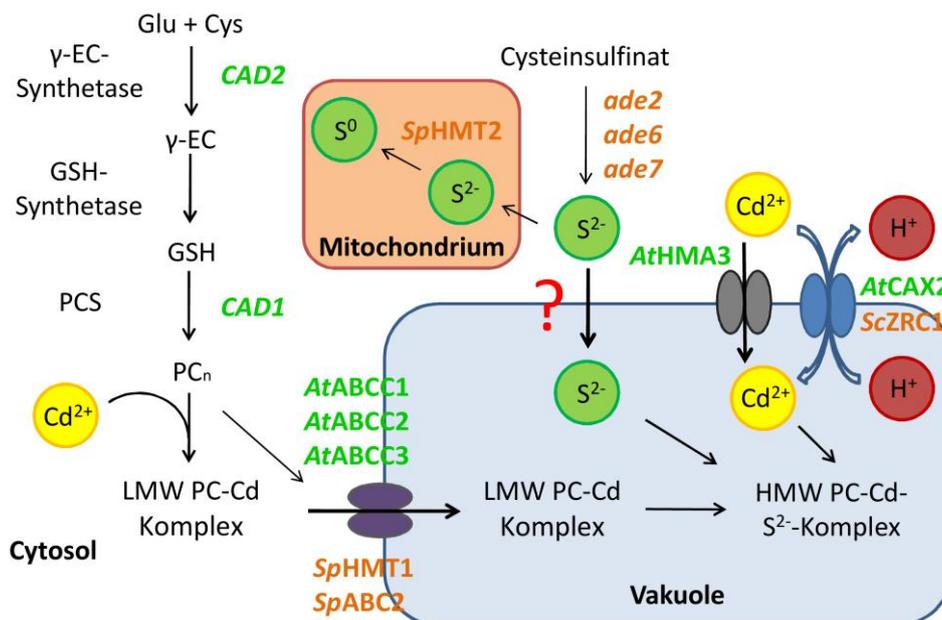


Abb. 3: Modell zur PC-abhängigen Cadmiumentgiftung in Pflanzen und Pilzen. Gene sind kursiv angegeben. *CAD1* und *CAD2* stammen aus *A. thaliana*; während *ade2*, *ade6* und *ade7* in *S. pombe* identifiziert wurden. Proteine sind in Großbuchstaben angegeben, wobei der Organismus, in dem sie vorkommen mit kursiven Buchstaben vorangestellt ist: *At*, *A. thaliana*; *Sc*, *S. cerevisiae*; *Sp*, *S. pombe*. Schritte des Sulfidmetabolismus sind weitestgehend unbekannt. (Schema modifiziert nach [200])

Die anschließende PC-Synthese liefert Chelatoren, welche die aktivierenden Schwermetalle komplexieren, wodurch niedermolekulare (LMW) PC-Schwermetallkomplexe gebildet werden. Diese bestehen aus einer heterogenen Mischung aus Peptiden mit unterschiedlichen Kettenlängen und werden anschließend in die Vakuole transportiert [164,165,177,185–190]. Der erste Nachweis für den Transport von PC-Cd-Komplexen gelang in *S. pombe* durch den ABC-Transporter ("ATP-binding cassette") HMT1. Später wurde ein weiterer Transporter ABC2 identifiziert. Zusätzlich zu LMW-Komplexen transportiert HMT1 auch apo-PCs [191–193]. Spätere Studien zeigten, dass *SpHMT1* und das Homolog aus *Caenorhabditis elegans* auch unabhängig von PCs zur Cadmiumtoleranz beitragen, wahrscheinlich durch den Transport von Cd-GSH-Komplexen [194–196]. Die Identifizierung der homologen Transporter ABCC1, ABCC2 und ABCC3 in *A. thaliana* gelang erst kürzlich. Für die beiden

erstgenannten Transporter wurde auch der Transport von PC-As- und PC-Hg-Komplexen gezeigt [197–199].

In der Vakuole werden den LMW-Komplexen weitere Cd- und Sulfidionen addiert, wodurch hochmolekulare (HMW) Komplexe gebildet werden. Diese HMW-Komplexe werden als vakuoläre Speicherform angesehen, treten aber nur bei extremer Cadmiumbelastung auf. Sie zeichnen sich durch eine erhöhte Säurestabilität und Cadmiumbindungskapazität aus [131,188,200,201]. Die Anwesenheit von sogenanntem säurelabilen Sulfid wurde frühzeitig in Komplexen von *S. pombe* und dem Einzeller *Euglena gracilis* beschrieben [185,201–203]. Die Einlagerung von Sulfid ermöglicht eine Erhöhung der Cadmiummenge pro Molekül. Mit zunehmendem Einbau von Cd^{2+} und S^{2-} in den Komplex wurde eine Abnahme der Peptidmenge beobachtet, wodurch eine Verringerung der Komplexgröße auftrat. Ein zusätzlicher Effekt des Sulfideinbaus ist eine Stabilisierung des pH-Werts, bei welchem die Dissoziation erfolgt, d.h. die Protonierung der Thiolliganden bei gleichzeitiger Freisetzung der Cadmiumionen. Komplexe ohne Sulfid waren bei pH 5 zu 50 % dissoziiert, während bei solchen mit Sulfid erst unterhalb eines pH von 4 die halbmaximale Dissoziation einsetzte [131,201]. Zudem soll Sulfid Schutz vor proteolytischem Abbau bieten. *In planta* wurde außerdem säurelabiles Sulfit in Tomatenzellkulturen nachgewiesen, wobei die Konzentration sogar höher lag als die von Sulfid [187].

Da PC-Cd-Komplexe bis zum heutigen Zeitpunkt nicht kristallisiert werden konnten, gibt es nur wenig strukturelle Informationen. Mittels EXAFS-Spektroskopie konnte in nativen PC-Cd-LMW-Komplexen aus Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina* die Koordination eines Cadmiumions mit vier Schwefelatomen, aus PCs stammend, detektiert werden. Des Weiteren konnte eine Koordination durch Sulfide wie auch durch die Carboxylgruppe der Peptide ausgeschlossen werden. Letztere sind der Komplexaußenseite zugewandt, wodurch sich deren hohe Hydrophilie, Wasserlöslichkeit und der polyanionische Charakter erklären lassen. Die Sättigung dieser nativen Komplexe mit CdSO_4 führte zur Präzipitatbildung und einem Verhältnis von Peptid-SH und Cd von 1:1, wobei die Koordination des Schwermetallions von drei O- bzw. N-Atomen komplettiert wurde [204]. An anderer Stelle wurde von einem Verhältnis von Thiol-Cys und Schwermetallion von 2:1 für Cd, Zn und Pb, von 1:1 für Cu und von 3:1 für As berichtet [165,171,187,205]. Röntgenstrukturdaten von HMW-Komplexen aus *S. pombe* mit einem hohen Sulfid/Cd-Verhältnis ergaben, dass diese sich aus Aggregaten von 20 Å Partikeln zusammensetzen, welche wiederum aus einem CdS-Kristallitkern bestehen und von PCs ummantelt sind [189,206].

Die freien Cadmiumionen, die dem Komplex zugefügt werden, gelangen wahrscheinlich über einen $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter in die Vakuole. Experimentelle Hinweise auf eine solche Aktivität, angetrieben durch den pH-Gradienten über den Tonoplast, wurden in *S. pombe* und *S. cerevisiae* sowie in Wurzeln von Hafer gefunden [192,207,208]. In der Bäckerhefe trägt außerdem der in der

Vakuolenmembran lokalisierte Transporter ZRC1 zur Cadmiumtoleranz bei [209]. *In planta* konnte für den Antiporter CAX2 [210] und für HMA3 der Import von Cd^{2+} [144,211–213] in die Vakuole nachgewiesen werden. Der *A. thaliana* Ökotyp Col-0 weist eine Mutation in HMA3 auf, ist aber dennoch cadmiumtolerant, was darauf hinweist, dass andere Transporter diese fehlende Funktion ausfüllen können [152].

Die Bereitstellung der Sulfidionen hingegen ist noch weitestgehend ungeklärt. Ebenfalls in *S. pombe* wurde beobachtet, dass zwei Enzyme der Purinbiosynthese (codiert durch *ade2* und *ade7*) für die Bildung von HMW-Komplexen notwendig sind. Diese benutzen das Schwefelanalogen von Asp, Cysteinsulfonat, um Intermediate bzw. Carrier für die Sulfatassimilation zu produzieren, welche wahrscheinlich die Sulfidionen bereitstellen. Dabei ist unklar, ob die Sulfidquelle im Cytosol oder in der Vakuole gebildet wird [214,215]. Des Weiteren wurde für *S. pombe hmt2* Mutanten beobachtet, dass bei Cadmiumüberschuss trotz funktionaler PCS die bekannte starke PC-Akkumulation ausbleibt. Die Mutation der Sulfiddehydrogenase HMT2, welche durch Sulfidoxidation in den Mitochondrien an der intrazellulären Sulfidhomöostase beteiligt ist, bedingt wahrscheinlich die Akkumulation von S^{2-} im Cytosol. Dies hat die Bildung toxischer CdS-Präzipitate zur Folge, wodurch eine Verstärkung der GSH-Synthese und die Bildung der aktivierenden Metall-Thiolatkomplexe verhindert wird [216].

1.3.3 Enzymaktivierung, Katalysemechanismus und Struktur der PCS

Bei der PCS handelt es sich um eine γ -EC Dipeptidyltransferase (EC 2.3.2.15), welche einem Akzeptor (GSH oder ein bereits bestehendes PC) eine weitere γ -EC Einheit hinzufügt. Die Kettenverlängerung erfolgt dabei vom C- zum N-Terminus des entstehenden Peptids [171,217,218]. Entgegen der früheren Annahme und trotz einer hochaffinen Cadmiumbindung der *AtPCS1* mit einer Bindungskapazität von 7, stellten Vatamaniuk *et al.* [169] anhand von *in vitro* Experimenten die umstrittene These auf, dass die Aktivierung nicht durch direkte Bindung freier Metallionen an das Enzym stattfindet, sondern indirekt durch Schwermetall-Thiolatkomplexe (gezeigt für Cd- GS_2 und Zn- GS_2).

Die Reaktion läuft dabei nach einem substituierten Enzymmechanismus ab, wobei freies Glutathion und Schwermetall-Thiolatkomplexe als niedrig (mM) bzw. hoch affine (μM) Kosubstrate dienen. Die Beobachtung, dass das Angebot von S-alkyliertem GSH in Abwesenheit von Schwermetallen genügt, um S-alkylierte PCs zu bilden, brachte die Theorie auf, dass GSH und abgeleitete Thiolderivate sowohl als γ -EC Donor als auch Akzeptor fungieren, wobei mindestens ein Substrat eine blockierte Thiolgruppe aufweisen muss [169]. Anhand von *in vitro* Experimenten mit homo-PCS aus der Sojabohne widersprachen Oven *et al.* der Theorie der blockierten Thiole insofern, dass Schwermetall-Thiolatkomplexe zwar notwendig für die Aktivierung des Enzyms sind, zugleich aber nicht als Substrat fungieren [219]. Dieser Widerspruch ergab sich aus der Beobachtung, dass bei

gleichbleibender GSH-Konzentration und steigender Cadmiumkonzentration bei der höchsten Konzentrationsstufe, bei welcher gleichzeitig die größte Menge an Cd-GS₂-Komplexen vorliegen sollte, die Enzymaktivität am niedrigsten war. Ausgehend von einem Bisubstratmechanismus, schließt dieser Befund jedoch nicht aus, dass Cd-GS₂ aktivierende Spezies und Substrat zugleich ist, da die Bildung dieser Komplexe zu Lasten des zweiten Substrats (GSH) ging, was wahrscheinlich ein Absinken der Syntheseleistung nach sich zog [220]. Ein zweiter Widerspruch zu Vatamaniuk *et al.* [169] ergab sich durch die Aktivierung des Enzyms durch Cd-Thiolatkomplexe (z.B. mit DTT), welche gleichzeitig nicht substrataktiv sind. Allerdings wurden bei diesem Versuch sehr hohe Schwermetallkonzentrationen (mM) eingesetzt. Um die Inhibierung des Enzyms zu verhindern, wäre somit eine starke Chelatierung durch Thiolgruppen erforderlich, unabhängig davon, ob diese als Substrat dienen [220].

Die Idee der direkten Cadmiumbindung kam durch Cadmiumbindungstests an Peptidsequenzen der PCS aus Hefe und Weizen wieder auf. Für letztere konnten sieben Hauptbindungsstellen identifiziert werden, meistens bestehend aus einem Cys oder einem Cys-Paar. Mutation von Cys 109 oder Cys 113 führte bei heterologer Expression in *S. pombe* nur zu einem geringen Toleranzverlust. Zwei der identifizierten Cys-Reste hingegen, Cys 56 und Cys 90, sind zu 100 % konserviert in allen bekannten PCS. Eine Mutation dieser Reste führte zum kompletten Aktivitätsverlust, wodurch sie sich als Kandidaten für mögliche Metallbindungsstellen anbieten [221].

Durch Analysen der Kinetik, Proteinchemie und zielgerichtete Mutagenese konnte ein Modell für den Katalysemechanismus entwickelt werden (vgl. Abb. 4). Durch einen nukleophilen Angriff des Thiolatanions des Cys 56 auf die Carbonylgruppe des Cys des γ -EC Donormoleküls (GSH oder PC_n), kommt es zur Bildung eines substituierten γ -EC Acylenzymintermediats durch Bildung eines Thioesters. Dieser Schritt hat die Abspaltung des Gly vom Donormolekül zur Folge und ist unabhängig von der Anwesenheit von Schwermetallionen. Der gebildete Thioester wird abschließend durch den N-Terminus des Akzeptormoleküls (GSH oder PC_n) nukleophil angegriffen, wodurch der Grundzustand des Enzyms wiederhergestellt und eine neue Peptidbindung geschlossen wird [218,220,222].

Stöchiometrische Analysen mit isotopenmarkiertem GSH als Donor ergaben, dass PCS an einer weiteren Stelle acyliert wird. Diese Acylierung wiederum findet nur in Anwesenheit von Schwermetallionen (experimentell gezeigt für Cd²⁺) im C-Terminus oder aber im N-Terminus, wobei sie in diesem Falle vom C-Terminus abhängig wäre, statt und führt zur Aktivierung der PC-Synthese. Schätzungen zufolge sind zwei Acylierungen notwendig, um die Energie für die Schließung einer neuen Peptidbindung bereitzustellen [218]. Obwohl nicht zwingend erforderlich für die eigentliche Katalyse, führt diese zweite Acylierung in Anwesenheit von Cd²⁺ zur Steigerung der PC-Syntheseleistung. Dies wurde aus der Beobachtung gefolgert, dass auch die verkürzte *AtPCS1-Δ221* Variante, welcher die C-Terminale Domäne vollständig fehlt, unter Verwendung von S-alkylierten

Substraten zur PC-Synthese fähig ist. Hierbei lieferte die Stimulation der Alkyl-PC-Synthese aus S-alkyliertem GSH in Anwesenheit von Cd^{2+} , d.h. unter Bedingungen, die die Thiolatbildung ausschließen, erste experimentelle Hinweise darauf, dass der C-Terminus direkt an der Metallerkennung beteiligt sein muss. Gleichzeitig führten erhöhte Cadmiumkonzentrationen bei *AtPCS1-Δ221* zur Inhibierung der Alkyl-PC-Synthese. Dies legt den Schluss nahe, dass die Bindung freier Metallionen an den N-Terminus die PC-Synthese unterbindet [222]. Diese experimentellen Hinweise decken sich mit Studien zur Enzymkinetik, welche Hinweise darauf gaben, dass *AtPCS1* zwei Cadmiumbindungsstellen besitzt, wobei eine für die Aktivierung und eine weitere für die Inhibierung zuständig ist [223].

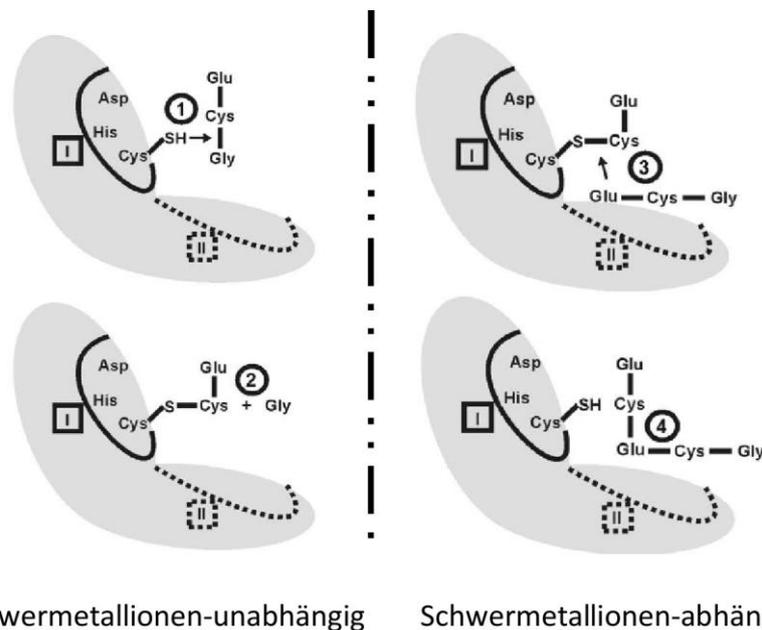


Abb. 4: Modell für den Enzymmechanismus der Phytochelatinsynthese in *A. thaliana*. Schritt 1: nukleophiler Angriff des Thiolatanions des Cys 56 auf Carbonylgruppe des Cys des γ -EC Donors. Zusammen mit His 162 und Asp 180 bildet dieser Rest eine katalytische Triade, die typisch für Papainpeptidasen ist. Schritt 2: Bildung des Acyl-Enzymintermediats und Abspaltung des terminalen Gly. Diese beiden Schritte sind unabhängig von der Anwesenheit von Schwermetallionen. Schritt 3: Bindung des Akzeptormoleküls (GSH oder bestehendes PC_n) an hypothetische zweite Substratbindungsstelle und nukleophiler Angriff auf Thioester. Schritt 4: Bildung der neuen Peptidbindung und Freisetzung des Produkts PC_{n+1} . Schritte 3 und 4 sind verbunden mit einer zweiten Acylierung des Enzyms und laufen nur in Anwesenheit von Schwermetallionen ab. (Abbildung nach [172])

Durch zielgerichtete Mutagenese und anschließende heterologe Expression in Hefe konnte experimentell bestätigt werden, dass von allen hochkonservierten Resten nur Cys 56, His 162 und Asp 180 essentiell für die Katalyse sind [222]. Die Strukturaufklärung des prokaryotischen "half-size" Proteins *alr0975* aus *Nostoc spec.* ("*NsPCS*"), welches ca. 36 % Sequenzähnlichkeit zur N-terminalen Domäne von *AtPCS1* aufweist, welchem aber gleichzeitig der aus Eukaryoten bekannte variable C-Terminus fehlt (vgl. Abb. 5), bestätigte, dass PCS zur Papainsuperfamilie gehören und eine katalytische Triade besitzen, die Cysteinproteasen ähnelt [224]. Wie typisch für diesen Proteasetyp

wird die Nukleophilie des katalytischen Cys durch die Nähe zu His und Asp erreicht. Dabei wird das Proton der Thiolgruppe des Cys auf den Imidazolring des His übertragen, wobei dessen Elektrophilie wiederum durch die β -Carboxylgruppe des Asp verstärkt wird. Angelehnt an die Struktur von Papainpeptidasen ist Gln 50 ein weiterer möglicher katalytischer Rest. Wahrscheinlich bildet dessen Amidseitenkette zusammen mit der Amidgruppe des Cys 56 eine Oxyanionenhöhle, welche die Polarisierung der zu spaltenden Carbonylgruppe in den ersten beiden Phasen der Katalyse ermöglicht sowie den tetraedrischen Übergangszustand des γ -EC Donors bzw. Thioesters des Enzyms stabilisiert [222,225].

Die Terminierung der Reaktion ist bisher nicht eindeutig geklärt. Unter der Annahme, dass freie Metallionen die aktivierende Spezies darstellen, ist eine Variante, dass diese von den gebildeten PCs chelatiert werden und eine Selbstterminierung der Reaktion erfolgt [217]. Bei einem späteren Modell führt die Verringerung des Metallpools durch Komplexierung zu einer Konkurrenzsituation zwischen freien Thiolen und Metall-Thiolatkomplexen um die Substratbindungsstelle im Enzym. Hierbei werden die substrataktiven Metall-Thiolatkomplexe entweder in die Vakuole verschoben oder die Schwermetallionen werden in längerkettige PC-Thiolatkomplexe transferiert, die nicht mehr als Substrat dienen, wodurch eine Sättigung der Enzymaktivität mit freien Thiolen erreicht wird und die Terminierung der PC-Synthese eintritt [169,220].

Wie bereits erwähnt, beinhaltet der N-terminale Bereich des Enzyms die in allen bekannten PCS hochkonservierte katalytische Triade, bestehend aus Cys, His und Asp (vgl. Abb. 5).

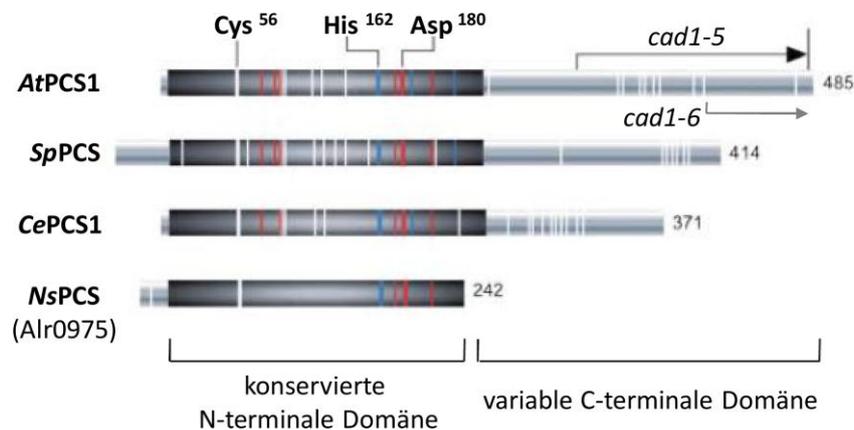


Abb. 5: Schematischer Vergleich der PCS Polypeptide aus verschiedenen Organismen. Aufgeführt sind die Volllänge-Proteine der eukaryotischen PCS aus *A. thaliana*, *S. pombe*, *C. elegans* und das prokaryotische "half-size" Protein Alr0975 aus *Nostoc spec.* Weiße Striche zeigen die ungefähre Position der Cys-Reste, während blaue und rote Striche konservierte His- bzw. Asp-Reste im konservierten N-Terminus angeben. Cys 56, His 162 und Asp 180 bilden die katalytische Triade und sind in allen bekannten PCS konserviert. Die Zahlen auf der rechten Seite geben die Gesamtzahl der Aminosäuren des jeweiligen Polypeptids an. Pfeile geben näherungsweise die Position der *Arabidopsis cad1-5* Nonsensemutation und *cad1-6* T-DNA Insertion an, die jeweils zu einem verkürzten Protein führen. (modifiziert nach [220])

Die Beobachtung, dass verkürzte *AtPCS1* Varianten, $\Delta 221$, $\Delta 283$, $\Delta 372$ und die Mutanten *cad1-5* und *cad1-6*, zur eigentlichen PC-Synthese fähig sind bzw. eine Restaktivität zeigen [167,222,226–228], jedoch einen Teil der Aktivierbarkeit durch verschiedene Metalle eingebüßt haben, führte zu dem Modell, dass der in allen Organismen konserviertere N-terminale Bereich die katalytische Aktivität verleiht, während der sequenzvariable C-terminale Bereich notwendig für die Metallerkennung und Aktivierung ist [167,200,229]. Weiter unterstützt wird dieses Modell durch den Umstand, dass prokaryotische "half-size" PCS, welchen der C-terminale Bereich komplett fehlt, zu keiner nennenswerten PC-Synthese fähig sind und deren Hauptfunktion in der metallunabhängigen Abspaltung des Gly von GSH besteht [230,231]. Eine Erweiterung dieses Modells besagt, dass Schwermetalle an die zahlreichen Cys-Reste im C-Terminus binden, welcher dann wiederum den Kontakt zur möglichen Aktivierungsstelle im N-Terminus herstellt. Ob diese Erkennung durch direkte Bindung oder indirekt durch Metall-Thiolatkomplexe erfolgt, bleibt weiterhin unklar [220,229].

1.4 *AtPCS2*

Die im vorherigen Abschnitt beschriebene metallabhängige Transpeptidierungsreaktion wird in *A. thaliana* von *AtPCS1* ausgeführt, welche im *CAD1*-Lokus codiert wird [167]. Ein Funktionsverlust dieses Gens führt zu einer stark cadmiumhypersensitiven Mutante, genannt *cad1-3*. Später wurde beobachtet, dass *cad1-3* ebenfalls zinkhypersensitiv ist [228]. Bei ihrer ursprünglichen Charakterisierung wurde diese Mutante als PC-frei beschrieben [227]. Daher war es erstaunlich, als ein weiteres PCS Gen, *AtPCS2*, identifiziert wurde [232]. Die Aminosäuresequenzen beider Proteine sind zu 84 % identisch und die Exon-Intron-Struktur der zugehörigen Gene ähnlich. Allerdings unterscheiden sich die Intronsequenzen zu 60 bis 80 %, was auf eine längere Koexistenz beider Gene schließen lässt. Eine Expression der Gene konnte in Wurzel und Spross gefunden werden, wobei höhere Transkriptlevel in Wurzeln und eine generell höhere Transkriptmenge für *AtPCS1* verglichen mit *AtPCS2* detektiert wurde. Die transkriptionelle Aktivität beider Gene ist weder durch Schwermetalle reguliert noch durch oxidativen und osmotischen Stress oder Jasmon- bzw. Salicylsäure [167,169,232]. Fusionsproteine mit eGFP, exprimiert unter Kontrolle des endogenen Promotors, wurden im Falle von *AtPCS1* innerhalb der ganzen Pflanze im Cytosol nachgewiesen, während die entsprechende Fusion mit *AtPCS2* nur Signale in der Wurzelspitze, vor allem im Cortex, lieferte. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass aufgrund des insgesamt niedrigen Expressionslevels andere Signale übersehen wurden [233].

In *planta* konnte *AtPCS2* bisher keine Funktion zugewiesen werden. Während heterologe Expression von *AtPCS2* sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *S. pombe* zur Vermittlung von Cadmiumtoleranz führte [232], was darauf hindeutet, dass dieses Gen eine funktionale PCS codiert, konnte durch Überexpression in *cad1-3* maximal eine partielle Komplementation des

cadmiumhypersensitiven Phänotyps erzielt werden [234]. Darüberhinaus scheint die Existenz eines funktionalen *PCS2* Gens nicht auszureichen, um Cd- oder Zinktoleranz zu vermitteln, was sich in der ausgeprägten Hypersensitivität der *cad1-3* Mutante gegenüber beiden Metallen bemerkbar macht. Dies deutet entweder auf eine strikt kontrollierte Expression der *AtPCS2* in bestimmten Geweben hin oder auf die Regulation durch spezielle und bisher nicht identifizierte Umwelteinflüsse [229]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Notwendigkeit eines funktionellen PCS1 Proteins, welches mit PCS2 für eine vollständige Aktivität interagiert [232]. Die erste Idee, die einer strikt kontrollierten *AtPCS2*, stellte sich durch die Detektion schwacher Transkriptlevel in allen Geweben und mehreren Entwicklungsstadien als überholt dar [232]. Zudem wurde die Unfähigkeit der *AtPCS2*, die Dysfunktion der *AtPCS1* in *cad1-3* auszufüllen, dem Fehlen eines TATA-Box Konsensusmotivs im Promotor, einem verlängertem 3'UTR sowie einem suboptimalen "Codonusage" an der Translationsinitiationsstelle zugeschrieben. Alle drei Punkte zusammen resultieren in der niedrigen Expression der *AtPCS2* [233,234]. Für die anderen Erklärungsversuche konnten bisher keine Hinweise gefunden werden.

Nichtsdestotrotz enthielten Hefezellen, die *AtPCS2* überexprimierten, PC2 und PC3, so dass der Schluss nahe lag, dass dieses Gen eine PCS mit funktionaler Transpeptidaseaktivität codierte [232]. Dennoch wurde *cad1-3* bei ihrer ersten Charakterisierung als PC-frei gefunden [227]. Auch die Verwendung von Methoden mit höherer Sensitivität resultierte nicht in der Detektion von PCs [232]. Außerdem wurde bisher von keinem Mutantenphänotyp für eine *atpcs2* Mutante berichtet.

1.5 Verbreitung der PCS und alternative Aktivität

Die Anwesenheit von PCS ist nicht auf höhere Pflanzen beschränkt. Kürzlich konnte PCS-Aktivität in 12 untersuchten Moospflanzenlinien, wie auch in einer Linie der Bärlapppflanzen nachgewiesen werden. Die Autoren ordneten eine aktive PCS als ursprüngliche Merkmalsausprägung einfacher Landpflanzen ein [235]. Des Weiteren ergab eine systematische Analyse PCS-ähnlicher Sequenzen die Präsenz von PCS Genen in allen größeren Gruppen von Eukaryoten. Auch prokaryotische Organismen besitzen Proteine, die Ähnlichkeit zur PCS Pfam Domäne 05023 aufweisen, deren Konsensussequenz 133 Aminosäuren im konservierteren N-Terminus von PCS umspannt. Aufgrund ihrer Größe zwischen 23-35 kDa, werden diese PCS-ähnlichen Proteine auch als "half-size" PCS bezeichnet. Ihre Verteilung in Prokaryoten scheint dabei eher zufällig und lässt kein Muster erkennen [172,230,236]. In einigen wenigen Fällen konnte die Bedeutung von PCS nicht-pflanzlicher Herkunft für die Cadmiumentgiftung gezeigt werden, und zwar in *C. elegans* [237] und *S. pombe* [167,238].

Zusätzlich zu ihrer ubiquitären Verbreitung sind PCS in allen untersuchten Fällen diverser Organismen konstitutiv exprimiert, darunter im parasitischen Nematod *Schistosoma mansoni* [239], im marinen Tunikat *Ciona intestinalis* [240], in Lebermoos [235] und *A. thaliana* [169]. Die weite

Verbreitung wie auch die konstitutive Expression dieses Enzyms in allen Organen und Entwicklungsstadien der untersuchten Spezies ließen die Frage aufkommen, ob PCS neben der Entgiftung nicht-essentieller Schwermetalle, welchen die meisten Zellen, wenn überhaupt, kaum jemals ausgesetzt sind, noch andere Funktionen haben [172,220]. Mögliche Erklärungsansätze stellen entweder eine alternative Enzymaktivität oder die Beteiligung in der Homöostase essentieller Mikroelemente dar. Die Beobachtung, dass PCs einen Beitrag zur Zinktoleranz in *A. thaliana* leisten [228] und der Nachweis von PC-Zn-Komplexen *in planta* [119,241] untermauerten letztere Möglichkeit.

Hinweise auf eine alternative enzymatische Aktivität ergaben sich durch zwei verschiedene Arbeiten. Zunächst konnte gezeigt werden, dass rekombinant aufgereinigte AtPCS1 Glycin vom GSH-Biman-Konjugat abspalten kann, was eine Beteiligung von PCS im Katabolismus von Glutathion-Konjugaten (GS-Konjugaten) möglich scheinen lässt [242]. Die entsprechende Aktivität wurde später *in planta* nachgewiesen [243]. Zweitens konnte für die prokaryotische "half-size" NsPCS gezeigt werden, dass ihre Hauptfunktion in der Abspaltung des terminalen Gly von GSH besteht [230,231].

Die Prozessierung von GS-Konjugaten könnte eine zusätzliche und sehr wichtige biologische Funktion von PCS darstellen, welche durch eine Beteiligung von AtPCS1 in der Pathogenabwehr angedeutet wurde. So löst die Exposition des MAMP Flagellin eine typische nichtwirtsspezifische Reaktion, Calloseeinlagerung in der Zellwand, aus. Ein großangelegter Screen verschiedener Mutantenlinien gab darüber Aufschluss, dass AtPCS1 essentiell für diesen Prozess ist [244]. Innerhalb dieser Studie wurde die Rolle von Indolglucosinolaten, insbesondere von 4-Methoxy-Indol-3-ylmethylglucosinolat (4-Methoxy-I3G), in der Flagellin-induzierten Calloseantwort aufgedeckt. Dabei soll der Abbau von 4-Methoxy-I3G einen wichtigen Koaktivator darstellen, wobei dessen Abbau und nachfolgend die Calloseantwort wiederum abhängig von PEN2 und AtPCS1 sein sollen. PEN2 wurde in einem Screen von Mutanten identifiziert, welche die Penetrationsresistenz gegen den echten Mehltau *Blumeria graminis* verloren hatten [245]. PEN2 codiert für eine untypische Myrosinase und wurde unabhängig davon in Verbindung mit dem Katabolismus von Indolglucosinolaten gebracht [246]. Hinzu kommt noch, dass eine weitere Mutante der Penetrationsresistenz, *pen4*, ein nicht-funktionales Allel von AtPCS1 trägt (Lim & Somerville, unveröffentlicht). Zusammengenommen sprechen diese Beobachtungen für eine Rolle der AtPCS1 in der pflanzlichen Immunabwehr, unabhängig von der Phytochelatinsynthese.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die ubiquitäre Verbreitung von PCS Genen sowie deren konstitutive Expression lassen die Frage nach einer Funktion abseits der Detoxifizierung nicht-essentieller Elemente, welchen die meisten Zellen und Organismen kaum jemals gegenüberstehen, aufkommen. Mögliche Erklärungsansätze

umfassen entweder (i) eine Beteiligung in der essentiellen Metallhomöostase bzw. (ii) eine alternative biologische Funktion. Aus diesem Grund sollte die Funktion der *AtPCS1* in der bereits angedeuteten Rolle in der Zinkhomöostase näher untersucht werden. Tennstedt *et al.* [228] beobachteten im Minimalmedium bei *AtPCS1* Mutanten einen hypersensitiven Phänotyp gegenüber Zn, der bei Anzucht im Vollmedium ausblieb. Zunächst sollte durch Variation verschiedener Makroelementkonzentrationen die Komponente des Mediums ermittelt werden, die zum Ausbleiben des zinkhypersensitiven Phänotyps im Vollmedium führte. Zudem sollte die physiologische Funktion in der generellen Zinkhomöostase unter Bedingungen, die natürlichen Gegebenheiten näherkommen, weiter untersucht werden.

Für Möglichkeit (ii) wurde durch Clay *et al.* [244] eine Beteiligung der PCS in der angeborenen Immunantwort von Pflanzen gezeigt. Durch Expression phylogenetisch diverser *PCS* Gene in der *A. thaliana cad1-3* Mutante und anschließender Komplementationsversuche sollte aufgeklärt werden, ob die Aktivitäten in Nichtwirtsresistenz und Metallhomöostase getrennt werden können oder voneinander abhängig sind.

Da Tennstedt *et al.* [228] beobachtet hatten, dass unterschiedliche Medien zu unterschiedlichen Phänotypen führen können, sollte eine mögliche Funktion der *AtPCS2 in planta* anhand von Überexpressionslinien im *cad1-3* Hintergrund durch Anwendung verschiedener Testsysteme nochmals untersucht werden.

Zuletzt sollte die physiologische Parallelität zwischen *AtPCS1* und dem ABC-Transporter PEN3 in der Schwermetalltoleranz weiter charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien von den Firmen Duchefa Biochemie (Haarlem, NLD), Fluka (St. Gallen, CHE), Merck (Darmstadt, DEU), Riedel-de Haën (Seelze, DEU), Roth (Karlsruhe, DEU) und Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen und besaßen analytischen Reinheitsgrad. Enzyme für molekularbiologische Methoden wurden, falls nicht extra aufgeführt, von Fermentas (St. Leon-Rot, DEU) bezogen. Alle verwendeten Primer wurden von Invitrogen (Darmstadt, DEU) synthetisiert. Die Sequenzen sind Tabelle 3 und 5 zu entnehmen.

Das für Nährmedien, Lösungen und molekularbiologische Ansätze verwendete Wasser wurde vor dem Gebrauch über eine Advantage A10 Milli-Q-Anlage (Millipore, Billerica, MA, USA) deionisiert und gereinigt.

2.1.2 Medien

Die Anzucht von *A. thaliana* in flüssiger Kultur erfolgte in 1/10 Hoaglandlösung Nummer 2, modifiziert nach den Angaben von Hoagland und Arnon [247]. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Konzentrationen der Makro- und Mikroelemente des für die Pflanzenanzucht in Flüssigkultur verwendeten 1/10 Hoaglandmediums. Modifikationen der Zusammensetzung wurden nach dem Rezept für Hoaglandlösung Nr. 2 von Hoagland und Arnon [247] vorgenommen.

Makroelemente		Mikroelemente	
Ca(NO ₃) ₂	0.28 mM	H ₃ BO ₃	4.63 µM
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.1 mM	CuSO ₄	32 nM
MgSO ₄	0.2 mM	MnCl ₂	915 nM
KNO ₃	0.6 mM	ZnSO ₄	77 nM
		MoO ₃	11 nM
		Fe-HBED	5 µM

Fe wurde als *N,N'*-Di-(2-Hydroxybenzyl)-Ethylenediamin-*N,N'*-Diessigsäure (Fe-HBED) angelehnt an Chaney (1988) [248] zugegeben, da es sich hierbei um einen spezifischeren Eisenchelator handelt als Eisentartrat, welches im ursprünglichen Rezept angegeben ist. Als Puffer wurde 0.05 % (w/v) MES verwendet und ein pH-Wert von 5.7 eingestellt.

2.1.3 Pflanzenlinien

Zur Untersuchung des Beitrages von Phytochelatinsynthasen in der pflanzlichen Schwermetallhomöostase wurden die *A. thaliana* Wildtypen Columbia (Col-0) und Wassilewskija (Ws-0) verwendet. Ferner die *AtPCS1* Mutanten *cad1-3* [227] und *cad1-6* (SAIL_650_C12) [228] im Col-0 Hintergrund sowie die *AtPCS2* T-DNA Insertionslinie *atpcs2* (FLAG_146G12) im Ws Hintergrund. Eine Doppelmutante beider *PCS* Gene wurde durch Kreuzung von *cad1-3* und *atpcs2* erhalten und *cad1-3 atpcs2* genannt. Des Weiteren wurden transgene Linien verwendet, in welchen *AtPCS1* (At5g44070) oder *AtPCS2* (At1g03980) unter Kontrolle des 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus in *cad1-3* als Fusionsprotein mit C-terminalem HA-Tag überexprimiert wurden (Clemens, unveröffentlicht).

Neben PCS wurde die Rolle einer weiteren Komponente der pflanzlichen Schwermetalltoleranz untersucht und zwar die des ABC-Transporters PEN3 (At1g59870). Linien mit Mutationen in diesem Gen, *pen3-1* bis *pen3-4* [249], stammten ebenfalls aus dem Col-0 Hintergrund. Um ein mögliches Zusammenspiel von PCS1 und PEN3 zu untersuchen, wurden die Linien *cad1-3* und *pen3-1* gekreuzt. Linien, die homozygot für die mutierte Version beider Gene waren, wurden x2-3 und x2-5 genannt.

Um den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion des PCS-Proteins näher zu untersuchen, wurden phylogenetisch diverse PCS-Varianten aus *C. elegans* (CePCS; AF299332.1), *C. intestinalis* (CiPCS; XP_002128372) und *Nostoc spec.* (NsPCS; NP_485018) ebenfalls in *cad1-3* transformiert und überexprimiert. Hierzu wurden Konstrukte der jeweiligen Volllänge-Proteine und Varianten, die auf die Länge der prokaryotischen *Nostoc* PCS gekürzt wurden (242 AS), als Fusionsprotein mit C-terminalem HA-Tag verwendet. Diese Konstrukte stammten aus Studien zur Metalltoleranz mittels heterologer Expression in *S. pombe* und wurden aus dem Hefevektor pSGP72 in den binären Vektor pCB302 [250] "in Frame" mit dem 35S-Promotor kloniert. Da der Vektor pCB302 den 35S-Promotor nicht enthält und um eine Subklonierung in den Vektor pRT100 zu ersparen, wurde eine Vektorvariante des pCB302 verwendet, welcher 35S-Promotor, MCS und die poly-A Sequenz aus dem Vektor pRT100 in die MCS1 hinzugefügt wurde. Zudem wurde die ursprüngliche MCS des pRT100 an den Schnittstellen *Xba*I und *Xho*I durch das Fragment 5'-tcgagaccggtggcgcgcctaggcgatcgacgctccgcggccatggt-3' ersetzt, um eine höhere Flexibilität an Restriktionsschnittstellen zu erhalten.

2.2 Kultivierung

2.2.1 *A. thaliana* Anzucht auf Erde

2.2.1.1 Anzucht zur Samengenerierung

Zum Zweck der Vermehrung wurden *A. thaliana* Samen auf Erde ausgebracht, zur besseren Keimung für 2 d bei 4°C stratifiziert und anschließend unter Kurztagbedingungen (8 h Licht/ 16 h

Dunkelheit) ca. 4 Wochen angezogen. Nach Erreichen einer für maximale Samenausbeute ausreichenden Blattrosette wurden die Pflanzen zur Blütenentwicklung Langtagbedingungen (16 h Licht/ 8 h Dunkelheit) ausgesetzt und bis zur vollständigen Samenreife dort belassen.

Zur Pflanzenanzucht auf Erde wurde ein Gemisch aus Einheitserde Typ GS90L grob (Einheitserde Werkverband, Sinntal-Altengronau), Pikiererde (Ökohum, Herbertingen) und Vermiculite (Deutsche Vermiculite Dämmstoff GmbH, Sprockhövel) im Verhältnis 3:3:1 verwendet. Vor dem Ausbringen der Pflanzen wurde die Erde für 1½ h bei 80°C in einem Sterilo1K (Harter Elektrotechnik, Schenkenzell) pasteurisiert.

2.2.1.2 Experimente auf artifiziell kontaminierter Erde

Für Experimente auf artifiziell kontaminierter Erde wurde ein mineralischer Bodentyp verwendet. Dieser wurde zunächst bei 70°C getrocknet und anschließend mittels eines groben Siebes weitestgehend von organischem Material befreit. Von der gesiebten Erde wurden 500 g in 1-Liter Plastikflaschen gefüllt, mit 250 ml einer entsprechenden Schwermetalllösung versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur gründlich mit Hilfe eines Überkopfschüttlers (Reax 20/12, Heidolph, Schwabach) durchmischt, sodass eine homogene Bodenlösung entstand. Kontrollboden wurde analog dazu nur mit Wasser versetzt. Die so kontaminierte Erde wurde anschließend bei 50°C getrocknet und erneut zur Auflockerung gesiebt. Damit die Erde bei nachfolgender Bewässerung nicht zu lehmig wurde, wurde sie zu einem Drittel mit Sand gemischt, welcher ebenfalls eine niedrige Ionenbindungskapazität aufwies. Um eine höchstmögliche Vergleichbarkeit zu erzielen, wurden Pflanztöpfe mit gleichen Mengen des Erde-Sand-Gemisches befüllt und jeder Topf wurde mit gleichen Wassermengen bewässert. Vor dem Transfer der Pflanzen in die Erde wurde der Boden mit einem Spatel aufgelockert. Anschließend wurden zehn Tage alte Pflanzen, die auf Agarplatten mit 1/10 Hoaglandmedium vorgekeimt wurden, in die Erde transferiert und sogleich mit 5-6 ml Wasser gegossen, um ein Austrocknen der Wurzel zu verhindern. Pro Linie und Metallkonzentration wurden zwischen 8 bis 16 Pflanzen eingesetzt. Die Versuchspflanzen wurden randomisiert aufgestellt, um Positionseffekte auszuschließen, die zu unterschiedlichem Wachstum führen könnten. Um ein Austrocknen der Randpflanzen zu vermeiden, was eine unterschiedliche Metallverfügbarkeit zur Folge haben könnte, wurden die Versuchspflanzen mit einem Ring aus Kontrollpflanzen umgeben, die aus der Datenerhebung ausgeschlossen wurden. Die Anzucht erfolgte unter Kurztagbedingungen (8 h Licht, 22°C/16 h Dunkelheit, 17°C) und einer Lichtstärke von 150 µE für 24 Tage. Jede Versuchspflanze wurde täglich mit 1 ml Wasser gegossen. Nach 24-tägigem Wachstum auf kontaminierter Erde wurden Pflanzen einer Linie und Bedingung in zwei Probenpools aufgeteilt, wobei darauf geachtet wurde eine vergleichbare phänotypische Varianz zwischen den Pools zu erzeugen. Ein Teil des gepoolten Blattmaterials wurde für Metabolitanalysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das restliche Material wurde durch Waschen in warmem Wasser von

Bodenpartikeln befreit und anschließend für die Aufnahme des Metallprofils gefriergetrocknet. Analog zu den Pools der Blattproben wurden Erdfraktionen vereinigt, um die Verfügbarkeit der einzelnen Metalle zu untersuchen. Die Dokumentation des Wachstums erfolgte fotografisch alle sieben Tage nach dem Transfer in Erde.

2.2.2 *A. thaliana* Anzucht in Flüssigkultur

Für den Einsatz in Metalltoleranzassays im Keimlingsstadium (bis max. 14 d) wurden mit Ausnahme von Fe nur die in Tabelle 1 aufgelisteten Makroelemente verwendet. Zusätzlich wurde 1 % (w/v) Saccharose zugegeben und das Medium anschließend autoklaviert. Bei Experimenten auf Agarplatten wurde die Nährlösung zusätzlich mit 1 % (w/v) Agar Typ A (Sigma-Aldrich) verfestigt.

Bei mehrwöchiger Anzucht in Flüssigkultur unter aseptischen Bedingungen zur Gewinnung von Wurzel- und Blattmaterial für Transkript-, Metall- und Metabolitmessungen, wurde auf die Zugabe von MES-Puffer und Saccharose verzichtet. Die Zugabe von Mikroelementen war bei Anzucht über drei Wochen jedoch notwendig. Zudem wurden die veränderten Konzentrationen von 0.4 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ und 0.0871 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ eingestellt. Zn^{2+} und Cd^{2+} wurden als die jeweiligen Chloridsalze zugegeben.

2.2.2.1 Samensterilisierung

Vor dem Transfer in Flüssigkultur wurden *A. thaliana* Samen mit Chlorgas oberflächensterilisiert, welches durch Zugabe von 5 ml HCl (32 %) zu 10 ml Natriumhypochloritlösung erzeugt wurde. In einem Exsikkator wurden die Samen dem Gas für 35 min exponiert. Nach 45-minütiger Evakuierung des Chlorgases wurden die Samen unter der Sterilbank mindestens für weitere 15 min belüftet, bevor sie in das jeweilige Experiment eingesetzt wurden.

2.2.2.2 Metalltoleranzassays

Die Untersuchung der Metalltoleranz im Keimlingsstadium erfolgte entweder in flüssigem oder verfestigtem 1/10 Hoaglandmedium (vgl. Tab. 1) und mit Ausnahme von Fe ohne die Zugabe von Mikroelementen. Ersteres erfolgte in 6-Well Zellkulturplatten, wobei pro Vertiefung sechs oberflächensterilisierte *A. thaliana* Samen der jeweiligen Linie in 5 ml Medium gegeben wurden. Für Tests auf Agarplatten wurde das Medium mit 1 % (w/v) Agar Typ A (Sigma-Aldrich) verfestigt und mit 24 Samen belegt. Platten beider Experimenttypen wurden mit Leucopore Tape (Duchefa) verschlossen um ein Austrocknen der Platten zu verhindern, den Gasaustausch jedoch zu ermöglichen. Nach 2-tägiger Stratifikation bei 4°C erfolgte die Inkubation unter Langtagbedingungen (16 h Licht/ 8 h Dunkelheit) bei 23°C, wobei Agarplatten für 14 d horizontal aufgestellt wurden (75 μE) und Flüssigkulturen unter leichtem Schütteln (ca. 100 rpm) 7 d inkubiert wurden (50 μE).

2.2.2.3 Anzucht für Metall- und Metabolitanalysen

Pflanzenmaterial für die Untersuchung der Metallgehalte von Wurzel und Spross sowie für die Analyse der Metabolitgehalte wurde durch mehrwöchige Anzucht in 50 ml Greinerröhrchen gewonnen. Hierfür wurden zunächst PCR-Gefäße mit dem in Tabelle 1 aufgeführten Hoaglandmedium ohne Saccharose und unter Zugabe von Mikroelementen mit den abweichenden Konzentrationen von 0.4 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ und 0.0871 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ befüllt. Nach Aushärten des Agars (0.5 % (w/v) Agar Typ A) wurde der Gefäßboden abgeschnitten, die Gefäße in Spitzenkästen gesteckt und mit je einem oberflächensterilisierten Samen belegt. Die Unterseite der Gefäße wurde in flüssiges 1/10 Hoaglandmedium getaucht, so dass die Wurzeln der gekeimten Samen durch den Agar in die Flüssigkeit wuchsen. Ebenfalls erfolgte zuerst die Stratifikation für 2 d bei 4°C und dann ein Transfer in den Kurztag (8 h Licht, 22°C/16 h Dunkelheit, 17°C; Lichtstärke 150 μE). Nach 3-wöchigem Wachstum wurden die Keimlinge in 50 ml Greinerröhrchen umgesetzt, wobei alle sieben Tage ein Wechsel der Nährlösung erfolgte, um Sauerstoffmangel der Wurzeln vorzubeugen. Nach weiterem Wachstum für 2-3 Wochen wurden dem Kulturmedium erhöhte Schwermetallkonzentrationen zugesetzt und die Pflanzen diesem mehrere Tage ausgesetzt, bevor Wurzel- und Sprossmaterial für nachfolgende Analysen geerntet wurden.

2.2.2.4 Callosedeposition

Für die Keimlingsanzucht zur späteren Detektion der Callosedeposition wurde anders als für Metalltoleranzassays $\frac{1}{2}$ Hoaglandmedium (alle Komponenten aus Tabelle 1 wurden hierfür 5-fach höher konzentriert eingesetzt) mit 1 % (w/v) Saccharose verwendet. Pro Vertiefung einer 12-Well Zellkulturplatte wurden je fünf oberflächensterile Samen in 2 ml Nährlösung gegeben. Die Platten wurden ebenfalls mit Leucopore Tape (Duchefa) verschlossen, 2 d bei 4°C stratifiziert und anschließend für 10 d unter Langtagbedingungen (16 h Licht/ 8 h Dunkelheit) bei 23°C und einer Lichtstärke von 50 μE unter leichtem Schütteln (ca. 100 rpm) inkubiert. Nach 7 d im Licht wurde die Nährlösung gewechselt, wobei darauf geachtet wurde die Keimlinge nicht zu verletzen. Dies könnte später zur Beobachtung von Callosedeposition führen, die allerdings mechanisch und nicht systemisch ausgelöst wurde. Nach 9 d im Licht wurde Flg22-Peptid als Induktor der Callosedeposition (gelöst in DMSO) in einer Endkonzentration von 1 μM zugegeben [244]. Als Negativkontrolle diente DMSO bzw. inaktives Flg22 Δ 2-Peptid. Anschließend wurden die Keimlinge für weitere 24 h im Langtag inkubiert.

2.2.2.5 Zinkspeziierung

Analog zur Anzucht für Metallprofile und Metabolitgehalte (Abschnitt 2.2.2.3) erfolgte zunächst eine 3-wöchige Anzucht in Spitzenkästen. Anschließend wurden die Keimlinge in 50 ml Greinerröhrchen umgesetzt und für weitere 18 d unter Kurztagbedingungen (8 h Licht, 22°C/ 16 h

Dunkelheit, 17°C) bei einer Lichtstärke von 150 μE kultiviert. Um genügend Biomasse zu erzeugen, wurden die Pflanzen erneut in größere Gefäße umgesetzt. Hierfür wurden je 3 Pflanzen einer Linie in einen Topf mit 1.6 l Fassungsvermögen an Medium überführt. Ab diesem Zeitpunkt wurde dem Medium eine 10-fach höhere Zinkkonzentration (vgl. Tab. 1) von 0.8 μM ZnSO_4 zugesetzt, um eventuell schon einen Unterschied im Zn- und PC-Gehalt zwischen Col-0 und *cad1-3* bei moderatem Zinkangebot zu erzeugen. Nach weiteren 7 d Wachstum wurde einem Teil der Pflanzen 20 μM ZnSO_4 zugesetzt, um PC-Bildung zu induzieren. Den jeweiligen Kontrollen wurde frisches Medium ohne Zusatz erhöhter Schwermetallkonzentrationen zugeführt. Nach weiteren 7 d Kultivierung wurden je 3 Pflanzen einer Linie gepoolt. Wurzelmaterial wurde anders als für Elementanalysen (Abschnitt 2.5.1) mit Wasser, zweimal mit 10 mM CaCl_2 und abschließend nochmals mit Wasser in je 25 ml und bei 4°C für 10 min unter stetigem Schütteln gewaschen. Die Wurzeln wurden kurz mit einem Papiertuch getrocknet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Ein Teil des Wurzel- und Blattmaterials wurde für eine separate Bestimmung der PC-Gehalte abgenommen. Blattmaterial wurde ohne weitere Behandlung sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Während der gesamten Kultivierung wurde alle 7 d die Nährlösung gewechselt.

2.2.2.6 Transkriptanalyse unter Zinkdefizienz

Die Anzucht für eine spätere Transkriptanalyse molekularer Markergene zur Bestimmung des Zinkdefizienzstadiums erfolgte zunächst analog zu Abschnitt 2.2.2.3 für 3 Wochen in Spitzenkästen. Anschließend wurden die Keimlinge in 50 ml Greinerröhrchen umgesetzt, wobei solange noch Zn zugeführt wurde, bis die Pflanzen für spätere Probenahmen ausreichend Biomasse gebildet hatten. Ab diesem Schritt wurden alle Gefäße, die mit der Nährlösung in Kontakt kamen, mit 1 % (v/v) HCl und anschließend Milliporewasser ausgespült, um Zinkkontamination zu vermeiden. Nach 2-wöchigem Wachstum wurden die Pflanzen in zinkfreies Medium überführt, um Zinkdefizienz zu erzeugen. Zinkionen, die der Wurzeloberfläche anhafteten, wurden entfernt, indem die Wurzeln zuerst kurz in Wasser, anschließend für 10 min in eine 100 mM CaCl_2 -Lösung und nochmals kurz in Wasser gehalten wurden. Kontrollpflanzen wurden der gleichen Behandlung unterzogen, allerdings wieder in Medium transferiert, welches die in Tabelle 1 angegebene Zinkmenge enthielt. Nach 2, 4, 7 und 14 Tagen in zinkfreiem Medium wurden pro Linie und Behandlung je 3 Pflanzen zu einer Probe vereinigt und Wurzel- und Spross getrennt voneinander in flüssigem Stickstoff für spätere Transkriptanalysen eingefroren. Pro Linie und Bedingung wurden drei biologische Replikate generiert.

2.3 Molekularbiologische Standardmethoden

Sofern nicht extra beschrieben, wurden Agarosegelelektrophoresen, Dephosphorylierungen und Ligationen von Vektoren, Polymerasekettenreaktionen, Restriktionsspaltungen sowie Transformationen kompetenter *E. coli*-Zellen nach Standardprotokollen durchgeführt [251].

2.3.1 gDNA-Isolation

Für die Isolation genomischer DNA wurden 2 bis 3 junge Blätter (zwischen 100-200 mg Frischgewicht) in 2 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das Pflanzenmaterial wurde mit 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris/HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA (pH 8.0), 500 mM NaCl, 1.5 % (w/v) SDS, 0.5 % (v/v) β -Mercaptoethanol) aufgenommen und für 10 min bei 65°C mit gelegentlichem Invertieren der Gefäße inkubiert. Anschließend wurden 300 μ l einer Kaliumacetatlösung (60 % (v/v) 5 M Kaliumacetat, 11.5 % (v/v) Eisessig, pH 5.2) zugegeben und für mindestens 30 min bis zu 1 h auf Eis inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 20,200 \times g und 4°C wurde der Überstand mit 800 μ l einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1) versetzt und gemischt. Durch erneute Zentrifugation bei 4°C und 20,200 \times g für 5 min wurde eine Phasentrennung erzeugt. Der wässrige Überstand wurde anschließend mit 500 μ l Isopropanol versetzt und die DNA für ca. 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Nach erneuter Zentrifugation bei 20,200 \times g für 10 min wurde der Überstand abgenommen und verworfen und das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets bei 37°C wurde die DNA in 30 μ l Wasser aufgenommen und die Lösung für 5 min bei 55°C beschleunigt. Die gDNA wurde bei 4°C gelagert.

2.3.2 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mit TRIzol®-Reagenz (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Hierfür wurde Pflanzenmaterial zunächst in flüssigem Stickstoff gemörsert. Zu ca. 100 mg Frischgewicht wurde 1 ml TRIzol-Reagenz zugegeben, 1 min gründlich gemischt, gefolgt von einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Nachdem der Ansatz erneut für 1 min gründlich durchmischt wurde, erfolgte die Zugabe von 200 μ l Chloroform mit einer anschließenden Durchmischung von 20 sec. Nach weiteren 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde eine Phasentrennung durch Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 13,400 \times g herbeigeführt. Der wässrige Überstand wurde abgenommen und die RNA durch Zugabe von 500 μ l Isopropanol und mehrmaligem Invertieren des Reaktionsgefäßes gefällt. Nach erneuter Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur wurde für 10 min bei 4°C und 13,400 \times g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, verworfen und das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach vollständiger Trocknung des Pellets bei 37°C wurde die RNA in 30 μ l Wasser (RNase-frei) aufgenommen und die Lösung durch 5-minütige Inkubation bei 55°C beschleunigt. Anschließend wurde die RNA-Konzentration durch Messung mit einem NanoPhotometer® (Implen GmbH, München) bestimmt. Lagen die Verhältnisse der Absorptionen A_{260}/A_{280} sowie A_{260}/A_{230} zwischen 1.8-2.0 bzw. über 1.7, wurde davon ausgegangen, dass keine beträchtliche Kontamination der RNA mit Proteinen bzw. Polysacchariden und aromatischen

Verbindungen, wie Phenol, vorlag. Die Integrität der RNA wurde durch Agarosegelelektrophorese sichergestellt. Die Aufbewahrung der RNA erfolgte bei -80°C .

2.3.3 Proteinisolation

Zur Isolation von Proteinen aus Pflanzenmaterial wurden ca. 100 mg Frischgewicht Wurzel oder Blatt in einem 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren und gemörsert. Anschließend wurde das 1.5-fache Volumen (ca. 150 μl) an Puffer (50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 8.0), 0.5 mM DTT, 0.1 x Proteaseinhibitor-Cocktail (7 x, Roche Diagnostics, Mannheim), 0.1 % (w/v) SDS, 0.1 % (v/v) Triton-X-100) zugegeben und ca. 1 min gründlich gemischt, bis das Material vollständig resuspendiert vorlag. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis mit zwischenzeitlicher Durchmischung wurde bei 4°C und $16,000 \times g$ für 15 min zentrifugiert. Der Proteinüberstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Längerfristige Lagerung erfolgte bei -20°C .

2.3.4 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes im Extrakt erfolgte colorimetrisch mittels der Bicinchoninsäure-Methode mit dem BCA-Kit (ThermoScientific) nach Herstellerangaben unter Zuhilfenahme eines "Microplate" Spektralphotometers (PowerWave x340, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA).

2.3.5 SDS-Gel

Für die Größenauftrennung der Proteine wurde SDS-PAGE durchgeführt. Die Zusammensetzungen von Sammel- und Trenngel sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tab. 2: Zusammensetzung der für SDS-PAGE verwendeten Trenn- und Sammelgele. Die Acrylamidmischung wurde von der Firma Roth bezogen.

	Trenngel (12 %)	Sammelgel (5 %)
H ₂ O	3.3 ml	1.4 ml
Tris/HCl 1.5 M	2.5 ml (pH 8.8)	250 μl (pH 6.8)
Acrylamidmischung 30 %	4.0 ml	330 μl
SDS 10 % (w/v)	0.1 ml	20 μl
APS 10 % (w/v)	0.2 ml	120 μl
TEMED	8 μl	4 μl

Hierfür wurden Proteinextrakte mit 5x SDS-Ladepuffer (250 mM Tris/HCl (pH 6.8), 250 mM DTT, 5 % (w/v) SDS, 0.5 % (w/v) Bromphenolblau, 50 % (v/v) Glycerin) versetzt, für 1 min im Wasserbad aufgekocht und anschließend sofort auf Eis gelagert. Für Pflanzenproben wurden 40-50 μg Gesamtprotein in die SDS-PAGE eingesetzt. Der „PageRuler™ prestained protein ladder“ (Fermentas)

wurde als Größenstandard mitgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im SDS-Laufpuffer (200 mM Glycin, 25 mM Tris, 0.1 % (w/v) SDS). Pro Gel wurde eine Stromstärke von 10 mA für das Sammelgel und 20 mA für das Trenngel angelegt. Zur Überprüfung einer gleichmäßigen Probenbeladung wurde das Gel nach dem Blotten für 20 min mit Coomassie-Färbelösung („PageBlue™ Protein Staining Solution“, Fermentas) gefärbt und in Wasser über Nacht entfärbt.

2.3.6 Westernblot

Nach der Größenauftrennung der Proteine erfolgte der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran (Protran™, 0.45 µm Porengröße, Whatman, Maidstone, GBR) in einem „semi-dry“ Blotverfahren unter Verwendung von Transferpuffer (28.9 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol) und einer Spannung von 0.8 mA/cm² Gel für 70 min. Vor dem Blotten wurden Filterpapiere und Membran für 5 min in Transferpuffer angefeuchtet. Nach dem Transfer wurde die Membran zweimal für 10 min in TBS-Tween-Puffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Tween 20, pH 7.5) gewaschen und anschließend bei 4°C über Nacht in Blockierlösung (10 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-Tween-Puffer) inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal für 5 min mit TBS-Tween gewaschen, bevor die Membran mit dem primären Antikörper α-HA (1:3,000 verdünnt in Blockierlösung; Sigma-Aldrich) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach erneutem dreimaligem Waschen für 5 min mit TBS-Tween erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper α-mouse (1:10,000 verdünnt in Blockierlösung, Sigma-Aldrich) ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur. Abschließend wurde die Membran nochmals dreimal für 5 min in TBS-Tween gewaschen und vor dem Entwickeln kurz in Wasser geschwenkt. Die Detektion von Proteinen mit HA-Tag erfolgte mittels der „enhanced chemiluminescence“ (ECL) Methode zwischen Substrat im ECL-Reagenz und der am sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase. Hierfür wurde auf die Membran eine Lösung bestehend aus 1 ml Lösung A (1.26 mM Luminol (Sigma-Aldrich) gelöst in 0.1 M Tris/HCl, pH 8.6), 100 µl Lösung B (6.7 mM p-Hydroxycoumarinsäure (Sigma-Aldrich) gelöst in DMSO) und 0.5 µl 30 % H₂O₂ gegeben. Anschließend wurde die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und im Chemilumineszenz Imager (INTAS, Göttingen) belichtet. Um zu überprüfen, ob der Proteintransfer vom SDS-Gel auf die Membran gleichmäßig stattfand, wurde die Membran nach dem Belichten kurz mit Wasser gewaschen und die Proteine mit Amidoschwarzlösung (40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0.1 % (w/v) Amidoschwarz 10B) für 20 min gefärbt und anschließend in Wasser entfärbt.

2.3.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-Produkten oder Plasmiden wurde durch die Firma LGC Genomics (Berlin) vorgenommen. Die anschließende Sequenzanalyse erfolgte mittels der BioEdit Software (Version 7.0.9).

2.3.8 PCR

Polymerasekettenreaktionen wurden im Standardvolumen von 50 µl durchgeführt und beinhalteten 1 µl Matrizen DNA (entsprechend verdünnt), je 1 µl 20 µM spezifischer Primer „forward“ und „reverse“ (Tabelle 3, 5), 1 µl 20 mM dNTP-Mix, 5 µl 10x PCR-Puffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris/HCl (pH 9.0), 1 % (v/v) Triton-X-100) und 1-5 U *Taq*-DNA-Polymerase (Fermentas).

Tab. 3: Liste der Primer, die zur Genotypisierung von *A. thaliana* Mutantenlinien verwendet wurden. Bei den Linien *pen3-1*, *pen3-2* und *cad1-3* handelt es sich um Punktmutanten, wohingegen die Linien *pen3-3* (SALK_110926), *pen3-4* (SALK_000578) und *atpcs2* (FLAG_146G12) T-DNA Insertionen tragen.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
<i>pen3-1 fw</i>	TGAAAGCTTCTGCTGCTCAA	Genotypisierung <i>pen3-1</i>
<i>pen3-1 rev</i>	TGAGGTGAACGATTTGTTGC	
<i>pen3-2 fw</i>	AAGCATCAGGTGGTGCAGGCAAT	Genotypisierung <i>pen3-2</i>
<i>pen3-2 rev</i>	TGCTCACAATATCCTGAGATTCTAGC	
<i>pen3-3 fw</i>	CGAACCACTCTCATGAACGCT	Nachweis Wildtypallel in <i>pen3-3</i>
<i>pen3-3 rev</i>	GTTCTGACTAATGTAAGCAGAGGTCT	Nachweis T-DNA Allel in <i>pen3-3</i>
<i>pen3-4 fw</i>	TGTATCACCCAATAAATCCTCAC	Nachweis T-DNA Allel in <i>pen3-4</i>
<i>pen3-4 rev</i>	TGACTTCAACAGTTGGAAGTTTGA	Nachweis Wildtypallel in <i>pen3-4</i>
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	T-DNA spezifischer Primer für SALK-Linien
<i>atpcs2 fw</i>	GATGAATCAATGCTGGAATGTTGC	Nachweis Wildtypallel in <i>atpcs2</i>
<i>atpcs2 rev</i>	GCAGATTGTCTTCGTACACAGAGG	Nachweis T-DNA Allel in <i>atpcs2</i>
TAG5	CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC	T-DNA spezifischer Primer für FLAG-Linien
<i>AtPCS1 fw</i>	CCGCAAATTTGTCGTCAAATG	Nachweis intakter gDNA für <i>AtPCS1</i>
<i>AtPCS1 rev</i>	CATGAACCTGAGAACAACACAGA	Nachweis intakter gDNA für <i>AtPCS1</i>
<i>cad1-3 fw</i>	CAAGTATCCCCCTCACCGG	Nachweis Wildtypallel in <i>cad1-3</i>
<i>cad1-3 rev</i>	CCCAAAGAAGTTTAAGAGGACCG	Nachweis Punktmutation in <i>cad1-3</i>

Die Temperaturschritte und zugehörigen Zeiten sind Tabelle 4 zu entnehmen und wurden im iCycler oder MJ Mini Personal Thermal Cycler (BioRad) durchgeführt.

Sollte das Zielfragment anschließend verdaut werden, wurde 1/10 Volumen 3 M Kaliumacetat zugegeben und gut gemischt. Anschließend wurde das 3-fache Volumen an eiskaltem 96 % (v/v) Ethanol zugegeben, gut gemischt und für 2 h bei -80°C oder über Nacht bei -20°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 20,200 × g für 15 min wurde das Pellet mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und bei 37°C getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 30 µl Wasser aufgenommen und in den Restriktionsverdau eingesetzt.

Tab. 4: Programm, das für Standard-PCRs verwendet wurde. T_m bezeichnet die jeweilige Annealingtemperatur des verwendeten Primerpaars. Die angegebene Elongationszeit bei 72°C war abhängig von der Ampliconlänge und bezieht sich auf die Verwendung der *Taq*-Polymerase.

Zyklenanzahl	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	94	5:00
10	94	0:30
	T_m	2:00
	72	ca. 1 min/kb
30	94	0:30
	T_m	0:30
	72	ca. 1 min/kb
1	72	10:00

2.3.9 Restriktionsverdau

Die Restriktion von DNA-Sequenzen erfolgte in einem Standardvolumen von 20 μ l. Hierbei wurde meist 1 μ g DNA eingesetzt, 2 bzw. 4 μ l des jeweiligen 10x Puffers (je nachdem ob 1x oder 2x konzentriert) und 5 U des jeweiligen Enzyms (Fermentas). Die Inkubation erfolgte in den meisten Fällen für 1 h bei 37°C mit anschließender Inaktivierung je nach Herstellerangaben für 20 min bei 65°C oder 80°C.

2.4 Transkriptanalyse

Für die Transkriptanalyse wurde die mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde 1 μ g Gesamt-RNA mit DNase I (Fermentas) behandelt. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese mit dem „*SuperScript™ II First-strand Synthesis System for RT-PCR*“ (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben. Für die quantitative Analyse wurde die cDNA 50-fach verdünnt. Die quantitative real-time PCR wurde in einem MyiQ Cycler (BioRad, München) durchgeführt. Der „*qPCR Mastermix SYBR green I*“ (Eurogentec Deutschland GmbH, Köln) wurde zur Quantifizierung der gebildeten DNA wie folgt eingesetzt: 10 μ l SYBR green I Mastermix, 5 μ l Primermix (je 0.5 μ M) und 5 μ l verdünnter cDNA. Alle Proben wurden in drei technischen Replikaten angesetzt. Ein 2-Stufen Programm beginnend mit 8 min Denaturierung der DNA bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen mit 10 sec bei 95°C und 1 min Elongation bei 60°C wurde verwendet. Eine Schmelzkurvenanalyse wurde an das Programm angegliedert, um die Spezifität der Reaktion zu überprüfen. Die verwendeten Primer sind Tabelle 5 zu entnehmen, wobei *NAS2* (At5g56080) und *ZIP9* (At4g33020) als molekulare Markergene für Zinkdefizienz nach Talke *et al.* [98] gewählt wurden.

Die Daten wurden mit der „*iQ5 Optical System Software 2.1*“ (BioRad) ausgewertet, wobei die Voreinstellungen beibehalten und die C_T -Werte über die Autofunktion generiert wurden. Die Quantifizierung des Expressionslevels eines Zielgens erfolgte relativ, indem sie in Beziehung zum

Referenzgen, hier *Elongationsfaktor 1 α* (At5g60390), gesetzt wurde. Der ΔC_T -Wert berechnete sich dann wie folgt: $\Delta C_T = C_T$ (Zielgen) - C_T (Referenzgen). Das relative Transkriptlevel eines Gens ergibt sich dann aus $RTL = 1000 * 2^{-\Delta C_T}$ [252], wobei der Faktor 1000 zur besseren Darstellung der Transkriptdaten eingeführt wurde.

Tab. 5: Sequenzen, der für quantitative und semiquantitative PCR verwendeten Oligonukleotide. Primersequenzen des Zielgens *NAS2* und des Referenzgens *Ef1 α* für qPCR wurden von Talke *et al.* [98] übernommen.

Gen	Sequenz „forward“ (5' → 3')	Sequenz „reverse“ (5' → 3')	Quantifizierung
<i>NAS2</i>	CTGACGACGTGGTTAATTCGG	TGCCTCGAGCTCCATTTGA	
<i>ZIP9</i>	ATCACCGTCATAGCCTCTCCATG	CATGACCGGAAACACCACTTCTC	quantitativ
<i>EF1α</i>	TGAGCACGCTCTTCTTGCTTTCA	GGTGGTGGCATCCATCTTGTTACA	
<i>CePCS</i>	CGTTGCAAGATTCAAGTATCCA	TCCGCAAGATTTCTATTCG	semi-
<i>EF1α</i>	CAACCTTGACTGGTACAAGG	AGAACGCCTGTCAATCTTGG	quantitativ

Alternativ zur qPCR wurde das Transkriptlevel des Zielgens *CePCS* in Überexpressionslinien semiquantitativ über Reverse-Transkriptase PCR (RT-PCR) analysiert. Anders als für qPCR wurde hierfür die mRNA mittels des „First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Fermentas) in cDNA umgeschrieben. Für die anschließende PCR wurde der in Abschnitt 2.3.8 beschriebene PCR-Ansatz verwendet, wobei 1 μ l unverdünnte cDNA als Matrize diente.

Tab. 6: Programm, der für semiquantitative Transkriptanalyse durchgeführten PCR zur Charakterisierung der *CePCS* Überexpressionslinien in *cad1-3*. In Klammern angegeben sind die unterschiedlichen Zyklenzahlen und Annealingtemperaturen für Zielgen (*CePCS*) und Referenzgen (*Ef1 α*).

Zyklusanzahl	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	94	5:00
26 (<i>CePCS</i>)/ 29 (<i>EF1α</i>)	94	0:30
	61 (<i>CePCS</i>)/ 57 (<i>EF1α</i>)	0:30
	72	0:40
1	72	10:00

2.5 Elementanalyse

2.5.1 Vorbereitung von Pflanzenmaterial

Wurzelmateriale aus Flüssigkulturen wurde zunächst in vier aufeinander folgenden Waschschritten von Metallionen befreit, die der Oberfläche anhaften: $H_2O_{dest.}$, 100 mM $CaCl_2$, 10 mM EDTA und $H_2O_{dest.}$. Alle Schritte erfolgten bei 4°C für 10 min in je 25 ml der jeweiligen Waschlösung

unter stetigem Schütteln. Wurzel- und Blattmaterial wurde vor dem Aufschluss gefriergetrocknet. Samen wurden bei 50°C getrocknet.

Der Probenaufschluss für die anschließende ICP-OES Analyse erfolgte pro 300 mg Trockengewicht Blatt oder Wurzel in 4 ml HNO₃ (65 %) und 2 ml H₂O₂ (30 %) bzw. 2 ml HNO₃ und 1 ml H₂O₂ pro 50 mg Samen in der Mikrowelle (START 1500, MLS GmbH, Leutkirch) mit dem in Tabelle 7 aufgeführten Temperaturgradientenprogramm.

Tab. 7: Mikrowellenprogramm zum Säureaufschluss von Pflanzenmaterial für nachfolgende Analyse des Metallgehaltes. Angegeben sind die Temperaturschritte und zugehörigen Zeiten für den Aufschluss von Wurzel- und Blattmaterial bzw. Samen.

Wurzel / Blatt		Samen	
Temperaturschritt	Zeit	Temperaturschritt	Zeit
linearer Gradient auf 80°C	5 min	linearer Gradient auf 95°C	5 min
80°C	5 min	95°C	2 min
linearer Gradient auf 180°C	5 min	linearer Gradient auf 180°C	10 min
180°C	12 min	180°C	5 min
Ventilation	26 min	Ventilation	20 min

2.5.2 Vorbereitung von Erdproben

Um den Anteil der extrahierbaren sowie austauschbaren Metalle im Boden zu analysieren, wurden 3 g trockene Erde mit 25 ml der jeweiligen Lösung versetzt und über die angegebene Zeit bei Raumtemperatur mittels eines Rotators (SB2, Stuart, Staffordshire, GBR) extrahiert. Der extrahierbare Metallgehalt wurde aus Extrakten mit 0.1 M HCl (30 min) [253] analysiert, während der austauschbare Anteil, welcher sich dem bioverfügbaren Metallanteil annähert, in Extrakten gemessen wurde, die nach 2-stündiger Extraktion mit entweder 10 mM CaCl₂ [254] oder 5 mM DTPA, 0.1 M Triethanolamin, 10 mM CaCl₂ (pH 7.3) [255] erhalten wurden. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 2,400 × g wurde der Überstand abgenommen und bis zur Analyse des Metallgehaltes bei 4°C gelagert.

2.5.3 Elementmessung

Die Analyse der Metallgehalte aus Pflanzen- bzw. Erdproben erfolgte mittels eines ICP-OES-Spektroskops (iCAP 6500, ThermoScientific, Dreieich) bei den in Tabelle 8 aufgeführten Wellenlängen. Die Proben wurden für die Analyse bei Bedarf entsprechend in 2 % (v/v) HNO₃ verdünnt.

Tab. 8: Übersicht über die mittels ICP-OES gemessenen Elemente und dazugehörigen Wellenlängen.

Element	Wellenlänge (nm)
Ca	315.8
Cd	226.5
Co	228.6
Cu	324.7
Fe	259.9
Mg	285.2
Mn	257.6
Mo	202.0
Ni	231.6
P	178.2
Zn	213.8

2.6 Metabolitanalyse

2.6.1 PC-Extraktion und Derivatisierung

Für die Extraktion der Phytochelatine wurde Pflanzenmaterial gepoolt und in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert. Je 100 mg Frischgewicht wurden mit 300 µl Extraktionspuffer (6.3 mM DTPA, 0.1 % (v/v) TFA, 40 µM *N*-Acetylcystein; nach Sneller *et al.* [256]) versetzt und gründlich gemischt, bis eine homogene Lösung entstand. Diese wurde anschließend mit gelegentlichem Mischen für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 16,000 × g wurde der PC-haltige Überstand abgenommen und bei -20°C bis zur Derivatisierung gelagert.

Die Reduktion und Derivatisierung des PC-Extrakts basiert auf Methoden von Rijstenbil & Wijnholds [257] und Sneller *et al.* [256] und wurde, wie von Thangavel *et al.* [258] und Minocha *et al.* [259] beschrieben, in leicht abgewandelter Form durchgeführt. Zu 62.5 µl des PC-Extraktes wurden 154 µl Derivatisierungspuffer (200 mM EPPS, 6.3 mM DTPA, pH 8.2) und 6.25 µl des Reduktionsmittels 20 mM TCEP (frisch angesetzt in 200 mM EPPS, pH 8.2) gegeben und für 10 min bei 45°C inkubiert. Die Derivatisierung der Phytochelatine wurde nachfolgend durch Zugabe von 5 µl 50 mM Monobromobiman (mBrb; gelöst in Acetonitril) gestartet und erfolgte ebenfalls bei 45°C für 30 min unter Lichtabschluss. Im Gegensatz zu früheren Methoden [256–259] wurde der interne Standard NAC nicht erst bei der Derivatisierung zugesetzt, sondern war schon im Extraktionspuffer enthalten, um eine geringere Variation zwischen den Proben zu erhalten. Derivatisierte Extrakte wurden bis zur Messung bei -20°C gelagert. Für die Standardreihe wurde eine Mischung aus PC2 bis PC5-Standards (AnaSpec Inc., Fremont, CA, USA) anstelle des PC-Extraktes in die Derivatisierung eingesetzt. Um vergleichbare Mengen des internen Standards NAC in der Standardreihe nach Ende der Derivatisierung zu erhalten, wurde das in Tabelle 9 aufgezeigte Pipettierschema verwendet. Die

Endkonzentration des internen Standards NAC nach der Derivatisierung betrug somit 8 μM . Dies näherte sich einer Endkonzentration von ca. 7.5 μM NAC in gelabelten PC-Extrakten an, welche sich durch die Verdünnung des Extraktionspuffers mit dem hohen Wassergehalt des Probenmaterials einstellte. Experimentell konnte bestätigt werden, dass in gelabelten Extrakten und PC-Standards gleiche Signalintensitäten für den internen Standard erhalten wurden.

Tab. 9: Pipettierschema zur Erstellung einer Standardreihe für PC-Quantifizierung mittels UPLC-ESI-QTOF-MS. Der Extraktionspuffer setzte sich wie folgt zusammen: 6.3 mM DTPA, 0.1 % (v/v) TFA, 40 μM NAC. Die Stammlösung war eine Mischung aus PC2, PC3, PC4 und PC5 in den angegebenen Konzentrationen für jedes PC.

Konzentration PC _n (μM)			Eingesetztes Volumen (μl)		
vor Derivatisierung	nach Derivatisierung	Stamm-lösung	Stamm-lösung	Wasser	Extraktions-puffer
100	25	1000	10	10	80
50	12.5	1000	5	15	80
20	5	100	20	-	80
10	2.5	100	10	10	80
2	0.5	10	20	-	80
1	0.25	10	10	10	80
0.5	0.125	10	5	15	80
0	0	-	-	20	80

2.6.2 PC-Quantifizierung mittels UPLC-ESI-QTOF-MS

Vor der Analyse wurden derivatisierte Proben bei 4°C und 16,000 \times g für 10 min zentrifugiert und der partikelfreie Überstand für die Messung in Probengläschen überführt. Für die Trennung mBrb-derivatisierter Thiole wurde ein Waters Aquity UPLC System mit einer HSS T3 Säule (1.8 μm , 2.1 \times 100 mm; Waters Corporation, Milford, MA, USA) verwendet. Es wurden 5 μl des gelabelten Extraktes injiziert und bei einer Flussrate von 0.5 ml pro Minute in einem binären, linearen Gradienten über 15 min aufgetrennt (vgl. Tab. 10). Die Säulentemperatur betrug 40°C.

Phytochelatine wurden mit einem Q-TOF Premier Massenspektrometer, welches mit einer ESI-Quelle (Waters Corporation, Milford, MA, USA) ausgestattet ist, im V+-Modus detektiert. Das Massenspektrometer wurde mit Leucin-Enkephalin auf optimale Sensitivität eingestellt. Einstellungen grundlegender Parameter waren wie folgt: Kapillarspannung 0.6 kV, Probenkonus 30 V, Extraktionskonus 30 V, Ionenleiter 3.3 V, Quelltemperatur 120°C, Gasstrom Konus 10 l/h, Verdampfungsgasstrom 1000 l/h, Kollisionsenergie 4.0 V. Die Datenaufnahme erfolgte in einem Bereich des Masse/Ladungsverhältnisses (m/z) von 300-2000 mit einer Scanzeit von 0.3 sec und einer "InterScan"-Verzögerung von 0.05 sec.

Tab. 10: Zeitlicher Verlauf des Laufmittelgradienten zur Auftrennung von mBrb-derivatisierten Phytochelatinen mittels UPLC-ESI-QTOF-MS. Acetonitril (ACN), Ameisensäure (FA)

Schritt	Zeit	Laufmittel A (H ₂ O, 0.1 % (v/v) FA)	Laufmittel B (ACN, 0.1 % (v/v) FA)	Gesamtzeit
1	1 min	99.5 %	0.5 %	1 min
2	9 min	linearer Gradient auf	60.5 % B	10 min
3	2 min	linearer Gradient auf	99.5 % B	12 min
4	1 min	0.5 %	99.5 %	13 min
5	1 min	linearer Gradient auf	0.5 % B	14 min
6	1 min	99.5 %	0.5 %	15 min

Für die Quantifizierung der Thiole wurde das "QuanLynx"-Modul der "MarkerLynx" Software verwendet. PC2 und PC3 wurden quantifiziert durch Integration der rekonstruierten Ionenspektren der protonierten Ionen $[M+H]^+$ m/z 354.1 ± 0.5 bei 4.39 ± 0.3 min für mBrb-NAC (interner Standard), m/z 920.3 ± 0.5 bei 4.57 ± 0.3 min für mBrb-PC2 und den summierten Ionenspektren m/z 1342.4 ± 0.5 und $[M+2H]^{2+}$ m/z 671.7 ± 0.5 bei 5.06 ± 0.3 min für mBrb-PC3. Eine lineare Kalibration durch den Ursprung wurde mit den Standardkonzentrationen 125, 250, 500 nM und 2.5, 5, 12.5 μ M des jeweiligen PCs erstellt. Durchschnittlich wurde ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0.98$ für PC2 bzw. $R^2 = 0.96$ für PC3 erreicht. Alle Proben wurden als Triplikate gemessen.

2.6.3 Messung des Nicotianamingehalts

Nicotinamin wurde aus Extrakten, die ursprünglich für den PC-Nachweis angefertigt wurden, analysiert (vgl. Abschnitt 2.6.1). Hierfür wurde Nicotinamin mit Fmoc derivatisiert und mittels UPLC-ESI-QTOF-MS (Waters Corporation, Milford, MA, USA) quantifiziert [260]. Rekombinant erzeugter, isotopenmarkierter $^{15}\text{N}_3$ -NA-Standard diente als interner Standard für die Quantifizierung.

2.7 Zinkspeziierung

Für die Zinkspeziierungsanalyse wurden 100 mg Frischgewicht von *A. thaliana* Wurzel- oder Blattmaterial unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff und Zugabe von 500 mg Quarzsand (säuregewaschen) und 2 ml 50 mM Tris/HCl (pH 7.5) homogenisiert und extrahiert. Anschließend wurde die Suspension bei 4°C und $11,000 \times g$ für 5 min zentrifugiert und der Überstand über eine Membran mit 100 kDa "cut-off" ultrafiltriert (Microcon Centrifugal Filter Unit YM-100, Millipore). Die anschließende Speziierungsanalyse mittels SEC-ICP-MS und ESI-TOF-MS wurde nach den in Persson *et al.* [241,261] beschriebenen Methoden vom „Plant and Soil Science Laboratory“ der Universität Kopenhagen durchgeführt.

2.8 pH Messung Boden

Um den pH von Substraterde, alkalischer Erde und artifiziell kontaminierter Erde zu bestimmen, wurden zwei verschiedene Extraktionen durchgeführt. Einmal wurden 5 g Trockengewicht Erde mit 12.5 ml 1 M KCl und zum anderen 3 g Trockengewicht mit 7.5 ml 10 mM CaCl₂ versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Rotator (SB2, Stuart) extrahiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen und mit einer pH-Elektrode (SevenEasy, Mettler Toledo, Gießen) vermessen.

2.9 Bestimmung Callosedeposition

Zur Färbung der Callose wurden die Keimlinge 22 h nach Zugabe von Flg22 nach Clay *et al.* [244] in einem Ethanol/Eisessig-Gemisch (3:1) fixiert. Hierfür wurde zunächst die Nährlösung abgenommen und pro Vertiefung 1 ml der Fixierlösung pipettiert, welcher sofort wieder abgenommen wurde. Dies diente der Entfernung von Rückständen des Mediums. Anschließend wurden pro Vertiefung 2 ml der Fixierlösung zugegeben und unter stetigem Schütteln bei Raumtemperatur für 2-3 h entfärbt, wobei alle 30 min die Entfärbelösung getauscht wurde. Nachdem die Kotyledonen farblos erschienen, wurde für 2 h mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol rehydriert, gefolgt von 2 h in 1 ml 50 % (v/v) Ethanol. Anschließend wurden die Keimlinge zweimal in Wasser gewaschen und in Wasser über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurde erneut zweimal mit Wasser gewaschen und nachfolgend für 2 h bei 37°C in 10 % (w/v) NaOH inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser erfolgte die Callosefärbung durch Inkubation in Färbelösung (0.01 % (w/v) Anilinblau in 150 mM K₂HPO₄, pH 9.5) unter Lichtabschluss und stetigem Schütteln für mindestens 4 h. Anschließend wurden aus jedem Well 3-4 Blätter auf einem Objektträger in 50 % (v/v) Glycerin platziert und bis zur Mikroskopie bei 4°C unter Lichtabschluss gelagert. Die Callosedeposition wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen) mit einem DAPI-Filter betrachtet (Filtersatz 1, Anregung 365 ± 6 nm, Emission > 397 nm). Bilder wurden mit einer "Evolution VF Mono Cooled Monochrom"-Kamera (Intas, Göttingen) und der Software "Image-Pro Plus 5.0" (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) aufgenommen. Fotos wurden innerhalb eines Experimentes mit gleicher Belichtungszeit gemacht. Um eine größtmögliche Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde die Callosedeposition immer im gleichen Teil des Blattes aufgenommen und zwar im Bereich des zentralen Leitbündels nahe der Blattspitze.

2.10 Pflanzentransformation und Selektion

Die Transformation von *A. thaliana* erfolgte nach der *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten "floral dip"-Methode [262]. Hierzu wurden 100 ml einer *A. tumefaciens* Kultur, die über Nacht bei 28°C und 200 rpm in selektivem LB-Medium angezogen wurde, zentrifugiert und das Pellet in 900 ml

einer 5 % (w/v) Saccharoselösung resuspendiert. Um die Oberflächenspannung der Bakteriensuspension herabzusetzen, wurden 0.02 % (v/v) Silwet L-77 (Lehle Seeds, Round Rock, TX, USA) zugegeben. Anschließend wurden ca. 8 Wochen alte *A. thaliana* Pflanzen durch mehrmaliges Eintauchen der Blütenanlagen in die Suspension transformiert. Nach einer Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur, hoher Luftfeuchtigkeit und Dunkelheit, wurden die Pflanzen im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (16 h Licht/ 8 h Dunkelheit) bis zur vollständigen Samenreife kultiviert. Zur Selektion transgener Pflanzen wurden die reifen Samen auf Substraterde ausgebracht, für 2 d bei 4°C stratifiziert und unter Langtagbedingungen (16 h Licht/ 8 h Dunkelheit) inkubiert. Etwa 4 d nach der Keimung erfolgte die Selektion durch Besprühen mit einer 0.04 % (v/v) Basta-Lösung (Bayer, Leverkusen). Diese Behandlung wurde jeweils im Abstand von 2 d zweimalig wiederholt.

2.11 Berechnung der Blattfläche

Die Berechnung der Blattfläche erfolgte mittels "*Adobe Photoshop CS2*" Version 9.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA). Hierfür wurde die Pixelzahl, die die Blattform repräsentiert, auf die Pixelzahl der Topfgröße bezogen und somit eine Blattfläche in Quadratzentimeter erhalten

2.12 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit "*SigmaPlot*" Version 11.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA). Je nach Experimentbeschaffenheit wurden die Daten mittels einfaktorieller bzw. zweifaktorieller Varianzanalyse berechnet. Als post-hoc Test wurde der Tukey HSD Test verwendet. Prozentwerte wurden vor der Varianzanalyse entsprechend transformiert, um die Normalverteilung wiederherzustellen.

3 Ergebnisse

3.1 AtPCS1

3.1.1 Vergleich des Effekts verschiedener Zusammensetzungen des Kulturmediums auf den Zn- und Cadmiumphänotyp

A. thaliana *AtPCS1* Mutanten zeigten eine hypersensitive Reaktion gegenüber Zn, sofern sie auf Medium angezogen wurden, welches sich zum einen durch einen niedrigen Kationengehalt (1/10 Hoaglandmedium) auszeichnet und welches zum anderen mit einem Agar verfestigt wurde, der eine nur geringe Bindungskapazität besitzt. Dieser zinkhypersensitive Phänotyp blieb bei der Verwendung eines Standardmediums (1/2 MS-Medium) für Pflanzenanzucht aus [228]. Ausgehend von dieser Beobachtung erfolgte ein Vergleich des Wachstums der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* und des zugehörigen Wildtyps Col-0 in Anwesenheit erhöhter Zn- und Cadmiumkonzentrationen in verschiedenen Medien zur Pflanzenanzucht. Anders als bei Tennstedt *et al.* [228] erfolgte die Anzucht in einem neu entwickelten flüssigen Keimlingsassay anstelle des üblicherweise verwendeten Toleranztests auf Agarplatten. Ersterer zeichnet sich durch eine kürzere Versuchsdauer und einfachere Durchführung aus. Zudem hat der Verzicht auf Agar den Vorteil, dass eine Komponente mit Metallionenbindungskapazität entfällt und das Risiko von Verunreinigungen minimiert wird. Für einen ersten Test wurden folgende drei Medien verwendet: (i) kommerziell erhältliches 1/10 Hoaglandmedium (Pulver, Sigma-Aldrich) mit Mikroelementen, (ii) nach Herstellerangaben selbst gemischtes 1/10 Hoaglandmedium und (iii) modifiziertes 1/10 Hoaglandmedium mit niedrigerer Calciummenge (vgl. Abb. 6). Medien (ii) und (iii) wurden nicht mit Mikroelementen versetzt, da Keimlinge in den ersten drei Wochen keine zusätzlichen Spurenelemente benötigen. Die gewählten Zn- und Cadmiumkonzentrationen waren analog zu Experimenten auf Agarplatten.

Es zeigte sich, dass sowohl der zink- als auch der cadmiumhypersensitive Phänotyp der *cad1-3* Mutante in allen drei Varianten des 1/10 Hoaglandmediums auftrat. Auffällig war, dass sowohl für Cd als auch für Zn der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante im kommerziellen Hoaglandmedium mit 21 % am größten war, sich um ca. 3 % im modifizierten Hoaglandmedium verringerte und im selbstgemischtem Rezept nach Herstellerangaben nur noch bei ca. 10 % lag. Die Mikroelementzugabe schien dabei nur einen Effekt auf das Wachstum der Keimlinge unter Kontrollbedingungen zu haben. In Anwesenheit erhöhter Schwermetallkonzentrationen war kein verbessertes Wachstum im Vergleich zum modifizierten Hoaglandmedium ohne Mikroelemente zu verzeichnen. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass geringe Unterschiede in der Stärke des Phänotyps mit Veränderung der Makroelementkonzentrationen im 1/10 Hoaglandmedium einhergingen.

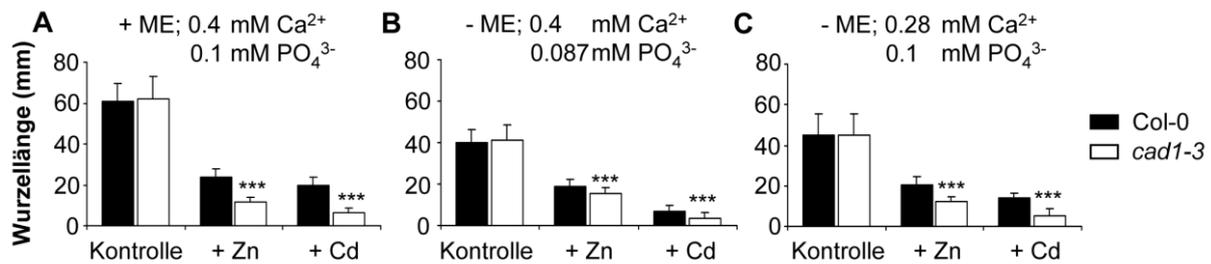


Abb. 6: Vergleich der Zn- und Cadmiumhypersensitivität der *cad1-3* Mutante in 1/10 Hoaglandmedium mit leicht veränderten Zusammensetzungen. Die *A. thaliana AtPCS1* Mutante *cad1-3* und der zugehörige Wildtyp Col-0 wurden in flüssigem 1/10 Hoaglandmedium mit drei unterschiedlichen Zusammensetzungen unter Langtagbedingungen in Anwesenheit von 50 µM Zn oder 2 µM Cd angezogen. Den zugehörigen Kontrollen wurden keine zusätzlichen Schwermetalle zugegeben. (A) Kommerziell erhältliches Hoaglandmedium Nr. 2 (Sigma-Aldrich) mit Mikroelementen (ME), (B) nach Herstellerangaben gemischtes Hoaglandmedium ohne Mikroelemente und (C) modifiziertes Hoaglandmedium mit geringerer Calciummenge ohne Mikroelementzugabe. Ebenfalls angegeben sind die Calcium- und Phosphatkonzentrationen in welchen sich die Lösungen unterschieden. Nach 7-tägigem Wachstum wurde die primäre Wurzellänge der Keimlinge gemessen. Daten repräsentieren Mittelwert ± Stdabw. aus 3 unabhängigen Experimenten mit 32-60 Individuen pro Linie und Bedingung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Zwei-Wege ANOVA und anschließendem Tukey-Test (***, $p < 0.001$).

Um zu überprüfen, ob die theoretisch eingestellten Konzentrationen auch tatsächlich im Medium vorlagen, wurden die Mg-, Ca- und Phosphorkonzentrationen in den einzelnen Experimenten aus Abbildung 6 mittels ICP-OES gemessen (vgl. Tab. 11).

Tab. 11: Makroelementkonzentrationen in den aus Abb. 6 verwendeten Medien. Angegeben sind die theoretisch eingestellten, sowie die durch ICP-OES gemessenen tatsächlichen Mg-, Ca- und Phosphorkonzentrationen für die einzelnen unabhängigen Experimente.

1/10 Hoagland-medium	Experiment	Makroelementkonzentration (mg l ⁻¹)					
		Mg		Ca		P	
		Sollwert	Istwert	Sollwert	Istwert	Sollwert	Istwert
kommerziell (Abb. 6A)	I	4.86	4.18	16.0	14.9	3.10	15.48
	II		4.55		16.2		4.90
	III		5.40		16.4		3.88
selbst gemischt (Abb. 6B)	I	4.86	5.04	16.0	16.2	2.70	60.46
	II		4.74		15.0		17.16
	III		5.20		16.2		2.88
modifiziert (Abb. 6C)	I	4.86	4.93	11.2	10.6	3.10	3.53
	II		5.19		11.1		3.72
	III		4.97		10.5		5.08

Die theoretische Magnesiumkonzentration war für alle drei Varianten des Hoaglandmediums gleich und deckte sich, abgesehen von geringen Schwankungen, mit den tatsächlich gemessenen Konzentrationen. Auch die tatsächliche Calciumkonzentration wich nur in geringem Maße vom Sollwert ab. Im Gegensatz dazu ergaben sich starke Abweichungen zwischen Soll- und Istwert für die

Phosphorkonzentration. Im kommerziellen Hoaglandmedium lag im ersten Versuch eine 5-fach höhere Phosphorkonzentration vor, als theoretisch erwartet. Noch höhere Abweichungen zum Sollwert ergaben sich für den ersten und zweiten Versuch im nach Herstellerangaben selbst gemischten Hoaglandmedium. Hier war die tatsächliche Phosphorkonzentration 22-fach bzw. 6-fach höher als die theoretische. Allein das modifizierte Hoaglandmedium unterlag nur geringen Schwankungen im Phosphorgehalt in allen drei Experimenten. Interessanterweise korrelierte die erhöhte Phosphorkonzentration im selbst gemischten Hoaglandmedium mit einem Ausbleiben bzw. einem verringertem zinkhypersensitiven Phänotyp der *cad1-3* Mutante bezogen auf den Wildtyp. Während im ersten Versuch kein Unterschied in der zinkhypersensitiven Antwort zwischen beiden Linien vorlag, lag dieser im zweiten Experiment schon bei 10 % und erhöhte sich auf 18 % im dritten Experiment, in welchem Soll- und Istwert nahezu übereinstimmten. Die cadmiumhypersensitive Antwort blieb unbeeinflusst durch die Schwankungen im Phosphorgehalt. Für das kommerzielle Hoaglandmedium mit Mikroelementen korrelierte die erhöhte Phosphorkonzentration im ersten Experiment nicht mit einer verringerten Zinkhypersensitivität.

Da Unterschiede in der Stärke des Phänotyps scheinbar mit einer Veränderung der Phosphatkonzentration im Medium einhergingen, wurde Hoaglandmedium mit verschiedenen Phosphatkonzentrationen versetzt und das Auftreten des Phänotyps getestet. Zunächst wurde dem selbst gemischten 1/10 Hoaglandmedium (vgl. Abb. 6B), welches 12.9 μM weniger Phosphat enthält, Phosphat in äquivalenten Intervallen zugesetzt (vgl. Abb. 7).

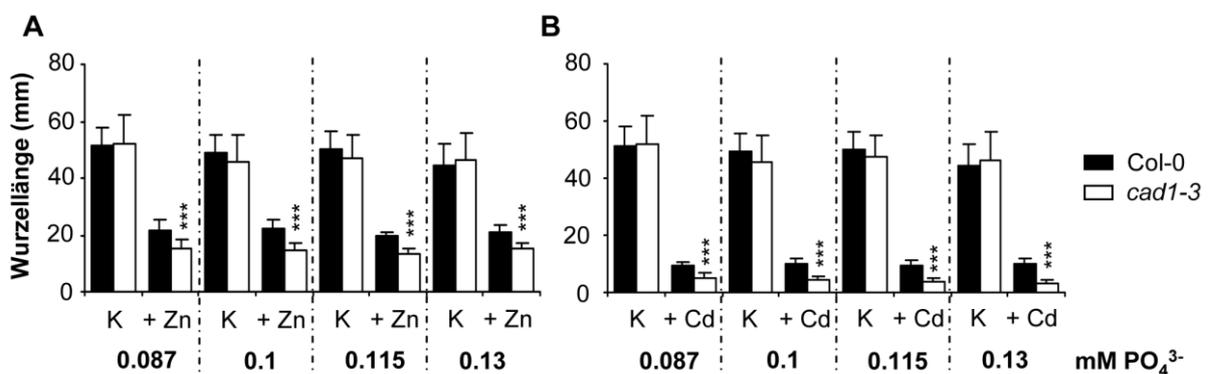


Abb. 7: Ausprägung des zink- und cadmiumhypersensitiven Phänotyps ist nicht beeinflusst durch höhere Phosphatkonzentrationen bei 0.4 mM Ca^{2+} . Keimlinge des *A. thaliana* Wildtyps Col-0 und der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* wurden für 7 d in 1/10 Hoaglandmedium, mit einer Calciumkonzentration von 0.4 mM, in Anwesenheit von (A) 50 μM Zn bzw. (B) 2 μM Cd angezogen. Die zugehörigen Kontrollen enthielten keine zusätzlichen Schwermetalle. Die Phosphatkonzentration wurde sukzessiv erhöht. Werte geben Mittelwerte \pm Stdabw. aus einem Experiment mit 10-15 Individuen pro Linie und Bedingung an. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Zwei-Wege ANOVA und anschließendem Tukey-Test (***, $p < 0.001$).

Da *cad1-3* in Anwesenheit beider Schwermetalle, unabhängig von der Zugabe erhöhter Phosphatkonzentrationen, eine hypersensitive Antwort zeigte, wurden ausgehend von einer

niedrigeren Calciumkonzentration von 0.28 mM dem modifizierten Hoaglandmedium ebenfalls verschiedene Phosphatkonzentrationen zugesetzt (vgl. Abb. 8).

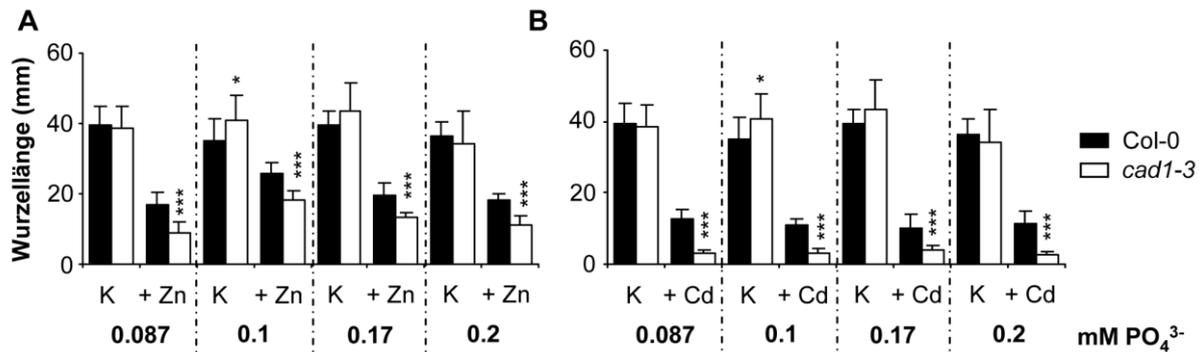


Abb. 8: Ausprägung des zink- und cadmiumhypersensitiven Phänotyps ist nicht beeinflusst durch höhere Phosphatkonzentrationen bei 0.28 mM Ca²⁺. Keimlinge des *A. thaliana* Wildtyps Col-0 und der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* wurden für 7 d in modifiziertem 1/10 Hoaglandmedium, mit einer Calciumkonzentration von 0.28 mM, in Anwesenheit von (A) 50 μM Zn bzw. (B) 2 μM Cd angezogen. Den zugehörigen Kontrollen wurden keine zusätzlichen Schwermetalle zugesetzt. Die Phosphatkonzentration wurde sukzessiv erhöht. Werte geben Mittelwerte ± Stdbw. aus einem Experiment mit 12-15 Individuen pro Linie und Bedingung an. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Zwei-Wege ANOVA und anschließendem Tukey-Test (*, p<0.05; ***, p<0.001).

Es zeigte sich, dass auch bei niedrigerer Calciumkonzentration im Medium eine Erhöhung der Phosphatmenge, bis auf das doppelte der ursprünglich im Rezept angegeben Konzentration, keinen Einfluss auf die Existenz des zink- und cadmiumhypersensitiven Phänotyps hatte. Allerdings konnte bei der Betrachtung des prozentualen Wachstums bezogen auf das Kontrollwachstum bei einer Phosphatkonzentration von 0.1 mM die stärkste Ausprägung der zinkhypersensitiven Antwort der *cad1-3* Mutante verzeichnet werden. Der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante lag hier bei 30 %, während er bei den anderen Konzentrationen nur bei 18 % lag.

Zusätzlich wurde das Wachstum beider Linien in Gegenwart von Cd und Zn im ½ MS-Medium ebenfalls im Flüssigsystem getestet (vgl. Abb. 9). Anders als auf Agarplatten [228] konnte in Flüssigkultur ein hypersensitiver Phänotyp von *cad1-3* nicht nur gegenüber Cd, sondern auch gegenüber Zn beobachtet werden. Überdies war der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante bei der jeweils höheren Schwermetallkonzentration mit 35 % für Zn bzw. 60 % für Cd sogar stärker ausgeprägt als im Hoaglandmedium. Dennoch liegen im ½ MS-Medium 6-fach höhere Phosphat-, 3.7-fach höhere Ca- und Magnesiumkonzentrationen, ca. 10-fach höhere Fe- und fast 200-fach höhere Zinkkonzentrationen vor, wodurch eine Konkurrenzsituation um Bindung und Aufnahme auftreten kann.

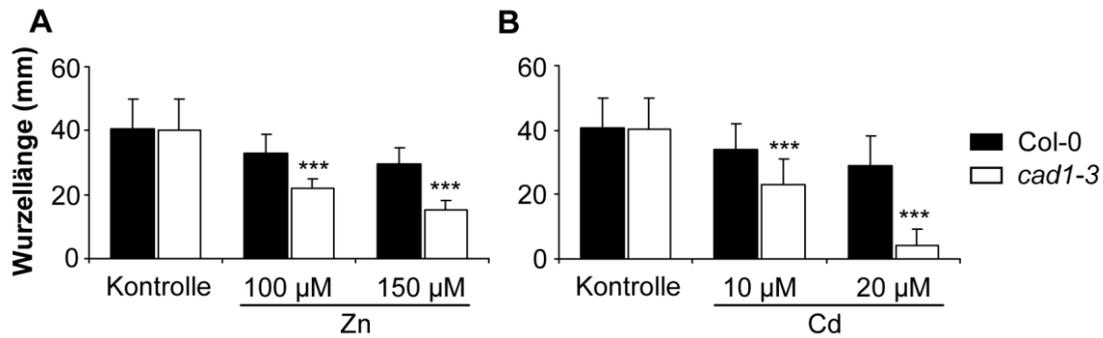


Abb. 9: Zn- und Cadmiumhypersensitivität der *cad1-3* Mutante im ½ MS-Medium. Die *A. thaliana* *AtPCS1* Mutante *cad1-3* und der zugehörige Wildtyp Col-0 wurden in flüssigem ½ MS-Medium unter Langtagbedingungen in Anwesenheit erhöhter (A) Zn- und (B) Cadmiumkonzentrationen angezogen. Den zugehörigen Kontrollen wurden keine zusätzlichen Schwermetalle zugegeben. Nach 7-tägigem Wachstum wurde die primäre Wurzellänge der Keimlinge gemessen. Daten repräsentieren Mittelwert ± Stdabw. aus 3 unabhängigen Experimenten mit 33-45 Individuen pro Linie und Bedingung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Zwei-Wege ANOVA und anschließendem Tukey-Test (***, p<0.001).

Da bekannt ist, dass Calcium durch Konkurrenz um Bindungsstellen an der Zelloberfläche einen schützenden Effekt bei Schwermetallüberschuss haben kann [263,264], wurden zunächst dem 1/10 Hoaglandmedium, mit einer Ausgangskonzentration von 0.0871 mM Phosphat, unterschiedliche Calciummengen zugesetzt und der Phänotyp beobachtet (vgl. Abb. 10).

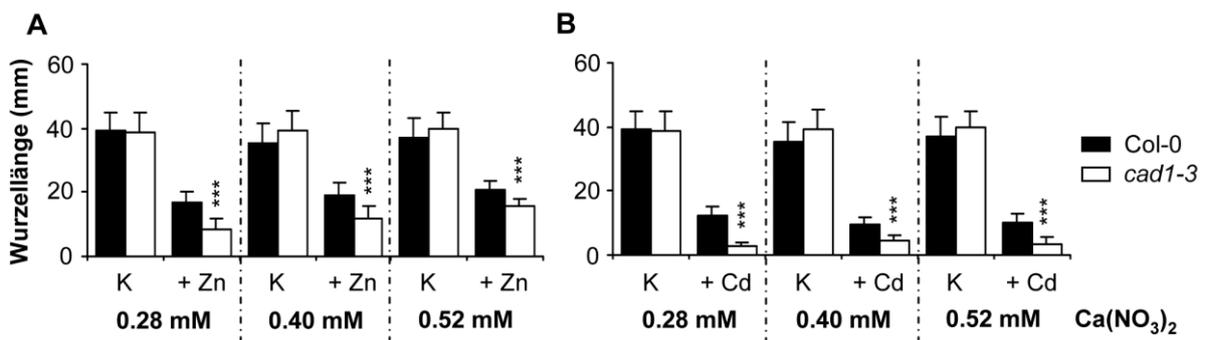


Abb. 10: Höhere Calciumkonzentration verringert Ausprägung des zinkhypersensitiven Phänotyps von *cad1-3*. Keimlinge des *A. thaliana* Wildtyps Col-0 und der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* wurden für 7 d in 1/10 Hoaglandmedium, mit einer Phosphatkonzentration von 0.0871 mM, in Anwesenheit von (A) 50 µM Zn bzw. (B) 2 µM Cd angezogen. Die zugehörigen Kontrollen enthielten keine zusätzlichen Schwermetalle. Die Calciumkonzentration wurde sukzessiv erhöht. Werte geben Mittelwerte ± Stdabw. aus einem Experiment mit 13-15 Individuen pro Linie und Bedingung an. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Zwei-Wege ANOVA und anschließendem Tukey-Test (*, p<0.05; ***, p<0.001).

Es zeigte sich, dass eine Erhöhung der Calciumkonzentration tatsächlich zu einer weniger stark ausgeprägten hypersensitiven Antwort der *cad1-3* Mutante gegenüber Zn führte. Zwar war der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante auch bei der höchsten Konzentration von 0.52 mM Calcium immer noch hoch signifikant, jedoch verringerte sich der Unterschied von 24 % auf 16 %. Zudem konnte für die Mutante ein signifikant verbessertes Wachstum zwischen allen getesteten

Calciumkonzentrationen festgestellt werden. Bei Cadmiumüberschuss konnte dieser rettende Effekt von Calciumionen nicht beobachtet werden.

Da mit höherer Calciumionenstärke im Hoaglandmedium ein verbessertes Wachstum der Mutante beobachtet werden konnte, wurde die Ausprägung der hypersensitiven Phänotypen auch im ½ MS-Medium in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration getestet (vgl. Abb. 11). Wie bereits erwähnt, enthält das MS-Medium an sich schon eine mehr als 3-fach höhere Calciumkonzentration von 1.5 mM verglichen mit dem 1/10 Hoaglandmedium

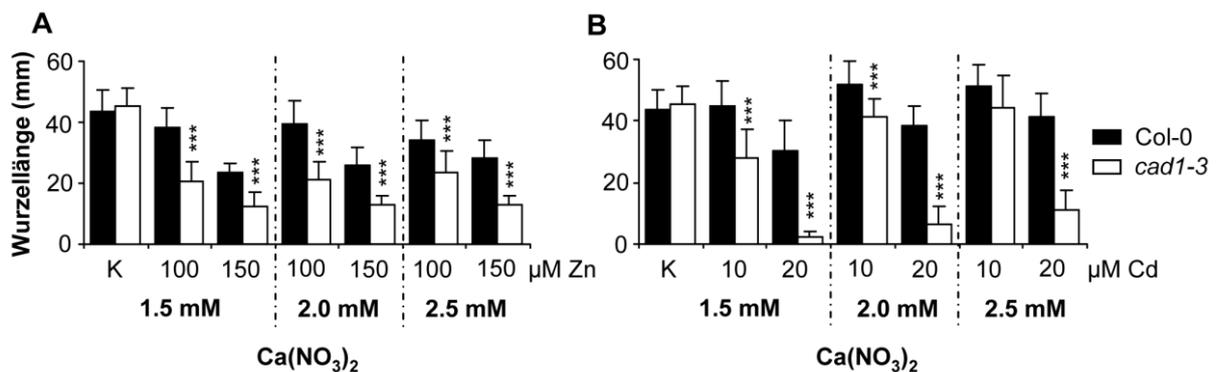


Abb. 11: Verringerung der zink- und cadmiumhypersensitiven Antwort durch erhöhte Calciumzugabe bei moderater Schwermetallbelastung. Keimlinge des *A. thaliana* Wildtyps Col-0 und der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* wurden für 7 d in ½ MS-Medium, mit einer Ausgangskonzentration von 1.5 mM Calciumnitrat, in Anwesenheit von (A) erhöhten Zn- bzw. (B) Cadmiummengen angezogen. Den zugehörigen Kontrollen wurden keine zusätzlichen Schwermetalle zugesetzt. Die Calciumkonzentration wurde sukzessiv angehoben. Werte geben Mittelwerte ± Stdabw. aus zwei unabhängigen Experimenten mit 14-26 Individuen pro Linie und Bedingung an. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Ein-Wege ANOVA und anschließendem Tukey-Test (***, $p < 0.001$).

Die Zugabe von Calcium im MS-Medium führte dazu, dass sich bei der jeweils niedrigeren Metallkonzentration der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante verringerte und im Fall von Cd sogar nicht mehr als signifikant getestet wurde. Bei höheren Metallkonzentrationen war für die Mutante zwar ebenfalls ein besseres Wachstum zu verzeichnen, gleichzeitig aber auch für den Wildtyp. Der schützende Effekt der Calciumionen war hierbei für den Wildtyp in stärkerem Maße zu beobachten.

3.1.2 Experimente auf künstlich kontaminierter Erde

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass höhere Phosphat- und Calciummengen zur Verringerung bzw. zum Ausbleiben des zinkhypersensitiven Phänotyps der *cad1-3* Mutante führen können. Allerdings trat der zinkhypersensitive Phänotyp in Flüssigkultur, im Gegensatz zu Versuchen auf Agarplatten [228], auch im MS-Medium auf, welches, verglichen mit dem Hoaglandmedium, 6-fach höhere Phosphat- und 3-fach höhere Calciummengen aufweist. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Ausbleiben des Phänotyps auf Agarplatte eher mit der Art der Schwermetallapplikation zu tun hat, als dass es um eine Folge des Zusammenspiels der einzelnen Komponenten im Medium

handelt. Da sowohl Agarplatten als auch Flüssigkulturen künstliche Testsysteme sind, wurde die Hypersensitivität von *AtPCS1* Mutanten unter Bedingungen getestet, die natürlichen Gegebenheiten näher kommen. Dazu wurde mineralische Erde, mit einem geringen Gehalt an organischem Material, künstlich mit Zn oder Cd kontaminiert. Tabelle 12 zeigt ein Metallprofil des verwendeten Bodentyps.

Tab. 12: Schwermetallgehalte im mineralischen Boden, der für Experimente auf künstlich kontaminierter Erde verwendet wurde. Extrahierbare und austauschbare Mengen an Mikroelementen wurden nach Extraktion des Bodens mit HCl, DTPA oder CaCl₂ mittels ICP-OES bestimmt. (n.q. nicht quantifizierbar; n.d. nicht detektierbar; * LLOD = 0.01 mg kg⁻¹_{Boden}; ** LLOQ = 0.1 mg kg⁻¹_{Boden})

Extraktions- methode	Metallgehalt im Boden (mg kg ⁻¹ TG)						
	Zn	Fe	Cu	Mn	Ni	Co	Cd
HCl	5.8 ± 0.5	155 ± 11	0.8 ± 0.1	134 ± 17	0.6 ± 0.03	0.8 ± 0.1	n.q.*
DTPA	2.4 ± 0.1	84 ± 9	0.7 ± 0.1	44 ± 7	n.q.**	n.q.**	n.q.*
CaCl ₂	n.d.*	0.5 ± 0.1	n.d.*	11 ± 2	n.d.*	n.d.*	n.d.*

Die verwendete Erde enthielt nur einen sehr geringen Gehalt an bioverfügbarem Zn. Frühere Experimente hatten gezeigt, dass Pflanzen auf diesem Bodentyp nach mehrwöchigem Wachstum ohne zusätzliches Zn leicht zinkdefizient waren (Lehrstuhl Pflanzenphysiologie, 2009, unveröffentlicht). Daher wurde die Erde bei Experimenten zur Untersuchung der Zinktoleranz für Kontrollbedingungen mit einem moderaten Gehalt von 60 mg Zn²⁺ kg⁻¹_{Boden} versetzt. Ebenfalls, aufgrund von Vorversuchen zur hier vorliegenden Arbeit, wurde die höhere Konzentration von 970 mg Zn²⁺ kg⁻¹_{Boden} gewählt, da Col-0 bei diesem Zinklevel bereits eine deutliche Wachstumsreduktion zeigte. Für Experimente auf cadmiumkontaminierter Erde wurde zunächst eine Dosis-Antwortkurve mit vier verschiedenen Konzentrationen aufgenommen (Abb. 12).

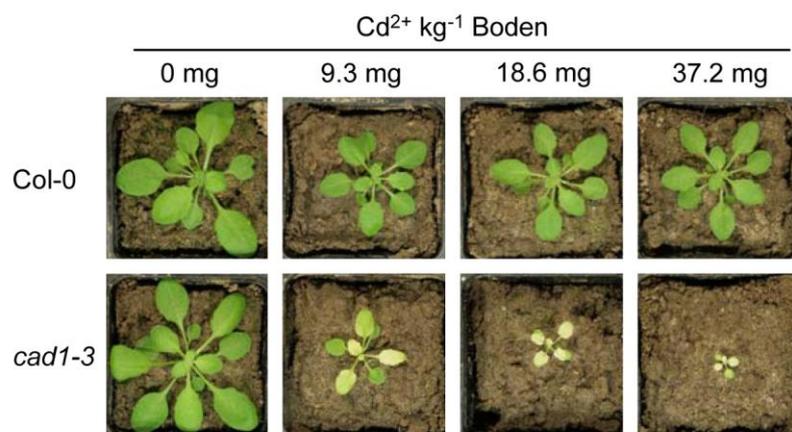


Abb. 12: Konzentrationsreihe zur Bestimmung einer geeigneten Cadmiummenge für Toleranzexperimente. Zehn Tage alte *A. thaliana* Keimlinge des Wildtyps Col-0 und der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* wurden auf künstlich kontaminierte Erde mit ansteigender Cadmiummenge transferiert. Gezeigt sind repräsentative Bilder von Pflanzen nach 24-tägigem Wachstum.

Da Col-0 bei der höchsten Cadmiumkonzentration nur einen geringen Effekt, *cad1-3* aber bereits bei der niedrigsten zugegebenen Cadmiummenge eine sehr starke Wachstumsreduktion zeigte, wurde für weitere Experimente zur Untersuchung der Cadmiumtoleranz eine Cadmiummenge von 7.5 mg Cd²⁺ kg⁻¹_{Boden} gewählt. Diese etwas verringerte Konzentration sollte dazu dienen, eine ausreichende Biomasse der Mutante für nachfolgende Analysen zu generieren.

Tabelle 13 gibt eine Auflistung der theoretisch eingestellten Zn- und Cadmiumkonzentrationen im Boden an und die, zur Abschätzung des bioverfügbaren Anteils und durch verschiedene Extraktionsmethoden erhaltenen, tatsächlichen Metallgehalte.

Tab. 13: Vergleich von extrahierbaren und austauschbaren Metallgehalten in künstlich kontaminierter Erde. Zn- und Cadmiumgehalte wurden aus Bodenextrakten, die mit Hilfe der HCl-, DTPA- oder CaCl₂-Methode erhalten wurden, mittels ICP-OES analysiert.

Extraktions- methode	Metallgehalt im Boden (mg kg ⁻¹ TG)		
	Zn ²⁺		Cd ²⁺
	60 mg	970 mg	7.5 mg
HCl	39.2 ± 3.9	555.4 ± 67.7	6.3 ± 0.3
DTPA	20.4 ± 2.0	452.0 ± 27.6	4.7 ± 0.3
CaCl ₂	0.35 ± 0.04	52.7 ± 8.8	0.12 ± 0.02

Die Analyse der Metallgehalte im Boden nach der Kontamination ergab, dass für Zn ca. 60 % der eingesetzten Menge mittels HCl wieder extrahiert werden konnte, und somit nicht irreversibel an Bodenpartikel gebunden war. Die bioverfügbare Zinkmenge, abgeschätzt aus Extrakten mit DTPA bzw. CaCl₂, erreichte einen Wert von bis zu 47 % der eingesetzten Zinkkonzentration. Für cadmiumbehandelte Erde lagen diese Werte höher. So konnte bis zu 84 % der eingesetzten Menge extrahiert werden, und bis zu 63 % waren austauschbar mittels DTPA. Somit war sichergestellt, dass ein Großteil der eingesetzten Schwermetalle auch tatsächlich für die Pflanzen verfügbar war.

Zunächst wurden die Mutanten *cad1-3* und *cad1-6* [227,228], welche eine nicht-funktionale Version der *AtPCS1* bzw. ein C-terminal verkürztes Protein enthalten, sowie der Wildtyp Col-0 auf zinkkontaminierter Erde angezogen (Abb. 13). Während auf Kontrollerde kein unterschiedliches Wachstum zwischen den drei Pflanzenlinien festgestellt werden konnte, war auf zinkkontaminierter Erde ein ausgeprägter hypersensitiver Phänotyp für beide *AtPCS1* Mutanten sichtbar (Abb. 13A). Zwar zeigte auch der Wildtyp Col-0 nach 24 d ein um 40 % reduziertes Wachstum, welches aber mit einem p-Wert <0.001 höchst signifikant unterschiedlich zu *cad1-3* und *cad1-6* war. Diese waren, bezogen auf die entsprechende Kontrolle, jeweils zu 74 % bzw. 65 % im Wachstum inhibiert (Abb. 13B). Untereinander wuchsen die *cad1* Mutanten nicht signifikant unterschiedlich.

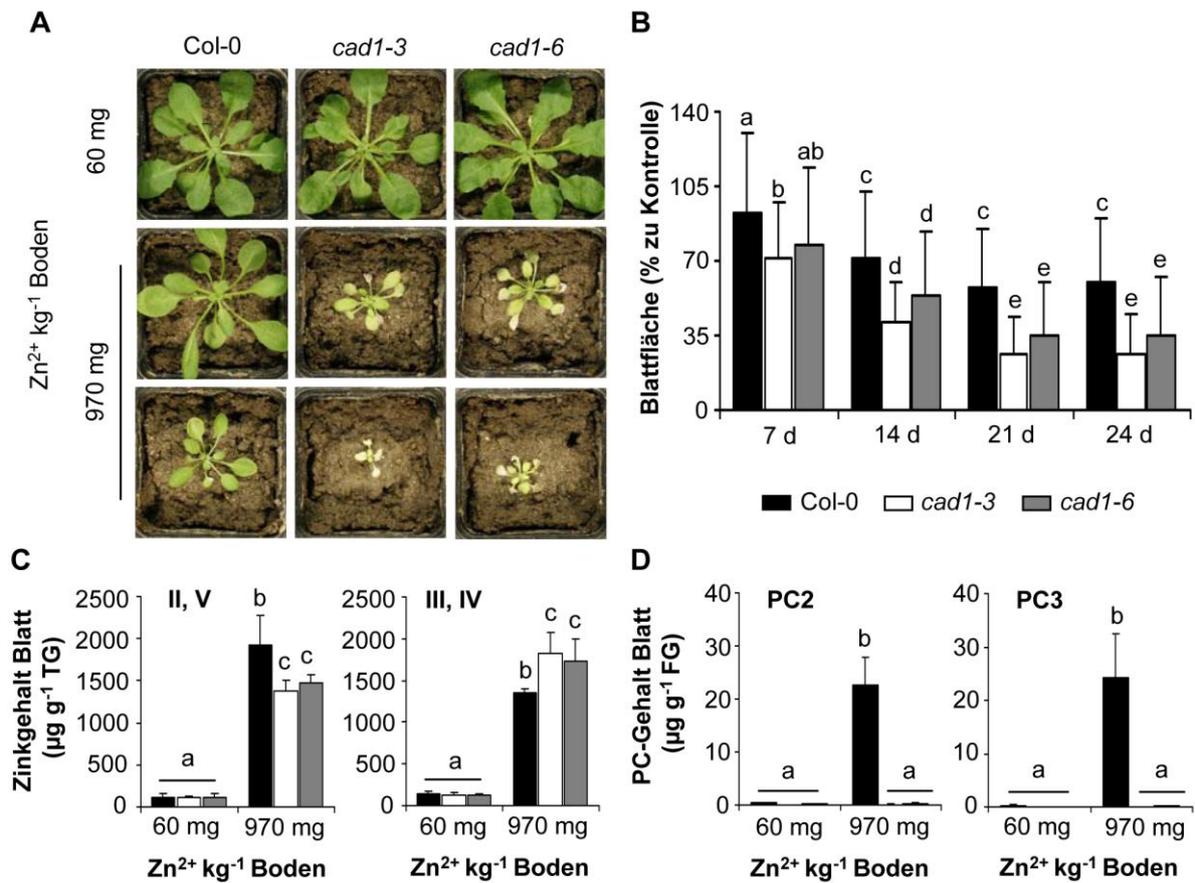


Abb. 13: *cad1* Mutanten zeigen auf zinkkontaminierter Erde einen ausgeprägten hypersensitiven Phänotyp sowie eine veränderte Metall- und PC-Akkumulation. Zehn Tage alte *A. thaliana* Keimlinge des Wildtyps Col-0 und der *AtPCS1* Mutanten *cad1-3* und *cad1-6* wurden auf künstlich mit Zn kontaminierter Erde transferiert. (A) Repräsentative Bilder von Pflanzen nach 24-tägigem Wachstum auf Erde mit niedrigem (oben) oder hohem (unten) Zinkgehalt. (B) Verfolgung des Pflanzenwachstum durch Quantifizierung der Blattfläche von Einzelpflanzen (n=35-47) über die Dauer des Experimentes. Für die Bestimmung von Metall- und PC-Gehalten in Blättern wurden zwei Probenpools pro Linie und Bedingung gebildet. (C) Bestimmung der Zinkgehalte mittels ICP-OES. Gezeigt sind gegensätzliche Akkumulationsmuster zwischen Wildtyp und Mutanten aus jeweils zwei Sets an Experimenten (Experimentnummern in römischen Zahlen angegeben). (D) PC2- und PC3-Gehalte wurden mittels UPLC-ESI-QTOF-MS gemessen. Daten repräsentieren Mittelwerte ± Stdbw. aus 4 unabhängigen Experimenten (n=8). Statistische Auswertung erfolgte mittels Zwei-Wege ANOVA und Gruppierung der Daten mittels post-hoc Tukey-Test (p<0.05). Prozentwerte wurden vor statistischer Analyse mittels Arkussinusquadratwurzelfunktion transformiert.

Obwohl in allen unabhängigen Experimenten der gleiche Trend im Wachstum zu verzeichnen war, wurde für jeweils zwei der vier Experimente ein unterschiedliches Muster in der Zinkakkumulation im Blatt zwischen Wildtyp und *cad1* Mutanten beobachtet (Abb. 13C). Während unter Kontrollbedingungen kein signifikanter Unterschied im Zinkgehalt detektiert werden konnte, ergab sich in zwei Experimenten ein im Mittel um 27 % reduzierter Zinkgehalt in Blättern von *cad1-3* und *cad1-6* verglichen mit Col-0. In zwei weiteren Experimenten zeigte sich der genau umgekehrte Trend. Diese gegensätzlichen Akkumulationsmuster im Zinkgehalt konnten nicht mit den PC-Gehalten im Blatt korreliert werden. Während bei Zinküberschuss ein starker Anstieg an PCs im Wildtyp zu

messen war, konnte PC2 kaum und PC3 überhaupt nicht über dem Quantifizierungslimit in *cad1-3* und *cad1-6* detektiert werden (Abb. 13D).

Neben den Zinkgehalten im Blatt wurden auch die essentiellen Mikroelemente Cu, Fe und Mn analysiert (Tab. 14). Alle anderen Spurenelemente lagen unterhalb des Detektionslimits. Auch die Kupferwerte müssen mit Vorsicht betrachtet werden, da sie größtenteils unterhalb des Quantifizierungslimits lagen.

Tab. 14: Erweitertes Metallprofil essentieller Elemente in Blättern von Pflanzen, die auf Erde mit niedrigem bzw. hohem Zinkgehalt angezogen wurden. Angegeben sind die Metallgehalte in Blättern des Wildtyps bzw. der *AtPCS1* Mutanten *cad1-3* und *cad1-6*, die mittels ICP-OES nach 24-tägiger Anzucht auf Erde mit dem angegebenen Zinkgehalt bestimmt wurden (vgl. Abb. 13). Daten repräsentieren Mittelwerte ± Stdabw. von 4 unabhängigen Experimenten mit je 2 Probenpools pro Linie und Bedingung (n=8). Hierbei ist zu beachten, dass die Kupferwerte unterhalb des LLOQ (0.1 µg g⁻¹) lagen.

Linie	Metallgehalt im Blatt (µg g ⁻¹ TG)					
	60 mg Zn kg ⁻¹ Boden			970 mg Zn kg ⁻¹ Boden		
	Cu	Fe	Mn	Cu	Fe	Mn
Col-0	12.4 ± 2.7	863 ± 603	186 ± 49	16.4 ± 2.7	710 ± 273	616 ± 90
<i>cad1-3</i>	10.9 ± 1.5	645 ± 208	194 ± 66	20.3 ± 6.1	959 ± 311	615 ± 263
<i>cad1-6</i>	13.9 ± 7.6	632 ± 275	201 ± 66	20.3 ± 4.9	971 ± 496	647 ± 242

Für die anderen Metalle konnten weder unter Kontrollbedingungen noch auf kontaminierter Erde Unterschiede zwischen Wildtyp und *cad1* Mutanten festgestellt werden. Zwar schienen *AtPCS1* Mutanten bei Zinküberschuss im Boden mehr Cu in den Blättern zu akkumulieren, allerdings lagen diese Werte unterhalb des Quantifizierungslimits, so dass nur unter Vorbehalt von einer Tendenz gesprochen werden kann. Des Weiteren waren insbesondere für Fe und Mn die Standardabweichungen zu groß, um Unterschiede zwischen den Linien detektieren zu können. Zu beobachten waren nur deutlich höhere Gehalte aller drei Metalle in Blättern von Pflanzen, die auf zinkkontaminierter Erde gewachsen waren.

In der zinkhyperakkumulierenden Spezies und nahen Verwandten *A. halleri* konnte durch Speziierungsanalysen gezeigt werden, dass bei einem Wegfall von Nicotianamin als Hauptligand für Zn eine Verschiebung hin zu Thiolliganden stattfindet [119]. Aus diesem Grund wurden die Blattextrakte der auf zinkkontaminierten Erde angezogenen Pflanzen auf ihren NA-Gehalt untersucht (Abb. 14). Dies diente der Überprüfung, ob in *A. thaliana* umgekehrt bei Abwesenheit von Phytochelatinen vermehrt NA detektiert werden kann, woraus sich eine Erklärung für das gegensätzliche Muster in der Zinkakkumulation zwischen Wildtyp und *cad1* Mutanten ergeben könnte.

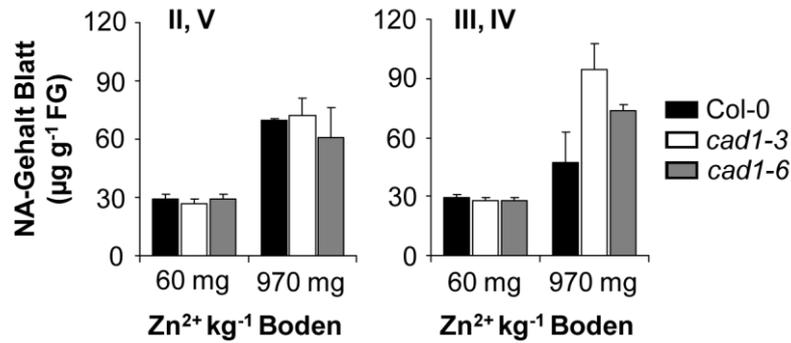


Abb. 14: Gegensätzliche Zinkakkumulationsmuster in Blättern von Pflanzen, die auf zinkkontaminierter Erde gewachsenen waren, gehen einher mit unterschiedlichen Nicotianamingehalten. Extrakte, die für PC-Derivatisierung verwendet wurden (vgl. Abb. 13D), wurden mittels Fmoc derivatisiert und anschließend mittels UPLC-ESI-QTOF-MS auf ihre NA-Gehalte untersucht. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Stdabw. von jeweils zwei unabhängigen Experimenten ($n=4$). Römische Zahlen geben die Experimentnummern an und korrespondieren mit Probenpools der Experimente aus Teilabbildung 13C.

Die Quantifizierung der NA-Gehalte ergab, dass bei Zinküberschuss in Blättern aus Experimenten II und V, bei welchen *AtPCS1* Mutanten eine reduzierte Zinkmenge aufwiesen, keine Unterschiede in der NA-Menge zwischen Wildtyp und *cad1* Mutanten auftraten. Hingegen waren im zweiten Set an Experimenten (III und IV), bei welchen *cad1* Mutanten einen erhöhten Zinkgehalt in Blättern zeigten, deutliche Unterschiede im NA-Gehalt zu detektieren. Während Col-0 eine um 30 % reduzierte NA-Menge im Vergleich zu Experimenten II und V enthielt, war in *cad1-3* ein um 20 % erhöhter NA-Gehalt verglichen mit dem anderen Experimentset zu beobachten. Demnach scheint dieser gegensätzliche Trend in der Zinkakkumulation mit einem veränderten NA-Gehalt zu korrelieren, welcher wahrscheinlich durch einen externen Reiz in diesen beiden Experimenten ausgelöst wurde.

Experimente auf kontaminierter Erde konnten somit eine Beteiligung von Phytochelatinen in der Detoxifizierung des essentiellen Schwermetalls Zn bestätigen, was durch artifizielle Testsysteme bereits angedeutet wurde. Ebenfalls aus Versuchen mit Agarplatten stammte die interessante Beobachtung, dass beide *AtPCS1* Mutanten eine unterschiedlich starke Ausprägung des hypersensitiven Phänotyps in Anwesenheit erhöhter Cadmiummengen aufwiesen. So zeigte *cad1-6*, welche eine verkürzte Variante der *AtPCS1* enthält, ein verbessertes Wachstum verglichen mit der Nullmutante *cad1-3*. Daher wurden die drei Linien auf Erde mit einem Cadmiumgehalt von $7.5 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{Boden}}$ angezogen (Abb. 15), um zu überprüfen, ob der Unterschied auch in diesem System reproduzierbar ist. Die Kontrollerde enthielt kein Cadmium oberhalb des Detektionslimits.

Auch auf cadmiumkontaminierter Erde konnten die Ergebnisse von Experimenten auf Agarplatten im Hoaglandmedium bestätigt werden. Während auf Kontrollerde wiederum kein unterschiedliches Wachstum der Linien verzeichnet werden konnte, war auf cadmiumkontaminierter

Erde ein deutlicher hypersensitiver Phänotyp für *cad1-3* zu beobachten, welcher durch eine starke Wachstumsreduktion und Chlorose der Blätter zu erkennen war (Abb. 15A).

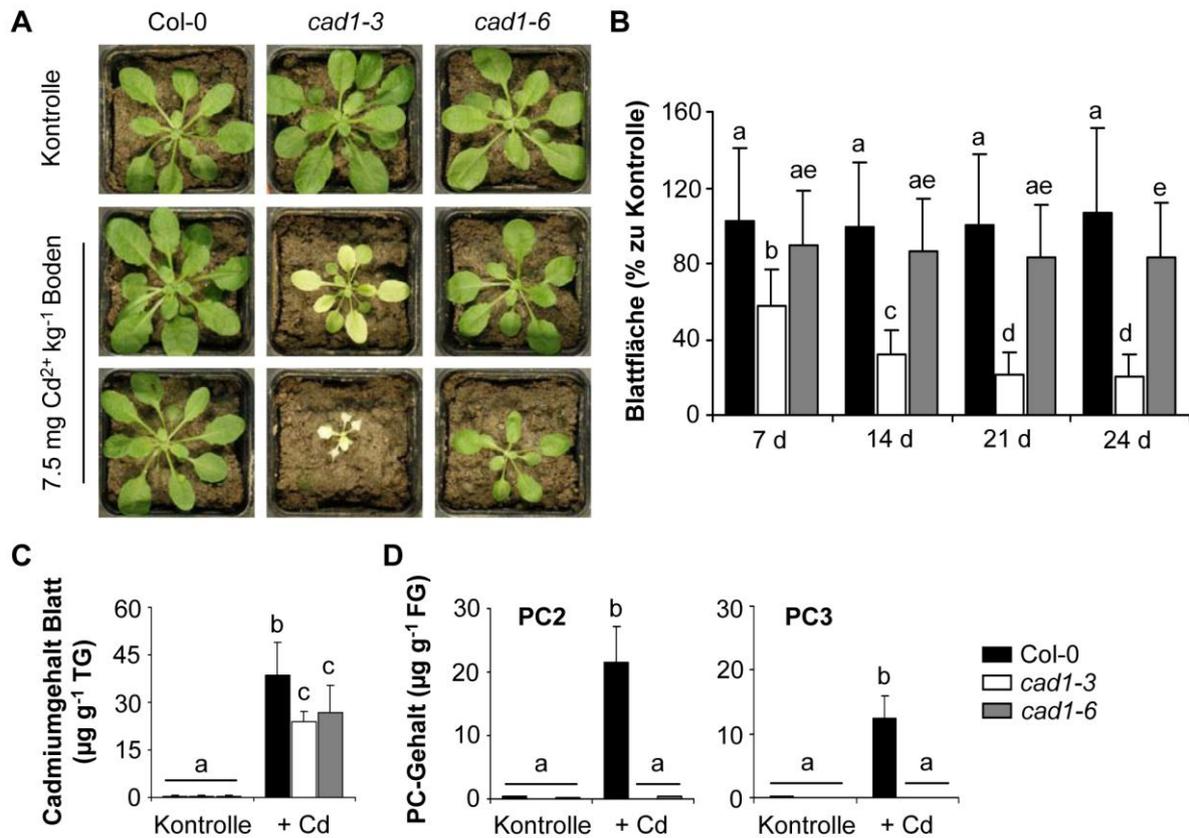


Abb. 15: Trotz schwächerer Ausprägung des cadmiumhypersensitiven Phänotyps enthält *cad1-6* im Spross ähnliche Metall- und PC-Mengen wie *cad1-3*. Zehn Tage alte *A. thaliana* Keimlinge des Wildtyps Col-0 und der *AtPCS1* Mutanten *cad1-3* und *cad1-6* wurden auf künstlich mit Cadmium kontaminierter Erde transferiert. (A) Repräsentative Bilder von Pflanzen nach 24-tägigem Wachstum auf Erde ohne zusätzliche Cadmiumzugabe (oben) oder 7.5 mg Cd kg⁻¹ Boden. (B) Pflanzenwachstum wurde durch Quantifizierung der Blattfläche von Einzelpflanzen (n=24-45) über die Dauer des Experimentes verfolgt. Für die Bestimmung von Metall- und PC-Gehalten in Blättern wurden zwei Probenpools pro Linie und Bedingung gebildet. (C) Bestimmung der Cadmiumgehalte mittels ICP-OES. (D) PC2- und PC3-Gehalte wurden mittels UPLC-ESI-QTOF-MS gemessen. Daten repräsentieren Mittelwerte ± Stdbw. aus 3 unabhängigen Experimenten (n=6). Statistische Auswertung erfolgte mittels Zwei-Wege ANOVA und Daten wurden anhand des Tukey 95 % Konfidenzintervalls gruppiert. Prozentwerte wurden vor statistischer Analyse mittels Arkussinusquadratwurzelfunktion transformiert.

In Zahlen ausgedrückt schlug sich dies in einer zum Kontrollwachstum um 80 % verringerten Blattfläche für *cad1-3* nach bereits 21 d nieder. Obwohl augenscheinlich nur schwer zu erkennen, war auch das Wachstum von *cad1-6* nach 21 d signifikant unterschiedlich zum Wildtyp. Allerdings war der hypersensitive Phänotyp, verglichen mit *cad1-3*, nur sehr schwach ausgeprägt mit einer Wachstumsreduktion von nur 18 % zur Kontrolle und keiner Chlorose der Blätter. Der Wildtyp Col-0 zeigte keinerlei verschlechtertes Wachstum relativ zu den Kontrollpflanzen, sondern sogar ein leicht verbessertes Wachstum nach 24 d auf kontaminierter Erde (Abb. 15B).

Ähnlich wie auf Agarplatten legen auch die Versuche auf kontaminierter Erde den Schluss nahe, dass die verkürzte Variante der AtPCS1 in *cad1-6* noch teilweise durch Cd aktivierbar sein muss, da diese Mutante bereits nach 7 d bis zum Experimentende ein signifikant besseres Wachstum ($p < 0.001$) als *cad1-3* aufwies. Der Unterschied zum Wildtyp wurde dagegen erst nach 24 d signifikant ($p = 0.008$). Obwohl *cad1-6* phänotypisch dem Wildtyp glich, wurden in Blättern ähnliche Metall- und PC-Gehalte wie in *cad1-3* detektiert (Abb. 15C, D). So enthielten *cad1-3* und *cad1-6* 38 % bzw. 31 % weniger Cd in Blättern als Col-0, während unter Kontrollbedingungen in allen drei Linien nur ähnlich geringe Mengen an Cd gefunden werden konnten. Analog zu Experimenten auf zinkkontaminierter Erde war nur für den Wildtyp ein deutlicher Anstieg der PC2- und PC3-Gehalte bei erhöhter Cadmiummenge im Boden festzustellen. Während in *cad1-6* zwar sehr geringe aber quantifizierbare PC2-Mengen in Kontroll- und cadmiumbehandelten Pflanzen auftraten, konnte in *cad1-3* kein PC2 oberhalb des Quantifizierungslimits (LLOQ, $S/N > 10$) gefunden werden. PC3 war in beiden *cad1* Mutanten nicht oberhalb des Detektionslimits (LLOD, $S/N > 3$) nachzuweisen.

Anders als bei Experimenten mit zinkkontaminierter Erde konnten bezüglich der anderen essentiellen Metalle keine Unterschiede zwischen Wildtyp und den *cad1* Mutanten festgestellt werden (Tab. 15).

Tab. 15: Erweitertes Metallprofil essentieller Elemente in Blättern von Pflanzen, die auf cadmium-kontaminierter bzw. Kontrollerde angezogen wurden. Angegeben sind die Metallgehalte in Blättern des *A. thaliana* Wildtyps bzw. der AtPCS1 Mutanten *cad1-3* und *cad1-6*, die mittels ICP-OES nach 24-tägiger Anzucht auf Erde mit dem angegebenen Cadmiumgehalt bestimmt wurden (vgl. Abb. 15). Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Stdabw. von 3 unabhängigen Experimenten mit je 2 Probenpools pro Linie und Bedingung ($n=6$). Hierbei ist zu beachten, dass die Cu- und Molybdänwerte unterhalb des LLOQ ($0.1 \mu\text{g g}^{-1}$) lagen.

Element	Metallgehalt im Blatt ($\mu\text{g g}^{-1}$ TG)					
	Kontrolle			7.5 mg Cd kg^{-1} Boden		
	Col-0	<i>cad1-3</i>	<i>cad1-6</i>	Col-0	<i>cad1-3</i>	<i>cad1-6</i>
Zn	68 \pm 7	77 \pm 11	73 \pm 7	80 \pm 13	68 \pm 16	77 \pm 14
Fe	516 \pm 265	526 \pm 165	490 \pm 101	478 \pm 186	652 \pm 116	532 \pm 194
Cu	10.4 \pm 1.8	10.1 \pm 1.5	10.1 \pm 1.2	11.1 \pm 2.8	11.1 \pm 0.3	10.6 \pm 2.3
Mn	179 \pm 53	175 \pm 50	183 \pm 60	191 \pm 52	158 \pm 27	166 \pm 39
Mo	10.0 \pm 1.3	9.2 \pm 0.4	9.8 \pm 1.5	9.7 \pm 1.5	5.7 \pm 1.0	7.4 \pm 0.9

Zwar war die Tendenz zu erkennen, dass beide Mutanten weniger Mo in Blättern cadmiumbelasteter Pflanzen akkumulierten als der Wildtyp, allerdings lagen diese Werte unterhalb des Quantifizierungslimits, so dass keine verlässliche Aussage getroffen werden konnte. Auch der vorher beobachtete Unterschied in der verringerten Zinkakkumulation der *cad1* Mutanten konnte auf dieser Erde nicht bestätigt werden.

3.1.3 PC-Bildung in *cad1-6*

Da die phänotypische Ausprägung der *cad1-6* Mutante auf cadmiumkontaminierten Erde dem Wildtyp Col-0 glich, war es überraschend, dass in Blättern, ähnlich zur Nullmutante *cad1-3*, kaum PCs detektiert werden konnten. Der jedoch deutliche Wachstumsunterschied zur *cad1-3* Mutante legte den Schluss nahe, dass die verkürzte Variante der *AtPCS1* in *cad1-6* zumindest noch teilweise durch Cd aktivierbar sein muss. Da aus den vorangegangenen Erdexperimenten nur Informationen über die PC-Gehalte in Blättern gewonnen werden konnten, wurden Pflanzen nach mehrwöchiger Anzucht in Flüssigkultur für drei Tage 0.5 μM oder 5 μM CdCl_2 ausgesetzt und neben dem Spross auch die Wurzeln auf ihre PC-Gehalte untersucht (Abb. 16).

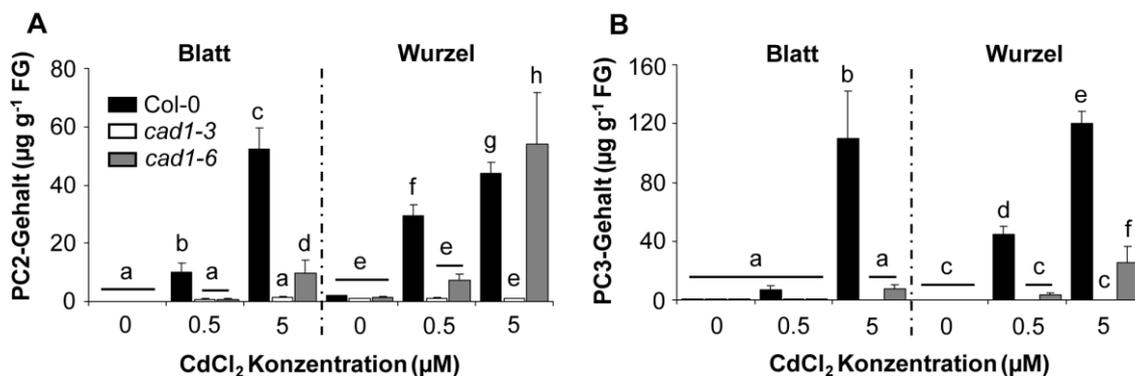


Abb. 16: Verminderte Bildung von langkettigen PCs und geringe PC-Akkumulation in Blättern von *cad1-6*. Der *A. thaliana* Wildtyp Col-0 sowie die *AtPCS1* Mutanten *cad1-3* und *cad1-6* wurden hydroponisch in modifiziertem 1/10 Hoaglandmedium für 6 ½ Wochen angezogen. Blatt- und Wurzelmaterial von je drei Pflanzen wurde nach 3-tägiger Exposition mit 0.5 μM oder 5 μM CdCl_2 gepoolt. Den zugehörigen Kontrollen wurde kein Cd zugesetzt. PC2- (A) und PC3-Gehalte (B) aus mBrb-derivatisierten Extrakten wurden mittels UPLC-ESI-QTOF-MS untersucht. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Stdabw. von 2 unabhängigen Experimenten mit insgesamt 6 Proben pro Linie und Bedingung. Daten wurden mittels Zwei-Wege ANOVA statistisch ausgewertet und anhand des Tukey 95 % Konfidenzintervalls gruppiert. Werte von Col-0 und *cad1-3* sind in Verbindung mit anderen Pflanzenlinien auch in Abb. 27 dargestellt.

Wie erwartet und zuvor in Erdexperimenten beobachtet, konnten keine PCs oberhalb des LLOQ ($S/N > 10$) in den Kontrollen detektiert werden. Nur in Wurzeln wurden sehr geringe aber quantifizierbare Mengen an PC2 in allen Linien gefunden, welche sich aber nicht signifikant unterschieden. Ebenfalls analog zu den Erdexperimenten war im Wildtyp ein starker Anstieg der PC-Mengen sowohl in Blättern als auch in Wurzeln bei erhöhten Cadmiumkonzentrationen im Medium festzustellen. Bei einer Konzentration von 0.5 μM war hierbei festzustellen, dass 3-fach bzw. 6-fach höhere PC2- bzw. PC3-Gehalte in Wurzeln, verglichen mit Blättern, zu finden waren. Bei einer Erhöhung der externen Cadmiumkonzentration glichen sich die PC-Level in Blättern und Wurzeln an. In *cad1-3* konnte zwar bei Cadmiumüberschuss PC2 in Wurzel und Blatt nachgewiesen werden, allerdings wurde kein Anstieg mit steigender Schwermetallzugabe beobachtet. Blätter der T-DNA Insertionslinie *cad1-6* enthielten beim niedrigeren externen Cadmiumlevel gleiche PC2- und PC3-

Mengen wie die Punktmutante *cad1-3*, wobei PC3 unterhalb des LLOQ lag. Ein deutlicher Anstieg der PC-Gehalte im Blatt konnte erst bei höherer Cadmiumbelastung im Medium von 5 μM verzeichnet werden. Für PC2 war dieser Unterschied signifikant zu 0.5 μM Cd, für PC3 wurde dieser Unterschied statistisch zwar als nicht signifikant getestet, lag aber deutlich oberhalb des LLOQ. Die Analyse der Wurzelproben ergab, dass in *cad1-6* eine deutlich höhere PC2-Bildung als in *cad1-3* stattfand. So lag die PC2-Menge bei 0.5 μM Cd 6.6-fach höher, bei 5 μM Cd sogar 61-fach höher als in der *cad1-3* Mutante. Bemerkenswert ist, dass bei höherer Cadmiumkonzentration im Medium *cad1-6* in Wurzeln sogar mehr PC2 als der Wildtyp aufwies, was jedoch nicht wie im Wildtyp zu einer gleichmäßigen PC-Akkumulation im Spross führte. Die niedrigen PC-Gehalte im Blatt decken sich mit den Messungen der Blattproben von Pflanzen, die auf kontaminierter Erde wuchsen (vgl. Abb. 15D). Weiterhin war auffällig, dass zwar hohe Mengen an kurzkettigem PC2 in Wurzeln gebildet wurde, die Synthese langkettiger PCs in *cad1-6* aber inhibiert zu sein schien. Dies deutet darauf hin, dass die verkürzte PCS-Variante noch zur cadmiuminduzierten Synthese kurzkettiger PCs fähig ist, wodurch ein gewisses Maß an Toleranz vermittelt wird, die Wildtypsituation aber nicht erreicht werden kann.

3.1.4 Eingrenzung kritischer Aminosäuren für die Aktivierung durch unterschiedliche Metalle

Wie eingangs erwähnt, wird der N-terminale Bereich der AtPCS1 als katalytische Domäne angesehen, während dem C-Terminus die Metallerkennung zugesprochen wird [167,200,229]. Die Beobachtung von Tennstedt *et al.* [228], dass die verkürzte AtPCS1-Variante in *cad1-6* noch durch Cd aktivierbar ist, die Zinkerkennung jedoch verloren zu haben scheint, konnte durch Experimente auf kontaminierter Erde und in Flüssigkultur (vgl. Abb. 13, 15, 16) bestätigt werden. Im Rahmen der Masterarbeit von Benjamin Käsdorf (Lehrstuhl Pflanzenphysiologie, 2012) wurde die AtPCS1 am C-Terminus nach den Aminosäuren 372 und 459 verkürzt. Die anschließende Expression dieser Proteinvarianten in *S. pombe* und die Untersuchung ihrer Fähigkeit, den cadmium- bzw. zinkhypersensitiven Phänotyp der Δpcs bzw. $\Delta zhf \Delta pcs$ Mutanten zu komplementieren (vgl. Abb. 17), sollte die Eingrenzung der für die Metallerkennung kritischen Aminosäuren ermöglichen.

Die Expression der beiden verkürzten PCS-Varianten führte bei Zinkbelastung zu Teilungsraten der *S. pombe* $\Delta zhf \Delta pcs$ Mutante, die der von Zellen, welche den leeren Vektor tragen, vergleichbar waren (Abb. 17A). Demnach konnten beide Proteinvarianten nicht zur Rettung des zinkhypersensitiven Phänotyps dieser Mutante beitragen, was auf eine Position der Zinkaktivierungsstelle nach Aminosäure 459 in der AtPCS1 hinweist. Hingegen ergab die Anwesenheit der beiden verkürzten Proteine in Δpcs Zellen einen signifikanten Unterschied zur leeren Vektorkontrolle bei Cadmiumzugabe. Zwar vermittelte weder die AtPCS1- $\Delta 372$ noch die AtPCS1- $\Delta 459$ ein Wachstum, das dem der Kontrollen vergleichbar war, wie es für das Volllänge-Protein der Fall war, jedoch konnte ein

Toleranzgewinn gegenüber Cd verzeichnet werden (Abb. 17B). Dies deutet auf einen Bereich für die Cadmiumaktivierung vor Aminosäure 372 hin.

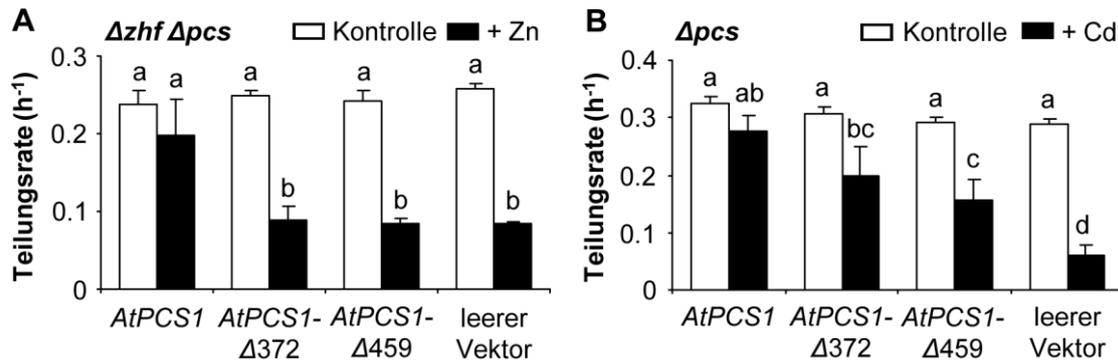


Abb. 17: Eingrenzung kritischer Aminosäurereste für Zn- und Cadmiumaktivierung der AtPCS1 mittels Expression verkürzter AtPCS1-Varianten in *S. pombe*. *S. pombe* Stämme $\Delta zhf \Delta pcs$ (A) und Δpcs (B), welche entweder die Volllänge-AtPCS1 exprimieren oder eine nach Aminosäure 372 bzw. 459 verkürzte Proteinvariante, wurden in Anwesenheit von 100 μM ZnCl_2 (A) oder 3 μM CdCl_2 (B) kultiviert. Den Kontrollen wurden keine zusätzlichen Schwermetallionen zugesetzt. Zellen wurden in EMM mit 100 nM Thiamin bei einer anfänglichen OD_{600} von 0.05 in 96-well Platten angeimpft. Das Wachstum wurde anhand von OD_{600} -Messung in 15 min Intervallen über 24 h verfolgt. Teilungsraten wurden in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Daten entsprechen Mittelwerten \pm Stdabw. von 3 (A) oder 5 (B) unabhängigen Experimenten mit drei technischen Replikaten pro Stamm und Behandlung. Statistische Auswertung erfolgte mit Zwei-Wege ANOVA und post-hoc Tukey-Test ($p < 0.05$). Daten wurden im Rahmen der Masterarbeit von Benjamin Käs Dorf am Lehrstuhl Pflanzenphysiologie (2012) erhoben und für diese Abbildung neu ausgewertet.

3.1.5 Die Rolle der PCS in der generellen Zinkhomöostase

Die bisher erhaltenen Daten zeigen, dass PCs eine Rolle in der Detoxifizierung bei Zinküberschuss spielen. Allerdings sind unter natürlichen Bedingungen die zinkkontaminierten Standorte regional sehr begrenzt, zumeist auf industrielle Regionen beschränkt, und eher Böden mit moderaten bzw. nur sehr geringen Zinkmengen zu finden. Da PCS in allen höheren Pflanzen ubiquitär verbreitet und wie bereits erwähnt konstitutiv exprimiert sind, stellt sich die Frage, ob PCs nicht nur eine Rolle in der Detoxifizierung sondern auch in der generellen Zinkhomöostase von Pflanzen spielen. Hierzu wurden Col-0 und beide *cad1* Mutanten auf Substraterde mit einem leicht sauren pH von 5.7 angezogen, bei dem eine gute Verfügbarkeit aller essentiellen Mikroelemente vorliegt, und die Metallgehalte analysiert. Die extrahierbaren und verfügbaren Metallgehalte dieses Erdtyps sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tab. 16: Schwermetallgehalte der Substraterde mit Standard pH 5.7. Extrahierbare und austauschbare Mengen an Mikroelementen wurden nach Extraktion des Bodens mit HCl, DTPA oder CaCl₂ mittels ICP-OES bestimmt. (n.q. nicht quantifizierbar; n.d. nicht detektierbar; * LLOD = 0.01 mg kg⁻¹_{Boden}; ** LLOQ = 0.1 mg kg⁻¹_{Boden})

Extraktions- methode	Metallgehalt im Boden (mg kg ⁻¹ TG)						
	Zn	Fe	Cu	Mn	Ni	Co	Cd
HCl	30 ± 7	34 ± 18	n.d.*	120 ± 6	n.q.**	n.q.**	n.d.*
DTPA	32 ± 6	137 ± 35	n.q.**	122 ± 55	n.d.*	n.q.**	n.d.*
CaCl ₂	0.8 ± 0.3	1.2 ± 0.5	n.d.*	16 ± 8	n.d.*	n.d.*	n.d.*

Nach mehrwöchigem Wachstum auf Substraterde mit einem moderaten Zinkangebot von ca. 30 mg Zn kg⁻¹_{Boden} (aus HCl- und DTPA-Extrakten) war phänotypisch kein unterschiedliches Wachstum zwischen den Linien zu beobachten (Abb.18).

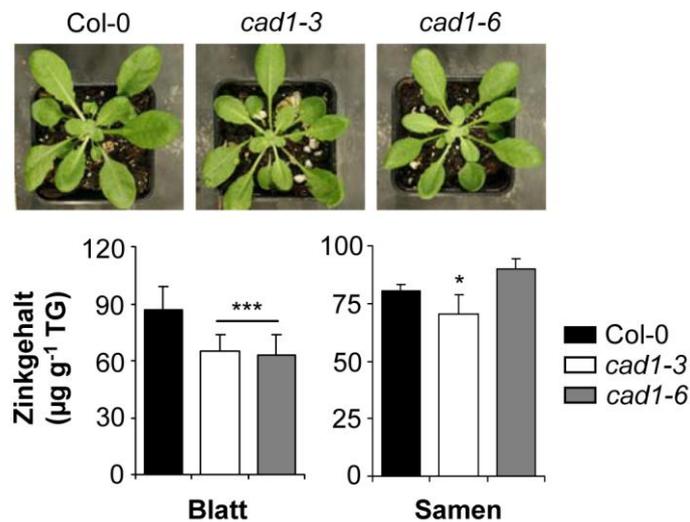


Abb. 18: PCS spielt eine Rolle in der generellen Zinkhomöostase. *A. thaliana* *AtPCS1* Mutanten *cad1-3* und *cad1-6* weisen einen ähnlichen Phänotyp wie der Wildtyp Col-0 auf Substraterde mit Standard pH 5.7 auf, bei welchem eine ausreichende Metallverfügbarkeit vorliegt. Metallgehalte in Blättern von 7 Wochen alten Pflanzen bzw. in reifen Samen wurden mittels ICP-OES bestimmt. Daten repräsentieren Mittelwerte ± Stdabw. (n=10-21) und wurden mittels Ein-Wege ANOVA und post-hoc Tukey-Test statistisch ausgewertet. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp sind mit Sternchen gekennzeichnet (*, p<0.05; ***, p<0.001).

Wiederum konnte in beiden *AtPCS1* Mutanten eine um 25 % reduzierte Zinkakkumulation in Blättern, verglichen mit dem Wildtyp, bestimmt werden. Auch in reifen Samen der *cad1-3* Mutante wurde ein um 12 % signifikant reduzierter Zinkgehalt, bezogen auf Col-0 detektiert. Interessanterweise wurde in *cad1-6* keine signifikant unterschiedliche Zinkmenge zum Wildtyp festgestellt, wobei ihre Samen tendenziell sogar mehr Zn enthielten. Zudem konnte in Blättern von *cad1-3* und *cad1-6* ein um ca. 15 % reduzierter Mangangehalt detektiert werden. Dieser Unterschied war ebenfalls signifikant (p=0.011 bzw. p<0.001). In Samen hingegen konnte der gleiche Trend wie für Zn beobachtet werden, d.h. ein leicht reduzierter Manganwert in *cad1-3* und ein etwas höherer

Gehalt in *cad1-6* relativ zum Wildtyp. Allerdings waren diese Unterschiede nicht signifikant. Für die anderen Metalle konnten keine unterschiedlichen Akkumulationsmuster festgestellt werden.

3.1.6 Die Rolle der PCS bei Zinkdefizienz

Da sich ein Hinweis für einen Beitrag von PCs zur Detoxifizierung und zur generellen Zinkhomöostase bei ausreichender Zinkversorgung ergab, lag die Frage nahe, ob Pflanzen, die eine Mutation in *AtPCS1* tragen, benachteiligt sind, wenn die verfügbare Zinkmenge limitiert ist. Um dieser Frage nachzugehen wurde der pH im Substratboden mit Calciumoxid von leicht sauren zu alkalischen Bedingungen auf einen Wert von pH 8.0 angehoben (Abb. 19), wodurch die Verfügbarkeit von Mikroelementen, mit Ausnahme von Mn, sinkt. Durch die Anhebung des pH-Wertes wurde die Verfügbarkeit von Zn auf einen Wert von $5.8 \text{ mg Zn kg}^{-1}_{\text{Boden}}$ (extrahierbare Zinkmenge mittels HCl-Methode) bzw. $0.5 \text{ mg Zn kg}^{-1}_{\text{Boden}}$ (CaCl₂-Methode) gesenkt.

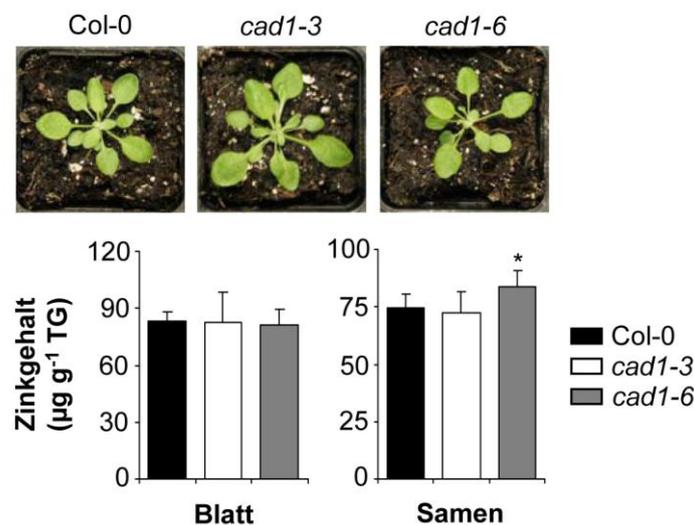


Abb. 19: Gleiche Zinkakkumulation in Wildtyp und *cad1* Mutanten bei limitierter Zinkversorgung. Kein Wachstumsunterschied zwischen *A. thaliana* Wildtyp Col-0 und *cad1* Mutanten nach 9-wöchigem Wachstum auf Substraterde mit alkalischen pH 8.0, welcher limitierte Metallverfügbarkeit aufweist. Metallgehalte in Blättern von 9 Wochen alten Pflanzen bzw. reifen Samen wurden mittels ICP-OES bestimmt. Daten entsprechen Mittelwerten \pm Stdabw. (n=6-12) und wurden mit Ein-Wege ANOVA und anschließendem Tukey-Test statistisch ausgewertet. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp sind mit Sternchen kenntlich gemacht (*, $p < 0.05$).

Interessanterweise enthielten Blätter von Pflanzen, die auf Erde mit einem limitierten Zinkangebot angezogen wurden, gleiche Mengen an Zn, egal ob es sich um Wildtyp oder *AtPCS1* Mutanten handelte. Auch der Unterschied im Zinkgehalt in Samen von Col-0 und *cad1-3*, der bei pH 5.7 beobachtet wurde, blieb aus. Die Tendenz, dass *cad1-6* in Samen einen höheren Zinkgehalt als der Wildtyp aufwies, war nach Wachstum auf alkalischer Erde statistisch signifikant. Im Fall von Mn konnte die gleiche Veränderung beobachtet werden, d.h. die unterschiedlichen Blattgehalte zwischen Wildtyp und *cad1* Mutanten waren nicht mehr festzustellen, während signifikant mehr Mn

in Samen von *cad1-6* verglichen mit den anderen Linien zu finden war. Weiterhin konnten, wie auch auf normaler Substraterde, keine Unterschiede bei den anderen Metallgehalten gefunden werden.

Auch auf diesem Bodentyp konnte kein deutlicher phänotypischer Unterschied zwischen Col-0 und *cad1* Mutanten beobachtet werden. Allerdings entstand der Eindruck, dass *cad1-3*, verglichen mit Col-0, auf Erde mit pH 8.0 ein leicht verbessertes Wachstum aufwies. Aus diesem Grund wurde das Wachstum beider Linien über mehrere Wochen durch Messung der Blattfläche verfolgt (Abb. 20).

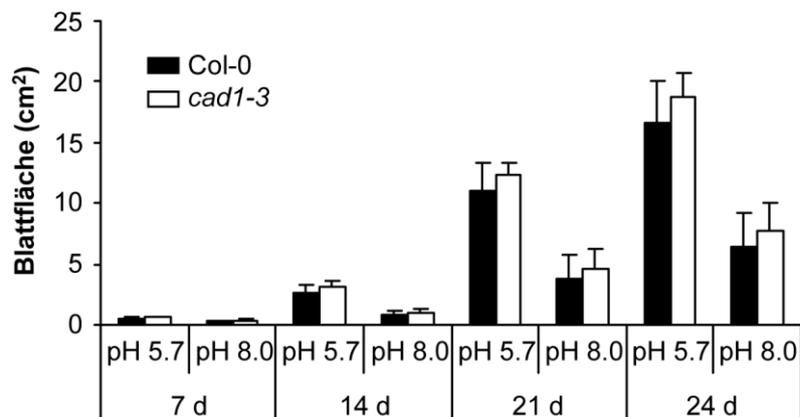


Abb. 20: Kein Wachstumsunterschied zwischen Wildtyp und *cad1-3* Mutante bei ausreichender oder limitierter Metallverfügbarkeit. Zehn Tage alte *A. thaliana* Keimlinge des Wildtyps Col-0 und der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* wurden auf Substraterde mit pH 5.7 bzw. pH 8.0 transferiert, welche eine ausreichende bzw. limitierte Zinkverfügbarkeit aufweist. Das Pflanzenwachstum wurde über den Experimentverlauf wöchentlich anhand der Quantifizierung der Blattfläche verfolgt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Stdabw. aus einem Experiment mit 8-10 Individuen pro Linie und Bedingung.

Nach dreiwöchigem Wachstum auf alkalischer Erde zeigten sowohl der Wildtyp als auch die *cad1-3* Mutante ein um 60 % reduziertes Wachstum, verglichen mit normaler Erde. Bei beiden pH-Werten, die für ausreichende bzw. limitierte Metallverfügbarkeit stehen, konnte tendenziell ein leicht verbessertes Wachstum der *cad1-3* Mutante gegenüber dem Wildtyp beobachtet werden, wobei dieser Unterschied jedoch statistisch nicht signifikant war ($p=0.238$ bzw. $p=0.317$ nach 24 d).

Die bisherigen Ergebnisse ergaben keinen Hinweis auf eine mögliche Rolle von PCs in der Antwort auf Zinkdefizienz. Dennoch bleibt die Frage offen, ob in *cad1* Mutanten durch fehlende Bindungsstellen in der Zelle weniger Zinkaufnahme stattfindet, woraus bei limitierter Zinkverfügbarkeit ein schnellerer Eintritt in die Zinkdefizienz resultiert. Des Weiteren konnte mit Experimenten auf alkalischer Erde nur die Antwort der Pflanzen bei einer generellen Limitierung der Mikroelementverfügbarkeit untersucht werden, da bei erhöhtem pH außer Mn alle essentiellen Mikroelemente gleichmäßig eingeschränkt verfügbar sind. Aus diesem Grund erfolgte eine Anzucht von Col-0 und *cad1-3* in Flüssigkultur, wobei die Pflanzen nach dem Erreichen einer ausreichend hohen Biomasse in zinkfreies Medium transferiert wurden. Nach 2, 4, 7 und 14 d wurde Wurzel- und Blattmaterial für spätere Transkriptanalysen geerntet. Als Indikator für einen zinkdefizienten Status

der Pflanzen wurde das Transkriptlevel der Gene *ZIP9* (At4g33020) und *NAS2* (At5g56080) als molekulare Markergene [98] untersucht. Zunächst wurden Wurzelproben nach 7 d in zinkfreiem Medium untersucht (Abb. 21).

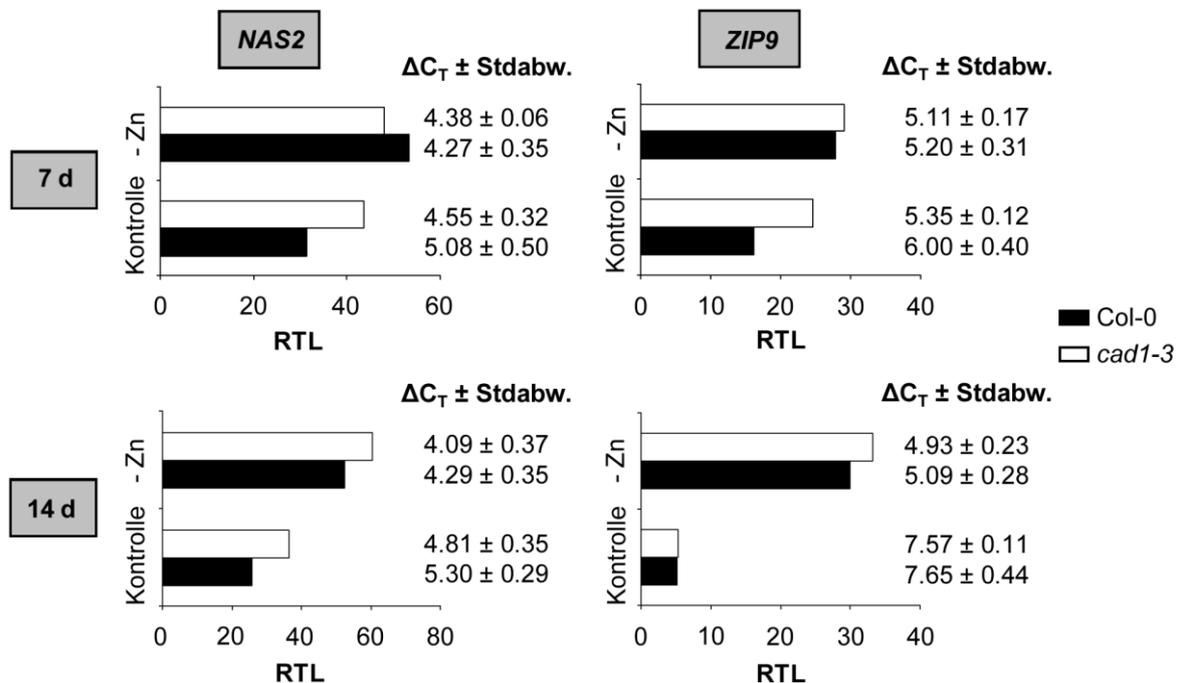


Abb. 21: Stärke der Zinkdefizienz bleibt unbeeinflusst durch "Knock-out" der *AtPCS1*. Pflanzen des *A. thaliana* Wildtyps Col-0 und der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* wurden für 5 ½ Wochen in flüssigem 1/10 Hoaglandmedium mit allen Mikroelementen angezogen bevor sie in zinkfreies Medium umgesetzt wurden. Wurzeln wurden vor dem Transfer mit 10 mM CaCl₂ gewaschen um apoplastisches Zn²⁺ zu entfernen. Nach weiteren 7 d bzw. 14 d Wachstum wurden Pflanzen gepoolt und Wurzelproben auf das Transkriptlevel der molekularen Markergene für Zinkdefizienz *NAS2* und *ZIP9* mittels quantitativer real-time PCR analysiert. Daten entsprechen Mittelwerten ± Stdabw. von einem Experiment mit 3 biologischen Replikaten. Als Referenzgen diente der *Elongationsfaktor 1α*. Alle Proben wurden in 3 technischen Replikaten gemessen.

Nach 7 d in zinkfreiem Medium trat kein Unterschied zu den Kontrollen im Transkriptlevel beider Markergene auf. Zudem wurden keine unterschiedlichen Transkriptmengen zwischen beiden Linien gefunden. Da die Pflanzen noch nicht zinkdefizient waren, erfolgte zusätzlich die Analyse der Wurzelproben nach 14-tägigem Wachstum in zinkfreiem Medium. Für diesen Zeitpunkt wurden in Wurzeln aus zinkfreiem Medium 2-fach höhere Transkriptmengen für *NAS2* und 6-fach höhere Mengen für *ZIP9*, verglichen mit den Kontrollen, gefunden. Demnach waren die Pflanzen nach 14 d in Abwesenheit externer Zinkmengen zinkdefizient. Allerdings ergaben sich keine Unterschiede zwischen *cad1-3* und Col-0. Somit konnte kein Hinweis darauf gefunden werden, dass PCs einen Beitrag zur Antwort auf Zinkdefizienz in *A. thaliana* leisten.

3.1.7 Langstreckentransport bei induzierter Seneszenz

In der Literatur finden sich Hinweise, dass Phytochelatine am Langstreckentransport von Schwermetallionen innerhalb der Pflanze beteiligt sind [265–267]. Pflanzen, die keine oder nur eingeschränkt PCs bilden, welche als Metallliganden dienen, könnten daher beim Übergang der Blätter in Seneszenz in der Mobilisierung und dem anschließenden Transport der wertvollen Mikroelemente in gesunde Pflanzenteile eingeschränkt sein. Um dieser Möglichkeit Rechnung zu tragen, wurden einzelne Blätter adulter Pflanzen in der vegetativen Phase in Alufolie eingewickelt, um Seneszenz zu induzieren [268]. Nach 7-tägiger Abdunkelung wurden diese seneszenten Blätter von Einzelpflanzen geerntet und ein Metallprofil erstellt. Grüne Blätter der gleichen Pflanzen wurden ebenfalls als Kontrolle untersucht. Erstaunlicherweise wurde in einem ersten Vorversuch festgestellt, dass senescente Blätter sogar mehr Mikroelemente, darunter Zn, Cu, Mn, Mo und Co enthielten als die entsprechenden grünen Pflanzenteile. Des Weiteren waren in Blättern der *cad1* Mutanten nur für Zn und Mn niedrigere Metallgehalte als im Wildtyp zu finden, wobei das Verhältnis zwischen den Linien in grünen und seneszenten Blättern aber gleich blieb. Da in diesem ersten Test hauptsächlich ältere, große Blätter in Alufolie gewickelt wurden, sich aber alte und junge Blätter in ihren Metallgehalten unterscheiden können, wurde in einem zweiten Experiment jeweils die Hälfte der Blattrosette, also junge und alte Blätter gleichermaßen, abgedunkelt. Zudem wurden Blätter nach sieben und zusätzlich nach neun Tagen in Dunkelheit geerntet, da gerade für jüngere Blätter eine 7-tägige Abdunkelung nicht ausreichte, um vollständige Seneszenz zu induzieren. In Abbildung 22 sind die erhaltenen Metallgehalte für Zn und Mn dargestellt.

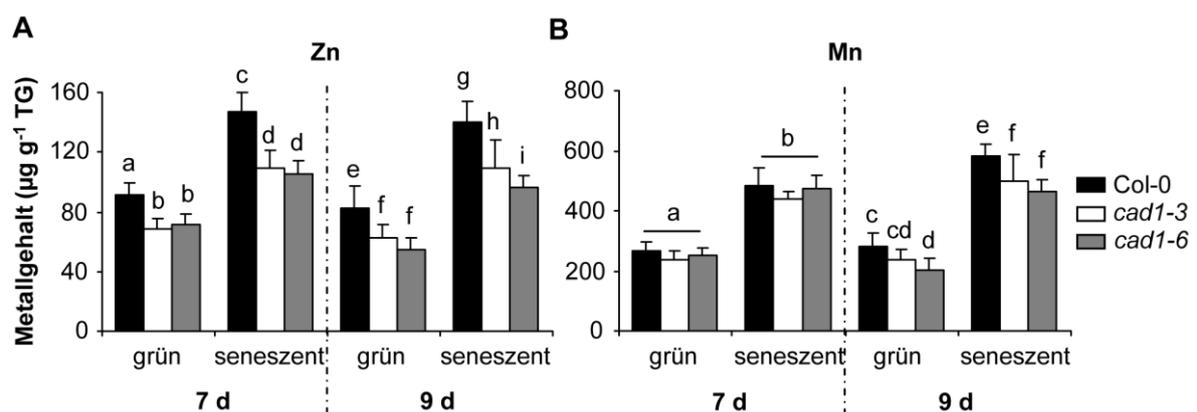


Abb. 22: Metallgehalte nach Seneszenzinduktion auf Substraterde mit ausreichender Mikroelementverfügbarkeit. Pflanzen des *A. thaliana* Wildtyps Col-0 sowie der *AtPCS1* Mutanten *cad1-3* und *cad1-6* wurden für 5 Wochen auf Substraterde mit pH 5.7 unter Kurztagbedingungen angezogen. Zur Induktion von Seneszenz wurde die Hälfte der Blattrosette in Alufolie eingewickelt und weiter kultiviert. Nach 7- bzw. 9-tägiger Abdunkelung wurden grüne und senescente Blätter getrennt mittels ICP-OES auf ihre (A) Zn- und (B) Mangangehalte untersucht. Daten repräsentieren Mittelwerte ± Stdabw. einer Anzucht (n=10-12). Statistische Analyse der Daten erfolgte mittels Zwei-Wege ANOVA und Gruppierung der Werte anhand des post-hoc Tukey-Tests (p<0.05).

Für Fe konnten, verglichen mit grünen Blättern, erwartungsgemäß niedrigere Werte in seneszenten Blättern gefunden werden, wobei aber keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten detektiert wurden. Wie im ersten Versuch enthielten seneszente Blätter leicht höhere Mo- und Kupfergehalte als grüne Blätter, aber auch hier waren die Gehalte gleich in den untersuchten Pflanzenlinien. Wie bereits auf Substraterde beobachtet (Abb. 18), konnte auch in diesem Experiment in grünen Blättern eine um ca. 25 % reduzierte Zinkakkumulation in *cad1* Mutanten gefunden werden. Zudem enthielten seneszente Blätter, wie im Vorversuch, ca. 40 % mehr Zn als grüne Pflanzenteile, wobei das Verhältnis zwischen Mutanten und Wildtyp gleich blieb (Abb. 22A). Dies war der Fall unabhängig davon, ob sieben oder neun Tage verdunkelt wurde. Auch die Mangangehalte waren zu beiden Zeitpunkten in seneszenten verglichen mit grünen Blättern aller drei Linien um ca. 50 % erhöht. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Linien nach 7-tägiger Seneszenzinduktion. Nach neun Tagen hingegen konnte in *cad1-6* relativ zu Col-0 sowohl in seneszenten als auch in grünen Blättern eine reduzierte Manganmenge festgestellt werden. Die Nullmutante *cad1-3* wies nur in seneszenten Blättern einen signifikant niedrigeren Manganwert auf. In grünen Blättern war zwar auch eine leichte Reduktion zu messen, diese war aber statistisch nicht signifikant.

Da mit Ausnahme von Fe keine Mobilisierung von Mikroelementen aus seneszenten in gesunde Pflanzenteile stattfand, stellte sich die Frage, ob dies durch die ausreichende Versorgung mit Mikroelementen bei pH 5.7 bedingt war. Daher wurden Pflanzen auf Erde mit alkalischem pH und somit limitierter Verfügbarkeit an Spurenelementen angezogen und anschließend Seneszenz induziert (Abb. 23). Sobald Pflanzen unter erschwerten Bedingungen bezüglich der Verfügbarkeit mit Mikroelementen angezogen wurden, konnten in seneszenten Blättern gleiche Mengen an Metallen gefunden werden wie in grünen Blättern. Allerdings wurden, mit Ausnahme von Cu und Mn, keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten festgestellt. Nur in der Kupferakkumulation zeigte der Wildtyp einen um 24 % reduzierten Wert in seneszenten Blättern. Ob es sich hierbei tatsächlich um einen Transport von Cu in grüne Teile der Blätter handelte, sollte unter Vorbehalt betrachtet werden, da die Kupferwerte unterhalb des LLOQ lagen und somit nur Tendenzen erkennbar waren. Eine erhöhte Stichprobenanzahl und Messung im Quantifizierungsbereich wären demnach für eine zuverlässige Aussage erforderlich.

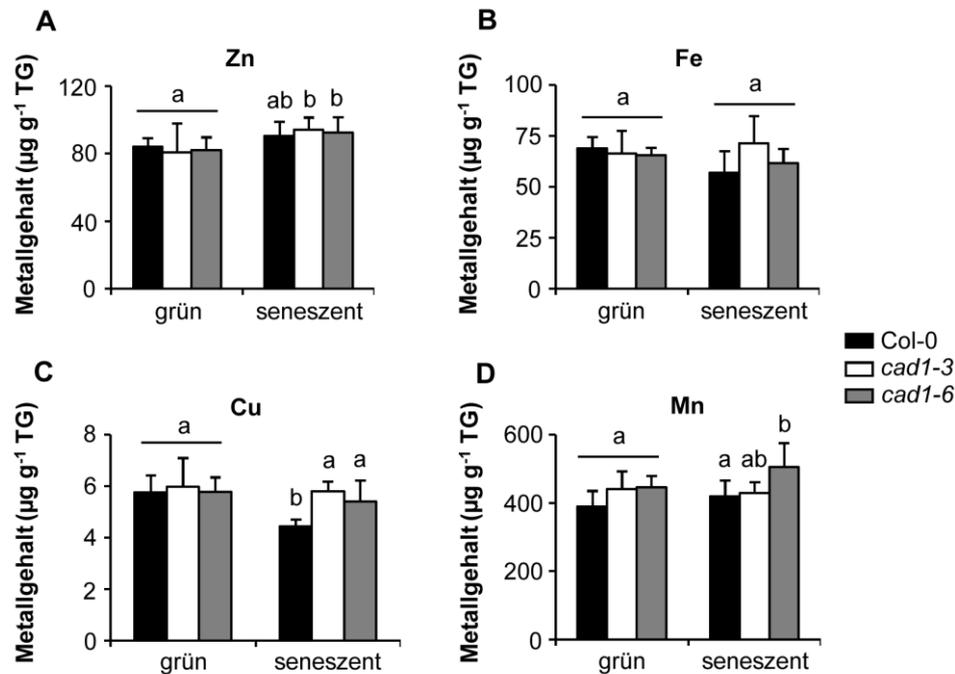


Abb. 23: Metallgehalte nach Seneszenzinduktion auf Substraterde mit limitierter Mikroelementverfügbarkeit. Pflanzen des *A. thaliana* Wildtyps Col-0 sowie der *AtPCS1* Mutanten *cad1-3* und *cad1-6* wurden für 7 Wochen auf alkalischer Erde mit pH 8.0 unter Kurztagbedingungen angezogen. Zur Induktion von Seneszenz wurde die Hälfte der Blattrosette für 7 d in Alufolie eingewickelt. Anschließend wurden grüne und seneszente Blätter getrennt mittels ICP-OES auf ihre (A) Zn-, (B) Fe-, (C) Cu- und (D) Mangangehalte untersucht. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Stdabw. einer Anzucht ($n=5-10$). Statistische Analyse der Daten erfolgte mittels Zwei-Wege ANOVA und Gruppierung der Werte anhand des Tukey 95 % Konfidenzintervalls.

3.2 AtPCS2

3.2.1 Verbreitung der PCS2 im Pflanzenreich

Die bisherig beschriebenen Funktionen der Phytochelatinsynthese in *Arabidopsis thaliana* bezogen sich ausschließlich auf die PCS1. Dennoch existiert in dieser Spezies ein zweites PCS Gen, *AtPCS2*. Zwar erwies sich das entsprechende Protein bei Komplementationsversuchen in *S. pombe* und *S. cerevisiae* als funktional [232], die Aufgabe der *AtPCS1 in planta* konnte jedoch nicht ausgefüllt werden. Dies drückt sich in der starken Cadmiumhypersensitivität der *cad1-3* Mutante aus, welche keine funktionale *AtPCS1* mehr besitzt [167,227]. Demnach ist die biologische Funktion der zweiten PCS aus *A. thaliana* ungeklärt. Bisher finden sich in der Literatur nur wenige Studien, die von der Existenz eines zweiten PCS Gens in anderen Pflanzenspezies neben *A. thaliana* berichten. Ein Beispiel stellt das Genom der Hülsenfrucht *Lotus japonicus* dar, welches sogar drei PCS Gene enthält, die ihren Ursprung wahrscheinlich in zwei Duplikationsereignissen haben [269]. Ebenso wie ihre nahe Verwandte *A. thaliana* besitzen die fakultativen Metallophyten *A. halleri* und *N. caerulescens* aus der Familie der Brassicaceae auch zwei PCS Gene [270]. Um einen Eindruck darüber zu gewinnen, wie verbreitet die Existenz eines zweiten PCS Gens im Pflanzenreich ist, wurde eine Suche (blast-

Algorithmus, NCBI) nach Sequenzhomologien innerhalb sequenzierter Pflanzengenome vorgenommen.

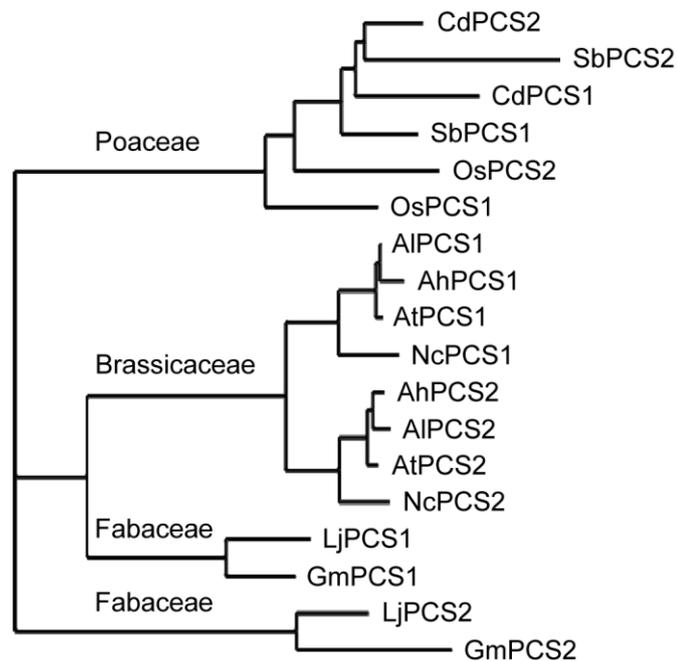


Abb. 24: Anwesenheit von zwei PCS-Proteinen in Vertretern der Mono- und Dikotyledonen. Verfügbare Proteinsequenzen für PCS1 und PCS2, die Mitglieder aus Familien der Poaceae, Brassicaceae und Fabaceae umfassen, wurden einer hierarchischen Clusteranalyse unterworfen. Das Dendrogramm wurde mit dem „Protein maximum likelihood“ (ProML) Algorithmus (www.trex.uqam.ca; [271]) auf der Basis eines ClustalW+ Proteinsequenzalignments erstellt. Im folgenden sind in die Analyse einbezogene Sequenzen aufgeführt (Proteinidentifikationsnummern von NCBI in Klammern angegeben): *Cynodon dactylon* (AAO13810, AAS48642); *Sorghum bicolor* (XP_002454970, XP_002454971); *Oryza sativa* (EEE64936, NP_001055554); *Arabidopsis lyrata* (XP_002865384, XP_002892190); *Arabidopsis halleri* (AAS45236, ADZ24787); *Arabidopsis thaliana* (NP_199220, AAK94671); *Noccaea caerulescens* (AAT07467, ABY89660); *Lotus japonicus* (AAT80342, AAT80341); *Glycine max* (NP_001235576, XP_003537353).

Aus der Analyse der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen (Abb. 24) geht hervor, dass PCS1- und PCS2-ähnliche Proteine innerhalb der Brassicaceae und Fabaceae in separaten Clustern auftauchen. Auch unter Vertretern der Monokotylen konnten zwei verschiedene PCS Gene gefunden werden. Die Existenz von mindestens zwei PCS Genen scheint demnach eine generelle Eigenschaft in pflanzlichen Genomen darzustellen, wodurch die Frage nach der physiologischen Rolle dieser Gene aufgeworfen wird.

3.2.2 Entwicklung einer sensitiven Methode zur PC-Detektion

Der Beitrag von AtPCS2 zu Mechanismen der Schwermetallhomöostase und -toleranz ist unklar. Des Weiteren konnte bislang kein Beweis für eine Transpeptidaseaktivität *in planta* gefunden werden, die sich als PC-Bildung in der *cad1-3* Mutante bemerkbar machen würde. Um eine Aussage über einen möglichen Beitrag bzw. dessen Größenordnung zum PC-Pool und somit zur Pufferung freier Metallionen in der Zelle treffen zu können, musste eine sensitive Methode zur Detektion sehr

geringer PC-Mengen entwickelt werden. Die Verwendung einer Kombination aus Umkehrphasen-Flüssigchromatographie und ESI-QTOF-MS ermöglicht eine hoch auflösende Detektion von PCs [228,272,273]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Thiolgruppen der PCs zunächst mit TCEP reduziert, anschließend mit Monobromobiman derivatisiert und mittels UPLC-ESI-QTOF-MS analysiert. Durch die Bestimmung von Wiederfindungsraten von PC-Standards über einen weiten Konzentrationsbereich, von 7.8 nM bis 50 µM pro PC in einer Mischung aus PC2 bis PC5, wurden die Detektions- und Quantifizierungslimits des verwendeten Systems definiert. Hierfür wurden die PC-Standards sowohl in Extraktionspuffer wie auch in pflanzlicher Matrix verdünnt. Letztere wurde durch Extraktion des Blattmaterials von Wildtyppflanzen (Col-0), die in Flüssigkultur in Abwesenheit erhöhter Metallkonzentrationen angezogen wurden, erhalten. Anhand dieses Vergleichs sollte überprüft werden, ob durch Matrixeffekte im Pflanzenextrakt eine Oxidation der Thiole stattfindet, die durch anschließende Reduktion der Extrakte nicht umkehrbar ist und so zu einem Verlust während der PC-Quantifizierung führt. Abbildung 25 zeigt den Zusammenhang zwischen der eingestellten Endkonzentration für PC2 und PC3 in Puffer bzw. Matrix und der erhaltenen Detektorantwort, welche auf den internen Standard *N*-Acetylcystein (NAC) normiert wurde.

Bis zu einem Wert von 25 µM konnte ein linearer Zusammenhang zwischen eingestellter PC-Konzentration und erhaltener Signalstärke beobachtet werden. Dieser lineare Messbereich, durch gestrichelte Linien im Diagramm kenntlich gemacht, erreichte ein $R^2 > 0.99$ und wurde nicht durch den Einsatz von Pflanzenmatrix beeinträchtigt. Auch im nanomolaren Bereich setzte sich die Linearität der Messung fort, zu sehen als Box im oberen Diagrammteil.

Dennoch waren Matrixeffekte vorhanden, was durch einen Vergleich der PC-Wiederfindungsraten im Puffer bzw. im Extrakt erkennbar wurde. Ein Vergleich der Kurvensteigungen im linearen Bereich ergab, dass die Pflanzenmatrix die erhaltene Signalintensität für PC2 zu 9 % reduzierte, während ein stärkerer Effekt, mit einer Abweichung von 37 % zu der in Extraktionspuffer gefundenen Menge, auf die Wiederfindung von PC3 zu verzeichnen war. Eine Sättigung der Detektorantwort war bei PC-Konzentrationen über 25 µM sichtbar. Dies kann jedoch vernachlässigt werden, da nie Konzentrationen über 13 µM in Pflanzenextrakten nachweisbar waren, auch nicht in Extrakten cadmiumbehandelter Pflanzen. Ein unteres Detektionslimit (LLOD; $S/N > 3$) von 50 fmol für PC2 und 100 fmol für PC3 wurde bestimmt und entspricht damit einer 4000-fach höheren Sensitivität verglichen mit dem Detektionslimit konventioneller HPLC, die ursprünglich zur Charakterisierung der *cad1-3* Mutante verwendet wurde [227].

Obwohl im Standardmix enthalten, wurden die langkettigeren PCs, PC4 und PC5, nicht in die spätere Quantifizierung mit einbezogen. Der Grund hierfür liegt in ihrem hohen m/z -Verhältnis der protonierten Ionen $[M+H]^+$ von 1764.5 bzw. 2186.7, was eine Erweiterung des üblicherweise verwendeten Kalibrationsbereiches, mit einem m/z -Verhältnis von 300-2000, sowie eine Erhöhung

der Scanzeit erfordert hätte. Diese Änderungen wiederum hätten zu einem Verlust der Sensitivität der PC2- und PC3-Detektion geführt. Zudem machten die summierten Ionenspuren $[M+H]^+$ und $[M+2H]^{2+}$ von PC4 und PC5 nur einen sehr kleinen Anteil der totalen PC-Konzentrationen in Pflanzenproben aus, so dass zugunsten einer hoch auflösenden PC2- und PC3-Detektion entschieden wurde.

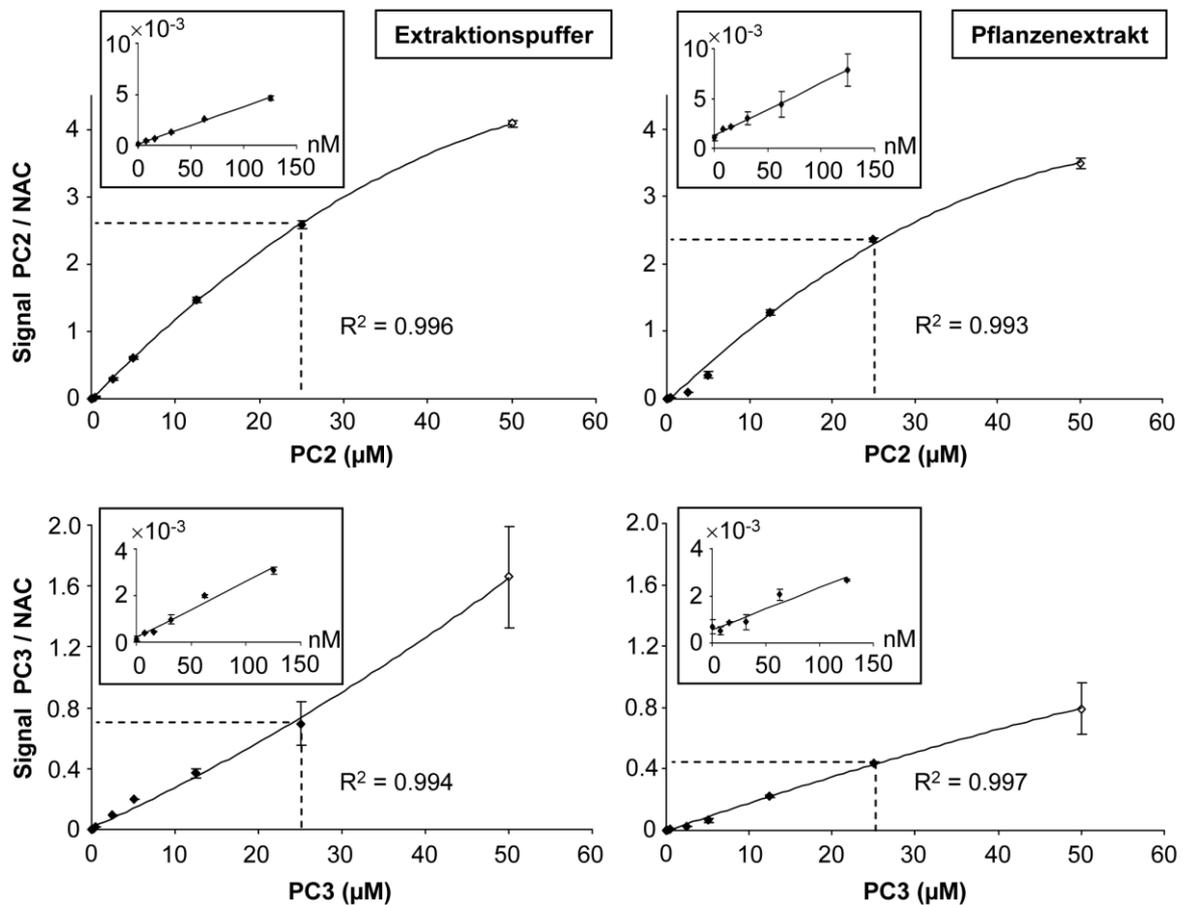


Abb. 25: Vergleich von linearem Messbereich, Wiederfindungsrate und Detektionslimit für Analyse von PC2 und PC3 in Puffer oder pflanzlicher Matrix mittels UPLC-ESI-QTOF-MS. Mischungen von PC2- bis PC5-Standards wurden entweder in Extraktionspuffer (6.3 mM DTPA, 0.1 % (v/v) TFA) oder Blattextrakten von Wildtyppflanzen (Col-0) verdünnt, die aus Anzucht in Flüssigkultur unter Kontrollbedingungen stammen. Thiolgruppen wurden vor der Analyse mit TCEP reduziert und anschließend mit mBrb derivatisiert. Dargestellt ist die Stärke des TOF-MS-Signals für PC2 (oben) und PC3 (unten), bezogen auf den internen Standard NAC, bei den eingestellten Endkonzentrationen im Extraktionspuffer (links) oder Pflanzenextrakt (rechts). Der angegebene Korrelationskoeffizient bezieht sich auf den linearen Messbereich bis 25 µM PC2/PC3. Im oberen Diagrammbereich umrahmt ist die Korrelation des PC/NAC-Verhältnisses im nanomolaren Konzentrationsbereich. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Stdabw. von 3 technischen Replikaten. Das untere Detektionslimit (LLOD; $S/N > 3$) wurde auf 50 fmol für PC2 bzw. 100 fmol für PC3 bestimmt.

3.2.3 Detektion von PCs in *cad1-3*

Nachdem die Entwicklung einer sensitiven Methode zur PC-Detektion abgeschlossen war, wurde der Beitrag der *AtPCS2* zur PC-Akkumulation *in planta* erneut untersucht. Dies erfolgte durch den Vergleich der PC-Bildung in Einzelmutanten für *AtPCS1* und *AtPCS2*, einer Doppelmutante für beide

Gene und den zugehörigen Wildtyplinien nach Exposition gegenüber erhöhten Cadmiummengen. Als Einzelmutante für *AtPCS1* diente die bereits beschriebene *cad1-3* Mutante. Eine "Knock-out" Linie für *AtPCS2* (At1g03980) war jedoch nur im Ws-0 Hintergrund erhältlich. Diese T-DNA Insertionslinie (FLAG_146G12) mit einer Insertion in Exon 6 des *AtPCS2* Gens wurde bestellt und eine homozygote Linie, im Weiteren als *atpcs2* bezeichnet, isoliert (Abb. 26).

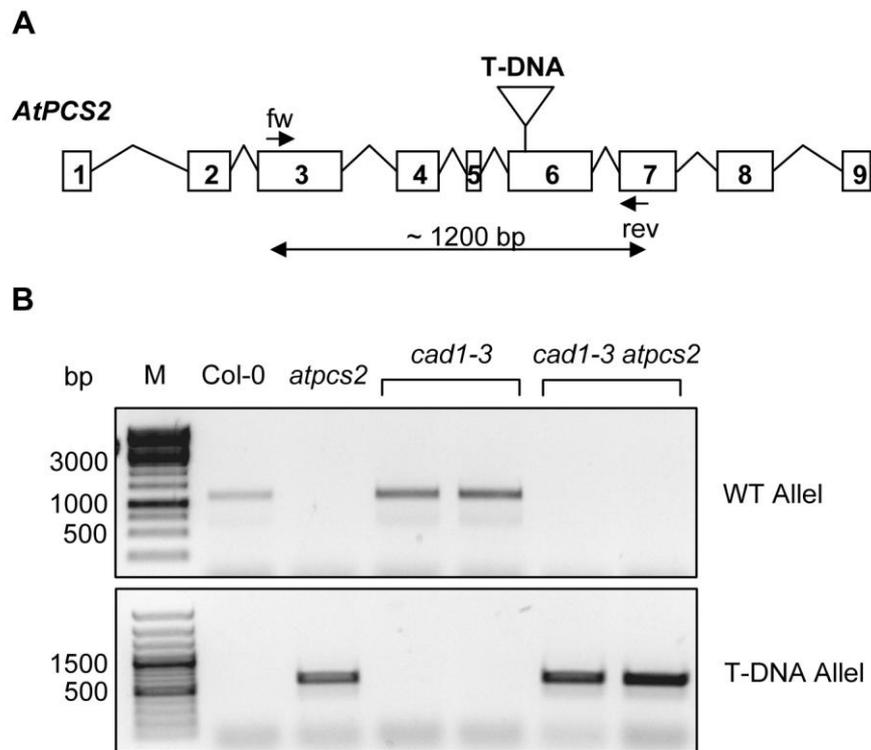


Abb. 26: Isolation der homozygoten T-DNA Insertionslinie *atpcs2*. (A) Schematische Darstellung der Genstruktur der *AtPCS2* (At1g03980). Zahlen in Boxen stehen für Exons, Linien hingegen für Introns. Das Dreieck gibt die Position der T-DNA Insertion in der Linie *atpcs2* (FLAG_146G12) an. Pfeile geben die Primerbindungsstellen der genspezifischen Primer zur Detektion des Wildtypfragments an. (B) Detektion des Wildtypfragments (oben) im Wildtyp Col-0 und der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* sowie des T-DNA spezifischen Fragments (unten) in *atpcs2* und der Doppelmutante *cad1-3 atpcs2*. Die Primersequenzen sind dem Material- und Methodenteil zu entnehmen.

Die Doppelmutante beider *PCS* Gene wurde durch Kreuzung der *atpcs2* Linie mit *cad1-3* erhalten. Anschließend wurden Einzelmutanten, Doppelmutante und die zugehörigen Wildtypen Col-0 und Ws-0 in Flüssigkultur angezogen und für 3 d entweder 0.5 μ M oder 5 μ M CdCl₂ ausgesetzt. Bei den zugehörigen Kontrollen wurden keine erhöhten Schwermetallkonzentrationen zugesetzt. Wurzel- und Blattmaterial wurden separat mittels UPLC-ESI-QTOF-MS auf ihre PC-Gehalte untersucht (Abb. 27). In den Wurzeln beider Wildtypen wie auch der *PCS* Einzelmutanten konnte PC2 auch in Kontrollpflanzen nachgewiesen werden (Abb. 27A). Dies deutet auf eine zwar geringe, aber dennoch messbare PC-Bildung auch in Abwesenheit erhöhter Metallkonzentrationen hin. Längerkettiges PC3 hingegen konnte nicht in Wurzeln nachgewiesen werden. Zudem wurden in Blattproben von Kontrollpflanzen keine PCs über dem Quantifizierungslimit (LLOQ; S/N > 10) detektiert.

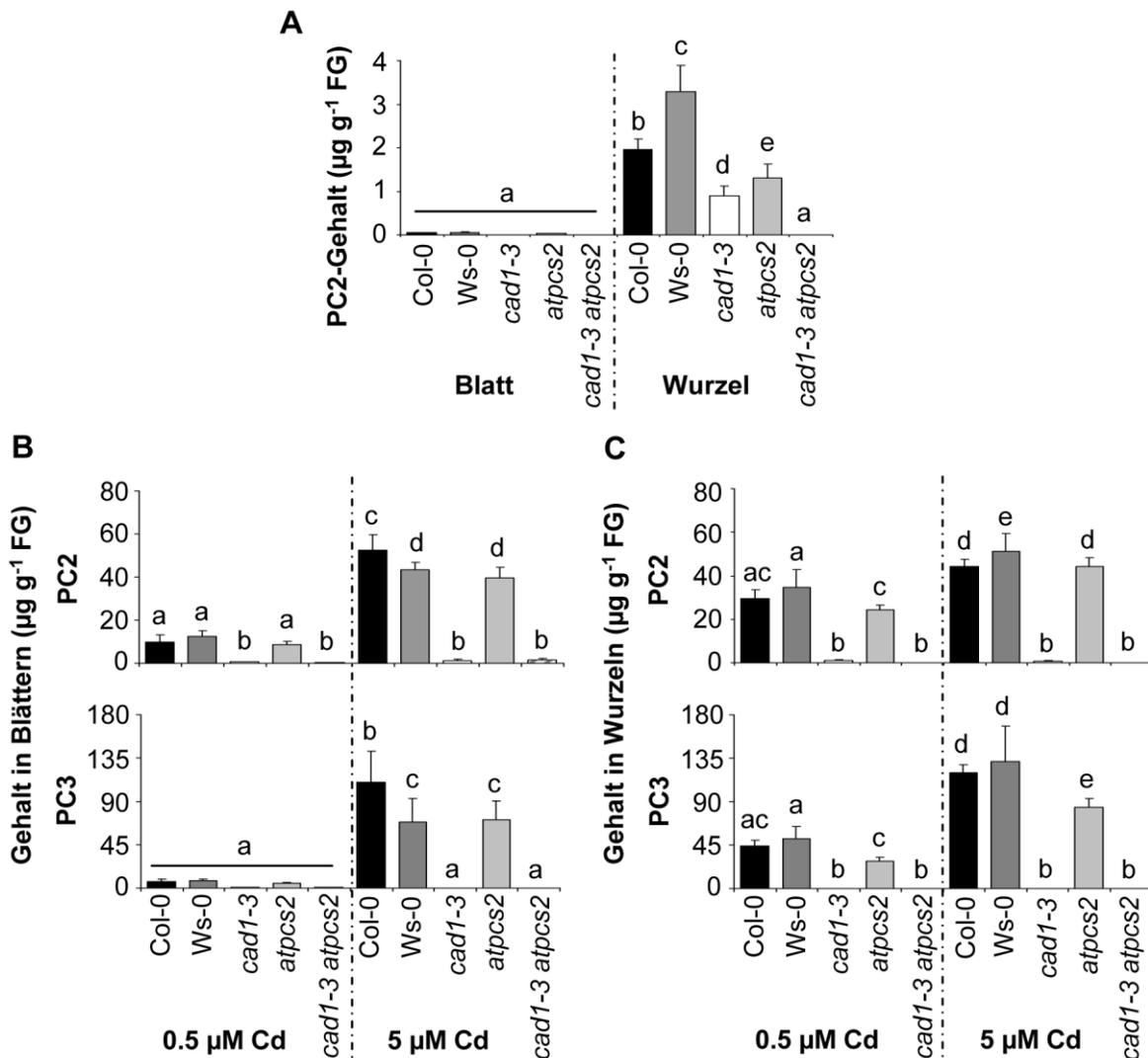


Abb. 27: Nachweis von PC-Bildung in *cad1-3*. Die *A. thaliana* *AtPCS1* und *AtPCS2* Mutanten *cad1-3* und *atpcs2*, sowie die zugehörigen Wildtypen Col-0 und Ws-0 und die Doppelmutante *cad1-3 atpcs2* wurden hydroponisch in 1/10 Hoaglandmedium für 6 ½ Wochen angezogen. Die PC-Akkumulation wurde mittels UPLC-ESI-QTOF-MS untersucht. (A) Gezeigt ist die PC2-Akkumulation von Pflanzen nach Anzucht in Kontrollmedium. Es ist zu beachten, dass außer für PC2 in Wurzeln unter Kontrollbedingungen alle PC-Gehalte unterhalb des Quantifizierungslimits lagen. (B,C) Pflanzen wurden für 3 d entweder 0.5 μM oder 5 μM CdCl_2 ausgesetzt. Blätter (B) und Wurzeln (C) wurden separat analysiert. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Stdabw. von 2 unabhängigen Experimenten mit insgesamt 6 Proben pro Linie und Bedingung. Für jede Probe wurde Material von je 3 Pflanzen gepoolt. Daten wurden mittels Zwei-Wege ANOVA statistisch ausgewertet und anhand des Tukey 95 % Konfidenzintervalls gruppiert.

In beiden Gewebearten von Wildtyppflanzen zeigte sich eine starke Zunahme der PC-Akkumulation, sobald diese cadmiumexponiert waren (Abb. 27B, C). Bei einer externen Cadmiumkonzentration von 0.5 μM enthielten Wurzeln 3-fach höhere PC2- und 6-fach höhere PC3-Konzentrationen als Blätter. Bei ansteigender Cadmiummenge im Medium trat dieser Unterschied nicht auf, so dass Blätter und Wurzeln über gleiche PC-Level verfügten. Obwohl die *atpcs2* Mutante phänotypisch kein schlechteres Wachstum als der Wildtyp Ws-0 aufwies (Daten nicht gezeigt),

konnten signifikante Unterschiede in den PC-Gehalten detektiert werden. Bei einer Cadmiumkonzentration von 5 μM enthielten Wurzeln der *atpcs2* Mutante vergleichbare PC2-Mengen wie Col-0, aber weniger als ihr Wildtyp Ws-0. Der PC3-Gehalt war niedriger als in beiden Wildtypen. Auch bei der niedrigeren externen Konzentration von 0.5 μM Cd war ein ähnlicher Trend zu verzeichnen, so dass ein messbarer Beitrag von *AtPCS2* zur PC-Akkumulation in Wurzeln nachgewiesen werden konnte. In Blättern hingegen konnte kein Unterschied zwischen *atpcs2* und Ws-0 verzeichnet werden.

Ein weiterer Hinweis auf eine Transpeptidaseaktivität der *AtPCS2* resultiert aus der Detektion von PC2-Mengen in Wurzeln und Blättern cadmiumbehandelter *cad1-3* Pflanzen, die über dem LLOQ lagen ($S/N > 10$) (Abb. 27B, C). Gleichzeitig konnten in Wurzeln der Doppelmutante keine PCs nachgewiesen werden. PC2, welches in Blättern der Doppelmutante bei 0.5 μM Cd gefunden wurde, lag unterhalb des LLOQ, während bei 5 μM Cd im Medium geringe Mengen an PC2 in Blättern detektiert wurden. Wenngleich dieser Unterschied nicht als statistisch signifikant zu *cad1-3* getestet wurde, so waren die in der Doppelmutante gefundenen PC2-Mengen dennoch geringer als in *cad1-3*. PC3 konnte weder in *cad1-3* noch in der Doppelmutante quantifiziert werden, mit Ausnahme von Spuren in Blattproben bei 0.5 μM Cd. Letztere lagen allerdings unterhalb des LLOQ.

3.2.4 Vergleich verschiedener Testsysteme zur Feststellung der Metalltoleranz liefert unterschiedliche Phänotypen

Der Hinweis auf eine PC-Bildung durch *AtPCS2* *in planta* führte zur Frage, ob durch Überexpression von *AtPCS2* in *cad1-3* eine Komplementation des cadmiumhypersensitiven Phänotyps stattfindet. Entsprechende Linien, die *AtPCS2* unter dem starken 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus exprimieren, wurden generiert und mit *cad1-3* Linien verglichen, die das entsprechende *AtPCS1*-Konstrukt trugen. In beiden Fällen wurden die Proteine mit einem C-terminalen HA-Tag exprimiert. Zwei homozygote Linien für beide Gene, die sich in der Expressionsstärke des Zielproteins unterschieden, wurden mittels Western Blot und Immunfärbung identifiziert (Abb. 28).

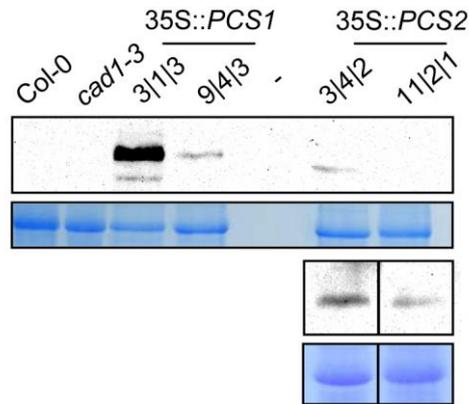


Abb. 28: Proteinlevel transgener *cad1-3* Linien, die *AtPCS1* oder *AtPCS2* unter Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors exprimieren. Proteinextrakte aus Blattproben vom Wildtyp Col-0, der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* und 35S-Überexpressionslinien im Mutantenhintergrund wurden mittels SDS-PAGE, Westernblot und anschließender Immunfärbung untersucht. Mithilfe eines anti-HA Antikörpers wurden mit C-terminalem HA-Tag versehene Versionen von *AtPCS1* (58 kDa) und *AtPCS2* (55 kDa) in den jeweiligen Linien detektiert. Unterhalb des Blots ist das Coomassie-gefärbte SDS-Gel als Ladekontrolle abgebildet. Bei Beladung auf dem gleichen Gel wie die starke *AtPCS1* Linie 3|1|3 konnte kein *AtPCS2*-Signal in der schwachen Linie 11|2|1 erhalten werden (oben). Nur auf einem separaten Gel (unten) konnte eine schwache Bande detektiert werden. Für einen besseren Vergleich der Linien 3|4|2 und 11|2|1, die auf dem gleichen Gel liefen, wurden die Gelbahnen nebeneinander kopiert.

Wurden diese Linien auf ihr Wachstum in Anwesenheit erhöhter Cadmiumkonzentrationen auf Agarplatten getestet, konnte der cadmiumhypersensitive Phänotyp von *cad1-3* nur durch Überexpression von *AtPCS1* komplementiert werden (Abb. 29). Dies wurde bereits von Tennstedt *et al.* (2009) [228] beobachtet. Linien, die *AtPCS2* exprimieren, konnten den hypersensitiven Phänotyp hingegen nicht retten. Es konnte allenfalls ein leicht positiver Effekt auf die Sprossentwicklung beobachtet werden.

Sowohl die Zusammensetzung von Kulturmedien als auch die Wachstumsbedingungen können einen starken Einfluss auf die Entstehung eines metallabhängigen Phänotyps haben [78,228], so dass die Komplementation des *cad1-3* Phänotyps in zusätzlichen Testsystemen untersucht wurde. Zunächst wurde ein neu entwickelter Toleranztest in Flüssigkultur im Keimlingsstadium durchgeführt. Die zugegebenen Zn- und Cadmiumkonzentrationen wurden gewählt, um in etwa eine halbmaximale Wachstumsinhibierung des Wildtyps zu generieren, gleichzeitig aber das Wachstum der *cad1-3* Mutante nicht vollkommen zu unterbinden.

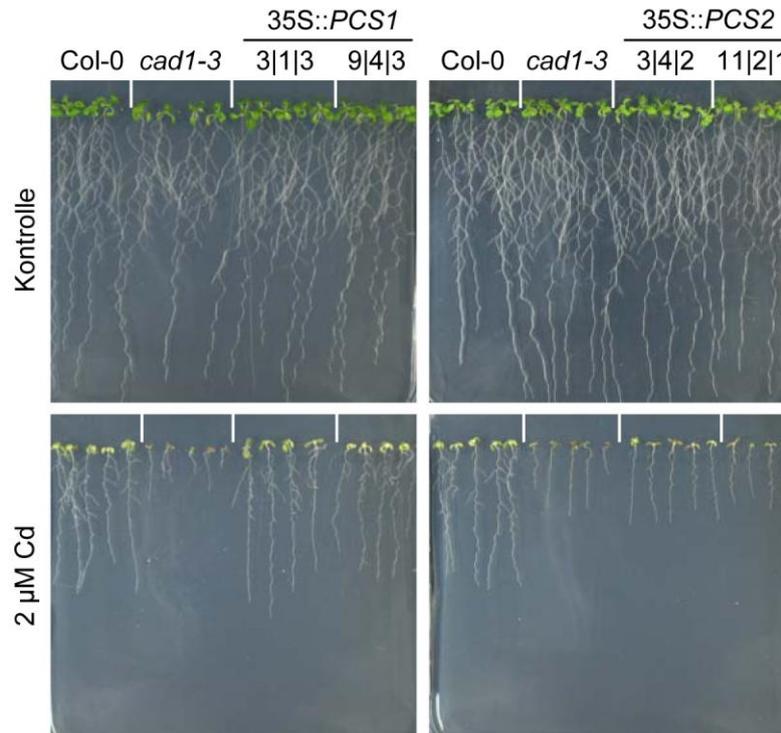


Abb. 29: Überexpression von *AtPCS1*, nicht aber *AtPCS2*, führt zur Komplementation des cadmiumhypersensitiven Phänotyps von *cad1-3* auf Agarplatten. Keimlinge des Wildtyps Col-0, der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* und transgener Linien, die *AtPCS1* oder *AtPCS2* im Mutantenhintergrund unter Kontrolle des 35S-Promotors überexprimieren, wurden in 1/10 Hoaglandmedium auf Agarplatten ohne zusätzliche Schwermetallionen oder in Anwesenheit von 2 μM CdCl_2 kultiviert. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der Keimlinge nach 14-tägigem Wachstum.

Tatsächlich konnte durch den Wechsel von verfestigtem Medium zur Flüssigkultur, wobei sich beide Kulturmedien nur durch das Fehlen von Agar unterschieden, eine partielle Komplementation des Mutantenphänotyps durch *AtPCS2* Überexpression beobachtet werden (Abb. 30). Da die Linien unter Kontrollbedingungen unterschiedliches Wachstum zeigten, wurden für das Wachstum bei Cadmiumzugabe relative Werte ermittelt, d.h. die Werte wurden als Prozentwert bezogen auf das Kontrollwachstum ausgedrückt. Bei Cd im Medium erreichte *cad1-3* eine primäre Wurzellänge von 18 % (± 8 %) des Wachstums unter Kontrollbedingungen, während Wurzeln der 35S::*AtPCS2* Linien 3|4|2 und 11|2|1 einen Wert von 30 % bzw. 23 % erreichten. Für die starke Linie 3|4|2 war dieser Unterschied zu *cad1-3* hoch signifikant ($p < 0.001$). Zwar wurde der Unterschied der schwachen *AtPCS2* Linie 11|2|1 zu *cad1-3* als nicht signifikant getestet ($p = 0.106$), jedoch war die Tendenz eines längeren Wurzelwachstums verglichen mit der Mutante sichtbar. Linien, die *AtPCS1* überexprimierten, zeigten ein dem Wildtyp vergleichbares Wachstum bei Cadmiumzugabe.

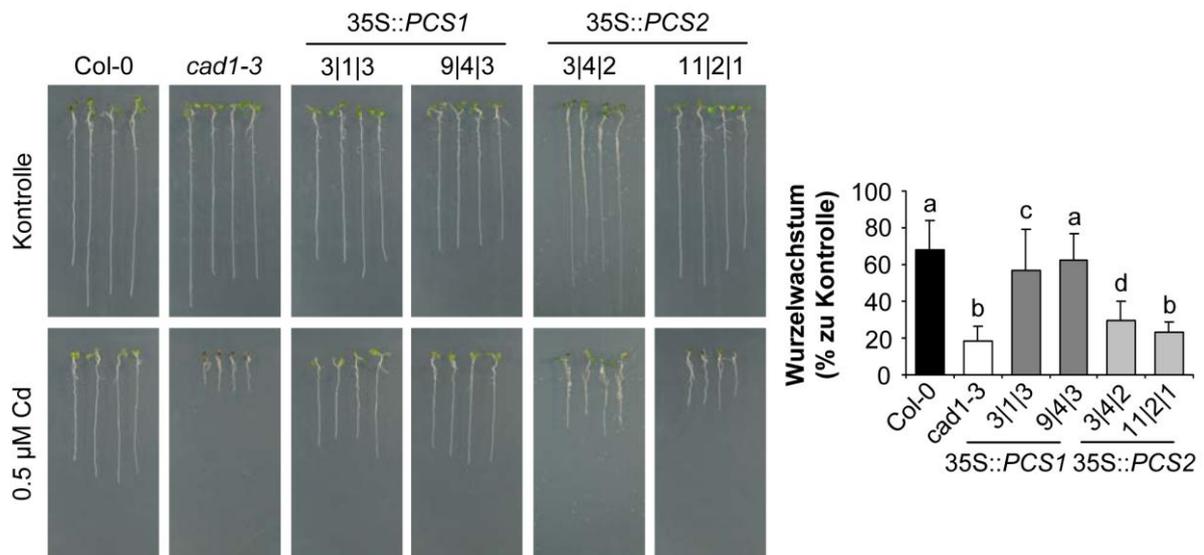


Abb. 30: Komplementation des cadmiumhypersensitiven Phänotyps der *cad1-3* Mutante in Flüssigkultur durch Expression von *AtPCS1* oder *AtPCS2*. Keimlinge des Wildtyps Col-0, der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* sowie *AtPCS1* oder *AtPCS2* Überexpressionslinien im Mutantenhintergrund wurden in flüssigem 1/10 Hoaglandmedium mit oder ohne 0.5 μM CdCl₂ angezogen. Nach 7-tägigem Wachstum wurde die Wurzellänge bestimmt und die Keimlinge für photographische Zwecke auf Agarplatten platziert. Daten repräsentieren Mittelwerte ± Stdabw. von 4-11 unabhängigen Experimenten mit insgesamt 65-150 analysierten Individuen pro Linie und Bedingung. Prozentwerte wurden transformiert und mittels Ein-Wege ANOVA statistisch ausgewertet und anhand des post-hoc Tukey-Tests (p<0.05) gruppiert.

Wie bereits publiziert [228] und in vorangegangenen Teilen der Arbeit gezeigt, weist *cad1-3* zudem einen hypersensitiven Phänotyp in Anwesenheit erhöhter Zinkkonzentrationen auf. Eine mögliche Rettung dieses zinkhypersensitiven Phänotyps durch *AtPCS1* oder *AtPCS2* Überexpression wurde daher im flüssigen Keimlingsassay überprüft (Abb. 31). Es zeigte sich, dass weder die Expression von *AtPCS2* noch von *AtPCS1* zur Rettung des zinkhypersensitiven Phänotyps führte. Die schwache *AtPCS2* Linie 11|2|1 war nicht in dieser Testreihe eingeschlossen, da sie erst zu einem späteren Zeitpunkt als die restlichen Linien identifiziert wurde. Da weder die starke *AtPCS2* Linie noch die *AtPCS1* Überexpressionslinien den hypersensitiven Phänotyp gegenüber Zn komplementieren konnten, wurde auf eine Wiederholung der Zinktoleranzexperimente unter Mitnahme der Linie 11|2|1 verzichtet.

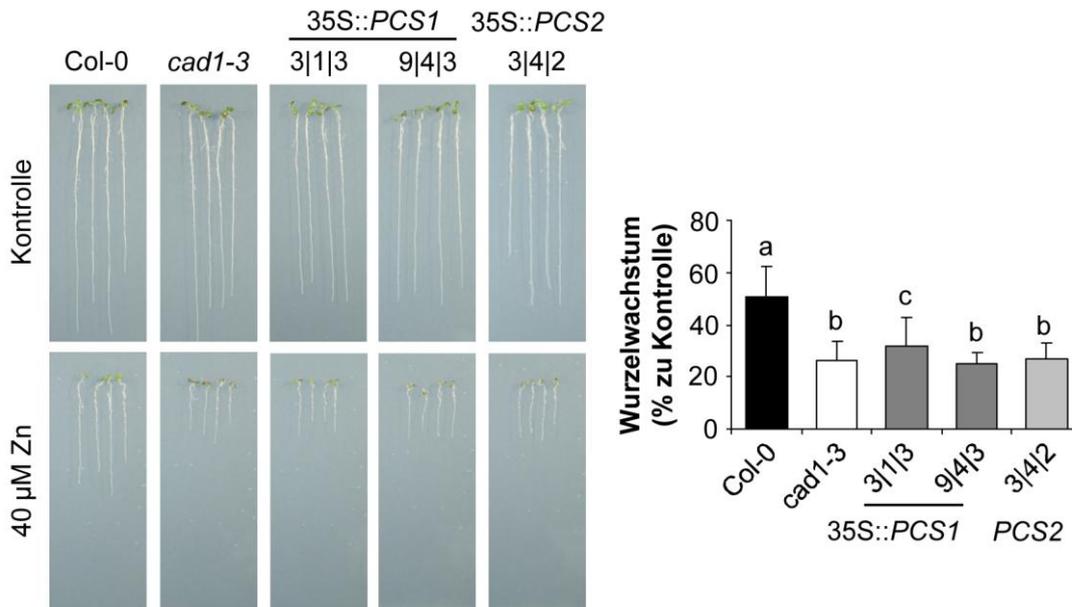


Abb. 31: Keine Komplementation des zinkhypersensitiven Phänotyps der *cad1-3* Mutante durch Überexpression von *AtPCS1* oder *AtPCS2*. Keimlinge des Wildtyps Col-0, der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* und der *AtPCS1/AtPCS2* Überexpressionslinien im Mutantenhintergrund wurden in flüssigem 1/10 Hoaglandmedium mit oder ohne 40 μM ZnCl₂ angezogen. Nach 7-tägigem Wachstum wurde die Wurzellänge bestimmt und die Keimlinge für photographische Zwecke auf Agarplatten platziert. Daten repräsentieren Mittelwerte ± Stdabw. von 6 unabhängigen Experimenten mit insgesamt 28-80 analysierten Individuen pro Linie und Bedingung. Prozentwerte wurden transformiert und mittels Ein-Wege ANOVA statistisch ausgewertet und anhand des post-hoc Tukey-Tests (p<0.05) gruppiert.

Um zu überprüfen, ob die partielle Komplementation der Cadmiumhypersensitivität von *cad1-3* durch *AtPCS2* Überexpression auch auf einer höheren PC-Bildung basiert, wurden Keimlinge nach dem Wachstum in Flüssigkultur in An- oder Abwesenheit von Cd²⁺ auf ihre PC-Gehalte untersucht.

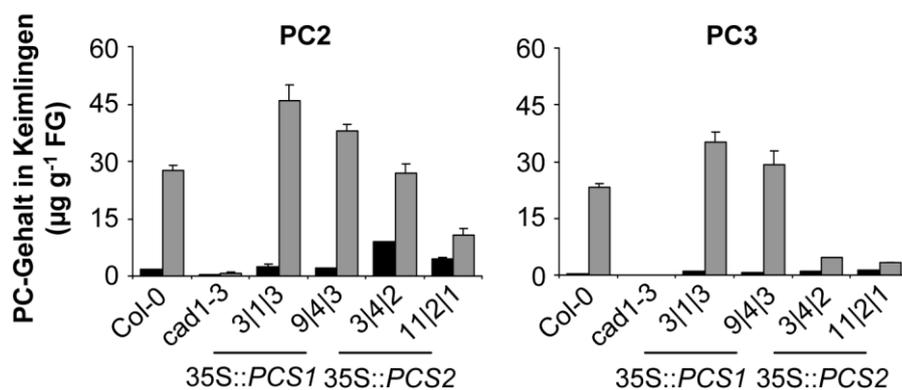


Abb. 32: PC-Akkumulation in Keimlingen von *AtPCS1* und *AtPCS2* Überexpressionslinien aus Flüssigkultur. Keimlinge des Wildtyps Col-0, der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* und der 35S-Überexpressionslinien von *AtPCS1* oder *AtPCS2* im Mutantenhintergrund wurden für 11 d in flüssigem 1/10 Hoaglandmedium ohne zusätzliche Metalle (schwarz) oder unter Zugabe von 0.5 μM CdCl₂ (grau) angezogen. Die PC-Gehalte aus ganzen Keimlingen wurden mittels UPLC-ESI-QTOF-MS bestimmt. Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte ± Stdabw. (n=2) aus einer repräsentativen Anzucht.

Beide *AtPCS1* Linien enthielten ähnliche Mengen an PC2 und PC3 und wiesen sogar leicht erhöhte PC-Mengen verglichen mit dem Wildtyp bei Cadmiumzugabe auf (Abb. 32). Auch in Keimlingen der *AtPCS2* Linien wurden PC2 und PC3 detektiert. Im Gegensatz dazu enthielt die *cad1-3* Mutante nur sehr geringe PC-Mengen. Der PC2-Gehalt der starken *AtPCS2* Linie 3|4|2 war vergleichbar mit dem des Wildtyps, wobei die schwache Linie 11|2|1 nur 40 % des Wildtyp PC2-Levels aufwies. Weiterhin zeigten beide *AtPCS2* Linien eine starke Beeinträchtigung in der Bildung des längerkettigen PC3, verglichen mit dem Wildtyp und den *AtPCS1* Überexpressionslinien. Der PC2-Gehalt in Abwesenheit von externem Cd^{2+} war in den 35S::*AtPCS2* Linien 6-fach bzw. 3-fach höher als in Col-0. Auch Keimlinge der *AtPCS1* Linien zeigten eine leicht erhöhte konstitutive PC-Bildung.

Die bisher erhobenen Daten zeigen, dass durch *AtPCS2* Überexpression in *cad1-3* ein verbessertes Wachstum bei Cadmiumzugabe im Medium erreicht werden kann, welches mit der erhöhten Bildung von PCs einhergeht. Da dieser Effekt jedoch nur in einem von zwei Testsystemen beobachtet werden konnte, wurde das Wachstumsverhalten der Linien auch unter Bedingungen getestet, die dem natürlichen Lebensraum näher kommen als die bisher verwendeten artifiziellen Testmethoden. Hierfür wurden Wildtyp, *cad1-3* Mutante und die transgenen Linien 35S::*AtPCS1* 3|1|3 und 35S::*AtPCS2* 3|4|2, die sich durch ein jeweils stärkeres Level des Zielproteins auszeichnen, auf mineralischem Boden mit oder ohne Zusatz von $7.5 \text{ mg Cd kg}^{-1}_{\text{Boden}}$ angezogen. Die extrahierbaren und verfügbaren Metallgehalte im Boden sind Tabelle 13 (Abschnitt 3.1.2) zu entnehmen.

Nach 24-tägigem Wachstum auf dieser künstlich kontaminierten Erde war die Cadmiumhypersensitivität von *cad1-3* deutlich an der ausgeprägten Chlorose der Blätter und dem stark reduzierten Wachstum, verglichen mit den Kontrollen, erkennbar (Abb. 33A). Als Indikator für das Wachstum wurde über die Dauer des Experiments wöchentlich die Blattfläche der Pflanzen bestimmt. Da sich die generelle Pflanzengröße zwischen den beiden unabhängigen Experimenten stark unterschied, wurde die Blattfläche der Pflanzen auf cadmiumkontaminierten Erde auf das Wachstum der Pflanzen auf Kontrollerde bezogen. Auf diese Weise wurde eine Reduktion des Wachstums von 65 % für *cad1-3* bestimmt, während der Wildtyp Col-0 sogar ein verbessertes Wachstum auf cadmiumkontaminierten Erde aufwies (Abb. 33B). Anders als in Flüssigkultur oder auf Agarplatten führte die Überexpression von *AtPCS1* und *AtPCS2* zu einem annähernd gleich guten Wachstum der *cad1-3* Pflanzen auf kontaminierten Erde. Die Chlorose der Blätter war deutlich geringer und die Blattfläche war nur zu 15 % bzw. 25 % nach 24 Tagen reduziert. Der Unterschied zwischen beiden transgenen Linien war nicht signifikant, wobei der Wachstumsunterschied zwischen Wildtyp, Mutante und den Überexpressionslinien schon nach 21 Tagen hoch signifikant war, mit einem p-Wert unter 0.001 für alle Vergleiche. Daraus geht allerdings auch hervor, dass keine vollständige Komplementation des Wachstums vorlag.

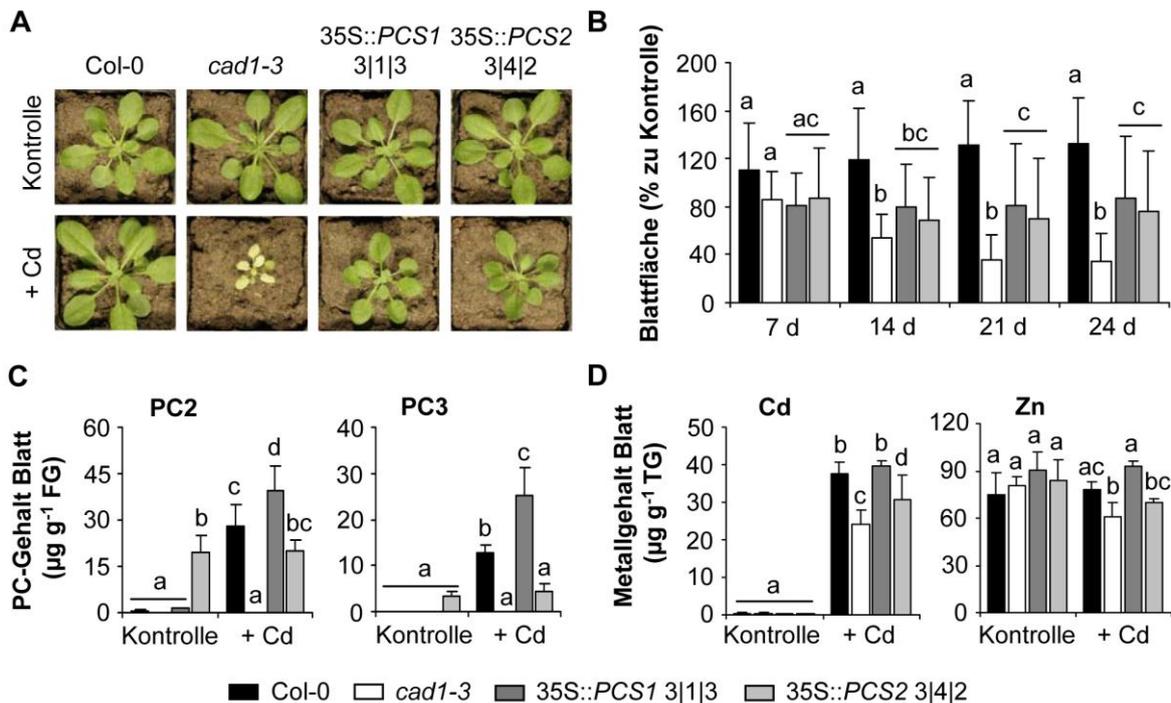


Abb. 33: *AtPCS2* Überexpression führt zu konstitutiver PC-Bildung und komplementiert dadurch den Wachstumsdefekt von *cad1-3* auf cadmiumkontaminierten Erde. Zehn Tage alte *A. thaliana* Keimlinge des Wildtyps Col-0, der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* und transgener Linien, die *AtPCS1* oder *AtPCS2* im Mutantenhintergrund überexprimieren, wurden auf Kontrollerde oder künstlich mit Cd kontaminierten Erde transferiert. (A) Gezeigt sind Photos von repräsentativen Individuen nach 24-tägigem Wachstum auf Kontrollerde oder Erde mit $7.5 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ Boden. (B) Die Blattfläche der Pflanzen wurde wöchentlich als Wachstumsindikator gemessen. Blattmaterial wurde gepoolt und mittels UPLC-ESI-QTOF-MS auf PC-Gehalte (C) bzw. auf Metallgehalte mittels ICP-OES (D) untersucht. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Stdabw. aus 2 unabhängigen Experimenten mit insgesamt 16-30 Individuen pro Linie und Bedingung. Statistische Analyse erfolgte über Zwei-Wege ANOVA wobei Prozentwerte vorher transformiert wurden. Daten wurden anhand des post-hoc Tukey-Tests ($p < 0.05$) gruppiert.

Da bekannt ist, dass die Aktivität der PCS Einfluss auf die Cadmiumakkumulation in Pflanzengewebe nimmt [228,274–277], wurden die Cadmiumgehalte in den Blättern der auf Erde gewachsenen Pflanzen mittels ICP-OES bestimmt (Abb. 33D). In Blättern von Kontrollpflanzen konnten keine messbaren Mengen an Cd gefunden werden. Auf kontaminierten Erde enthielt *cad1-3* ca. 35 % weniger Cd als der Wildtyp Col-0. Die Überexpression von *AtPCS1* wie auch *AtPCS2* führte zu einem Anstieg der Cadmiumgehalte in den Blättern. Allerdings wurde eine vollständige Wiederherstellung der Wildtypsituation nur in *AtPCS1* Linien gefunden. Ein ähnlicher Trend zeigte sich für die Zinkgehalte. Während unter Kontrollbedingungen keinerlei signifikante Unterschiede in den Blattproben verschiedener Linien auftraten, akkumulierte *cad1-3* auf cadmiumkontaminierten Erde ca. 20 % weniger Zn als Col-0. *AtPCS1* Überexpression führte sogar zu leicht höheren Zinkwerten, verglichen mit dem Wildtyp, wobei durch *AtPCS2* Überexpression zwar höhere Zinkwerte als in der Mutante zu finden waren, diese aber nicht die Wildtypsituation wiederherstellen konnte.

3.2.5 *AtPCS2* zeigt höhere Aktivität als *AtPCS1* in Abwesenheit des aktivierenden Schwermetalls Cd

Die Analyse der PC-Gehalte in Blättern der auf Erde gewachsenen Pflanzen brachte erneut hervor, dass PC2 auch in Wildtyp- bzw. transgenen Pflanzen gebildet wurde, die nicht erhöhten Metallkonzentrationen ausgesetzt waren (Abb. 33C). In der Mutante *cad1-3* konnten im Gegensatz dazu weder PC2 noch PC3 detektiert werden, unabhängig davon, auf welcher Erde sie gewachsen waren. Die *AtPCS1* Linie 3|1|3 zeigte höhere PC2- und PC3-Gehalte als Col-0 nach Wachstum auf kontaminierter Erde, obwohl keine vollständige Komplementation des hypersensitiven Phänotyps von *cad1-3* beobachtet wurde. Pflanzen, die *AtPCS2* überexprimieren, akkumulierten in Anwesenheit von Cd fast genauso viel PC2 wie Col-0, während die PC3-Mengen signifikant niedriger waren. Des Weiteren wies 35S::*AtPCS2* die höchste Menge an PC2 und PC3 in Pflanzen auf Kontrollerde auf. Genauer gesagt waren die PC-Gehalte gleich in Blättern von Pflanzen, die auf Kontrollerde oder kontaminierter Erde kultiviert wurden. Diese Beobachtung ist absolut gegensätzlich zu Col-0 und 35S::*AtPCS1* 3|1|3, bei welchen die Anwesenheit von Cd einen 30-fachen bzw. 40-fachen Anstieg der PC2-Bildung bewirkte.

Eine verstärkte PC-Bildung ohne Cadmiumzugabe in *AtPCS2* Linien wurde bereits vorher in Flüssigkultur beobachtet (vgl. Abb. 32). Dies deutet darauf hin, dass *AtPCS2* im Gegensatz zu *AtPCS1* nicht durch Cd aktiviert wird.

3.3 Trennung von Transpeptidase und Peptidaseaktivität

Wie bereits erwähnt, gliedert sich die Katalyse der PC-Synthese in zwei Aktivitäten des PCS-Enzyms. Der erste Schritt, die sogenannte Peptidaseaktivität, besteht aus der Abspaltung des terminalen Gly, während der zweite Schritt, die Transpeptidaseaktivität, eine neue Peptidbindung zwischen einem Akzeptormolekül und einem γ -EC Dipeptid schließt. Zwar ist bekannt, dass nur die Transpeptidaseaktivität abhängig ist von der Anwesenheit aktivierender Schwermetallionen, dennoch ist bisher unklar, ob beide Funktionen voneinander abhängig sind oder auch getrennt voneinander auftreten können. Dies ist insbesondere von Interesse, da die Peptidaseaktivität in Verbindung gebracht wurde mit Mechanismen der Nichtwirtsresistenz von Pflanzen [244]. Um mehr über den Zusammenhang von Struktur und Funktion des Enzyms zu erfahren und zu testen, ob beide Aktivitäten unabhängig voneinander agieren können, wurden phylogenetisch diverse Varianten der PCS kloniert und in *cad1-3* transformiert. Durch Testen der Transformanten auf ihre Metalltoleranz bzw. Nichtwirtsresistenz sollte untersucht werden, ob es PCS-Varianten gibt, die nur eine Funktion erfüllen können bzw. ob beide Aktivitäten nur gekoppelt auftreten.

3.3.1 Generierung von Überexpressionslinien mit phylogenetisch diverser PCS

PCS-Varianten aus *C. elegans*, *C. intestinalis* und *Nostoc spec.* wurden ausgewählt. Zudem wurden die eukaryotischen Varianten aus *C. elegans* und *C. intestinalis* C-terminal auf die Länge der prokaryotischen *Nostoc* PCS verkürzt und ebenfalls transformiert. Alle diese Varianten wurden in früheren Arbeiten bereits in Metalltoleranztests in der Spalthefe *S. pombe* hinsichtlich ihrer Transpeptidaseaktivität, also der PC-Bildung in Anwesenheit von Schwermetallen, charakterisiert. Mit Ausnahme von *NsPCS* waren alle Varianten zur PC-Bildung befähigt. Konstrukte dieser Gene mit C-terminalem HA-Tag wurden aus dem Hefvektor pSGP72 in den binären Vektor pCB302, zur Agrobakterien vermittelten Pflanzentransformation, kloniert und in die Mutante *cad1-3* transformiert. Nach zwei Selektionsrunden wurde die Expression des Zielproteins mittels Western Blot untersucht. Allerdings konnten nur für *CePCS* Linien des Volllänge- und verkürzten Proteins Signale detektiert werden. Daher erfolgte eine Nachzucht dieser Linien in die dritte Generation um homozygote Samen zu bekommen. Keimlinge dieser, in Anwesenheit des Selektionsmarkers uniform wachsenden Samenbatches, wurden erneut auf die Expression des Zielproteins untersucht (Abb. 34). Die bereits in früheren Teilen der Arbeit charakterisierte starke *AtPCS1* Überexpressionslinie 3|1|3 wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Die Analyse wurde auf zwei Linien beschränkt, welche in der Elterngeneration ein starkes bzw. schwaches Proteinlevel aufwiesen

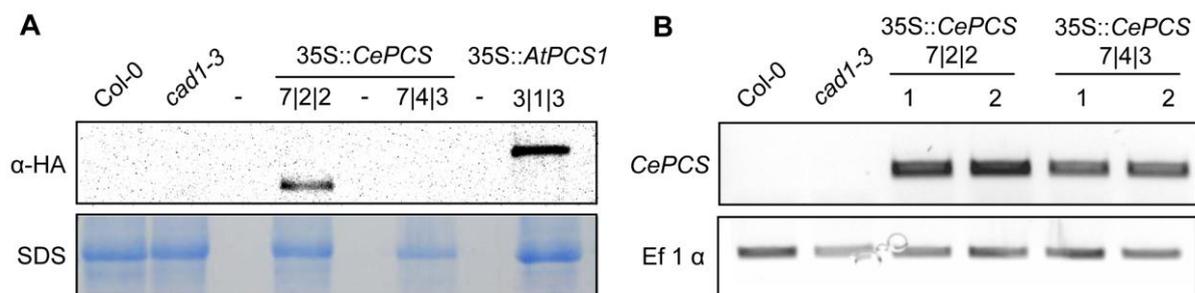


Abb. 34: Detektion von PCS-Protein- und Transkriptlevel in Überexpressionslinien. (A) 60 µg Proteinextrakt aus Blattmaterial wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend über Western Blot und Immunfärbung auf die Zielproteine untersucht. Anhand des HA-Antikörpers wurden mit C-terminalem Tag versehene Proteine *CePCS* (48 kDa) und *AtPCS1* (58 kDa) in den 35S-Überexpressionslinien detektiert. Das Coomassie-gefärbte SDS-Gel unterhalb des Blots dient als Ladekontrolle. (B) Bestimmung von *CePCS* Transkriptleveln in Überexpressionslinien mittels semiquantitativer RT-PCR. Der *Elongationsfaktor 1α* diente als Referenzgen.

In der F3-Generation konnte nur noch für die Linie 35S::CePCS 7|2|2 ein Signal des Zielproteins erhalten werden (Abb. 34A). Dieses war jedoch schwächer als das Signal, welches für *AtPCS1* in der starken Überexpressionslinie 3|1|3 detektiert wurde. Ein schwaches PCS-Signal in der Linie 35S::CePCS 7|4|3 wurde nur einmalig beobachtet.

Aufgrund der zu niedrigen Sensitivität im Western Blot erfolgte eine Analyse des Transkriptlevels der *CePCS* mittels semiquantitativer RT-PCR (Abb. 34B). Hiermit konnte bestätigt werden, dass die

Linie 7|2|2 eine stärkere Expression des Transgens aufweist als die Linie 7|4|3. Somit konnten Experimente mit einer schwachen und einer starken Expressionslinie des Zielproteins erfolgen. Für die Überexpressionslinien mit verkürzter Version der *CePCS* konnten im Western Blot nur Signale für die F2-Generation, nicht mehr für Individuen der homozygoten F3-Generation nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Diese waren jedoch für alle zehn untersuchten Linien gleich schwach. Für weitere Versuche wurden daher die Linien 5|3|2 und 7|3|1 mit gleichmäßig schwacher Expression verwendet. 35S-Linien mit verkürzter *CePCS* wurden im folgenden als 35S::*CePCS*[‡] bezeichnet.

3.3.2 *CePCS* vermittelt Cadmiumtoleranz in *cad1-3*

Zur Untersuchung der Transpeptidaseaktivität *in planta*, die sich durch PC-Bildung und somit der Vermittlung von Metalltoleranz zeigen sollte, wurden Metalltoleranztests in flüssiger Keimlingskultur durchgeführt (Abb. 35).

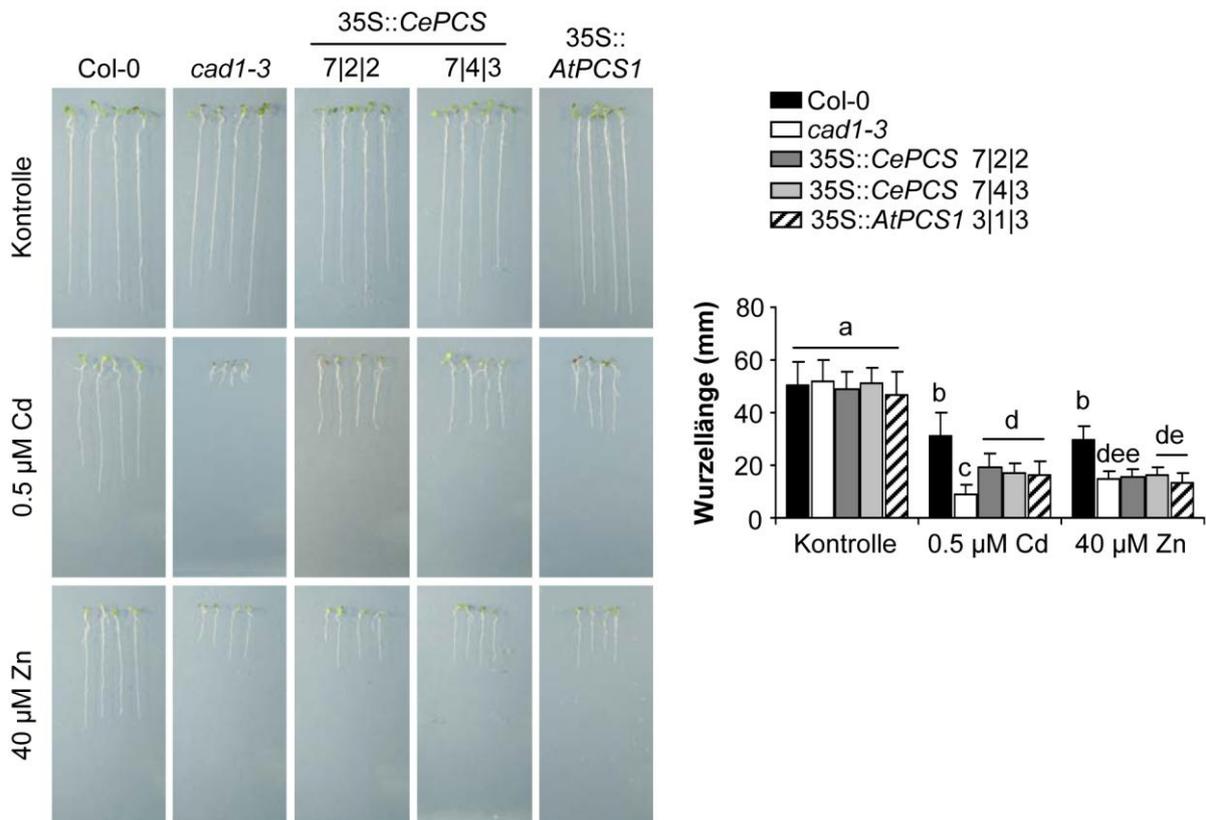


Abb. 35: Überexpression von *C. elegans PCS* in *cad1-3* stellt Cadmiumtoleranz wieder her. Keimlinge des *A. thaliana* Wildtyps Col-0, der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* sowie der *PCS* Überexpressionslinien wurden in flüssigem 1/10 Hoaglandmedium in Anwesenheit von 0.5 µM CdCl₂ oder 40 µM ZnCl₂ angezogen. Die Kontrollen enthielten keine zusätzlichen Schwermetalle. *CePCS* Überexpressionslinien wiesen ein starkes (dunkelgrau) bzw. schwaches (hellgrau) Proteinlevel auf. Die *AtPCS1* Linie diente als interne Kontrolle. Nach 7-tägigem Wachstum unter Langtagbedingungen wurde die primäre Wurzellänge der Keimlinge bestimmt. Für photographische Zwecke wurden die Keimlinge auf Agarplatten gelegt. Daten repräsentieren Mittelwerte ± Stdabw. von 3 unabhängigen Experimenten mit 40-90 Individuen pro Linie und Bedingung. Daten wurden statistisch mittels Zwei-Wege ANOVA analysiert und mit dem post-hoc Tukey-Test (p<0.05) gruppiert.

Die starke *AtPCS1* Überexpressionslinie 3|1|3 wurde als interne Kontrolle mitgeführt, da für dieselbige schon Richtwerte erhoben wurden (vgl. Abb. 30, 31). Unter Kontrollbedingungen ergaben sich keine Unterschiede im Wachstum, so dass auf eine prozentuale Auswertung verzichtet werden konnte (Abb. 35A). In Anwesenheit von 0.5 μM CdCl_2 konnte der bereits bekannte starke hypersensitive Phänotyp der *cad1-3* Mutante mit einer Reduktion der Wurzellänge um 83 % beobachtet werden. Verglichen damit war der Wildtyp nur zu 40 % im Wachstum inhibiert.

Beide *CePCS* Überexpressionslinien zeigten ein deutlich verbessertes Wachstum im Vergleich zu *cad1-3*, wobei sie im Mittel nur zu 64 % reduziert waren, vergleichbar mit der Positivkontrolle 35S::*AtPCS1*. Der Unterschied zu *cad1-3* war hierbei hoch signifikant ($p < 0.001$). Allerdings erfolgte, wie auch schon vorher für *AtPCS1* beobachtet (vgl. Abb. 30, 33), keine vollständige Komplementation des Phänotyps zur Wildtypsituation ($p < 0.001$ für beide *CePCS* Linien). Anders hingegen verlief das Wachstum bei Zinküberschuss. Hier war ebenfalls der stark ausgeprägte Phänotyp von *cad1-3* mit einer 70 %-igen Wachstumsreduktion zu verzeichnen. Allerdings zeigten alle Überexpressionslinien ein der Mutante vergleichbares Wachstum.

Zudem wurden die Linien mit verkürzter *CePCS*-Variante auf ihre Metalltoleranz untersucht (Abb. 36). Anders als bei heterologer Expression der verkürzten *CePCS* in Hefe konnte *in planta* keine Vermittlung von Toleranz bei erhöhter Schwermetallbelastung beobachtet werden. Beide Linien mit verkürzter *CePCS* zeigten signifikant unterschiedliches Wachstum zu Col-0 ($p < 0.001$) und keinen Unterschied zur *cad1-3* Mutante. Dies war sowohl bei Cd- als auch bei Zinküberschuss zu beobachten.

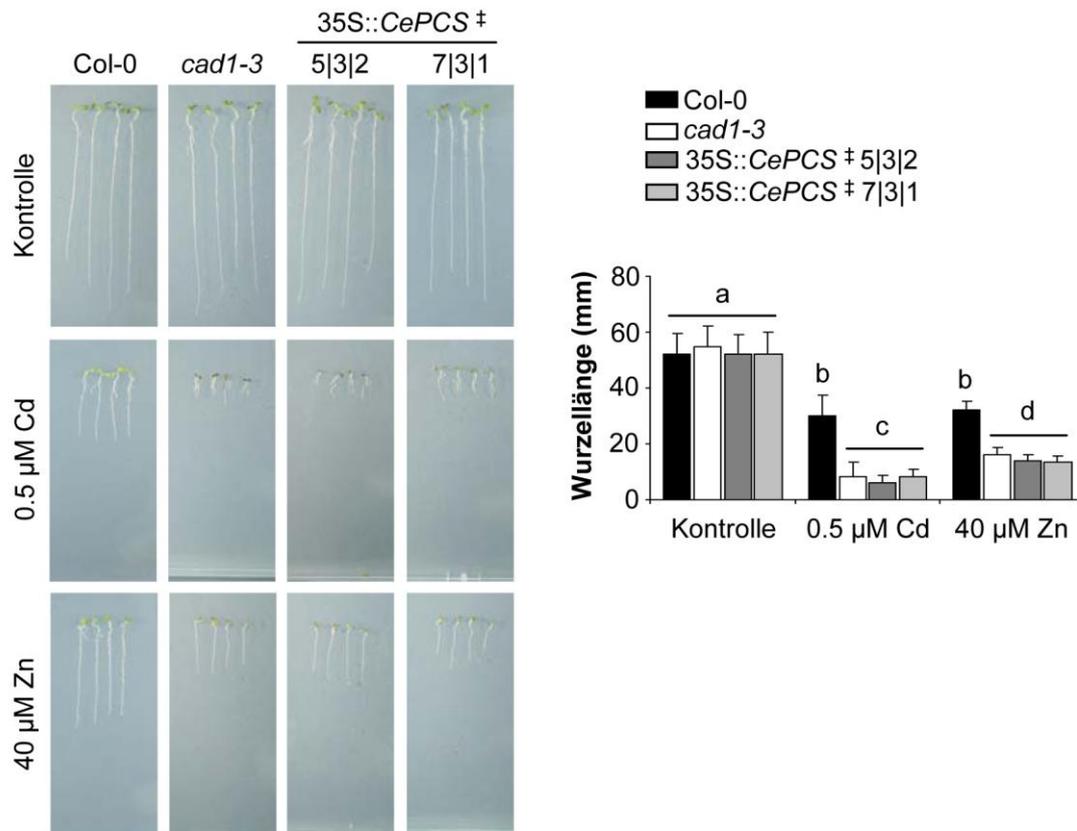


Abb. 36: Überexpression von verkürzter *CePCS* in *cad1-3* komplementiert nicht die schwermetallhypersensitiven Phänotypen. Keimlinge des *A. thaliana* Wildtyps Col-0, der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* sowie der *CePCS* Überexpressionslinien mit einer verkürzten Proteinvariante wurden in flüssigem 1/10 Hoaglandmedium in Anwesenheit von 0.5 µM CdCl₂ oder 40 µM ZnCl₂ angezogen. Die Kontrollen enthielten keine zusätzlichen Schwermetalle. Nach 7-tägigem Wachstum unter Langtagbedingungen wurde die primäre Wurzellänge der Keimlinge bestimmt. Für photographische Zwecke wurden die Keimlinge auf Agarplatten gelegt. Daten repräsentieren Mittelwerte ± Stdbw. von 3 unabhängigen Experimenten mit 35-45 Individuen pro Linie und Bedingung. Daten wurden statistisch mittels Zwei-Wege ANOVA analysiert und mit dem post-hoc Tukey-Test ($p < 0.05$) gruppiert.

Da im vorangegangenen Teil dieser Arbeit dokumentiert werden konnte, dass in verschiedenen Testsystemen unterschiedliche Phänotypen auftreten können, wurden die Linien auch auf Agarplatten hinsichtlich ihrer Metalltoleranz getestet (Abb. 37, 38).

Der Trend, der in flüssiger Keimlingskultur beobachtet wurde, setzte sich auf Agarplatten fort und verstärkte sich im Falle der Cadmiumtoleranz sogar. Die Überexpression von *CePCS* führte in beiden Linien zu einer vollständigen Komplementation des cadmiumhypersensitiven Phänotyps der *cad1-3* Mutante (Abb. 37), während letztere, verglichen mit dem Wachstum unter Kontrollbedingungen, eine starke Wachstumsreduktion um 80 % aufwies. Die starke Überexpressionslinie 7|2|2 zeigte sogar ein signifikant verbessertes Wachstum relativ zum Wildtyp ($p < 0.001$). Analog zu Versuchen in Flüssigkultur vermittelte die Expression von *CePCS* keine Zinktoleranz.

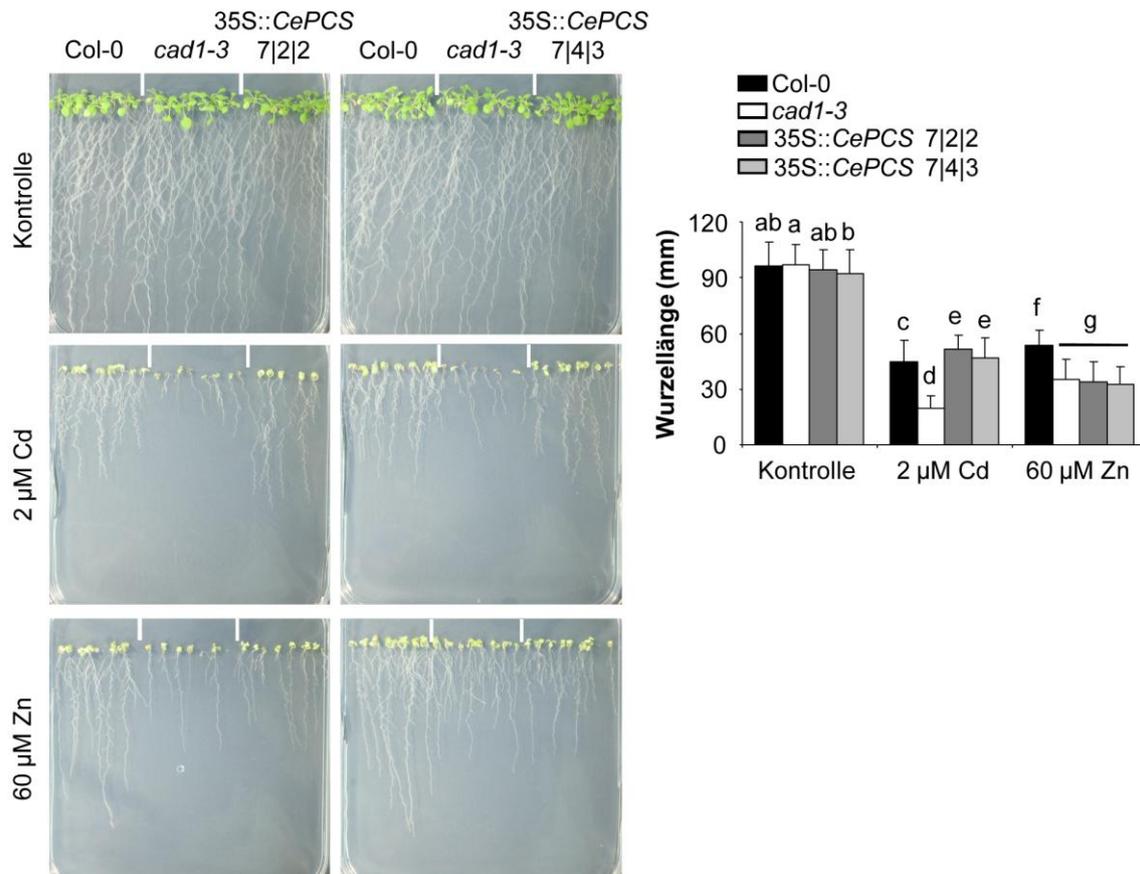


Abb. 37: Überexpression von *CePCS* in *cad1-3* komplementiert auch auf Agarplatte den cadmium-hypersensitiven Phänotyp. Keimlinge des *A. thaliana* Wildtyps Col-0, der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* und Überexpressionslinien mit einem starken (dunkelgrau) oder schwachen (hellgrau) *CePCS*-Proteinlevel wurden auf Agarplatten mit 1/10 Hoaglandmedium und 2 µM CdCl₂ bzw. 60 µM ZnCl₂ angezogen. Kontrollen enthielten keine zusätzlichen Schwermetalle. Nach 14-tägigem Wachstum unter Langtagbedingungen wurde die primäre Wurzellänge bestimmt. Daten repräsentieren Mittelwerte ± Stdbw. von 3 unabhängigen Experimenten mit 50-120 Individuen pro Linie und Bedingung. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels Zwei-Wege ANOVA und anschließender Gruppierung nach dem Tukey 95 % Konfidenzintervall.

Auch auf Agarplatten konnte durch die Expression der verkürzten *CePCS*, verglichen mit der *cad1-3* Mutante, kein Gewinn an Cd- oder Zinktoleranz erzielt werden (Abb. 38). Da beide Überexpressionslinien unter Kontrollbedingungen ein leicht, aber signifikant schlechteres, Wachstum aufwiesen, erfolgte eine prozentuale, auf das jeweilige Kontrollwachstum bezogene, Auswertung. Während Col-0 in Gegenwart beider Schwermetalle um ca. 50 % im Wachstum inhibiert war, zeigte *cad1-3* die bereits bekannte hypersensitive Antwort mit einer Reduktion der Wurzellänge um 80 % bzw. 65 % für Cd und Zn. Dieser Unterschied war höchst signifikant ($p < 0.001$). In Gegenwart beider Schwermetalle unterschieden sich die $35S::CePCS^+$ -Linien dabei nicht von der Mutante.

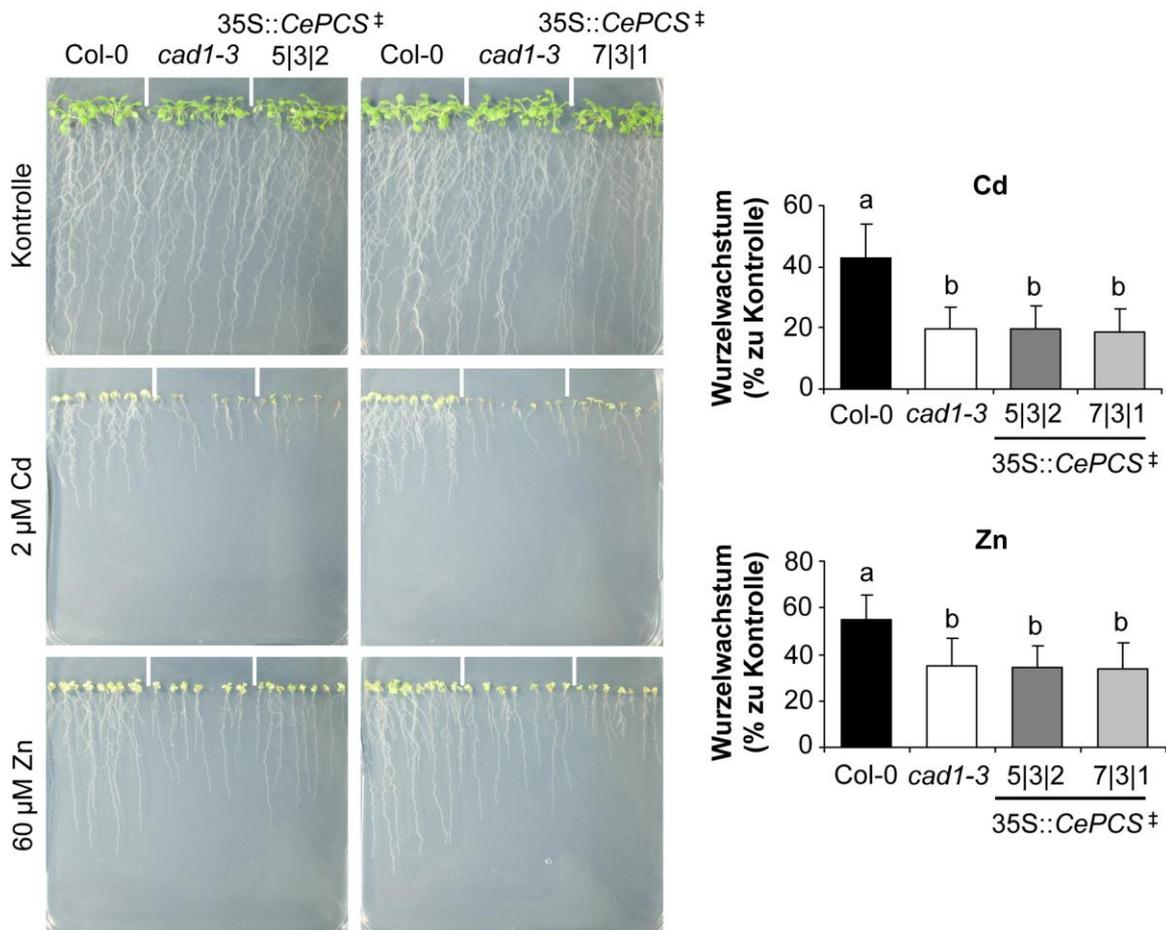


Abb. 38: Überexpression einer verkürzten *CePCS*-Variante in *cad1-3* führt auch auf Agarplatten nicht zur Komplementation des Zn- und cadmiumhypersensitiven Phänotyps. Keimlinge des *A. thaliana* Wildtyps Col-0, der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* und der *CePCS* Überexpressionslinien mit einer verkürzten Proteinvariante wurden auf Agarplatten mit 1/10 Hoaglandmedium und 2 µM CdCl₂ bzw. 60 µM ZnCl₂ angezogen. Kontrollen enthielten keine zusätzlichen Schwermetalle. Nach 14-tägigem Wachstum unter Langtagbedingungen wurde die primäre Wurzellänge bestimmt. Daten repräsentieren Mittelwerte ± Stdabw. von 3 unabhängigen Experimenten mit 41-120 Individuen pro Linie und Bedingung. Prozentwerte wurden transformiert und mittels Ein-Wege ANOVA statistisch ausgewertet und anhand des post-hoc Tukey-Tests ($p < 0.05$) gruppiert.

3.3.3 Transpeptidaseaktivität *in planta*

Die phänotypische Bewertung der Metalltoleranz liefert einen indirekten Hinweis auf die Transpeptidaseaktivität. Um diese aber direkt nachvollziehen zu können, erfolgte eine Analyse der PC-Gehalte in adulten Pflanzen, die zur Generierung höherer Biomasse mehrere Wochen in Flüssigkultur angezogen wurden. Nach siebentägiger Inkubation mit einer niedrigen Cadmiumdosis von 0.5 µM CdCl₂, welche auch für *cad1-3* in diesem Alter der Pflanzen nicht toxisch ist und somit mögliche Nebeneffekte durch akute Vergiftung ausgeschlossen werden konnten, erfolgte die PC-Analyse von Wurzel- und Blattmaterial (Abb. 39).

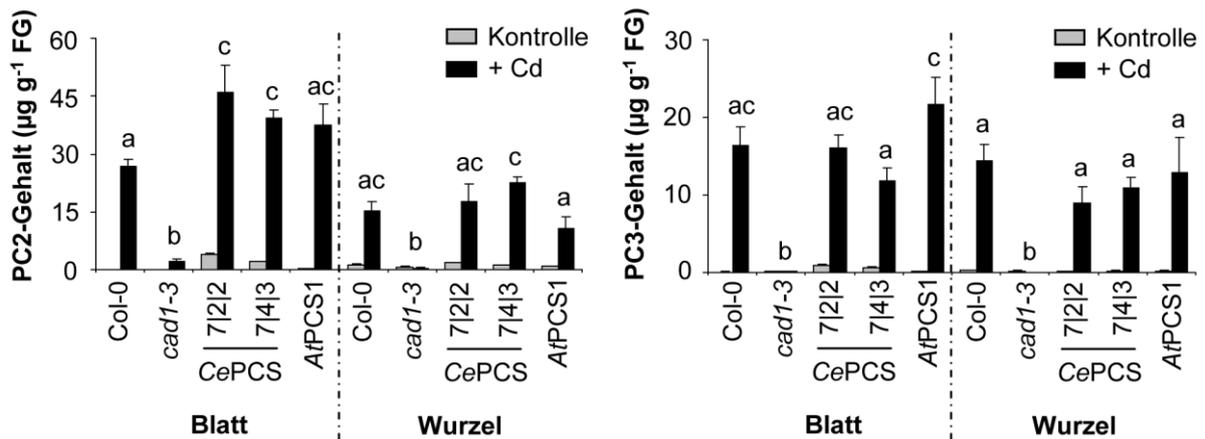


Abb. 39: Analyse der PCS-Transpeptidaseaktivität *in planta*. Pflanzen des *A. thaliana* Wildtyps Col-0, der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* sowie der *CePCS* und *AtPCS1* Überexpressionslinien im Mutantenhintergrund wurden vor der Zugabe von 0.5 µM CdCl₂ für 7 ½ Wochen in flüssigem 1/10 Hoaglandmedium angezogen. Nach 7-tägiger Exposition mit Cd wurden Wurzeln und Blätter geerntet und PC-Level in mBrb-derivatisierten Extrakten mittels UPLC-ESI-QTOF-MS bestimmt. PC2- und PC3-Gehalte sind als Mittelwerte ± Stdbw. (n=3) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Ein-Wege ANOVA und Gruppierung der Daten anhand des Tukey 95 % Konfidenzintervalls.

Eine geringe Transpeptidaseaktivität in Form von PC2-Bildung trat in allen Linien sowohl in Wurzeln als auch in Blättern ohne Schwermetallzugabe auf. Dieses basale Level an Aktivität war allerdings in Blättern der 35S::*CePCS* Linien 7|2|2 und 7|4|3 am höchsten. In Wurzeln war diese geringe PC2-Menge gleichbleibend zwischen Wildtyp und den Überexpressionslinien. Zudem konnte nur in Blättern der *CePCS* Linien PC3 oberhalb des LLOQ nachgewiesen werden, während in allen anderen Linien nur Signale unterhalb des LLOD erhalten wurden. Durch Zugabe von Cd erfolgte in allen Linien mit Ausnahme der *cad1-3* Mutante eine deutliche Aktivierung der PC-Synthese. Hierbei waren die PC2-Gehalte in Blättern der *CePCS* Linien sogar signifikant höher als im Wildtyp. In Wurzeln konnte nur in der schwachen *CePCS* Linie 7|4|3 ein höherer PC2-Gehalt festgestellt werden. Langkettigeres PC3 war in Blättern und Wurzeln des Wildtyps und der *CePCS* Linien gleichmäßig vertreten. Nur in der *AtPCS1* Überexpressionslinie konnte verglichen mit Col-0 signifikant mehr PC3 in Blättern detektiert werden. Dieser Trend war bereits in Flüssigkultur und auf Erde beobachtet worden (vgl. Abb. 32, 33). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass beide *CePCS* Linien gleiche Mengen an PCs enthielten, unabhängig vom Proteinexpressionslevel. Eine funktionierende Transpeptidaseaktivität in Pflanzen, die *CePCS* überexprimieren, konnte somit nachgewiesen werden.

Die Analyse der PC-Gehalte in Linien mit verkürzter *CePCS* ergab das durch Metalltoleranztests erwartete Ergebnis (Abb. 40). Es konnten keine signifikanten Unterschiede im PC2-Gehalt zwischen *cad1-3* und den 35S::*CePCS*[±] Linien gefunden werden. Zwar waren nach Cadmiumexposition doppelt so hohe PC2-Mengen in Wurzeln der Überexpressionslinien zu finden, dieser Unterschied war aber nicht signifikant. PC3 oberhalb des LLOD konnte weder in *cad1-3* noch in den 35S::*CePCS*[±] Linien nachgewiesen werden.

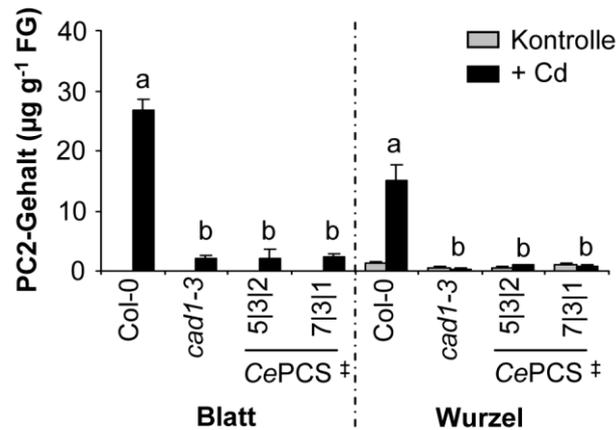


Abb. 40: Verkürzte CePCS-Varianten zeigen keine PC-Bildungsaktivität *in planta*. Pflanzen des *A. thaliana* Wildtyps Col-0, der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* sowie der *CePCS* Überexpressionslinien im Mutantenhintergrund, die eine verkürzte PCS-Variante exprimieren, wurden, wie in Abb. 39 beschrieben, angezogen und auf ihre PC-Gehalte untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte ebenfalls mittels Ein-Wege ANOVA und Gruppierung der Daten anhand des Tukey 95 % Konfidenzintervalls.

3.3.4 Peptidaseaktivität *in planta*

Eine mögliche physiologische Rolle der PCS-Peptidaseaktivität wurde in der Literatur in Verbindung mit der angeborenen Immunantwort von Pflanzen auf nichtwirtsspezifische Elicitoren von Pathogenen diskutiert. Hierbei soll die PCS am Abbau von Indolglucosinolaten beteiligt sein, die Teil einer Signaltransduktionskaskade sind, die zwischen der Erkennung des bakteriellen Flagellins und der Verstärkung der Zellwand in Form von Callosedeposition liegt [244].

3.3.4.1 Callosedeposition

Zur Auslösung der angeborenen Immunantwort in Folge von Bakterienbefall genügt eine hochkonservierte 22 Aminosäuren umfassende Sequenz des bakteriellen Flagellins, abgekürzt Flg22 [278,279]. Clay *et al.* [244] berichteten innerhalb eines Screenings verschiedenster Mutantenlinien, dass durch "Knock-out" der *AtPCS1* keine Callosedeposition mehr als Antwort auf Flg22-Behandlung stattfindet. Der Grund hierfür wurde auf eine fehlende Peptidaseaktivität der *AtPCS1* zurückgeführt. Um zu überprüfen, ob die Expression von *CePCS* die Calloseantwort in *cad1-3* wiederherzustellen vermag, wurde dieser Assay etabliert (Forschungsmodul 2009 Martin Möckel, Lehrstuhl Pflanzenphysiologie). Im ursprünglichen Protokoll nach Clay *et al.* [244] erfolgte die Anzucht der Keimlinge in MS-Medium. Da über eine mögliche Abhängigkeit der Callosedeposition von der Anwesenheit von Schwermetallen spekuliert wurde, und dies zu einem späteren Zeitpunkt näher untersucht werden sollte, erfolgte die Etablierung des Calloseassays im Hoaglandmedium. Dies geschah, um einer möglichen Interferenz von Schwermetallionen mit den, im MS-Medium enthaltenen höheren Ionenkonzentrationen vorzubeugen (vgl. Abschnitt 3.1.1).

Zu neun Tage alten Keimlingen wurde Flg22 zugegeben, um Callosedeposition zu induzieren. Nach 24-stündiger Induktion wurde dann, nach Fixierungs-, Wasch- und Färbeschritten, Callosedeposition in Kotyledonen der Keimlinge untersucht. Als Negativkontrolle diente die Zugabe von DMSO, welches als Lösungsmittel für das Flg22-Peptid diente. Zunächst erfolgte ein Vergleich der Callosedeposition nach Induktion mit einem Flg22-Peptid unterschiedlicher Reinheitsgrade. Nicht aufgereinigtes Peptid stammte aus einer Festphasenspeptidsynthese von Kooperationspartnern (IPB, Halle). Zusätzlich wurde ein Peptid verwendet, das industriell synthetisiert und anschließend aufgereinigt wurde.

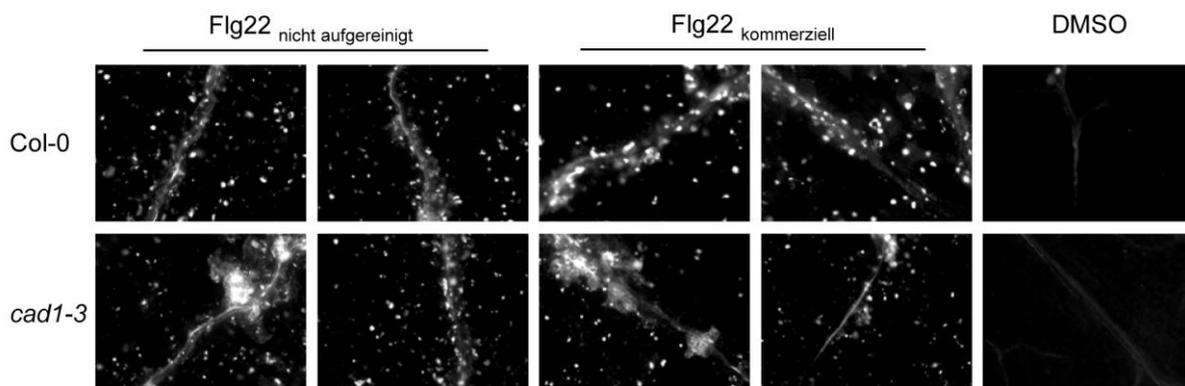


Abb. 41: Callosedeposition in *cad1-3* tritt unabhängig von der Reinheit des verwendeten Elicitors auf. Keimlinge des *A. thaliana* Wildtyps Col-0 und der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* wurden nach 24-stündiger Exposition mit dem Flg22-Peptid auf Callosedeposition in Keimblättern untersucht. Vor Induktion erfolgte die Anzucht für 9 d in ½ Hoaglandmedium unter Langtagbedingungen. Verglichen wurde die Callosedeposition nach Induktion mit Flg22-Peptiden unterschiedlicher Reinheitsstufen. Links: Peptid nach Festphasensynthese ohne weitere Aufreinigung; Rechts: aufgereinigtes Peptid (BioLux GmbH). Die DMSO-Behandlung erfolgte als Negativkontrolle.

Es zeigte sich, dass der Reinheitsgrad des verwendeten Flg22-Peptids keinen Einfluss auf das Auftreten bzw. die Stärke der Callosedeposition hatte (Abb. 41). Überraschenderweise zeigten sowohl der Wildtyp als auch die *cad1-3* Mutante eine starke Callosedeposition. Die Negativkontrolle mit DMSO war allerdings frei von Callospoten. Dies beweist, dass weder das verwendete Lösungsmittel zu einer systemischen Auslösung von Callosebildung führte, noch durch mechanische Verletzung der Keimlinge eine Verstärkung der Zellwand in Form von Callosebildung auftrat.

Da die Callosebildung in *cad1-3* widersprüchlich zu Ergebnissen von Clay *et al.* [244] ist, wurden zusätzlich zwei weitere Mutantenlinien mitgeführt, *myb51* und *cyp81F2*, die ebenfalls als Teil der Signaltransduktionskaskade als Antwort auf Flg22-Erkennung identifiziert wurden. Des Weiteren erfolgte die Anzucht nicht nur im Hoaglandmedium, sondern analog zu Clay *et al.* [244] auch im MS-Medium (Abb. 42). Es wurde nicht aufgereinigtes Peptid zur Induktion verwendet, da aus Abbildung 41 hervorgeht, dass der Reinheitsgrad des Flg22-Peptids keinen Einfluss auf die Stärke der Callosedeposition hatte. Keimlinge aller drei Mutanten zeigten nach Anzucht im Hoaglandmedium deutliche Callosedeposition, die der im Wildtyp vergleichbar war (Abb. 42A). Zwar gab es vereinzelt

auch Keimlinge, die weitestgehend frei von Callospots waren, die Mehrzahl der untersuchten Kotyledonen wies jedoch eine starke Callosebildung auf.

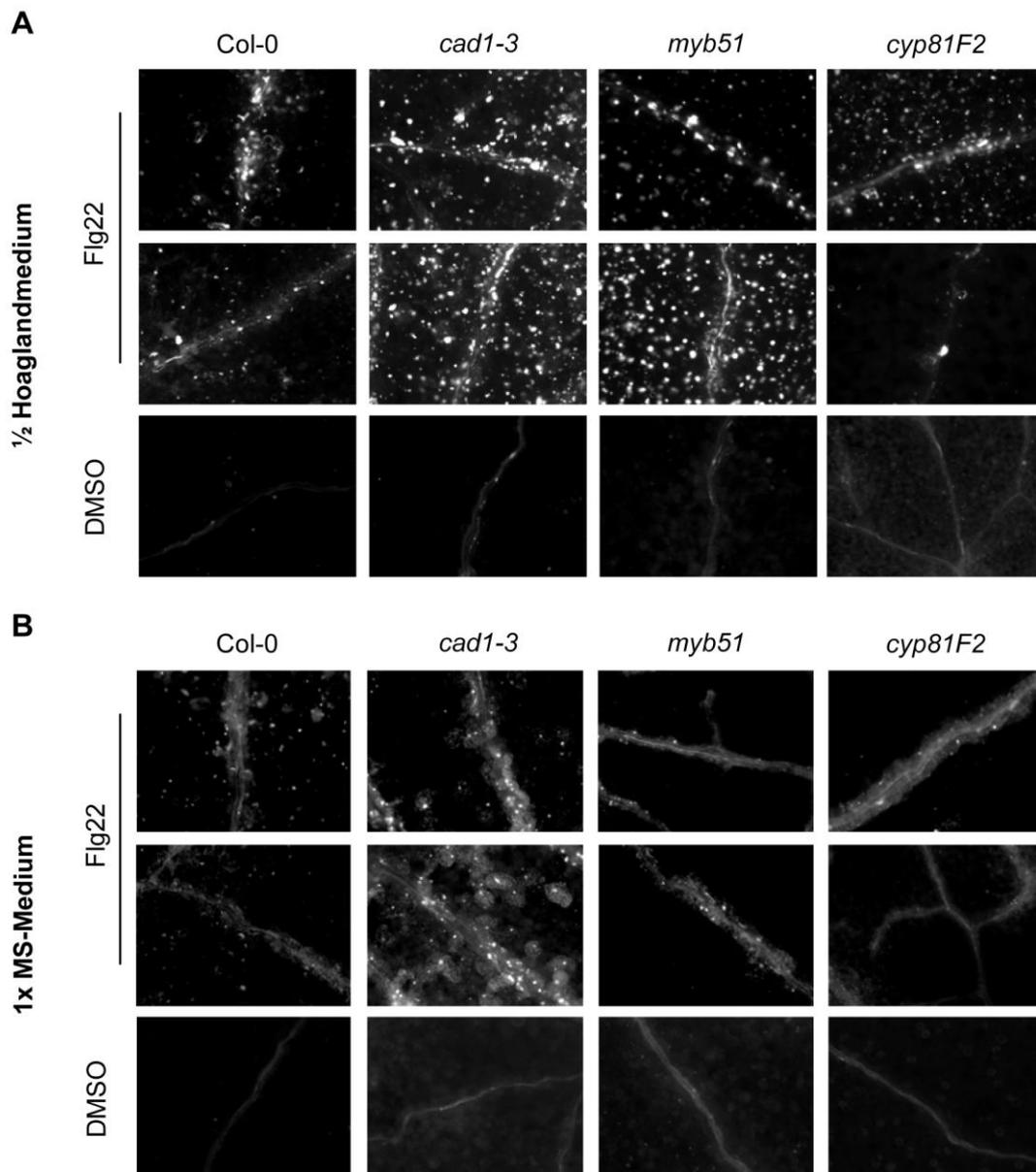


Abb. 42: Anzuchtmedium beeinflusst Callosedeposition verschiedener Mutanten der MAMP-aktivierten Signaltransduktion als Antwort auf Flg22-Erkennung. Keimblätter der *A. thaliana* Keimlinge des Wildtyps Col-0, der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* sowie Mutanten des Transkriptionsfaktors *myb51* und des Cytochroms P450 *cyp81F2*, die ebenfalls Teil der Signaltransduktionskaskade zwischen MAMP-Erkennung und Callosedeposition sind, wurden auf ihre Callosebildung nach 24-stündiger Induktion mit Flg22 untersucht. Keimlinge wurden zuvor 9 d in (A) 1/2 Hoaglandmedium oder (B) 1x MS-Medium angezogen. DMSO-Behandlung diente als Negativkontrolle.

Die Negativkontrollen aller vier untersuchten Linien hingegen waren frei von Callose. Der Vergleich von Keimlingen, die im Standard MS-Medium angezogen wurden (Abb. 42B), zeigte, dass das Anzuchtmedium einen Einfluss auf die Immunantwort ausübt. Bei Verwendung des MS-Mediums war in den Mutanten *myb51* und *cyp81F2* keine Callosedeposition zu beobachten. Zwar traten einzelne Callospots im Bereich des zentralen Leitbündels auf, die in Negativkontrollen fehlten,

allerdings war dies auch bei Clay *et al.* [244] zu sehen. Dennoch war, anders als bei Clay *et al.* [244] beschrieben, auch in *cad1-3* Callosedeposition zu beobachten, die der im Wildtyp vergleichbar war. Um zu überprüfen, ob diese unerwartete Callosebildung in *cad1-3* doch auf eine Verunreinigung des Flg22-Peptids zurückzuführen oder Folge einer falschen Behandlung war, wurde zusätzlich der Wildtyp Ws-0 mitgeführt (Abb. 43).

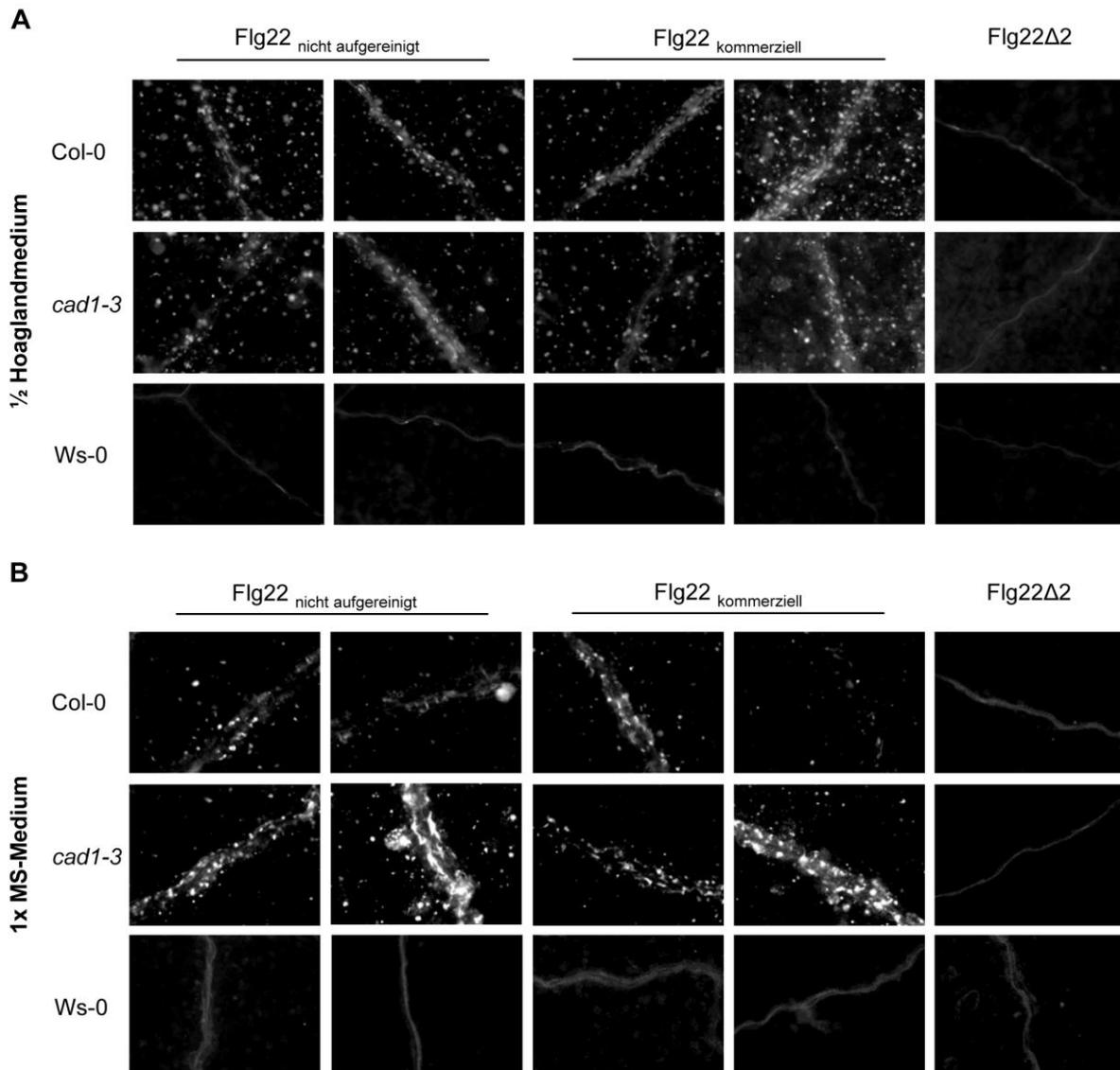


Abb. 43: Callosedeposition in *cad1-3* ist nicht Folge einer systemische Antwort durch Verunreinigung des Flg22-Peptids. Untersuchung der Callosedeposition in Kotyledonen von *A. thaliana* Keimlingen des Wildtyps Col-0, der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* sowie des Wildtyps Ws-0, der einen Defekt im FLS2-Rezeptor trägt, welcher für die Erkennung des Flg22-Peptids verantwortlich ist. Keimlinge wurden für 9 d in (A) ½ Hoaglandmedium oder (B) 1x MS-Medium angezogen bevor eine Zugabe von aufgereinigtem oder nicht aufgereinigtem Flg22-Peptid erfolgte. Die Zugabe von Flg22Δ2, einem Peptid welchem zwei hochkonservierte Reste fehlen, die essentiell für die Erkennung sind, diente als Negativkontrolle.

Ws-0 besitzt einen Defekt im FLS2-Rezeptor, welcher für die Erkennung des Flg22-Peptids verantwortlich ist [279,280]. Sollte ein anderer Elicitor als Flg22 für die Callosebildung in *cad1-3* verantwortlich sein, so müsste auch Ws-0 Callospots aufweisen. Aus Abbildung 43 geht hervor,

dass Keimlinge der *cad1-3* Mutante, die im Hoagland- oder im MS-Medium angezogen wurden, Callosedeposition ähnlich dem Wildtyp Col-0 aufwiesen. Dies war unabhängig vom Reinheitsgrad des verwendeten Flg22-Peptids zu beobachten. In beiden Medien wies Ws-0, welche insensitive gegenüber Flg22 ist, keine Callospots auf. Als zusätzliche Negativkontrolle für alle Linien wurde anstelle von Flg22 ein Peptid zugegeben, Flg22 Δ 2, welchem zwei hochkonservierte Reste fehlen, die für die Erkennung essentiell sind. Kotyledonen, die mit letzterem behandelt wurden, wiesen ebenfalls keine Callose auf. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Peptide, Bedingungen und Behandlungen korrekt waren, und die von Clay *et al.* [244] postulierte Rolle der AtPCS1 in der MAMP-gesteuerten Callosedeposition nicht zutreffend ist.

3.3.4.2 *Phytophthora infestans* Inokulationsversuche

Wie sich im vorangegangenen Abschnitt herausstellte, kann die Funktionalität der PCS-Peptidaseaktivität *in planta* nicht anhand der Callosebildung als Antwort auf Flg22-Behandlung nachvollzogen werden. Daher wurde auf die Beobachtung zurückgegriffen, dass Blätter von *cad1-3*, die mit Zoosporen des Oomyceten *P. infestans* in Berührung kamen, den gleichen Phänotyp aufwiesen wie Mutanten der Glycosidhydrolase PEN2, deren Dysfunktion zu einem Verlust der Penetrationsresistenz führt. Blätter der *A. thaliana pen2* Mutante weisen nach Kontakt mit *P. infestans* Sporen einen lokal begrenzten Zelltod auf, während der Wildtyp Col-0 keinen sichtbaren Phänotyp zeigt [245,281]. Dies lieferte einen weiteren Hinweis darauf, dass AtPCS1 einen Beitrag in der Nichtwirtsresistenz von Pflanzen leistet, der unabhängig von der Transpeptidaseaktivität scheint. Bereits früher wurde eine mögliche Rolle durch Isolation der *pen4* Mutante angedeutet, welche eine ursächliche Mutation in AtPCS1 (Lim & Somerville; unveröffentlicht) trägt, woraus der Verlust der Penetrationsresistenz resultierte.

Um zu überprüfen, ob Überexpressionslinien, die CePCS in Volllänge oder der verkürzten Variante exprimieren, diesen Penetrationsphänotypen komplementieren können, wurden Sporensuspensionen von *P. infestans* auf Blätter adulter Pflanzen getropft und die Zellintegrität drei Tage nach der Inokulation mittels Trypanblaufärbung überprüft (Abb. 44). Als Positivkontrolle wurde die Überexpressionslinie 35S::AtPCS1 3|1|3 mit untersucht. Diese Versuche wurden in Kooperation mit dem IPB Halle durchgeführt (Lore Westphal und Dierk Scheel; IPB Halle).

Drei Tage nach *P. infestans*-Inokulation konnte eine deutliche Trypanblaufärbung auf Blättern von *cad1-3* festgestellt werden, die dem Wildtyp Col-0 fehlte. Dies ist ein Indikator dafür, dass in Bereichen des Blattes, die in Berührung mit dem Pflanzenpathogen kamen, Zellen perforiert waren, der Farbstoff aufgenommen werden konnte, wodurch eine starke Blaufärbung entstand. Weder die Expression der verkürzten CePCS noch die des Volllänge-Proteins führte zu einer Komplementation des Penetrationsphänotyps der *cad1-3* Mutante, was durch die starke Blaufärbung der Blätter

deutlich wird. Überraschenderweise konnte auch durch Expression der *AtPCS1* in *cad1-3* dieser Phänotyp nicht aufgehoben werden.

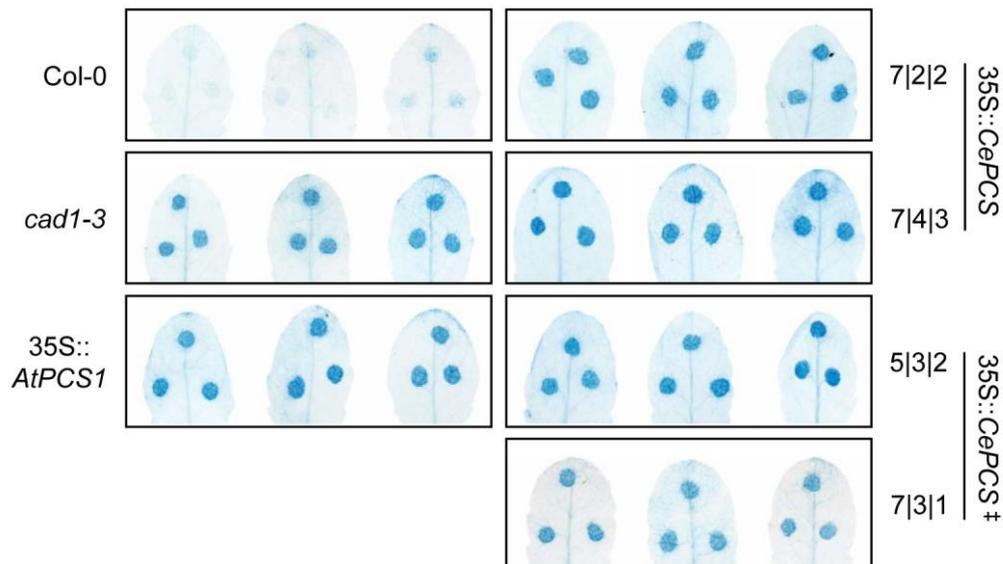


Abb. 44: Überexpression von *CePCS* oder *AtPCS1* in *cad1-3* führt nicht zu einer Komplementation des Penetrationsphänotyps, der durch das Pflanzenpathogen *P. infestans* ausgelöst wird. Blätter adulter *A. thaliana* Pflanzen des Wildtyps Col-0, der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* sowie der Überexpressionslinien im Mutantenhintergrund unter Kontrolle des 35S-Promotors mit einem starken (7|2|2) bzw. schwachen (7|4|3) Proteinlevel der *CePCS* bzw. schwacher Expression einer verkürzten *CePCS*-Variante (mit ‡ gekennzeichnet) wurden mit *P. infestans* (5×10^5 Zoosporen ml^{-1}) beimpft. Gezeigt ist eine Trypanblaufärbung der Blätter 3 Tage nach der Infektion. Eine *AtPCS1* Überexpressionslinie wurde als mögliche Positivkontrolle mitgeführt. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Experimenten.

3.4 Der ABC-Transporter PEN3

Dem ABC-Transporter PEN3, auch ABCG36 und PDR8 genannt, wird in der Literatur eine Rolle in der Nichtwirtsresistenz sowie der Dürre- und Salztoleranz und dem Transport einer Auxinvorstufe zugesprochen [249,282–284]. Zu diesen physiologisch diversen Funktionen kommt noch hinzu, dass PEN3 auch als Effluxtransporter für Cadmiumionen fungiert [285]. Demnach wird PEN3 mit zwei Funktionen in Verbindung gebracht, Nichtwirtsresistenz und Cadmiumdetoxifizierung, die ebenfalls von *AtPCS1* ausgefüllt werden. Darin begründet lag das Interesse, die physiologische Parallelität zwischen beiden Proteinen weiter aufzuklären. Zu diesem Zweck wurden die vier bereits isolierten Mutantenaliele [249], *pen3-1* bis *pen3-4*, auf ihre erweiterte Schwermetalltoleranz untersucht. Zudem wurde eine Kreuzung aus *cad1-3* und *pen3-1* generiert, um zu überprüfen, ob beide Proteine in einem physiologischen Weg arbeiten.

3.4.1 Genotypisierung der vier *pen3* Mutantenallele

Die bereits isolierten *pen3* Mutantenallele [249] wurden bestellt, vermehrt und genotypisiert, um sicherzustellen, dass es sich zum einen um die korrekten Mutanten und zum anderen um homozygote Samenbatches handelt (Abb. 45).

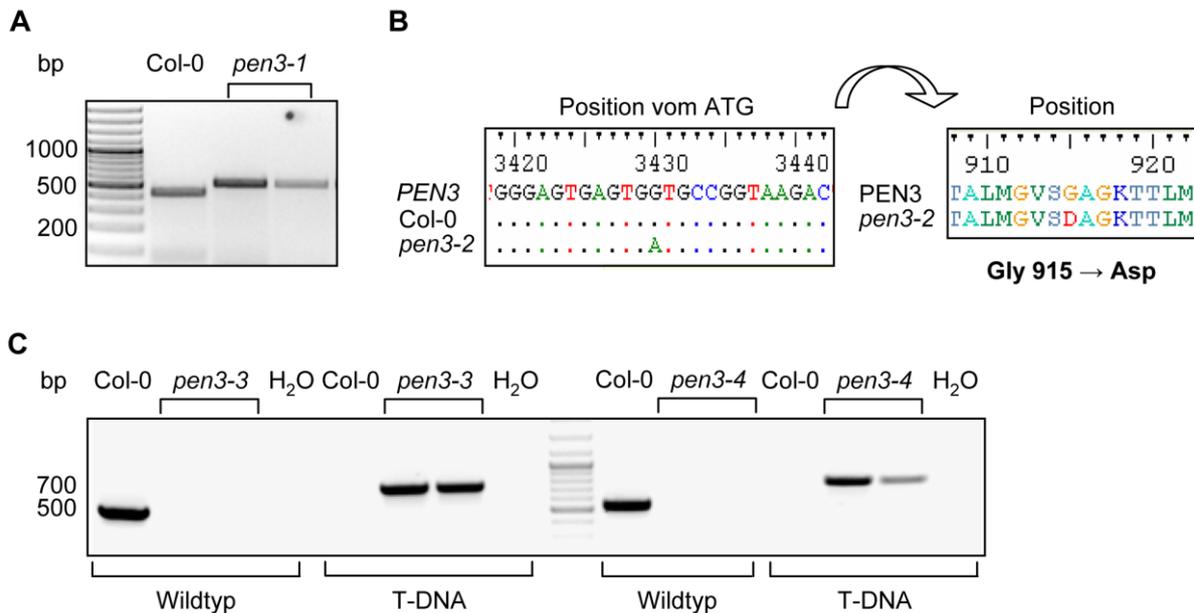


Abb. 45: Genotypisierung der vier *pen3* Mutantenallele. (A) CAPS-Markeranalyse zur Genotypisierung von *pen3-1*. Durch die Punktmutation in *pen3-1* geht die *HphI*-Schnittstelle verloren. (B) Sequenzierung zur Bestätigung der Punktmutation in *pen3-2*. (C) Die T-DNA Insertionen in *pen3-3* und *pen3-4* wurden anhand PCR-basierter Detektion von Wildtyp- bzw. T-DNA Sequenzen nachgewiesen. Das Wildtypallel wurde anhand der Primerkombination *pen3-3* bzw. *pen3-4 fw/rev* nachgewiesen, während der T-DNA spezifische Nachweis mittels der Kombination *pen3-3 rev/LBa1* bzw. *pen3-4 fw/LBa1* erfolgte. Hierbei bindet *LBa1* an die "Left Border"-Region in der T-DNA. Die Primersequenzen sind Tab. 3 zu entnehmen.

Der von Stein *et al.* [249] annotierte Nukleotidaustausch in *pen3-1* von G zu A an Position 1419, ausgehend vom A des Startcodons in der genomischen Sequenz von *PEN3* (At1g59870), führt zu einem Verlust der *HphI*-Schnittstelle. Durch eine CAPS-Markeranalyse (Abb. 45A) konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei der vorliegenden Mutante um eine homozygote *pen3-1* Linie handelt. Des Weiteren wurde für *pen3-2* ein Nukleotidaustausch an Position 3335 (wieder ausgehend vom A des Startcodons in der genomischen Sequenz) angegeben, der zu einem Aminosäureaustausch des Gly 915 zu Ser führen soll. Läge dieser Aminosäureaustausch vor, müsste allerdings Nukleotid 3429 (G zu A) mutiert sein. Zur Überprüfung der Sequenz wurde ein Teilstück der genomischen DNA, welches beide Positionen enthält, amplifiziert und sequenziert (Abb. 45B). Hierbei zeigte sich, dass die tatsächliche Punktmutation in *pen3-2* an Position 3430 (G zu A) vorliegt, wodurch ein Austausch von Gly 915 zu Asp erfolgte.

Die T-DNA Insertionen in *pen3-3* und *pen3-4* liegen laut Datenbank (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) nahe dem 5'-Ende der genomischen DNA, ca. an den Positionen 360 bzw. 229

ausgehend vom A des Startcodons. Mittels der Amplifizierung genspezifischer bzw. T-DNA spezifischer Sequenzen konnte bestätigt werden, dass es sich bei den vorliegenden Allelen um homozygote T-DNA Insertionslinien handelt (Abb. 45C).

3.4.2 PEN3 Mutanten sind Zn- und cadmiumhypersensitiv

Wie bereits erwähnt wurde PEN3 eine Rolle im Efflux von Cadmiumionen zugeschrieben. RNAi-Linien, mit deutlich verringertem PEN3-Expressionslevel, enthielten mehr Cd in Wurzeln und Blättern von Keimlingen als der Wildtyp und waren hypersensitiv gegenüber diesem Schwermetall [285]. Da sich Zn und Cd chemisch sehr ähneln und die physiologische Parallelität zu *AtPCS1* aufgeklärt werden sollte, wurden die *pen3* Allele auf ihre Zinktoleranz getestet. Zusätzlich erfolgte auch ein Test auf Cadmiumtoleranz, da sich die publizierten Ergebnisse nur auf RNAi-Pflanzen beschränkten.

3.4.2.1 Metalltoleranz der *pen3* Allele in Flüssigkultur

Zunächst wurden die *pen3* Pflanzen hinsichtlich ihrer Zn- und Cadmiumtoleranz in Flüssigkultur im Keimlingsstadium getestet (Abb. 46). Da insbesondere *pen3-2* und *pen3-4* ein signifikant schlechteres Wachstum relativ zum Wildtyp unter Kontrollbedingungen aufwiesen (Abb. 46A), war eine Berechnung prozentualer Werte erforderlich. Die *AtPCS1* Mutante *cad1-3* wurde als Referenz mitgeführt. Der starke zink- und cadmiumhypersensitive Phänotyp der *cad1-3* Mutante mit einer Reduktion der Wurzellänge zu 80 % bzw. 95 % des Kontrollwachstums zeigte, dass die Testbedingungen für beide Schwermetalle geeignet waren. In Anwesenheit von Cd im Medium zeigten alle *pen3* Allele ein signifikant kürzeres Wurzelwachstum als der Wildtyp (Abb. 46B, D). Allerdings war der Grad der hypersensitiven Antwort gegenüber Cd wesentlich niedriger als für *cad1-3* beobachtet ($p < 0.001$ für alle Vergleiche).

Bei Zinküberschuss konnte ebenfalls, mit Ausnahme von *pen3-3* verglichen mit Col-0, für alle anderen Linien ein reduziertes Wachstum festgestellt werden. Auch hier fiel die hypersensitive Reaktion von *cad1-3* stärker aus als für *pen3* Allele ($p < 0.001$ für alle Vergleiche). Nichtsdestotrotz weisen diese Experimente darauf hin, dass PEN3 nicht nur eine Rolle in der Cd- sondern auch in der Zinkentgiftung spielt.

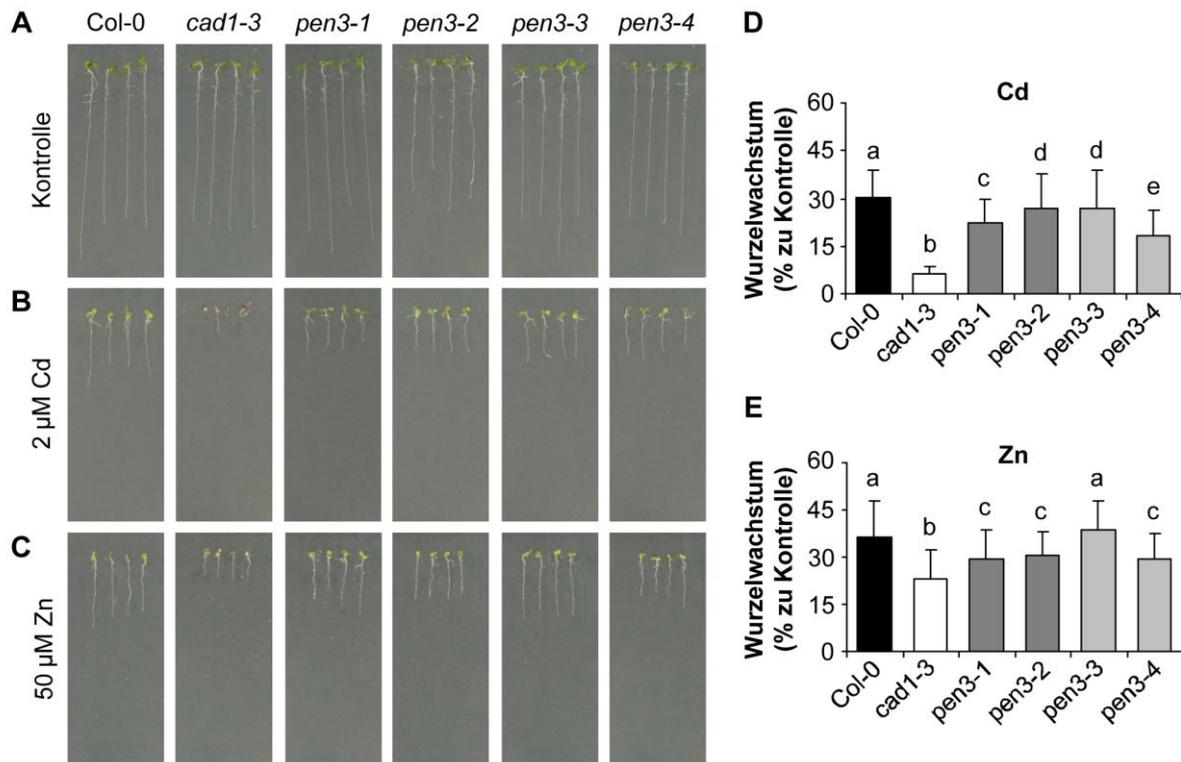


Abb. 46: A. thaliana PEN3 Mutanten sind zink- und cadmiumhypersensitiv. Keimlinge des Wildtyps Col-0 und der vier Mutantenallele des ABC-Transporters PEN3 wurden in flüssigem 1/10 Hoaglandmedium in Anwesenheit von (B) 2 μM CdCl_2 oder (C) 50 μM ZnCl_2 angezogen. Die Kontrollen (A) enthielten keine zusätzlichen Schwermetalle. Die *AtPCS1* Mutante *cad1-3* wurde als interne Kontrolle mitgeführt. Nach 7-tägigem Wachstum unter Langtagbedingungen wurde die primäre Wurzellänge der Keimlinge bestimmt (D,E). Für photographische Zwecke wurden die Keimlinge auf Agarplatten platziert. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Stdabw. von 10 unabhängigen Experimenten mit 100-160 analysierten Individuen pro Linie und Bedingung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Ein-Wege ANOVA und die Daten wurden anhand des Tukey 95 % Konfidenzintervalls gruppiert. Prozentwerte wurden vor statistischer Auswertung anhand der Arkussinusquadratwurzelfunktion transformiert.

3.4.2.2 Metalltoleranz der *pen3* Allele auf Agarplatten

Zusätzlich zum flüssigen Keimlingsassay wurde die Schwermetalltoleranz der *pen3* Allele auf Agarplatten getestet. Auch hier war eine Berechnung des prozentualen Wachstums bezogen auf das Wachstum ohne Schwermetallzugabe notwendig, da sich *pen3-2* und *pen3-4* unter Kontrollbedingungen signifikant vom Wildtyp unterschieden (Abb. 47A). In diesem Testsystem konnten Ergebnisse aus flüssigen Keimlingskulturen bestätigt werden. Für alle *pen3* Allele wurde ein metallhypersensitiver Phänotyp sowohl gegenüber Cd als auch gegenüber Zn festgestellt. Dies drückte sich in einem signifikant reduzierten Wurzelwachstum bzw. Keimlingsgewicht aus. Während *pen3-3* bei Zinküberschuss, wie im Flüssigsystem auch, keine verringerte Wurzellänge verglichen mit Col-0 aufwies, war das Keimlingsfrischgewicht dieser Linie signifikant reduziert. Des Weiteren konnten leichte Unterschiede in der Stärke der hypersensitiven Antwort zwischen Punktmutanten und T-DNA Insertionslinien beobachtet werden. In Gegenwart beider Schwermetalle verfügten Punktmutanten über kürzere Wurzeln als T-DNA Insertionslinien. Zwar war der Unterschied zwischen

pen3-1 und *pen3-3* bzw. *pen3-4* bei Cadmiumzugabe nicht signifikant, die Tendenz aber ebenfalls erkennbar (Abb. 47B). Ein gegensätzlicher Trend trat beim Keimlingsgewicht auf. Hier besaßen die T-DNA Insertionslinien *pen3-3* und *pen3-4* verglichen mit den Punktmutanten leicht verringerte Gewichte. Allerdings war auch diese Tendenz nicht für alle Vergleiche signifikant.

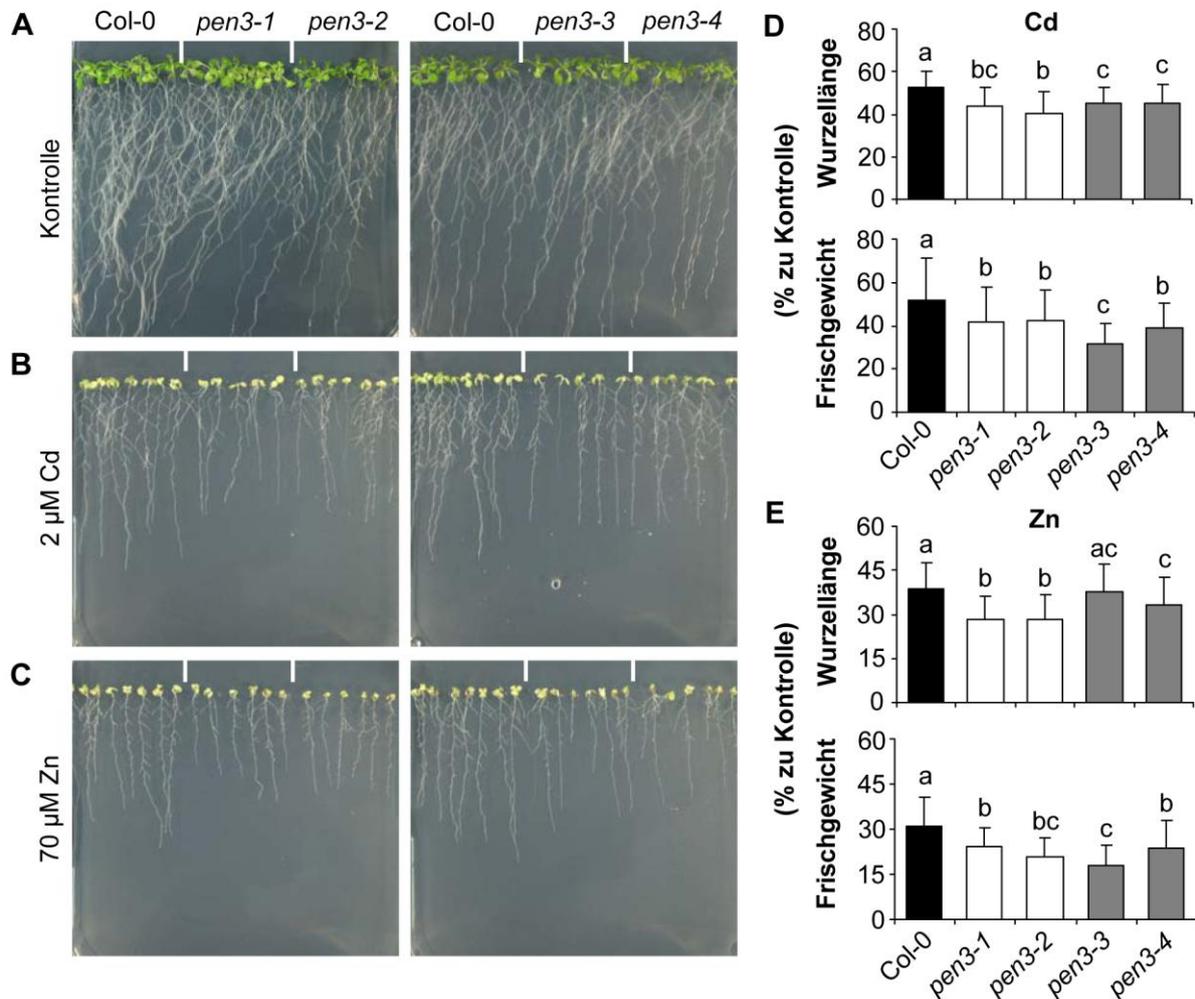


Abb. 47: *A. thaliana* *PEN3* Mutanten, die Punktmutationen oder T-DNA Insertionen tragen, unterscheiden sich in der Stärke des zink- und cadmiumhypersensitiven Phänotyps. Keimlinge des Wildtyps Col-0 sowie der *pen3* Allele (weiß: Punktmutanten; grau: T-DNA Insertionslinien) wurden in 1/10 Hoaglandmedium auf Agarplatten ohne Schwermetalle (A) oder in Anwesenheit von (B) 2 μM CdCl_2 oder (C) 70 μM ZnCl_2 gekeimt und inkubiert. Nach 14-tägigem Wachstum erfolgte die Bestimmung der primären Wurzellänge und des Keimlingsfrischgewichts (D,E). Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Stdabw. von 3 unabhängigen Experimenten mit 45-130 Individuen pro Linie und Bedingung. Prozentwerte wurden vor Ein-Wege ANOVA transformiert. Die Gruppierung der Daten erfolgte anhand des Tukey 95 % Konfidenzintervalls.

3.4.3 Identifizierung einer homozygoten *cad1-3 pen3-1* Doppelmutante

Die bisher erhaltenen Ergebnisse, wie auch Berichte in der Literatur, weisen darauf hin, dass *PEN3* und *PCS1* mehrere Funktionen gemeinsam haben. Um zu überprüfen, ob beide Proteine eventuell in einem Stoffwechselweg z.B. dem Transport von PC-Metall-Komplexen

zusammenarbeiten, wurden die Einzelmutanten *pen3-1* und *cad1-3* gekreuzt. Metalltoleranztests mit einer Doppelmutante sollten Aufschluss über eine mögliche Zusammenarbeit geben.

Zunächst war die Identifizierung einer homozygoten Linie notwendig, um aussagekräftige Ergebnisse erhalten zu können. Hierzu wurden ca. 50 Samen der F2-Generation von fünf unabhängigen Kreuzungen in Gegenwart von 0.8 µM CdCl₂ auf Agarplatten mit 1/10 Hoaglandmedium ausgelegt und für acht Tage unter Kurztagbedingungen selektiert. Diese geringe Cadmiumkonzentration wurde gewählt, um einer Vergiftung möglicher Kandidaten vorzubeugen. Alle Individuen, die eine *cad1-3* vergleichbare oder kürzere Wurzellänge aufwiesen, wurden anschließend zur Regeneration auf Kontrollplatten überführt und für weitere 15 Tage im Kurztag inkubiert. Anschließend erfolgte ein Transfer der ca. 60 Kandidaten auf Erde zur Samengenerierung. Blattmaterial von zunächst 18 Kandidatenpflanzen wurde geerntet, genomische DNA isoliert und auf Homozygotie an beiden Loci untersucht (Abb. 48). Doppelmutantenkandidaten wurden mit einem x versehen und durchnummeriert, wobei die erste Zahl für die unabhängige Kreuzung und die zweite für das jeweilige Individuum steht.

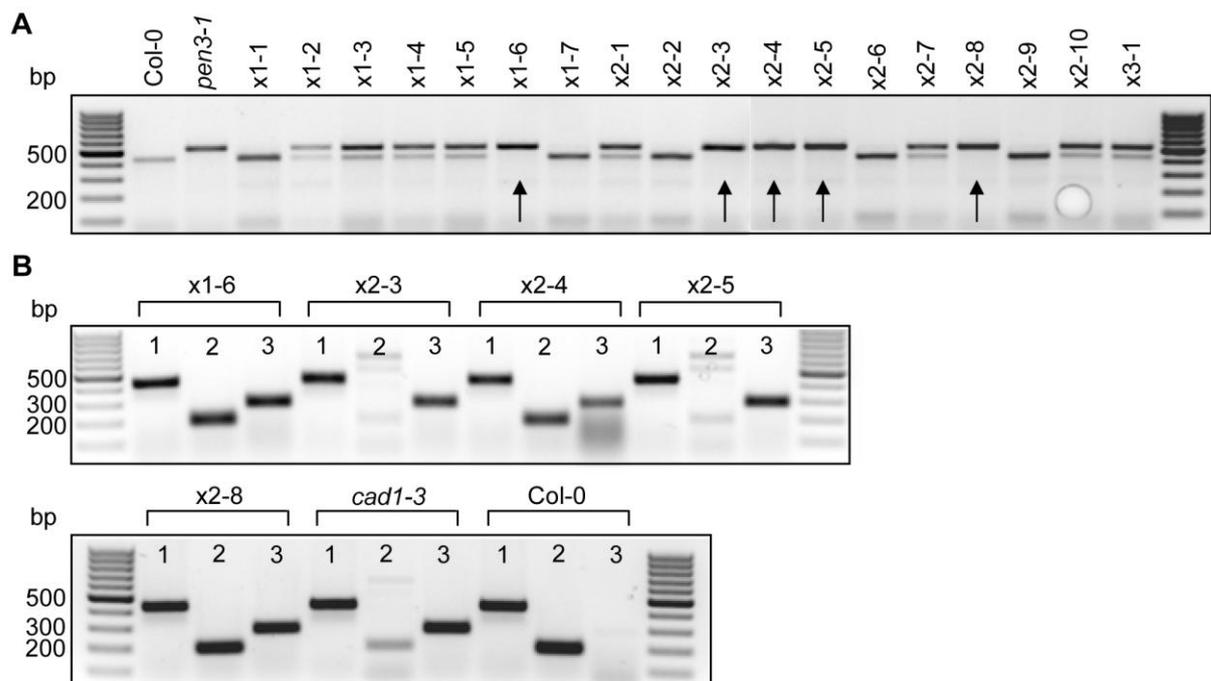


Abb. 48: Identifizierung einer homozygoten *cad1-3 pen3-1* Doppelmutante. (A) Vorselektierte F2-Individuen einer Kreuzung aus *cad1-3* und *pen3-1* wurden mittels PCR und anschließender CAPS-Markeranalyse auf Homozygotie für die in *pen3-1* vorliegende Punktmutation untersucht, die zum Verlust der *HphI*-Schnittstelle führt. Die mit Pfeilen markierten Individuen wurden als homozygot für das *pen3-1* Allel identifiziert und auf ihren Genotyp hinsichtlich der *PCS1* getestet. (B) PCR-basierte Identifizierung homozygoter Individuen für das *cad1-3* Allel. Zahlen geben folgende Primerkombinationen an: Ansatz 1: *AtPCS1 fw/rev* (Kontrolle für intakte gDNA); Ansatz 2: *AtPCS1 rev/cad1-3 fw* (Detektion Col-0 Allel); Ansatz 3: *AtPCS1 fw/cad1-3 rev* (Detektion *cad1-3* Allel). Die Primersequenzen sind Tab. 3 zu entnehmen.

Für die Genotypisierung des *pen3-1* Allels wurde der von Stein *et al.* [249] publizierte und in Abschnitt 3.4.1 bereits beschriebene CAPS-Marker verwendet. Von den 18 untersuchten Kandidaten

konnten fünf homozygote Individuen für das *pen3-1* Allel identifiziert werden (Abb. 48A). Diese fünf Kandidaten wurden anschließend mittels „*mismatch-PCR*“ auf die für *cad1-3* charakteristische Punktmutation untersucht (Abb. 48B). Von den fünf Kandidaten konnten zwei Linien, x2-3 und x2-5, als homozygot für den zweiten Locus identifiziert werden. Eine abschließende Sequenzierung beider Doppelmutantenkandidaten bestätigte, dass es sich um homozygote Linien für das *pen3-1* und *cad1-3* Allel handelt.

3.4.4 Doppelmutante *cad1-3 pen3-1* zeigt einen additiven Effekt in Zinkhypersensitivität

Die identifizierten Doppelmutantenlinien sowie die Einzelmutanten und der Wildtyp wurden nun Metalltoleranztests in Flüssigkultur im Keimlingsstadium unterworfen. Eine mögliche additive hypersensitive Antwort der Doppelmutanten, verglichen mit den Einzelmutanten, würde darauf hinweisen, dass beide Proteine in unterschiedlichen physiologischen Wegen der Schwermetall-entgiftung fungieren. Zunächst wurde die Metalltoleranz der aufgezählten Linien bei Zinküberschuss untersucht (Abb. 49).

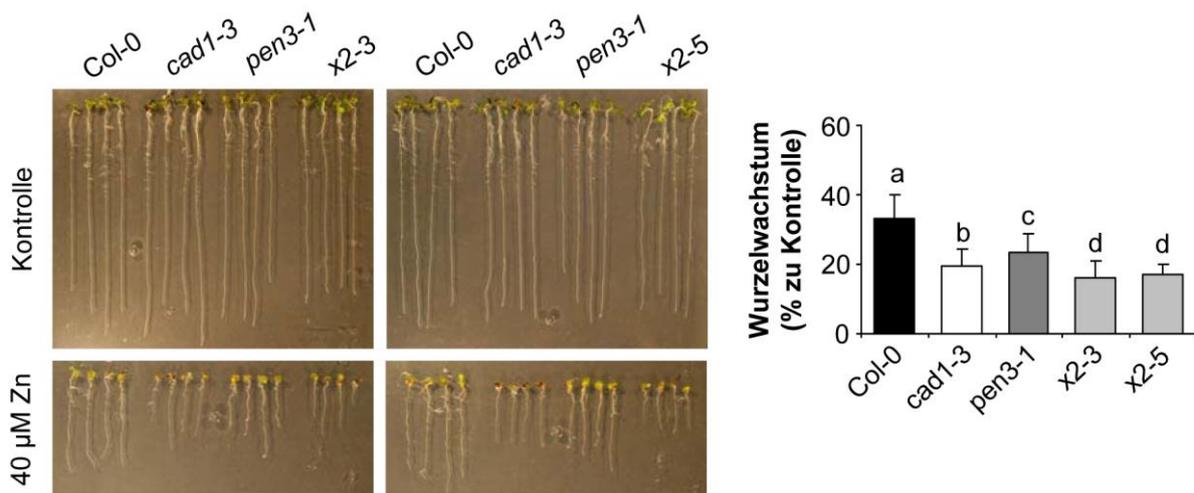


Abb. 49: Doppelmutanten, die aus einer Kreuzung von *cad1-3* und *pen3-1* resultieren, zeigen einen additiven Effekt in der Zinkhypersensitivität. Keimlinge des Wildtyps Col-0, der Einzelmutanten (weiß/ dunkelgrau) sowie der *cad1-3 pen3-1* Doppelmutanten (hellgrau) wurden in flüssigem 1/10 Hoaglandmedium gekeimt und unter Langtagbedingungen mit 40 μM ZnCl₂ oder ohne zusätzliche Schwermetalle angezogen. Nach 7 d wurde die primäre Wurzellänge bestimmt. Die Keimlinge wurden für photographische Zwecke auf Agarplatten platziert. Daten repräsentieren Mittelwerte ± Stdbw. von 4 unabhängigen Experimenten mit 50-75 analysierten Individuen pro Linie und Bedingung. Daten wurden statistisch mittels Ein-Wege ANOVA ausgewertet und anhand des post-hoc Tukey-Tests gruppiert (p<0.05). Prozentwerte wurden vor statistischer Analyse mittels Arkussinus-quadratwurzelfunktion transformiert.

In Anwesenheit erhöhter Zinkmengen im Medium zeigten sich, wie erwartet, die bereits bekannten hypersensitiven Phänotypen der *cad1-3* und *pen3-1* Mutanten, wobei der Effekt erneut stärker für *cad1-3* ausfiel. Interessanterweise wiesen beide Doppelmutantenlinien, x2-3 und x2-5, signifikant kürzere Wurzeln als die jeweiligen Einzelmutanten auf.

Der Test auf eine additive hypersensitive Reaktion der Doppelmutante gegenüber Cd war im vorliegenden Flüssigsystem nicht möglich. Dies ist darin begründet, dass *pen3-1* bis zu einer Konzentration von 2 μM CdCl_2 nur einen schwachen Effekt zeigte. Bei dieser Cadmiummenge jedoch war *cad1-3* bereits zu 95 % im Wachstum inhibiert (vgl. Abb. 46), so dass es nicht möglich wäre einen möglichen additiven Effekt der Doppelmutante nachzuweisen. Aus diesem Grund erfolgten weitere Metalltoleranztests auf Agarplatten (Abb. 50).

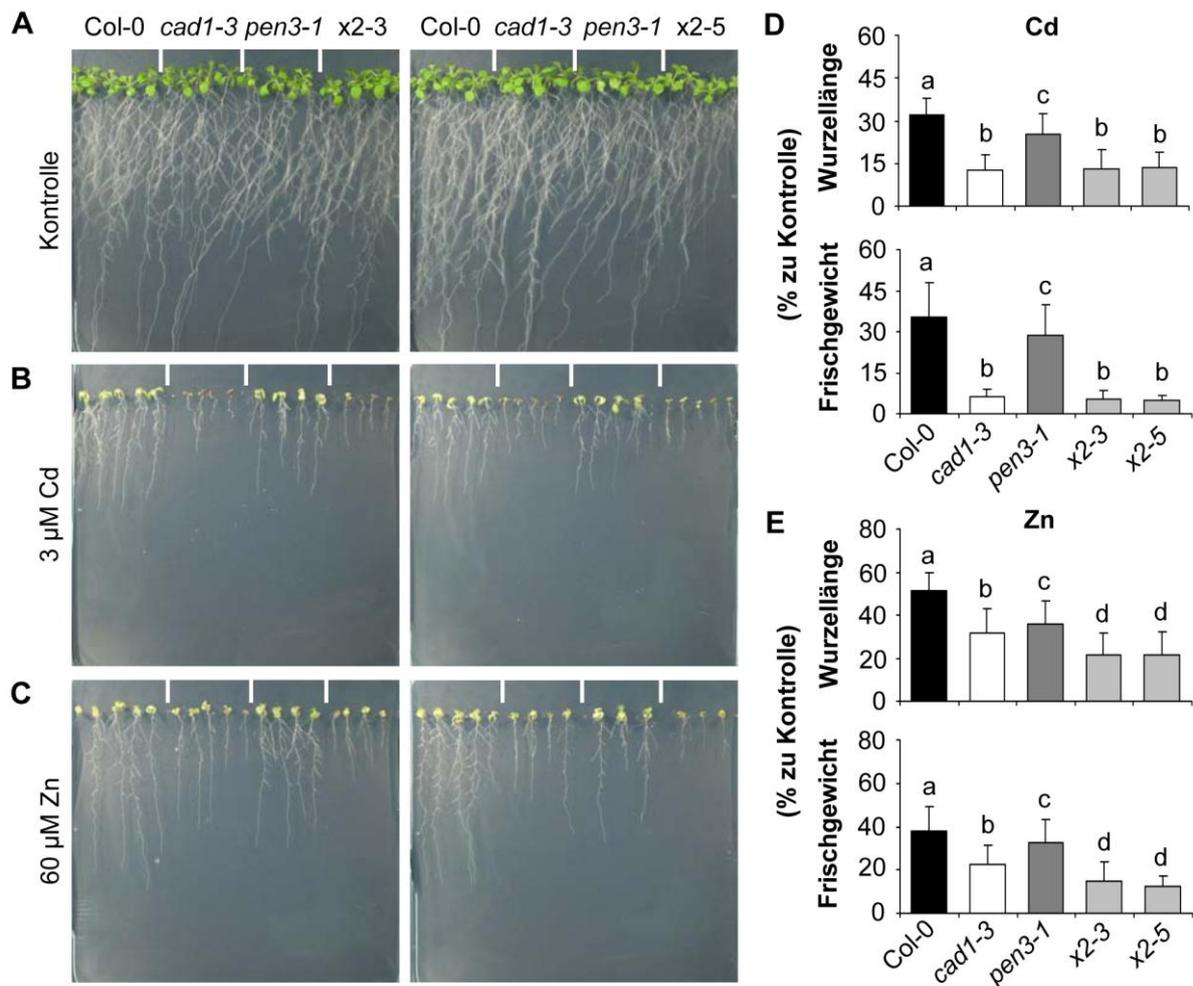


Abb. 50: Doppelmutanten von *cad1-3* und *pen3-1* weisen einen additiven Effekt in Zn- aber nicht Cadmiumhypersensitivität auf. Keimlinge des *A. thaliana* Wildtyps Col-0, der Einzelmutanten *cad1-3* und *pen3-1* (weiß/dunkelgrau) sowie der aus einer Kreuzung der Einzelmutanten resultierenden Doppelmutante (hellgrau) wurden auf Agarplatten mit 1/10 Hoaglandmedium gekeimt und angezogen. Die primäre Wurzellänge und das Keimlingsfrischgewicht wurden nach 14-tägigem Wachstum in Anwesenheit von (B,D) 3 μM CdCl_2 oder (C,E) 60 μM ZnCl_2 bestimmt. Kontrollen enthielten keine zusätzlichen Schwermetalle. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Stdabw. von 4 unabhängigen Experimenten mit 45-145 Individuen pro Linie und Bedingung. Prozentwerte wurden mit Arkussinusquadratwurzelfunktion transformiert und statistisch mittels Ein-Wege ANOVA und anschließendem Tukey-Test ($p < 0.05$) ausgewertet und gruppiert.

Da sich auch hier bei Kontrollpflanzen signifikante Unterschiede zwischen Doppelmutantenlinien und Wildtyp ergaben, wurde das Wachstum bei Schwermetallzugabe auf das Wachstum unter Kontrollbedingungen bezogen. Wie schon im Flüssigsystem beobachtet, konnte für beide

Doppelmutantenlinien auch in diesem Testsystem verglichen mit den Einzelmutanten eine additive hypersensitive Reaktion bei Zinküberschuss festgestellt werden (Abb. 50C, E). Hierbei waren die Unterschiede zwischen den Linien x2-3 und x2-5 und den Einzelmutanten für beide Parameter, Wurzellänge und Keimlingsfrischgewicht, höchst signifikant mit $p < 0.001$ für alle Vergleiche. Ein anderes Bild ergab sich bei Cadmiumzugabe. Hier konnte weder für die Wurzellänge noch für das Frischgewicht ein reduzierter Wert verglichen mit *cad1-3* gefunden werden (Abb. 50B, D). Dies weist auf die Funktion beider Proteine innerhalb eines physiologischen Weges hin.

3.4.5 *PEN3* Mutanten besitzen veränderte Zinkakkumulation

Mit einer Störung der Schwermetallentgiftung geht meist eine Veränderung der Metallakkumulation innerhalb der Pflanze einher. Daher wurden *pen3-1* und *pen3-3*, stellvertretend für Punktmutanten und T-DNA Insertionslinien, zusammen mit den Doppelmutanten auf ihre Metallgehalte untersucht (Abb. 51).

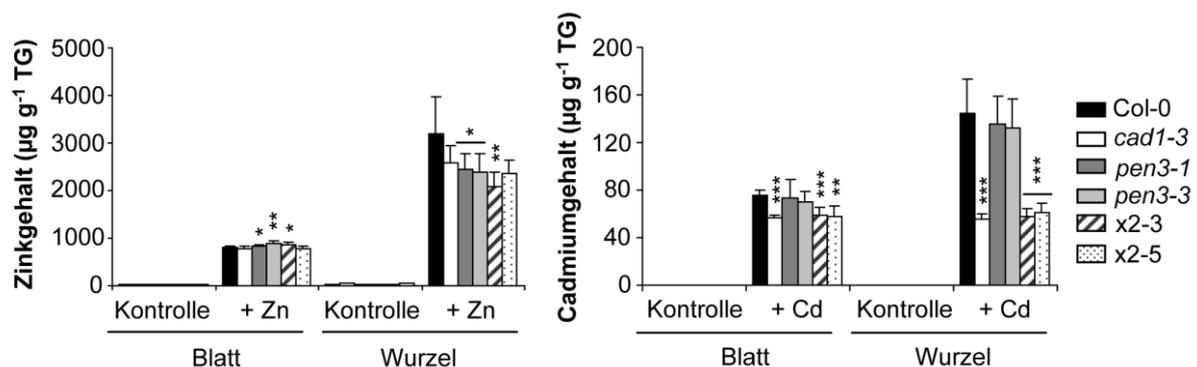


Abb. 51: *A. thaliana* *PEN3* Mutanten weisen veränderte Zn- nicht aber Cadmiumakkumulation auf. Der Wildtyp Col-0, die *PEN3* Punktmutante *pen3-1* bzw. T-DNA Insertionslinie *pen3-3* sowie die *AtPCS1* Mutante *cad1-3* und Doppelmutanten x2-3 und x2-5, die aus einer Kreuzung von *cad1-3* und *pen3-1* resultieren, wurden für 5 Wochen in flüssigem 1/10 Hoaglandmedium unter Kurztagbedingungen angezogen. Nach 7-tägiger Exposition mit 15 µM ZnSO₄ oder 0.5 µM CdCl₂ wurde Wurzel- und Blattmaterial von 3 Pflanzen gepoolt und mittels ICP-OES auf Metallgehalte untersucht. Daten geben Mittelwerte ± Stdbw. von 2 unabhängigen Experimenten mit 5-7 Proben pro Linie und Bedingung an. Statistisch signifikante Unterschiede zum Wildtyp sind mit Sternchen markiert (t-test: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Anders als von Kim *et al.* für *PEN3*-RNAi-Pflanzen berichtet [285], konnte bei Cadmiumzugabe für *pen3* Mutanten keine zum Wildtyp erhöhte Cadmiummenge detektiert werden. Dies war gleichermaßen der Fall für Wurzeln und Blätter. Nur *cad1-3* enthielt signifikant niedrigere Cadmiumgehalte in beiden Geweben. Die Doppelmutanten wiesen gleiche Cadmiumlevel wie *cad1-3* auf. Im Gegensatz dazu akkumulierten beide *pen3* Mutanten bei Zinküberschuss 25 % weniger Zn in Wurzeln als der Wildtyp. Dieser Unterschied war signifikant. Dementsprechend konnten in Blättern beider Linien leicht höhere Zinkmengen als in Col-0 gefunden werden. Analog dazu verhielt es sich mit der Doppelmutante x2-3. Auch die zweite Doppelmutantenlinie x2-5 sowie *cad1-3* akkumulierten

weniger Zn in Wurzeln bei Zinküberschuss. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. In Blättern wiesen beide Linien dem Wildtyp vergleichbare Zinkgehalte auf.

3.4.6 PEN3 spielt nur untergeordnete Rolle in der Arsentoleranz

Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass PEN3 und PCS1 sowohl eine Rolle in der Cd- als auch der Zinkentgiftung spielen. Des Weiteren legen die vorangegangenen Ergebnisse mit der Doppelmutante den Schluss nahe, dass beide Proteine im gleichen Weg der Cadmiumdetoxifizierung agieren. Da PCS1 in höheren Pflanzen den Hauptweg für die Cd- wie auch Arsenentgiftung darstellt, wurden die *pen3* Mutanten auch auf ihre Arsenat- und Arsenittoleranz getestet. Dies diente der Überprüfung, wie weit die physiologische Parallelität zwischen beiden Genen reicht (Abb. 52).

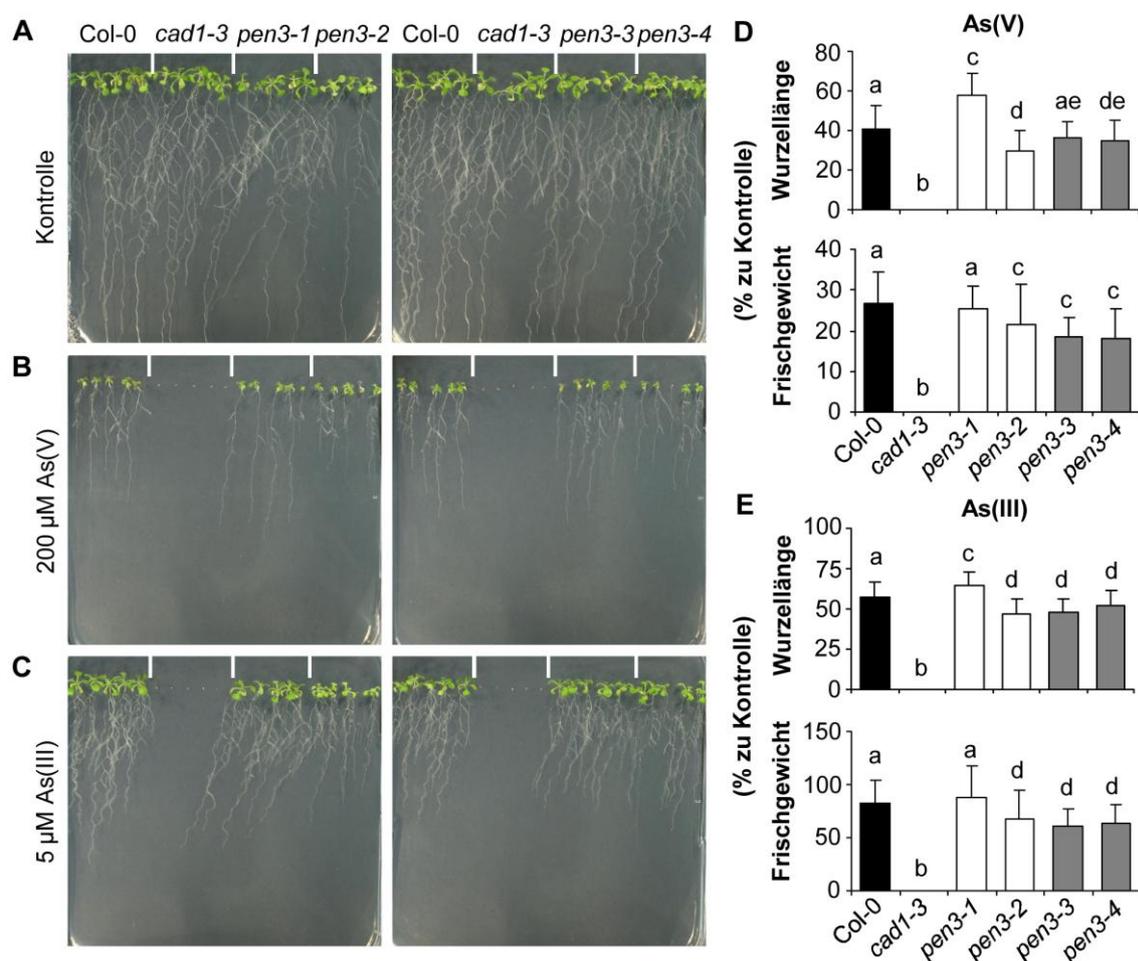


Abb. 52: Trennung der Parallelität zwischen *PEN3* und *PCS1* Mutanten in hypersensitiver Antwort gegenüber As: *PEN3* leistet nur geringen Beitrag zur Arsentoleranz. Keimlinge des *A. thaliana* Wildtyps Col-0, der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* sowie der vier Mutantenallele des ABC-Transporters *PEN3* wurden auf Agarplatten mit 1/10 Hoaglandmedium gekeimt und angezogen. Nach 14-tägigem Wachstum in Gegenwart von (B,D) 200 µM As(V) oder (C,E) 5 µM As(III) wurde die primäre Wurzellänge und das Keimlingsfrischgewicht (D,E) bestimmt. Kontrollen waren frei von As. Daten geben Mittelwerte ± Stdbw. von mindestens 2 unabhängigen Experimenten mit 40-110 Individuen pro Linie und Bedingung an. Prozentwerte wurden vor Ein-Wege ANOVA transformiert. Daten wurden anhand des post-hoc Tukey-Tests ($p < 0.05$) gruppiert.

Die verwendete Arsenat- bzw. Arsenitkonzentration wurde gewählt, da sie zu einer ca. 50 %-igen Wachstumsreduktion des Wildtyps führte. Deutlich zu sehen ist, dass bei fehlender PCS1 kein Pflanzenwachstum möglich war (Abb. 52B, C). Gleichzeitig zeigte sich, dass *pen3-2* wie auch die T-DNA Insertionslinien *pen3-3* und *pen3-4* verglichen mit dem Wildtyp eine leichte Inhibierung sowohl im Wurzelwachstum als auch in der generellen Biomasseproduktion aufwiesen. Überraschenderweise konnte für *pen3-1* sowohl bei Arsenat- als auch bei Arsenitzugabe ein signifikant längeres Wurzelwachstum beobachtet werden, während das Keimlingsfrischgewicht dem Wildtyp glich. Die anderen drei *pen3* Allele verhielten sich allerdings uniform, so dass davon ausgegangen werden kann, dass PEN3 an der Arsenentgiftung beteiligt ist, wenngleich auch nur in sehr untergeordneter Funktion.

4 Diskussion

Die PC-Synthese ist einer der Hauptschritte bei der Entgiftung von Cd, As und Hg [131]. Trotz dieser Funktion bleibt die weite Verbreitung von *PCS* Genen und ihre konstitutive Expression ein Rätsel, zumal sie sogar in Organen wie Blättern auftritt, welche kaum jemals mit toxischen und nicht-essentiellen Schwermetallen in Kontakt kommen [220]. Tatsächlich wurde gezeigt, dass Komplexbildung mit PCs und reduziertem GSH in Wurzeln die Translokation toxischer Metalle in den Spross effizient verhindert [267,286]. Das anfangs erwähnte Phänomen kann noch auf die Existenz von zwei *PCS* Genen ausgedehnt werden, die scheinbar keinen Einzelfall in Genomen höherer Pflanzen darstellen (Abb. 24). Zwei zusätzliche Funktionen von PCS könnten ihre weite Verbreitung und konstitutive Expression erklären [225,236]. Zunächst einmal wurde PC-Synthese mit der Homöostase des essentiellen Mikroelements Zn in Verbindung gebracht [228,287]. Zweitens wurde für *AtPCS1* die Abspaltung des Gly von GS-Konjugaten gezeigt [233,243,288]. Diese zweite Funktion liegt möglicherweise der Rolle von *AtPCS1* in der angeborenen Immunantwort von *A. thaliana* Keimlingen zugrunde [244].

4.1 Die Rolle der *AtPCS1* in der Zinkhomöostase

4.1.1 Effekt verschiedener Testsysteme und Komponenten des Kulturmediums auf die Ausprägung von metallabhängigen Phänotypen

Die Beteiligung der PCS in der Zinkhomöostase stellt einen Erklärungsansatz für ihre weite Verbreitung und konstitutive Expression dar. Bisherige Hinweise auf eine solche Rolle konnten jedoch nur durch Korrelation von *PCS1* Transkripten und Zinkakkumulation in Pappeln bzw. durch Wachstum von *A. thaliana* Keimlingen auf Agarplatten bei Verwendung eines Mediums mit geringer Ionenstärke erhalten werden [228,287]. Einen weiteren Beleg lieferte die Detektion von PC-Bildung in Zellkulturen von sieben verschiedenen Pflanzenspezies bei Anwesenheit von physiologischen Zinkkonzentrationen im Medium [289]. Dennoch wurde in früheren Experimenten kein sichtbarer Phänotyp der *cad1-3* Mutante bei Zinküberschuss beobachtet. Allerdings wurde für diese Tests auch MS-Medium, welches eine hohe Ionenstärke aufweist, verwendet [227,167]. Ein zinkhypersensitiver Phänotyp für die *AtPCS1* Mutanten *cad1-3* und *cad1-6* konnte erstmals bei Verwendung des 1/10 Hoaglandmediums beobachtet werden, welches eine geringere Ionenstärke als MS-Medium besitzt, sowie bei Einsatz eines Agars mit niedriger Ionenbindungskapazität [228]. Im neu entwickelten flüssigen Keimlingsassay hingegen konnte der zinkhypersensitive Phänotyp sowohl im 1/10 Hoagland- als auch im 1/2 MS-Medium festgestellt werden (vgl. Abb. 6, 9). Versuche, den fehlenden Phänotyp im MS-Medium auf Platte durch Variation der Makroelementgehalte von Ca und Phosphat zu erklären, deren Konzentrationen die größten Unterschiede zwischen MS- und Hoaglandmedium

ausmachen, schlugen fehl. Zwar führte die schrittweise Erhöhung der Calciumkonzentration zu einer verminderten Ausprägung des zinkhypersensitiven Phänotyps im Hoaglandmedium und zusätzlich des cadmiumhypersensitiven Phänotyps im MS-Medium, dennoch war selbst im MS-Medium bei doppelter Calciumkonzentration der zinkhypersensitive Phänotyp der *cad1-3* Mutante noch zu beobachten. Demnach konnte, wie in der Literatur berichtet [263,264], ein genereller Schutz der Ca^{2+} -Ionen festgestellt werden. Dieser ist wahrscheinlich bedingt durch die konkurrierende Bindung an Zellwandkomponenten. Das Ausbleiben des zinkhypersensitiven Phänotyps auf Platte kann damit aber nicht erklärt werden. Der Verlust bzw. eine verminderte Ausprägung des sensitiven Phänotyps von *cad1-3* gegenüber Zn konnte im Hoaglandmedium nur in zwei einzelnen Versuchen beobachtet werden. Analysen der Elementgehalte des verwendeten Mediums mittels ICP-OES ergaben eine starke Phosphorkontamination in beiden Versuchen (vgl. Tab. 11 und Abb. 6B). Die Interferenz mit Phosphat ist demnach der wahrscheinlichste Faktor für das Ausbleiben des zinkhypersensitiven Phänotyps, da ein Überschuss im Medium nur zum Ausbleiben der Zn-, nicht aber der Cadmiumsensitivität führte. In Wurzeln von *A. halleri* konnte eine Kopräzipitierung von Zn und P in der äußeren Zellwand der Rhizodermis bei Zinküberschuss nachgewiesen werden. Dabei wurde ein stöchiometrisches Massenverhältnis von P und Zn gefunden, welches sich $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ annähert [161,163]. Die Bildung von unlöslichem Zinkphosphat würde somit dem Medium Zinkionen entziehen und die Hypersensitivität abschwächen. Die Vergleiche beider Medien in Flüssigkultur und das Auftreten des zinkhypersensitiven Phänotyps in beiden Medien legen den Schluss nahe, dass das Ausbleiben des Phänotyps auf Agarplatten vielleicht ein Problem des Testsystems an sich ist. Zwei Möglichkeiten sind denkbar. Erstens wurden von Tennstedt *et al.* für die Verfestigung von Hoagland- und MS-Medium verschiedene Komponenten benutzt, Agar Typ A (mit geringer Ionenbindungskapazität) bzw. Gelrite [228]. Eventuell war letztere mit Phosphat kontaminiert, wodurch Zinkphosphat präzipitierte. Auch eine stärkere Bindung von Zn^{2+} an das anionische Polysaccharid Gelrite, verglichen mit Agar Typ A, wäre möglich. Die Folge wäre in beiden Fällen eine niedrigere Verfügbarkeit von Zinkionen und das Ausbleiben der hypersensitiven Reaktion von *cad1-3*. Zweitens kann im Plattensystem in direkter Umgebung der Wurzel ein lokaler Zinkgradient entstehen, welcher sensitiven Spezies das Wachstum ermöglicht. Im Flüssigsystem hingegen findet durch das Schwenken der Platten ein ständiger Flüssigkeitsaustausch an der Wurzeloberfläche statt, so dass sich ein Gradient bzw. eine Zone, in der weniger Ionen vorliegen, nicht entwickeln kann. Die hier erhobenen Daten schlagen demnach die Verwendung verschiedener Testsysteme für die Beurteilung der Metalltoleranz von Pflanzenlinien vor.

4.1.2 Experimente auf zinkkontaminierter Erde

Um zum einen die Beteiligung von PCS an der Zinkentgiftung in einem weiteren Testsystem zu bestätigen und zum anderen natürlichen Gegebenheiten näherzukommen, wurden *cad1* Mutanten auch auf artifiziell mit Zn kontaminierter Erde angezogen. Um eine mögliche Zinkdefizienz von Kontrollpflanzen zu vermeiden, wurde eine Konzentration von $60 \text{ mg Zn kg}^{-1}_{\text{Boden}}$ zugegeben. Böden mit Werten von weniger als $0.5\text{--}1.5 \text{ mg DTPA-extrahierbarem Zn pro kg Erde}$ gelten als potentiell zinkdefizient [255,290]. Zwar liegt der verwendete mineralische Boden über diesem Wert (vgl. Tab. 12), dennoch zeigten *A. thaliana* Pflanzen nach mehrwöchigem Wachstum auf dieser Erde eine leichte Zinkdefizienz auf molekularer Ebene (Lehrstuhl Pflanzenphysiologie, 2009, unveröffentlicht). Um ein verändertes, durch Zinkdefizienz bedingtes, Wachstum der Kontrollpflanzen zu vermeiden, wurde der Erde für Kontrollbedingungen zusätzliches Zn appliziert. Dies führte zu einem Wert von $20 \text{ mg DTPA-extrahierbarem Zn}$ (Tab. 13), so dass die bioverfügbare Zinkmenge deutlich erhöht wurde. HCl-extrahierbares Zn, also die Menge, die nicht irreversibel an Bodenpartikel gebunden ist, ergab einen Wert von $40 \text{ mg Zn kg}^{-1}_{\text{Boden}}$ und liegt damit unter dem Durchschnitt landwirtschaftlicher Nutzflächen von rund $55 \text{ mg Zn kg}^{-1}_{\text{Boden}}$ [7,20,290]. Somit scheint maximal die Hälfte des applizierten Zn für Pflanzen verfügbar zu sein. Für die künstlich mit $970 \text{ mg Zn kg}^{-1}_{\text{Boden}}$ kontaminierte Erde wurde ein Wert von $450 \text{ mg Zn kg}^{-1}_{\text{Boden}}$ mittels DTPA-Extraktion erhalten, was im mittleren Konzentrationsbereich für verschiedene natürlich kontaminierte Habitate liegt [290]. Die DTPA-Methode wurde für die Abschätzung der Phytoverfügbarkeit von Zn, Fe, Mn und Cu in potentiell defizienten, fast neutralen und kalkhaltigen Böden unter Nachahmung des Verhaltens grasartiger Pflanzen entwickelt [255]. Dabei konnten positive Korrelationen zwischen DTPA-extrahierbarem Zn und Zinkgehalten in Spross und Samen verschiedener Pflanzenspezies gefunden werden [291–293]. Allerdings hängt die Güte der Abschätzung der Metallverfügbarkeit einer Methode sowohl von der Pflanzenspezies als auch von den Bodenbeschaffenheiten ab, so dass nur eine Annäherung an die tatsächlichen Werte erreicht werden kann. Die Extraktionsmethode mit CaCl_2 soll die natürliche Bodenlösung simulieren [290]. Die Werte, die durch beide Extraktionsmethoden erhalten werden, zeigen einen großen Unterschied (vgl. Tab. 12, 13), so dass davon ausgegangen werden muss, dass nur ein geringer Teil des applizierten Metalls tatsächlich für die Pflanze verfügbar ist. Abgesehen von Zn lagen die mittels HCl extrahierten Metallgehalte für Mn, Co und Cu bei ca. 20 %, 10 %, und 5 % des europäischen Durchschnitts für Oberböden und im Fall von Ni bei 5 % des weltweiten Durchschnitts [290].

Nach 24-tägigem Wachstum auf dieser zinkkontaminierten Erde konnte die Beteiligung der PCS für die Zinkentgiftung bestätigt werden. Dies drückte sich in einem stark eingeschränkten Wachstum beider *AtPCS1* Mutanten aus, welches verglichen mit dem Wachstum der Kontrollpflanzen im Mittel zu 70 % reduziert war. Im Gegensatz dazu zeigte der Wildtyp Col-0 nur ein um 40 % beeinträchtigtes Wachstum nach 24 d (Abb. 13A, B). Dabei wiesen *cad1* Mutanten typische Vergiftungssymptome wie

Chlorosen junger Blätter und Wachstumsreduktion auf [290]. Unter Kontrollbedingungen wiesen die Pflanzen Zinkwerte zwischen 120-145 mg Zn kg⁻¹TG auf (Abb. 13C), womit sie unter dem Toxizitätsschwellenwert von 300 mg Zn kg⁻¹TG lagen. Für ein angemessenes Pflanzenwachstum ist ein Blattgehalt von 15-20 mg Zn kg⁻¹TG angegeben [290,294]. Demnach lagen Kontrollpflanzen auf der mit geringer Zinkmenge versetzten Kontrollerde deutlich über dem angegebenen Schwellenwert für Zinkdefizienz. Bei Zinküberschuss im Boden stieg die Zinkakkumulation im Spross auf Werte zwischen 1300-2430 mg Zn kg⁻¹TG an und lag somit deutlich über dem Toxizitätsschwellenwert (Abb. 13C). Beide *AtPCS1* Mutanten wiesen verglichen mit dem Wildtyp in Blättern eine veränderte Zinkakkumulation wie auch verringerte PC-Gehalte auf (Abb. 13C, D). Überraschenderweise wurde in zwei von vier Experimenten eine um 27 % reduzierte Zinkmenge in *cad1* Mutanten detektiert, während in zwei weiteren Experimenten der genau umgekehrte Fall auftrat, obwohl phänotypisch keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchen zu beobachten waren. Ein möglicher Grund könnte die Feuchtigkeit des Bodens sein, welche Einfluss auf die Zinkverfügbarkeit hat [23] und welche eventuell zwischen den Experimenten schwankte. Zwar wurden zu Versuchsbeginn alle Töpfe mit der gleichen Menge an Wasser angefeuchtet, dennoch kann es zu Schwankungen der generellen Bodenfeuchtigkeit zwischen den unabhängigen Experimenten gekommen sein. Eine andere Möglichkeit für die höheren Metallgehalte stellt die Kontamination der Blätter mit Staub auf der Blattoberfläche dar. Allerdings wurden die Blätter vor der Analyse gewaschen, um eventuell anhaftende Erdreste zu entfernen. Ein Anhaltspunkt für diese Möglichkeit wäre ein gleichzeitiger Anstieg von Fe und Al in einzelnen Proben. Derartige Korrelationen konnten jedoch nicht festgestellt werden. Zudem traten bei der verwendeten Messmethode zu starke Schwankungen des Aluminiumwertes auf, so dass eine Normierung der Werte auf ein Element, das nur in geringem Maß translociert wird und als Indikator für Verunreinigungen dienen könnte, nicht möglich war. Ein Teil der Ergebnisse hinsichtlich der Zinkakkumulation deckt sich mit Ergebnissen aus Flüssigkulturen. Tennstedt *et al.* [228] berichteten ebenfalls von einer Reduktion der Zinkmenge in Blättern von *cad1-3* und *cad1-6* um 20-30 % verglichen mit Col-0. Allerdings waren diese Unterschiede nicht signifikant. Deutlicher hingegen waren die Unterschiede in Wurzeln mit einem um 50 % verringerten Zinkgehalt in beiden *cad1* Mutanten. Aufgrund des Wachstums in Erde und der feinen Wurzelstruktur von *A. thaliana* konnten aus Erdexperimenten keine Daten von Wurzeln erhoben werden. Ebenfalls wie bei Tennstedt *et al.* konnte in beiden Mutanten kein Anstieg im PC-Gehalt bei externem Zinküberschuss verzeichnet werden. Somit konnte bestätigt werden, dass PCs eine Rolle in der Zinkentgiftung spielen und zur Akkumulation dieses Elements auch bei Kontaminationen im Boden, die unter natürlichen Gegebenheiten auftreten können, beitragen.

4.1.3 Zinkspeziierung

Die Analyse der NA-Gehalte aus Blättern von Pflanzen auf kontaminierter Erde ergab, dass die gegensätzlichen Zinkakkumulationsmuster in jeweils zwei von vier Experimenten mit veränderten NA-Gehalten korrelierten. Während im Experimentset mit verringertem Zinkgehalt in *cad1* Mutanten (II, V) keine Unterschiede im NA-Gehalt zwischen den drei Linien auftraten, konnten im zweiten Experimentset (III, IV), welches eine höhere Zinkakkumulation für *AtPCS1* Mutanten lieferte, Veränderungen im NA-Gehalt festgestellt werden. Hierbei war eine Reduktion um 30 % von NA im Wildtyp, verglichen mit dem ersten Experimentset, zu verzeichnen, bei einer gleichzeitigen Erhöhung um 20 % in *cad1-3* (Abb. 14). Demnach kam es also in diesen zwei Experimenten (III, IV) in *cad* Mutanten zu einer verstärkten Bildung von NA, wodurch eine erhöhte Translokation von Zn in den Spross möglich scheint. Aus der verwandten hyperakkumulierenden Spezies *A. halleri* ist bekannt, dass NA eine entscheidende Rolle in der Speziierung von Zn sowie in der effizienten Beladung des Xylems und der anschließenden Translokation dieses Elements spielt. Die Komplexierung im Xylem erfolgt jedoch vorwiegend durch organische Säuren [119,295]. NA scheint demnach nicht nur relevant für die Eisenhomöostase zu sein, wie in der Literatur hauptsächlich zu finden, sondern auch für die Mobilität anderer Mikroelemente. So weisen die um das doppelte erhöhten NA-Gehalte in Blättern von Pflanzen auf zinkkontaminierter Erde erneut auf eine wichtige Rolle von NA in der Zinkhomöostase hin [119–121].

In *A. halleri* konnte außerdem gezeigt werden, dass der Mangel an NA in der Speziierung von Zn zu einer Verschiebung hin zu Thiolliganden, darunter auch PCs, führt. Demnach ist es denkbar, dass es in *A. thaliana* umgekehrt, unter bestimmten Bedingungen und bei gleichzeitiger Abwesenheit von PCs, zu einem Wechsel von Thiolliganden zu NA kommt. Dadurch könnte eine verstärkte Translokation in den Spross erfolgen und die erhöhte Zinkakkumulation in *cad* Mutanten in Experimenten III und IV auf zinkkontaminierter Erde erklären.

Speziierungsanalysen mit *A. thaliana* wurden in Kooperation mit dem "Plant and Soil Science Laboratory" (Universität Kopenhagen) durchgeführt und sollten einen indirekten Nachweis von PC-Zn-Komplexen erbringen. Erste Analysen mittels SEC-ICP-MS ergaben sowohl für Col-0 als auch für *cad1-3* eine Koelution von Zn- und Schwefelfractionen (Daten nicht gezeigt). Zwar ist die Komplexierung von Zn mit schwefelhaltigen Liganden auch in PC-defizienten Linien denkbar, da auch GSH zur Zinkspeziierung beiträgt, allerdings konnten bei einer anschließenden ESI-TOF-MS-Analyse keine PCs in der Zinkfraktion des Wildtyps nachgewiesen werden. Zudem waren die Signalintensitäten für Zn vergleichbar, unabhängig von der Konzentration im Medium. Dies und die fehlende PC-Detektion im Wildtyp ließ Zweifel an der Speziierungsanalyse aufkommen, zumal Messungen der Metall- und PC-Gehalte mit den in dieser Arbeit verwendeten Techniken deutliche Unterschiede im Zinkgehalt bei unterschiedlichen Behandlungen ergaben, wie auch die Detektion

ausreichender Mengen an PCs. Bei einer weiteren Auftrennung der Zinkfraktion über Anionenaustauschchromatographie waren Retentionszeiten von Zn und GSH/PC-Standards verschieden. Möglicherweise beruht dies jedoch entweder auf einer zu niedrigen Sensitivität des verwendeten Systems oder einer höheren Labilität von PC-Zn-Komplexen, verglichen mit PC-Cd-Komplexen, für welche die Extraktions- und Messmethode entwickelt wurde. Zwar schlug der Nachweis von PC-Zn-Komplexen in *A. thaliana* fehl, dennoch gibt es Belege für die Existenz solcher Komplexe *in vivo* [119,241].

4.1.4 Erweitertes Metallprofil von Pflanzen auf zinkkontaminierter Erde

Das Metallprofil der Blätter von *cad* Mutanten, die auf kontaminierter Erde angezogen wurden, ergab neben Änderungen im Zinkgehalt einen ca. 3-fachen Anstieg der Mangangehalte in allen drei Linien. Ebenfalls wurde mehr Cu in Blättern von Pflanzen auf kontaminierter Erde gefunden, mit einer Tendenz von höheren Kupfergehalten in *cad* Mutanten. Allerdings lagen diese Werte nahe oder unterhalb des LLOQ, so dass weiterführende Messungen mit anderen Verdünnungsstufen Aufschluss über die Richtigkeit dieses Trends geben müssten. Die Eisenwerte waren gleichbleibend zwischen den Linien und Bedingungen. Dies deckt sich mit Ergebnissen von Becher *et al.*, welche in *A. thaliana* Flüssigkulturen ebenfalls keinen Einfluss der externen Zinkkonzentration auf die Eisenakkumulation im Spross feststellten [100]. Im Gegensatz dazu führte die Erhöhung der Zinkkonzentration im Medium auf 300 μM zu einer signifikanten Reduktion der Cu- und Manganwerte in Blättern, während bei der niedrigeren Konzentration von 100 μM Zn keine veränderte Akkumulation, verglichen mit den Kontrollen, nachzuweisen war. Fukao *et al.* beobachteten ebenfalls bei Zinküberschuss im Medium erhöhte Kupfergehalte in Wurzeln und Blättern von *A. thaliana*. Die Manganakkumulation hingegen war nur in Wurzeln erhöht, während der Eisenwert sowohl in Blättern als auch in Wurzeln niedriger war [296]. In Blättern von *A. halleri* dagegen führten hohe externe Zinkkonzentrationen in Flüssigkulturen zu reduzierten Fe- und Manganwerten [161]. In Wurzeln dagegen sank die Akkumulation von Cu und Mn bei steigender Zinkkonzentration, was auf eine geringere Aufnahme dieser Metalle durch Konkurrenzsituation schließen lässt [163]. Auch in der Gartenbohne konnte eine negative Korrelation zwischen Mangangehalten in allen Organen und der applizierten Zinkkonzentration festgestellt werden, während junge Blätter weniger Cu aufwiesen. Wurzeln hingegen beinhalteten höhere Cu- und Eisenmengen [297]. Ein Vergleich mit diesen aus Flüssigkulturen erhaltenen Akkumulationsmuster ist jedoch nur bedingt möglich, da, verglichen mit dem Wachstum auf Erde, die applizierte Metallmenge auch für die Pflanze verfügbar ist. Gegensätzliche Akkumulationsmuster können somit auftreten, da auch das jeweilige Alter der Pflanzen bei Schwermetallzugabe entscheidend ist. Ein Nachteil der Erdexperimente sind die fehlenden Metallgehalte in Wurzeln. Aus den nicht-hyperakkumulierenden Spezies *Thlaspi arvense*

und *A. thaliana* ist bekannt, dass bei erhöhter Zinkzugabe mehr Zn in Wurzeln verbleibt und nur ein geringer Teil in den Spross transportiert wird [99,100,298]. Es muss also davon ausgegangen werden, dass unterschiedliche Muster in der Metallakkumulation in Wurzeln aufzufinden sind.

4.1.5 Funktion von PCs in der generellen Zinkhomöostase

Die Beteiligung von PCs in der Entgiftung des essentiellen Schwermetalls Zn und ihr Beitrag zur Akkumulation konnte anhand von Experimenten auf künstlich kontaminierter Erde bestätigt werden. Wie schon anfangs erwähnt, sind Zinkkontaminationen in der Natur allerdings eher lokal begrenzt. Daher stellte sich die Frage, ob PCs auch bei moderatem Zinkangebot in der generellen Homöostase dieses Elements eine Rolle spielen. Aus diesem Grund wurden *AtPCS1* Mutanten auf Substraterde mit einem leicht saurem pH von 5.7 angezogen, bei welchem gute Verfügbarkeit der meisten Makro- und Mikroelemente vorliegt. Die Analyse der Blätter ergab auch unter diesen Bedingungen eine um 25 % verringerte Zinkakkumulation in *cad1-3* und *cad1-6*, bezogen auf den Wildtyp (vgl. Abb. 18). Unabhängig davon konnte durch Kooperationspartner bestätigt werden, dass *cad1* Mutanten nach Anzucht auf Kontrollerde eine reduzierte Zinkmenge in Blättern aufweisen, wobei sich Wildtyp und Mutanten um ca. 33 % unterschieden (Datenbankabfrage: Oktober 2013, <http://www.ionomics.hub.org/arabidopsis/>; [299]). Eine Suche in dieser "Ionomics"-Datenbank nach Phänotypen, die eine zu *cad1* Mutanten vergleichbare oder stärkere Reduktion im Zinkgehalt der Blätter aufweisen, lieferte nur drei Treffer. Betroffen war z.B. das Gen At1g23300, welches für ein Mitglied der MATE- ("multidrug and toxin extrusion") Proteinfamilie codiert. Eine Mutante dieses Gens enthielt ca. 38 % weniger Zn in Blättern als der Wildtyp. Ein ähnlicher und ebenfalls stärkerer Effekt auf die Zinkakkumulation als bei *cad1* Mutanten beobachtet, war für die Tripelmutante *tir1 afb2 afb3* gemessen worden, welche 37 % weniger Zn als der Wildtyp enthielt. Hierbei handelt es sich um Mutationen in Auxinrezeptoren, die an der Auxin-regulierten Signalübertragung und Transkription beteiligt sind. Zuletzt wies eine Überexpressionslinie für das Gen At1g15690, welches für eine Protonen-translocierende Pyrophosphatase in der Vakuolenmembran codiert, eine um ca. 28 % reduzierte Akkumulation im Zinklevel des Sprosses auf. Von einer weitaus stärkeren Reduktion des Zinkgehalts oberirdischer Pflanzenteile ist jedoch eine Mutante des MTP1-Transporters betroffen, welche 50 % weniger Zn in der Blattrosette enthielt als der Wildtyp [141]. Die hier angeführten Beispiele zeigen zwar, dass andere Mutationen einen stärkeren Effekt auf die Zinkakkumulation im Spross von *A. thaliana* ausüben, PCs aber dennoch einen nicht unerheblichen Beitrag zur Zinkakkumulation in oberirdischen Geweben leisten.

Neben Blättern enthielten auch Samen von *cad1-3* Pflanzen, die auf Substraterde angezogen wurden, signifikant weniger Zn als Samen des Wildtyps, während *cad1-6* interessanterweise tendenziell mehr Zn in Samen aufwies (vgl. Abb. 18). Zudem war der Mangangehalt in Blättern der

beiden Mutanten und in Samen von *cad1-3* reduziert. Diese Ergebnisse sprechen für eine Rolle von PCs nicht nur in der Entgiftung bei Zinküberschuss, sondern auch in der Akkumulation dieses Elements bei Konzentrationen, die keine Toxizität hervorrufen.

4.1.6 Funktion von PCS unter zinklimitierenden Bedingungen

Die Akkumulationsrate setzt sich zusammen aus der Aufnahmekapazität und den intrazellulären Bindungsstellen [140], wobei die Zinkaufnahme linear mit der Metallkonzentration in Lösung oder im Boden verknüpft ist [290]. Unter diesem Gesichtspunkt kam die Frage auf, ob PCs auch unter zinklimitierenden Bedingungen durch Bereitstellung von Bindungsstellen zur Aufnahme und Akkumulation beitragen. Die Frage kann erweitert werden, ob eine reduzierte Menge an Chelatoren zu einer Verstärkung der Zinkdefizienz beiträgt bzw. ob PC-defiziente Pflanzen schneller in Zinkdefizienz eintreten als Pflanzen, die zur PC-Synthese fähig sind. Die Absorptionsrate von Zn ist unterschiedlich für jede Pflanzenspezies und vom Wachstumsmedium abhängig, wobei die Zusammensetzung des Mediums, v.a. der Calciumgehalt, entscheidend ist [290]. Durch Zugabe von Calciumoxid wurde die vorher verwendete Substraterde auf einen pH-Wert von 8.0 eingestellt. Steigt der pH des Bodens, so hat dies Folgen für die Adsorption der Metallionen an Bodenpartikel, nicht zuletzt durch eine Veränderung der Oberflächenladung und des elektrischen Potentials der Adsorptionsstellen ins Negative. Dies bedingt eine stärkere Bindung von Kationen an Fe-/Mn-Hydroxide, Al-Silikate sowie Ton und Humus, wodurch die Metallspezierung im Boden variiert und die Löslichkeit der Metalle sinkt [300]. Dabei stellt der pH-Wert des Bodens den Faktor mit dem größtem Einfluss auf die Löslichkeit von Schwermetallionen dar [300,301] und ist invers proportional zu ihrer Verfügbarkeit [23,25,301–304].

Phänotypisch konnte bei pH 8.0 kein Unterschied zwischen Col-0 und *cad* Mutanten beobachtet werden (vgl. Abb. 19). Auch die Wachstumsrate ergab keinerlei Unterschiede zwischen Col-0 und *cad1-3* (vgl. Abb. 20). Der Unterschied in der Zinkakkumulation, der zwischen *cad* Mutanten und Wildtyp sowohl bei Zinküberschuss als auch bei moderatem Zinkangebot in Blättern detektiert wurde, war auf alkalischer Erde, also unter Mikroelement-limitierenden Bedingungen, nicht mehr festzustellen. Zudem enthielten Samen von *cad1-3* die gleiche Zinkmenge wie Samen des Wildtyps. Die Tendenz, dass Samen von *cad1-6* mehr Zn aufwiesen als die des Wildtyps und welche auf Erde mit ausreichender Mikroelementverfügbarkeit verzeichnet wurde, verstärkte sich auf alkalischer Erde noch, so dass dieser Unterschied signifikant war.

Das Muster der Manganakkumulation von Linien, die auf Erde mit pH 5.7 und 8.0 angezogen wurden, war analog zu Zn. Zwar gibt es bisher keine Hinweise auf eine Aktivierung der PCS durch Mn, dennoch könnte eine Bindung dieses divalenten Metallions auftreten, auch wenn es nicht der auslösende Faktor für die PC-Bildung ist, zumal es in höheren Konzentrationen als aktivierende

Metallionen vorlag. Synergetische Effekte für Zn und Mn wurden schon früher *in planta* beschrieben [290]. So benötigt Zuckerrohr bei Manganüberschuss im Boden höhere Zinklevel für ein optimales Wachstum [305]. Des Weiteren wurden im Spross von *A. halleri* positive Korrelationen zwischen Cd- und Mangangehalten ermittelt [306]. Eine mögliche Korrelation in *A. thaliana* zwischen Zn und Mn ist daher nicht auszuschließen, da man annimmt, dass Cd hauptsächlich über Zinktransporter aufgenommen und translociert wird. Obwohl in Blättern von *cad1-6* gleiche Zn- und Mangangehalte wie in *cad1-3* detektiert wurden, sowohl bei pH 5.7 als auch pH 8.0, enthielten die Samen mehr Zn und Mn. Dies spricht für eine verstärkte Samenbeladung in *cad1-6* von beiden Schwermetallen über das Phloem. Vergleichende Analysen des Metaboloms könnten Aufschluss über die Hintergründe dieser verstärkten Akkumulation in Samen von *cad1-6* geben.

Die Angleichung der Zinkgehalte in *cad* Mutanten an den Wildtyp unter zinklimitierenden Bedingungen spricht gegen eine Beteiligung von PCs an der Antwort auf Zinkdefizienz. Allerdings ist die Verfügbarkeit fast aller Mikroelemente auf alkalischer Erde, mit Ausnahme von Mn und Mo, stark reduziert, so dass die Interferenz mit einem anderen Metall nicht ausgeschlossen werden kann. Zudem sollte die anfängliche Frage geklärt werden, ob PC-defiziente Pflanzen schneller in Zinkdefizienz geraten. Aus diesem Grund wurden Pflanzen auch hydroponisch angezogen, wobei nach mehrwöchigem Wachstum unter Zugabe aller notwendigen Mikroelemente ein Transfer in zinkfreies Medium erfolgte, so dass nur der Effekt von Zinkmangel untersucht werden konnte. Um an die Zelloberfläche gebundene Zinkionen zu entfernen, wurden die Wurzeln vor dem Transfer mit CaCl_2 gewaschen. Anschließend wurden die Wurzeln nach verschiedenen Zeitpunkten in zinkfreiem Medium auf ihren molekularen Zinkstatus durch Analyse der Markergene für Zinkdefizienz, *ZIP9* und *NAS2* [98], untersucht. Nach 14 Tagen in zinkfreiem Medium waren Wurzeln beider Linien, Col-0 und *cad1-3*, gleichermaßen zinkdefizient, wobei kein Unterschied in der Transkriptmenge der Markergene vorhanden war (Abb. 21). Eine Beteiligung von PCs in der Antwort auf Zinkdefizienz kann somit, wie schon durch Experimente auf alkalischer Erde angedeutet (vgl. Abb. 19), ausgeschlossen werden.

4.1.7 Vergleich der Zinkakkumulation in Wildtyp und *cad* Mutanten auf verschiedenen Bodentypen

Die bisherigen Erdexperimente liefern das Bild, dass PCs an der Entgiftung bei überschüssigem Zn sowie an der generellen Zinkhomöostase beteiligt sind. Sobald ein unbekannter Schwellenwert an Zn unterschritten wird, scheinen andere Transporter und Chelatoren die Zinkversorgung der Pflanze zu übernehmen. Interessanterweise jedoch war auf mineralischer Kontrollerde, die ca. 40 mg HCl-extrahierbares $\text{Zn kg}^{-1}_{\text{Boden}}$ (vgl. Tab. 13) enthielt, keine signifikante Reduktion im Zinkgehalt von *cad* Mutanten zu detektieren. Hingegen existierte dieser Unterschied zwischen *AtPCS1* Mutanten und Col-0 auf Substraterde mit 30 mg HCl-extrahierbarem $\text{Zn kg}^{-1}_{\text{Boden}}$ (vgl. Tab. 16), also eigentlich einem

geringerem Gesamtzinkgehalt. Der Vergleich an DTPA-extrahierbarem Zn, welcher wie vorher beschrieben eine Abschätzung des phytoverfügbaren Zinkanteils im Boden ist, liefert einen Wert von ca. $20 \text{ mg Zn kg}^{-1}_{\text{Boden}}$ für mineralische Erde und $30 \text{ mg Zn kg}^{-1}_{\text{Boden}}$ für Substraterde. Auch die Zinkmengen, die mit CaCl_2 extrahiert wurden und eine Annäherung an die Bodenlösung geben sollen, waren mit $0.8 \text{ mg Zn kg}^{-1}_{\text{Boden}}$ höher für die Substraterde, verglichen mit $0.3 \text{ mg Zn kg}^{-1}_{\text{Boden}}$ in Mineralerde (Tab. 13, 16). Dies lässt auf eine höhere Zinkverfügbarkeit des Substratbodens schließen. Die für die Kontamination mit Schwermetallionen verwendete mineralische Erde wurde wegen ihres geringen Gehalts an organischem Material gewählt. Letzteres könnte Metallionen binden und ihre Verfügbarkeit senken, z.B. durch Bildung von stabilen Huminsäurekomplexen. So führte die Zugabe von Huminsäure zu einer verringerten Extrahierbarkeit der löslichen und austauschbaren Schwermetallfraktionen in kontaminierter Mineral- oder Substraterde. Gleichzeitig jedoch stieg der Anteil der DTPA-extrahierbaren und potentiell phytoverfügbaren Schwermetallionen [307]. Dies kann der Effekt von Metall-Huminsäurekomplexen sein, welche die Transformation in unlösliche Metallspezies durch Bereitstellung von organischem Material verhindern, welches als Chelator dient und somit die Mobilität und Verfügbarkeit für die Pflanze erhöht [308]. Zudem zeigte eine Studie mit 1500 Bodentypen, dass der Anteil an DTPA-extrahierbarem Zn durch Erhöhung des Boden pH abnahm, wie auch durch einen geringen Anteil an organischem Material und niedrige Bodenfeuchtigkeit [23]. Mehrere Studien berichten von einer positiven Korrelation zwischen DTPA-extrahierbarem Zn und organischem Material des Bodens [25,301,309]. So machen organische Zinkkomplexe durchschnittlich 88 % des total in der Bodenlösung gelösten Zinks aus, während nur ca. 8 % als freies Zn^{2+} vorliegt. Hierbei sorbiert Zn an pH-abhängige Bindungsstellen von Oxyhydroxiden und organischem Material sowie an Tonminerale bei hohen Konzentrationen [300]. Allerdings ist der Boden eine komplexe Matrix und die Schwermetallverfügbarkeit ist daher von vielen Faktoren abhängig. Die Anwesenheit von organischem Material und die somit potentiell höhere Zinkverfügbarkeit können einen Erklärungsansatz für das Auftreten des Akkumulationsunterschiedes zwischen Col-0 und *cad* Mutanten auf Substraterde darstellen, während er bei ähnlichem Gesamtzinkgehalt auf mineralischer Erde nicht auftrat. Zudem wurde die reduzierte Zinkakkumulation in *cad1* Mutanten auf Substraterde unabhängig durch die "IonomicsHub"-Plattform bestätigt (vgl. Abschnitt 4.1.5).

4.1.8 PC-abhängige Remobilisierung und Langstreckentransport bei induzierter Seneszenz

Ein Vergleich der Metallgehalte in Samen ergab gleiche Metalllevel unabhängig davon, ob die Mutterpflanzen unter Mikroelement-limitierenden Bedingungen oder bei guter Schwermetallverfügbarkeit angezogen wurden (vgl. Abb. 18,19). Dies impliziert die Existenz eines robusten Translokations- und Beladungsnetzwerks sowie die Remobilisierung von Mikroelementen aus reifen

Blättern, um eine ausreichende Belieferung der Samen mit Metallionen sicherzustellen, auch wenn deren Verfügbarkeit eingeschränkt ist. Dieser Langstreckentransport von der Wurzel in den Spross findet über das Xylem statt, während die Umverteilung der Metallionen von reifen Blättern in die Samen über das Phloem abläuft. Eine Beteiligung von PCs am Langstreckentransport von Schwermetallionen in *A. thaliana* wurde postuliert [266,267]. Der direkte Nachweis von PCs im Phloemsaft erfolgte bislang aber nur in Raps [265]. Eine eventuelle Remobilisierung von Schwermetallionen unter PC-Teilnahme aus seneszenten in junge bzw. intakte Blätter wurde untersucht. Durch Abdunkeln einzelner Blätter für sieben und neun Tage wurde Seneszenz in Blättern induziert [268] und anschließend die Metallgehalte in seneszenten und grünen Blättern untersucht (Abb. 22). Entgegen der Annahme [122,310–312] konnte jedoch kein Hinweis für eine Remobilisierung von Schwermetallen während des Seneszenzprozesses aus alternden in junge bzw. intakte Blätter gefunden werden. Im Gegenteil wurden in seneszenten Blättern mit Ausnahme von Fe sogar höhere Gehalte an Zn, Mn, Mo und Cu gefunden. Dabei konnte nur bei den Zn- und Mangangehalten eine signifikante Reduktion in *cad* Mutanten, wie schon früher beobachtet (vgl. Abschnitt 3.1.5), festgestellt werden. Das Verhältnis in grünen und seneszenten Blättern blieb dabei aber gleich. Bei Anzucht der Pflanzen unter Mikroelement-limitierten Bedingungen (pH 8.0) und anschließender Seneszenzinduktion glichen sich die Schwermetallgehalte in grünen und seneszenten Blättern an, wobei die vorher beobachteten Unterschiede für Zn und Mn zwischen *cad* Mutanten und Wildtyp ausblieben (Abb. 23). Eine Ausnahme bildeten seneszente Blätter von *cad1-6* nach 7-tägiger Abdunkelung, welche nach wie vor einen um 17 % höheren Mangangehalt aufwiesen als Col-0. Im Gegensatz zu Bedingungen mit ausreichender Mikroelementverfügbarkeit (vgl. Abb. 22) schien bei ihrer begrenzten Verfügbarkeit also in der Tat eine Remobilisierung von Schwermetallen stattgefunden zu haben. Eine Benachteiligung PC-defizienter Pflanzen trat hierbei nicht auf. Zusammen mit der oben genannten Ausnahme konnten nur für Zn und Cu leicht höhere Metallgehalte in seneszenten Blättern von *cad1-3* und *cad1-6*, verglichen mit Col-0, festgestellt werden (Abb. 23A, C). Da die Messungen unterhalb des LLOQ lagen, müssten im Fall von Cu weiterführende Messungen diesen Trend bestätigen. Ein Vergleich der Metallgehalte von seneszenten mit grünen Blättern der gleichen Pflanze ergab für Col-0 einen um 7 % höheren Zinkgehalt in seneszenten Blättern, während dieser Wert für *cad1-3* und *cad1-6* bei 14 % bzw. 11 % lag (Abb. 23A). Demnach schien in PC-defizienten Pflanzen eine leicht verzögerte Remobilisierung von Zn aus seneszenten Blättern vorzuliegen, was darauf schließen lässt, dass PCs bei der Remobilisierung während des Seneszenzprozesses nur eine sehr geringe Rolle spielen.

Die höheren Metallgehalte in seneszenten Blättern bei pH 5.7 (Abb. 22) könnten aus einem Konzentrationseffekt der Metallionen während des Seneszenzvorgangs und des einhergehenden Wasserverlusts resultieren. Gegen diese Möglichkeit sprechen jedoch vergleichbare Metallgehalte in

grünen und seneszenten Blättern bei Wachstum auf pH 8.0, obwohl letztere die gleiche phänotypische Ausprägung aufwiesen wie seneszente Blätter bei pH 5.7.

Die fehlende Remobilisierung von Schwermetallen bei ausreichender Mikroelementverfügbarkeit aus seneszierenden in intakte Blätter könnte Folge der induzierten Seneszenz in der vegetativen Wachstumsphase sein. Für *Trifolium subterraneum* konnte gezeigt werden, dass Mn während der vegetativen Wachstumsphase nicht mobil ist [313]. Auch bei Zinkdefizienz erfolgt generell nur wenig bis gar keine Mobilisierung von Zn aus reifen in junge Blätter [290]. Studien, die von der Remobilisierung von Mikroelementen während natürlicher Seneszenz berichten, wurden ausschließlich während der reproduktiven Wachstumsphase in Verbindung mit Samenreifung und -beladung durchgeführt [122,310,314–317]. Bei Wachstum auf pH 8.0 (Abb. 19), also unter Bedingungen für die gezeigt wurde, dass Remobilisierung aus Blättern stattfindet (Abb. 23), wiesen Samen der *cad* Mutanten jedoch keine verringerten Zinkwerte auf. Nur nach Wachstum auf pH 5.7 enthielten Samen von *cad1-3* geringere Zinkwerte (Abb. 18). Diese geringere Akkumulation lag aber auch in Blättern vor, so dass dies keinen Hinweis auf eine verminderte Remobilisierung darstellt, sondern auf eine generell niedrigere Zinkakkumulation in oberirdischen Pflanzenteilen. Insgesamt deuten die in dieser Arbeit erhobenen Daten darauf hin, dass nur wenig Remobilisierung von Mikroelementen aus seneszierenden Blättern stattfindet. In ihrer Studie zur Metallverteilung innerhalb der Pflanze während des Lebenszyklus von *A. thaliana* postulieren Waters und Grusak [311], dass Aufnahme und Translokation einen vergleichbaren bzw. sogar größeren Beitrag zur Samenbeladung leisten als die Remobilisierung von früher gespeicherten Nährstoffen.

4.2 Verhalten von *cad* Mutanten auf cadmiumkontaminierter Erde

PCs spielen eine Schlüsselrolle in der Entgiftung von Cd, was sich in der stark ausgeprägten Hypersensitivität der *AtPCS1* Nullmutante *cad1-3* ausdrückt [167,227]. Tennstedt *et al.* [228] beobachteten auf Agarplatten, dass sich die *AtPCS1* Mutanten *cad1-3* und *cad1-6* in der Stärke der cadmiumhypersensitiven Reaktion unterschieden. Da die Art der Aktivierung der PC-Synthese und die Struktur der PCS bisher nicht aufgeklärt wurden, war es von Interesse, ob dieser Unterschied in einem alternativen Testsystem bestehen bleibt. Daher wurde das Wachstum der *cad* Mutanten und des Wildtyps unter naturähnlicheren Bedingungen auf künstlich mit Cd kontaminierter Erde getestet. Die gewählte Konzentration von $7.5 \text{ mg Cd kg}^{-1}_{\text{Boden}}$ liegt nur drei Größenordnungen über dem oberen Limit für die Grundbelastung in Oberböden [34] und ist innerhalb der berichteten Spanne für landwirtschaftliche Nutzflächen in manchen Ländern [30,318]. Mittels HCl konnte 84 % des applizierten Cd wieder extrahiert werden (Tab. 13). Somit lag die Menge an Cd, die reversibel an Bodenpartikel gebunden war, deutlich über der Menge, die für Zn mittels HCl extrahiert werden konnte (vgl. Abschnitt 4.1.2). Der phytoverfügbare Anteil, abgeschätzt durch DTPA-Extraktion, lag bei

63 % und war somit ebenfalls höher als die für Pflanzen verfügbare Zinkmenge. Dies deckt sich mit Ergebnissen von Mitsios *et al.* [302] und Sukreeyapongse *et al.* [303], welche verglichen mit den Metallen Pb, Cu, Mn und Zn für Cd die höchste Extrahierbarkeit gemessen am Gesamtmetallgehalt bzw. die höchsten Freisetzungsraten erhielten. Des Weiteren stellten Lee *et al.* [319] für Cd die stärkste Korrelation zwischen Metallkonzentration im Boden und in Pflanzen fest. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass Cd hauptsächlich in der austauschbaren und wasser- bzw. säurelöslichen Phase im Boden vorliegt. Dadurch scheint dieses Schwermetall bioverfügbarer für Pflanzen zu sein als andere Schwermetalle. Die Hauptbindungsstellen für Cd im Boden sind organische Bestandteile, Oxyhydroxide und Fe-/Al-/Mn-Tonminerale. Im leicht sauren pH-Bereich des verwendeten Bodens (pH 5.7) liegt Cd vorwiegend an organische Bodenkomponenten gebunden vor, wobei in nicht salzhaltigen Böden mehr als 50 % des Schwermetalls in freier Form vorliegt. Dabei bindet es um einige Größenordnungen stärker an Huminsäure als Ca^{2+} , jedoch weniger als z.B. Zn^{2+} und Cu^{2+} . Auch die Adsorptionsaffinität an Fe-/Mn-Hydroxide ist für Zn^{2+} deutlich höher als für Cd^{2+} [300]. Somit stellt Cd das in Böden am schwächsten gebundene Schwermetall dar, was sich auch in den in dieser Arbeit erhaltenen Wiederfindungsraten in Extrakten widerspiegelt (vgl. Tab. 13). Mit 0.12 mg l^{-1} CaCl_2 -extrahierbarem Cd, welches eine Abschätzung der Bodenlösung darstellt [290], und umgerechnet einer Konzentration von $1 \text{ }\mu\text{M}$ entspricht, liegt die Cadmiumkonzentration somit genau an der oberen Grenze für moderat kontaminierte Standorte [320]. Anders als bei Experimenten mit zinkkontaminierter Erde wurde hier für Kontrollbedingungen kein zusätzliches Zn zugegeben, um einen möglichen schützenden Effekt von Zn auf die Cadmiumsensitivität zu unterbinden. Zwar fanden Köleli *et al.* in oberirdischen Teilen von Weizen keine veränderte Cadmiumakkumulation bedingt durch Zugabe verschiedener Zinkmengen im Boden vor, jedoch wiesen zinkdefiziente Pflanzen stärkere Toxizitätssymptome im Spross auf [321].

Individuen des Wildtyps Col-0 waren bei der applizierten Cadmiummenge im Boden nicht in ihrer Entwicklung beeinträchtigt. Tatsächlich war sogar die Blattfläche, die als Wachstumsindikator diente, leicht erhöht, verglichen mit Pflanzen auf Kontrollboden (Abb. 15/33B), obwohl der Toxizitätsschwellenwert, der für die meisten Pflanzen zwischen $5\text{-}30 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ TG}$ im Blatt liegt [290,322,323], überschritten wurde (Abb. 15C). Dies bestätigen Ergebnisse von Köleli *et al.* [321], wonach die Cadmiumakkumulation im Spross nicht mit den Toxizitätssymptomen korreliert war. Ein geringes Cadmiumlevel im Boden scheint also eine fördernde Wirkung auf das Pflanzenwachstum zu haben. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass Populationen von *N. caerulea* existieren, die Cd für ein optimales Wachstum benötigen [66]. Möglicherweise erfolgt unter zinklimitierenden Bedingungen der Einbau von Cd anstelle von Zn als Cofaktor in Enzymen analog zur Carboanhydrase des eingangs erwähnten Diatoms *T. weissflogii* [39]. Ähnlich wie Aluminium könnte Cd auch durch Verdrängung

essentieller Metalle von metabolisch inaktiven Bindungsstellen diesen wachstumsfördernden Effekt auslösen [305].

Im Gegensatz zum Wildtyp entwickelte *cad1-3* chlorotische Blätter und das Wachstum war massiv eingeschränkt. Dieser Unterschied zwischen Col-0 und *cad1-3* demonstriert die essentielle Rolle der PC-Synthese für die Toleranz von Cadmiumkonzentrationen, denen Pflanzen auch außerhalb metallreicher Habitats in der Natur ausgesetzt sein können. Zudem weist die zum Wildtyp verringerte Cadmiumakkumulation in Blättern von *cad1-3* auf eine Beteiligung von PCs zur Cadmiumakkumulation unter derartigen Bedingungen hin (Abb. 15C). Im Zuge der weitverbreiteten Hintergrundkontaminationen landwirtschaftlicher Nutzflächen mit Cd und der damit einhergehenden Gesundheitsrisiken, ausgelöst durch dieses Schwermetall das durch Pflanzen in die Nahrungsmittelkette des Menschen aufgenommen wird, ist dies von hoher Relevanz [324–326]. Die reduzierte Akkumulation von Cd in Blättern von Pflanzen, die auf Erde angezogen wurden, deckt sich mit früheren Ergebnissen aus Agarplattentests, bei welchen acht Tage alte Keimlinge der *cad1-1* Mutante weniger Cd in Blättern aufwiesen als der Wildtyp [275]. Tennstedt *et al.* erhielten dagegen in Flüssigkulturen keinen Unterschied für die Cadmiumakkumulation im Spross zwischen Col-0 und *cad1-3* und *cad1-6*. In Wurzeln hingegen lag eine fast doppelt so hohe Cadmiumkonzentration verglichen mit dem Spross vor und nur hier wurde eine 50-60 %-ige Reduktion des Cadmiumgehalts in beiden Mutanten verglichen mit Col-0 detektiert [228]. Im Gegensatz dazu wurde in zwei anderen Studien ein zum Wildtyp erhöhter Cadmiumgehalt in Wurzeln von *cad1-3* vorgefunden [266,267]. In Birkenkeimlingen war bei BSO-Zugabe, also unter Bedingungen, welche die PC-Synthese hemmen, die Cadmiumakkumulation in Wurzeln und Spross beeinträchtigt. Gleichzeitig konnte in feinen Wurzeln ein Anstieg von Fe, Mo und Zn gemessen werden [327]. Wie schon im Zuge der Experimente auf zinkkontaminierter Erde erwähnt (Abschnitt 4.1.2), verhindert die feine Wurzelstruktur von *A. thaliana* die Analyse der Metallgehalte in diesem Organ.

Die Blattgehalte anderer Elemente waren unabhängig von der Anwesenheit von Cd im Boden vergleichbar zwischen den Linien (Tab. 15). Nur für Mo waren in *cad* Mutanten leicht geringere Werte zu finden, allerdings lagen diese Messungen unterhalb des LLOQ. Die Zinkaufnahme und Akkumulation war durch Cadmiumüberschuss im Boden nicht reduziert, was umgekehrt für die Cadmiumaufnahme von *A. halleri* bei Zinküberschuss galt [328]. Abhängig von der Cadmiumdosis war die Zinkakkumulation in *A. halleri* Blättern zwischen 40-70 % reduziert. Ebenfalls niedriger waren Cu- und Eisenwerte, während die Manganakkumulation positiv mit Cd korreliert war [306]. Auch in Erbsen wurde ein niedrigeres Zinklevel in Blättern bei Cadmiumzugabe beobachtet. Zudem sank die Akkumulation von Fe, Mn und Cu [49]. In Reis wurden geringere Mn- und Zinkgehalte und höhere Kupferkonzentrationen im Spross bei Cadmiumzugabe verzeichnet [329].

In beiden *cad* Mutanten waren die PC-Gehalte in Blättern von Pflanzen auf Kontroll- und cadmiumkontaminierter Erde verschwindend gering. Während *cad1-6* zwar noch quantifizierbare PC2-Mengen in Blättern aufwies, lagen diese in *cad1-3* unterhalb des LLOQ (vgl. Abb. 15D). Der geringe PC-Gehalt in Blättern von *cad1-6* war überraschend, da diese Linie schon nach 7 d ein gegenüber der *cad1-3* Mutante signifikant verbessertes Wachstum zeigte und zum Experimentende nur eine 20 %-ige Wachstumsreduktion verglichen mit Col-0 aufwies. Zu diesem Zeitpunkt war *cad1-3* zu 80 % im Wachstum eingeschränkt (Abb. 15B). Tennstedt *et al.* [228] konnten in Blättern von *cad1-6* aus Flüssigkulturen ebenfalls nur 8 % des PC2-Levels, das im Wildtyp gefunden wurde, messen, wohingegen bis zu 26 % des Wildtyp PC-Gehalts in Wurzeln auftrat. Auch für die *cad1-5* Mutante, die ebenfalls eine verkürzte AtPCS1-Variante enthält (vgl. Abb. 5), wurde ein PC-Gehalt, der 33 % des WT-Levels entspricht, gemessen [227].

4.2.1 PC-Gehalte von AtPCS1 Mutanten aus Flüssigkultur

Da aus den Erdexperimenten keine Rückschlüsse über die PC-Gehalte in Wurzeln gezogen werden konnten, erfolgte eine Anzucht der Linien in Flüssigkultur mit anschließender Bestimmung der PC-Gehalte in Wurzeln und Blättern. Bei einer moderaten externen Konzentration von 0.5 μM Cd wies *cad1-6* vergleichbar geringe Mengen an PC2 im Blatt auf wie *cad1-3* (Abb. 16A). In Wurzeln dagegen war ein deutlich höherer PC2-Gehalt als in *cad1-3* auszumachen, der aber auch nur 25 % des Wildtyp PC2-Levels ausmachte, analog zu Tennstedt *et al.* [228]. Bei einer Erhöhung der Cadmiumkonzentration im Medium auf 5 μM konnte signifikant mehr PC2 in Blättern von *cad1-6* verglichen mit *cad1-3* detektiert werden. Dieser Wert entsprach 20 % des PC2-Gehalts in Col-0. Gleichzeitig enthielten Wurzeln sogar signifikant mehr PC2 als der Wildtyp. Dies legt den Schluss nahe, dass die Translokation von PC-Cd-Komplexen in den Spross in *cad1-6* scheinbar beeinträchtigt ist.

Des Weiteren wiesen Wurzeln und Blätter von *cad1-6* nur geringe Mengen an längerkettigem PC3 auf (Abb. 16B). Bei einer Cadmiumkonzentration von 5 μM war nur 21 % bzw. 7 % des Wildtyp PC3-Gehalts vorhanden. Zur verminderten Translokation kommen demnach auch noch Einschränkungen in der Synthese langkettiger PCs hinzu. Hierin begründet liegt wahrscheinlich der Grund für den geringen Toleranzverlust von *cad1-6* gegenüber Cd.

Deutlich wird, dass bei einem moderaten Cadmiumlevel im Medium der Großteil der PCs in der Wurzel verbleibt, um Cd zu komplexieren und in der Vakuole zu sequestrieren. Erst bei höheren externen Cadmiummengen, wenn die Speicherkapazität der Wurzel ausgeschöpft ist, erfolgt die Translokation in den Spross und ein Angleichen der PC-Level zwischen unter- und oberirdischen Geweben findet statt. Wie durch CaCl_2 -Extraktion abgeschätzt, liegt die Cadmiumkonzentration in der Bodenlösung der künstlich kontaminierten Erde bei ca. 1 μM und spiegelt somit die Situation

wider, die in Flüssigkulturen (Abb. 16) bei der geringen Konzentration von 0.5 μM Cd im Medium auftrat.

Die eingeschränkte Translokation von PC-Cd-Komplexen in *cad1-6* könnte darin begründet sein, dass die Funktion von PCs in der Wurzel nicht vollständig autonom, sondern mit einer anderen Aktivität gekoppelt ist. Die mit der Verkürzung in *cad1-6* einhergehenden Änderungen, z.B. die verminderte Synthese langkettiger PCs, könnten in einer Störung des Gleichgewichts dieser Interaktion resultieren und dadurch das weitere Transportschicksal von PC-Cd-Komplexen beeinflussen. Song *et al.* [330] konnten mittels heterologer Expression in Hefe zeigen, dass *AtABCC1* und *AtABCC2* eine Substratpräferenz für PC-As-Komplexe verglichen mit PC-Cd-Komplexen aufweisen. Im Gegensatz dazu erfolgte der Transport beider Komplexarten durch ABC-Transporter zu gleichen Teilen in Gerstevakuolen. Zudem wurde *in vitro* auch der Transport von PC-Komplexen mit Zn, Cu und Mn angedeutet, wobei auch hier die Transportrate abhängig vom komplexierten Metallion war. Unterschiedliche Substrataffinitäten von Transportproteinen könnten demnach über das Transportschicksal verschiedener PC-Metallkomplexe entscheiden.

Zu einer anderen Klasse von Transportern gehören OPTs (**O**ligo**p**eptid **T**ransporter). Diese sind in *Arabidopsis* am stärksten in Leitbündeln exprimiert und gelten als potentielle Langstreckentransporter für Peptide, die im proteolytischen Abbau während des Seneszenzvorgangs ihren Ursprung haben und über das Phloem remobilisiert werden [331]. Für das Hefehomolog *ScOPT1* konnte eine höhere Affinität für PC2 gegenüber oxidiertem oder reduziertem GSH nachgewiesen werden [332]. Langstreckentransporter für PCs, darunter eventuell auch OPTs, könnten also eine geringere Affinität zu kurzkettigem PC2 haben, welches hauptsächlich in *cad1-6* vorhanden ist und demnach die verminderte Translokation für PCs zur Folge haben. Zusätzlich zu möglichen Unterschieden in der Substratpräferenz für bestimmte PC-Metallkomplexe könnte dies ein Erklärungsansatz für die erhöhten Mangangehalte in seneszenten Blättern von *cad1-6* darstellen (vgl. Abb. 23D und Abschnitt 4.1.8).

4.3 Eingrenzung kritischer Aminosäuren für die Aktivierung durch unterschiedliche Metalle

Wie eingangs erwähnt, wird der N-terminale Bereich der *AtPCS1* als katalytische Domäne angesehen, während der C-Terminus für die Metallerkennung zuständig ist. *cad1-6* exprimiert eine C-terminal verkürzte Variante der *AtPCS1* und scheint in der Synthese langkettiger PCs beeinträchtigt. Die Deletion am C-Terminus könnte eine schlechtere Bindung langkettiger γ -EC Akzeptoren bedingen und somit eine Erklärung für die verringerte Fähigkeit der Mutante höherkettige PCs zu bilden (vgl. Abb. 16) darstellen.

Die T-DNA Insertion in *cad1-6* führt zu einem PCS1-Protein, welches nach Aminosäure 409 endet [228]. Die von Tennstedt *et al.* und in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass diese verkürzte Proteinvariante noch zur Aktivierung der PC-Synthese durch Cd fähig ist. Die Zinkaktivierung hingegen scheint verloren. Diese Beobachtung bestätigt *in vivo* die von Ruotolo *et al.* [226] postulierte Funktion des C-terminalen Bereichs in der Erkennung eines breiten Metallspektrums bzw. die Existenz von mehreren Bindungsstellen zur Erkennung verschiedener Schwermetalle. Um kritische Aminosäurereste für die Aktivierung der PC-Synthese durch Zn näher einzugrenzen, wurden im Zuge einer Masterarbeit (Benjamin Käs Dorf, Lehrstuhl Pflanzenphysiologie 2012) Verkürzungen der *AtPCS1* nach Aminosäure 372 und 459 generiert und durch anschließende heterologe Expression in *S. pombe* (vgl. Abb. 17) bzw. durch Aktivitätstests mit rekombinant aufgereinigtem Protein auf ihre Aktivierbarkeit durch Cd und Zn geprüft. Die Position der Verkürzungen wurde gewählt, da von Ruotolo *et al.* [226] bekannt ist, dass eine *AtPCS1*-Variante, die durch Proteaseverdau nach Aminosäure 372 verkürzt ist, noch zur Toleranzvermittlung gegenüber Cd in Hefezellen fähig ist. Zweitens ist von Tennstedt *et al.* [228] gezeigt worden, dass in *cad1-6* eine Verkürzung an Aminosäure 409 vorliegt, wodurch die *AtPCS1* nicht mehr durch Zn aktiviert werden kann. Für eine erste Eingrenzung der Zinkbindungsstelle wurde nach Aminosäure 459 verkürzt, um die konservierten Reste His 460 und Cys 471 zu entfernen (vgl. Abb. 53).

Heterologe Expression in der Spalthefe bestätigte die Beobachtung von Ruotolo *et al.* [226], dass *AtPCS1-Δ372* noch durch Cd aktivierbar ist (Abb. 17B) und die Cadmiumbindungsstelle demnach zwischen Aminosäure 220 und 372 liegen muss. Dieser Bereich beinhaltet sieben konservierte Cysteine, die als Cadmiumbindungsstelle in Frage kämen, wobei einer dieser Reste (Cys 358) nicht zum Toleranzverlust führt [221]. Des Weiteren zeigte sich, dass die Zinkerkennung nach Aminosäure 459 stattfinden muss, da die entsprechende Verkürzung in *S. pombe* keine Zinktoleranz vermittelte (Abb. 17A).

Wie eingangs erwähnt, handelt es sich bei Zn um eine Grenzsäure, was die Bindung an N-, S- und O-haltige Liganden ermöglicht. Anhand eines Alignments (Abb. 53) konnten die konservierten Aminosäuren His 460, Cys 471 sowie eine Abfolge von Glu und Asp an Position 476 bis 479 als potentielle Zinkbindungsstellen identifiziert werden. Für die verkürzten Varianten war es trotz Verwendung verschiedener Expressionsvektoren, -stämme und Proteintags nicht möglich, lösliches Protein zu erhalten, so dass durch Testen der Bakterienlysate nur eine qualitative Aussage über die PC-Bildung möglich war. Da von Ruotolo *et al.* [226] bekannt ist, dass der C-Terminus für die thermische Stabilität des Proteins verantwortlich ist, kann die C-terminale Verkürzung auch die Präzipitation während der Proteinaufreinigung erklären. Zukünftige Experimente zur Identifizierung potentieller Metallbindungsstellen aus den oben genannten Kandidaten sollten somit durch Einführung von Punktmutationen anstelle von Verkürzungen durchgeführt werden.

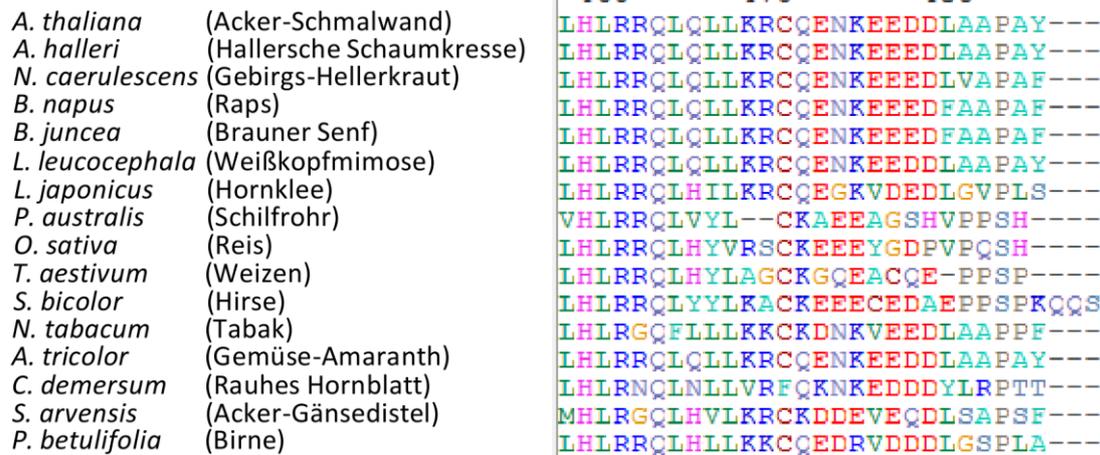


Abb. 53: Alignment der Aminosäuresequenz von *AtPCS1* mit PCS-Proteinsequenzen aus verschiedenen monokotylen und dikotylen Pflanzenspezies. Gezeigt ist der C-terminale Bereich ab Aminosäure 459 der *AtPCS1*-Sequenz.

4.4 *AtPCS2*

4.4.1 Nachweis von PCs in *cad1-3*

Mit dem Ziel, die physiologische Rolle von PC-Synthasen weiter aufzuklären, wurde die Aktivität der *AtPCS2* analysiert, welche durch das zweite *PCS* Gen in *A. thaliana* codiert wird. Die *cad1-3* Mutante, die nur eine Mutation in der *AtPCS1* trägt, wurde bei ihrer ersten Charakterisierung als PC-frei beschrieben [227]. Dies wurde später bestätigt, so dass die Frage nach der Funktion der zweiten PCS aufkam, welche sich bei heterologer Expression in Hefe als funktional erwies [232]. Aus diesem Grund wurde eine mögliche PCS2-abhängige PC-Synthese in *cad1-3* durch eine sensitivere als bisher verfügbare Methode zur PC-Detektion erneut untersucht. In den letzten Jahren wurde von der Verwendung von TCEP als Reduktionsmittel [257–259] und von UPLC-Auftrennung mit gekoppelter ESI-QTOF-MS als Methode für PC-Detektion berichtet [333]. Unter Berücksichtigung möglicher Matrixeffekte lieferte die Beurteilung der verwendeten UPLC-ESI-QTOF-MS-Technik (Abb. 25) ein unteres Detektionslimit für PC2 und PC3, das mehr als drei Größenordnungen unter dem durch konventionelle HPLC erreichten LLOD bei Analysen von *A. thaliana* Extrakten lag [227]. Detektionslimits anderer Studien waren ca. 2-fach [259] bzw. 20-fach höher [272]. Der Massenbereich wurde auf die gängigen Werte für *m/z* von 300-2000 eingegrenzt, um maximale Sensitivität zu erhalten. Daraus ergab sich eine Beschränkung der Analyse auf PC2 und PC3, welche aber zugleich die häufigsten PCs in *A. thaliana* sind. So zeigte ein Vergleich mit Tabak, dass dieser nach gleicher Dauer der Schwermetallexposition einen höheren Anteil an langkettigen PCs wie PC3 und PC4 aufwies [334]. In Haferwurzeln wiederum ist PC3 das einzige an der Cadmiumbindung beteiligte PC [190].

Die Analyse von Thiolen aus derivatisierten Pflanzenextrakten, die aus hydroponischer Anzucht unter Zugabe aller nötigen Mikroelemente, aber in Abwesenheit potentiell toxischer Metallüberschüsse stammen, bestätigte die konstitutive PC-Synthese in Wurzeln und in geringerem Maß ebenfalls in Blättern. Dies entspricht einer physiologischen Rolle von PC-Synthese über die Entgiftung von Metallen hinaus [225]. Zudem lieferte dieses Experiment den eindeutigen Beweis für PC2-Detektion in Wurzeln von *cad1-3* (vgl. Abb. 27A). Diese PC2-Bildung könnte entweder die Folge einer Restaktivität von *AtPCS1* in *cad1-3* sein oder aber der Beweis für *AtPCS2* Aktivität *in planta*. Die zweite Interpretation wird unterstützt durch die Tatsache, dass die Punktmutation in *cad1-3* eine Aminosäure betrifft, die in allen PCS-Proteinen zu 100 % konserviert ist. Hinzu kommt die Abwesenheit von *AtPCS1*-Transkripten in *cad1-3* [167]. Zwei weitere Beobachtungen untermauern die *AtPCS2*-abhängige PC-Synthese noch weiter. Erstens wies die *atpcs2* T-DNA Insertionslinie eine geringere PC2-Menge als der zugehörige Wildtyp *Ws-0* auf. Zweitens und noch entscheidender, konnte kein PC2 in Wurzeln der generierten Doppelmutante *cad1-3 atpcs2* nachgewiesen werden. Dies wurde in Wurzeln cadmiumbehandelter Pflanzen bestätigt, die wie erwartet eine starke Zunahme der PC-Akkumulation abhängig von der Cadmiumdosis zeigten (vgl. Abb. 27C). Im Gegensatz dazu wurde kein Hinweis auf eine nennenswerte *AtPCS2*-abhängige PC-Synthese in Blättern von *cad1-3* gefunden. Dies deckt sich mit dem Ergebnis, dass *AtPCS2*-eGFP Fusionsproteine unter Kontrolle des endogenen *AtPCS2*-Promotors nur Signale in der Wurzelspitze lieferten [233]. Die überraschende Detektion geringer Mengen an PC2 in Blättern der Doppelmutante unter Cadmiumbehandlung könnte die Existenz einer anderen, bisher unbekannt, enzymatischen Aktivität zur PC-Bildung andeuten. Dies könnte auch die zwar geringen aber messbaren Spuren an PC2 in Blättern cadmiumbehandelter *cad1-3* Pflanzen erklären (vgl. Abb. 27B). Hinweise auf eine alternative PC-bildende enzymatische Aktivität lieferten MS- und HPLC-Analysen von Extrakten aus *S. cerevisiae* und *Neurospora crassa*, in denen bei Anwesenheit von Cd im Medium PC2 detektiert wurde, obwohl beide Genome keine *PCS* Gene enthalten [335]. Möglicherweise kann diese PC-Bildung auf eine Seitenreaktion der GSH-Synthetase zurückgeführt werden, für welche die Polymerisierung von γ -EC Einheiten mit einer finalen Addition von Gly postuliert wurde [336,337]. Zudem konnte *in vitro* die Bildung von PC2 und PC3 bei hoher GSH-Konzentration im Puffer durch Carboxypeptidase Y gezeigt werden [338]. Wünschmann *et al.* [339] gelang es, durch "Knock-out" der vakuolären Serincarboxypeptidasen Y und C die PC-Synthese in *S. cerevisiae* zu unterbinden.

4.4.2 *AtPCS2*-abhängige Komplementation der Metallhypersensitivität von *cad1-3* in verschiedenen Testsystemen

Der Nachweis von *AtPCS2*-abhängiger PC-Synthese *in vivo* führte zum erneuten Test einer möglichen Komplementation des *cad1-3* Mutantenphänotyps durch *AtPCS2* Überexpression. Daher wurden Linien mit unterschiedlich starkem Level an *AtPCS2*-Protein (vgl. Abb. 28) generiert und ihr

Wachstum mit dem von *AtPCS1* überexprimierenden Linien verglichen. Bei Durchführung des am weitesten verbreiteten Testsystems, Wachstum auf vertikalen Agarplatten, wurde kein Hinweis auf eine Komplementation durch *AtPCS2* gefunden, während *AtPCS1 cad1-3* vollständig komplementierte (Abb. 29). Im Gegensatz dazu wurde zumindest für die starke *AtPCS2* Überexpressionslinie 3|4|2 eine partielle Rettung beobachtet, wenn die Cadmiumtoleranz in einem alternativen System, Wachstum von Keimlingen im Flüssigmedium, begutachtet wurde (Abb. 30). Zudem konnte in diesem Testsystem gezeigt werden, dass schon bei 0.5 μM Cd in Flüssigkultur eine 80 %-ige Reduktion des Wachstums der *cad1-3* Mutante auftrat. Die meisten nicht kontaminierten Standorte enthalten eine Cadmiumkonzentration von maximal 0.3 μM Cd in der Bodenlösung. Da in Studien überwiegend Konzentrationen über 1 μM Cd verwendet werden, wurde eine Rolle von PCs unter natürlichen Gegebenheiten bezweifelt (Wagner GJ, zitiert in [131]). Die hier verwendete Konzentration entspricht demnach nur einer geringfügigen Kontamination und demonstriert die essentielle Rolle von PCs in der Cadmiumentgiftung auch bei natürlich auftretenden Cadmiummengen in Böden.

Der ebenfalls stark ausgeprägte zinkhypersensitive Phänotyp der *cad1-3* Mutante konnte weder durch Überexpression von *AtPCS2* noch durch *AtPCS1* komplementiert werden (Abb. 31). Vermutlich kann dies auf den C-terminal fusionierten HA-Tag zurückgeführt werden. Da wie bereits erwähnt der C-Terminus als Metallerkennungsdomäne angesehen wird und die Zinkaktivierungsstelle mit einer Position zwischen Aminosäure 459 und dem Ende an Position 485 liegen muss (vgl. Abschnitt 4.3), kann durch den C-terminalen Tag eine Hinderung der Bindung von freien Zinkionen oder Zn-Thiolatkomplexen stattfinden bzw. die Weiterleitung der Aktivierung durch Interaktion von C-Terminus und katalytischem N-Terminus gestört werden. Da die Cadmiumaktivierungsstelle zwischen Aminosäure 220 und 372 liegen muss (vgl. Abschnitt 4.3), liegt hier wahrscheinlich keine Beeinträchtigung vor. Die Generierung von Linien mit N-terminalem Tag und ein anschließender Vergleich des Wachstums bei Zinküberschuss könnte möglicherweise auch zur Rettung des Zinkphänotyps führen.

Da die Komplementation des *cad1-3* Phänotyps durch *AtPCS2* nur in einem von zwei Testsystemen beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 29, 30), wurde das Wachstum aller Linien zusätzlich unter Bedingungen getestet, die natürlichen Gegebenheiten näherkommen (Abb. 33). Wie schon vorher für die Charakterisierung von *cad1-3* und *cad1-6* wurde eine moderate Cadmiummenge von 7.5 $\text{mg kg}^{-1}_{\text{Boden}}$ appliziert. Die resultierende Cadmiumkonzentration in der Bodenlösung, abgeschätzt am Wert der CaCl_2 -Extraktion, nähert sich einem Wert von 1 μM Cd an (vgl. Abschnitt 4.2). Wie schon vorher beobachtet (Abb. 15), waren Individuen des Wildtyps Col-0 durch diese Cadmiummenge im Boden nicht in ihrer Entwicklung beeinträchtigt, sondern wiesen sogar ein leicht verbessertes Wachstum auf (Abb. 33A, B). Im Gegensatz dazu war für *cad1-3* der bereits

bekannte hypersensitive Phänotyp zu beobachten, der sich wiederum in einer starken Blattchlorose und Wachstumsreduktion ausdrückte. Interessanterweise war im Grad der Komplementation zwischen *AtPCS1* und *AtPCS2* Überexpressionslinien kein Unterschied bei Anzucht auf cadmiumkontaminierte Erde zu beobachten. Nach 21- und 24-tägigem Wachstum waren die Blattflächen beider transgener Linien signifikant höher als die der Mutante. Das Fehlen einer vollständigen Komplementation bzw. das langsamere Wachstum auf cadmiumhaltiger Erde verglichen mit dem Wildtyp, deckt sich mit früheren Beobachtungen. Daraus leitet sich ab, dass *PCS* Überexpression nicht in einem Toleranzgewinn resultiert. In einigen Fällen wurde sogar von verringerter Toleranz berichtet [340–342]. Letzteres wurde nicht nur auf Erde sondern auch im flüssigen Medium beobachtet (vgl. Abb. 30). Die Begrenzung des Toleranzgewinns durch *PCS* Überexpression könnte in einer Limitierung von Cystein und GSH, welche für die PC-Synthese notwendig sind, bestehen [343]. Zudem konnte gezeigt werden, dass PCs in der Hypertoleranz gegen Metallionen, wie sie Metallophyten aufweisen, nur eine sehr geringe Rolle spielen [344]. In *A. halleri* ist Cd z.B. mit hochmolekularen Cadmiumbindungsproteinen assoziiert, welche einen möglichen Faktor für die Cadmiumtoleranz dieses Hyperakkumulierers darstellen könnten. Bei diesen Proteinen handelt es sich nicht um MTs [306]. Allerdings treten sie auch im Cytosol von *A. thaliana* und Gemüsepflanzen auf [345]. Unklar bleibt jedoch, ob diese Proteine *in vivo* existieren oder ob es sich hierbei eventuell nur um cadmiumbindende Artefakte aus der Proteinextraktion handelt. In der Tabakspezies *Nicotiana plumbaginifolia* konnten Proteine gefunden werden, deren molekulare Massen abhängig von der An- oder Abwesenheit von PC-Bildung waren. Änderungen in der Synthese dieser Cadmiumbindungsproteine, so die Idee, können das Fehlen von Phytochelatinen zu einem gewissen Teil kompensieren [346].

Zuletzt schlagen die unterschiedlichen Muster in der PC-Akkumulation von Pflanzen, die entweder *AtPCS1* oder *AtPCS2* überexprimierten, eine deutliche Diskrepanz der enzymatischen Eigenschaften beider Proteine vor. Erstens scheint *AtPCS2* weniger effizient in der Synthese von PC3 und wahrscheinlich generell längerkettiger PCs zu sein. Dies ist möglicherweise in einer reduzierten Fähigkeit begründet, PC2 als Substrat anstelle von reduziertem GSH zu akzeptieren. Zweitens akkumulierten *AtPCS2* Linien höhere PC2-Level in Abwesenheit von Metallüberschüssen. Dies galt für Flüssigkulturen und Erdanzuchten gleichermaßen (vgl. Abb. 32, 33) und stellt einen grundlegenden Gegensatz zum bisherigen Wissen über *PCS* dar, und zwar die Aktivierung von konstitutiv exprimiertem Protein durch erhöhte Metallmengen [169,171]. Tatsächlich zeigten diese Linien sogar überhaupt keinen Anstieg in PC2- und PC3-Blattgehalten von Pflanzen, die auf kontaminierte Erde angezogen wurden, obwohl Cd in Blättern deutlich akkumulierte (vgl. Abb. 33C, D). Cd^{2+} -Ionen zählen zu den stärksten Aktivatoren der *AtPCS1* [164,167,169], was sich auch in den stark erhöhten PC2- und PC3-Leveln von 35S::*AtPCS1* Linien auf cadmiumkontaminierte Erde widerspiegelt. Angelehnt an

die in verschiedenen Testsystemen erhobenen Daten, scheint *AtPCS2* eine Aktivität zu besitzen, die im Gegensatz zum etablierten Wissen über *AtPCS1 in planta* nicht durch Cd stimuliert wurde. Eine mögliche Aktivierung durch andere Metalle konnte bei heterologer Expression in *S. pombe* durch Zugabe erhöhter Eisenmengen, welches zugleich einziges Mikroelement im flüssigen Keimlingsassay ist, ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Versuche, die Unterschiede der enzymatischen Eigenschaften mit rekombinant aufgereinigtem Protein weiter aufzuklären, waren nicht erfolgreich. Während die Aufreinigung aktiver *AtPCS1* möglich war, wie auch von anderen Gruppen berichtet [169], scheiterten Versuche, aktive und lösliche *AtPCS2* zu erhalten. Dies war auch der Fall, wenn die gleichen Tags, Vektoren, Klonierungsstrategien und *E. coli* Stämme verwendet wurden (Daten nicht gezeigt). Zugleich auch ein Hauptunterschied zur *AtPCS1* [167], könnte die 90 bp Deletion in Exon 8 die fehlende Löslichkeit des *AtPCS2*-Proteins bedingen, da für den C-terminalen Bereich der Einfluss auf die Enzymstabilität nachgewiesen werden konnte [226]. Analog dazu konnte kein aktives und lösliches verkürztes *AtPCS1*-Protein erhalten werden (vgl. Abschnitt 4.3).

Zusammengefasst etablieren die gezeigten Daten eine konstitutive *AtPCS2*-Aktivität *in planta*, d.h. Katalyse der PC-Bildung in Abwesenheit potentiell toxischer Metallüberschüsse. Diese Aktivität reicht aus, um bei Überexpression den starken cadmiumhypersensitiven Phänotyp der *cad1-3* Mutante zumindest zum Teil zu retten. Dennoch ist die konstitutive PC2-Bildung durch *AtPCS2* in *cad1-3* eher gering, gemessen am Einfluss von *AtPCS1*, welcher in der PC2-Akkumulation in Wurzeln von *atpcs2* unter Kontrollbedingungen zum Ausdruck kommt (Abb. 27A). Höchst wahrscheinlich ist dieser geringe Beitrag der *AtPCS2* auf ihre gewebespezifisch begrenzte und schwache Expression zurückzuführen, welche nicht ausreicht, um Cadmiumtoleranz zu vermitteln. Dies wird im starken Phänotyp von *cad1-3* bei Cadmiumüberschuss offensichtlich (vgl. Abb. 29, 30, 33), welcher zudem eine Folge der reduzierten Bildung von PC3 und längerkettiger PCs sein könnte. Da PC-Cd-Komplexe mit wachsender Kettenlänge eine höhere pH Stabilität [347] aufweisen und eine erhöhte Bindungsaffinität der PCs zu Metallionen [217] auftritt, kann die verminderte Metalltoleranz von Pflanzen, die vornehmlich kurzkettige PCs synthetisieren, erklärt werden. Dies zeigte sich auch bei der verminderten Cadmiumtoleranz der *cad1-6* Mutante, welche auch überwiegend PC2 in Wurzeln synthetisiert (vgl. Abb. 15, 16). Des Weiteren waren, abgesehen vom etwas niedrigeren PC2-Gehalt, keine erkennbaren Unterschiede zwischen *atpcs2* und *Ws-0* zu beobachten. Dieser Umstand zusammen mit der konstitutiven Aktivität deuten eine physiologische Rolle der *AtPCS2* an, die unabhängig von der Metallentgiftung ist. Entsprechend den kürzlich aufgedeckten Funktionen für *AtPCS1* [244] sollten künftige Experimente die Bedeutung der *AtPCS2* im GS-Konjugat-Metabolismus oder der Pathogenabwehr testen.

4.5 Trennung von Peptidase- und Transpeptidaseaktivität der PCS

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden neben *AtPCS1* einige Proteine sowohl in Nichtwirtsresistenz als auch Metalltoleranz von Pflanzen eingeordnet. Ein Beispiel hierfür sind pflanzliche Defensine, kleine Proteine mit antimykotischer Aktivität, die zur Nichtwirtsresistenz von *A. thaliana* gegen *Colletotrichum gloeosporioides* beitragen [348]. Zugleich sind einige Defensingene in den Metallhyperakkumulierern *A. halleri* und *N. caerulea* konstitutiv höher exprimiert als in ihren nicht-hyperakkumulierenden Verwandten. Dies wurde unter anderem als Eigenschaft von Hyperakkumulierern eingestuft (zusammengefasst in [103]). Die Überexpression von Defensinen in *A. thaliana* führt zu erhöhter Zinktoleranz [349]. Des Weiteren ist der ABC-Transporter ABCG36/PEN3/PDR8 essentiell für eine effiziente Nichtwirtsresistenz von *A. thaliana* gegen den echten Gerstemehltau [249]. Zusammen mit PEN2 arbeitet er in einem von zwei bekannten Wegen, die Pre-Invasionsresistenz vermitteln (der alternative Weg wird von PEN1 behauptet [350]). Außerdem führt der Verlust von PEN3 zu einer verringerten Cadmiumtoleranz, welche dem reduzierten Efflux von Cd über die Plasmamembran zugeschrieben wird [285]. *A. thaliana* Pflanzen, die aufgrund einer Mutation im *GSH1* Gen, welches die γ -EC Synthetase codiert, eine gehemmte GSH-Syntheserate aufweisen, sind zudem in ihren Abwehrreaktionen beeinträchtigt. So ist bei den *GSH1* Mutanten *cad2* und *pad2* eine erhöhte Anfälligkeit gegen zahlreiche Pathogene zu verzeichnen [351]. Zudem ist die *GSH1* Mutante *zir1*, die eine geringere GSH-Akkumulation als *cad2* und *pad2* innehat, v.a. bei erhöhter Eisenzufuhr sensitiver gegenüber Zn als Wildtyppflanzen [352].

Für diese doppelte Funktion sind zwei Erklärungsansätze denkbar: (i) das betreffende Protein ist Teil eines Weges, der von Nichtwirtsresistenz und Metallentgiftung geteilt wird oder (ii) zwei individuelle Aktivitäten eines Proteins agieren in unterschiedlichen Wegen. Dabei fällt GSH1 höchst wahrscheinlich in Kategorie (i). GSH ist ein unentbehrliches Molekül mit wichtiger physiologischer Funktion in Redox-Homöostase und antioxidativer Abwehr. Außerdem dient es als Vorstufe für zahlreiche Biosynthesewege. Hierzu zählen Indolglucosinolate wie auch das häufigste Phytoalexin in *A. thaliana*, Camalexin [353]. Demnach können die zahlreichen Phänotypen von *A. thaliana* Mutanten mit reduzierter GSH-Konzentration eher durch die zentrale Rolle von GSH im Metabolismus erklärt werden als durch hypothetische distinkte Aktivitäten der γ -EC Synthetase. Im Gegensatz dazu können die scheinbar unzusammenhängenden biologischen Funktionen von PEN3 sehr wahrscheinlich der breiten Substratspezifität dieses Transporters zugeschrieben werden [354]. Die Hauptfrage dieses Teils der Arbeit war also, ob *AtPCS1* analog zu *GSH1* in die erste Kategorie fällt oder in die zweite Kategorie wie PEN3.

Wie schon früher erwähnt, gehört *AtPCS1* zur Papainsuperfamilie mit einem aktiven Zentrum, das Cysteinproteasen ähnelt. Dabei ist sie zur Katalyse von zwei verschiedenen Reaktionstypen fähig und zwar der Spaltung von Peptidbindungen in GSH oder verwandten Molekülen und dem Transfer

der entstandenen Dipeptide auf ein Akzeptormolekül. Diese Transpeptidaseaktivität resultiert in der Synthese von PCs mit unterschiedlichen Kettenlängen. Die daraus abgeleiteten Peptide puffern dann labile cytosolische Metallpools (vgl. Abschnitt 1.3). Alternativ dazu kann *AtPCS1* ausschließlich als Protease arbeiten und Peptidbindungen in GS-Konjugaten hydrolysieren [225]. Um zu überprüfen, ob die Transpeptidaseaktivität auch der Immunfunktion des Proteins zugrundeliegt, wurde die phylogenetisch entfernte PCS aus *C. elegans* in der *cad1-3* Mutante exprimiert. Dieses Protein würde mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht alle potentiellen enzymatischen Aktivitäten einer pflanzlichen PCS *in vivo* aufweisen, wobei die Vorbedingung in einer etablierten Transpeptidaseaktivität und Funktion in der Metalltoleranz bestand.

PCS Gene scheinen ubiquitär in höheren Pflanzen zu sein, während ihr Auftreten im Tierreich zwar weitverbreitet aber lückenhaft ist [355]. Nur sehr wenige PCS aus Tieren wurden bisher untersucht. Hierbei stellt *C. elegans* die einzige Spezies dar, für welche die PC-abhängige Cadmiumentgiftung demonstriert wurde [355]. Das verantwortliche Enzym *CePCS* katalysiert die PC-Synthese im heterologen System [237,356] und ein Ausschalten des zugehörigen Gens macht den Fadenwurm hypersensitiv gegen Cd [237]. Im wildtypischen *C. elegans* löst Cadmiumexposition PC-Synthese aus, nicht aber in der *pcs1* Mutante [196]. Andererseits fehlt der *CePCS* die Pfam Domäne 09328 ("Phytochelatin_C", Domain of unknown function, DUF1984), die Teil aller PCS Proteine aus Pflanzen, aber nicht essentiell für deren enzymatische Funktion als Phytochelatinsynthase ist. Demzufolge stellte sich *CePCS* als bestmöglicher Kandidat für die Expression einer entfernt verwandten PCS nicht-pflanzlichen Ursprungs in *A. thaliana* dar.

4.5.1 Untersuchung der Transpeptidaseaktivität

Zwei transgene Linien, die sich im *CePCS* Transkript- und Proteinlevel unterschieden (Abb. 34), wurden ausgewählt und auf ihre Toleranz gegenüber Cd und Zn getestet. Zusätzlich wurden zwei Linien, als 35S::*CePCS*[‡] bezeichnet, mit schwacher Expression einer, auf die Länge der prokaryotischen *NsPCS* verkürzten *CePCS*, mitgeführt. Frühere Experimente zeigten, dass diese verkürzte *CePCS*-Variante bei heterologer Expression in Hefe noch zur PC-Synthese fähig war (Daten nicht gezeigt). Durch die Verkürzung und die damit einhergehende strukturelle Veränderung des Proteins sollte die Möglichkeit einer Trennung von Peptidase- und Transpeptidaseaktivität noch erhöht werden.

In zwei verschiedenen Systemen zur Untersuchung der Schwermetalltoleranz konnte die Volllänge-*CePCS* den cadmiumhypersensitiven Phänotyp von *cad1-3* retten (Abb. 35, 37). Dabei war das Wachstum der getesteten 35S::*CePCS* Linien praktisch nicht voneinander zu unterscheiden. Dies impliziert, dass das *CePCS*-Level nur geringen Einfluss auf den Phänotyp hat. Dies ist von besonderer Relevanz im Hinblick auf die, in der Literatur beschriebenen, gegensätzlichen Effekte auf die

Metalltoleranz als Folge der Überexpression von pflanzlichen *PCS* Genen [276,334,340]. Außerdem bestätigt es die Beobachtung in *S. pombe*, dass ein vergleichsweise geringes Expressionslevel der *CePCS* genauso effektiv wie eine starke Expression zur Cadmiumtoleranz und PC-Akkumulation beiträgt [356].

Die hypersensitive Reaktion der *cad1-3* Mutante in Anwesenheit von Zinküberschuss wurde nicht durch *CePCS* komplementiert (Abb. 35, 37). Auch die Expression der verkürzten *CePCS* in *cad1-3* führte nicht zum Toleranzgewinn der Mutante gegenüber beiden Metallen (Abb. 36, 38). Das Ausbleiben der Toleranzvermittlung bei Zinküberschuss könnte hierbei auf die fehlende Pfam Domäne 09328 zurückzuführen sein, da der sequenzvariable C-terminale Bereich für die Erkennung eines breiteren Metallspektrums angesehen wird [167,200,229]. Für höhere Pflanzen, deren PCS diese Domäne besitzen, konnte am Beispiel von *A. thaliana* und Pappeln die Beteiligung der PCS an der Zinkhomöostase gezeigt werden [(Abb. 13), 215,274]. Für nicht-pflanzliche PCS jedoch gibt es kaum Belege für eine Aktivierung durch Zn. Zwar konnte für *SpPCS*, die in *E. coli* exprimiert wurde, PC-Bildung detektiert werden [167], jedoch konnten bei Expression von *CePCS* in *S. pombe* keine PCs bei Zinkzugabe gemessen werden [356]. Einen indirekten Hinweis auf eine mögliche Zinkaktivierung der *CePCS* lieferte die Beobachtung, dass eine *C. elegans* Tripelmutante aus zwei MTs und PCS1 eine verminderte Zinktoleranz bei Exposition mit Zinkoxid-Nanopartikeln aufwies. Allerdings fehlen hier Daten zur PC-Analyse [357]. Eine andere Erklärung für die fehlende Komplementation bei Zinkbelastung könnte die Störung der Zinkerkennung und -aktivierung durch den C-terminalen HA-Tag darstellen. Analog zu 35S::*CePCS* Linien konnten *AtPCS1* Überexpressionslinien, die ebenfalls am C-Terminus mit dem HA-Tag fusioniert waren, nur den cadmium-, nicht aber den zinkhypersensitiven Phänotyp von *cad1-3* retten (vgl. Abb. 30, 31 und Abschnitt 4.4.2).

Die Analyse der PC-Akkumulation in hydroponisch angezogenen Pflanzen unter Kontrollbedingungen oder in Anwesenheit geringer Cadmiumkonzentrationen bestätigte, dass auch bei Cadmiumzugabe nur Spuren von PCs in *cad1-3* detektierbar waren. Der Eindruck aus den Toleranztests, dass die verkürzte *CePCS in planta* im Gegensatz zum heterologen System keinerlei Transpeptidaseaktivität aufwies, konnte durch die PC-Analyse bestätigt werden (Abb. 40). Für 35S::*CePCS* Linien hingegen zeigte sich bezüglich der PC-Akkumulation eine fast vollständige Wiederherstellung der Wildtypsituation (Abb. 39). Die Eignung dieser Linien für die Untersuchung einer möglichen Beteiligung der PC-Synthese in der pflanzlichen Immunantwort war somit gegeben.

4.5.2 Untersuchung der Peptidaseaktivität

4.5.2.1 Analyse der PCS-abhängigen Callosedeposition

Ursprünglich wurde *AtPCS1* durch eine erhöhte Transkription in Keimlingen, die mit dem MAMP Flg22 behandelt wurden, mit dem pflanzlichen Immunsystem in Verbindung gebracht [244]. Dabei

steuert die MAMP-Erkennung ein Spektrum an Antworten, die das Wachstum von angepassten und nicht-angepassten Pathogenen einschränkt [358]. So werden alle *PEN* Gene durch Flg22 induziert und sind Teil einer großen Anzahl an Abwehrmechanismen, die durch MAMP-Erkennung ausgelöst werden und unabhängig von der Natur des einfallenden Pathogens sind [350]. Eine dieser Abwehrreaktionen ist die Einlagerung von Callose in die Zellwand, welche als Indikator für die Analyse zellulärer Ereignisse verwendet wurde, die der MAMP-Erkennung nachgeschaltet sind. In dem daraus abgeleiteten Modell wurde PCS1 zusammen mit PEN2 und PEN3 zwischen methoxylierten Indolglucosinolaten als Signalmolekül und der Aktivierung der Callosesynthesen eingeordnet [244]. Dabei soll *AtPCS1* am Abbau von Indolglucosinolaten teilnehmen, welche als Signalmolekül für die Calloseverstärkung der Zellwand fungieren. Da über eine Abhängigkeit dieser Reaktion von Metallionen spekuliert wurde, sollten diese Experimente anders, als im ursprünglichen Protokoll angegeben, im Hoaglandmedium erfolgen, um eine Interferenz durch höhere Ionenstärken, wie sie im MS-Medium vorliegen, zu vermeiden. Im Gegensatz zu Clay *et al.* [244] wurde allerdings für *cad1-3* Callosedeposition beobachtet, die dem Wildtyp vergleichbar war. Eine Verunreinigung der verwendeten Flg22-Lösung konnte durch Vergleich mit einem kommerziellen Produkt ausgeschlossen werden (Abb. 41, 43). Um zudem Fehler bei der Durchführung auszuschließen, wurden die Mutanten *myb51* und *cyp81F2*, die ebenfalls Teil dieser Signaltransduktionskaskade sein sollen, parallel im Hoagland- und MS-Medium getestet. Hierbei zeigten beide Mutanten wie auch *cad1-3* und der Wildtyp starke Callospots bei Flg22-Zugabe, wenn die Anzucht im Hoaglandmedium erfolgte. Wurde MS-Medium als Nährlösung verwendet, zeigten *myb51* und *cyp81F2* den von Clay *et al.* beschriebenen, callosefreien Phänotyp, während für *cad1-3* nach wie vor starke Calloseablagerungen beobachtet wurden (Abb. 42). Demnach stellte sich die Verwendung von Hoaglandmedium für diese Experimente als ungeeignet dar, war zugleich aber nicht verantwortlich für den zu Clay *et al.* gegensätzlichen Phänotyp der *cad1-3* Mutante. Durch Mitführen des Columbia Wildtyps *Ws-0*, welcher einen Defekt im FLS2-Rezeptor beinhaltet und somit nicht zur Flg22-Erkennung fähig ist [279,280], konnte sichergestellt werden, dass die für *cad1-3* beobachtete Calloseablagerung weder auf eine mechanische Verletzung der Keimlinge während der Behandlung noch auf einen anderen Elicitor als Flg22 in den verwendeten Lösungen zurückzuführen ist (Abb. 43). Die von Clay *et al.* postulierte Rolle der PCS in der Calloseantwort auf MAMP-Erkennung konnte somit nicht bestätigt werden. Hinzu kommt noch, dass in einer nachfolgenden Untersuchung, bei der die Calloseverstärkung in Wurzeln untersucht wurde, die Aktion der meisten Gene mit Ausnahme von PCS1 getestet und bestätigt wurde [359].

4.5.2.2 Untersuchung der PCS-abhängigen Penetrationsresistenz

Um die Funktion der *AtPCS1* in der Immunantwort weiter zu untersuchen, wurde ein Versuch zum Test der Nichtwirtsresistenz herangezogen, der vorher für die Charakterisierung von *pen*

Mutanten verwendet wurde. *A. thaliana* Wildtyppflanzen besitzen eine effektive Pre-Invasionsresistenz gegen das Kartoffelpathogen *P. infestans*, während *pen2* Mutanten einen verstärkten Zelltod nach Inokulation mit *P. infestans* Zoosporen zeigen [245,281]. Ein sehr ähnlicher Phänotyp wurde beobachtet, wenn die *AtPCS1* Mutante *cad1-3* dem gleichen Test unterzogen wurde (Abb. 44). Dies bestätigt die bisher nicht veröffentlichte Beobachtung von Lim & Somerville, wobei ein Defekt der *AtPCS1* zur Beeinträchtigung der Penetrationsresistenz gegen den Gerstemehltau führt. Hiermit wurde eine Funktion der *AtPCS1* in der pflanzlichen Immunantwort gegen nicht-angepasste Pathogene etabliert.

Der Phänotyp des verstärkten Zelltods nach Inokulation von *cad1-3* mit *P. infestans* Zoosporen blieb unverändert bei Expression des Volllänge-Proteins bzw. der verkürzten *CePCS*-Variante. Überraschenderweise war auch für die *AtPCS1* Überexpressionslinie keine Komplementation des Penetrationsphänotyps festzustellen (Abb. 44). Da jedoch sowohl für *CePCS* als auch *AtPCS1* Überexpressionslinien die Cadmiumaktivierung zweifelsfrei belegt werden konnte (Abb. 39), führte dieses Ergebnis zu der Schlussfolgerung, dass die Transpeptidaseaktivität der PCS und somit die PC-Synthese nicht verantwortlich ist für die Rolle in der Nichtwirtsresistenz. Stattdessen scheint die Peptidaseaktivität die Funktion der *AtPCS1* in der Pre-Invasionsresistenz zu erklären. Allerdings muss diese Aktivität *in planta* noch in einen metabolischen und physiologischen Kontext gebracht werden.

4.5.3 Mögliche physiologische Aktivitäten der PCS-Peptidaseaktivität

Der Beweis für die Prozessierung von GS-Konjugaten durch *AtPCS1* ist bisher auf das künstliche Substrat GS-Biman beschränkt [243]. Ein natürlicher Substratkandidat, der die Peptidaseaktivität der *AtPCS1* mit der Immunfunktion verknüpfen könnte, tauchte bei der Aufklärung der Biosynthese des Phytoalexins Camalexin auf, welche über ein Indol-3-Acetonitril-Cysteinkonjugat (Cys-IAN) abläuft. Dieses wiederum leitet sich durch eine Peptidspaltung vom jeweiligen GSH-Konjugat (GS-IAN) ab [360]. Allerdings erbrachten die Analyse des Metaboloms der jeweiligen Mutanten wie auch die Aktivitätsdaten der rekombinanten Proteine einen starken Hinweis auf eine Schlüsselrolle der cytosolischen γ -glutamyl Peptidasen GGP1 und GGP3 in der Prozessierung von GS-IAN [361]. PCS1 wird daher nicht länger als Teil der Camalexinbiosynthese betrachtet [362].

Die zweite und dritte Möglichkeit für eine Verknüpfung der *AtPCS1*-Peptidaseaktivität mit der pflanzlichen Immunabwehr ist assoziiert mit Biosynthese und Abbau von Indolglucosinolaten, deren Syntheseweg sich mit dem von Camalexin die Vorstufen Tryptophan und Indol-3-Acetaldoxim teilt [362]. Zudem dient in beiden Fällen GSH als Schwefeldonor. Dabei wird das intermediäre GS-Konjugat zum Cys-Konjugat durch Abspaltung des γ -glutamyl Rests und des Gly prozessiert. Die Katalyse der ersten Reaktion läuft zweifelsfrei über GGP1 und GGP3 ab [361]. Für die Abspaltung des Gly wäre *AtPCS1* ein geeigneter Kandidat. Allerdings ist unklar, ob für diese Reaktion *in vivo*

zusätzliche Carboxypeptidasen benötigt werden. Berücksichtigt man die Analogie zwischen der Camalexin- und Indolglucosinolatbiosynthese hinsichtlich der Prozessierung des GS-Konjugats [361], so erscheint eine Beteiligung der *AtPCS1* auch in diesem Fall unwahrscheinlich.

Wie schon in Abschnitt 1.5 erwähnt, wurden *AtPCS1* und *PEN2* in der von Clay *et al.* [244] postulierten Flg22-gesteuerten Signaltransduktionskaskade zur Calloseverstärkung der Zellwand unterhalb des zentralen Signalmoleküls 4-Methoxy-Indol-3-ylmethylglucosinolat (4-Methoxy-I3G) eingeordnet. Die molekulare Analyse des *PEN2*-abhängigen Wegs identifizierte Indol-3-ylmethylamin und Raphanusamsäure als Endprodukte [246]. Der hypothetische Weg, der zu diesen Verbindungen führt, beinhaltet die Konjugierung von Isothiocyanaten mit GSH, welche wiederum Produkte der *PEN2*-katalysierten Hydrolyse von Glucosinolaten darstellen. Die weitere Prozessierung dieser GS-Isothiocyanate durch Entfernung des γ -glutamyl Rests und des Gly durch Peptidaseaktivitäten würde zu einem S-cysteinyl-Isothiocyanat-Konjugat führen, welches anschließend zu den oben genannten Endprodukten metabolisiert würde [246]. Als Kandidat für die Glycinspaltung dient erneut die *AtPCS1*. Während die analoge Reaktion mit GS-konjugierten Xenobiotika *in vivo* in der Vakuole stattfindet und somit sehr wahrscheinlich nicht von *AtPCS1* ausgeführt wird [288], soll die mögliche Prozessierung der GS-Isothiocyanat-Konjugate im Cytosol ablaufen, wo wiederum *AtPCS1* aktiv ist [233]. Der direkte experimentelle Beweis für die postulierte Rolle von *AtPCS1* im *PEN2*-abhängigen Weg stellt nicht zuletzt wegen unbekannter Konzentrationen und Stabilität der Intermediate eine Herausforderung dar. Ein Grund für die fehlende Penetrationsresistenz der *AtPCS1* Überexpressionslinie (Abb. 44) könnte demnach im C-terminalen HA-Tag liegen. Dieser könnte zu einer sterischen Hinderung bei der Bindung der Substratmoleküle führen.

Ein weiterer Punkt, der sich aus der Annahme von zwei abgegrenzten enzymatischen Aktivitäten der *AtPCS1* ergibt, ist die Frage, unter welchen physiologischen Bedingungen diese *in vivo* auftreten. Die Transpeptidaseaktivität ist bekanntermaßen von der Aktivierung freier Metalle oder Metall-Thiolatkomplexe abhängig [225]. Da Cadmiumionen als stärkste Aktivatoren der PCS gelten und *PEN3* Cadmiumtoleranz vermittelt, wurde über die Abhängigkeit der Immunantwort von der Anwesenheit dieses Metalls spekuliert [244]. Allerdings ist Cd ein nicht-essentielles Metall und die Akkumulation unter den meisten natürlichen Gegebenheiten auf Wurzeln beschränkt. Wahrscheinlicher ist eine posttranslationale Modifikation der *AtPCS1*, die der MAMP-Erkennung nachgeschaltet ist, wie es für einige potentielle Phosphoproteine unterhalb der MPK3/6-Aktivierung gefunden wurde [363]. Die physiologische Bedeutung dieser Beobachtung erfordert jedoch weitere Studien.

4.6 Der ABC-Transporter *PEN3*

Der Transporter *PEN3* (auch ABCG36 bzw. PDR8) ist einer von 129 ABC-Transportern aus *Arabidopsis*. Allerdings ist für einen Großteil dieser Transporter weder Substrat noch physiologische

Relevanz bekannt [364]. Einige ABC-Transporter, wie z.B. bakterielle Permeasen, sind sehr spezifisch für ein Substrat [365], während andere, darunter Mitglieder der MRP-Familie ("*multi-drug resistance associated protein*") aus Pflanzen, Hefen und Säugetieren, wenig selektiv agieren [366,367]. Das Substratspektrum der ABC-Transporter ist sehr breit gefächert und reicht von Ionen, Kohlenhydraten, Lipiden, Xenobiotika und Arzneimitteln bis hin zu Schwermetallen [367,368]. So ist die Existenz von drei Hefetransportern bekannt, die Cd in der Vakuole sequestrieren. Zum einen YCF1 aus *S. cerevisiae*, der Cd-GS₂ Komplexe in die Vakuole verschiebt [369], und zum anderen die *S. pombe* Transporter HMT1 und ABC2, die PC-Cd-Komplexe über den Tonoplast transportieren [192,193]. Während es sich bei HMT1 um einen "*half-size*" ABC-Transporter handelt, d.h. nur jeweils eine Transmembrandomäne und eine Nukleotidbindungstasche sind präsent, ist ABC2 ein "*full-size*" Transporter, der, wie für diesen Typ von ABC-Transportern üblich, beide Domänen jeweils zweimal beinhaltet. Dabei war HMT1 das erste Beispiel eines ABC-Transporters, der durch Sequestrierung in einem intrazellulären Kompartiment Toleranz gegen eine toxische Substanz verleiht. Die erst kürzlich identifizierten Transporter AtABCC1-3 sind die pflanzlichen Orthologe für den Transport von PC-Metall-Komplexen in die Vakuole [197–199].

PEN3 ist in der Plasmamembran lokalisiert und ist ebenso wie PCS1 sowohl in der Nichtwirtsresistenz als auch in der Schwermetallentgiftung beteiligt. Neben dem Export von Cadmiumionen [285] soll er auch in der Sezernierung von Toxinen an der Eintrittsstelle von Pathogenen fungieren, welche deren Eindringen und Verbreitung verhindern sollen [249,282]. Zudem wurde für PEN3 über eine Rolle in der Salztoleranz wie auch im Transport einer Auxinvorstufe berichtet [283,284]. Der Transporter wird in allen Geweben, vornehmlich aber in Blättern exprimiert. Dabei ergaben GUS-Reporterkonstrukte die stärkste Aktivität des *PEN3*-Promotors in der Epidermis von Blättern und Wurzeln. Die Expression wiederum wird induziert durch Pathogenbefall und eine Reihe von abiotischen Stressfaktoren, wozu auch Metallüberschuss zählt [249,282,285]. So wird die Genexpression durch die Anwesenheit von Cd, Pb und Cu verstärkt, wobei in diesem Fall die Induktion in Wurzeln stärker ist als im Spross [285].

Noch für einen weiteren ABC-Transporter, AtPDR12, gibt es Hinweise auf eine duale Funktion in angeborener Immunantwort und Schwermetallentgiftung. Hierbei wurde der Transport von Diterpenen postuliert, welche als endogenes Signal für die Expressionsinduktion von Abwehrgenen bei Pathogenbefall dienen sollen [370]. Zudem wurde ein Beitrag zur Bleitoleranz nachgewiesen [371].

4.6.1 PEN3 vermittelt Cd- und Zinktoleranz

Die weitere Charakterisierung der Schwermetalltoleranz, vermittelt durch PEN3, sollte Aufschluss darüber geben, ob die physiologische Parallelität zur PCS1 über die Cadmiumentgiftung

hinausgeht. Zunächst wurden die vier *pen3* Allele, die von Stein *et al.* [249] bezüglich ihrer Penetrationsresistenz charakterisiert wurden, auf ihre Cadmium- und Zinktoleranz getestet. Sowohl im flüssigen Keimlingsassay (Abb. 46) als auch auf Agarplatten (Abb. 47) konnte für *pen3* Allele ein cadmiumhypersensitiver Phänotyp beobachtet werden. Allerdings fiel die Stärke der hypersensitiven Antwort wesentlich geringer als für *cad1-3* aus, was die Schlüsselrolle von PCs in der Cadmiumentgiftung erneut unterstreicht. Dennoch konnte eine Rolle für PEN3 in der Cadmiumentgiftung bestätigt werden. Bisherige Ergebnisse bezogen sich auf RNAi-Pflanzen, nicht auf Punktmutanten bzw. "knock-out" Linien [285].

Auch bei Zinküberschuss wiesen *pen3* Keimlinge in Flüssigkultur und auf Agarplatte einen hypersensitiven Phänotyp auf (Abb. 46/47 C, E). Dies steht im Gegensatz zu Resultaten von Kim *et al.* [285], die keine Wachstumsreduktion von RNAi-Pflanzen bei erhöhten Zinkmengen im Medium feststellten. Allerdings wurden diese Experimente im MS-Medium durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.1.1). Eine Ausnahme in der Zinkhypersensitivität stellte das *pen3-3* Allel dar. So konnte in beiden Testsystemen bezüglich der Wurzellänge keine signifikante Reduktion erfasst werden. Jedoch ergab sich auf Agarplatten ein signifikant niedrigeres Keimlingsfrischgewicht verglichen mit dem Wildtyp (Abb. 47E). Da die Expression von PEN3 verstärkt in oberirdischen Pflanzenteilen stattfindet [249] und nur bei Zugabe von Cd, Pb oder Cu zum Medium eine verstärkte Expression in Wurzeln ausgelöst wird [285], könnte eine fehlende PEN3 Aktivität im Blatt den stärkeren Effekt auf den Spross und demnach auf das Keimlingsgewicht erklären. Dennoch konnte zumindest für einen Wachstumsindikator, Wurzellänge bzw. Frischgewicht, für alle *pen3* Allele eine Reduktion verglichen mit dem Wildtyp bei Zn- oder Cadmiumzugabe detektiert werden. Die relativ geringe Wachstumsbeeinträchtigung von nur 35 % für *cad1-3* bzw. im Mittel ca. 17 % für *pen3* Mutanten bei Zinkzugabe verglichen mit einer Reduktion um 80 % bzw. nur ca. 20 % bei Cadmiumüberschuss (Abb. 46) demonstriert, dass die Zinkhomöostase im Gegensatz zur Cadmiumentgiftung von mehreren Faktoren beeinflusst wird. Dazu zählen zunächst der kontrollierte Transport in den Symplast, die Chelatierung durch verschiedene Liganden wie NA und PCs aber auch Aminosäuren wie His und organische Säuren. Des Weiteren trägt die gezielte Sequestrierung von Zn in der Vakuole zur basalen Zinktoleranz bei, so dass eine möglichst geringe Translokation von der Wurzel in den Spross stattfindet (zusammengefasst in [372]).

Eine interessante Beobachtung auf Agarplatten (Abb. 47) war die unterschiedlich starke Ausprägung der Metallsensitivität zwischen Punktmutanten (*pen3-1*, *pen3-2*) und T-DNA Insertionslinien (*pen3-3*, *pen3-4*). So waren erstere stärker im Wurzelwachstum beeinträchtigt, während zweitere einen stärkeren Effekt auf das Keimlingsgewicht erkennen ließen. Zwar waren diese Unterschiede nicht für alle Vergleiche signifikant, dennoch konnte ein allgemeiner Trend beobachtet werden. Die Mutanten *pen3-1* und *pen3-2* beinhalten jeweils eine Punktmutation in

einer der beiden Nukleotidbindungstaschen des ABC-Transporters und weisen noch *PEN3*-Transkripte auf, welche den T-DNA Linien vollständig fehlten [249]. Die sogar stärkere Beeinträchtigung des Wurzelwachstum auf erhöhte Zn- und Cadmiummengen verglichen mit den T-DNA Insertionslinien schließt somit eine Restaktivität des Transporters aus.

Unter Kontrollbedingungen war in beiden Testsystemen das Wachstum aller *pen3* Allele, im Fall von *pen3-2* und *pen3-4* sogar signifikant, reduziert, verglichen mit dem Wildtyp. Durch Export der Auxinvorstufe Indol-3-Buttersäure aus dem Cytosol nimmt *PEN3* Einfluss auf die Auxinhomeostase [284]. Da das Hormon Auswirkungen sowohl auf Zellteilung und Elongation als auch auf Wurzel- und Stielelongation hat [373], könnte diese generelle Beeinträchtigung im Wachstum von *pen3* Mutanten Folge der fehlenden Auxintransportaktivität sein.

4.6.2 Koaktivität von *PEN3* und *PCS1* in Cadmiumentgiftung

Durch Erzeugung einer Doppelmutante aus *cad1-3* und *pen3-1* und der anschließenden Beurteilung der Metalltoleranz, verglichen mit den Einzelmutanten, sollte untersucht werden, ob *PCS1* und *PEN3* in einem oder in zwei physiologischen Wegen agieren. Untersuchungen im flüssigen Keimlingsassay und auf Agarplatten ergaben einen additiven Effekt beider Mutationen auf die Zinkhypersensitivität von Doppelmutantenlinien (Abb. 49, 50). Die Cadmiumhypersensitivität hingegen war in der Doppelmutante nicht verstärkt (Abb. 50). Allerdings war das Wurzelwachstum der *cad1-3* Mutante bereits zu 88 % reduziert, so dass sich die Beobachtung einer zusätzlichen starken Wachstumsbeeinträchtigung als schwierig erweisen könnte. Dennoch war auch keine leichte Tendenz für eine weitere Reduktion der Wurzellänge erkennbar, was darauf hindeutet, dass *PEN3* und *PCS1* im gleichen Weg der Cadmiumentgiftung arbeiten. Dies legt die Komplexierung der Cadmiumionen durch PCs und den anschließenden Export der PC-Cd-Komplexe nahe. So konnte der Transport von PC-Komplexen mit Cd, As und Hg in die Vakuole durch die ABC-Transporter *AtABCC1-3* bereits nachgewiesen werden [197–199]. Der Export von PC-Cd-Komplexen aus dem Symplast durch den ABC-Transporter *PEN3* ist demnach nicht unwahrscheinlich. Zwar ist bekannt, dass die Komplexe hauptsächlich in der Vakuole sequestriert werden (Abschnitt 1.3.2), jedoch schließt dieser Prozess einen zusätzlichen Export aus der Zelle nicht aus. Der geringe Umfang dieser Effluxaktivität schlägt sich zudem in der nur schwachen Wachstumsreduktion bei Cadmiumüberschuss von *pen3* Einzelmutanten (Abb. 46, 47) im Vergleich zur starken hypersensitiven Antwort von *cad1-3* nieder. Der Export von nicht-essentiellen Elementen als Detoxifizierungsstrategie ist für As bekannt [105]. Die Tendenz einer verstärkten hypersensitiven Reaktion von Doppelmutanten, verglichen mit den Einzelmutanten, in Anwesenheit erhöhter Zinkmengen deutet hingegen auf eine Funktion von *PCS1* und *PEN3* als Teil unterschiedlicher Toleranzmechanismen hin. Analog dazu wurde für die Bleitoleranz von *pdr12* Mutanten ein additiver Effekt bei BSO-Zugabe, also Inhibierung der GSH- und

somit auch PC-Synthese, nachgewiesen. Die Schlussfolgerung war demnach ein PC-unabhängiger Beitrag zur Bleitoleranz durch PDR12 [371].

4.6.3 Zn- und Cadmiumakkumulation

Für PEN3 RNAi-Pflanzen wurde ein zum Wildtyp erhöhter Cadmiumgehalt in Wurzel und Spross detektiert, bedingt durch die verringerte Exportaktivität [285]. Die Metallprofile von *pen3-1* und *pen3-3* in Flüssigkultur ließen diesen Unterschied vermissen. Sowohl Wurzeln als auch Blätter enthielten dem Wildtyp vergleichbare Cadmiummengen (Abb. 51). Doppelmutanten wiesen analog zu *cad1-3* eine um 25 % reduzierte Cadmiumakkumulation im Spross und eine um etwa 60 % verringerte Cadmiummenge in Wurzeln auf. Dies deckt sich mit Metallprofilen aus Birkenkeimlingen, bei welchen die Inhibierung der PC-Synthese durch BSO ebenfalls zu einer niedrigeren Cadmiumakkumulation in Wurzel und Spross führte [327]. Im Gegensatz dazu wurden in Wurzeln von *pen3-1* und *pen3-3* 20 % weniger Zn als in Col-0 detektiert, während in Blättern leicht erhöhte Zinkmengen auftraten. Die niedrigere Zinkakkumulation in Wurzeln ist überraschend, da es sich bei PEN3 um einen Exporter handelt und dieser in Wurzeln hauptsächlich in lateralen Wurzelhauben sowie in der Endodermis und im Cortex exprimiert ist ("*Arabidopsis eFP Browser*", [374]). Analog zu den Blattgehalten wäre also ein erhöhter, zumindest aber vergleichbarer, Zinkgehalt zu Col-0 zu erwarten. Denkbar wäre nur, dass Zink durch die fehlende Exportaktivität in Wurzeln akkumuliert und in den Spross verschoben wird. Dort kann es ebenfalls nicht exportiert werden, so dass eine leichte Erhöhung des Zinkgehalts auftritt.

4.6.4 Beitrag von PEN3 zur Arsentoleranz

Die essentielle Rolle von PCs in der Arsendetoxifizierung wird demonstriert durch die fehlende Keimungsfähigkeit von *cad1-3* bei 200 μM As(V) und 5 μM As(III) Konzentrationen, die beim Wildtyp nur zur halbmaximalen Wachstumsreduktion führen (Abb. 52). Hierbei wird die höhere Toxizität von As(III) durch den 40-fachen Konzentrationsunterschied zwischen Arsenat und Arsenit *in planta* veranschaulicht [375,376]. Bei den angegebenen Arsenkonzentrationen wiesen *pen3* Mutanten eine nur sehr geringe Wachstumsbeeinträchtigung, gemessen an Wurzellänge und Keimlingsgewicht, auf. Dies lässt zwar auf eine Beteiligung an der Entgiftung dieses Metalloids schließen, allerdings nur in sehr untergeordneter Funktion. Interessanterweise zeigte *pen3-1*, verglichen mit Col-0, sogar ein signifikant besseres Wachstum in Anwesenheit beider Arsenformen. Da diese Punktmutation durch EMS-Mutagenese herbeigeführt wurde, sind weitere Mutationen in dieser Linie nicht auszuschließen, die eine verbesserte Toleranz bedingen könnten.

Zusätzlich zum Transport von Glutathionato-Cd-Komplexen wurde für den Transporter ScYCF1 der Transport von As-GS₃ Konjugaten postuliert [107]. Für die menschlichen Transporter ABCC1 und

ABCC2 wurde ebenfalls der Transport von As-GS₃ nachgewiesen. As(V) hingegen diente nicht als Substrat [377]. Ob PEN3 zur Arsentoleranz durch den Transport von PC-As-Komplexen, wie AtABCC1 und AtABCC2 [198], oder freien Arsenionen beiträgt, bleibt unklar.

4.7 Schlussbemerkung und Ausblick

Bei Wachstum von *A. thaliana* auf kontaminierter Erde, die Zn- bzw. Cadmiummengen enthielt, denen Pflanzen auch in natürlichen Habitaten mit moderater Kontamination ausgesetzt sein können, wurde die elementare Rolle von PCs in der Zn- und Cadmiumentgiftung bestätigt. Zudem zeigte sich, dass PCs nicht nur für die Toleranz diesen Metallen gegenüber nahezu unverzichtbar sind, sondern auch zu ihrer Akkumulation unter natürlichen Gegebenheiten beitragen. Allerdings führte die Überexpression der *A. thaliana* PCS Gene weder zur erhöhten Toleranz noch zur verstärkten Akkumulation. Eine Limitierung der Toleranzvermittlung kann hierbei durch begrenzte Mengen an Cys und GSH auftreten [343], welche die Grundbausteine der PCs darstellen. Allerdings könnte die gesteigerte PCS-Expression bei gleichzeitiger Erhöhung dieser Substrate für die PC-Synthese eine Möglichkeit für verstärkte Metalltoleranz und -anreicherung von essentiellen Zn in oberirdischen Pflanzenteilen darstellen. PCS könnte demnach für die Biofortifikation, also die Anreicherung von Nutzpflanzen mit essentiellen Nährstoffen, relevant sein. So konnten in Reiskörnern durch Überexpression von einzelnen *NAS* Genen signifikant höhere Zn- und Eisengehalte erzielt werden [378]. Ebenfalls in Reis führte das Ausschalten des Cadmiumtransporters LCT1 zu Körnern, welche signifikant reduzierte Cadmiummengen enthielten [379]. Da die Speziierung von Metallionen in der Zelle über ihr weiteres Transportschicksal entscheidet [140,372], stellt die Aufklärung von Metallliganden und deren Einfluss auf Transport in Kompartimente und Pflanzenorgane eine weitere wichtige Grundlage für die Biofortifikation dar. Die Generierung von Nutzpflanzen, welche zum einen eine erhöhte Toleranz gegenüber Metallüberschüssen und nicht-essentiellen und toxischen Metallen aufweisen und zum anderen den selektiven Transport von essentiellen Mikroelementen in essbare Pflanzenteile verstärken, rückt somit in erreichbare Nähe. Allerdings dürfen Faktoren wie Bodenbeschaffenheit und Verfügbarkeit von Mikro- und Makroelementen dabei nicht außer Acht gelassen werden. So führte die Zugabe von Stickstoff zum Wachstumsmedium von Hartweizen zu einer gesteigerten Aufnahme, Translokation und Remobilisierung von Zn aus Blättern in das Korn [380].

Ein weiteres Resultat war die Bestätigung für eine Beteiligung der PCS in der Resistenz gegenüber nicht-angepassten Pathogenen. Zudem konnte erstmals gezeigt werden, dass diese Immunfunktion unabhängig von der Metalltoleranzfunktion agiert. Allerdings bleibt die genaue physiologische Rolle der PCS-Peptidaseaktivität in der Nichtwirtsresistenz unklar. Vergleichende

Metabolitanalysen von Wildtyp und *PCS* Mutanten könnten demnach Aufschluss über die Substrate und den physiologischen Kontext dieser Enzymaktivität geben.

Die vorliegende Arbeit trägt zur Charakterisierung einer wichtigen Komponente des Metallhomöostase-Netzwerks von Pflanzen bei. Dennoch ist eine weitere Aufklärung von Komponenten dieses Netzwerks und deren Zusammenspiel erforderlich, um eine optimale Grundlage für die Entwicklung von Pflanzen zu schaffen, die zur Biofortifikation und somit zur Verbesserung der Nahrungsmittelqualität beitragen. Zudem kann dieses Wissen für die Phytoremediation, also die Sanierung von schwermetallbelasteten Böden und Gewässern, genutzt werden.

5 Zusammenfassung

Anhand von Experimenten auf künstlich kontaminierter Erde konnte bestätigt werden, dass Phytochelatine eine Rolle in der Detoxifizierung des essentiellen Schwermetalls Zn sowie des toxischen Schwermetalls Cd spielen. Des Weiteren konnte auf diesem Weg aufgezeigt werden, dass PC-Bildung essentiell ist für die pflanzliche Toleranz gegenüber Cd und Zn innerhalb und außerhalb metallreicher Habitats und dass PCs unter diesen Bedingungen zudem einen Beitrag zur Akkumulation beider Schwermetalle leisten. Weiterhin konnte eine Beteiligung der PCS in der generellen Zinkhomöostase gezeigt werden. Für eine mögliche Funktion von PCs in der Antwort auf Zinkdefizienz fanden sich hingegen keine Hinweise.

Durch die Entwicklung einer sensitiven Methode zur PC-Detektion mittels UPLC-ESI-QTOF-MS konnten zum ersten Mal geringe Mengen an PC2 in der *AtPCS1* Mutante *cad1-3* nachgewiesen werden, die sich auf die Transpeptidaseaktivität der zweiten PCS in *A. thaliana*, *AtPCS2*, zurückführen lassen. Hiermit konnte erstmals ein Beweis für die Funktionalität der *AtPCS2 in planta* erbracht werden. Außerdem ist *AtPCS2* fähig, die Cadmiumhypersensitivität der *cad1-3* Mutante, welcher eine funktionale *AtPCS1* fehlt, zu komplementieren. Zudem konnte durch Toleranztests in verschiedenen Systemen mit *AtPCS1* und *AtPCS2* Überexpressionslinien gezeigt werden, dass die Aktivierung der PC-Bildung der *AtPCS2*, anders als bei *AtPCS1*, weniger stark durch die Anwesenheit von Schwermetallen beeinflusst wird. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass *AtPCS2* in der Synthese langkettiger PCs beeinträchtigt ist, wodurch eine Übernahme der Funktion der *AtPCS1* in der Schwermetalltoleranz *in planta* nicht möglich ist. Dies legt den Schluss nahe, dass die biologische Funktion der *AtPCS2* eine andere, als die der Schwermetalldetoxifizierung ist.

Weiterhin konnte durch Experimente auf kontaminierter Erde mit der Nullmutante *cad1-3* und der T-DNA Insertionslinie *cad1-6*, die eine verkürzte Variante der *AtPCS1* trägt, die Hypothese untermauert werden, dass der C-Terminus in *AtPCS1* für die Aktivierung der PC-Synthese durch Schwermetalle verantwortlich ist. Des Weiteren ergaben sich durch Analyse der PC-Gehalte dieser Linien aus Experimenten auf Erde und aus Flüssigkultur Anhaltspunkte dafür, dass der C-Terminus unterschiedliche Bindungsstellen für die verschiedenen Metalle beinhalten muss, und ein Verlust C-terminaler Sequenzen zu verringerter Synthese langkettiger PCs führt.

Durch vergleichende Experimente der phylogenetisch diversen PCS-Variante aus *C. elegans* mit *AtPCS1* konnte demonstriert werden, dass Transpeptidase- und Peptidaseaktivität *in planta* unabhängig voneinander agieren. Es zeigte sich, dass Überexpression von *CePCS* und *AtPCS1* in *cad1-3* zwar zur Rettung des cadmiumhypersensitiven Phänotyps, nicht aber des Penetrationsphänotyps, ausgelöst durch das Pflanzenpathogen *P. infestans*, führte.

Zudem konnte für den ABC-Transporter PEN3, ebenso wie für *AtPCS1*, durch Metalltoleranztests eine Rolle in der Detoxifizierung von Cd als auch Zn belegt werden. Während *AtPCS1* den Schlüsselfaktor für die Entgiftung des Metalloids As darstellt, scheint PEN3 hierbei nur eine untergeordnete Funktion auszuüben. Durch Versuche mit Linien, die aus einer Kreuzung der Einzelmutanten beider Gene resultieren, konnte ein additiver Effekt, also eine mögliche Zusammenarbeit beider Proteine, in der Zn- nicht aber der Cadmiumentgiftung beobachtet werden.

6 Summary

Experiments on artificially contaminated soil confirmed a role of PCs in the detoxification of the essential heavy metal Zn and the toxic metal Cd. Moreover, it was shown that PC-formation is indispensable for plants tolerance towards these metals inside and outside metal rich habitats and that PCs contribute to their accumulation. Furthermore, PCS participate in general Zn homeostasis, whereas no evidence was provided for a function of PCs in the response upon Zn deficiency. In addition, the hypothesis of the *AtPCS1* C-terminal part being the responsible region for the activation of PC-synthesis by metal ions, could be underlined by growth experiments on contaminated soil comparing wild type, null allele *cad1-3* and the T-DNA insertion line *cad1-6*, which carries a C-terminally truncated version of the protein. PC-analysis of soil grown and liquid culture derived plant material strengthened the idea of the existence of different binding sites for different metals in the C-terminus. Furthermore, the loss of C-terminal sequences appears to interfere with long-chain PC-synthesis.

The development of a sensitive method for PC-detection by use of UPLC-ESI-QTOF-MS enabled the detection of small PC₂ levels in the *AtPCS1* mutant *cad1-3*, which result from the action of the second PCS in *A. thaliana*, *AtPCS2*. This was the first evidence for the functionality of *AtPCS2* *in planta*. Furthermore *AtPCS2* is able to complement the Cd hypersensitivity of *cad1-3*, which lacks a functional *AtPCS1*. Using different test systems for the assessment of heavy metal tolerance of *AtPCS1* and *AtPCS2* overexpression lines in the *cad1-3* background it was demonstrated, that the activation of PC-formation of *AtPCS2* is, in contrast to *AtPCS1*, less influenced by the presence of heavy metals. Furthermore, *AtPCS2* seems to be impaired in the synthesis of long-chain PCs, which renders the quenching of the dysfunction of *AtPCS1* in heavy metal tolerance impossible *in planta*. This suggests a biological function for this protein apart from heavy metal detoxification.

Assays with *cad1-3* plants expressing the phylogenetic diverse PCS variant from *C. elegans* in comparison with those expressing *AtPCS1* demonstrated the independent action of transpeptidase and peptidase activity *in planta*. Overexpression lines of both genes could complement the Cd hypersensitive phenotype but not the penetration phenotype induced by *P. infestans*.

The ABC-transporter PEN3 was shown, like *AtPCS1*, to take part in plants Cd and Zn tolerance. Although *AtPCS1* is the key component of As detoxification, PEN3 plays only a minor role. Experiments with a crossing of single mutants of both genes revealed an additive effect in Zn hypersensitivity, implying the coordinated action of both proteins in Zn but not in Cd tolerance.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Stephan Clemens für die Möglichkeit an diesem Projekt mitarbeiten zu dürfen, bedanken. Danke für die vielen Denkanstöße, Vorschläge und Diskussionen, die maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben und für das Vertrauen, dass du in mich und meine Fähigkeiten gesetzt hast.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. Holger Schmidt für die LC-MS-Messungen ("Masse streicheln") und die vielen Gespräche und Ratschläge. Nicht zuletzt ein Danke für das gemeinsame Schrauben an der HPLC!!!

Danke an Dr. Michael Weber für die Tipps bei Transformations- und Klonierungsproblemen und für die Hilfe bei allgemeinen Laborbelangen.

Ein Dank geht auch an Dr. Aleksandra Trąmpczyńska (und ja, es ist richtig geschrieben!), die zwar während meiner Doktorarbeit nicht mehr am Lehrstuhl war, von der ich aber während meiner Diplomarbeit so viel gelernt habe, dass ich noch lange davon zehren konnte. Danke auch für die Aufmunterung am Telefon!!!

Vielen Dank an Dr. Shimpei Uraguchi für die unkomplizierte und schnelle Hilfe bei allen Versuchen, die noch für das Paper nachgeholt werden mussten. Die Zusammenarbeit mit ihm war mir eine große Ehre und ich durfte viel neues dazu lernen.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine "Büromitbewohner" Sina Fischer und Amelie Detterbeck für die schöne und freundschaftliche Atmosphäre; für eure vielen Tipps, Hilfsdienste, die Motivation und ein offenes Ohr zur richtigen Zeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei den Mitgliedern unseres "Weiberlabors", Silke Matros und Dr. Christiane Reinbothe, bedanken. Danke, dass es bei uns fast immer sauber, aufgeräumt und alles an Ort und Stelle war. Danke auch für eure Hilfe bei großen und kleinen Anliegen, euer offenes Ohr und die aufbauenden Worte.

Vielen Dank auch an Christiane Meinen, Carmen Günther und Pia Schuster für die vielen kleinen und großen Hilfsdienste, die ihr mir erwiesen habt. Und für die vielen lustigen Kaffeepausen.

Ein großes Dankeschön auch an Uschi Ferrera für die Hilfe bei allen "bürokratischen Problemen" und für deine Schulter zum Ausheulen. Danke!

Danke an alle anderen Lehrstuhlangehörigen für die nette und angenehme Arbeitsatmosphäre. Insbesondere an Ulrich Deinlein (für die sprechende Ziege und die Eselgeräusche), Stephan Höreth

(für das Schleppen der Gasflaschen), Blen Beyene (für das aufmunternde Lächeln. Really!) und auch an Stefan Rensch (für unsere vielen wissenschaftlichen und privaten "Dachgespräche" und die vielen anderen Hilfestellungen).

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Westermann für die Nutzung des Fluoreszenzmikroskops und bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls Zellbiologie für die einfachen Terminabsprachen.

Danke unseren Kooperationspartnern am IPB, Lore Westphal und Dierk Scheel, für die Durchführung der Inokulationsversuche und dem "*Plant and Soil Science Laboratory*" der Universität Kopenhagen für die Durchführung der Zinkspezierungsanalysen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann Markus für die Unterstützung über all die Jahre hinweg bedanken. Für dein Verständnis und die vielen Entbehren auch an Wochenenden und Feiertagen.

Literatur

- [1] **A. Schützendübel, A. Polle**, Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization, *J. Exp. Bot.* **53** (2002) 1351–1365.
- [2] **B.L. Vallee, D.S. Auld**, Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins, *Biochemistry.* **29** (1990) 5647–5659.
- [3] **C.M. Palmer, M.L. Guerinot**, Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants, *Nat. Chem. Biol.* **5** (2009) 333–340.
- [4] **E. Nieboer, D.H.S. Richardson**, The replacement of the nondescript term “heavy metals” by a biologically and chemically significant classification of metal ions, *Environ. Pollut.* **1** (1980) 3–26.
- [5] **B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge**, The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases, *Mol. Aspects Med.* **8** (1985) 89–193.
- [6] **C.E. Outten, T.V. O’Halloran**, Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis, *Science.* **292** (2001) 2488–2492.
- [7] **M.R. Broadley, P.J. White, J.P. Hammond, I. Zelko, A. Lux**, Zinc in plants, *New Phytol.* **173** (2007) 677–702.
- [8] **J.E. Coleman**, Zinc enzymes, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2** (1998) 222–234.
- [9] **M.E. Nelbach, V.P. Pigiet, J.C. Gerhart, H.K. Schachman**, Role for zinc in the quaternary structure of aspartate transcarbamylase from *Escherichia coli*, *Biochemistry.* **11** (1972) 315–327.
- [10] **J. Miller, A.D. McLachlan, A. Klug**, Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*, *EMBO J.* **4** (1985) 1609–1614.
- [11] **C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, A. Rosato**, Zinc through the three domains of life, *J. Proteome Res.* **5** (2006) 3173–3178.
- [12] **C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, A. Rosato**, Counting the zinc-proteins encoded in the human genome, *J. Proteome Res.* **5** (2006) 196–201.
- [13] **J.M. Berg, Y. Shi**, The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc, *Science.* **271** (1996) 1081–1085.
- [14] **E. Riedel**, Anorganische Chemie, *Walter de Gruyter*, (2004).
- [15] **M. Eigen**, Fast elementary steps in chemical reaction mechanisms, *Pure Appl. Chem.* **6** (1963) 97–116.
- [16] **G.F. Wildner, J. Henkel**, The effect of divalent metal ions on the activity of Mg(++) depleted ribulose-1,5-bisphosphate oxygenase, *Planta.* **146** (1979) 223–228.
- [17] **F. Van Assche, H. Clijsters**, Effects of metals on enzyme activity in plants, *Plant Cell Environ.* **13** (1990) 195–206.
- [18] **I. Cakmak**, Tansley Review No. 111 - Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species, *New Phytol.* **146** (2000) 185–205.
- [19] **C. Hotz, K.H. Brown**, IZINCG (International zinc nutrition consultative group), Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control, *Food Nutr. Bull.* **25** (2004) S91–S104.
- [20] **B.J. Alloway**, Zinc in soils and crop nutrition, 2nd ed., *International zinc Association (Brussels, Belgium); International Fertilizer Industry Association (Paris, France)*, (2008).
- [21] **B.J. Alloway**, Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans, *Environ. Geochem. Health.* **31** (2009) 537–548.
- [22] **J.O. Nriagu, J.M. Pacyna**, Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals, *Nature.* **333** (1988) 134–139.
- [23] **I. Cakmak**, Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification?, *Plant Soil.* **302** (2007) 1–17.
- [24] **A. Sharma, B. Patni, D. Shankhdhar, S.C. Shankhdhar**, Zinc – An indispensable micronutrient, *Physiol. Mol. Biol. Plants.* **19** (2013) 11–20.

- [25] **F. Zeng, S. Ali, H. Zhang, Y. Ouyang, B. Qiu, F. Wu, G. Zhang**, The influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants, *Environ. Pollut.* **159** (2011) 84–91.
- [26] **D.S. Smith, R.A. Bell, J.R. Kramer**, Metal speciation in natural waters with emphasis on reduced sulfur groups as strong metal binding sites, *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* **133** (2002) 65–74.
- [27] **T. Karlsson, K. Elgh-Dalgren, E. Björn, U. Skyllberg**, Complexation of cadmium to sulfur and oxygen functional groups in an organic soil, *Geochim. Cosmochim. Acta.* **71** (2007) 604–614.
- [28] **T. Karlsson, P. Persson, U. Skyllberg**, Extended X-ray absorption fine structure spectroscopy evidence for the complexation of cadmium by reduced sulfur groups in natural organic matter, *Environ. Sci. Technol.* **39** (2005) 3048–3055.
- [29] **J.M. Pacyna, E.G. Pacyna**, An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide, *Environ. Rev.* **9** (2001) 269–298.
- [30] **J. Pan, J.A. Plant, N. Voulvoulis, C.J. Oates, C. Ihlenfeld**, Cadmium levels in Europe: implications for human health, *Environ. Geochem. Health.* **32** (2010) 1–12.
- [31] **WHO (World Health Organization)**, Environmental health criteria 135; Cadmium - environmental aspects, (1992).
- [32] **Nordic council of ministers**, Cadmium review, (2003).
- [33] **C.A. Grant**, Influence of phosphate fertilizer on cadmium in agricultural soils and crops, *Pedologist.* (2011) 143–155.
- [34] **EFSA (European Food Safety Authority)**, Cadmium in food - Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain, *EFSA J.* **980** (2009) 1–139.
- [35] **P.D. Darbre**, Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast, *J. Appl. Toxicol.* **26** (2006) 191–197.
- [36] **L. Benbrahim-Tallaa, J. Liu, M.M. Webber, M.P. Waalkes**, Estrogen signaling and disruption of androgen metabolism in acquired androgen-independence during cadmium carcinogenesis in human prostate epithelial cells, *Prostate.* **67** (2007) 135–145.
- [37] **M.P. Waalkes**, Cadmium carcinogenesis, *Mutat. Res.* **533** (2003) 107–120.
- [38] **WHO (World Health Organization)**, Exposure to cadmium: a major public health concern, (2010).
- [39] **Y. Xu, L. Feng, P.D. Jeffrey, Y. Shi, F.M.M. Morel**, Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms, *Nature.* **452** (2008) 56–61.
- [40] **S.J. Stohs, D. Bagchi**, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Radic. Biol. Med.* **18** (1995) 321–336.
- [41] **R.J. Brennan, R.H. Schiestl**, Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast, *Mutat. Res.* **356** (1996) 171–178.
- [42] **O. Ouariti, N. Boussama, M. Zarrouk, A. Cherif, M. Habib Ghorbal**, Cadmium- and copper-induced changes in tomato membrane lipids, *Phytochemistry.* **45** (1997) 1343–1350.
- [43] **E. Fodor, A. Szabó-Nagy, L. Erdei**, The effects of cadmium on the fluidity and H⁺-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots, *J. Plant Physiol.* **147** (1995) 87–92.
- [44] **B.V. Somashekaraiah, K. Padmaja, A.R.K. Prasad**, Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation, *Physiol. Plant.* **85** (1992) 85–89.
- [45] **M. Greger, E. Ögren**, Direct and indirect effects of Cd²⁺ on photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris*), *Physiol. Plant.* **83** (1991) 129–135.
- [46] **L.F. De Filippis, H. Ziegler**, Effect of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on the photosynthetic carbon reduction cycle of *Euglena*, *J. Plant Physiol.* **142** (1993) 167–172.
- [47] **B.P. Shaw**, Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of *Phaseolus aureus*, *Biol. Plant.* **37** (1995) 587–596.
- [48] **S.M. Gallego, M.P. Benavides, M.L. Tomaro**, Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress, *Plant Sci.* **121** (1996) 151–159.

- [49] **L.M. Sandalio, H.C. Dalurzo, M. Gómez, M.C. Romero-Puertas, L.A. del Río**, Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants, *J. Exp. Bot.* **52** (2001) 2115–2126.
- [50] **IARC (International Agency for Research on Cancer)**, Summary & Evaluations: arsenic and arsenic compounds (group 1), Supplement 7 (1987).
- [51] **F. Wolfe-Simon, J.S. Blum, T.R. Kulp, G.W. Gordon, S.E. Hoefft, J. Pett-Ridge, et al.**, A bacterium that can grow by using arsenic instead of phosphorus, *Science*. **332** (2011) 1163–1166.
- [52] **T.J. Erb, P. Kiefer, B. Hattendorf, D. Günther, J.A. Vorholt**, GFAJ-1 is an arsenate-resistant, phosphate-dependent organism, *Science*. **337** (2012) 467–470.
- [53] **M. Elias, A. Wellner, K. Goldin-Azulay, E. Chabriere, J.A. Vorholt, T.J. Erb, D.S. Tawfik**, The molecular basis of phosphate discrimination in arsenate-rich environments, *Nature*. **491** (2012) 134–137.
- [54] **G.N. Basturea, T.K. Harris, M.P. Deutscher**, Growth of a bacterium that apparently uses arsenic instead of phosphorus is a consequence of massive ribosome breakdown, *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 28816–28819.
- [55] **M.L. Reaves, S. Sinha, J.D. Rabinowitz, L. Kruglyak, R.J. Redfield**, Absence of detectable arsenate in DNA from arsenate-grown GFAJ-1 cells, *Science*. **337** (2012) 470–473.
- [56] **WHO (World Health Organization)**, Exposure to arsenic: a major public health concern, (2010).
- [57] **A.A. Meharg, J. Hartley-Whitaker**, Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species, *New Phytol.* **154** (2002) 29–43.
- [58] **T. Takamatsu, H. Aoki, T. Yoshida**, Determination of arsenate, arsenite, monomethylarsonate and dimethylarsinate in soil polluted with arsenic, *Soil Sci.* **133** (1982) 239–246.
- [59] **C. Lomax, W.-J. Liu, L. Wu, K. Xue, J. Xiong, J. Zhou, et al.**, Methylated arsenic species in plants originate from soil microorganisms, *New Phytol.* **193** (2012) 665–672.
- [60] **R.-Y. Li, Y. Ago, W.-J. Liu, N. Mitani, J. Feldmann, S.P. McGrath, et al.**, The rice aquaporin Lsi1 mediates uptake of methylated arsenic species, *Plant Physiol.* **150** (2009) 2071–2080.
- [61] **A.A. Meharg, M.R. Macnair**, Suppression of the high affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L., *J. Exp. Bot.* **43** (1992) 519–524.
- [62] **M.R. Macnair, Q. Cumbes**, Evidence that arsenic tolerance in *Holcus Lanatus* L. is caused by an altered phosphate uptake system, *New Phytol.* **107** (1987) 387–394.
- [63] **C.I. Ullrich-Eberius, A. Sanz, A.J. Novacky**, Evaluation of arsenate- and vanadate-associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba* G1, *J. Exp. Bot.* **40** (1989) 119–128.
- [64] **A.A. Meharg**, Integrated tolerance mechanisms: constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment, *Plant Cell Environ.* **17** (1994) 989–993.
- [65] **J. Hartley-Whitaker, G. Ainsworth, A.A. Meharg**, Copper- and arsenate-induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity, *Plant Cell Environ.* **24** (2001) 713–722.
- [66] **N. Verbruggen, C. Hermans, H. Schat**, Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants, *Curr. Opin. Plant Biol.* **12** (2009) 364–372.
- [67] **A.C. Barrachina, F.B. Carbonell, J.M. Beneyto**, Arsenic uptake, distribution, and accumulation in tomato plants: effect of arsenite on plant growth and yield, *J. Plant Nutr.* **18** (1995) 1237–1250.
- [68] **G. Paliouris, T.C. Hutchinson**, Arsenic, cobalt and nickel tolerances in two populations of *Silene vulgaris* (Moench) Garcke from Ontario, Canada, *New Phytol.* **117** (1991) 449–459.
- [69] **T. Watanabe, M. Osaki**, Mechanisms of adaptation to high aluminum condition in native plant species growing in acid soils: a review, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **33** (2002) 1247–1260.
- [70] **N. Rascio, F. Dalla Vecchia, N. La Rocca, R. Barbato, C. Pagliano, M. Raviolo, et al.**, Metal accumulation and damage in rice (*cv.* Vialone nano) seedlings exposed to cadmium, *Environ. Exp. Bot.* **62** (2008) 267–278.
- [71] **F. Dalla Vecchia, N.L. Rocca, I. Moro, S. De Faveri, C. Andreoli, N. Rascio**, Morphogenetic, ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea canadensis* exposed to cadmium, *Plant Sci.* **168** (2005) 329–338.

- [72] **F. Navari-Izzo, M.F. Quartacci, C. Pinzino, F.D. Vecchia, C.L.M. Sgherri**, Thylakoid-bound and stromal antioxidative enzymes in wheat treated with excess copper, *Physiol. Plant.* **104** (1998) 630–638.
- [73] **M.C. Brundrett**, Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants, *New Phytol.* **154** (2002) 275–304.
- [74] **G.E.D. Oldroyd, J.D. Murray, P.S. Poole, J.A. Downie**, The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis, *Annu. Rev. Genet.* **45** (2011) 119–144.
- [75] **L.C. Williamson, S.P.C.P. Ribrioux, A.H. Fitter, H.M.O. Leyser**, Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* **126** (2001) 875–882.
- [76] **H. Zhang, B.G. Forde**, Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability, *J. Exp. Bot.* **51** (2000) 51–59.
- [77] **T.R. Bates, J.P. Lynch**, Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability, *Plant Cell Environ.* **19** (1996) 529–538.
- [78] **B.D. Gruber, R.F.H. Giehl, S. Friedel, N. von Wirén**, Plasticity of the *Arabidopsis* root system under nutrient deficiencies, *Plant Physiol.* **163** (2013) 161–179.
- [79] **P.R. Moog, T.A. van der Kooij, W. Brüggemann, J.W. Schiefelbein, P.J. Kuiper**, Responses to iron deficiency in *Arabidopsis thaliana*: the turbo iron reductase does not depend on the formation of root hairs and transfer cells, *Planta.* **195** (1995) 505–513.
- [80] **W. Schmidt, A. Schikora**, Different pathways are involved in phosphate and iron stress-induced alterations of root epidermal cell development, *Plant Physiol.* **125** (2001) 2078–2084.
- [81] **R.D. Graham, J.C.R. Stangoulis**, Trace element uptake and distribution in plants, *J. Nutr.* **133** (2003) 1502S–1505S.
- [82] **M.J. Haydon, C.S. Cobbett**, Transporters of ligands for essential metal ions in plants, *New Phytol.* **174** (2007) 499–506.
- [83] **C. Curie, Z. Panaviene, C. Loulergue, S.L. Dellaporta, J.-F. Briat, E.L. Walker**, Maize *yellow stripe1* encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake, *Nature.* **409** (2001) 346–349.
- [84] **N. Von Wirén, H. Marschner, V. Romheld**, Roots of iron-efficient maize also absorb phytosiderophore-chelated zinc., *Plant Physiol.* **111** (1996) 1119–1125.
- [85] **G. Schaaf, U. Ludewig, B.E. Erenoglu, S. Mori, T. Kitahara, N. von Wirén**, *ZmYS1* functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals, *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 9091–9096.
- [86] **R.J. DiDonato, L.A. Roberts, T. Sanderson, R.B. Easley, E.L. Walker**, *Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2)*: a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine–metal complexes, *Plant J.* **39** (2004) 403–414.
- [87] **T. Nozoye, S. Nagasaka, T. Kobayashi, M. Takahashi, Y. Sato, Y. Sato, et al.**, Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants, *J. Biol. Chem.* **286** (2011) 5446–5454.
- [88] **M.G. Palmgren**, PLANT PLASMA MEMBRANE H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52** (2001) 817–845.
- [89] **C.W. Jin, G.Y. You, Y.F. He, C. Tang, P. Wu, S.J. Zheng**, Iron deficiency-induced secretion of phenolics facilitates the reutilization of root apoplastic iron in red clover, *Plant Physiol.* **144** (2007) 278–285.
- [90] **S. Susín, J. Abián, F. Sánchez-Baeza, M.L. Peleato, A. Abadía, E. Gelpí, J. Abadía**, Riboflavin 3'- and 5'-sulfate, two novel flavins accumulating in the roots of iron-deficient sugar beet (*Beta vulgaris*), *J. Biol. Chem.* **268** (1993) 20958–20965.
- [91] **E.P. Colangelo, M.L. Guerinot**, Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants, *Curr. Opin. Plant Biol.* **9** (2006) 322–330.
- [92] **G. Vert, N. Grotz, F. Dédaldéchamp, F. Gaymard, M.L. Guerinot, J.-F. Briat, C. Curie**, IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth, *Plant Cell.* **14** (2002) 1223–1233.
- [93] **Y.O. Korshunova, D. Eide, W.G. Clark, M.L. Guerinot, H.B. Pakrasi**, The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range, *Plant Mol. Biol.* **40** (1999) 37–44.
- [94] **C.K. Cohen, T.C. Fox, D.F. Garvin, L.V. Kochian**, The role of iron-deficiency stress responses in

- stimulating heavy-metal transport in plants, *Plant Physiol.* **116** (1998) 1063–1072.
- [95] **D. Eide, M. Broderius, J. Fett, M.L. Guerinot**, A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93** (1996) 5624–5628.
- [96] **E.L. Connolly, J.P. Fett, M.L. Guerinot**, Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation, *Plant Cell.* **14** (2002) 1347–1357.
- [97] **N. Grotz, T. Fox, E. Connolly, W. Park, M.L. Guerinot, D. Eide**, Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95** (1998) 7220–7224.
- [98] **I.N. Talke, M. Hanikenne, U. Krämer**, Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*, *Plant Physiol.* **142** (2006) 148–167.
- [99] **M. Weber, E. Harada, C. Vess, E. v Roepenack-Lahaye, S. Clemens**, Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors, *Plant J.* **37** (2004) 269–281.
- [100] **M. Becher, I.N. Talke, L. Krall, U. Krämer**, Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*, *Plant J.* **37** (2004) 251–268.
- [101] **Y.-F. Lin, H.-M. Liang, S.-Y. Yang, A. Boch, S. Clemens, C.-C. Chen, et al.**, *Arabidopsis* IRT3 is a zinc-regulated and plasma membrane localized zinc/iron transporter, *New Phytol.* **182** (2009) 392–404.
- [102] **F.-J. Zhao, R.E. Hamon, E. Lombi, M.J. McLaughlin, S.P. McGrath**, Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *J. Exp. Bot.* **53** (2002) 535–543.
- [103] **N. Verbruggen, C. Hermans, H. Schat**, Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants, *New Phytol.* **181** (2009) 759–776.
- [104] **D.-Y. Chao, Y. Chen, J. Chen, S. Shi, Z. Chen, C. Wang, et al.**, Genome-wide association mapping identifies a new arsenate reductase enzyme critical for limiting arsenic accumulation in plants, *PLoS Biol.* **12** (2014) e1002009.
- [105] **X.Y. Xu, S.P. McGrath, F.J. Zhao**, Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots, *New Phytol.* **176** (2007) 590–599.
- [106] **F.-J. Zhao, Y. Ago, N. Mitani, R.-Y. Li, Y.-H. Su, N. Yamaji, et al.**, The role of the rice aquaporin Lsi1 in arsenite efflux from roots, *New Phytol.* **186** (2010) 392–399.
- [107] **M. Ghosh, J. Shen, B.P. Rosen**, Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96** (1999) 5001–5006.
- [108] **R. Wysocki, P. Bobrowicz, S. Ułaszewski**, The *Saccharomyces cerevisiae* ACR3 gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport, *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 30061–30066.
- [109] **S.V. Isayenkov, F.J.M. Maathuis**, The *Arabidopsis thaliana* aquaglyceroporin AtNIP7;1 is a pathway for arsenite uptake, *FEBS Lett.* **582** (2008) 1625–1628.
- [110] **G.P. Bienert, M. Thorsen, M.D. Schüssler, H.R. Nilsson, A. Wagner, M.J. Tamás, T. Jahn**, A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of As(OH)₃ and Sb(OH)₃ across membranes, *BMC Biol.* **6** (2008) 26.
- [111] **J.F. Ma, N. Yamaji, N. Mitani, X.-Y. Xu, Y.-H. Su, S.P. McGrath, F.-J. Zhao**, Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105** (2008) 9931–9935.
- [112] **U. Krämer, I.N. Talke, M. Hanikenne**, Transition metal transport, *FEBS Lett.* **581** (2007) 2263–2272.
- [113] **V. Lanquar, G. Grossmann, J.L. Vinkenborg, M. Merckx, S. Thomine, W.B. Frommer**, Dynamic imaging of cytosolic zinc in *Arabidopsis* roots combining FRET sensors and RootChip technology, *New Phytol.* **202** (2014) 198–208.
- [114] **T.D. Rae, P.J. Schmidt, R.A. Pufahl, V.C. Culotta, T.V. O’Halloran**, Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase, *Science.* **284** (1999) 805–808.
- [115] **S. Clemens**, Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis, *Planta.* **212** (2001) 475–486.

- [116] **U.W. Stephan, G. Scholz, A. Rudolph**, Distribution of nicotianamine, a presumed symplast iron transporter, in different organs of sunflower and of a tomato wild type and its mutant *chloronerva*, *Biochem. Physiol. Pflanz.* **186** (1990) 81–88.
- [117] **M. Klatte, M. Schuler, M. Wirtz, C. Fink-Straube, R. Hell, P. Bauer**, The analysis of *Arabidopsis* nicotianamine synthase mutants reveals functions for nicotianamine in seed iron loading and iron deficiency responses, *Plant Physiol.* **150** (2009) 257–271.
- [118] **M.J. Haydon, M. Kawachi, M. Wirtz, S. Hillmer, R. Hell, U. Krämer**, Vacuolar nicotianamine has critical and distinct roles under iron deficiency and for zinc sequestration in *Arabidopsis*, *Plant Cell.* **24** (2012) 724–737.
- [119] **U. Deinlein, M. Weber, H. Schmidt, S. Rensch, A. Trampczynska, T.H. Hansen, et al.**, Elevated nicotianamine levels in *Arabidopsis halleri* roots play a key role in zinc hyperaccumulation, *Plant Cell.* **24** (2012) 708–723.
- [120] **A. Trampczynska, C. Böttcher, S. Clemens**, The transition metal chelator nicotianamine is synthesized by filamentous fungi, *FEBS Lett.* **580** (2006) 3173–3178.
- [121] **A. Trampczynska, H. Küpper, W. Meyer-Klaucke, H. Schmidt, S. Clemens**, Nicotianamine forms complexes with Zn(II) *in vivo*, *Metallomics.* **2** (2010) 57–66.
- [122] **C. Curie, G. Cassin, D. Couch, F. Divol, K. Higuchi, M. Le Jean, et al.**, Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters, *Ann. Bot.* **103** (2009) 1–11.
- [123] **U. Krämer, J.D. Cotter-Howells, J.M. Charnock, A.J.M. Baker, J.A.C. Smith**, Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel, *Nature.* **379** (1996) 635–638.
- [124] **L. Kerkeb, U. Krämer**, The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*, *Plant Physiol.* **131** (2003) 716–724.
- [125] **D.E. Salt, R.C. Prince, A.J.M. Baker, I. Raskin, I.J. Pickering**, Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy, *Environ. Sci. Technol.* **33** (1999) 713–717.
- [126] **H. Küpper, A. Mijovilovich, W. Meyer-Klaucke, P.M.H. Kroneck**, Tissue- and age-dependent differences in the complexation of cadmium and zinc in the cadmium/zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges Ecotype) revealed by X-ray absorption spectroscopy, *Plant Physiol.* **134** (2004) 748–757.
- [127] **G. Sarret, P. Saumitou-Laprade, V. Bert, O. Proux, J.-L. Hazemann, A. Traverse, et al.**, Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*, *Plant Physiol.* **130** (2002) 1815–1826.
- [128] **D.H. Hamer**, Metallothionein1,2, *Annu. Rev. Biochem.* **55** (1986) 913–951.
- [129] **N. Kondo, K. Imai, M. Isobe, T. Goto, A. Murasugi, C. Wada-Nakagawa, Y. Hayashi**, Cadystin a and b, major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced in a fission yeast - separation, revision of structures and synthesis, *Tetrahedron Lett.* **25** (1984) 3869–3872.
- [130] **R.K. Mehra, E.B. Tarbet, W.R. Gray, D.R. Winge**, Metal-specific synthesis of two metallothioneins and gamma-glutamyl peptides in *Candida glabrata*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85** (1988) 8815–8819.
- [131] **C. Cobbett, P. Goldsbrough**, Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis, *Annu. Rev. Plant Biol.* **53** (2002) 159–182.
- [132] **N.J. Robinson, J.R. Wilson, J.S. Turner**, 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 Zn(2+) metabolism, *Plant Mol. Biol.* **30** (1996) 1169–1179.
- [133] **A. Murphy, J. Zhou, P.B. Goldsbrough, L. Taiz**, Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol.* **113** (1997) 1293–1301.
- [134] **M. García-Hernández, A. Murphy, L. Taiz**, Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* **118** (1998) 387–397.
- [135] **E. Freisinger**, Plant MTs — long neglected members of the metallothionein superfamily, *Dalton Trans.* (2008) 6663–6675.
- [136] **T.V. O’Halloran, V.C. Culotta**, Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions, *J. Biol. Chem.* **275** (2000) 25057–25060.

- [137] **V. Lanquar, M.S. Ramos, F. Lelièvre, H. Barbier-Brygoo, A. Krieger-Liszka, U. Krämer, S. Thomine**, Export of vacuolar manganese by *AtNRAMP3* and *AtNRAMP4* is required for optimal photosynthesis and growth under manganese deficiency, *Plant Physiol.* **152** (2010) 1986–1999.
- [138] **J.F. Ma, D. Ueno, F.-J. Zhao, S.P. McGrath**, Subcellular localisation of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*, *Planta.* **220** (2005) 731–736.
- [139] **S. Arrivault, T. Senger, U. Krämer**, The *Arabidopsis* metal tolerance protein *AtMTP3* maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply, *Plant J.* **46** (2006) 861–879.
- [140] **S. Clemens, M.G. Palmgren, U. Krämer**, A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation, *Trends Plant Sci.* **7** (2002) 309–315.
- [141] **A.-G. Desbrosses-Fonrouge, K. Voigt, A. Schröder, S. Arrivault, S. Thomine, U. Krämer**, *Arabidopsis thaliana* MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation, *FEBS Lett.* **579** (2005) 4165–4174.
- [142] **Y. Kobae, T. Uemura, M.H. Sato, M. Ohnishi, T. Mimura, T. Nakagawa, M. Maeshima**, Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* *AtMTP1* is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis, *Plant Cell Physiol.* **45** (2004) 1749–1758.
- [143] **K.B. Axelsen, M.G. Palmgren**, Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* **126** (2001) 696–706.
- [144] **A. Gravot, A. Lieutaud, F. Verret, P. Auroy, A. Vavasseur, P. Richaud**, *AtHMA3*, a plant P_{1B} -ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast, *FEBS Lett.* **561** (2004) 22–28.
- [145] **I. Baxter, J. Tchieu, M.R. Sussman, M. Boutry, M.G. Palmgren, M. Gribskov, et al.**, Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice, *Plant Physiol.* **132** (2003) 618–628.
- [146] **S. Thomine, F. Lelièvre, E. Debarbieux, J.I. Schroeder, H. Barbier-Brygoo**, *AtNRAMP3*, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency, *Plant J.* **34** (2003) 685–695.
- [147] **S. Thomine, R. Wang, J.M. Ward, N.M. Crawford, J.I. Schroeder**, Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97** (2000) 4991–4996.
- [148] **V. Lanquar, F. Lelièvre, S. Bolte, C. Hamès, C. Alcon, D. Neumann, et al.**, Mobilization of vacuolar iron by *AtNRAMP3* and *AtNRAMP4* is essential for seed germination on low iron, *EMBO J.* **24** (2005) 4041–4051.
- [149] **R.J.F.J. Oomen, J. Wu, F. Lelièvre, S. Blanchet, P. Richaud, H. Barbier-Brygoo, et al.**, Functional characterization of *NRAMP3* and *NRAMP4* from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *New Phytol.* **181** (2009) 637–650.
- [150] **M.J. Haydon, C.S. Cobbett**, A novel major facilitator superfamily protein at the tonoplast influences zinc tolerance and accumulation in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* **143** (2007) 1705–1719.
- [151] **M. Tester, R.A. Leigh**, Partitioning of nutrient transport processes in roots, *J. Exp. Bot.* **52** (2001) 445–457.
- [152] **D. Hussain, M.J. Haydon, Y. Wang, E. Wong, S.M. Sherson, J. Young, et al.**, P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*, *Plant Cell.* **16** (2004) 1327–1339.
- [153] **F. Verret, A. Gravot, P. Auroy, N. Leonhardt, P. David, L. Nussaume, et al.**, Overexpression of *AtHMA4* enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance, *FEBS Lett.* **576** (2004) 306–312.
- [154] **C.K.E. Wong, C.S. Cobbett**, HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*, *New Phytol.* **181** (2009) 71–78.
- [155] **E. Eren, J.M. Argüello**, *Arabidopsis* *HMA2*, a divalent heavy metal-transporting P_{1B} -type ATPase, is involved in cytoplasmic Zn(2+) homeostasis, *Plant Physiol.* **136** (2004) 3712–3723.
- [156] **R.F. Mills, A. Francini, P.S.C. Ferreira da Rocha, P.J. Baccarini, M. Aylett, G.C. Krijger, L.E. Williams**, The plant P_{1B} -type ATPase *AtHMA4* transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels, *FEBS Lett.* **579** (2005) 783–791.
- [157] **W.-Y. Song, K.S. Choi, D.Y. Kim, M. Geisler, J. Park, V. Vincenzetti, et al.**, *Arabidopsis* *PCR2* is a zinc

- exporter involved in both zinc extrusion and long-distance zinc transport, *Plant Cell*. **22** (2010) 2237–2252.
- [158] **W.-Y. Song, E. Martinoia, J. Lee, D. Kim, D.-Y. Kim, E. Vogt, et al.**, A novel family of cys-rich membrane proteins mediates cadmium resistance in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* **135** (2004) 1027–1039.
- [159] **N. Rascio, F. Navari-Izzo**, Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting?, *Plant Sci.* **180** (2011) 169–181.
- [160] **H. Küpper, F. Jie Zhao, S.P. McGrath**, Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *Plant Physiol.* **119** (1999) 305–312.
- [161] **H. Küpper, E. Lombi, F.J. Zhao, S.P. McGrath**, Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*, *Planta*. **212** (2000) 75–84.
- [162] **D.E. Salt, R.C. Prince, I.J. Pickering, I. Raskin**, Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in indian mustard, *Plant Physiol.* **109** (1995) 1427–1433.
- [163] **F.J. Zhao, E. Lombi, T. Breedon, S.P. McGrath**, Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*, *Plant Cell Environ.* **23** (2000) 507–514.
- [164] **E. Grill, E.L. Winnacker, M.H. Zenk**, Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84** (1987) 439–443.
- [165] **E. Grill, E.L. Winnacker, M.H. Zenk**, Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants, *Science*. **230** (1985) 674–676.
- [166] **W.E. Rauser**, Phytochelatins, *Annu. Rev. Biochem.* **59** (1990) 61–86.
- [167] **S.B. Ha, A.P. Smith, R. Howden, W.M. Dietrich, S. Bugg, M.J. O'Connell, et al.**, Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Plant Cell*. **11** (1999) 1153–1164.
- [168] **O.K. Vatamaniuk, S. Mari, Y.P. Lu, P.A. Rea**, AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and *in vitro* reconstitution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96** (1999) 7110–7115.
- [169] **O.K. Vatamaniuk, S. Mari, Y.P. Lu, P.A. Rea**, Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase, *J. Biol. Chem.* **275** (2000) 31451–31459.
- [170] **E. Grill, W. Gekeler, E.-L. Winnacker, H.H. Zenk**, Homo-phytochelatins are heavy metal-binding peptides of homo-glutathione containing Fabales, *FEBS Lett.* **205** (1986) 47–50.
- [171] **E. Grill, S. Löffler, E.L. Winnacker, M.H. Zenk**, 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. U.S.A.* **86** (1989) 6838–6842.
- [172] **S. Clemens**, Evolution and function of phytochelatin synthases, *J. Plant Physiol.* **163** (2006) 319–332.
- [173] **A. Murasugi, C. Wada, Y. Hayashi**, Cadmium-binding peptide induced in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*, *J. Biochem.* **90** (1981) 1561–1565.
- [174] **A. Murasugi, C. Wada, Y. Hayashi**, Purification and unique properties in UV and CD spectra of Cd-binding peptide 1 from *Schizosaccharomyces pombe*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **103** (1981) 1021–1028.
- [175] **S. Klapheck, W. Fliegner, I. Zimmer**, Hydroxymethyl-phytochelatins [[gamma]-glutamylcysteine]_n-Serine] are metal-induced peptides of the Poaceae, *Plant Physiol.* **104** (1994) 1325–1332.
- [176] **W.R. Bernhard, J.H.R. Kägi**, Purification and characterization of atypical cadmium-binding polypeptides from *Zea mays*, in: J.H.R. Kägi, Y. Kojima (Eds.), *Metallothionein II*, *Birkhäuser Basel*, (1987) 309–315.
- [177] **R.K. Mehra, D.R. Winge**, Cu(I) binding to the *Schizosaccharomyces pombe* gamma-glutamyl peptides varying in chain lengths, *Arch. Biochem. Biophys.* **265** (1988) 381–389.
- [178] **P. Meuwly, P. Thibault, A.L. Schwan, W.E. Rauser**, Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize, *Plant J.* **7** (1995) 391–400.
- [179] **M.H. Zenk**, Heavy metal detoxification in higher plants - a review, *Gene*. **179** (1996) 21–30.
- [180] **M.J. May, C.J. Leaver**, *Arabidopsis thaliana* gamma-glutamylcysteine synthetase is structurally unrelated to mammalian, yeast, and *Escherichia coli* homologs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91** (1994) 10059–10063.

- [181] **M.R. Rawlins, C.J. Leaver, M.J. May**, Characterisation of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding glutathione synthetase, *FEBS Lett.* **376** (1995) 81–86.
- [182] **C.S. Cobbett, M.J. May, R. Howden, B. Rolls**, The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in gamma-glutamylcysteine synthetase, *Plant J.* **16** (1998) 73–78.
- [183] **C. Xiang, D.J. Oliver**, Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*, *Plant Cell.* **10** (1998) 1539–1550.
- [184] **K. Vido, D. Spector, G. Lagniel, S. Lopez, M.B. Toledano, J. Labarre**, A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 8469–8474.
- [185] **Y. Hayashi, C.W. Nakagawa, A. Murasugi**, Unique properties of Cd-binding peptides induced in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*, *Environ. Health Perspect.* **65** (1986) 13–19.
- [186] **R.N. Reese, R.K. Mehra, E.B. Tarbet, D.R. Winge**, Studies on the gamma-glutamyl Cu-binding peptide from *Schizosaccharomyces pombe*., *J. Biol. Chem.* **263** (1988) 4186–4192.
- [187] **J.C. Steffens**, The heavy metal-binding peptides of plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41** (1990) 553–575.
- [188] **W.E. Rauser**, Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function, *Plant Physiol.* **109** (1995) 1141–1149.
- [189] **R.N. Reese, C.A. White, D.R. Winge**, Cadmium-sulfide crystallites in Cd-(γ EC)_nG peptide complexes from tomato, *Plant Physiol.* **98** (1992) 225–229.
- [190] **D.E. Salt, W.E. Rauser**, MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots, *Plant Physiol.* **107** (1995) 1293–1301.
- [191] **D.F. Ortiz, L. Kreppel, D.M. Speiser, G. Scheel, G. McDonald, D.W. Ow**, Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter, *EMBO J.* **11** (1992) 3491–3499.
- [192] **D.F. Ortiz, T. Ruscitti, K.F. McCue, D.W. Ow**, Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein, *J. Biol. Chem.* **270** (1995) 4721–4728.
- [193] **D.G. Mendoza-Cózatl, Z. Zhai, T.O. Jobe, G.Z. Akmakjian, W.-Y. Song, O. Limbo, et al.**, Tonoplast-localized Abc2 transporter mediates phytochelatin accumulation in vacuoles and confers cadmium tolerance, *J. Biol. Chem.* **285** (2010) 40416–40426.
- [194] **O.K. Vatamaniuk, E.A. Bucher, M.V. Sundaram, P.A. Rea**, CeHMT-1, a putative phytochelatin transporter, is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 23684–23690.
- [195] **S. Prévéral, L. Gayet, C. Moldes, J. Hoffmann, S. Mounicou, A. Gruet, et al.**, A common highly conserved cadmium detoxification mechanism from bacteria to humans, *J. Biol. Chem.* **284** (2009) 4936–4943.
- [196] **M.S. Schwartz, J.L. Benci, D.S. Selote, A.K. Sharma, A.G.Y. Chen, H. Dang, et al.**, Detoxification of multiple heavy metals by a half-molecule ABC transporter, HMT-1, and coelomocytes of *Caenorhabditis elegans*, *PLoS One.* **5** (2010) e9564.
- [197] **J. Park, W.-Y. Song, D. Ko, Y. Eom, T.H. Hansen, M. Schiller, et al.**, The phytochelatin transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate tolerance to cadmium and mercury, *Plant J.* **69** (2011) 278–288.
- [198] **W.-Y. Song, J. Park, D.G. Mendoza-Cózatl, M. Suter-Grotemeyer, D. Shim, S. Hörtensteiner, et al.**, Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABCC-type phytochelatin transporters, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107** (2010) 21187–21192.
- [199] **P. Brunetti, L. Zanella, A. De Paolis, D. Di Litta, V. Cecchetti, G. Falasca, et al.**, Cadmium-inducible expression of the ABC-type transporter AtABCC3 increases phytochelatin-mediated cadmium tolerance in *Arabidopsis*, *J. Exp. Bot.* (2015). doi:10.1093/jxb/erv185.
- [200] **C.S. Cobbett**, Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification, *Plant Physiol.* **123** (2000) 825–832.
- [201] **R.N. Reese, D.R. Winge**, Sulfide stabilization of the cadmium-gamma-glutamyl peptide complex of *Schizosaccharomyces pombe*, *J. Biol. Chem.* **263** (1988) 12832–12835.

- [202] **A. Murasugi, C. Wada, Y. Hayashi**, Occurrence of acid-labile sulfide in cadmium-binding peptide 1 from fission yeast, *J. Biochem.* **93** (1983) 661–664.
- [203] **D.N. Weber, C.F. Shaw, D.H. Petering**, *Euglena gracilis* cadmium-binding protein-II contains sulfide ion, *J. Biol. Chem.* **262** (1987) 6962–6964.
- [204] **H. Strasdeit, A.-K. Duhme, R. Kneer, M.H. Zenk, C. Hermes, H.-F. Nolting**, Evidence for discrete Cd(SCys)₄ units in cadmium phytochelatin complexes from EXAFS spectroscopy, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **16** (1991) 1129–1130.
- [205] **M.E.V. Schmoger, M. Oven, E. Grill**, Detoxification of arsenic by phytochelatin in plants, *Plant Physiol.* **122** (2000) 793–802.
- [206] **C.T. Dameron, R.N. Reese, R.K. Mehra, A.R. Kortan, P.J. Carroll, M.L. Steigerwald, et al.**, Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites, *Nature.* **338** (1989) 596–597.
- [207] **D.E. Salt, G.J. Wagner**, Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a Cd²⁺/H⁺ antiport activity, *J. Biol. Chem.* **268** (1993) 12297–12302.
- [208] **C.W. MacDiarmid, M.A. Milanick, D.J. Eide**, Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 39187–39194.
- [209] **A. Kamizono, M. Nishizawa, Y. Teranishi, K. Murata, A. Kimura**, Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Gen. Genet.* **219** (1989) 161–167.
- [210] **K.D. Hirschi, V.D. Korenkov, N.L. Wilganowski, G.J. Wagner**, Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance, *Plant Physiol.* **124** (2000) 125–134.
- [211] **D. Ueno, N. Yamaji, I. Kono, C.F. Huang, T. Ando, M. Yano, J.F. Ma**, Gene limiting cadmium accumulation in rice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107** (2010) 16500–16505.
- [212] **D. Ueno, M.J. Milner, N. Yamaji, K. Yokosho, E. Koyama, M. Clemencia Zambrano, et al.**, Elevated expression of *TcHMA3* plays a key role in the extreme Cd tolerance in a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*, *Plant J.* **66** (2011) 852–862.
- [213] **M. Morel, J. Crouzet, A. Gravot, P. Auroy, N. Leonhardt, A. Vavasseur, P. Richaud**, AtHMA3, a P_{1B}-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* **149** (2009) 894–904.
- [214] **D.M. Speiser, D.F. Ortiz, L. Kreppel, G. Scheel, G. McDonald, D.W. Ow**, Purine biosynthetic genes are required for cadmium tolerance in *Schizosaccharomyces pombe*, *Mol. Cell. Biol.* **12** (1992) 5301–5310.
- [215] **R.H. Juang, K.F. Mccue, D.W. Ow**, Two purine biosynthetic enzymes that are required for cadmium tolerance in *Schizosaccharomyces pombe* utilize cysteine sulfinate *in vitro*, *Arch. Biochem. Biophys.* **304** (1993) 392–401.
- [216] **J.G. Vande Weghe, D.W. Ow**, Accumulation of metal-binding peptides in fission yeast requires *hmt2⁺*, *Mol. Microbiol.* **42** (2001) 29–36.
- [217] **S. Loeffler, A. Hochberger, E. Grill, E.-L. Winnacker, M.H. Zenk**, Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of heavy metals by the reaction product, *FEBS Lett.* **258** (1989) 42–46.
- [218] **O.K. Vatamaniuk, S. Mari, A. Lang, S. Chalasani, L.O. Demkiv, P.A. Rea**, Phytochelatin synthase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with gamma-glutamylcysteine during catalysis, *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 22449–22460.
- [219] **M. Oven, J.E. Page, M.H. Zenk, T.M. Kutchan**, Molecular characterization of the homo-phytochelatin synthase of soybean *Glycine max*: relation to phytochelatin synthase, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 4747–4754.
- [220] **P.A. Rea, O.K. Vatamaniuk, D.J. Rigden**, Weeds, worms, and more. Papain's long-lost cousin, phytochelatin synthase, *Plant Physiol.* **136** (2004) 2463–2474.
- [221] **T. Maier, C. Yu, G. Küllertz, S. Clemens**, Localization and functional characterization of metal-binding sites in phytochelatin synthases, *Planta.* **218** (2003) 300–308.
- [222] **N.D. Romanyuk, D.J. Rigden, O.K. Vatamaniuk, A. Lang, R.E. Cahoon, J.M. Jez, P.A. Rea**, Mutagenic definition of a papain-like catalytic triad, sufficiency of the N-terminal domain for single-site core catalytic enzyme acylation, and C-terminal domain for augmentative metal activation of a eukaryotic

- phytochelatin synthase, *Plant Physiol.* **141** (2006) 858–869.
- [223] **S. Ogawa, T. Yoshidomi, E. Yoshimura**, Cadmium(II)-stimulated enzyme activation of *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase 1, *J. Inorg. Biochem.* **105** (2011) 111–117.
- [224] **D. Vivares, P. Arnoux, D. Pignol**, A papain-like enzyme at work: native and acyl-enzyme intermediate structures in phytochelatin synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102** (2005) 18848–18853.
- [225] **P.A. Rea**, Phytochelatin synthase: of a protease a peptide polymerase made, *Physiol. Plant.* **145** (2012) 154–164.
- [226] **R. Ruotolo, A. Peracchi, A. Bolchi, G. Infusini, A. Amoresano, S. Ottonello**, Domain organization of phytochelatin synthase, *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 14686–14693.
- [227] **R. Howden, P.B. Goldsbrough, C.R. Andersen, C.S. Cobbett**, Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient, *Plant Physiol.* **107** (1995) 1059–1066.
- [228] **P. Tennstedt, D. Peisker, C. Böttcher, A. Trampczynska, S. Clemens**, Phytochelatin synthesis is essential for the detoxification of excess zinc and contributes significantly to the accumulation of zinc, *Plant Physiol.* **149** (2009) 938–948.
- [229] **C.S. Cobbett**, Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification, *Curr. Opin. Plant Biol.* **3** (2000) 211–216.
- [230] **E. Harada, E. von Roepenack-Lahaye, S. Clemens**, A cyanobacterial protein with similarity to phytochelatin synthases catalyzes the conversion of glutathione to gamma-glutamylcysteine and lacks phytochelatin synthase activity, *Phytochemistry.* **65** (2004) 3179–3185.
- [231] **N. Tsuji, S. Nishikori, O. Iwabe, K. Shiraki, H. Miyasaka, M. Takagi, et al.**, Characterization of phytochelatin synthase-like protein encoded by *alr0975* from a prokaryote, *Nostoc* sp. PCC 7120, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315** (2004) 751–755.
- [232] **A.C. Cazalé, S. Clemens**, *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase, *FEBS Lett.* **507** (2001) 215–219.
- [233] **R. Blum, K.C. Meyer, J. Wünschmann, K.J. Lenzian, E. Grill**, Cytosolic action of phytochelatin synthase, *Plant Physiol.* **153** (2010) 159–169.
- [234] **S. Lee, B.S. Kang**, Expression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase 2 is too low to complement an *AtPCS1*-defective *cad1-3* mutant, *Mol. Cells.* **19** (2005) 81–87.
- [235] **A. Petraglia, M.D. Benedictis, F. Degola, G. Pastore, M. Calcagno, R. Ruotolo, et al.**, The capability to synthesize phytochelatins and the presence of constitutive and functional phytochelatin synthases are ancestral (plesiomorphic) characters for basal land plants, *J. Exp. Bot.* **65** (2014) 1153–1163.
- [236] **S. Clemens, D. Peršoh**, Multi-tasking phytochelatin synthases, *Plant Sci.* **177** (2009) 266–271.
- [237] **O.K. Vatamaniuk, E.A. Bucher, J.T. Ward, P.A. Rea**, A new pathway for heavy metal detoxification in animals, *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 20817–20820.
- [238] **S. Clemens, E.J. Kim, D. Neumann, J.I. Schroeder**, Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast, *EMBO J.* **18** (1999) 3325–3333.
- [239] **D. Ray, D.L. Williams**, Characterization of the phytochelatin synthase of *Schistosoma mansoni*, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5** (2011) e1168.
- [240] **N. Franchi, E. Piccinni, D. Ferro, G. Basso, B. Spolaore, G. Santovito, L. Ballarin**, Characterization and transcription studies of a phytochelatin synthase gene from the solitary tunicate *Ciona intestinalis* exposed to cadmium, *Aquat. Toxicol.* **152** (2014) 47–56.
- [241] **D.P. Persson, T.H. Hansen, P.E. Holm, J.K. Schjoerring, H.C.B. Hansen, J. Nielsen, et al.**, Multi-elemental speciation analysis of barley genotypes differing in tolerance to cadmium toxicity using SEC-ICP-MS and ESI-TOF-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* **21** (2006) 996–1005.
- [242] **A. Beck, K. Lenzian, M. Oven, A. Christmann, E. Grill**, Phytochelatin synthase catalyzes key step in turnover of glutathione conjugates, *Phytochemistry.* **62** (2003) 423–431.
- [243] **R. Blum, A. Beck, A. Korte, A. Stengel, T. Letzel, K. Lenzian, E. Grill**, Function of phytochelatin synthase in catabolism of glutathione-conjugates, *Plant J.* **49** (2007) 740–749.
- [244] **N.K. Clay, A.M. Adio, C. Denoux, G. Jander, F.M. Ausubel**, Glucosinolate metabolites required for an

- Arabidopsis* innate immune response, *Science*. **323** (2009) 95–101.
- [245] **V. Lipka, J. Dittgen, P. Bednarek, R. Bhat, M. Wiermer, M. Stein, et al.**, Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*, *Science*. **310** (2005) 1180–1183.
- [246] **P. Bednarek, M. Pislewska-Bednarek, A. Svatos, B. Schneider, J. Doubsky, M. Mansurova, et al.**, A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense, *Science*. **323** (2009) 101–106.
- [247] **D. Hoagland, D. Arnon**, The water-culture method for growing plants without soil, *Circular, California. Agricult. Exp. Station*. **347** (1950) 1–32.
- [248] **R.L. Chaney**, Plants can utilize iron from Fe-*N,N'*-di-(2-hydroxybenzoyl)-ethylene-diamine-*N,N'*-diacetic acid, a ferric chelate with 10⁶ greater formation constant than Fe-EDDHA., *J. Plant Nutr.* **11** (1988) 1033–1050.
- [249] **M. Stein, J. Dittgen, C. Sánchez-Rodríguez, B.-H. Hou, A. Molina, P. Schulze-Lefert, et al.**, *Arabidopsis* PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration, *Plant Cell*. **18** (2006) 731–746.
- [250] **C. Xiang, P. Han, I. Lutziger, K. Wang, D.J. Oliver**, A mini binary vector series for plant transformation, *Plant Mol. Biol.* **40** (1999) 711–717.
- [251] **J. Sambrook, D.W. Russell**, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, *CSHL Press*, (2001).
- [252] **K.J. Livak, T.D. Schmittgen**, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*. **25** (2001) 402–408.
- [253] **S. Kuo, M.S. Lai, C.W. Lin**, Influence of solution acidity and CaCl₂ concentration on the removal of heavy metals from metal-contaminated rice soils, *Environ. Pollut.* **144** (2006) 918–925.
- [254] **V.J.G. Houba, E.J.M. Temminghoff, G.A. Gaikhorst, W. van Vark**, Soil analysis procedures using 0.01 M calcium chloride as extraction reagent, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **31** (2000) 1299–1396.
- [255] **W.L. Lindsay, W.A. Norvell**, Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper, *Soil Sci. Soc. Am. J.* **42** (1978) 421–428.
- [256] **F.E. Sneller, L.M. van Heerwaarden, P.L. Koevoets, R. Vooijs, H. Schat, J.A. Verkleij**, Derivatization of phytochelatins from *Silene vulgaris*, induced upon exposure to arsenate and cadmium: comparison of derivatization with Ellman's reagent and monobromobimane, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 4014–4019.
- [257] **J.W. Rijstenbil, J.A. Wijnholds**, HPLC analysis of nonprotein thiols in planktonic diatoms: pool size, redox state and response to copper and cadmium exposure, *Marine Biol.* **127** (1996) 45–54.
- [258] **P. Thangavel, S. Long, R. Minocha**, Changes in phytochelatins and their biosynthetic intermediates in red spruce (*Picea rubens* Sarg.) cell suspension cultures under cadmium and zinc stress, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **88** (2007) 201–216.
- [259] **R. Minocha, P. Thangavel, O.P. Dhankher, S. Long**, Separation and quantification of monothiols and phytochelatins from a wide variety of cell cultures and tissues of trees and other plants using high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*. **1207** (2008) 72–83.
- [260] **H. Schmidt, C. Böttcher, A. Trampczynska, S. Clemens**, Use of recombinantly produced ¹⁵N₃-labelled nicotianamine for fast and sensitive stable isotope dilution ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* **399** (2011) 1355–1361.
- [261] **D.P. Persson, T.H. Hansen, K.H. Laursen, J.K. Schjoerring, S. Husted**, Simultaneous iron, zinc, sulfur and phosphorus speciation analysis of barley grain tissues using SEC-ICP-MS and IP-ICP-MS, *Metallomics*. **1** (2009) 418–426.
- [262] **S.J. Clough, A.F. Bent**, Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* **16** (1998) 735–743.
- [263] **M. Weber, U. Deinlein, S. Fischer, M. Rogowski, S. Geimer, R. Tenhaken, S. Clemens**, A mutation in the *Arabidopsis thaliana* cell wall biosynthesis gene *pectin methylesterase 3* as well as its aberrant expression cause hypersensitivity specifically to Zn, *Plant J.* **76** (2013) 151–164.
- [264] **C.Q. Wang, H. Song**, Calcium protects *Trifolium repens* L. seedlings against cadmium stress, *Plant Cell Rep.* **28** (2009) 1341–1349.

- [265] **D.G. Mendoza-Cózatl, E. Butko, F. Springer, J.W. Torpey, E.A. Komives, J. Kehr, J.I. Schroeder**, Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation, *Plant J.* **54** (2008) 249–259.
- [266] **J.-M. Gong, D.A. Lee, J.I. Schroeder**, Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatins and cadmium in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100** (2003) 10118–10123.
- [267] **A. Chen, E.A. Komives, J.I. Schroeder**, An improved grafting technique for mature *Arabidopsis* plants demonstrates long-distance shoot-to-root transport of phytochelatins in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* **141** (2006) 108–120.
- [268] **L.M. Weaver, R.M. Amasino**, Senescence is induced in individually darkened *Arabidopsis* leaves, but inhibited in whole darkened plants, *Plant Physiol.* **127** (2001) 876–886.
- [269] **J. Ramos, M.R. Clemente, L. Naya, J. Loscos, C. Pérez-Rontomé, S. Sato, et al.**, Phytochelatin synthases of the model legume *Lotus japonicus*. A small multigene family with differential response to cadmium and alternatively spliced variants, *Plant Physiol.* **143** (2007) 1110–1118.
- [270] **C.-L. Meyer, D. Peisker, M. Courbot, A.R. Craciun, A.-C. Cazalé, D. Desgain, et al.**, Isolation and characterization of *Arabidopsis halleri* and *Thlaspi caerulescens* phytochelatin synthases, *Planta.* **234** (2011) 83–95.
- [271] **A. Boc, A.B. Diallo, V. Makarenkov**, T-REX: a web server for inferring, validating and visualizing phylogenetic trees and networks, *Nucleic Acids Res.* **40** (2012) W573–W579.
- [272] **D.B.D. Simmons, A.R. Hayward, T.C. Hutchinson, R.J.N. Emery**, Identification and quantification of glutathione and phytochelatins from *Chlorella vulgaris* by RP-HPLC ESI-MS/MS and oxygen-free extraction, *Anal. Bioanal. Chem.* **395** (2009) 809–817.
- [273] **A. Bräutigam, D. Schaumlöffel, G.-J. Krauss, D. Wesenberg**, Analytical approach for characterization of cadmium-induced thiol peptides — a case study using *Chlamydomonas reinhardtii*, *Anal. Bioanal. Chem.* **395** (2009) 1737–1747.
- [274] **R. Howden, C.S. Cobbett**, Cadmium-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol.* **100** (1992) 100–107.
- [275] **R. Howden, C.R. Andersen, P.B. Goldsbrough, C.S. Cobbett**, A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol.* **107** (1995) 1067–1073.
- [276] **M. Pomponi, V. Censi, V. Di Girolamo, A. De Paolis, L.S. di Toppi, R. Aromolo, et al.**, Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase in tobacco plants enhances Cd(2+) tolerance and accumulation but not translocation to the shoot, *Planta.* **223** (2006) 180–190.
- [277] **J.-C. Li, J.-B. Guo, W.-Z. Xu, M. Ma**, RNA interference-mediated silencing of *phytochelatin synthase* gene reduce cadmium accumulation in rice seeds, *J. Integr. Plant Biol.* **49** (2007) 1032–1037.
- [278] **G. Felix, J.D. Duran, S. Volko, T. Boller**, Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin, *Plant J.* **18** (1999) 265–276.
- [279] **L. Gómez-Gómez, G. Felix, T. Boller**, A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* **18** (1999) 277–284.
- [280] **D. Chinchilla, Z. Bauer, M. Regenass, T. Boller, G. Felix**, The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception, *Plant Cell.* **18** (2006) 465–476.
- [281] **L. Westphal, D. Scheel, S. Rosahl**, The *coi1-16* mutant harbors a second site mutation rendering PEN2 nonfunctional, *Plant Cell.* **20** (2008) 824–826.
- [282] **Y. Kobae, T. Sekino, H. Yoshioka, T. Nakagawa, E. Martinoia, M. Maeshima**, Loss of *AtPDR8*, a plasma membrane ABC transporter of *Arabidopsis thaliana*, causes hypersensitive cell death upon pathogen infection, *Plant Cell Physiol.* **47** (2006) 309–318.
- [283] **D.-Y. Kim, J.-Y. Jin, S. Alejandro, E. Martinoia, Y. Lee**, Overexpression of *AtABCG36* improves drought and salt stress resistance in *Arabidopsis*, *Physiol. Plant.* **139** (2010) 170–180.
- [284] **L.C. Strader, B. Bartel**, The *Arabidopsis* PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE8/ABCG36 ATP-binding cassette transporter modulates sensitivity to the auxin precursor indole-3-butyric acid, *Plant Cell.* **21** (2009) 1992–2007.

- [285] **D.-Y. Kim, L. Bovet, M. Maeshima, E. Martinoia, Y. Lee**, The ABC transporter *AtPDR8* is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance, *Plant J.* **50** (2007) 207–218.
- [286] **Y. Li, O.P. Dankher, L. Carreira, A.P. Smith, R.B. Meagher**, The shoot-specific expression of γ -glutamylcysteine synthetase directs the long-distance transport of thiol-peptides to roots conferring tolerance to mercury and arsenic, *Plant Physiol.* **141** (2006) 288–298.
- [287] **J.P. Adams, A. Adeli, C.-Y. Hsu, R.L. Harkess, G.P. Page, C.W. dePamphilis, et al.**, Poplar maintains zinc homeostasis with heavy metal genes *HMA4* and *PCS1*, *J. Exp. Bot.* **62** (2011) 3737–3752.
- [288] **A. Grzam, P. Tennstedt, S. Clemens, R. Hell, A.J. Meyer**, Vacuolar sequestration of glutathione S-conjugates outcompetes a possible degradation of the glutathione moiety by phytochelatin synthase, *FEBS Lett.* **580** (2006) 6384–6390.
- [289] **E. Grill, J. Thumann, E.L. Winnacker, M.H. Zenk**, Induction of heavy-metal binding phytochelatins by inoculation of cell cultures in standard media, *Plant Cell Rep.* **7** (1988) 375–378.
- [290] **A. Kabata-Pendias**, Trace elements in soils and plants, 4th ed., *CRC Press, Boca Raton*, (2011).
- [291] **A. Kabata-Pendias, B. Galczynska, S. Dudka**, Baseline zinc content of soils and plants in Poland, *Environ. Geochem. Health.* **11** (1989) 19–24.
- [292] **K.G. Tiller, E. Suwadi, R.S. Beckwith**, An approach to soil testing with special reference to the zinc requirement of rice paddy soils, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **10** (1979) 703–715.
- [293] **A.R. Hosseinpur, H. Motaghian**, Evaluating of many chemical extractants for assessment of Zn and Pb uptake by bean in polluted soils, *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **15** (2015) 24–34.
- [294] **U. Krämer**, Metal hyperaccumulation in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* **61** (2010) 517–534.
- [295] **J.-Y. Cornu, U. Deinlein, S. Höreth, M. Braun, H. Schmidt, M. Weber, et al.**, Contrasting effects of nicotianamine synthase knockdown on zinc and nickel tolerance and accumulation in the zinc/cadmium hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*, *New Phytol.* **206** (2015) 738–750.
- [296] **Y. Fukao, A. Ferjani, R. Tomioka, N. Nagasaki, R. Kurata, Y. Nishimori, et al.**, iTRAQ analysis reveals mechanisms of growth defects due to excess zinc in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* **155** (2011) 1893–1907.
- [297] **A. Ruano, J. Barceló, C. Poschenrieder**, Zinc toxicity-induced variation of mineral element composition in hydroponically grown bush bean plants, *J. Plant Nutr.* **10** (1987) 373–384.
- [298] **A.G.L. Assunção, W.M. Bookum, H.J.M. Nelissen, R. Vooijs, H. Schat, W.H.O. Ernst**, Differential metal-specific tolerance and accumulation patterns among *Thlaspi caerulescens* populations originating from different soil types, *New Phytol.* **159** (2003) 411–419.
- [299] **I. Baxter, M. Ouzzani, S. Orcun, B. Kennedy, S.S. Jandhyala, D.E. Salt**, Purdue ionomics information management system. An integrated functional genomics platform, *Plant Physiol.* **143** (2007) 600–611.
- [300] **B.J. Alloway**, Heavy Metals in Soils - Trace metals and metalloids in soils and their bioavailability, 3rd ed., *Springer*, (2010).
- [301] **K. Zhao, X. Liu, J. Xu, H.M. Selim**, Heavy metal contaminations in a soil-rice system: identification of spatial dependence in relation to soil properties of paddy fields, *J. Hazard. Mater.* **181** (2010) 778–787.
- [302] **I.K. Mitsios, E.E. Golia, C.D. Tsadilas**, Heavy metal concentrations in soils and irrigation waters in Thessaly region, central Greece, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **36** (2005) 487–501.
- [303] **O. Sukreeyapongse, P.E. Holm, B.W. Strobel, S. Panichsakpatana, J. Magid, H.C.B. Hansen**, pH-dependent release of cadmium, copper, and lead from natural and sludge-amended soils, *J. Environ. Qual.* **31** (2002) 1901–1909.
- [304] **A.S. Wang, J.S. Angle, R.L. Chaney, T.A. Delorme, R.D. Reeves**, Soil pH effects on uptake of Cd and Zn by *Thlaspi caerulescens*, *Plant Soil.* **281** (2006) 325–337.
- [305] **C.D. Foy, R.L. Chaney, M.C. White**, The physiology of metal toxicity in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **29** (1978) 511–566.
- [306] **E. Przedpeńska-Wąsowicz, A. Polatajko, M. Wierzbicka**, The influence of cadmium stress on the content of mineral nutrients and metal-binding proteins in *Arabidopsis halleri*, *Water Air Soil Pollut.* **223** (2012) 5445–5458.
- [307] **M. Halim, P. Conte, A. Piccolo**, Potential availability of heavy metals to phyto-extraction from

- contaminated soils induced by exogenous humic substances, *Chemosphere*. **52** (2003) 265–275.
- [308] **A. McCauley, C. Jones, J. Jacobsen**, Soil pH and organic matter, *Montana State University Extension Service*. **4449-8** (2009) 1–12.
- [309] **J. Dai, T. Becquer, J.H. Rouiller, G. Reversat, F. Bernhard-Reversat, P. Lavelle**, Influence of heavy metals on C and N mineralisation and microbial biomass in Zn-, Pb-, Cu-, and Cd-contaminated soils, *Appl. Soil Ecol.* **25** (2004) 99–109.
- [310] **B.M. Waters, H.-H. Chu, R.J. DiDonato, L.A. Roberts, R.B. Easley, B. Lahner, et al.**, Mutations in *Arabidopsis yellow stripe-like1* and *yellow stripe-like3* reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds, *Plant Physiol.* **141** (2006) 1446–1458.
- [311] **B.M. Waters, M.A. Grusak**, Whole-plant mineral partitioning throughout the life cycle in *Arabidopsis thaliana* ecotypes Columbia, Landsberg *erecta*, Cape Verde Islands, and the mutant line *ysl1ysl3*, *New Phytol.* **177** (2008) 389–405.
- [312] **E. Himelblau, R.M. Amasino**, Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence, *J. Plant Physiol.* **158** (2001) 1317–1323.
- [313] **R. Nable, J. Loneragan**, Translocation of manganese in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L. cv. Seaton Park) I. Redistribution during vegetative growth, *Funct. Plant Biol.* **11** (1984) 101–111.
- [314] **B.M. Waters, C. Uauy, J. Dubcovsky, M.A. Grusak**, Wheat (*Triticum aestivum*) NAM proteins regulate the translocation of iron, zinc, and nitrogen compounds from vegetative tissues to grain, *J. Exp. Bot.* **60** (2009) 4263–4274.
- [315] **C. Uauy, J.C. Brevis, J. Dubcovsky**, The high grain protein content gene *Gpc-B1* accelerates senescence and has pleiotropic effects on protein content in wheat, *J. Exp. Bot.* **57** (2006) 2785–2794.
- [316] **C. Uauy, A. Distelfeld, T. Fahima, A. Blechl, J. Dubcovsky**, A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat, *Science*. **314** (2006) 1298–1301.
- [317] **A. Distelfeld, I. Cakmak, Z. Peleg, L. Ozturk, A.M. Yazici, H. Budak, et al.**, Multiple QTL-effects of wheat *Gpc-B1* locus on grain protein and micronutrient concentrations, *Physiol. Plant.* **129** (2007) 635–643.
- [318] **M. McLaughlin, D. Parker, J. Clarke**, Metals and micronutrients – food safety issues, *Field Crops Res.* **60** (1999) 143–163.
- [319] **J.-S. Lee, H.-T. Chon, K.-W. Kim**, Migration and dispersion of trace elements in the rock–soil–plant system in areas underlain by black shales and slates of the Okchon Zone, Korea, *J. Geochem. Explor.* **65** (1998) 61–78.
- [320] **L. Sanità di Toppi, R. Gabbrielli**, Response to cadmium in higher plants, *Environ. Exp. Bot.* **41** (1999) 105–130.
- [321] **N. Köleli, S. Eker, I. Cakmak**, Effect of zinc fertilization on cadmium toxicity in durum and bread wheat grown in zinc-deficient soil, *Environ. Pollut.* **131** (2004) 453–459.
- [322] **S.S. Gill, N. Tuteja**, Cadmium stress tolerance in crop plants. Probing the role of sulfur, *Plant Signal. Behav.* **6** (2011) 215–222.
- [323] **P.J. White, P.H. Brown**, Plant nutrition for sustainable development and global health, *Ann. Bot.* **105** (2010) 1073–1080.
- [324] **T.S. Nawrot, J.A. Staessen, H.A. Roels, E. Munters, A. Cuypers, T. Richart, et al.**, Cadmium exposure in the population: from health risks to strategies of prevention, *Biometals.* **23** (2010) 769–782.
- [325] **S. Clemens, M.G.M. Aarts, S. Thomine, N. Verbruggen**, Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning, *Trends Plant Sci.* **18** (2013) 92–99.
- [326] **S. Uruguchi, T. Fujiwara**, Rice breaks ground for cadmium-free cereals, *Curr. Opin. Plant Biol.* **16** (2013) 328–334.
- [327] **M. Gussarsson, H. Asp, S. Adalsteinsson, P. Jensén**, Enhancement of cadmium effects on growth and nutrient composition of birch (*Betula pendula*) by buthionine sulphoximine (BSO), *J. Exp. Bot.* **47** (1996) 211–215.
- [328] **F.J. Zhao, R.F. Jiang, S.J. Dunham, S.P. McGrath**, Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*, *New Phytol.* **172** (2006) 646–654.

- [329] **Y. Cai, F. Cao, W. Cheng, G. Zhang, F. Wu**, Modulation of exogenous glutathione in phytochelatin and photosynthetic performance against Cd stress in the two rice genotypes differing in Cd tolerance, *Biol. Trace Elem. Res.* **143** (2011) 1159–1173.
- [330] **W.-Y. Song, D.G. Mendoza-Cózatl, Y. Lee, J.I. Schroeder, S.-N. Ahn, H.-S. Lee, et al.**, Phytochelatin-metal(loid) transport into vacuoles shows different substrate preferences in barley and *Arabidopsis*, *Plant Cell Environ.* **37** (2014) 1192–1201.
- [331] **M.G. Stacey, H. Osawa, A. Patel, W. Gassmann, G. Stacey**, Expression analyses of *Arabidopsis* oligopeptide transporters during seed germination, vegetative growth and reproduction, *Planta.* **223** (2006) 291–305.
- [332] **H. Osawa, G. Stacey, W. Gassmann**, ScOPT1 and AtOPT4 function as proton-coupled oligopeptide transporters with broad but distinct substrate specificities, *Biochem. J.* **393** (2006) 267–275.
- [333] **A. Bräutigam, S. Bomke, T. Pfeifer, U. Karst, G.-J. Krauss, D. Wesenberg**, Quantification of phytochelatin in *Chlamydomonas reinhardtii* using ferrocene-based derivatization, *Metallomics.* **2** (2010) 565–570.
- [334] **P. Brunetti, L. Zanella, A. Proia, A. De Paolis, G. Falasca, M.M. Altamura, et al.**, Cadmium tolerance and phytochelatin content of *Arabidopsis* seedlings over-expressing the phytochelatin synthase gene *AtPCS1*, *J. Exp. Bot.* **62** (2011) 5509–5519.
- [335] **R. Kneer, T.M. Kutchan, A. Hochberger, M.H. Zenk**, *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin, *Arch. Microbiol.* **157** (1992) 305–310.
- [336] **Y. Hayashi, C.W. Nakagawa, N. Mutoh, M. Isobe, T. Goto**, Two pathways in the biosynthesis of cadystins (γ EC)_nG in the cell-free system of the fission yeast, *Biochem. Cell Biol.* **69** (1991) 115–121.
- [337] **A. Al-Lahham, V. Rohde, P. Heim, R. Leuchter, J. Veeck, C. Wunderlich, et al.**, Biosynthesis of phytochelatin in the fission yeast. Phytochelatin synthesis: a second role for the glutathione synthetase gene of *Schizosaccharomyces pombe*, *Yeast.* **15** (1999) 385–396.
- [338] **K. Imai, H. Obata, K. Shimizu, T. Komiya**, Conversion of glutathione into cadystins and their analogs catalyzed by carboxypeptidase Y, *Biosci. Biotech. Biochem.* **60** (1996) 1193–1194.
- [339] **J. Wünschmann, A. Beck, L. Meyer, T. Letzel, E. Grill, K.J. Lenzian**, Phytochelatin are synthesized by two vacuolar serine carboxypeptidases in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.* **581** (2007) 1681–1687.
- [340] **S. Lee, J.S. Moon, T.-S. Ko, D. Petros, P.B. Goldsbrough, S.S. Korban**, Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress, *Plant Physiol.* **131** (2003) 656–663.
- [341] **S. Lee, D. Petros, J.S. Moon, T.-S. Ko, P.B. Goldsbrough, S.S. Korban**, Higher levels of ectopic expression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase do not lead to increased cadmium tolerance and accumulation, *Plant Physiol. Biochem.* **41** (2003) 903–910.
- [342] **S. Wojas, S. Clemens, J. Hennig, A. Skłodowska, E. Kopera, H. Schat, et al.**, Overexpression of phytochelatin synthase in tobacco: distinctive effects of *AtPCS1* and *CePCS* genes on plant response to cadmium, *J. Exp. Bot.* **59** (2008) 2205–2219.
- [343] **S. Clemens, S. Thomine, J.I. Schroeder**, Molecular mechanisms that control plant tolerance to heavy metals and possible roles towards manipulating metal accumulation, in: *Plant biotechnology and transgenic plants*, Marcel Dekker, New York, (2002) 668–694.
- [344] **H. Schat, M. Llugany, R. Vooijs, J. Hartley-Whitaker, P.M. Bleeker**, The role of phytochelatin in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes, *J. Exp. Bot.* **53** (2002) 2381–2392.
- [345] **B. Kastenholz**, Comparison of the electrochemical behavior of the high molecular mass cadmium proteins in *Arabidopsis thaliana* and in vegetable plants on using preparative native continuous polyacrylamide gel electrophoresis (PNC-PAGE), *Electroanalysis.* **18** (2006) 103–106.
- [346] **S.I. Fenik, V.G. Solodushko, T.B. Kalinyak, A.B. Blume**, The role of Cd-binding proteins and phytochelatin in the formation of resistance to cadmium in the cell lines of *Nicotiana plumbaginifolia*, *Cytol. Genet.* **41** (2007) 6–11.
- [347] **H. Satofuka, S. Amano, H. Atomi, M. Takagi, K. Hirata, K. Miyamoto, T. Imanaka**, Rapid method for detection and detoxification of heavy metal ions in water environments using phytochelation, *J. Biosci.*

- Bioeng.* **88** (1999) 287–292.
- [348] **K. Hiruma, T. Nishiuchi, T. Kato, P. Bednarek, T. Okuno, P. Schulze-Lefert, Y. Takano**, *Arabidopsis ENHANCED DISEASE RESISTANCE 1* is required for pathogen-induced expression of plant defensins in nonhost resistance, and acts through interference of MYC2-mediated repressor function, *Plant J.* **67** (2011) 980–992.
- [349] **M. Mirouze, J. Sels, O. Richard, P. Czernic, S. Loubet, A. Jacquier, et al.**, A putative novel role for plant defensins: a defensin from the zinc hyperaccumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance, *Plant J.* **47** (2006) 329–342.
- [350] **U. Lipka, R. Fuchs, C. Kuhns, E. Petutschnig, V. Lipka**, Live and let die – *Arabidopsis* nonhost resistance to powdery mildews, *Eur. J. Cell Biol.* **89** (2010) 194–199.
- [351] **V. Parisy, B. Poinssot, L. Owsianowski, A. Buchala, J. Glazebrook, F. Mauch**, Identification of PAD2 as a gamma-glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of *Arabidopsis*, *Plant J.* **49** (2007) 159–172.
- [352] **V. Shanmugam, M. Tsednee, K.-C. Yeh**, ZINC TOLERANCE INDUCED BY IRON 1 reveals the importance of glutathione in the cross-homeostasis between zinc and iron in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* **69** (2012) 1006–1017.
- [353] **G. Noctor, A. Mhamdi, S. Chaouch, Y. Han, J. Neukermans, B. Marquez-Garcia, et al.**, Glutathione in plants: an integrated overview, *Plant Cell Environ.* **35** (2012) 454–484.
- [354] **P. Bednarek, C. Kwon, P. Schulze-Lefert**, Not a peripheral issue: secretion in plant–microbe interactions, *Curr. Opin. Plant Biol.* **13** (2010) 378–387.
- [355] **J.G. Bundy, P. Kille**, Metabolites and metals in Metazoa - what role do phytochelatins play in animals?, *Metallomics.* **6** (2014) 1576–1582.
- [356] **S. Clemens, J.I. Schroeder, T. Degenkolb**, *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase, *FEBS J.* **268** (2001) 3640–3643.
- [357] **N. Polak, D.S. Read, K. Jurkschat, M. Matzke, F.J. Kelly, D.J. Spurgeon, S.R. Stürzenbaum**, Metalloproteins and phytochelatin synthase may confer protection against zinc oxide nanoparticle induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **160** (2014) 75–85.
- [358] **T. Boller, G. Felix**, A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors, *Annu. Rev. Plant Biol.* **60** (2009) 379–406.
- [359] **Y.A. Millet, C.H. Danna, N.K. Clay, W. Songnuan, M.D. Simon, D. Werck-Reichhart, F.M. Ausubel**, Innate immune responses activated in *Arabidopsis* roots by microbe-associated molecular patterns, *Plant Cell.* **22** (2010) 973–990.
- [360] **C. Böttcher, L. Westphal, C. Schmotz, E. Prade, D. Scheel, E. Glawischnig**, The multifunctional enzyme CYP71B15 (PHYTOALEXIN DEFICIENT3) converts cysteine-indole-3-acetonitrile to camalexin in the indole-3-acetonitrile metabolic network of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell.* **21** (2009) 1830–1845.
- [361] **F. Geu-Flores, M.E. Møldrup, C. Böttcher, C.E. Olsen, D. Scheel, B.A. Halkier**, Cytosolic γ -glutamyl peptidases process glutathione conjugates in the biosynthesis of glucosinolates and camalexin in *Arabidopsis*, *Plant Cell.* **23** (2011) 2456–2469.
- [362] **P. Bednarek**, Sulfur-containing secondary metabolites from *Arabidopsis thaliana* and other Brassicaceae with function in plant immunity, *ChemBiochem.* **13** (2012) 1846–1859.
- [363] **I. Lassowskat, C. Böttcher, L. Eschen-Lippold, D. Scheel, J. Lee**, Sustained mitogen-activated protein kinase activation reprograms defense metabolism and phosphoprotein profile in *Arabidopsis thaliana*, *Front. Plant Sci.* **5** (2014) 554.
- [364] **R. Sánchez-Fernández, T.G.E. Davies, J.O.D. Coleman, P.A. Rea**, The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory, *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 30231–30244.
- [365] **K.J. Linton, C.F. Higgins**, The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins, *Mol. Microbiol.* **28** (1998) 5–13.
- [366] **S.P.C. Cole, R.G. Deeley**, Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP, *Bioessays.* **20** (1998) 931–940.

- [367] **T.G.E. Davies, J.O.D. Coleman**, The *Arabidopsis thaliana* ATP-binding cassette proteins: an emerging superfamily, *Plant Cell Environ.* **23** (2000) 431–443.
- [368] **F.L. Theodoulou**, Plant ABC transporters, *Biochim. Biophys. Acta.* **1465** (2000) 79–103.
- [369] **Z.-S. Li, Y.-P. Lu, R.-G. Zhen, M. Szczyпка, D.J. Thiele, P.A. Rea**, A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94** (1997) 42–47.
- [370] **E.J. Campbell, P.M. Schenk, K. Kazan, I.A.M.A. Penninckx, J.P. Anderson, D.J. Maclean, et al.**, Pathogen-responsive expression of a putative ATP-binding cassette transporter gene conferring resistance to the diterpenoid sclareol is regulated by multiple defense signaling pathways in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* **133** (2003) 1272–1284.
- [371] **M. Lee, K. Lee, J. Lee, E.W. Noh, Y. Lee**, AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* **138** (2005) 827–836.
- [372] **S.A. Sinclair, U. Krämer**, The zinc homeostasis network of land plants, *Biochim. Biophys. Acta.* **1823** (2012) 1553–1567.
- [373] **A.W. Woodward, B. Bartel**, Auxin: regulation, action, and interaction, *Ann. Bot.* **95** (2005) 707–735.
- [374] **D. Winter, B. Vinegar, H. Nahal, R. Ammar, G.V. Wilson, N.J. Provart**, An “electronic fluorescent pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets, *PLoS ONE.* **2** (2007) e718.
- [375] **F. Bertolero, G. Pozzi, E. Sabbioni, U. Saffiotti**, Cellular uptake and metabolic reduction of pentavalent to trivalent arsenic as determinants of cytotoxicity and morphological transformation, *Carcinogenesis.* **8** (1987) 803–808.
- [376] **M. Styblo, L.M.D. Razo, L. Vega, D.R. Germolec, E.L. LeCluyse, G.A. Hamilton, et al.**, Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells, *Arch. Toxicol.* **74** (2000) 289–299.
- [377] **E.M. Leslie, A. Haimeur, M.P. Waalkes**, Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1), *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 32700–32708.
- [378] **A.A.T. Johnson, B. Kyriacou, D.L. Callahan, L. Carruthers, J. Stangoulis, E. Lombi, M. Tester**, Constitutive overexpression of the *OsNAS* gene family reveals single-gene strategies for effective iron- and zinc-biofortification of rice endosperm, *PLoS ONE.* **6** (2011) e24476.
- [379] **S. Uruguchi, T. Kamiya, T. Sakamoto, K. Kasai, Y. Sato, Y. Nagamura, et al.**, Low-affinity cation transporter (*OsLCT1*) regulates cadmium transport into rice grains, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108** (2011) 20959–20964.
- [380] **E.B. Erenoglu, U.B. Kutman, Y. Ceylan, B. Yildiz, I. Cakmak**, Improved nitrogen nutrition enhances root uptake, root-to-shoot translocation and remobilization of zinc (⁶⁵Zn) in wheat, *New Phytol.* **189** (2011) 438–448.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.

Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -
vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde.

Heinersreuth, der 16. November 2015, Tanja Kühnlenz