

Lehrstuhl für Botanik, Department Biowissenschaftliche Grundlagen  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt

**Phytochelatine**  
**Komplexierung von Metallen und Metalloiden**  
**Untersuchungen zur Phytochelatin-Synthese**

Marcus Schmöger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. E. Grill
2. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 14. September 2000 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie  
am 9. Oktober 2000 angenommen.

## Abstract (deutsch)

Phytochelatine sind die wichtigsten schwermetall-bindenden und schwermetall-entgiftenden Peptide bei Pflanzen. Die Bildung dieser Peptide als Reaktion auf die Zugabe verschiedener Metalle und Metalloide wurde an pflanzlichen Zellkulturen und an Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* untersucht.

Cadmium, Blei, Quecksilber, Kupfer, Zinn, Eisen, Chrom und Molybdän, Arsen, Antimon und Bismut induzierten in pflanzlichen Zellkulturen die Bildung von Phytochelatinen; Selen, Vanadium und Cobalt hingegen nicht. Mittels Gelfiltration konnte die Existenz von Phytochelatin-Komplexen mit Blei, Quecksilber und Antimon gezeigt werden.

Nach Zugabe von Arsenit oder Arsenat wurde eine dramatische Zunahme der Phytochelatine beobachtet. Die Identität der gebildeten Peptide wurde durch Massenspektrometrie (ESI-MS) bestätigt. Unter optimierten Bedingungen konnte mit Gelfiltration die Existenz eines *in vivo* gebildeten Komplexes zwischen Arsen und Phytochelatinen gezeigt werden. Die massenspektrometrische Analyse eines synthetisierten Komplexes ergab die erwartete Stöchiometrie von drei SH-Gruppen pro As.

Mit dem Yeast-Two-Hybrid-System wurde untersucht, ob die Phytochelatin-Synthase als Homodimer aus zwei ca. 50 kDa-Untereinheiten aktiv ist. Die mit dem Phytochelatin-Synthase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* transformierten Hefen zeigten nach  $\text{Cd}^{2+}$ -Zugabe Phytochelatin-Bildung; die Phytochelatin-Synthase ist jedoch nicht als Homodimer aktiv, weil eine Interaktion im Yeast-Two-Hybrid-System nicht beobachtet wurde.

## Abstract (english)

Phytochelatins are the most important heavy metal binding and heavy metal detoxifying peptides in plants. The formation of these peptides upon addition of different metals and metalloids was studied in plant cell cultures and in seedlings of *Arabidopsis thaliana*.

Cadmium, lead, mercury, copper, tin, iron, chromium and molybdenum, arsenic, antimony and bismuth induced the formation of phytochelatins in plant cell cultures; selenium, vanadium and cobalt did not, however. By gel filtration the existence of phytochelatin complexes of lead, mercury and antimony could be demonstrated.

Upon addition of arsenite or arsenate a dramatic increase of phytochelatins could be observed. The identity of the formed peptides was confirmed by mass spectrometry (ESI-MS). The existence of an *in vivo* formed complex between arsenic and phytochelatins could be demonstrated by gel filtration under optimized conditions. The mass spectrometrical analysis of a synthesized complex showed the expected stoichiometry of three SH groups per As.

With the yeast two hybrid system the question was studied, if the phytochelatin synthase is active as an homodimer of two approximately 50 kDa subunits. The yeasts transformed with the phytochelatin synthase gene from *Arabidopsis thaliana* showed phytochelatin formation upon  $\text{Cd}^{2+}$  addition; however, the phytochelatin synthase is not active as an homodimer, as the interaction in the yeast two hybrid system could not be observed.

## Inhaltsverzeichnis

<b>A. Einleitung</b>	<b>1</b>
A.1. Schwermetalle	1
A.2. Biologische Wirkungen von Schwermetallen	3
A.3. Mechanismen für Toleranz und Homöostase gegenüber Schwermetallen	4
A.4. Komplexierung durch cysteinreiche Peptide: Metallothionein	8
A.5. Komplexierung durch cysteinreiche Peptide: Phytochelatine	13
A.6. Phytochelatin-Synthase: Protein und Gen	19
A.7. Funktion der Phytochelatine	21
A.8. Steckbriefe der wichtigsten verwendeten Elemente Arsen, Selen, Blei	25
A.8.1. Arsen	25
A.8.2. Selen	28
A.8.3. Blei	32
<b>B. Material und Methoden</b>	<b>35</b>
B.1. Verwendete Organismen	35
B.1.1. Pflanzliche Zellkulturen	35
B.1.2. Belastungsversuche mit Zellkulturen	35
B.1.3. Ernten der Zellkulturen	36
B.1.4. Keimlinge von <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
B.1.5. Bakterien und Hefen	37
B.2. Chemikalien und allgemeine Geräte	37
B.2.1. Chemikalien	37
B.2.2. Geräte	37
B.3. Nachweis von Phytochelatinen durch RP-HPLC mit Nachsäulenderivatisierung	38
B.3.1. Probenvorbereitung	38
B.3.2. Trennung und Derivatisierung	39
B.3.3. HPLC-Anlage	40
B.3.4. Datenanalyse	41
B.4. Proteinbestimmung	43

B.5. Nachweis von Schwermetallen durch AAS und ICP-AES und	
Arsen-Schnelltest	44
B.5.1. AAS und ICP-AES	44
B.5.2. Arsen-Schnelltest	45
B.6. Nachweis von Phytochelatın-Metall-Komplexen durch Gelfiltration bzw.	
Anionenaustauscherchromatographie	46
B.6.1. Extraktion	46
B.6.2. Gelfiltrations-Chromatographie	46
B.6.3. Anionenaustauscherchromatographie	47
B.7. Reinigung von Phytochelatın-Metall-Komplexen bzw. Apo-Phytochelatinen	47
B.7.1. Extraktion	47
B.7.2. Anionenaustauscherchromatographie	47
B.7.3. Ammoniumsulfatfällung und Ultrafiltration	48
B.7.4. Gelfiltration	48
B.7.5. Gewinnung metallfreier Phytochelatine (apo-Phytochelatine)	48
B.8. Biosynthese von Phytochelatinen <i>in vitro</i>	48
B.9. Rekonstitution von GSH-Metall- und PC-Metall-Komplexen	49
B.10. Massenspektrometrische Analysen (ESI-MS und MALDI-TOF-MS)	49
B.11. Molekularbiologische Techniken	50
B.11.1. Vorgehensweise	50
B.11.2. Verwendete Chemikalien und Enzyme	51
B.11.3. DNA-Isolierung	51
B.11.4. PCR	52
B.11.5. Gelelektrophorese und Isolation aus dem Gel	54
B.11.6. Restriktionsverdau und Ligation in Vektoren	54
B.11.7. Transformation von <i>Escherichia coli</i> und Isolation der Vektor-DNA	56
B.11.8. Yeast-Two-Hybrid-Analyse	57
B.11.9. Datenbanksuchen und Sequenzvergleiche	59
<b>C. Ergebnisse und Teildiskussion</b>	<b>61</b>
C.1. Effekt der Elemente Cadmium, Blei und Quecksilber sowie einiger	
anderer Metalle (Eisen, Kupfer, Zinn, Vanadium, Chrom, Molybdän, Cobalt)	61

C.1.1. Cadmium	62
C.1.2. Blei	66
C.1.3. Quecksilber	75
C.1.4. Eisen, Kupfer, Zinn	78
C.1.5. Vanadium, Chrom, Molybdän, Cobalt	82
C.1.6. Teildiskussion	84
C.2. Effekt des Halbmetalls Arsen	87
C.2.1. Phytochelatin-Induktion durch anorganische Arsen-Spezies: Konzentrations- und Zeitabhängigkeit	87
C.2.2. Phytochelatin-Induktion in <i>Arabidopsis thaliana</i> -Keimlingen	92
C.2.3. Phytochelatin-Induktion durch organische Arsen-Verbindungen	94
C.2.4. Phytochelatin-Bildung <i>in vitro</i>	97
C.2.5. Nachweis der gebildeten Peptide durch Massenspektrometrie	98
C.2.6. Komplexierung von Arsen durch Phytochelatine: Anionenaustauscher-Chromatographie	103
C.2.7. Komplexierung von Arsen durch Phytochelatine: Gelfiltrationen	106
C.2.8. Komplexierung von Arsen durch Phytochelatine: Massenspektrometrie	109
C.2.9. Inhibierung der As-induzierten Phytochelatin-Bildung durch BSO	111
C.2.10. Teildiskussion: Arsen und Phytochelatine	113
C.3. Effekt der Elemente Antimon, Bismut und Selen	118
C.3.1. Antimon und Bismut	118
C.3.2. Selenat und Selenit	122
C.3.3. Teildiskussion Antimon, Bismut und Selen	125
C.4. Die Phytochelatin-Synthase benötigt keine Dimerisierung zur Aktivität	128
C.4.1. Fragestellung und Strategie	128
C.4.2. PCR-Amplifikation	131
C.4.3. Transformation von <i>Escherichia coli</i>	135
C.4.4. Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	137
C.4.5. Aktivität der PC-Synthase in transformierten Hefen	138
C.4.6. Test auf Interaktion	139
C.4.7. Teildiskussion	141

<b>D. Diskussion</b>	<b>143</b>
D.1. Wie ubiquitär sind Phytochelatine?	143
D.2. Welche Elemente induzieren Phytochelatine?	149
D.3. Welche Struktur haben Phytochelatin-Komplexe und wo sind sie lokalisiert?	153
D.4. Phytoremediation und Phytochelatine	161
<b>E. Zusammenfassung</b>	<b>163</b>
<b>F. Literaturverzeichnis</b>	<b>167</b>
<b>G. Danksagung</b>	<b>183</b>

## A. Einleitung

### A.1. Schwermetalle

Schwermetalle sind in aller Munde: Quecksilber im Amalgam der Zahnfüllungen ängstigt die Menschen (Staehe, 1998); Cadmium wird mit der Nahrung aufgenommen (Brown et al., 1996; Hart et al., 1998), Arsen über das Trinkwasser (Dhar et al., 1997). In Tageszeitungen werden immer wieder kürzere oder längere Berichte über von Schwermetallen ausgehende Gefahren abgedruckt (Müller-Jung, 1996; Näveke, 1996; Anon., 1997; Steinberger, 1998, 1999). Tatsächlich sind „Schwermetalle“ problematische Umweltgifte, die außer durch natürliche Prozesse in großem Umfang durch menschliche Aktivitäten freigesetzt und der Biosphäre zugeführt werden. Nriagu & Pacyna (1988) gaben einen Überblick über die jährlichen Freisetzungen: So wurden z.B. 1983 etwa 7600 Tonnen Cadmium, 18800 Tonnen Arsen, 3600 Tonnen Quecksilber und 332000 Tonnen Blei allein in die Atmosphäre freigesetzt. Ein interessanter Indikator zur Veranschaulichung des anthropogenen Anteils der Freisetzung in die Biosphäre wurde von Ochiai (1995) vorgestellt. Die „zusätzliche Last“ (excess burden) ist das Verhältnis anthropogener zu natürlicher Freisetzung. Nach diesem Indikator ist in besonderem Maße die Freisetzung der Elemente Selen (19fache Freisetzung), Cadmium (8fach), Quecksilber, Blei, Zinn (je 6fach), Arsen, Nickel und Chrom (je etwa 3fach) auf Aktivitäten des Menschen zurückzuführen.

In der allgemeinen Diskussion über Umweltgifte wird allerdings viel zu häufig der Eindruck erweckt, daß Schwermetalle eine klar definierte und ziemlich einheitliche Stoffklasse seien. Auch in der wissenschaftlichen Literatur wird der Begriff meist sehr pauschal verwendet. Oft werden Schwermetalle als die Metalle definiert, deren Dichte mehr als  $5 \text{ g/cm}^3$  (Wiberg, 1985) beträgt, manchmal auch schon bei mehr als  $4 \text{ g/cm}^3$  (Nieboer & Richardson, 1980).

Diese physikalisch-technische Definition ist jedoch wenig hilfreich, um Schwermetalle von ihrer biologischen Relevanz her zu betrachten. Die biologische Wirkung von Barium (Dichte 3,65) oder Titan (Dichte 4,51) unterscheidet sich deutlich von der von Cadmium oder Blei, diese jedoch auch wieder von der von Cobalt oder Nickel oder den Lanthaniden (Dichte 5,25 bis 9,84). Die Dichte eines Elements hängt von der Stellung im Periodensystem der Elemente, d.h. von der Periode und der Gruppe ab; die chemische Reaktivität wird hauptsächlich durch die Gruppe bestimmt. Dies führt uns schon in die richtige Richtung, denn die biologische



Wirkung von Schwermetallen ist im wesentlichen eine (bio)chemische Wirkung. Was verbindet eine Anzahl von Elementen wie Cadmium, Blei, Quecksilber, Silber, Arsen, Antimon, Zinn, Kupfer, Zink? Herausragendes Merkmal ist ihre Affinität zu Schwefel-Liganden, die im anorganischen Trennungsgang durch Fällung der Schwermetalle mit H<sub>2</sub>S genutzt wird (Blasius, 1985). Auch biologisch ist diese Affinität von herausragender Bedeutung, wie noch dargestellt werden wird.

Aus verschiedenen physikalisch-chemischen Parametern leiteten Nieboer & Richardson (1980) eine klarere Definition verschiedener metallischer Elemente ab. Sie teilten die Kationen dieser Elemente in drei Gruppen ein: *Class A*, *Borderline* und *Class B*. Die Zugehörigkeit der metallischen Elemente zu einer der drei Gruppen ist in Abbildung 1 dargestellt. Die hauptsächliche Trennlinie ist zwischen den *Class A*-Ionen und den beiden anderen Gruppen, während der Übergang zwischen *Class B*- und *Borderline*-Ionen fließend ist. Die für die weiteren Betrachtungen wichtigste Eigenschaft ist, daß *Class A*-Ionen an Liganden bevorzugt über O-Atome, *Class B*-Ionen hingegen bevorzugt über S-Atome binden.

H																			He
Li	Be												B	C	N	O	F		Ne
Na	Mg												Al	Si	P	S	Cl		Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br			Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I			Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At			Rn
Fr	Ra	Ac																	

**Class A**    
  **Borderline**    
  **Class B**

**Abbildung 1:** Periodensystem der Elemente (ohne Lanthaniden und Actiniden). Die Zugehörigkeit der metallischen Elemente zu den drei Klassen von Ionen (*Class A*, *Borderline* und *Class B*) erfolgte nach Nieboer & Richardson (1980). Die nicht markierten Elemente sind entweder nichtmetallisch, oder es gibt zu wenige Daten, um sie einer der Gruppen zuzuordnen. Lanthaniden und Actiniden gehören zu *Class A*. Pb<sup>2+</sup> und Cu<sup>2+</sup> sind *Borderline*-Ionen, Pb (IV) und Cu<sup>+</sup> *Class B*-Ionen.

## A.2. Biologische Wirkungen von Schwermetallen

Unter den *Class B*- und *Borderline*-Elementen und auch unter den anderen, die häufig zu den Schwermetallen gerechnet werden, sind viele, die als Spurenelemente wichtige biologische Funktionen haben. Essentiell sind für alle oder einige Organismen: Vanadium, Molybdän, Mangan, Eisen, Cobalt, Nickel, Kupfer, Zink, Selen (Marschner, 1995). Eisen wird benötigt für Enzyme in Redox-Systemen, als Bestandteil von Cytochromen, Ferredoxin, Hämoglobin, Leghämoglobin. Zink ist in Enzymen enthalten, z.B. Alkohol-Dehydrogenase, Kohlensäure-Anhydrase, Superoxid-Dismutase und in den DNA-bindenden Zinkfinger-Proteinen. Auch Kupfer ist Bestandteil vieler Enzyme wie Ascorbat-Oxidase, Superoxid-Dismutase. Mangan wird hauptsächlich als Kofaktor von Enzymen benötigt, z.B. im Photosystem II. Molybdän kommt in Enzymen der N<sub>2</sub>-Fixierung und der Nitratreduktion vor. Cobalt wird hauptsächlich in Form von Vitamin B<sub>12</sub> von Tieren und Bakterien gebraucht. Nickel ist Bestandteil der Urease.

Für Organismen ist es notwendig, nicht zu viel und nicht zu wenig der essentiellen Elemente aufzunehmen bzw. im Organismus reaktiv zu haben, denn in höheren Konzentrationen sind diese genauso giftig wie die nicht-essentiellen. Auch für Pflanzen gilt der Satz von Paracelsus: *dosis facit venenum*. Organismen müssen also eine Homöostase dieser Elemente bewerkstelligen. Davon wohl nicht grundsätzlich zu unterscheiden sind die Mechanismen, die Organismen entwickelt haben, um nicht-essentielle Elemente fernzuhalten oder unschädlich zu machen, besonders da für manche Elemente und viele Organismen die Essentialität noch ungeklärt ist.

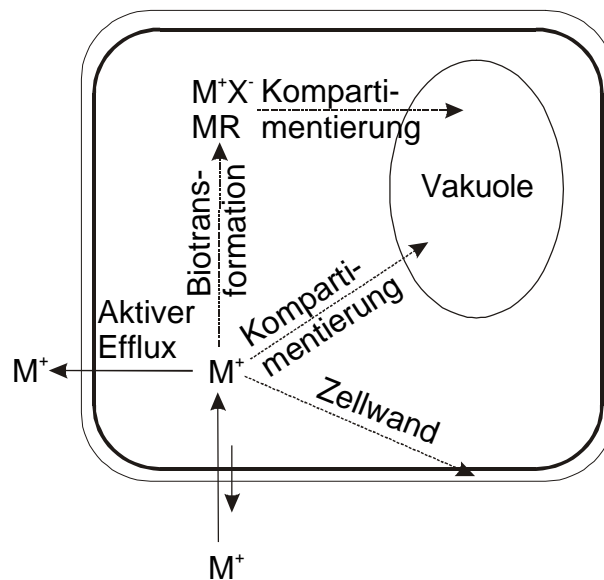
Die nicht-essentiellen Elemente (z.B. Cd, Pb, Hg, As, Sb, Sn, Cr) haben vielfältige toxische Wirkungen. Bei Pflanzen inhibieren sie beispielsweise das Wachstum; Wurzelwachstum wird daher gern als Test für die Toxizität dieser Elemente genommen (Köhl & Lösch, 1999). Andere makroskopische Effekte sind erniedrigte Photosynthese, Schäden am Wasserhaushalt, Chlorosen (Prasad, 1995; Ernst, 1996a). Biochemisch ist ihre Toxizität häufig in der Bindung an SH-Gruppen in Proteinen oder im Austausch gegen andere, essentielle Ionen begründet. Elemente wie Kupfer oder Eisen können in höheren Konzentrationen vor allem durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies toxisch wirken (Dietz et al., 1999). Auch genotoxische Effekte dürfen nicht übersehen werden (Steinkellner et al., 1998). Allerdings können diese Effekte sehr unterschiedlich sein bei verschiedenen Organismen und unter

verschiedenen physiologischen Bedingungen. Cadmium beispielsweise ist ein gut untersuchtes nicht-essentielles Schwermetall; die marine Kieselalge *Thalassiosira weissflogii* kann jedoch Cadmium statt Zink in die Kohlensäure-Anhydrase einbauen, wenn zu wenig Zink vorhanden ist. Unter diesen Umständen fördert Cadmium das Wachstum dieser Alge (Lane & Morel, 2000).

### A.3. Mechanismen für Toleranz und Homöostase gegenüber Schwermetallen

Die Homöostase -und Entgiftungsmechanismen der Organismen lassen sich in folgende Bereiche gliedern:

1. Selektive Aufnahme in den (vielzelligen) Organismus und selektiver Transport in verschiedene Teile des Organismus;
2. Selektive Aufnahme in die Zelle oder Abgabe in das Medium;
3. Biotransformation in organische Verbindungen oder Metall-Ligand-Komplexe;
4. Intrazelluläre Kompartimentierung.



**Abbildung 2:** Zelluläre Mechanismen der Entgiftung und Homöostase von Metallen (modifiziert nach Tomsett & Thurman 1988; Mehra & Winge, 1991). Aufgenommene Metall-Ionen ( $M^+$ ) können wieder aktiv aus der Zelle ausgeschleust werden; in der Vakuole oder in der Zellwand kompartimentiert werden; in kovalente Verbindungen ( $MR$ ) oder Komplexe ( $M^+X$ ) umgewandelt und dann in der Vakuole abgelagert werden.

Im weiteren werden die entsprechenden Mechanismen im wesentlichen anhand der Landgefäßpflanzen diskutiert werden; nur manchmal wird auf andere Organismengruppen Bezug genommen. Gerade bezüglich der Aufnahme von bestimmten Elementen aus dem Wasser oder dem Boden sind Pflanzen biogeochemisch besonders wichtig: „living plants can be compared to solar driven pumps that can extract and concentrate certain elements from their environment“ (Raskin et al., 1994).

Unter den Pflanzen in dieser Hinsicht herausragend sind die sogenannten Metall-Hyperakkumulatoren (Baker & Brooks, 1989). Als Hyperakkumulatoren werden Pflanzen definiert, die mehr als 1 mg/g Trockengewicht eines Metalls anreichern können (bei Mn und Zn mehr als 10 mg/g Trockengewicht). Diese Pflanzen wachsen zumeist auf humusarmen Böden, die ein oder mehrere Schwermetalle in hoher Konzentration enthalten, so daß sie auch häufig als Indikatoren für die entsprechenden Metalle dienen (de Plaen et al., 1982). Nur teilweise untersucht sind die kupfer- und cobalt-akkumulierenden Pflanzen (z.B. *Crotalaria cobalticola* oder *Haumaniastrum katangense*), die v.a. im Kupfergürtel des südlichen Zentralafrika (Sambia, DR Kongo) vorkommen. Während je etwa 25 kupfer- und cobalt-akkumulierende Pflanzen bekannt sind, kennt man etwa 150 nickel-akkumulierende Arten (z.B. aus den Brassicaceen-Gattungen *Alyssum* und *Thlaspi*), aber nur wenige chrom- oder blei-akkumulierende. Am längsten und besten bekannt sind Zink-Akkumulatoren, die mit Arten wie *Cardaminopsis halleri* und *Viola calaminaria* auch in Deutschland vorkommen (Ernst, 1974). Diese Pflanzen sind Bestandteile einer spezialisierten „Galmei-Flora“, die auf Abraumhalden historischer Bergbaugebiete siedelt. Neben den höheren Pflanzen sind auch die dort wachsenden Flechten des „Acarosporetum sinopicae“ besonders interessant (Lange & Ziegler, 1963).

Bei Landgefäßpflanzen erfolgt die Aufnahme in den Organismus im wesentlichen über die Wurzeln, zunächst dabei in den Apoplasten (Greger, 1999). Die Aufnahme in die Zelle (sei es in der Wurzel oder in einem anderen Teil der Pflanze) erfolgt durch spezifische Transportproteine, von denen einige mittlerweile bekannt sind (Williams et al., 2000). Besonders wichtig sind dabei die CPx-ATPasen (auch Schwermetall-P-Typ-ATPasen), die metallbindende Domänen aufweisen und Schwermetalle wie Kupfer, Zink oder Cadmium transportieren. Allerdings sind zumindest aus Pflanzen die genauen physiologischen Funktionen der einzelnen Proteine, die im wesentlichen anhand von Homologien gefunden wurden, noch unklar. Weitere Proteinfamilien, die bei der Schwermetallaufnahme eine Rolle

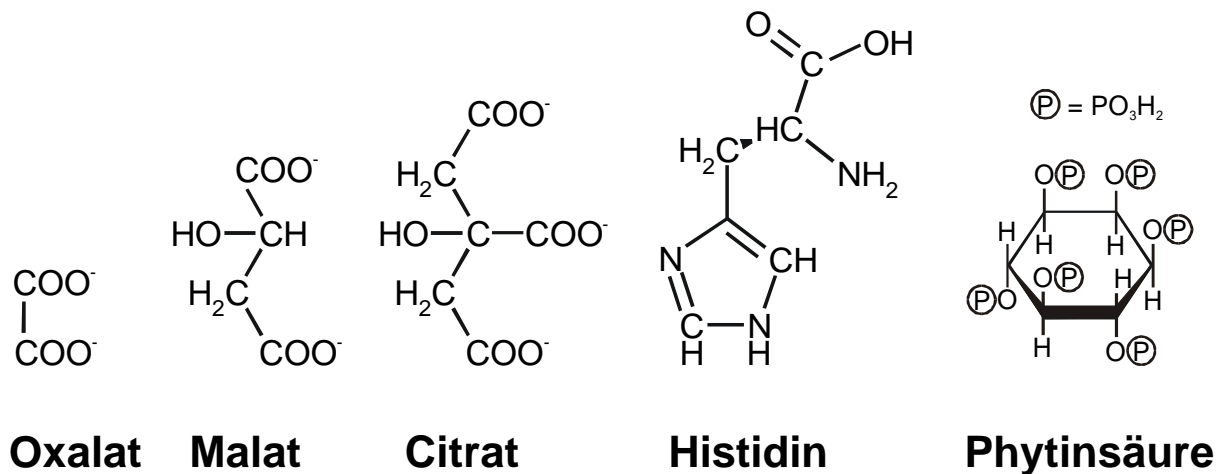
spielen sind die Nramp-Proteine und die CDF-Familie, zu der ein Zink-Transporter aus *Arabidopsis* gehört (ZAT; van der Zaal et al., 1999).

Die Mechanismen des Transports in der Pflanze (Translokation) sind nicht besonders gut erforscht. Für Nickel konnte gezeigt werden, daß es im Xylem-Strom von Nickel-Hyperakkumulatoren als Ni-Histidin-Komplex transportiert wird (Krämer et al., 1996), bei anderen Elementen sind weder die Transportform bekannt noch die Regulationsmechanismen für den Transport. Im wesentlichen empirische Untersuchungen zeigen, daß verschiedene Kulturlinien von Weizen oder Mais Cadmium und Kupfer in unterschiedlichem Ausmaß von der Wurzel in den Sproß und dabei v.a. ins Korn transportieren (Florijn & van Beusichem, 1993; Hart et al., 1998). Die teilweise hohe Konzentration von Cadmium im Korn ist eine der Hauptquellen für die menschliche Cadmium-Belastung. Der wesentliche Parameter beim Transport ist, in welchem Maße die Elemente von den unterirdischen Teilen (der Wurzel) in die oberirdischen (den Sproß) transportiert werden.

Biotransformation der Metalle und ihre Kompartimentierung gehören häufig zusammen. Ähnlich wie bei organischen Xenobiotica (Sandermann, 1994) folgt auf die chemische Umwandlung (Transformation) und Bindung an bestimmte Moleküle wie Glutathion (Konjugation) die Kompartimentierung, z.B. der Transport in die Vakuole. Die Biotransformation hat die Aufgabe, eine sehr reaktive Form (üblicherweise das Metall-Kation) in ein weniger reaktives Produkt umzuwandeln. Ein wichtiger Teil bei der Untersuchung von Metall-Entgiftungsmechanismen ist daher die Trennung und Charakterisierung der unterschiedlichen Formen oder „Spezies“ (Speziations-Analytik; z.B. Lobinski & Potin-Gautier, 1998; Welz, 1998). Nur bei wenigen Elementen spielt dabei die Bildung kovalenter Bindungen zwischen dem Metall und Kohlenstoffatomen eine Rolle. Besonders die Halbmetalle oder Metalloide Selen (Läuchli, 1993; Lobinski et al., 2000) und Arsen (Cullen & Reimer, 1989; Aposhian 1997) werden in organischen Verbindungen eingebaut, wobei zumindest einige der Reaktionen als Entgiftungsmechanismen angesehen werden können. Im speziellen Teil der Einleitung wird noch näher darauf eingegangen werden.

Wesentlich verbreiteter ist die Bildung von nichtkovalenten Bindungen zwischen dem Metall-Kation und einem oder mehreren ionisierten Atomen eines organischen Liganden. Wenn zwei oder mehr Atome eines Liganden das Metall binden, spricht man von einem Chelat-Komplex

(Jones, 1995). Dieser Begriff wurde abgeleitet vom griechischen  $\chi\eta\lambda\eta$ , was Krebschere bedeutet; die Liganden „zwicken“ sozusagen das Metall-Ion zwischen ihren Atomen ein.



**Abbildung 3:** Wichtige nicht-peptidische Liganden für Class B- und Borderline-Ionen in Pflanzen.

Zunächst sollen einige Liganden vorgestellt werden, die nicht aus Peptiden bestehen (Abbildung 3). Seit Mathys (1977) wurden organische Säuren immer wieder als Komplexboren für Zink, z.T. auch für Cadmium und Kupfer diskutiert. Insbesondere die erhöhte Konzentration von Malat in zink-toleranten Ökotypen von *Silene vulgaris*, *Festuca rubra* und anderen Arten wurden als Hinweis dafür genommen, daß Schwermetallresistenz zumindest zum Teil durch organische Säuren vermittelt wird (Godbold et al., 1984; Harmens et al., 1994; Harrington et al., 1996). Wang et al. (1991, 1992) zeigten mit Computersimulationen, daß in der Vakuole von Pflanzen Citrat wohl einen wesentlichen Anteil von Cadmium und Zink komplexiert, selbst wenn peptidische Liganden wie Phytochelatine vorhanden sind. Auch für Nickel scheinen organische Säuren wichtige Liganden zu sein. Ein Nickel-Citrat-Komplex wurde von Lee et al. (1977) identifiziert; im Latex-Saft des nickel-akkumulierenden Baums *Sebertia acuminata* konnte ein solcher Komplex nachgewiesen werden (Sagner et al., 1998). Auch die nickel-akkumulierende Brassicacee *Thlaspi goesingense* komplexiert Nickel in der Vakuole mit Citrat, allerdings ist etwa 70% des Nickels in der Zellwand gebunden (Krämer et al., 2000). Phytat (Myoinositol-Hexaphosphat) bildet Komplexe mit Zink, wie Gelfiltrationsexperimente (Collier, 1981) und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten (van Steveninck et al., 1992, 1993, 1994). Unter den freien Aminosäuren ist besonders Histidin wichtig; Histidin wird sehr stark in nickel-hyperakkumulierenden Pflanzen wie

*Alyssum lesbiacum* von Nickel induziert und komplexiert Nickel im Xylem-Saft, wie EXAFS-Studien zeigten (Krämer et al, 1996). Der Beweis, daß organische Säuren oder Aminosäuren für Schwermetall-Entgiftung und -Toleranz verantwortlich sind, ist jedoch offensichtlich schwer zu führen; ihre schon konstitutiv hohe Konzentration und ihre vielfältigen Aufgaben (man denke nur an den Citrat-Zyklus oder die Proteinbiosynthese) schränken die Möglichkeiten der experimentellen Manipulation, z.B. durch Generierung von Mutanten, ein.

#### A.4. Komplexierung durch cysteinreiche Peptide: Metallothioneine

Eine wichtige Gruppe von Liganden zur Metall-Entgiftung sind cysteinreiche Peptide und Proteine. Erstmals 1957 wurde ein entsprechendes Protein aus Pferdenieren isoliert und Metallothionein (MT) benannt (Margoshes & Vallee, 1957). Seither wurden homologe Proteine in vielen Tieren, Pilzen, eukaryotischen Mikroorganismen und einigen Prokaryoten gefunden (Hamer, 1986; Kägi, 1991). Auch in Pflanzen wurden viele für MT-ähnliche Proteine codierende DNA-Sequenzen und einige homologe Proteine beschrieben. Die Strukturen und Funktionen von Metallothioneinen wurden auf mehreren Konferenzen diskutiert (Kägi & Kojima, 1987; Suzuki et al., 1993; Klaassen, 1999; Bordin & Rodriguez,

##### Metallothioneine der Klasse I (MT-I)

```
(1) MDP NCSCAAGDSCCTCAGSCKCKECKCTSCKKSCCSCCPVGCACCAQGCICKGASD KCSCCA
(2) MDPQDCCTCAAGDSCSCAGSCKCKNCRQSCRKSCCSCCPASCSNCAKGCVCCKEPSSSKCSCCH
(3) MDP CECSKTGSCNCGGSCCKCSNCACTSCCKSCCPCPSDCSKCASGCVCKGKTC DTSCCQ
(4) PDP C C NDKCDCKEKECKTGCKCTSCKCPCPEQCSSGC KCANKEDCRKTCCKPCSCCP
(5) GDCCSGASSCNCGSGSCCSNCGSK
```

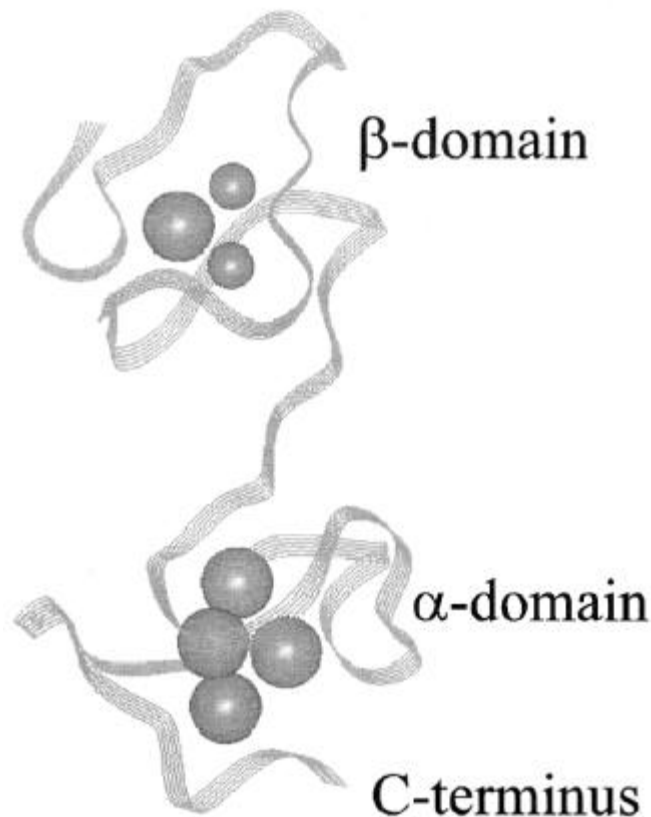
##### Metallothioneine der Klasse II (MT-II)

```
(6) MPDVKCVCCCKEGNECACTGQDCCTTIGKCKKDGTCCKGKSNAACKTCADGCTCGSGCSCTEGNCP
(7) VCKCDCKNQNSCNTGTKDCDSDAKCCEQYCCPTASEKKCKKSGCAGGCKCANCECAQAAH
(8) QNEGHECQCQCGSCKNNEQCQKSCSCPTGCNSDDKCPCKGNKSEETKKSCCSGK
(9) TSTTLVKCACEPCLCNVDPSKAIDRNGLYYCCCEACADGHTGGSKGCGHTGCNC
```

**Abbildung 4:** Aminosäure-Sequenzen einiger Formen von Metallothioneinen (nach Kägi, 1991). Die Sequenzen stammen aus (1) *Homo sapiens* (MT-2), (2) *Columba livia* (Haustaube) (MT-2), (3) *Oncorhynchus mykiss* (Regenbogenforelle) (tMT-B), (4) *Scylla serrata* (Krabbe; MT-2), (5) *Neurospora crassa*, (6) *Strongylocentrotus purpuratus* (Seeigel), (7) *Caenorhabditis elegans*, (8) *Saccharomyces cerevisiae*, (9) *Synechococcus* sp. (Cyanobakterium).

2000). Drei Hauptklassen von Metallothioneinen werden unterschieden (Fowler et al., 1987): MT-I haben eine hohe Homologie zu Säugetier-Metallothioneinen; MT-II haben ähnlich wie MT-I viele Cysteine, aber ihre Verteilung ist nicht homolog zueinander oder zu MT-I; MT-III ist eine der vielen Bezeichnungen für Phytochelatine (Abbildung 4).

MT-I-Proteine aus Säugetieren sind etwa 60 Aminosäuren lang, davon sind 20 Cysteine; die Cysteine sind als Cys-Cys, Cys-x-Cys oder Cys-xx-Cys angeordnet, wobei x für Aminosäuren außer Cys steht. An diese 20 Cysteine können bis zu sieben  $\text{Me}^{2+}$  gebunden werden, und zwar als Metall-Thiolat-Cluster in zwei Domänen: einem  $\text{Me}_3\text{Cys}_9$ -Cluster am Aminoterminus und einem  $\text{Me}_4\text{Cys}_{11}$ -Cluster am Carboxy-Terminus (Abbildung 5), die von einem Spacer von 2-4 Aminosäuren verbunden werden.



**Abbildung 5:** Strukturmodell von  $\text{Cd}_5\text{Zn}_2$ -MT2 aus Ratten basierend auf kristallographischen Daten (nach Öz et al., 1999). Oben dargestellt ist die N-terminale  $\beta$ -Domäne, unten die C-terminale  $\alpha$ -Domäne;  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen sind als große Kugeln,  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen als kleine Kugeln dargestellt.



Obwohl ursprünglich als cadmium-bindendes Protein isoliert, zeigte es sich, daß Metallothionein auch bei der Cu- und Zn-Homöostase eine bedeutende Rolle spielt; daneben legt die Induzierbarkeit durch andere Metallionen (Hg, Au, Ag, Co, Ni, Bi) und viele andere Faktoren (z.B. Hormone, Wachstumsfaktoren, Cytokine, Vitamine, Antibiotika, verschiedene Stressbedingungen) nahe, daß Metallothioneine nicht nur einfach Metalle binden und damit entgiften bzw. ihre Konzentration regulieren (Kägi, 1991). Die große Zahl von orthologen MT-Genen in Säugern und ihre spezifische Induktion deuten darauf hin, daß sie Bestandteil eines ausbalancierten regulatorischen Netzwerks sind; ihre Funktionen sind bis heute nur ansatzweise verstanden. In letzter Zeit konzentrierte sich die Forschung daher vor allem darauf, die verschiedenen Isoformen zu unterscheiden (Bordin et al., 1998; Chassaing & Lobinski, 1998).

Metallothioneine in höheren Pflanzen sind nach wie vor in ihrem Vorkommen und ihrer Funktion umstritten. Das einzige bisher isolierte Protein, das Ähnlichkeiten zu Metallothioneinen aufweist, ist das E<sub>c</sub>-Protein (Lane et al., 1987; Kawashima et al., 1992). Dieses „early Cys-labeled“ (E<sub>c</sub>) Protein wurde aus Weizen-Embryos gereinigt und kann Zn<sup>2+</sup> binden, aber auch Cd<sup>2+</sup>. Die Sequenz (Abbildung 6) weist es als Metallothionein aus, allerdings aufgrund der geringen Homologie zu Säuger-MTs als eines der Klasse II. Die Funktion dieses Proteins scheint in der Embryogenese zu liegen, da die Abundanz nach der Keimung sank; die mRNA wird induziert durch Abscisinsäure, nicht jedoch durch Zn<sup>2+</sup> (Reynolds & Crawford, 1996).

Gene, die für MT-ähnliche Proteine codieren, wurden hingegen mittlerweile in großer Zahl in Pflanzen gefunden. Das erste dieser Gene wurde aus einem kupfer-toleranten Ökotyp von *Mimulus guttatus* isoliert (de Miranda et al., 1990), auch aus *Arabidopsis* wurden entsprechende Gene kloniert (Zhou & Goldsbrough, 1995). Seither wurden mindestens 58 Gene in höheren Pflanzen beschrieben (Rauser, 1999). Die vorhergesagten Peptidsequenzen für diese Gene enthalten zwei Domänen, die von zumeist etwa 40 Aminosäuren getrennt sind; davon abweichend ist der Linker bei einigen Metallothioneinen aus Brassicaceen (*Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus*) nur 7 oder 19 Aminosäuren lang. Die Peptid-Sequenzen können anhand des Vorkommens von Cys-x-Cys bzw. Cys-xx-Cys-Motiven und der Zahl der Cysteine in den beiden Domänen in vier verschiedene Klassen unterteilt werden (Rauser, 1999). In Abbildung 6 sind die Konsensus-Sequenzen der vier Klassen dargestellt. Einige

weitere Gene für metallothionein-ähnliche Proteine, u.a. auch aus *Arabidopsis*, lassen sich keiner der vier Klassen zuordnen.

**Ec-Protein-Sequenz:**

xxCxxxCxCxxxCxxxxxCxC-----CxCxxxCxCxxCxC-----CxCxxxCxCxxCxxxx

**Vorausgesagte Peptid-Sequenzen pflanzlicher MT-Gene:**

xxxxCxCxxxCxCxxxCxC-----CxCxxxCxCxxCxCxx	Typ1
xxxxxCxCxxxCxCxxxCxC-----CxCxxxCxCxxCxxxCx	Typ1 (Brassicaceae)
xxCCxxxCxCxxxCxCxxxCx-----CxCxxxCxCxxCxCxx	Typ2
xxCCxxxCxCxxxCxCxxxCx-----CxCxxCxCxxxCxxCxCCxCx	Typ3
xxxxCxxCxCxxxxxC-----CxCxxxCxCxxCxCxx	Typ4

**Abbildung 6:** Protein-Sequenz des E<sub>c</sub>-Proteins aus Weizen bzw. Mais und Konsensus der vorhergesagten Peptid-Sequenzen der vier Haupttypen von Metallothionein-Genen in Höheren Pflanzen (nach Rauser, 1999). C steht für Cystein, x für eine beliebige Aminosäure, wobei ein nicht fett gedrucktes x einen Aminosäurerest andeutet, der nur in manchen der Sequenzen vorkommt. Die aminoterminal Domäne ist links dargestellt, die carboxyterminale rechts; die dazwischenliegende Linker-Region von variabler Länge ist mit --- angedeutet. Das E<sub>c</sub>-Protein hat einen ersten Linker von 12-14 Aminosäuren und einen zweiten von 15 Aminosäuren; Typ 1-MTs haben einen Linker von 39-45 Aminosäuren, Typ 1-MTs (Subtyp Brassicaceae) einen von 7 Aminosäuren; Typ 2-MTs einen von 35-43 (außer einer Sequenz aus *Brassica napus* mit nur 19 Aminosäuren); Typ 3-MTs einen von 37-40 Aminosäuren; Typ 4-MTs einen von 30-34 Aminosäuren.

Wenn man von dem oben erwähnten E<sub>c</sub>-Protein absieht, wurden die von den Metallothionein-Genen in Pflanzen codierten Proteine bisher nur in einem Fall gereinigt (Murphy et al., 1997). Die beiden aus *Arabidopsis thaliana* gereinigten Proteine hatten ein Molekulargewicht von 8 kD bzw. 4,5 kD und reagierten mit Antikörpern gegen ein Fusionsprotein aus GST (Glutathion-S-Transferase) und Metallothionein (genomische Sequenz aus *Arabidopsis*).

Partielle Aminosäure-Sequenzen stimmten mit den anhand der Gene vorhergesagten Sequenzen überein.

Welche Funktionen Metallothioneine in Pflanzen haben, ist nach wie vor unklar. Die mRNA-Transkripte wurden gefunden in Wurzeln, Sproß, Blättern, Blüten, Früchten und Samen; die Abundanz der Transkripte wurde erhöht durch Seneszenz (Buchanan-Wollaston, 1994; Coupe et al., 1995; Hsieh et al., 1995; Buchanan-Wollaston & Ainsworth, 1997) oder während der Fruchtreifung (Ledger & Gardner, 1994; Clendennen & May, 1997). Manche Gene wurden verstärkt exprimiert nach Zugabe von Cu, Zn oder Cd (Zhou & Goldsbrough, 1994, 1995; Hsieh et al., 1995; Choi et al., 1996), manche wurden durch das Metall nicht beeinflusst (Foley & Singh, 1994), manche wurden durch Cu, Zn oder Cd herunterreguliert (de Miranda et al., 1990; Kawashima et al., 1991; Hsieh et al., 1996). Die große Zahl von Faktoren, die laut Literatur einen Einfluß auf die Expression der MT-Gene in Pflanzen haben (Rauser, 1999), lassen insgesamt kein klares Bild erkennen; die Tatsache, daß viele, aber nicht alle der Gene durch Metalle reguliert zu werden scheinen, deutet darauf hin, daß die untersuchenden Wissenschaftler eher die Metallregulation testeten als andere Einflußfaktoren. Ob die Metallothioneine in Pflanzen Metalle binden, ist ebenfalls unklar. Rekonstituierte Komplexe aus Cu und MT wurden von Murphy et al. (1997) berichtet; aufgrund der Proteinreinigungsstrategie konnten keine nativen Komplexe isoliert werden. Die geringe Menge der Metallothioneine, die gereinigt werden konnten (0,0001 bis 0,0007 % des Gesamtproteins; Murphy et al., 1997) läßt jedoch darauf schließen, daß der Anteil der MTs an der Schwermetall-Entgiftung und -Homöostase eher gering ist. Heterologe Expression von pflanzlichen MT-Genen in Hefen und Cyanobakterien führte zu erhöhter Resistenz gegenüber Cu bzw. Zn (Zhou & Goldsbrough, 1994; Robinson et al., 1996).

In einer ausführlichen Studie an zehn verschiedenen Ökotypen von *Arabidopsis thaliana* konnten Murphy & Taiz (1995) zeigen, daß verschiedene Metallothionein-Gene unterschiedlich reguliert werden. Während das MT1-Gen konstitutiv exprimiert wurde, fand eine Induktion des MT2-Transkripts durch  $\text{Cu}^{2+}$  statt. Die unterschiedliche Toleranz der Ökotypen ließ sich gut mit der MT2-Transkription korrelieren. Auch andere Metalle ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ) und Hitzeschock induzierten die MT2-Transkription. Dies ist die bisher überzeugendste Untersuchung, die zeigen konnte, daß pflanzliche Metallothioneine tatsächlich mit der Homöostase und Entgiftung von Schwermetallen zu tun haben.

## A.5. Komplexierung durch cysteinreiche Peptide: Phytochelatine

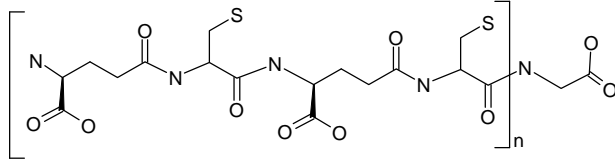
Beim Versuch, pflanzliche Metallothioneine zu reinigen, wurden Anfang der 80er Jahre Peptide teilweise gereinigt, die hauptsächlich aus Glutamat und Cystein bestanden (Bartolf et al., 1980; Rauser et al., 1983). Erst 1985 gelang es (Grill et al., 1985), cadmium-bindende Peptide aus Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina* zu reinigen und die Aminosäuresequenz zu bestimmen. Es zeigte sich, daß die Peptide aus alternierenden 2-11 Glu-Cys-Einheiten aufgebaut sind mit einem carboxyterminalen Gly (Abbildung 7); die Glutamat-Reste bilden mit ihrer  $\gamma$ -Carboxy-Gruppe die Peptidbindung mit Cystein, wie es vom Tripeptid Glutathion (GSH;  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) bekannt ist. Diese Peptide wurden „Phytochelatine“ benannt: „phyto“, weil sie aus Pflanzen isoliert wurden; „chelatin“, weil sie Chelat-Komplexe mit Metallen bilden (vom griechischen  $\chi\eta\lambda\eta$ , was Krebschere bedeutet). Kurz zuvor waren diese Peptide bereits aus der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* isoliert und „Cadystin“ bezeichnet worden (Kondo et al., 1983, 1984). Neben den Begriffen Phytochelatine und Cadystine werden in der Literatur noch andere für diese Peptid-Klasse benutzt:  $\gamma$ -Glutamyl-Cysteinyll-Peptide, cadmium-bindende Peptide und Metallothioneine Klasse III (Fowler et al., 1987). Obwohl die Zuordnung zu Pflanzen mittlerweile nicht mehr ganz eindeutig ist, ist doch der Begriff Phytochelatin der geeignetste, um die Peptide zu bezeichnen, und wird daher im folgenden ausschließlich verwendet werden; als Abkürzung wird häufig „PC“ dafür verwendet werden. In einer Anzahl von Reviews wurden die Phytochelatine in den letzten Jahren behandelt (Rauser 1990; Reddy & Prasad, 1990; Steffens, 1990; Rauser, 1995; Zenk, 1996; Rauser, 1999; Cobbett, 2000a, 2000b)

Phytochelatine konnten bisher in allen untersuchten höheren Pflanzen (Bryophyta, Pteridophyta und Spermatophyta) nachgewiesen werden (Grill et al., 1987; Gekeler et al., 1989); außerdem in photosynthetisierenden Protisten (Euglenophyta, Dinophyta, Haptophyta, Heterokontophyta, Chlorophyta, Rhodophyta), in Pilzen (Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes) und in Oomyceten (heterotrophe Heterokontophyta) (Kondo et al., 1984; Gekeler et al., 1988; Kneer et al., 1992; Kneer, 1993; Ahner et al., 1995; Miersch et al., 1997). Die meisten sonstigen heterotrophen Eukaryonten („Protozoa“, d.h. Microsporidia, Diplomonadina, Trichomonadina, Amoebaeflagellates, Myxomycota, Ciliata, Apicomplexa etc.) wurden bisher nicht untersucht, zumindest gibt es keine Hinweise in der Literatur dazu. Die einzige Eukaryontengruppe, bei der bisher ohne Erfolg nach Phytochelatinen gesucht

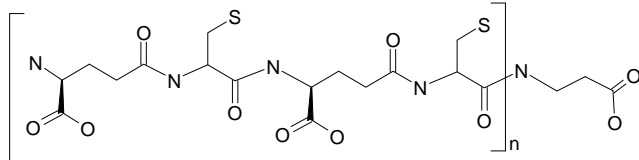
wurde, sind die vielzelligen Tiere (Metazoa; Gekeler, 1988). Bei den Prokaryoten gibt es Hinweise, daß zumindest manche Cyanobakterien Phytochelatine produzieren (Gekeler, 1988; Mallick et al., 1994; Mallick & Rai, 1998); die gebildeten Peptide wurden jedoch bisher nicht ausreichend charakterisiert, um eindeutig ihre Identität festzustellen.

Die Struktur der Phytochelatine ist im wesentlichen universal in den untersuchten Gruppen; allerdings gibt es neben den „klassischen“ Phytochelatinen mit der Struktur  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  noch zumindest fünf Familien von ähnlichen Peptiden, die sich nur durch die carboxyterminale Aminosäure unterscheiden; diese Peptid-Familien wurden iso-Phytochelatine benannt (Zenk, 1996; Abbildung 7). Aus einigen Fabaceen wurden die homo-Phytochelatine isoliert, die ein carboxyterminales  $\beta$ -Alanin enthalten (Grill et al., 1986). Aus Poaceen wurden hydroxymethyl-Phytochelatine nachgewiesen, die ein carboxyterminales Serin enthalten (Klapheck et al., 1994). Aus Mais wurde erstmals die iso-PC-Familie gereinigt, die ein carboxyterminales Glutamat enthält (Meuwly et al., 1995), während in Meerrettich (*Armoracia rusticana*) auch iso-PCs mit einem carboxyterminales Glutamin vorkamen (Kubota et al., 2000). Die letzte Familie schließlich sind die desglycin-Phytochelatine, die die carboxyterminale Aminosäuren vermissen lassen ( $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$ ); obwohl erstmals aus Mais isoliert (Bernhard & Kägi, 1987), sind diese Peptide doch sicher weiter verbreitet und wurden bisher nur häufig als kleinere Verunreinigungen übersehen. Die Struktur der Phytochelatine und iso-Phytochelatine wurde in jüngerer Zeit meist mittels Massenspektrometrie (Isobe et al., 1990; Kneer et al., 1992; Leopold et al., 1998; Vacchina et al., 1999, 2000) oder NMR (Yoshimura et al., 2000) aufgeklärt.

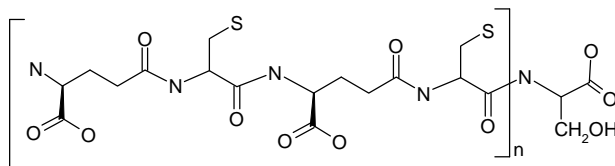
Obwohl ursprünglich als cadmium-bindende Peptide beschrieben (Kondo et al., 1983; Grill et al., 1985), wurden Phytochelatine von einer breiten Palette von Elementen induziert. Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina* produzierten Phytochelatine nach Zugabe von  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sb}^{3+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{HAsO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{SeO}_3^{2-}$ ,  $\text{Au}^+$ ,  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Te}^{4+}$ ,  $\text{W}^{6+}$  (Grill et al., 1987). In anderen Organismen (Zellkultur von *Rosa canina*, Wurzelkulturen von *Rubia tinctorum*) induzierten auch  $\text{AsO}_2^-$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{In}^{3+}$  (Grill, 1987; Maitani et al., 1996). Keine Phytochelatin-Induktion bewirkten hingegen Ionen der Alkali- und Erdalkaligruppe,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{MoO}_4^-$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{U}^{4+}$ ,  $\text{V}^{3+}$ . Das bedeutet, daß im wesentlichen alle getesteten *Class B*-Ionen und die meisten *Borderline*-Ionen Phytochelatine induzieren (s. Abbildung 1). Allerdings ließ sich die Induktion durch  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Te}^{4+}$ ,  $\text{W}^{6+}$ ,  $\text{SeO}_3^{2-}$  nicht reproduzieren (Zenk, 1996).



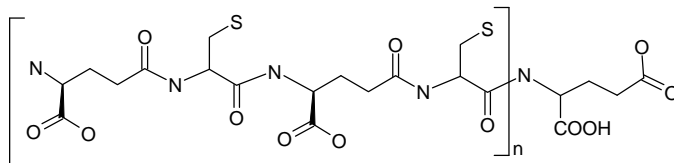
**Phytochelatin**



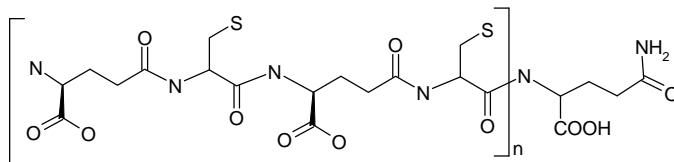
**Homophytochelatin oder iso-Phytochelatin (β-Ala)**



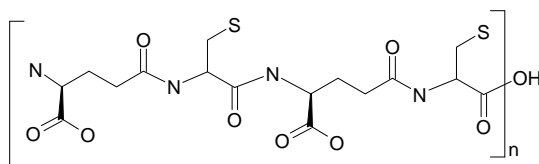
**Hydroxymethyl-Phytochelatin oder iso-Phytochelatin (Ser)**



**iso-Phytochelatin (Glu)**



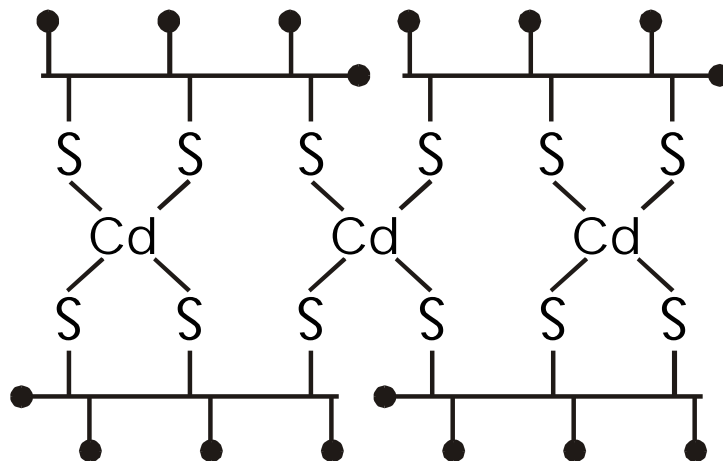
**iso-Phytochelatin (Gln)**



**desglycin-Phytochelatin**

**Abbildung 7:** Chemische Struktur der Phytochelatine und iso-Phytochelatine. Die grundsätzliche Struktur ist  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-X}$ , wobei  $n=2-11$ . Die Peptidfamilien unterscheiden sich nur durch die carboxyterminale Aminosäure X: Phytochelatine i.e.S. haben ein Glycin, iso-PCs ( $\beta\text{-Ala}$ ) ein  $\beta\text{-Alanin}$ , iso-PCs (Ser) ein Serin, iso-PCs (Glu) ein Glutamat, iso-PCs (Gln) ein Glutamin am Carboxyterminus; den desglycin-Phytochelatinen fehlt die carboxyterminale Aminosäure.

Phytochelatine bilden Komplexe mit den sie induzierenden Metallionen. Insbesondere der Komplex mit Cadmium ist gut untersucht. Der erste Hinweis auf die Existenz eines Komplexes ist zumeist eine Gelfiltration (Grill et al., 1985). Dabei erhielt man für die Komplexe Massen von 2,5 bzw. 3,6 kDa (Grill, 1989). In vielen Fällen ließen sich drei verschiedene Komplexe zeigen (Plocke & Kägi, 1992; Kneer & Zenk, 1997). Der LMW (low molecular weight complex) bestand hauptsächlich aus PC<sub>3</sub> bei einer Stöchiometrie SH:Cd von 3:1; der MMW (medium molecular weight complex) hauptsächlich aus PC<sub>4</sub> und längeren PCs bei einer Stöchiometrie SH:Cd von 2,4:1; der HMW (high molecular weight complex) hauptsächlich aus PC<sub>4</sub> und längeren PCs bei einer Stöchiometrie SH:Cd von 1,5:1, wobei dieser auch Sulfid enthielt (s. unten). Allerdings enthalten die Komplexe wohl immer eine Mischung von Phytochelatinen verschiedener Längen, wobei die Bindungsstärke mit zunehmender Phytochelatin-Länge zunimmt. Nach einer mehrstufigen Reinigung (Grill et al., 1991) ließen sich die Komplexe spektroskopisch charakterisieren. Sowohl die ausgeprägte UV-Absorption (im Bereich von 250-280 nm) als auch die CD-Spektroskopie (circular dichroism) sprachen für eine Cd-Thiolat-Bindung, wie aus Metallothioneinen bekannt (Grill et al., 1985; Grill, 1989). Mittels NMR ließen sich die Komplexe nicht untersuchen (Zenk, 1996), daher wurde die Struktur durch EXAFS-Spektroskopie (extended X-ray absorption fine structure) bestimmt (Strasdeit et al., 1991). Es ließ sich auch hier zeigen, daß das Cadmium tetraedrisch von vier Schwefel-Atomen koordiniert wird mit einer durchschnittlichen



**Abbildung 8:** Strukturmodell eines Cadmium-Phytochelatin-Komplexes [Cd<sub>3</sub>(PC<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]. Darin ist jedes Cd von vier S tetraedrisch koordiniert. Carboxylat-Gruppen sind als schwarze Kreise dargestellt (nach Strasdeit et al., 1991).

Bindungslänge von  $252 \pm 2$  pm. In Übereinstimmung mit den in der Gelfiltration gefundenen Massen wurde ein Strukturmodell eines Komplexes aus vier PC<sub>3</sub>-Molekülen und drei Cd<sup>2+</sup>-Ionen vorgeschlagen (Abbildung 8). Dieses Modell wurde durch Pickering et al. (1999) im wesentlichen bestätigt; Röntgen-Absorptionsspektroskopie und EXAFS-Spektroskopie ließen jedoch auch die Interpretation zu, daß Cd-Cd-Cluster und Cd-O-Bindungen in geringerem Maße an der Struktur beteiligt sind.

Komplexe anderer Elemente mit Phytochelatinen sind bisher nicht besonders gut untersucht, worauf auch in Reviews immer wieder hingewiesen wurde (Rauser, 1995, 1999; Cobbett, 2000a). Grill (1989) konnte Komplexe mit Cu<sup>+</sup>, Zn<sup>2+</sup> und Pb<sup>2+</sup> aus pflanzlichen Zellkulturen reinigen; außer der Stöchiometrie SH-Gruppe zu Metallion wurde jedoch keine Charakterisierung beschrieben. Mit Cu<sup>+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Pb<sup>2+</sup> und Hg<sup>2+</sup> gelang eine Rekonstitution von Phytochelatin-Komplexen (Mehra & Winge, 1988; Mehra & Mulchandani, 1995; Mehra et al., 1995, 1996a, 1996b). UV-Spektroskopie und CD-Spektroskopie zeigten, daß diese Komplexe denen mit Cd ähneln, d.h. es traten Absorptionsmaxima ähnlich denen in Cd-PC-Komplexen auf. Daraus wurde auf eine Metall-Thiolat-Koordination geschlossen. Allerdings unterschieden sich die abgeleiteten Strukturen in der Stöchiometrie SH:Metall. PC<sub>4</sub> konnte bis zu 2,5 Hg<sup>2+</sup> oder Cu<sup>+</sup> (Stöchiometrie 1,6:1) oder bis zu 4 Ag<sup>+</sup> (Stöchiometrie 1:1) binden; allein mit Pb<sup>2+</sup> ergab sich eine Stöchiometrie von 2:1 wie häufig beim Cadmium. Die Reinigung von Komplexen, die *in vivo* entstanden sind, wurde jedoch sonst nicht beschrieben. Eine Arbeitsgruppe behauptete sogar, daß nur Phytochelatin-Komplexe mit Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> und Ag<sup>+</sup>, vielleicht mit Fe<sup>2+</sup> existieren (s. auch Jackson et al., 1992); sie konnten mittels Gelfiltration mit direkt gekoppelter ICP (SEC-ICP) keine Komplexe mit As<sup>3+</sup>, Pb<sup>2+</sup> oder Zn<sup>2+</sup> nachweisen (Maitani et al., 1996). Auch Leopold et al. (1998) konnten mit einer ähnlichen Technik keinen Pb-PC-Komplex zeigen. Aufgrund der angewandten Technik konnten Maitani et al. (1996) Hg-PC-Komplexe nicht untersuchen.

Bisher nicht erwähnt wurde die Bedeutung von Sulfid für Phytochelatin-Cadmium-Komplexe. Zuerst in *Schizosaccharomyces pombe* als Bestandteil von Cd-Phytochelatin-Komplexen entdeckt (Murasugi et al., 1983), ist Sulfid ein wichtiger Bestandteil der HMW-Komplexe. In Hefen (*Schizosaccharomyces pombe* und *Candida glabrata*) entstehen dabei CdS-Kristallite von 1,8 - 2 nm Durchmesser, die etwa 85 CdS-Einheiten enthalten, von etwa 30 PC<sub>2</sub> umgeben (Dameron et al., 1989). Auch in Pflanzen (*Brassica juncea*, Tomate, *Rauvolfia serpentina*, *Silene vulgaris*) wurde Sulfid in den HMW-Komplexen gefunden (Reese et al., 1992; Speiser

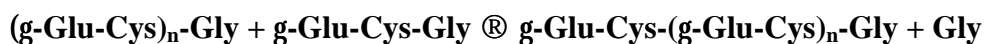
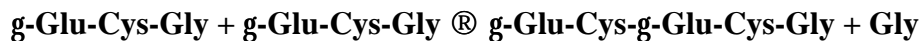


et al., 1992a; Kneer & Zenk, 1997). Das Sulfid stabilisiert die Komplexe und führt dazu, daß weniger Peptid pro Cadmium gebraucht wird (Reese & Winge, 1988; Kneer & Zenk, 1997). Die Biosynthese des Sulfids in diesen Komplexen ist bisher nur unzureichend bekannt. Im wesentlichen scheinen, zumindest in *Schizosaccharomyces pombe*, Enzyme des Purin-Biosynthese-Wegs daran beteiligt zu sein (Speiser et al., 1992b; Juang et al., 1993; s. auch Abbildung 12).

Die Kompartimentierung innerhalb der Zelle spielt eine eminente Rolle bei der Homöostase und Entgiftung von Metallen. Dabei gilt besonders die Vakuole als zentrales Entsorgungskompartiment. Häufig unterschätzt wird die Bedeutung der Zellwand, da sie herkömmlichen Untersuchungsmethoden nur schwer zugänglich ist. Blei beispielsweise wird in so starkem Maße an Zellwandbestandteile gebunden, daß Komplexe aus Blei und Rhamnogalakturonan-II (einem Abbauprodukt der Zellwand) sogar im Wein noch die hauptsächliche Blei-Spezies darstellen (Pellerin & O'Neill, 1998; Szpunar et al., 1998). Auch Nickel ist im Nickel-Hyperakkumulator *Thlaspi goesingense* zu etwa 70% an die Zellwand gebunden (Krämer et al., 2000). Zumindest die Cd-Phytochelatin-Komplexe finden sich in der Vakuole, für andere phytochelatin-induzierende Elemente ist darüber nichts bekannt. Gereinigte Vakuolen aus Tabakblättern enthielten praktisch die gesamte Menge an Cadmium und Phytochelatinen (Vögeli-Lange & Wagner, 1990). Auch mit analytischer Elektronenmikroskopie wurde gezeigt, daß Cd-haltige Präzipitate in Vakuolen wohl Cd-Phytochelatin-Komplexe sind (Lichtenberger & Neumann, 1997). Andererseits spielen in der sauren Vakuole auch andere Liganden eine Rolle; zumindest in Computersimulationen ist der Citrat-Cd-Komplex bei vakuolärem pH vorherrschend (Wang et al., 1991; Johanning & Strasdeit, 1998). Aus *Schizosaccharomyces pombe* wurde ein Protein charakterisiert, das Phytochelatine oder Phytochelatin-Cadmium-Komplexe aus dem Cytosol in die Vakuole transportiert (Ortiz et al., 1992, 1995). Dieses Protein (HMT1) gehört zur Familie der ABC-Transporter (ATP-binding cassete), die eine der größten Proteinfamilien überhaupt ist (Rea et al., 1998). Das Modell von Ortiz et al. (1995) ist als Teil der Abbildung 12 dargestellt. Dabei werden die Phytochelatine im Cytosol produziert und bilden mit  $\text{Cd}^{2+}$  den cytosolischen LMW-Komplex; der Komplex wird von HMT1 unter ATP-Verbrauch in die Vakuole transportiert, wo er mit Sulfid und weiterem  $\text{Cd}^{2+}$  den HMW-Komplex bildet. Auch in Hafer-Wurzeln konnte ein ähnlicher Transportvorgang gezeigt werden; die Charakteristika des Transportes lassen ebenfalls auf ein Protein der ABC-Transporter-Familie schließen (Salt & Rauser, 1995).

## A.6. Phytochelatin-Synthase: Protein und Gen

Bisher wurde nur davon gesprochen, daß Phytochelatine gebildet werden, daß sie Metalle komplexieren und in die Vakuole transportiert werden. Wie jedoch werden sie gebildet? Ihre Struktur gab den ersten Hinweis darauf (Grill et al., 1985). Die Existenz einer Peptidbindung zwischen der  $\gamma$ -Carboxygruppe des Glutamats und der Aminogruppe des Cysteins schloß eine Biosynthese an Ribosomen aus; hingegen wies die Ähnlichkeit mit dem Tripeptid Glutathion ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) in die richtige Richtung. Im Prinzip ist Glutathion (GSH) das kürzeste Phytochelatin, „PC<sub>1</sub>“. Es zeigte sich in der Tat, daß Phytochelatine enzymatisch aus der Vorstufe Glutathion synthetisiert werden. Das verantwortliche Enzym wurde aus Zellkulturen von *Silene vulgaris* gereinigt und charakterisiert (Grill et al., 1989). Es wurde Phytochelatin-Synthase (systematischer Name  $\gamma$ -Glutamylcystein-Dipeptidyl-Transpeptidase; EC 2.3.2.15) benannt. Es katalysiert die in Abbildung 9 dargestellte Reaktionen, nämlich die Übertragung einer  $\gamma$ -Glu-Cys-Einheit auf ein Glutathion ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) oder ein bereits vorhandenes Phytochelatin (( $\gamma$ -Glu-Cys)<sub>n</sub>Gly). Sowohl *in vivo* als auch in Enzymansätzen konnte gezeigt werden, daß die längeren Phytochelatine mit einer gewissen Verzögerung nach den kürzeren, d.h. aus den kürzeren gebildet werden.



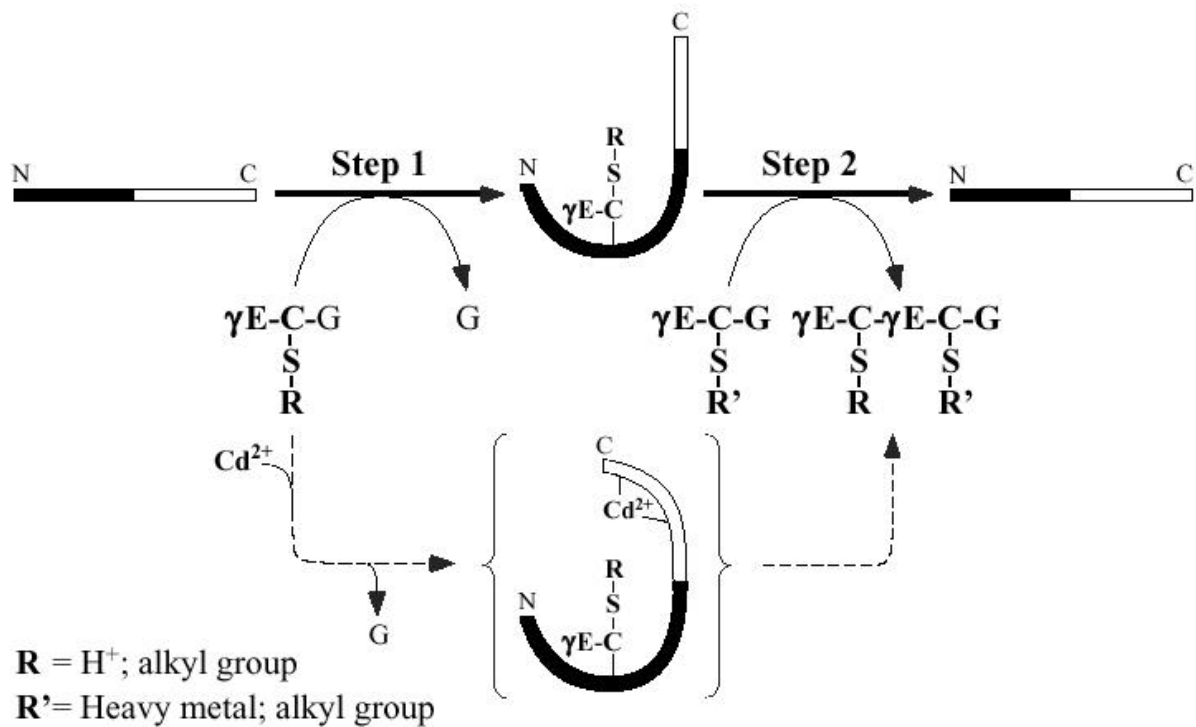
**Abbildung 9:** Die von der Phytochelatin-Synthase (systematischer Name  $\gamma$ -Glutamylcystein-Dipeptidyl-Transpeptidase; EC 2.3.2.15) katalysierten Reaktionen. Rein mechanistisch handelt es sich dabei um eine Polykondensation von Glutathion unter Freisetzung von Glycin.

Die PC-Synthase benötigte Cd<sup>2+</sup> (oder andere Schwermetallionen, die auch *in vivo* Phytochelatine induzieren), um die Reaktion durchzuführen; die gebildeten Phytochelatine komplexierten das aktivierende Cd<sup>2+</sup> und stoppten die Reaktion damit (Löffler et al., 1989). Die Masse des aktiven Enzyms wurde mit Gelfiltration auf 50 kDa bzw. 95 kDa bestimmt, wobei das 95 kDa-Protein als Homodimer aus zwei 50 kDa-Untereinheiten interpretiert wurde; die optimale Aktivität war bei pH 7.9 (Grill et al., 1989). Das konstitutive Enzym konnte auch in anderen Pflanzen, z.B. Tomaten und in der Spaltheife *Schizosaccharomyces*

*pombe* nachgewiesen werden (Hayashi et al., 1991; Chen et al., 1997). Allerdings konnte für *Schizosaccharomyces* ein alternativer Biosyntheseweg aufgezeigt werden: Polymerisierung von  $\gamma$ -Glu-Cys-Einheiten mit anschließender Addition des Gly. Die Biosynthese der iso-Phytochelatine ist noch nicht völlig geklärt; während Enzymextrakte aus *Pisum sativum* auch die Ser- und  $\beta$ -Ala-Derivate aus den entsprechenden Glutathion-Derivaten synthetisieren konnten (Klapheck et al., 1995), ist über die Glu- und Gln-Derivate noch nichts bekannt. Die desgly-Phytochelatine entstehen wohl (außer in *Schizosaccharomyces*) als Abbauprodukte von Phytochelatinen (Klapheck et al., 1994). Die Produktion von Phytochelatinen verbraucht Glutathion und damit die Aminosäuren Glu, Cys und Gly. Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina* vervierfachen beispielsweise ihren  $\gamma$ -Glu-Cys-Pool, wenn sie drei Tage mit 100  $\mu$ M  $\text{Cd}^{2+}$  belastet wurden (Grill et al., 1987); dabei sank die Glutathion-Konzentration zeitweise stark ab.

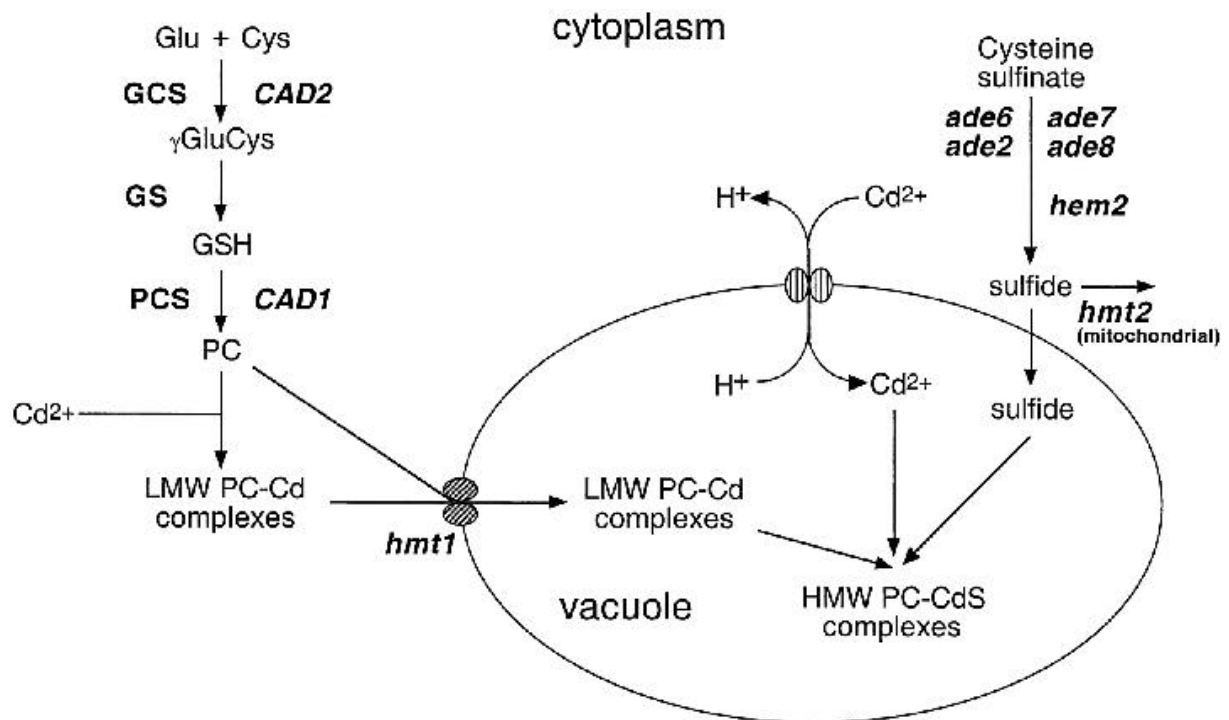
Es gelang nicht, die Phytochelatinsynthase soweit zu reinigen, daß die Aminosäuresequenz bestimmt werden konnte. Hingegen wurden Mutanten aus *Schizosaccharomyces pombe* und *Arabidopsis thaliana* gescreent, die keine Phytochelatinsynthase-Aktivität mehr zeigten (Mutoh & Hayashi, 1988; Howden & Cobbett, 1992; Howden et al., 1995). Praktisch gleichzeitig publizierten 1999 drei Forschergruppen dann die Isolierung des Phytochelatinsynthase-Gens aus *Arabidopsis*, Weizen und *Schizosaccharomyces* (Clemens et al., 1999; Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999). Die Gene in allen drei Organismen codierten für ein Protein, das zu bekannten Sequenzen keine Homologie aufwies. Untereinander allerdings waren sie homolog; das *Arabidopsis*-Protein (AtPCS1) wies 33 % Identität und 48 % Ähnlichkeit zum *Schizosaccharomyces*-Protein (SpPCS1) auf. Insbesondere der N-Terminus ist konserviert (Abbildung 10), während der C-Terminus eher variabel ist; auffällig ist die Konservierung der Cystein-Reste im N-Terminus und die hohe Zahl auch vicinaler Cystein-Reste im C-Terminus. Überraschend war, daß bei einer Datenbanksuche eine homologe Sequenz aus dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* gefunden wurde (32 % Identität, 45 % Ähnlichkeit); auch in anderen Tieren gibt es Hinweise auf das Vorkommen homologer Gene (Ha et al., 1999; Cobbett, 2000a). Die pflanzlichen Proteine (AtPCS1 und TaPCS1 aus *Triticum aestivum*) sind 485 bzw. 500 Aminosäuren lang, und damit 55 kDa schwer.





**Abbildung 11:** Modell der PCS-Reaktion (modifiziert nach Vatamaniuk et al., 2000). Der konservierte N-Terminus der PC-Synthase ist schwarz, der C-Terminus weiß dargestellt. In einem ersten Schritt wird Gly von einem (substituierten oder unsubstituierten) Glutathion abgespalten und das entstehende  $\gamma$ -Glu-Cys an das Enzym gebunden. Im zweiten Schritt wird das  $\gamma$ -Glu-Cys auf ein vorhandenes  $(\gamma$ -Glu-Cys) $_n$ Gly übertragen, um  $(\gamma$ -Glu-Cys) $_{n+1}$ Gly zu ergeben. In einem alternativen Weg (gestrichelte Pfeile) bindet  $Cd^{2+}$  an das Enzym und beschleunigt damit die Katalyse. In diesem Modell wird angenommen, daß die Substratbindestelle in der konservierten N-terminalen Hälfte liegt, die Bindestelle für das beschleunigende  $Cd^{2+}$  hingegen in der wenig konservierten C-terminalen Hälfte liegt.

Cadmium (oder anderen Schwermetallen) einen Komplex (LMW-Komplex). Dieser wird in die Vakuole transportiert und bildet mit dem cytosolisch gebildeten und ebenfalls in die Vakuole transportierten Sulfid den HMW-Komplex, der im sauren pH der Vakuole stabiler ist. Die in dem Modell dargestellten Reaktionen sind allerdings eine Zusammenstellung aus Mechanismen, die aus Pflanzen und solchen, die aus Hefen bekannt sind. Inwieweit alle Schritte in beiden Gruppen in gleicher oder ähnlicher Weise verwirklicht sind, ist noch ungeklärt.



**Abbildung 12:** Wege der Cd-Entgiftung in Pflanzen und Hefen (nach Cobbett, 2000b). Die Abbildung ist zusammengesetzt aus Funktionen aus verschiedenen Organismen. Enzym-Abkürzungen sind fett gedruckt, Gene fett-kursiv. GCS,  $\gamma$ -Glu-Cys-Synthetase; GS, Glutathion-Synthetase; PCS, Phytochelatin-Synthase. *CAD1* und *CAD2* sind Gene aus *Arabidopsis*; *hmt1*, *hmt2*, *ade2*, *ade6*, *ade7* und *ade8* aus *Schizosaccharomyces*; *hem2* aus *Candida glabrata*.

Wie die Abbildung 12 zeigt, sind viele Aspekte bei der Entgiftung von Schwermetallen durch Phytochelatine mittlerweile geklärt, einige bleiben noch ungelöst. Die Funktion ist die Entgiftung von Schwermetallen, besonders Cadmium, das ist unumstritten. Auf zellulärer Ebene konnte nicht nur gezeigt werden, daß bis zu 97 % des löslichen Cadmiums an Phytochelatine gebunden waren, sondern auch daß metall-sensitive Enzyme Cadmium in 10facher bis 1000facher Konzentration tolerierten, wenn es an Phytochelatine gebunden war (Kneer & Zenk 1992). Der beste Beweis, daß die Phytochelatine der zentrale Schwermetallentgiftungsmechanismus bei Pflanzen sind, kommt aus der Analyse von Mutanten. *Arabidopsis*-Mutanten, die keine Phytochelatine produzierten (*cad1*), konnten schon auf  $0,6 \mu\text{M Cd}^{2+}$  nicht mehr wachsen, eine Konzentration, die dem Wildtyp überhaupt nicht schadete (Howden et al., 1995). Die heterologe Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* mit dem Phytochelatin-Synthase-Gen aus *Arabidopsis* führte zu einer erhöhten Toleranz nicht nur gegen  $\text{Cd}^{2+}$ , sondern auch  $\text{Cu}^{2+}$ , Arsenat, Arsenit und  $\text{Hg}^{2+}$  (Vatamaniuk et

al., 1999). Von höheren Pflanzen oder Algen, die nicht im Labor, sondern in der Natur erhöhter Schwermetallkonzentration ausgesetzt waren, konnte ebenfalls gezeigt werden, daß sie darauf mit Phytochelatin-Produktion reagierten (Grill et al., 1988b; Ahner et al., 1994, 1997; Ahner & Morel, 1995). Andererseits scheint der Unterschied in der Metalltoleranz verschiedener Ökotypen von *Silene vulgaris* oder *Arabidopsis thaliana* nicht auf unterschiedlich starke Phytochelatin-Bildung zurückzuführen sein, sondern von anderen Faktoren abzuhängen (Schat & Kalff, 1992; Harmens et al., 1993; de Knecht et al., 1994; Murphy & Taiz, 1995). Phytochelatine sind also eher eine schnelle konstitutive Entgiftungsmethode, die ubiquitär ist; die speziellen Mechanismen, die besonders schwermetalltolerante Pflanzen und Hyperakkumulatoren entwickelt haben, sind davon verschieden.

Etwas vernachlässigt wurde die Suche nach anderen Funktionen der Phytochelatine. Von der Entgiftungsfunktion nicht völlig zu trennen ist die Funktion in der Homöostase von (essentiellen) Schwermetallen. Phytochelatine werden auch gebildet als Reaktion auf  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  und sind ein zellulärer Zwischenspeicher für diese Ionen (Grill et al., 1988a). Enzyme, die Metalle als Cofaktoren brauchen, konnten durch Phytochelatin-Komplexe mit  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  reaktiviert werden (Thumann et al., 1991). Die Homöostase der essentiellen Elemente Kupfer und Zink scheint eine hochregulierte Angelegenheit zu sein, wie sich erst in letzter Zeit herausstellte; um Enzyme mit diesen Ionen zu versorgen in einer Zelle, die im Schnitt nur ein freies  $\text{Cu}^{2+}$ -Ion enthält (Rae et al., 1999), werden spezielle Proteine (Metallochaperone; O'Halloran & Culotta, 2000) diskutiert. Noch wenig untersucht ist die Wechselwirkung mit der Phytochelatinvorstufe Glutathion. Glutathion hat vielfältige Funktionen im Organismus, darunter Schutz gegen oxidativen Stress und Entgiftung von Xenobiotika (de Kok & Stulen, 1993; Lamoureux & Rusness, 1993). Die Produktion von Phytochelatinen führt zu einer Abnahme des Glutathions (Grill et al., 1987) und damit auch zu oxidativem Stress (de Vos et al., 1992). Ob andererseits Phytochelatine auch Glutathion-Funktionen übernehmen können, ist bisher unbekannt.

## A.8. Steckbriefe der wichtigsten verwendeten Elemente Arsen, Selen, Blei

### A.8.1. Arsen

Arsen steht in der Erdkruste an Rangstelle 20 bezüglich der Häufigkeit (Cullen & Reimer, 1989). Hauptsächliche Quellen für den anthropogenen Eintrag von Arsen in die Biosphäre sind Metallverhüttung und Verbrennungsvorgänge; etwa 12000 bis 26000 Tonnen Arsen werden jährlich allein in die Atmosphäre abgegeben (Nriagu & Pacyna, 1988; Ochiai, 1995). Braunkohle kann bis zu 2,2 g/kg Arsen enthalten (Tritschler et al., 1998; Finkelman, 1999). Die für den Menschen derzeit bedrohlichste Quelle für Arsen ist jedoch das Trinkwasser: Grundwasserverseuchung aus natürlichen, geologischen Quellen ist in manchen Gegenden, speziell in Bangladesh und im angrenzenden indischen Teil von Bengalen, ein ernstes Gesundheitsrisiko (Dhar et al., 1997; Kaiser, 1998). Über die Hälfte der Bevölkerung in den betroffenen Gebieten zeigte arsen-bedingte Hautschäden. In einer ausführlichen Studie in Taiwan konnte eine Korrelation zwischen der chronischen Arsen-Belastung aus Trinkwasser und Krankheiten wie Hautkrebs und Blackfoot-Disease gezeigt werden (Tseng et al., 1968). Aufgrund dieser und anderer Studien wurde ein vorläufiger Grenzwert für Arsen im Trinkwasser von 10 µg/L (entspricht 0,13 µM) vorgeschlagen (Buchet & Lison, 2000), der allerdings in Bangladesh z.T. um das 1000fache überschritten wird (Karim, 2000).

Im Gegensatz zum stark metallischen Charakter klassischer Schwermetalle wie Cd, Pb oder Hg ist das Arsen ein Halbmetall oder Metalloid (Wiberg, 1985); es kann in anorganischen Verbindungen als (metallisches) Kation auftreten, z.B. in Auripigment ( $\text{As}_2\text{S}_3$ ), oder als (nichtmetallisches) Anion, z.B. als  $\text{Na}_3\text{As}$  oder Arsenwasserstoff ( $\text{AsH}_3$ ). In wässriger Lösung liegt Arsen zumeist als Arsenit ( $\text{As}^{\text{III}}$ ; in basischer Lösung als  $\text{As}(\text{OH})_3$ ) oder Arsenat ( $\text{As}^{\text{V}}$ ; in basischer Lösung als  $\text{AsO}_4^{3-}$ ) vor.

$\text{As}_2\text{O}_3$  (Arsenik) ist das klassische Gift zum Töten von Ratten, aber auch Menschen. Im 18. und 19. Jahrhundert verdiente es sich den Namen „poudre de succession“ (Erbpulver). Es gibt auch immer wieder Berichte, daß die hohen Arsen-Konzentrationen in den Haaren von Napoleon Bonaparte auf eine schleichende, vorsätzliche Vergiftung mit Arsen schließen lassen (Forshufvud et al., 1961; Weider & Fournier, 1999). Bekannt ist auch das Theaterstück „Arsen und Spitzenhäubchen“, das mit Cary Grant verfilmt wurde. Andererseits sind die steirischen Arsenik-Esser berühmt, die nicht unbeträchtliche Mengen von Arsen ohne



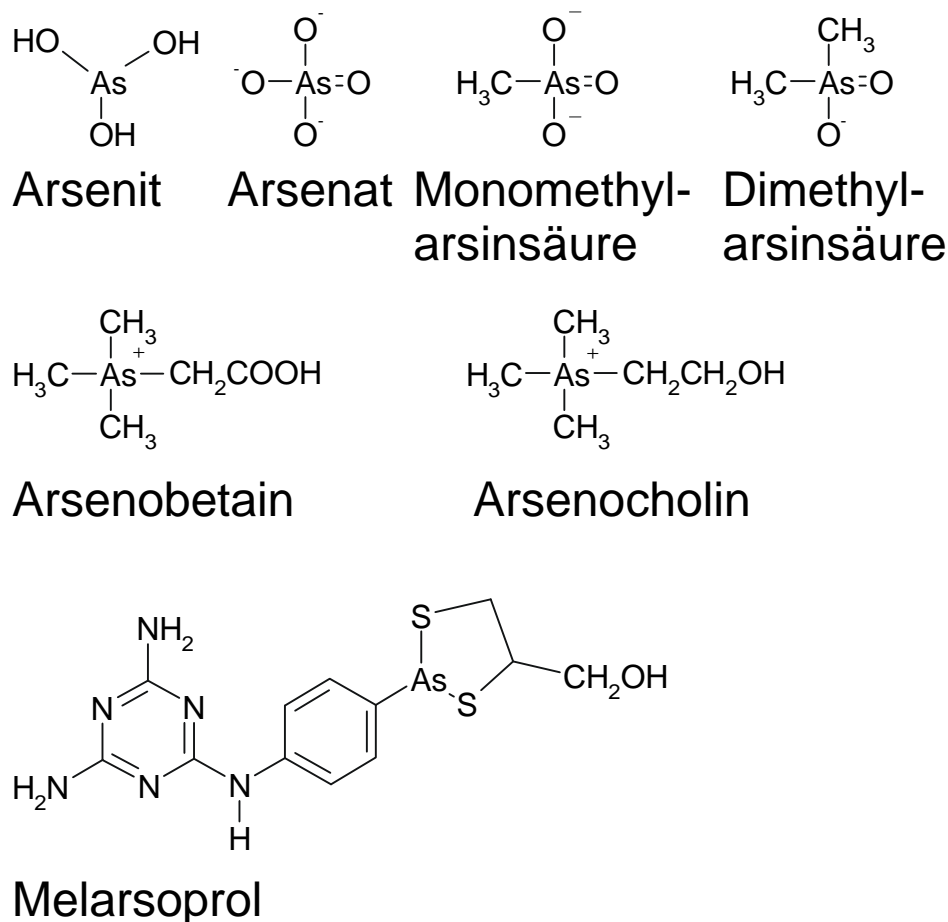
offensichtliche toxische Wirkung zu sich nahmen (Jolliffe, 1993); es wird sogar diskutiert, ob Arsen nicht in (sehr geringen Mengen) für Menschen und Tiere essentiell sein könnte (Uthus, 1992). Seit dem Altertum wurde Arsen auch als Medikament eingesetzt, berühmt wurde die Einführung von Salvarsan gegen Syphilis durch Paul Ehrlich (Azcue & Nriagu, 1994; Gorby, 1994). Mittlerweile ist die medizinische Verwendung von Arsenverbindungen im wesentlichen auf die Behandlung von Schlafkrankheit, hervorgerufen durch Trypanosomen, beschränkt (Friedheim, 1949), wobei diese Verbindungen (z.B. Melarsoprol; Abbildung 13) neuerdings auch als Mittel gegen Tumore diskutiert werden (Barrett & Barrett, 2000; Koshiuka et al., 2000).

Die starke Giftwirkung von anorganischen Arsenverbindungen und ihre durch anthropogene Verschmutzung erzeugte Verbreitung führte zur Entwicklung von Methoden, unterschiedliche Arsen-Verbindungen zu trennen und zu analysieren (z.B. Styblo et al., 1995; Pantsar-Kallio & Manninen, 1997; Michalke & Schramel, 1998; Mattusch et al., 2000). Durch diese Speziationsanalytik wurde festgestellt, daß ein beträchtlicher Anteil des vom Menschen mit der Nahrung aufgenommenen Arsens nicht in Form der sehr giftigen anorganischen Salze, sondern als weniger giftige organische Verbindungen aufgenommen wird.

Diese organischen Arsenverbindungen werden hauptsächlich durch Bakterien, Pilze, Algen oder marine Invertebraten produziert (Edmonds & Francesconi, 1981; Cullen & Reimer, 1989) als Teil ihres Entgiftungsmechanismus. Dabei gebildete Verbindungen sind Monomethylarsinsäure, Dimethylarsinsäure, Arsenocholin, Arsenobetain und Arsenzucker (Abbildung 13). Die Entgiftungsmechanismen in Säugetieren wurden in jüngerer Zeit aufgeklärt (Lakso & Peoples, 1975; Aposhian 1997). Auch hier spielt Methylierung die entscheidende Rolle: Arsenit wird zu Monomethylarsinsäure und dann zu Dimethylarsinsäure umgewandelt.

Höhere Pflanzen nehmen Arsenit und Arsenat schnell auf, wobei letzteres bei der Aufnahme mit Phosphat konkurriert (Asher & Reay, 1979). Die Konzentrationen können dabei z.B. 1,1 Gewichtsprozent Arsen in den Wurzeln erreichen (Gräser in Simbabwe; Jonnalagadda & Nenzou, 1997). Die Aufnahme von Arsen aus dem Boden wird auch als Indikator für das Vorkommen von Gold genutzt, da Arsen häufig geologisch vergesellschaftet mit Gold vorkommt (Warren et al., 1964; Girling et al., 1978; Samecka-Cymerman & Kempers, 1998).

Während Süßwasserpflanzen organische Arsenverbindungen bilden, scheint dies bei Landpflanzen kein verbreiteter Mechanismus zu sein (Nissen & Benson, 1982).



**Abbildung 13:** Wichtige anorganische und organische Arsen-Verbindungen.

Trivalentes Arsen vergiftet Zellen hauptsächlich durch seine Interaktion mit Sulfhydryl-Gruppen, beim Menschen neben der Bindung an Enzyme v.a. durch die Bindung an Lipoprotein (Webb, 1966; Aposhian, 1989; Kalef & Gitler, 1994). In Erythrozyten bindet es vor allem an Hämoglobin (Winski & Carter, 1995). Pentavalentes Arsen (Arsenat) hingegen ähnelt Phosphat und kann daher bei vielen Reaktionen, an denen Phosphat beteiligt ist, konkurrieren; ein Beispiel ist die Glykolyse (Aposhian, 1989). Wegen der Reaktion von Arsen mit SH-Gruppen werden als Antidot Dithiole wie 2,3-Dimercaptopropanol oder 1,2-Ethandithiol verabreicht (Webb & van Heyningen, 1947; Whittaker, 1947), die stärker als Monothiole an Arsen binden. Eine zentrale Rolle bei der Entgiftung von Arsenverbindungen spielt Glutathion; dabei läßt sich die Bindung an Arsen zumeist nur *in vitro* zeigen (Jocelyn, 1972;

Dill et al., 1987; Delnomdedieu et al., 1993; Scott et al., 1993; Gailer & Lindner, 1998). Glutathion ist auch an der Reduktion von  $\text{As}^{\text{V}}$  zu  $\text{As}^{\text{III}}$  beteiligt (Scott et al., 1993; Winski & Carter, 1995; Liu & Rosen, 1997) und wird als Cofaktor bei Arsen-Methylierungen diskutiert (Aposhian 1997). Die cytotoxischen Effekte von Arsen wurden erhöht, wenn die Glutathion-Konzentration verringert wurde (Shimizu et al., 1998).

Dithiole binden jedoch stärker als das Monothiol Glutathion (Delnomdedieu et al., 1993; Whittaker, 1947); human- und tierpathogene Protisten der Gruppe Apicomplexa (*Trypanosoma* und *Leishmania*) bilden aus Spermidin und zwei Glutathionmolekülen das Dithiol Trypanothion, das Komplexe mit arsen- oder antimonhaltigen Medikamenten (z.B. Melarsoprol; Abbildung 13) bildet (Bacchi et al., 1991; Smith et al., 1991). Die Erhöhung der Trypanothion-Produktion führt zu erhöhter Resistenz gegen Arsen- und Antimon-Verbindungen (Mukhopadhyay et al., 1996; Grondin et al., 1997).

In Pflanzen konnte gezeigt werden, daß auch als Reaktion auf Arsenat bzw. Arsenit Phytochelatine gebildet werden (Grill et al., 1987; Maitani et al., 1996); diese scheinen, da sie zwei oder mehr SH-Gruppen enthalten, in analoger Weise geeignet, um Arsenverbindungen zu komplexieren und zu entgiften. Maitani et al. (1996) konnten jedoch mit Gelfiltrationsexperimenten keinen Phytochelatin-Arsen-Komplex nachweisen. Neuere Untersuchungen an Mutanten von *Arabidopsis thaliana* und *Schizosaccharomyces pombe*, die keine Phytochelatine mehr zu produzieren vermögen und sensitiver gegenüber Arsenat sind, zeigten hingegen, daß Phytochelatine eine wichtige Rolle bei der Entgiftung von Arsen spielen (Ha et al., 1999). Eine zentrale Frage dieser Doktorarbeit war daher die Untersuchung der Rolle von Phytochelatinen bei der Entgiftung von Arsen in Pflanzen.

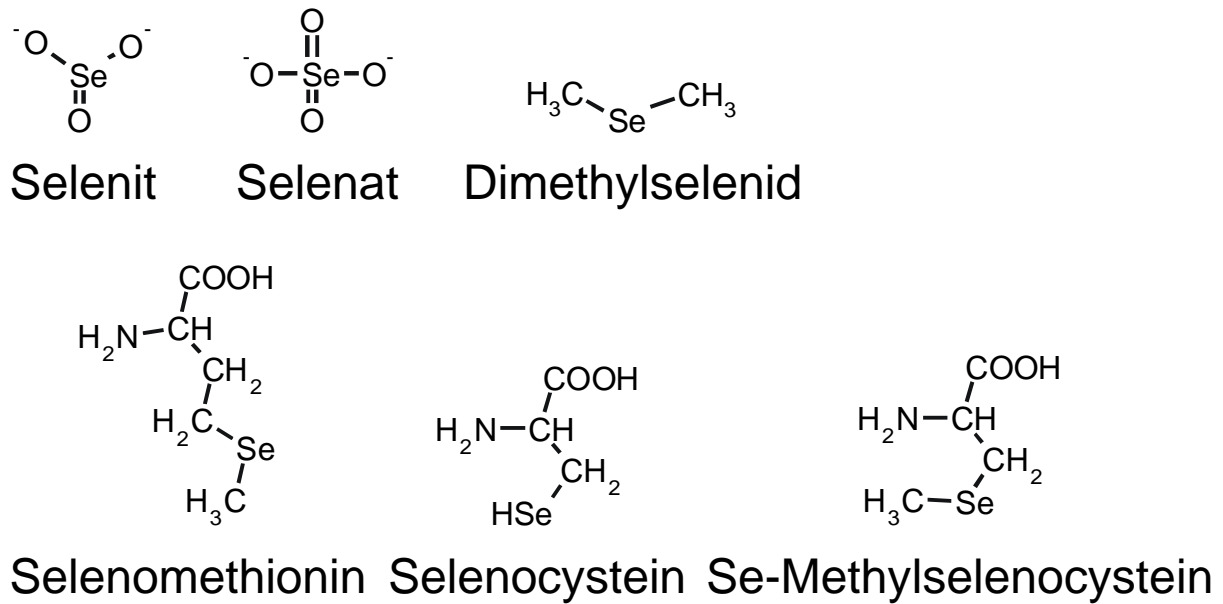
### A.8.2. Selen

Selen ist ein relativ seltenes Element, das in der Häufigkeit in der Erdkruste an 69. Stelle steht (Milne, 1998). Selen ähnelt chemisch dem Schwefel und tritt ähnlich wie dieser in den Oxidationsstufen 0 (elementares Selen), -2 (Selenwasserstoff,  $\text{H}_2\text{Se}$ ) +4 (Selenit,  $\text{SeO}_3^{2-}$ ) oder +6 (Selenat,  $\text{SeO}_4^{2-}$ ) auf (Wiberg, 1985). Die hauptsächliche biochemische Wirkung kommt dadurch zustande, daß in organischen Verbindungen Schwefel durch Selen ersetzt wird.

Die hauptsächliche Quelle von Selen in Organismen ist der Boden; während die meisten Böden nur 0,01 bis 2 mg Se/kg enthalten, können manche Böden bis zu 1200 mg Se/kg erreichen (Mayland et al., 1989), was zu einer Anreicherung des Selen in der Nahrungskette führen kann. In Kalifornien (San Joaquin Valley) und anderen Teilen der USA war Selen das Element, das durch künstliche Bewässerungsvorhaben am häufigsten die Grenzwerte für Wasser überschritt (Tanji et al., 1986; Seiler, 1996); die Konzentrationen erreichten an einigen Stellen 5 mg/L bei einem Grenzwert von 100 µg/L. Durch erhöhte Selen-Konzentration hervorgerufene Schäden und Tod bei den dort lebenden Fischen und Wasservögeln waren der Auslöser für ausführliche Untersuchungen und Diskussionen (Marshall, 1986; Ohlendorf, 1989).

Dies sollte jedoch nicht den Eindruck erwecken, daß Selen nur giftig ist. Frühere Untersuchungen zeigten die toxischen und karzinogenen Eigenschaften des Selen auf (Moxon & Rhian, 1943; Nelson et al., 1943). Erst später wurden die Eigenschaften als (zumindest für einige Organismen) essentielles Element erkannt (Schwarz & Foltz, 1957). Die empfohlene tägliche Selenzufuhr für den Menschen beträgt 50-200 µg (Forchhammer & Böck, 1991), während toxische Effekte ab der 100fachen Menge auftreten (Milne, 1998). Dabei ist auch die Form, in der das Selen aufgenommen wird, von Bedeutung für die Verfügbarkeit im Körper (Thomson, 1998). Unter anderem auch deswegen, aber auch um die Biochemie des Elements Selen näher zu erforschen, hat in jüngerer Zeit die Unterscheidung der verschiedenen anorganischen und organischen Spezies Interesse gefunden (Speziationsanalytik; Lobinski et al., 2000). Es finden sich dabei neben den anorganischen Spezies Selenit und Selenat verschiedene Analoge zu schwefelhaltigen Aminosäuren wie Selenocystein (und -cystin), Selenomethionin und Selenohomocystein (Abbildung 14). Die Freisetzung von flüchtigen Selen-Verbindungen wie Dimethylselenid (DMSe) spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle in den biogeochemischen Zyklen des Selen (Chasteen, 1998).

Die Biosynthesewege dieser Verbindungen laufen im wesentlichen über die entsprechenden Wege des Schwefelstoffwechsels (Anderson, 1993). Daher war es zunächst nicht überraschend, daß auch manche Proteine die selenhaltigen Aminosäuren enthielten (Cone et al., 1976). Erst die Entdeckung, daß für den spezifischen Einbau von Selenocystein ein eigenes Codon, nämlich UGA codiert, war spektakulär (Zinoni et al., 1987). Dieses Codon, das normalerweise STOP codiert, muß von einer 3'-Region von mindestens 45 Basen, die eine

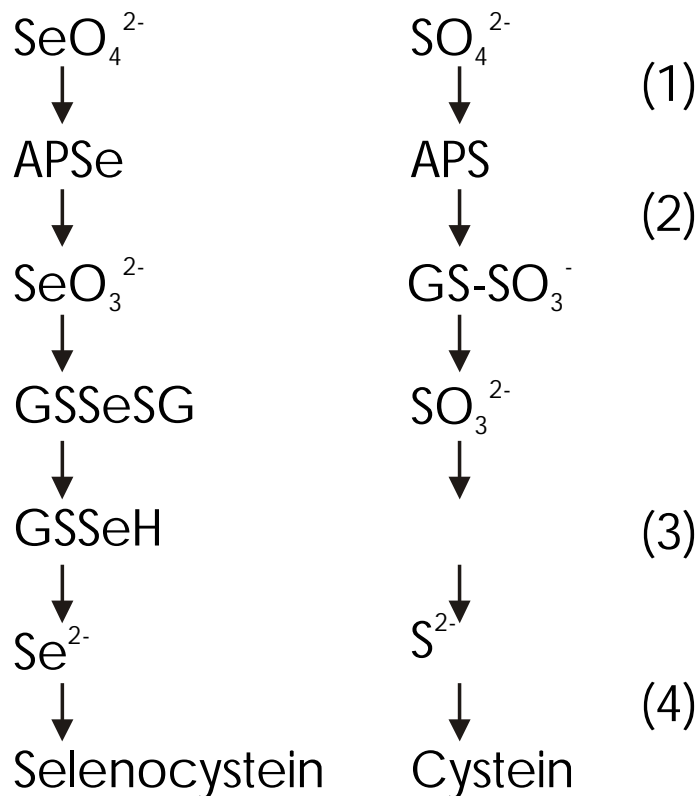


**Abbildung 14:** Häufige anorganische und organische Selen-Verbindungen.

spezifische Struktur ausbilden, begleitet sein, um als Codon für Selenocystein zu wirken (Böck et al., 1991). Selenocystein (Sec) ist damit die 21. proteinogene Aminosäure. Wichtige Selenoproteine sind Formate-Dehydrogenasen, andere Hydrogenasen und Glycin-Reduktasen aus Bakterien sowie verschiedene Glutathion-Peroxidasen, Tetraiodothyronin-Deiodinase und Plasma-Protein P aus Säugern (Stadtman, 1990; Böck et al., 1991). Die spezifische Funktion des Selenocysteins (statt Cystein) kommt durch die abweichenden chemischen Eigenschaften des Selens zustande, nämlich insbesondere den größeren Ionenradius und die leichtere Ionisierbarkeit der SeH-Gruppe, die bei physiologischem pH vollständig dissoziiert ist (Forchhammer & Böck, 1991). Neben dem spezifischen Einbau von Selenocystein kommt auch unspezifischer Einbau von Selenocystein und Selenomethionin anstatt der entsprechenden S-Analoga vor, was einen Teil der toxischen Effekte von Selen bewirkt (Anderson, 1993).

Die Aufnahme von Selen in Pflanzen wurde besonders deswegen untersucht, weil Pflanzen mit hohem Selen-Gehalt immer wieder zu Vergiftungen unter Nutztieren führten (James et al., 1989). Unter den Pflanzen werden bezüglich der Selen-Aufnahme üblicherweise drei Gruppen unterschieden: Akkumulatoren, sekundäre Akkumulatoren und Nicht-Akkumulatoren (Peterson & Butler, 1962; Brown & Shrift, 1982). Zu den Akkumulatoren, die einige mg Selen/g anreichern können, gehören Vertreter der Gattungen *Astragalus*, *Neptunia*, *Oonopsis*, *Stanleya* und *Xylorhiza*; insbesondere die Gattung *Astragalus* hat das Interesse der Forschung

gefunden. Die Se-Toleranz der Hyperakkumulatoren kommt durch geringeren unspezifischen Einbau in Proteine und Umwandlung der Se-Aminosäuren in physiologisch wenig aktive Derivate, wie Se-Methyl-Selenocystein oder Selenocystathionin zustande (Brown & Shrift, 1982). Auch in Zellkulturen von nicht-akkumulierenden Pflanzen läßt sich durch Selektion eine auf diesem Prinzip basierende Toleranz erzielen (Wang et al., 1999).



**Abbildung 15:** Reduktion von Selenat in Pflanzen im Vergleich zur Sulfat-Reduktion (nach Läuchli, 1993; Leustek & Saito, 1999; Saito, 2000). Die Schritte in der Sulfat-Reduktion zwischen APS (Adenosin-5'-Phosphosulfat) und Sulfid sind umstritten (Hell, 1997). Die beteiligten Enzyme sind ATP-Sulfurylase (1), APS-Sulfotransferase (2), Sulfit-Reduktase (3), O-Acetylserin(thiol)lyase (4).

Die Interaktion von Selen mit Thiolen ist *in vivo* nur unzureichend erforscht. Zwar wird als ein Schritt in der Reaktion des Sulfit die Bildung von Selenodiglutathion (GS-Se-SG) diskutiert (Ganther, 1971; Björnstedt et al., 1995); ob diese Reaktion tatsächlich *in vivo* so stattfindet, ist allerdings unklar. Der gesamte Reaktionsweg der möglichen Selenat-Reduktion ist in Abbildung 15 dargestellt; dabei zeigt sich, daß dieses Modell (u.a. nach Läuchli, 1993) analog ist zum sogenannten „gebundenen APS“-Reaktionsweg bei der Sulfatreduktion. Dieser ist allerdings noch umstritten (Hell, 1997), was auch zu Zweifeln am entsprechenden Selenat-

Reduktionsweg führen könnte. Auch molekularbiologische Untersuchungen zeigten, daß der Selen-Stoffwechsel im wesentlichen über die Enzyme des Schwefelstoffwechsels verläuft; die Überexpression der ATP-Sulfurylase führte zu vermehrter Selenat-Reduktion und -Toleranz (Pilon-Smits et al. 1999).

Aufgrund der möglichen Interaktionen von Selenit mit Glutathion war es interessant, daß Selenit auch die vom Glutathion abgeleiteten Phytochelatine induzierte (Grill et al., 1987); dieses konnte jedoch in späteren Experimenten nicht bestätigt werden (Zenk, 1996). Daher sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit auch die mögliche Induktion von Phytochelatinen in Zellkulturen und gegebenenfalls ihre Komplexe untersucht werden.

### A.8.3. Blei

Blei (Pb) ist mit 0,0018 % Gewichtsanteil an der Erdkruste eines der häufigeren Schwermetalle (Wiberg, 1985). Chemisch zeigt es als schwerstes Element der Kohlenstoffgruppe noch Eigenschaften dieser Gruppe, wie das Vorkommen vierwertiger Verbindungen. Die wichtigsten sind die „Antiklopfmittel“ Bleitetramethyl ( $\text{Pb}(\text{CH}_3)_4$ ) und Bleitetraethyl ( $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$ ). Natürlich vorkommend sind aber nur die zweiwertigen Bleiverbindungen wie  $\text{PbCO}_3$  oder  $\text{PbSO}_4$ .

Die wichtigsten anthropogenen Quellen für Blei in der Umwelt sind neben dem Einsatz von bleihaltigen Farben und früher auch Pestiziden (Bleiarsenat) metallverarbeitende Prozesse und die Verwendung von bleihaltigem Benzin (Singh et al., 1997). Das durch Metallverarbeitung und Kraftstoffe in die Atmosphäre gelangende Blei tritt dabei zumeist als Aerosol oder Staub auf und lagert sich zunächst oberflächlich, auch auf Pflanzenoberflächen ab. Während bleihaltiges Benzin eine großflächige Bleikontamination entlang der Straßen verursacht, nimmt die Belastung durch punktförmige Quellen wie Blei-Minen mit der Entfernung stark ab (Pilegaard, 1994). Eine heute im wesentlichen historische Quelle für die chronische Vergiftung von Menschen mit Blei ist die Verwendung von Wasserrohren aus Blei; zwar stammen die ältesten gefundenen Bleirohre aus dem Mesopotamien des 4. Jahrtausend vor Chr., in großem Umfange jedoch wurden sie dann v.a. von den Römern verwendet (Nriagu, 1985).

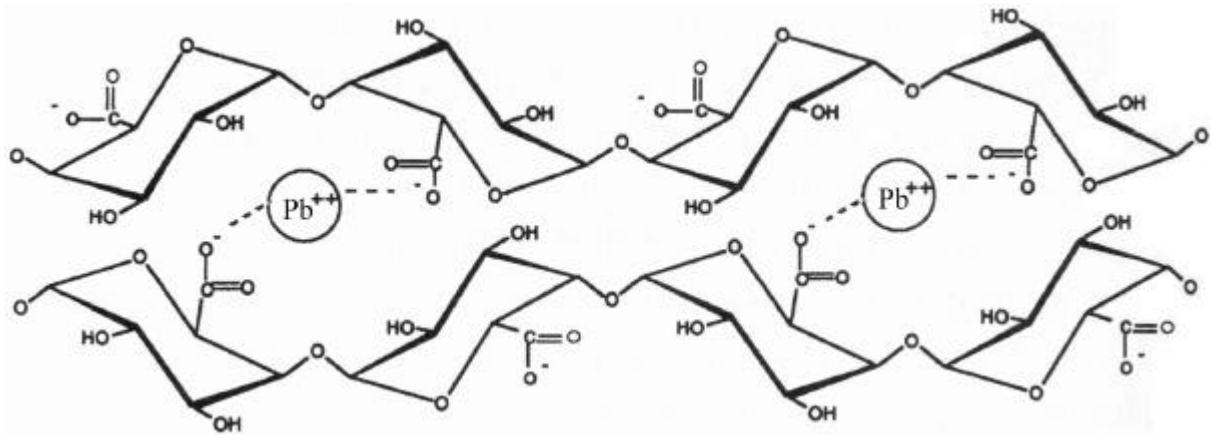
Die Aufnahme von Blei durch Pflanzen erfolgt zu einem wesentlichen Anteil (40-100 %) aus der Luft, während die Aufnahme aus dem Boden teilweise eine geringe Rolle spielt (Tahvonen, 1996). Dies kommt von der schwer löslichen Form, in der Blei im Boden vorkommt. In Experimenten kann die Bleikonzentration über 6,5 mg/g Trockengewicht der Pflanzen erreichen (Singh et al., 1997), in Wurzeln von *Brassica pekinensis* sogar mehr als 33 mg/g (Xiong, 1998). Die Verfügbarkeit von Blei im Boden wurde für Untersuchungen zur möglichen Phytoremediation von Blei durch Zugabe von künstlichen Komplexoren wie EDTA erhöht (Huang & Cunningham, 1996; Huang et al., 1997; Vassil et al., 1998).

Die hauptsächlichen zellphysiologischen Effekte von Blei in Pflanzen sind Hemmung der Photosynthese und der Nitrat-Reduktase (Singh et al., 1997). Verschiedene Mechanismen für die Hemmung der Photosynthese wurden diskutiert, darunter die Hemmung der Chlorophyll-Biosynthese oder die Verdrängung von essentiellen zweiwertigen Kationen ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ). In menschlichen Erythrozyten scheint die Bindung an  $\delta$ -Aminolaevulinsäure-Dehydratase und die Hemmung dieses wichtigen Enzyms der Häm-Biosynthese eine große Rolle zu spielen (Bergdahl, 1998).

Pflanzen tolerieren Blei, indem sie verstärkt essentielle Metallkationen wie  $Ca^{2+}$  aufnehmen, das  $Pb^{2+}$  durch Phytochelatine binden und indem Blei im wesentlichen apoplastisch transportiert und abgelagert wird (Singh et al., 1997). Pflanzen deponieren Blei hauptsächlich in der Zellwand, wie man durch mikroskopische Studien zeigen konnte (Tung & Temple, 1996). Mittlerweile stellte sich heraus, daß ein Pektin-Bestandteil der Zellwand, das Rhamnogalakturonan-II (RG-II) einen potenten Komplexor von Blei darstellt. Zumindest in Wein und Fruchtsäften tritt Blei bis zu 95 % gebunden an RG-II auf (Pellerin & O'Neill, 1998; Szpunar et al., 1998). Daraus wurde geschlossen, daß auch *in planta* RG-II eine wichtige Rolle bei der Bindung von  $Pb^{2+}$  in der Zellwand spielt. Ein Modell der entsprechenden Komplexierung von  $Pb^{2+}$  durch RG-II ist in Abbildung 16 dargestellt.

Blei, das das Cytosol erreicht, kann dort, wie andere Schwermetalle auch, Proteine vergiften, indem es an Thiolgruppen bindet. Als Entgiftungsmechanismen gegen solche Metalle in Pflanzen gelten die Phytochelatine;  $Pb(NO_3)_2$  induzierte die Bildung von Phytochelatinen in pflanzliche Zellkulturen fast so stark wie  $Cd(NO_3)_2$  (Grill et al., 1987). Auch Enzymextrakte bildeten nach Zugabe von  $Pb^{2+}$  Phytochelatine (Grill et al., 1989; Chen et al., 1997). Obwohl





**Abbildung 16:** Dimerisierung von Rhamnogalakturonan-II (RG-II) unter Komplexierung von divalenten Metallkationen wie z.B.  $\text{Pb}^{2+}$  (modifiziert nach Pellerin & O'Neill, 1998).

von Grill (1989) kurz die Isolierung eines Pb-Phytochelatin-Komplexes erwähnt wurde, blieben weitere Informationen über *in vivo* gebildete Pb-PC-Komplexe aus. Mehra et al. (1995) rekonstituierten Komplexe aus Phytochelatinen und  $\text{Pb}^{2+}$  und fanden dabei eine Komplexierung in der Stöchiometrie SH-Gruppen zu  $\text{Pb}^{2+}$  von 2:1. Ähnlich wie bei Cd-PC-Komplexen ergab sich eine Bindung des  $\text{Pb}^{2+}$  an die Thiolatgruppen der Phytochelatine. Ob diese Komplexe auch *in vivo* gebildet werden, ist jedoch offen; bei Gelfiltrationsexperimenten gelang es nämlich nicht, eine Cochromatographie von Pb und Phytochelatinen zu zeigen (Maitani et al., 1996; Leopold et al., 1998). Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob Phytochelatin-Pb-Komplexe nachgewiesen und ggf. gereinigt werden können.

## **B. Material und Methoden**

### **B.1. Verwendete Organismen**

#### **B.1.1. Pflanzliche Zellkulturen**

Für die meisten Versuche wurden pflanzliche Zellsuspensionskulturen verwendet. Diese stammen ursprünglich aus der Sammlung des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der LMU München (ehem. Prof. Zenk). Die verwendeten Arten waren *Rauwolfia serpentina* BENTH. EX KURZ, *Silene vulgaris* (MOENCH) GARCKE und *Agrostis tenuis* SIBTH. Die Zellsuspensionskulturen enthielten hauptsächlich Agglomerate von zwei bis fünf Zellen. Die Kulturen wurden in Erlenmeyerkolben unterschiedlichen Volumens oder Fernbachkolben auf einem Rundschüttler mit 100 U/min gehalten; die Temperatur des Zellkulturraums betrug konstant 23°C bei Dauerlicht. Einmal pro Woche wurden die Kulturen zur Erhaltung in frisches LS-Medium überführt (nach Linsmaier & Skoog, 1965); dabei wurde die Kultur je nach Wachstumsgeschwindigkeit mit ein bis zwei Volumina frischen Mediums verdünnt.

#### **B.1.2. Belastungsversuche mit Zellkulturen**

Um die Wirkung von verschiedenen Metallionen auf das Wachstum und die Thiol-Konzentrationen der Zellkulturen zu untersuchen, wurden 30 ml-Aliquote der mit frischem Medium verdünnten Zellkultur in leere, sterile 100 ml-Erlenmeyerkolben überführt. Nach drei Tagen wurden sterile konzentrierte Lösungen der interessierenden Ionen (Stammlösung zumeist 100 mM) bis zur gewünschten Konzentration zupipettiert. Nach weiteren vier Tagen wurden die so belasteten Kulturen geerntet. Als Kontrollen dienten dabei unbelastete Kulturen, in Fällen, bei denen der zugesetzte Stoff nicht in Wasser gelöst war, auch solche Kulturen, denen das Lösungsmittel zugesetzt wurde. Die Versuche wurden üblicherweise als Dreifachbestimmung angelegt. Je drei Erlenmeyerkolben mit Zellkultur wurden gleich nach dem Überimpfen oder vor dem Zusetzen der Schwermetallionen geerntet.

Zur Charakterisierung der Toxizität der getesteten Stoffe dienten drei Maßzahlen (Köhl & Lösch, 1999): MNIC (maximale nicht-inhibierende Konzentration); IC<sub>50</sub> (Konzentration, die 50 % Wachstumshemmung verursacht) und IC<sub>100</sub> (Konzentration, die 100 % Wachstumshemmung verursacht). Diese Zahlen wurden durch eine geeignete Regression des

Wachstums auf die Konzentration der getesteten Stoffe ermittelt (verwendetes Computerprogramm Microsoft Excel 7.0).

Kinetikversuche wurden in Fernbachkolben durchgeführt. Ein bzw. drei Tage nach Überimpfen der Kulturen in frisches Medium wurden die Schwermetalle zugesetzt. Täglich wurden drei Aliquote der belasteten Zellkultur und der unbelasteten Kontrollzellkultur geerntet und auf Trockengewicht und Phytochelatine analysiert.

Um größere Mengen von mit Schwermetallionen behandelten Kulturen zu erhalten, wurden diese in Fernbachkolben (Zellkulturvolumen 1 l) kultiviert, nach drei Tagen die Schwermetallionen zupipettiert und die Zellen nach weiteren vier Tagen geerntet.

### **B.1.3. Ernten der Zellkulturen**

Das Ernten der Zellkulturen erfolgte durch Abnutschen mit einer Saugflasche und Büchnertrichter. Die trockengesaugten Zellen wurden mit Leitungswasser gewaschen und wieder trockengesaugt. Aus Fernbachkolben gewonnene größere Mengen von Kulturen wurden unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert. Bei Versuchen mit 100 ml-Erlenmeyerkolben wurde zunächst das geerntete Frischgewicht bestimmt. Aus den geernteten Zellen wurden ein Aliquot von 1 g für die Trockengewichtsbestimmung und zwei Aliquote von 0,4 g für die HPLC-Analyse genommen. Die Bestimmung des Trockengewichts pro Gramm Frischgewicht erfolgt nach zweitägiger Trocknung bei 60°C auf einer Feinwaage. Die Aliquote für die HPLC-Analyse wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

### **B.1.4. Keimlinge von *Arabidopsis thaliana***

Neben den Zellkulturen wurden auch Keimlinge von *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. (var. RLD) auf Agar-Platten verwendet. Dazu wurden Samen sterilisiert (zweimal 1 min und einmal 30 min mit 80 % Ethanol/0,1 % Triton-X, einmal 5 min mit 3 % NaOCl; dann fünfmal mit sterilem Wasser gewaschen) und einzeln auf MS-Agar-Platten (Murashige & Skoog, 1962) ausgebracht. Die Platten wurden vertikal bei 22 °C, einer Beleuchtung von 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und einem hell/dunkel-Zyklus von 16/8h aufgestellt. Eine Woche nach

Ausbringen der Samen wurden die Keimlinge auf frische MS-Platten transferiert (je 20 pro Platte); diese enthielten unterschiedliche Konzentrationen des zu testenden Elements. Das Wachstum der Keimlinge wurde anhand des Wurzelwachstums (Köhl & Lösch, 1999) und des Frischgewichts bestimmt. Das Wurzelwachstum wurde bestimmt, indem sechs Tage nach dem Transfer der Abstand zwischen der Wurzelspitze und der Wurzelspitze nach dem Transfer (mit wasserunlöslichem Stift auf der Agar-Platte markiert) gemessen wurde. Zwei Wochen nach dem Transfer wurden die Keimlinge geerntet und das Frischgewicht pro Keimling bestimmt; je zehn der Keimlinge wurden gepoolt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20° C gelagert.

### **B.1.5. Bakterien und Hefen**

Im molekularbiologischen Teil (B.11.) wurden Kulturen von *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* verwendet. *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) wurde auf LB-Agar-Platten bzw. in LB-Flüssigmedium kultiviert. Hefen (HF7c) wurden in SD-Medium (mit/ohne His, Leu, Trp) oder YPD-Medium kultiviert.

## **B.2. Chemikalien und allgemeine Geräte**

### **B.2.1. Chemikalien**

Alle verwendeten Chemikalien waren, soweit nicht anders angegeben, von p.a.-Qualität und wurden von Fluka (Buchs, Schweiz) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Stickstoff in Druckflaschen (Qualität 4.6) wurde von Messer-Griesheim (Olching) bezogen. Molekularbiologische Reagenzien und Enzyme wurden, soweit nicht anders angegeben, von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) gekauft. Alle Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, in Milli-Q-Wasser (18,2 M $\Omega$ cm; Millipore, Eschborn) angesetzt.

### **B.2.2. Geräte**

Die folgenden allgemeinen Labor-Geräte wurden verwendet:

Tischzentrifuge Eppendorf 5415C (Eppendorf, Hamburg)

Zentrifuge Universal 16 (Hettich, Tuttlingen)

Kühlzentrifuge Jouan KR22i mit Rotoren AK500-11 (JA-10-kompatibel) und AK50-22 (JA-20-kompatibel) (Jouan, Unterhaching)

Thermoschüttler Eppendorf 5436 (Eppendorf, Hamburg)

Minishaker MS1 (IKA, Wilmington, NC, USA)

Ultraschall-Sonifier B-12 (Branson, Danbury, CT, USA)

Minibeadbeater (Biospec, Bartlesville, OK, USA)

Waage BP3100S (Sartorius, Göttingen)

Feinwaage A200S (Sartorius, Göttingen)

pH-Meter pH526 (WTW, Weilheim)

Photometer Ultrospec 3000 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Membran-Vakuumpumpe MZ2C (Vacuubrand, Wertheim)

Gefriertrocknung Lyovac GT2 (Leybold-Heraeus)

Vacuum-Konzentrator BA-VC-300H (Bachofer, Reutlingen)

Schüttelinkubator Thermoshake (Gerhardt)

Sterilbank Microflow Laminar Flow Workstation (MDH, Andover Hants, UK).

Geräte, die bei chromatographischen Trennverfahren verwendet wurden, sind unter B.3., B.6. und B.7. aufgeführt. Geräte für molekularbiologische Arbeiten finden sich unter B.11.

### **B.3. Nachweis von Phytochelatinen durch RP-HPLC mit Nachsäulenderivatisierung**

#### **B.3.1. Probenvorbereitung**

Phytochelatine und andere Thiole wurden mit der Methode nach Grill et al. (1987) bestimmt, modifiziert nach Kneer (1993).

Dazu wurden 0,4 g Zellkulturen (die in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren worden waren) mit frisch angesetzter 500 µl NaBH<sub>4</sub>-Lösung versetzt (1 mg/ml in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> bei Arsen-belasteten Zellen; 1 mg/ml in 1 N NaOH bei anderen Zellen) und mit einem Ultraschall-Sonifier lysiert (5 Pulse á 5 sec bei maximalem Output). Nach zehn Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (5 min, 10000 x g); 500 µl des Überstands wurden mit 100 µl 3,6 N HCl versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und dann abzentrifugiert (5 min,

10000 x g). Der Überstand wurde in HPLC-Gläschen pipettiert. Aliquote des Überstands vor der Zugabe der HCl wurden teilweise für die Proteinbestimmung nach Bradford verwendet.

*Arabidopsis*-Keimlinge wurden nach einem etwas modifizierten Verfahren aufgeschlossen: Jeweils 10 Keimlinge (in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren) wurden mit 500 µl NaBH<sub>4</sub>-Lösung versetzt (1 mg/ml in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> bei Arsen-belasteten Keimlingen; 1 mg/ml in 1 N NaOH bei anderen Keimlingen) und mit einem Glaspistill etwa 2 min auf Eis homogenisiert (Potter-Elvehjem-Homogenisator). Die weitere Behandlung war wie bei Zellkulturen.

Für die Extraktion von Hefen kam folgendes Protokoll zur Anwendung: Die Hefen wurden abzentrifugiert (5000 x g; 15 min), das Pellet in 500 µl NaBH<sub>4</sub>-Lösung (1 mg/ml NaOH) resuspendiert und mit 0,5 g Glaskügelchen im Minibeadbeater aufgeschlossen (dreimal 30 sek). 450 µl des Überstands nach Zentrifugieren (10 min; 10000 x g) wurden mit 100 µl 3,6 N HCl für 15 min auf Eis inkubiert. Der Überstand nach Zentrifugieren (10 min; 10000 x g) wurde für die HPLC eingesetzt.

Lösungen (z.B. Chromatographie-Fractionen) wurden folgendermaßen für die HPLC vorbereitet: 250 µl der Lösung wurden mit 250 µl NaBH<sub>4</sub>-Lösung versetzt (1 mg/ml in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> bei Lösungen, die Arsen enthielten; 1 mg/ml in 1 N NaOH bei anderen Lösungen) und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl 3,6 N HCl wurden die Proben für 15 min auf Eis inkubiert und dann abzentrifugiert (5 min, 10000 x g). Der Überstand wurde in HPLC-Gläschen pipettiert.

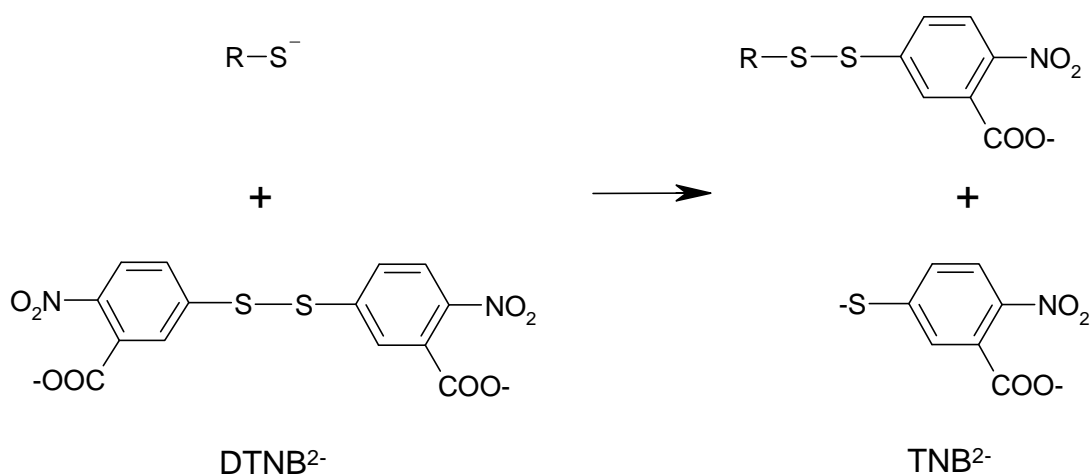
### **B.3.2. Trennung und Derivatisierung**

Für die Bestimmung der Thiole wurden 100 µl der Probe auf die HPLC-Trennsäule (Reversed-Phase-Säule CC250/4 Nucleosil 100-10 C18; Macherey-Nagel, Düren) injiziert und bei einer Flußrate von 2 ml/min mit einem Acetonitril-Gradienten getrennt (Tabelle 1). Die spezifische Detektion der SH-Gruppen in Glutathion und Phytochelatinen erfolgte durch eine Nachsäulenderivatisierung mit 5,5'-bisdithio(2-nitrobenzoesäure) (DTNB), Ellman's Reagenz (Ellman, 1959). Die Reaktion ist in Abbildung 17 dargestellt; das dabei gebildete gelb gefärbte Thiolanion (TNB<sup>2-</sup>) kann anhand seiner Extinktion bei 410 nm quantifiziert werden. Nach der Säule wurde über ein T-Stück Ellman's Reagenz (75 µM DTNB in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 8.0, und 10 % Acetonitril) mit einer Flußrate von 2 ml/min

zuepumpt. Nach einer Reaktionszeit von 75 sek in einer 5 ml Probenschleife (50 °C im Wasserbad) wurde die Extinktion bei 410 nm mit dem UV/Vis-Detektor gemessen und automatisch auf den Computer übertragen.

t (min)	% A	% B
0	100	0
2,5	75	25
17,5	0	100
18	0	100
19	100	0
26	100	0

**Tabelle 1:** Gradient der RP-HPLC-Trennung: Laufmittel A war 0,1 % Trifluoressigsäure in H<sub>2</sub>O; Laufmittel B war 0,1 % Trifluoressigsäure in 20 % Acetonitril.



**Abbildung 17:** Reaktion von DTNB (Ellman's Reagenz) mit einem Thiol zum gelb gefärbten Thiolatanion (TNB<sup>2-</sup>), welches bei 410 nm detektiert wird.

### B.3.3. HPLC-Anlage

Die HPLC-Anlage (Pharmacia, Uppsala, Schweden) bestand aus: Autosampler Marathon mit Injektionsventil (übliches Injektionsvolumen 100 µl); Gradientenpumpe Pharmacia LKB 2249 mit Low Pressure Mixer und Entgaser Degasys DG-1310; HPLC-Pumpe Pharmacia LKB

2248 (für die Derivatisierung); Trennsäule CC250/4 Nucleosil 100-10 C18 mit Vorsäule CC8/4 Nucleosil 100-10 C18 (beide Macherey-Nagel, Düren); Wasserbad (50 °C) mit Probenschleife (5 ml); UV/Vis-Detektor Pharmacia VWM 2141; Windows 95-PC mit Ezchrom Chromatography Data System 6.6 (Scientific Software, San Ramon, CA, USA). Die HPLC-Anlage ist in Abbildung 18 dargestellt.



**Abbildung 18:** Verwendete HPLC-Anlage: Autosampler mit Injektionsventil und RP-Säule (rechts); Wasserbad mit Derivatisierungsschleife (Mitte); Laufmittel, HPLC-Pumpe für Derivatisierungsreagenz, UV/Vis-Detektor, HPLC-Gradientenpumpe mit Low Pressure Mixer und Entgaser (links von oben).

### B.3.4. Datenanalyse

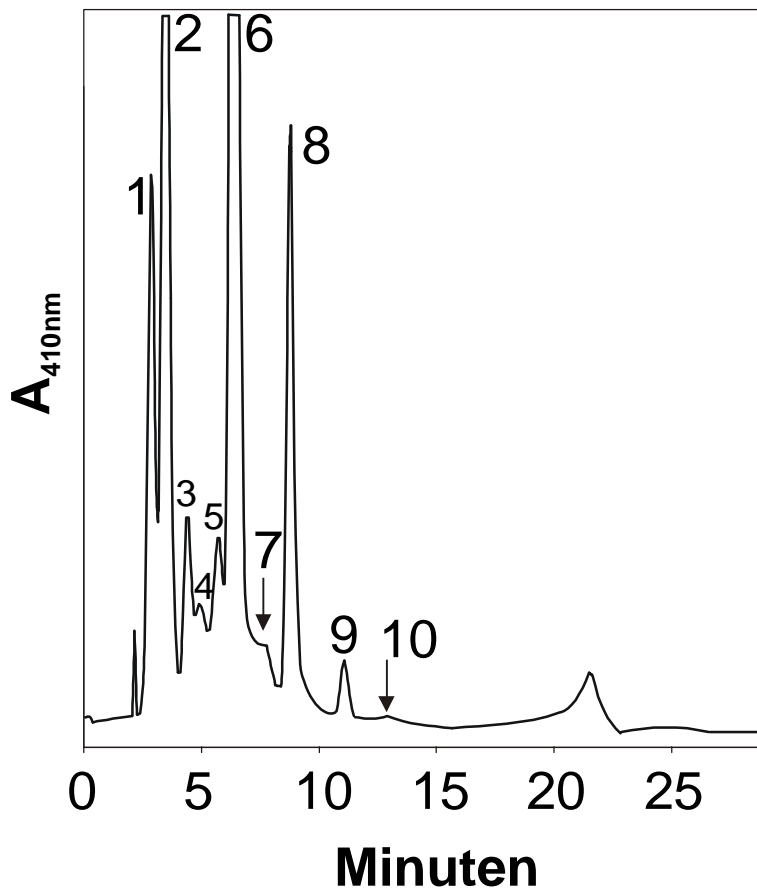
Die Extinktion bei 410 nm wurde vom UV/Vis-Detektor auf den Windows95-PC übertragen und dort mit dem Programm Ezchrom Chromatography Data System 6.6 (Scientific Software, San Ramon, CA, USA) analysiert. Die Identifikation der erhaltenen Peaks erfolgte anhand des Vergleichs der Retentionszeiten mit Standardsubstanzen. Die Quantifizierung erfolgte nach



der Peakfläche. Als Thiol-Standard wurde Glutathion-Lösung (in Laufmittel A) verwendet. Der Zusammenhang zwischen eingesetzter Menge Glutathion und Peakfläche war zwischen 50 und 10000 pmol linear ( $r=0,99995$ ). Die Menge an Glutathion, die noch qualitativ nachgewiesen werden konnte, betrug etwa 20 pmol; ab etwa 50 pmol konnten die Peakflächen noch mit hinreichender Genauigkeit quantifiziert werden. Für die Quantifizierung der Phytochelatine war es nötig, die Derivatisierungseffizienz in Abhängigkeit von der Zahl der SH-Gruppen zu bestimmen (s. auch Kneer, 1993). Dazu wurde die Absorption derivatisierter Phytochelatin-Standards bei 410 nm zu der Absorption underivatisierter bei 220 nm in Bezug gesetzt; die daraus errechneten Korrekturfaktoren sind in Tabelle 2 aufgelistet. Alle Thiol-Konzentrationen wurden als  $\mu\text{mol}$  SH-Gruppe pro g Trockengewicht (oder pro mg Protein oder pro ml Lösung) dargestellt. In Abbildung 19 ist beispielhaft ein HPLC-Chromatogramm dargestellt.

Thiol	Korrekturfaktor
Glutathion	1
PC <sub>2</sub>	1
PC <sub>3</sub>	1,3
PC <sub>4</sub>	1,5
PC <sub>5</sub>	2,9

**Tabelle 2:** Korrekturfaktoren für die Quantifizierung von Thiolen mittels RP-HPLC und Nachsäulenderivatisierung mit Ellman's Reagenz. Aufgrund unterschiedlicher Derivatisierungseffizienz der SH-Gruppen bei unterschiedlich langen Phytochelatinen war die  $A_{410\text{nm}}$  pro SH-Gruppe bei längeren Phytochelatinen geringer als bei kürzeren. Bei Verwendung eines Glutathion-Standards zur Quantifizierung mußten daher die aufgeführten Korrekturfaktoren verwendet werden.



**Abbildung 19:** RP-HPLC-Chromatogramm mit Nachsäulenderivatisierung mit DTNB und Detektion bei 410 nm (Beispiel). Das HPLC-Elutionsprofile zeigt einen Extrakt aus Zellen, die für vier Tage mit 2000  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  behandelt wurden. Die mit Nummern versehenen Peaks repräsentieren: Cystein (1), Glutathion (2), unbekannte Sunstanzen (3-5),  $\text{PC}_2$  (6), unbekannt (7),  $\text{PC}_3$  (8),  $\text{PC}_4$  (9),  $\text{PC}_5$  (10).

#### B.4. Proteinbestimmung

Bestimmungen der Proteinmenge in Lösungen erfolgten nach Bradford (1976). Dazu wurden in 1 ml-Kunststoffküvetten 0,5 ml Bradford-Reagenz (Sigma) mit 1-50  $\mu\text{l}$  Probe versetzt und auf 1 ml mit  $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt. Die Absorption bei 595 nm wurde nach 10 min Inkubation gegen einen Blindwert, der statt der Probe  $\text{H}_2\text{O}$  enthielt, gemessen. Als Proteinstandard diente Rinderserumalbumin (BSA).

## B.5. Nachweis von Schwermetallen durch AAS und ICP-AES und Arsen-Schnelltest

### B.5.1. AAS und ICP-AES

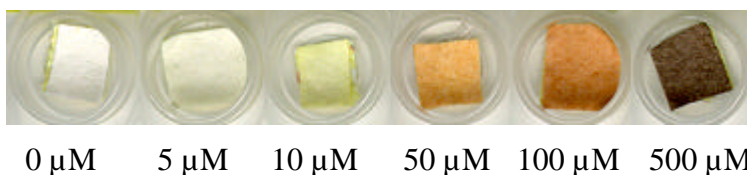
Schwermetalle in Lösungen, z.B. in Chromatographiefraktionen, wurden mittels AAS (Atomabsorptionsspektrometrie), später auch mittels ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry) bestimmt. Die Analysen führte Herr Hartl am Institut für Anorganische Chemie der LMU München durch. Das verwendete Gerät war ein Perkin-Elmer 1100B Atomabsorptions-Spektrometer (Perkin-Elmer, Überlingen) mit Hohlkathodenlampen von Bachofer. Neben der einfacheren Direktbestimmung in der Flamme (für Cd und Pb) wurden die meisten Analysen (v.a. auf As, Se, Sb, Hg) mit der Graphitrohrtechnik durchgeführt. Die verwendeten Bedingungen für die einzelnen Elemente sind in Tabelle 3 aufgeführt. Bei den Graphitrohr-Analysen wurde ein Palladium-Ascorbat-Modifizier verwendet (Endkonzentration 1,34 mM Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> und 81,1 mM Ascorbinsäure). Spätere Analysen wurden mit einem Simultan-ICP-AES-Gerät Varian Vista RL CCD (Varian, Darmstadt) durchgeführt. Die dabei verwendeten Wellenlängen waren für As 188,98 nm, für Cu 324,75 nm, für Zn 213,86 nm.

Element	Wellenlänge [nm]	AAS-Methode	Konzentrationsbereich (verdünnt) [µg/L]
<b>Cd</b>	228,8	Flamme	1000-8000
		Graphitrohr	0,05-5
<b>Pb</b>	283,3	Flamme	200-20000
		Graphitrohr	1-50
<b>Hg</b>	253,6	Graphitrohr	2-200
<b>As</b>	193,7	Graphitrohr	2-100
<b>Se</b>	196,0	Graphitrohr	2-50
<b>Sb</b>	217,5	Graphitrohr	2-100

**Tabelle 3:** Bedingungen bei der Analyse von Schwermetallen mittels AAS.

### B.5.2. Arsen-Schnelltest

Um eine Methode zur schnellen Bestimmung von Arsen, dem in der Arbeit am häufigsten verwendeten Element, direkt im eigenen Labor zu haben, wurde ein semiquantitativer Schnelltest von Merck (Merckoquant Arsen-Test; Merck, Darmstadt) modifiziert. Die zu analysierende Lösung (0,5 ml) wurde in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit einer Spatelspitze Zn-Pulver und 3,6 N HCl (0,1 ml) versetzt und verschlossen; der Verschlußdeckel wurde zur besseren Abdichtung mit Parafilm umwickelt. Im Deckel war ein Stück des Arsen-Indikatorpapiers (Quecksilberbromid-Papier) aufgeklebt worden. Nach dreißig Minuten Inkubation bei 35°C im Thermoschüttler wurde der Deckel vorsichtig abgenommen (Wasserstoff-Entwicklung!); anhand der Verfärbung des Indikatorpapiers von weiß nach gelb bis braun konnte auf die Arsen-Konzentration geschlossen werden (Abbildung 20). Konzentrationen zwischen 5 µM und 200 µM Arsen konnten durch Vergleich mit entsprechend behandelten Standard-Lösungen bestimmt werden. Zur Dokumentation und zur genaueren Quantifizierung wurden die auf Papier aufgeklebten Deckel mit Indikatorpapier mit einem Flachbettscanner (Hewlett-Packard ScanJet 4C) eingescannt; mit einem Grafikprogramm (Micrografx Picture Publisher) wurde die mittlere Helligkeit der Indikatorpapier-Stückchen bestimmt. Im Bereich von 5 µM bis 200 µM war die Korrelation zwischen dem Logarithmus der Konzentration und der mittleren Helligkeit überraschend gut (teilweise bei  $r=0,99$ ); allerdings war eine so gute Korrelation nicht immer erreichbar. Zur schnellen Überprüfung von Konzentrationen zwischen 10 µM und 100 µM As eignete sich die Methode jedoch gut.



**Abbildung 20:** Arsen-Schnell-Test: Je 0,5 ml einer Lösung mit den angegebenen Konzentrationen von Arsenit wurde in dicht verschlossenen 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen 30 Minuten unter Schütteln bei 35 °C mit HCl (0,1 ml 3,6N) und Zn-Pulver inkubiert (eine Spatelspitze). Im Deckel der Eppendorf-Reaktionsgefäße befand sich ein Stück Indikatorpapier, das sich je nach Arsen-Konzentration von weiß nach gelb bis braun verfärbte.

## **B.6. Nachweis von Phytochelatin-Metall-Komplexen durch Gelfiltration bzw. Anionenaustauscherchromatographie**

Zur schonenden Auftrennung von verschiedenen Metall-Spezies, insbesondere von nicht-kovalenten Komplexen, dient üblicherweise die Gelfiltration (auch Gelchromatographie oder Size-Exclusion-Chromatography genannt). Auch für Phytochelatin-Metall-Komplexe wurde diese Methode häufig verwendet (Grill et al., 1985). Daneben wurde auch versucht, As-PC-Komplexe mit Anionenaustauscherchromatographie nachzuweisen (nach Sneller et al., 1999).

Das verwendete Chromatographiesystem (Biorad, Hercules, CA, USA) bestand aus einer BioLogic Workstation mit Ventilen AV7-3, SV5-4, SV3-2, UV-Detektor (254 nm bzw. 280 nm) und Leitfähigkeitsmonitor; einem BioLogic HR Controller (PC mit Windows 95 und BioLogic HR 2.0 Software); einem Fraktionssammler 2128.

### **B.6.1. Extraktion**

Für die Gelfiltration wurden die Zellen mit Puffer extrahiert; dazu wurden auf 1 g Frischgewicht 0,5 ml des Puffers genommen. Standardpuffer war 10 mM Tris-Cl (pH 8.0), bei der Extraktion arsen-belasteter Zellen wurde auch 10 mM Natriumacetat-Puffer (pH 4.0) eingesetzt. Nach Zentrifugation (10000 x g; 30 Minuten) wurden 8 ml des Überstands auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen.

Für die Anionenaustauscherchromatographie wurden 23,5 g Zellen mit 23,5 ml 20 mM Tris-Cl (pH 8.0) extrahiert. Nach Zentrifugation (10000 x g; 30 Minuten) wurde der Überstand auf 40 ml verdünnt und auf die Anionenaustauschersäule aufgetragen.

### **B.6.2. Gelfiltrations-Chromatographie**

Die Gelfiltrationssäule war 64 cm lang, hatte einen inneren Durchmesser von 1,6 cm und war mit Sephadex G25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gepackt. Das Ausschlußvolumen  $V_0$  der Säule betrug 55 ml, das Gesamtvolumen  $V_t$  130 ml. Als Laufmittel diente der Extraktionspuffer (also 10 mM Tris-Cl pH 8.0 oder 10 mM  $\text{NaCH}_3\text{COO}$  pH 4.0) mit 100 mM NaCl. Bei Versuchen mit Arsen-belasteten Zellen wurde dem Laufmittel teilweise auch 5  $\mu\text{M}$  Arsenit zugesetzt. Bei einer Flußrate von 0,8 ml/min wurden Fraktionen von 2 ml gesammelt.

Die gesammelten Fraktionen wurden mit RP-HPLC auf Thiole und mit AAS bzw. ICP-AES auf Metalle analysiert.

### **B.6.3. Anionenaustauscherchromatographie**

Der verdünnte Zellextrakt (40 ml) wurde auf die Anionenaustauschersäule aufgetragen. Diese war eine vorgepackte Mono-Q-Säule (5ml Säulenvolumen; Biorad, Hercules, CA, USA). Nach 10 ml Waschen mit Puffer A (20 mM Tris-Cl pH 8.0) wurde ein Gradient von 0-1,5 M NaCl in Puffer A zur Elution benutzt. Die Fraktionen von 1 ml wurden mit ICP-AES auf Arsen, Zink und Kupfer und mit HPLC auf Phytochelatine getestet.

## **B.7. Reinigung von Phytochelatin-Metall-Komplexen bzw. Apo-Phytochelatinen**

### **B.7.1. Extraktion**

Phytochelatin-Metall-Komplexe wurden nach der Methode von Grill et al. (1991) gereinigt. Dazu wurden 200-300 g gefrorene Zellen (*Rauvolfia serpentina*) in dem halben Volumen (also 100-150 ml) 20 mM Tris-Cl-Puffer (pH 8.6) aufgetaut. Der Puffer enthielt z.T. auch 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol. Der Extrakt wurde zentrifugiert (10000 x g, 30 min), der Überstand auf pH 8.6 eingestellt und auf das vierfache Volumen verdünnt.

### **B.7.2. Anionenaustauscher-Chromatographie**

Der verdünnte Extrakt wurde auf eine Anionenaustauscher-Säule (14x1,6 cm; DEAE-Biogel, Biorad, Hercules, CA, USA) aufgetragen, die mit 10 mM Tris-Cl (pH 8.6) und 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol äquilibriert war. Mit 100 ml dieses Puffers wurde nachgewaschen und mit Elutionspuffer eluiert (10 mM Tris-Cl, pH 8.6; 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol; 500 mM NaCl). Die Flußrate betrug 3-4 ml/min. Die phytochelatin-haltigen Fraktionen (getestet mit HPLC) wurden gepoolt.

### **B.7.3. Ammoniumsulfat-Fällung und Ultrafiltration**

Zu dem gepoolten Eluat wurde fein gemahlenes Ammoniumsulfat unter Rühren zugegeben, bis zu einer Sättigung von 80 % (entspricht 0,6 g Ammoniumsulfat/ml Eluat). Die gefällten Proteine wurden abzentrifugiert und der Überstand mit 10 mM Tris-Cl (pH 8.0) auf das dreifache Volumen verdünnt. Die Abtrennung des Ammoniumsulfats und die Aufkonzentrierung erfolgte durch Ultrafiltration. Diese wurde in einer Ultrafiltrationsrührzelle (60 ml bzw. 200 ml) mit Membran YM1 durchgeführt (Amicon, Beverly, MA, USA). Die Lösung wurde auf 5-10 ml konzentriert.

### **B.7.4. Gelfiltration**

Dieses Konzentrat wurde im letzten Reinigungsschritt auf einer Gelfiltrationssäule aufgetrennt (54x2,6 cm; Sephadex G50, Pharmacia, Uppsala, Schweden). Die Flußrate betrug 2 ml/min, der Puffer war 10 mM Ammoniumacetat (pH 7.0). Die Fraktionen, die Phytochelatin-Komplexe enthielten, wurden gepoolt und bis zur Trockne lyophilisiert.

### **B.7.5. Gewinnung metallfreier Phytochelatine (apo-Phytochelatine)**

Apo-Phytochelatine (metallfreie Phytochelatine) wurden auf einfachere Weise gewonnen. Die Zellen wurden, wie oben beschrieben (B.5.), extrahiert und mittels Gelfiltration getrennt. Die phytochelatin-haltigen Fraktionen wurden lyophilisiert und mit RP-HPLC getrennt. Die Trennung erfolgte dabei wie oben beschrieben (B.3.); allerdings erfolgte die Detektion bei 220 nm ohne Nachsäulenderivatisierung. Die einzelnen Phytochelatine wurden gesammelt, mit einem Vakuumkonzentrator das Acetonitril entfernt und lyophilisiert. Die gewonnenen Phytochelatine wurden nochmals chromatographiert und bis zur Trockne lyophilisiert.

### **B.8. Biosynthese von Phytochelatinen *in vitro***

Leicht angereinigte PC-Synthase aus *Silene vulgaris*-Zellkulturen (nach der Methode von Friederich et al., 1998) wurde von M. Oven zur Verfügung gestellt. Damit wurde ein Kurzzeit-Kinetik-Versuch durchgeführt. Der Versuch wurde in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt 0,8 nkat PC-Synthase, 1 mM Arsenit, 10 mM Glutathion und 5 mM EDTA in 100 mM Tris-Cl (pH 8.0). Das EDTA diente

zur Unterdrückung der PC-Synthese-Aktivität in Anwesenheit von Restmengen von  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ . Aliquote des Reaktionsansatzes wurden nach jeweils 10 min mittels RP-HPLC auf gebildete Phytochelatine getestet.

### **B.9. Rekonstitution von GSH-Metall- und PC-Metall-Komplexen**

Komplexe aus Glutathion und Arsenit bzw.  $\text{PC}_2$  und Arsenit wurden im wesentlichen nach Scott et al. (1993) in einem molaren Verhältnis von drei SH-Gruppen zu einem As (III) rekonstituiert. Dazu wurden wässrige Lösungen des Peptids (10 mM GSH bzw. 5 mM  $\text{PC}_2$ ) mit 3 mM Arsenit für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation fand unter kontinuierlichem Durchleiten von Stickstoff statt, um Oxidation der Peptide zu vermeiden.

### **B.10. Massenspektrometrische Analysen (ESI-MS und MALDI-TOF-MS)**

Zur Bestimmung der Masse der Phytochelatine wurden sie im Institut für Organische Chemie und Biochemie der TU München massenspektrometrisch analysiert. Lyophilisierte Standards von Glutathion,  $\text{PC}_2$  und  $\text{PC}_3$  sowie aus arsenit-belasteten Zellen gewonnene Phytochelatine wurden in 10 % Acetonitril gelöst (Endkonzentration 0,1 mg/ml). Die Analyse erfolgte im MS-Modus mittels ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectrometry) an einem MAT LCQ-Gerät (Finnigan, San Jose, CA, USA). Teilweise wurden die Proben direkt in das Massenspektrometer injiziert, teilweise wurden sie vorher noch mit RP-HPLC aufgetrennt. Auch rekonstituierte  $\text{PC}_2$ -As-Komplexe (s. B.7.) wurden mit ESI-MS untersucht.

Da bei der MS-Analyse von aus arsen-belasteten Zellen gewonnenen Phytochelatinen in hohem Maße intramolekular oxidierte Phytochelatine auftraten, wurden diese unmittelbar vor der Analyse mit  $\text{NaBH}_4$  reduziert. Dazu wurde den Phytochelatin-Lösungen (0,1 mg/ml in 10 % Acetonitril) 5 mg/ml  $\text{NaBH}_4$  (als Pulver) zugefügt; nach 10 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml 3,6 N HCl gestoppt. Aufgrund der durch diese Prozedur erzeugten hohen Salzkonzentration konnte jedoch keine ESI-MS durchgeführt werden (Vacchina et al., 1999).

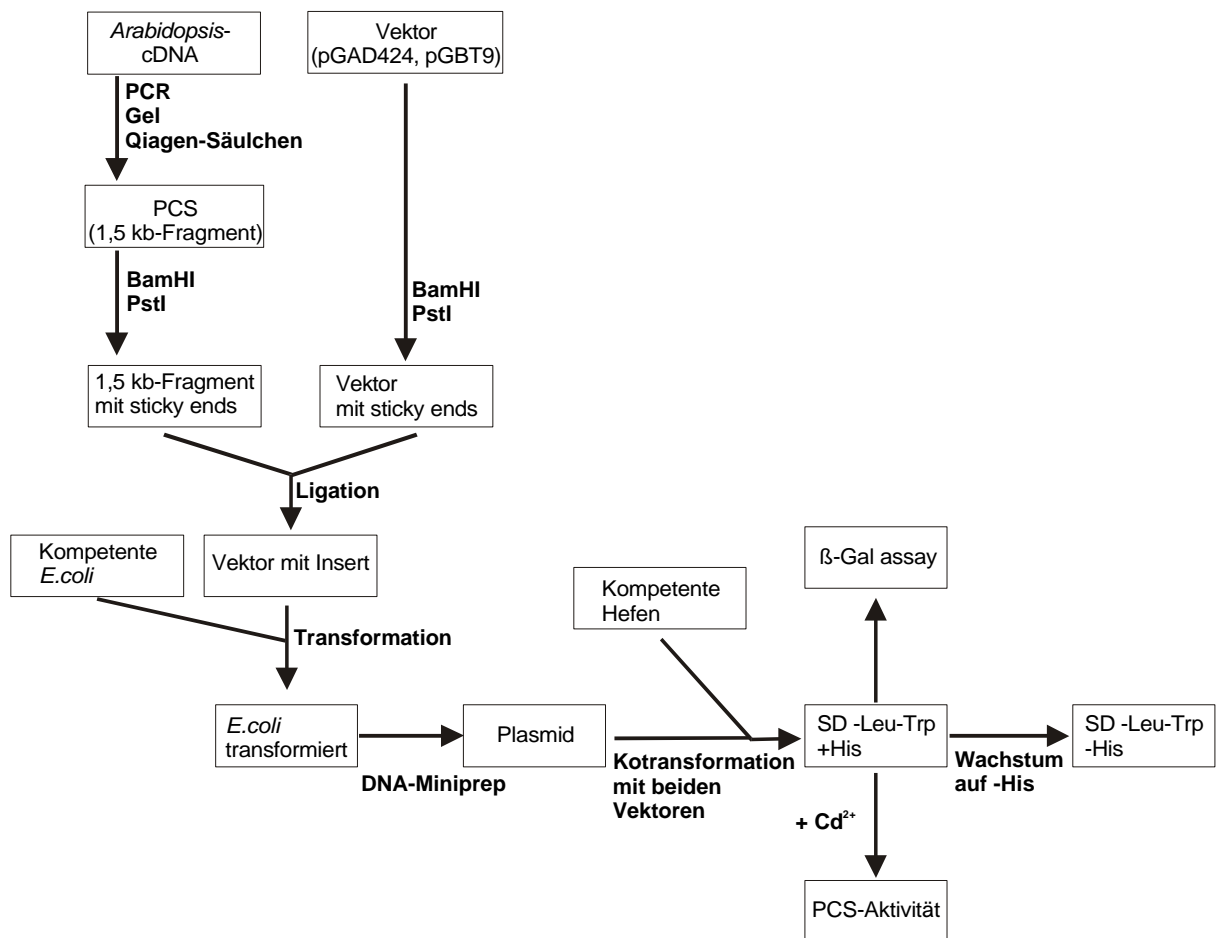
Daher wurden die Proben einer MALDI-TOF-MS (Matrix assisted laser desorption ionization-Time of flight-Mass spectrometry) unterzogen. Das verwendete Gerät war ein Bruker Biflex (Bruker Daltonik, Bremen).



## B.11. Molekularbiologische Techniken

### B.11.1. Vorgehensweise

Mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems (Chien et al., 1991; Fritz & Green, 1992; Clontech, 1997) sollte untersucht werden, ob die PC-Synthase aus *Arabidopsis* (AtPCS1) ein Dimer bildet, um aktiv zu sein. Dazu wurden folgende Hauptschritte durchgeführt (Abbildung 21): PCR-Amplifikation der AtPCS1-cDNA aus *Arabidopsis thaliana*-cDNA; Klonierung des so gewonnenen Produkts in verschiedenen Vektoren (psK; pGAD und pGBT) in *Escherichia coli*; Klonierung der aus *E. coli* gewonnenen Vektor-DNA in *Saccharomyces cerevisiae*; Testen der transformierten *S. cerevisiae* auf PC-Synthase-Aktivität und Interaktion. Die angewandten molekularbiologischen Methoden waren im wesentlichen nach Sambrook et al. (1989), mit entsprechenden Modifikationen, die erwähnt werden; die Yeast-Two-Hybrid-Klonierung erfolgte nach dem Handbuch von Clontech (Clontech, 1997).



**Abbildung 21:** Untersuchung der PC-Synthase auf Interaktion zum Homodimer mittels Yeast-Two-Hybrid-System: Schematische Darstellung der wichtigsten Schritte.

### **B.11.2. Verwendete Chemikalien und Enzyme**

Die verwendeten Enzyme und Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Der häufig verwendete TE-Puffer bestand aus 10 mM Tris-Cl und 1 mM EDTA (pH 8.0).

### **B.11.3. DNA-Isolierung**

Als Matrize für die PCR diente eine cDNA-Bank aus *Arabidopsis thaliana* (Clontech). Zur Analyse putativer Transformanten von *Escherichia coli* wurden als Template geringe Mengen der Bakterienkolonie (Pipettenspitze) ohne weitere Vorbehandlung verwendet (Kolonie-PCR). Zur Isolierung von genomischer *Arabidopsis*-DNA für die PCR-Amplifikation wurde ein Mikro-Isolations-Protokoll benutzt.

Der verwendete Mikro-Isolations-Puffer bestand aus 0,4 Vol. Extraktionspuffer, 0,4 Vol. Nukleus-Lysis-Puffer, 0,16 Vol. 5% Sarcosyl und 3,8 g/l Natriumdisulfit. Der Extraktionspuffer bestand aus: 0,1 M Tris-Cl (pH 8.0), 5 mM EDTA (pH 8.0), 0,35 M Sorbitol. Der Nukleus-Lysis-Puffer bestand aus 200 mM Tris-Cl (pH 8.0), 50 mM EDTA (pH 8.0), 2 M NaCl und 2% CTAB.

Mikro-Isolation genomischer *Arabidopsis*-DNA:

3-5 Blätter mit 100 µl Mikro-Isolations-Puffer im Eppendorf-Cap homogenisieren;

650 µl Mikro-Isolations-Puffer hinzufügen und gut vortexen;

für 65 min bei 60°C inkubieren;

750 µl CHCl<sub>3</sub> hinzufügen und gut vortexen;

zentrifugieren (10000 x g; 10 min) und wässrige, obere Phase in neues Cap überführen;

DNA über Nacht mit 750 µl Isopropanol fällen;

zentrifugieren (13000 x g; 20 min; 4 °C);

Pellet mit 750 µl 70% Ethanol waschen und Pellet trocknen;

Pellet in 10 µl 0,1 x TE-Puffer aufnehmen.

### B.11.4. PCR

Die PCR-Amplifikationen wurden mit einem Thermocycler TGradient (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Verwendete Programme sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die verwendeten Enzyme waren Taq-Polymerase, Vent-Polymerase und Pwo-Polymerase (Peqlab, Erlangen). Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 15 µl angesetzt, für präparative Zwecke in einem Volumen von 100 µl (0,02 U Polymerase/µl und je 1/10 Volumen folgender Lösungen: 10x Puffer; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; je 2 mM ATP, CTP, GTP, TTP; je 2 µM der beiden Primer). Die verwendeten Primer sind in Abbildung 22 dargestellt.

P 1 Zyklen	Zeit	T [°C]		P 2 Zyklen	Zeit	T [°C]		P 3 Zyklen	Zeit	T [°C]
1	2'	95		1	1'	95		1	1'	95
36	1'	95		31	1'	95		40	1'	95
	2'	60			0,5'	60			0,5'	47/55
	2,5'	72			2'	72			2'	72
1	10'	72								

**Tabelle 4:** Verwendete PCR-Programme.

Die Primer (pcs1f und pcs1r) waren so konstruiert, daß sie sowohl die AtPCS1-Sequenz als auch die AtPCS2-Sequenz amplifizieren konnten (Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999). Für die Klonierung in die Vektoren wurden durch die Primer Restriktionsschnittstellen eingeführt. Um eine bessere Amplifikation zu ermöglichen, erwies es sich als nötig, eine verschachtelte PCR-Strategie zu verwenden (nested PCR). Dazu wurde in einem ersten PCR-Schritt ein 1626 bp-Fragment amplifiziert (mit den Primern npcs1f und npcs1r); im zweiten Schritt wurde aus diesem Fragment mit den Primern pcs1f und pcs1r das gewünschte 1489 bp-Fragment mit Restriktionsschnittstellen amplifiziert (Abbildung 22).

**pcs1f:**

Primer pcs1f 5'-ACAGGATCCGAAAAATGGCTATGGCGAG-3'  
AtPCS1 cDNA 5'-ACAAGCAGTGAAAAATGGCTATGGCGAG-3'

**pcs1r:**

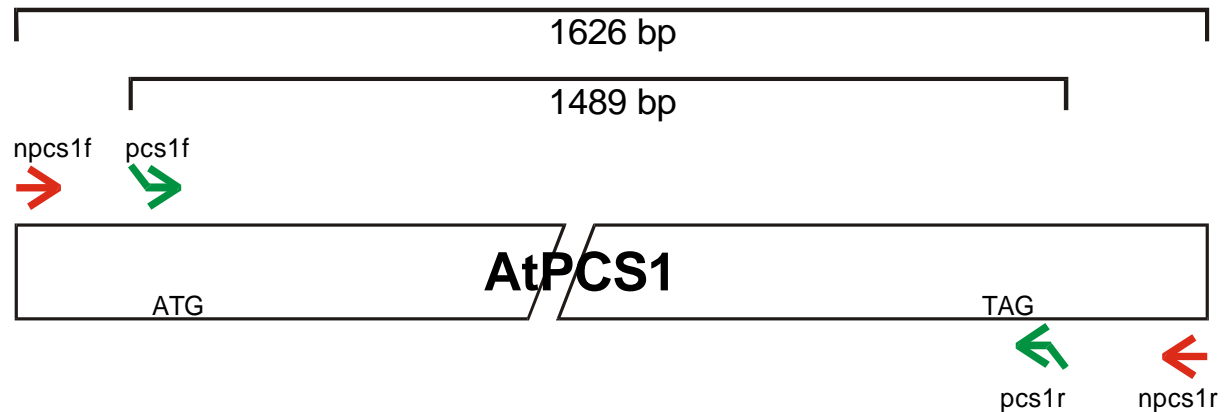
Primer pcs1r 5'-GGACTGCAGACAATGAACTAATAGGC-3'  
AtPCS1 cDNA 5'-GGATTTGGGACAATGAACTAATAGGC-3'

**npcs1f:**

Primer npc1f 5' ATCTTCCACAGCAAACACTTTTGTG-3'

**npcs1r:**

Primer npc1r 5' TTGAATCGTACAGAGAATAAAGAGA-3'



**Abbildung 22A:** Primer-Sequenzen für die Amplifikation der AtPCS1 aus *A. thaliana*-cDNA und Ligation in YTH-Vektoren (pGAD424 und pGBT9). Der forward-Primer (pcs1f) enthält eine Schnittstelle für BamH1 (markiert), der reverse-Primer (pcs1r) eine für PstI (markiert). Beide Enzyme schneiden nicht innerhalb der AtPCS1-Sequenz; sie ermöglichten es, daß das Amplifikat im Leseraster und in richtiger Orientierung in die Multiple-Cloning-Site (MCS) der YTH-Vektoren ligiert werden konnte. Zusätzlich wurden später für eine verschachtelte PCR noch äußere Primer (npc1f und npc1r) verwendet, um in einem ersten PCR-Schritt das Produkt anzureichern.

**Abbildung 22B:** Schematische Darstellung der verschachtelten PCR-Strategie. In einem ersten Schritt wurde mittels der äußeren Primer (npc1f und npc1r) ein 1626 bp langes PCR-Produkt amplifiziert; im zweiten Schritt wurde mit den inneren Primern (pcs1f und pcs1r) das gewünschte 1489 bp-Produkt (mit eingeführten Restriktionsschnittstellen) erzeugt, das für die weitere Klonierung verwendet wurde.

### **B.11.5. Gelelektrophorese und Isolation aus dem Gel**

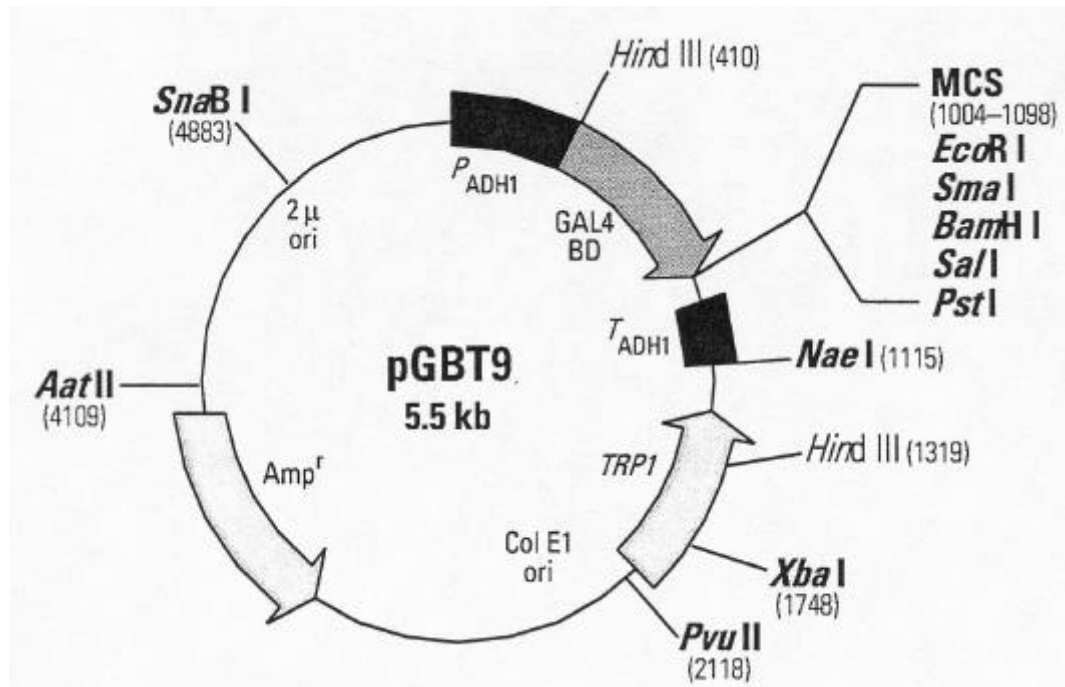
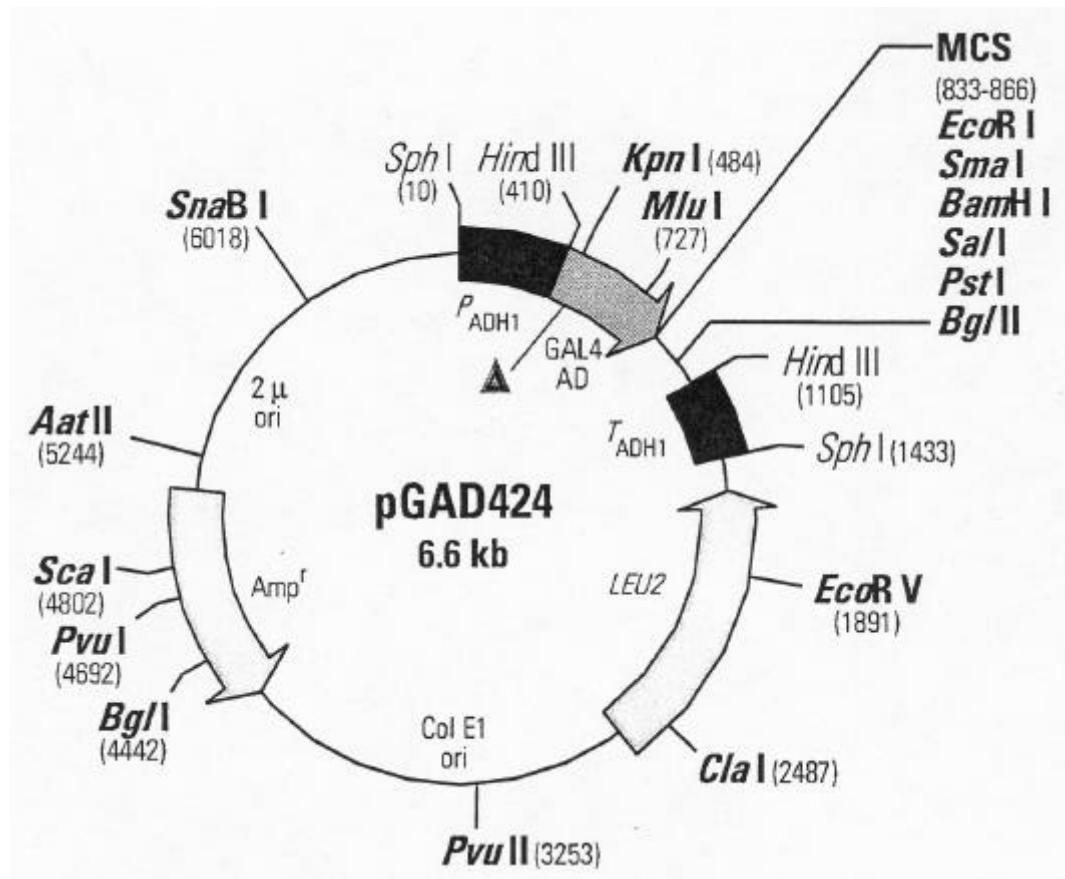
PCR-Produkte wurden mit Gel-Elektrophorese getrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die verwendeten Gele bestanden aus 1,2 % Agarose, die Elektrophorese wurde in einer Elektrophorese-Apparatur aus selbstgebauten Gelschlitten und Electrophoresis Power Supply 200 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Als Molekulargrößenmarker diente eine 1 kb-DNA-Leiter. Die Dokumentation erfolgte mit einem Geldokumentationssystem aus CCD-Kamera; Stativ Camag Reprostar 3 und Software Biorad Molecular Analyst 1.4 (alles Biorad, Hercules, CA, USA). Aufgetrennte DNA-Stücke wurden aus dem Gel mit dem Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) eluiert.

### **B.11.6. Restriktionsverdau und Ligation in Vektoren**

Um die AtPCS1-DNA in die Vektoren pGAD424 und pGBT9 zu klonieren, wurden die Vektoren und das PCR-Produkt mit den Enzymen BamHI und PstI verdaut. Dies ergab überlappende Enden bei den Vektoren und dem PCR-Produkt, die eine Klonierung in richtiger Orientierung und im Leseraster erlaubten. Restriktionsansätze enthielten 10 U des Enzyms in 100 µl und den empfohlenen Puffer, und wurden 3 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Außerdem wurden zur Analyse der Restriktionsfragmente des oben gewonnenen PCR-Produkts die Enzyme EcoRI, HindIII, NdeI, Bsu15I und XbaI verwendet. Die Ansätze enthielten 5 U des Enzyms in 15 µl und wurden 3 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Zur Ligation des PCR-Produkts in die Vektoren (pGAD424; pGBT9; pSK; Abbildung 23) wurden das PCR-Produkt in einfachem oder zehnfachem molaren Verhältnis zum Vektor eingesetzt. Die Ligation wurde in 15 µl mit 3 U Ligase 4 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt.



**Abbildung 23:** Die verwendeten Yeast-Two-Hybrid-System-Klonierungsvektoren pGAD424 und pGBT9 (nach Clontech, 1997). Beide enthalten eine MCS (Multiple Cloning Site) mit Restriktionsschnittstellen für BamH1 und PstI, in die das ATPCS1-Insert ligiert werden konnte, und zwar in der richtigen Orientierung und im Leseraster.

### **B.11.7. Transformation von *Escherichia coli* und Isolation der Vektor-DNA**

Die Transformation erfolgte in chemisch kompetente *Escherichia coli* Zellen (DH5 $\alpha$ ). Pro Ligationsansatz wurden 125  $\mu$ l auf Eis aufgetaute *E. coli*-Zellen zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann für 30 sek bei 42 °C erhitzt und mit 800  $\mu$ l LB-Medium 60 min bei 37 °C geschüttelt. 20 bzw. 200  $\mu$ l des Ansatzes wurden auf LB-Platten (mit Ampicillin) ausplattiert. Von den über Nacht bei 37 °C inkubierten Platten wurden die transformanten Kolonien gezählt und auf frischen Platten zur weiteren Verwendung ausgestrichen. Mittels Kolonie-PCR (s. oben) wurden die Transformanten darauf überprüft, daß sie das richtige Insert in der richtigen Länge trugen. In Flüssigkulturen (LB-Medium) angezogene *E. coli* wurden für die DNA-Isolierung (Miniprep) verwendet.

Miniprep-Bakterien-DNA-Isolation:

Bakterienkultur abzentrifugieren und Pellet in 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O resuspendieren;

100  $\mu$ l Lyse-Lösung (100 mM NaOH; 2 % SDS; 10 mM EDTA, pH 8.0) zugeben und durch Umdrehen vorsichtig mischen;

2 min bei 95 °C inkubieren; im weiteren auf Eis arbeiten;

50  $\mu$ l 1 M kalte MgCl<sub>2</sub> zugeben und vortexen, dann 2 min (10000 x g) zentrifugieren;

50  $\mu$ l kalte Kaliumacetat-Lösung (0,6 Vol. 5 M Kaliumacetat; 0,115 Vol. Eisessig; 0,285 Vol. H<sub>2</sub>O) zugeben, vorsichtig mischen;

nach 2 min Zentrifugieren (10000 x g) den Überstand mit 600  $\mu$ l Ethanol fällen (20 min auf Eis);

20 min zentrifugieren (10000 x g), das Pellet zweimal mit 70%-igem Ethanol waschen und jeweils wieder zentrifugieren;

das Pellet bei Raumtemperatur trocknen lassen, und in 30  $\mu$ l 1x TE bei 4 °C resuspendieren lassen;

mit 2  $\mu$ l RNAase 30 min bei Raumtemperatur inkubieren;

mit 0,1x TE auf 200  $\mu$ l verdünnen, mit 1 Vol. Phenol versetzen und mixen;

nach Zentrifugieren (13000 x g; 10 min) wässrige Phase mit 1 Vol. Phenol/Chloroform (1:1) versetzen und mixen;

nach Zentrifugieren (13000 x g; 10 min) wässrige Phase mit 1 Vol. Chloroform versetzen und mixen;

nach Zentrifugieren (13000 x g; 10 min) wässrige Phase mit 2 Vol. Ethanol und 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5.7) versetzen und DNA 10 min auf Eis fällen;

nach Zentrifugieren (15 min; 13000 x g) zweimal mit 70 % Ethanol waschen und Pellet in 30 µl TE aufnehmen.

### **B.11.8. Yeast-Two-Hybrid-Analyse**

Im Yeast-Two-Hybrid-System können Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* in Hefen getestet werden (Clontech, 1997). Dazu müssen die Hefen mit den beiden Vektoren pGAD424 und pGBT9 (jeweils mit entsprechendem Insert) kotransformiert werden. Zur Selektion der mit beiden Vektoren kotransformierten Hefen enthält der pGAD424 das *LEU2*-Gen und der pGBT9 das *TRP1*-Gen, so daß die kotransformierten Hefen (untransformiert auxotroph auf Leu, Trp) auf Medium ohne Leucin und Tryptophan wachsen können. Zur Analyse der Interaktion dient die Expression der Reportergene *HIS3* und *lacZ*. Diese werden exprimiert, wenn das Fusionsprotein aus Aktivierungsdomäne und interessierendem Protein 1 (AD-P1; in pGAD424) mit dem Fusionsprotein aus Bindedomäne und interessierendem Protein 2 (BD-P2; in pGBT9) interagiert.

Für die Transformation der Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*; HF7c; untransformiert auxotroph auf His, Leu, Trp) wurden diese über Nacht in einer Vorkultur von 30 ml SD-Medium angesetzt, die am nächsten Morgen auf 400 ml verdünnt wurde. Bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,3 wurden die Hefen mittels Zentrifugation geerntet (20 min; 5000 x g), mit H<sub>2</sub>O gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das Pellet wurde in 8 ml 0,5x TE/0,5x LiAc (d.h. 5 mM Tris-Cl pH 8.0; 0,5 mM EDTA; 50 mM Lithiumacetat) aufgenommen. Von der Suspension wurden 100 µl je Transformationsansatz genommen. Zu diesen wurden 100 ng des jeweiligen Plasmids (mit oder ohne Insert) und 100 µg Carrier-DNA pipettiert und gevortext. Als Negativkontrollen dienten Plasmide ohne Insert, als Positivkontrollen die Kombination der Vektoren pTD und pVA (im Kit von Clontech enthalten; Clontech 1997) sowie pGAD424-HB6 mit pGBT9-ABI2 (zur Verfügung gestellt von A. Himmelbach). Nach Zugabe von 300 µl PEG/1x LiAc (d.h. 40 % Polyethylenglykol; 10 mM Tris-Cl pH 8.0; 1 mM EDTA; 100 mM Lithiumacetat) und nochmaligem Vortexen wurde bei 30 °C und 200 U/min für 30 min inkubiert. Es folgte nach Zugabe von 35 µl DMSO eine Inkubation bei 42 °C für 15 min und eine Abkühlung auf Eis. Das Pellet einer Zentrifugation (10000 g; 5 min) wurde in 250 µl 1x TE aufgenommen und auf SD-Platten (-Leu -Trp) zur Selektion der Transformanten ausplattiert. Nach vier Tagen Inkubation der Platten bei 30 °C wurden für die



weiteren Untersuchungen bis zu 50 transformante Kolonien pro Konstrukt auf frische SD-Platten (-Leu -Trp) ausplattiert.

Um die Bildung von Phytochelatinen in transformierten Hefen zu testen, wurden 100 ml YPD-Medium mit je zwei Klonen pro Konstrukt für 24 h bei 30 °C inkubiert (davon die letzten 19 h mit/ohne 50 µM Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). Die Hefen wurden geerntet und mittels RP-HPLC untersucht (s. B.3.).

Die Protein-Protein-Interaktion wurde mit zwei Methoden getestet: Zum einen sollten nur die Hefen, in denen eine Interaktion zwischen AD-P1 und BD-P2 stattfindet, auf histidinfreiem Medium wachsen können. Dazu wurden bis zu 50 transformante Kolonien pro Konstrukt auf SD-Platten (-His -Leu -Trp) ausplattiert. Um zu testen, ob für die Interaktion ggf. Cd<sup>2+</sup> nötig ist, wurden außerdem SD-Platten (-His -Leu -Trp) mit Cd hergestellt, indem 1 ml 250 µM Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Lösung auf den Platten ausplattiert wurde. Auch auf diesen Platten wurden je acht Transformanten pro Konstrukt ausgestrichen. Die Platten wurden für sechs Tage bei 30°C inkubiert.

Als weiterer Test auf Protein-Protein-Interaktion kam der ONPG-Assay zur Messung der β-Galactosidase-Aktivität zum Einsatz (Clontech, 1997). Dazu wurden pro Konstrukt zwei Klone in 30 ml YPD-Medium über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Nach 20 Stunden wurden die Hefen bei 5000 x g 10 min abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml Z-Puffer (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM KCl; 1 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,27 Vol% β-Mercaptoethanol) resuspendiert. Die Suspension wurde bei 4°C abzentrifugiert (10000 x g; 10 min) und das Pellet in 650 µl Z-Puffer resuspendiert. Zum Aufschließen der Zellen wurden etwa 0,5 g Glaskügelchen zugegeben und im Minibeadbeater dreimal 30 sek gevortext. Nach Abnehmen des Überstands und Waschen der abgesetzten Glaskügelchen mit weiteren 650 µl Z-Puffer (Überstand zum vorigen Überstand hinzugefügt), wurden die vereinigten Überstände 30 min zentrifugiert (4 °C; 10000 x g). Der Überstand der Zentrifugation diente als Rohextrakt für die weiteren Schritte. 600 µl des Rohextrakts wurden mit 120 µl ONPG-Lösung (4 mg o-Nitrophenyl β-D-galaktopyranosid/ml) für 150 min bei 30 °C inkubiert, dann wurde zum Abstoppen der Reaktion 300 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung zugegeben. Nach Zentrifugieren (5 min; 10000 x g) wurde die E<sub>420nm</sub> des Überstands gemessen, die als Maß für die Aktivität der β-Galaktosidase diente.

### **B.11.9. Datenbanksuchen und Sequenzvergleiche**

Im Internet wurde mit dort vorhandenen Programmen eine Suche nach Peptidsequenzen, die zur AtPCS1 homolog sind, durchgeführt. Die Suche erfolgte mit BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) in den dort vorhandenen Datenbanken „nr“ (non redundant), „dbest“ (database of expressed sequence tags) und „Drosophila Genome“.

Mithilfe der Programme auf der Internetseite von HUSAR (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/w2h/w2hdkfz/index.shtml>) wurden Sequenzvergleiche angestellt. Zwei einzelne Peptidsequenzen wurden mit dem Programm „GAP“ verglichen; ein Alignment mehrerer Sequenzen wurde mit „Clustal“ durchgeführt.



## C. Ergebnisse und Teildiskussion

### C.1. Effekt der Elemente Cadmium, Blei und Quecksilber sowie einiger anderer Metalle (Eisen, Kupfer, Zinn, Vanadium, Chrom, Molybdän, Cobalt)

Zunächst soll die Rolle der Phytochelatine bei der Entgiftung einiger Elemente diskutiert werden, die als „klassische“ Schwermetalle gelten. Es sind dies Cadmium, Blei und Quecksilber. Insbesondere Cadmium ist in seiner Wirkung auf Organismen gut untersucht, die Reaktion von Pflanzen auf Cadmium wurde beispielsweise in einem neueren Übersichtsartikel zusammengefaßt (Sanità di Toppi & Gabrielli, 1999). Die Phytochelatine als wichtigste pflanzliche schwermetallentgiftende Peptide wurden zunächst als cadmium-bindende Peptide entdeckt (Grill et al., 1985). Da auch danach die meisten Untersuchungen über Phytochelatine mit Cadmium durchgeführt wurden, sollen hier nur einige wenige Experimente dargestellt werden, im wesentlichen um als Vergleichsmaterial für andere Elemente zu dienen. Cadmium induziert Phytochelatine von den untersuchten Elementen am stärksten (Grill et al., 1987); aus diesem Grund wurde Cadmium in den meisten Versuchen mit anderen Elementen als positive Kontrolle verwendet. In den entsprechenden Abbildungen (v.a. HPLC-Profilen) wird jeweils darauf verwiesen.

Auch Blei und Quecksilber induzieren Phytochelatine (Grill et al., 1987); über die Phytochelatin-Komplexe dieser Elemente gibt es allerdings nur wenige Untersuchungen. Zwar konnten an rekonstituierten Komplexen spektroskopische Untersuchungen durchgeführt werden (Mehra et al., 1995, 1996a), jedoch ist über die *in vivo* Komplexe fast nichts bekannt. In zwei Arbeiten konnte mittels Gelfiltration kein Pb-PC-Komplex nachgewiesen werden (Maitani et al., 1996; Leopold et al., 1998), während Grill (1989) kurz die Reinigung des Pb-PC-Komplexes berichtete. Daher sollte neben der Induktion von Phytochelatinen in Abhängigkeit von der  $Pb^{2+}$ - oder  $Hg^{2+}$ -Konzentration untersucht werden, ob mit Gelfiltration ein Pb-PC-Komplex und ein Hg-PC-Komplex nachgewiesen werden kann.

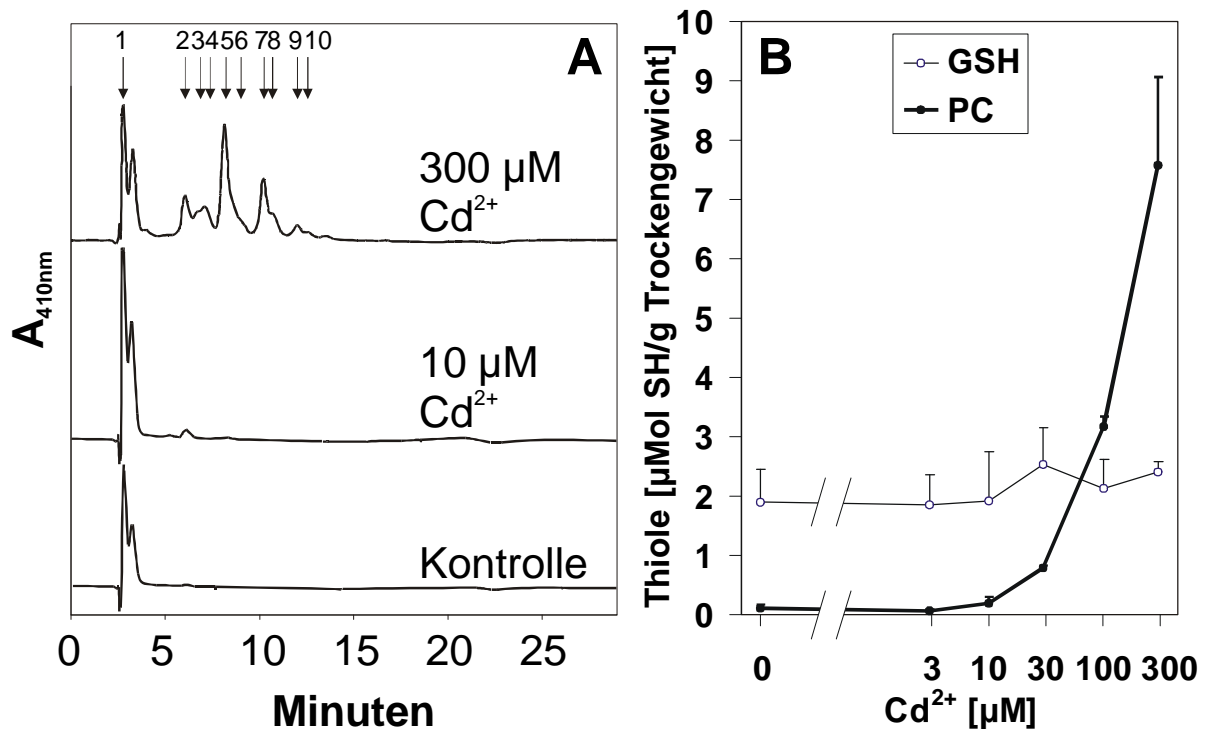
In weiteren Versuchen sollten noch einige andere Metallionen getestet werden. Zum einen die bekannt phytochelatin-induzierenden Elemente Kupfer ( $Cu^{2+}$ ) und Zinn ( $Sn^{2+}$ ), zum anderen einige Elemente, die nach Grill et al. (1987) keine Phytochelatine induzieren. Dies waren

Eisen, Vanadium, Chrom, Molybdän und Cobalt. Deren wachstumshemmende Wirkung und deren Effekt auf die Thiole sollten in Zellkulturen untersucht werden.

### C.1.1. Cadmium

Neben den sonst zumeist verwendeten *Rauvolfia serpentina*-Zellkulturen wurden auch Zellkulturen von *Agrostis tenuis* mit Cadmium belastet. In *Agrostis* (wie auch in anderen Gräsern) werden neben den Phytochelatinen, die ein C-terminales Glycin enthalten, auch hydroxymethyl-Phytochelatine (hm-PCs) gebildet, also solche, die ein C-terminales Serin enthalten (Klapheck et al., 1994). Es sollte untersucht werden, ob auch die Zellkulturen von *Agrostis tenuis* diese hydroxymethyl-Phytochelatine produzieren, und ob mit unserer HPLC-Methode die Trennung und der Nachweis gelingt. Tatsächlich zeigten sich in den HPLC-Profilen (Abbildung 24A) neben dem jeweils prominentesten Peak (eigentliche Phytochelatine) noch zwei Peaks, die etwas später eluierten. Die Peakmaxima waren beispielsweise bei 6,07 Minuten (PC<sub>2</sub>) und 6,73 Minuten bzw. 7,20 Minuten; eine vollständige Baseline-Trennung der drei Peaks wurde jedoch zumeist nicht erreicht. Die Identifikation erfolgte anhand der Retentionszeit nach Klapheck et al. (1994). Danach waren die Peaks wahrscheinlich zu identifizieren als desgly-PC<sub>2</sub> (RT=6,73 Minuten) und hydroxymethyl-PC<sub>2</sub> (RT=7,20 Minuten); auch bei den längeren PCs traten kleinere Peaks oder Schultern auf, diese waren jedoch noch schlechter vom eigentlichen PC-Peak getrennt als beim PC<sub>2</sub>.

Die Menge der gebildeten Phytochelatine (aller Familien) nahm mit der Cd-Konzentration im Medium zu (Abbildung 24B); bei 300 µM Cd, einer Konzentration, die das Wachstum der Zellkultur nicht beeinträchtigte, wurden 7,6 µMol/g Trockengewicht Phytochelatine (als SH-Gruppen) gebildet. Davon waren ca. 30 % desgly-PCs und hm-PCs, ein Anteil, der sich auch bei den anderen Cd-Konzentrationen fand. Ähnlich wie bei der PC-Induktion durch Cd<sup>2+</sup> in *Rauvolfia serpentina* (Grill et al., 1987) waren die PC<sub>3</sub>-Moleküle die häufigsten, gefolgt von PC<sub>2</sub> und PC<sub>4</sub>, und geringen Mengen von PC<sub>5</sub> und PC<sub>6</sub>; die Glutathion-Konzentration nahm nicht ab.

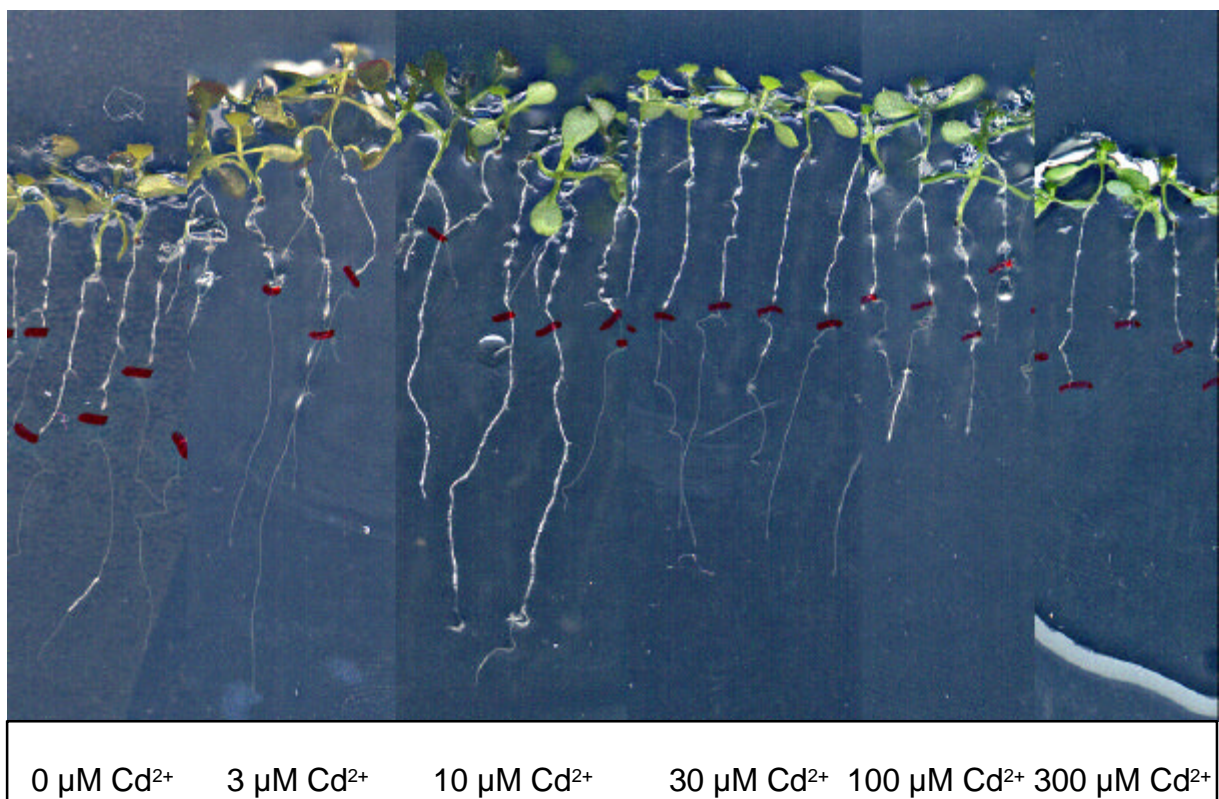


**Abbildung 24A:** Thiol-Analyse von Extrakten aus *Agrostis tenuis*-Zellkulturen. Die HPLC-Elutionsprofile zeigen Extrakte aus Zellen, die für vier Tage mit 10 oder 300  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  behandelt wurden; das unterste Chromatogramm ist die unbehandelte Kontrolle. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Peaks sind: 1 (Glutathion  $\gamma\text{ECG}$ ; GSH), 2 ( $(\gamma\text{EC})_2\text{G}$ ;  $\text{PC}_2$ ), 3 ( $(\gamma\text{EC})_2$ ; desgly- $\text{PC}_2$ ), 4 ( $(\gamma\text{EC})_2\text{S}$ ; hm- $\text{PC}_2$ ), 5 ( $(\gamma\text{EC})_3\text{G}$ ;  $\text{PC}_3$ ), 6 ( $(\gamma\text{EC})_3$  und  $(\gamma\text{EC})_3\text{S}$ ; desgly- $\text{PC}_3$  und hm- $\text{PC}_3$ ), 7 ( $(\gamma\text{EC})_4\text{G}$ ;  $\text{PC}_4$ ), 8 ( $(\gamma\text{EC})_4$  und  $(\gamma\text{EC})_4\text{S}$ ; desgly- $\text{PC}_4$  und hm- $\text{PC}_4$ ), 9 ( $(\gamma\text{EC})_5\text{G}$ ;  $\text{PC}_5$ ), 10 ( $(\gamma\text{EC})_5$  und  $(\gamma\text{EC})_5\text{S}$ ; desgly- $\text{PC}_5$  und hm- $\text{PC}_5$ ).

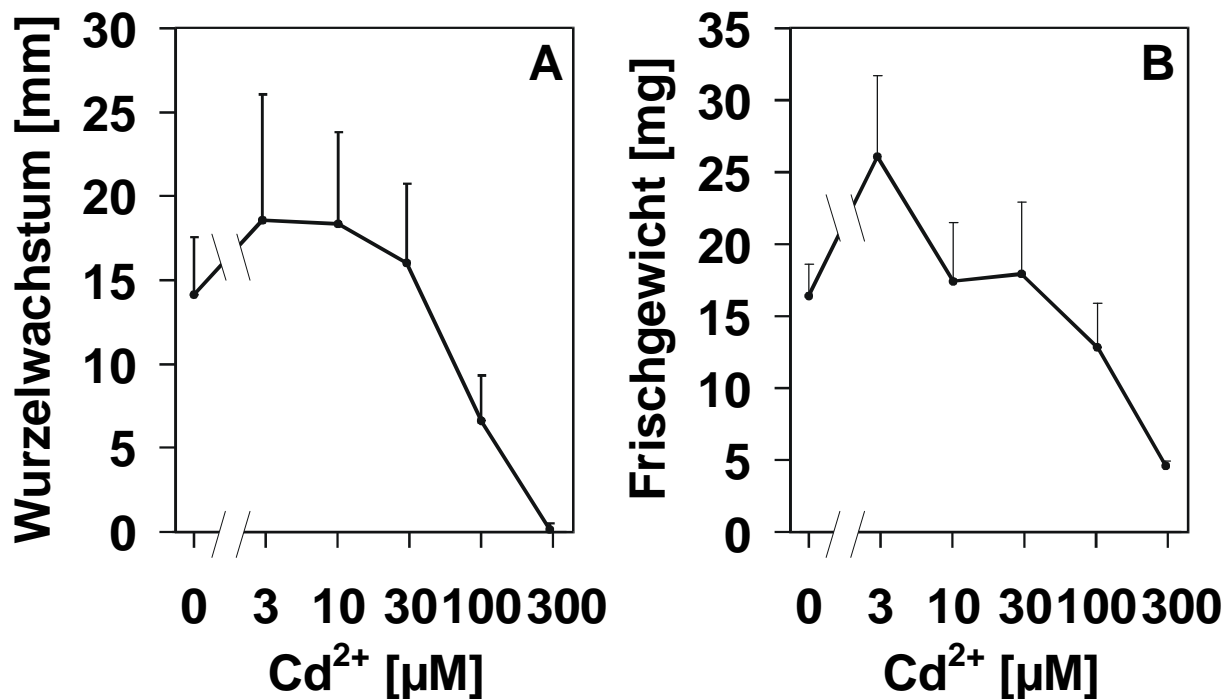
**Abbildung 24B:** Thiole (Glutathion und Phytochelatine) in *Agrostis tenuis*-Zellkulturen behandelt mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cadmium. In *Agrostis tenuis* sind neben den herkömmlichen  $\gamma(\text{EC})_n\text{G}$ -Peptiden auch desgly-PCs ( $\gamma(\text{EC})_n$ ) und hydroxymethyl-PCs ( $\gamma(\text{EC})_n\text{S}$ ) vorhanden; die dargestellten PCs repräsentieren die Summe dieser drei Peptid-Familien. Die Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung ( $n=2$ ).

Um die Reaktionen von Zellkulturen mit denen von differenzierten Pflanzen zu vergleichen, wurden Keimlinge von *Arabidopsis thaliana* auf Agar-Platten untersucht. Zum einen wurde der Einfluß von Schwermetallen (hier:  $\text{Cd}^{2+}$ ) auf das Wachstum, zum anderen auf die Bildung von Phytochelatinen getestet.

Das Wachstum der Keimlinge, die nach einer Woche von normalem MS-Medium auf cadmiumhaltiges transferiert worden waren, wurde anhand des Wurzelwachstums (sechs Tage nach dem Transfer) und anhand des Frischgewichts beim Ernten (14 Tage nach dem Transfer) bestimmt. Einige Keimlinge, die sechs Tage auf unterschiedlichen Konzentrationen von  $\text{Cd}^{2+}$  gewachsen waren, sind in Abbildung 25 dargestellt. Geringe Cd-Konzentrationen (bis  $30\ \mu\text{M}$ ) regten das Wurzelwachstum an; erst bei mehr als  $30\ \mu\text{M}$  Cadmium war das Wurzelwachstum deutlich gehemmt, bei  $300\ \mu\text{M}$  fand kein Wurzelwachstum mehr statt (Abbildung 26A). Auch das Frischgewicht war höher bei Keimlingen, die mit  $3\ \mu\text{M}$  Cadmium belastet worden waren, als bei der Kontrolle ohne Cadmium; erst bei über  $30\ \mu\text{M}$  war das Frischgewicht geringer als bei der Kontrolle (Abbildung 26B). Der Effekt von Cadmium auf die Keimung war gering: nach 14 Tagen auf MS-Platten mit  $100\ \mu\text{M}$  oder  $300\ \mu\text{M}$  Cadmium waren 97 % der Samen gekeimt, bei der Kontrolle waren es 100 %.



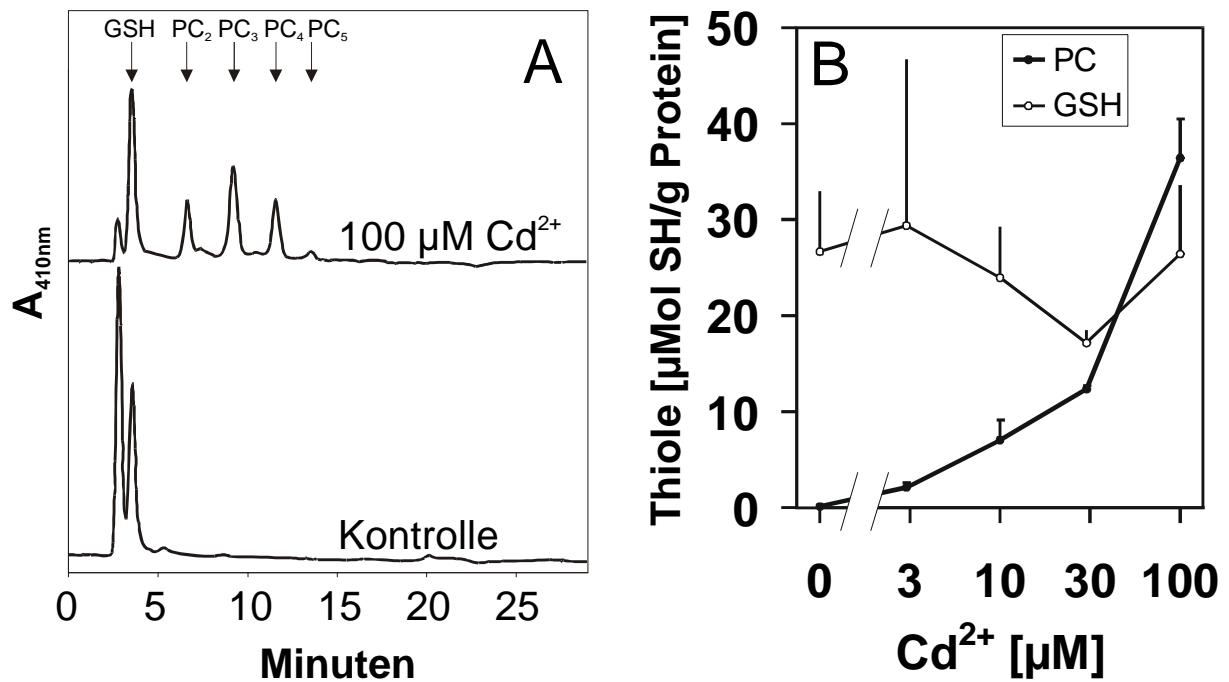
**Abbildung 25:** *Arabidopsis thaliana*-Keimlinge (RLD) sechs Tage nach dem Transfer von MS-Agar-Platten auf MS-Agar-Platten mit den angegebenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen. Unmittelbar nach dem Transfer wurden die Wurzelspitzen mit rotem Stift markiert; die Verlängerung der Hauptwurzel in sechs Tagen auf Cadmium wurde als Indikator für die Toxizität des Schwermetalls benutzt.



**Abbildung 26:** Wurzelwachstum (A) und Frischgewicht (B) von Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* (RLD). Die Keimlinge wurden nach einer Woche von MS-Agar-Platten auf MS-Agar-Platten mit der angegebenen Cadmium-Konzentration transferiert. Das Wurzelwachstum individueller Keimlinge (Mittelwert mit Standardabweichung; n=20) wurde sechs Tage nach dem Transfer bestimmt, das Frischgewicht von Pools aus je 10 Keimlingen (Mittelwert mit Standardabweichung; n=4) 14 Tage nach dem Transfer.

*Arabidopsis*-Keimlinge produzierten bei Belastung mit Cadmium Phytochelatine (Abbildung 27A); ähnlich wie bei Zellkulturen überwog PC<sub>3</sub> vor PC<sub>2</sub>, PC<sub>4</sub> und längeren PCs. Bereits bei einer Konzentration von 3 µM Cadmium enthielten die Keimlinge etwa 30mal mehr PC als die unbelastete Kontrolle (2,1 gegenüber 0,07 µMol SH-Gruppen in PC/g Protein) (Abbildung 27B). Bei 100 µM erreichten die Phytochelatine eine Konzentration von 36 µMol SH-Gruppen in PC/g Protein, bei 300 µM Cadmium sogar etwa 230 µMol. Auf Gesamtprotein bezogen erhöhte sich der Anteil der γ-GluCys-Peptide (Glutathion und Phytochelatine) von 0,8 Gewichtsprozent in der Kontrolle auf 7,2 Gewichtsprozent bei 300 µM Cadmium.





**Abbildung 27A:** Thiol-Analyse von Extrakten aus *Arabidopsis*-Keimlingen. Das HPLC-Elutionsprofil zeigt einen Extrakt aus Keimlingen, die für 14 Tage mit 100 µM Cd<sup>2+</sup> behandelt wurden; das untere Chromatogramm ist die unbehandelte Kontrolle. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Peaks sind: Glutathion γECG (GSH), (γEC)<sub>2</sub>G (PC<sub>2</sub>), (γEC)<sub>3</sub>G (PC<sub>3</sub>), (γEC)<sub>4</sub>G (PC<sub>4</sub>) und (γEC)<sub>5</sub>G (PC<sub>5</sub>).

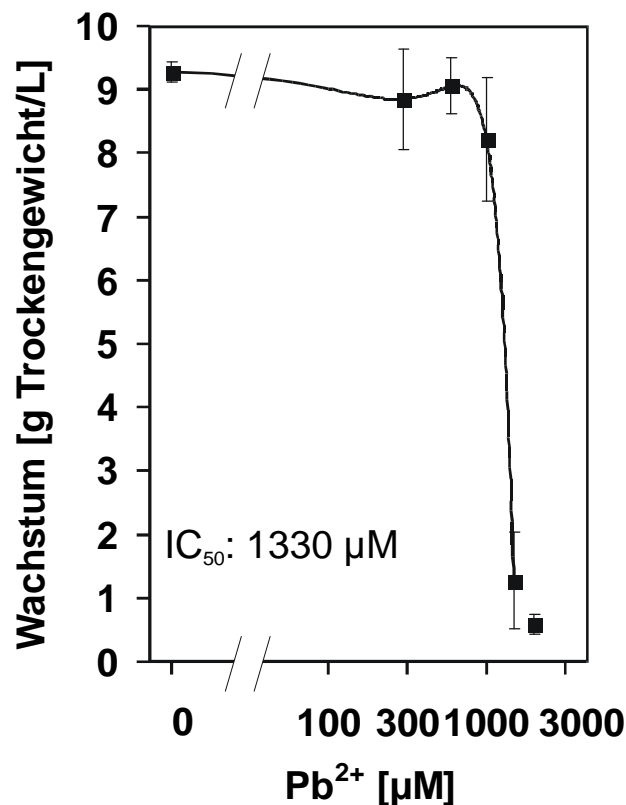
**Abbildung 27B:** Phytochelatine und Glutathion in cadmium-belasteten *Arabidopsis*-Keimlingen. Die Keimlinge wurden nach einer Woche von MS-Platten auf MS-Platten mit der angegebenen Cd-Konzentration transferiert. Nach weiteren 14 Tagen wurden je 10 Keimlinge gepoolt und auf Protein, Phytochelatine und Glutathion analysiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=4).

### C.1.2. Blei

Blei ist ein Schwermetall, dessen Freisetzung in die Umwelt durch anthropogenen Einfluß in den letzten Jahrzehnten stark zunahm, besonders durch die Verwendung von verbleitem Kraftstoff. Das in verbleitem Benzin enthaltene Antiklopfmittel Tetraethylblei ist eine sehr flüchtige und sehr toxische Verbindung, während anorganische Bleisalze aufgrund ihrer teilweise sehr geringen Löslichkeit weniger toxisch wirken.

Insbesondere Bleisulfat (PbSO<sub>4</sub>) ist in Wasser nahezu unlöslich (Wiberg, 1985); dies erschwerte auch die Untersuchungen von Pflanzen oder Zellkulturen in Medien, die größere

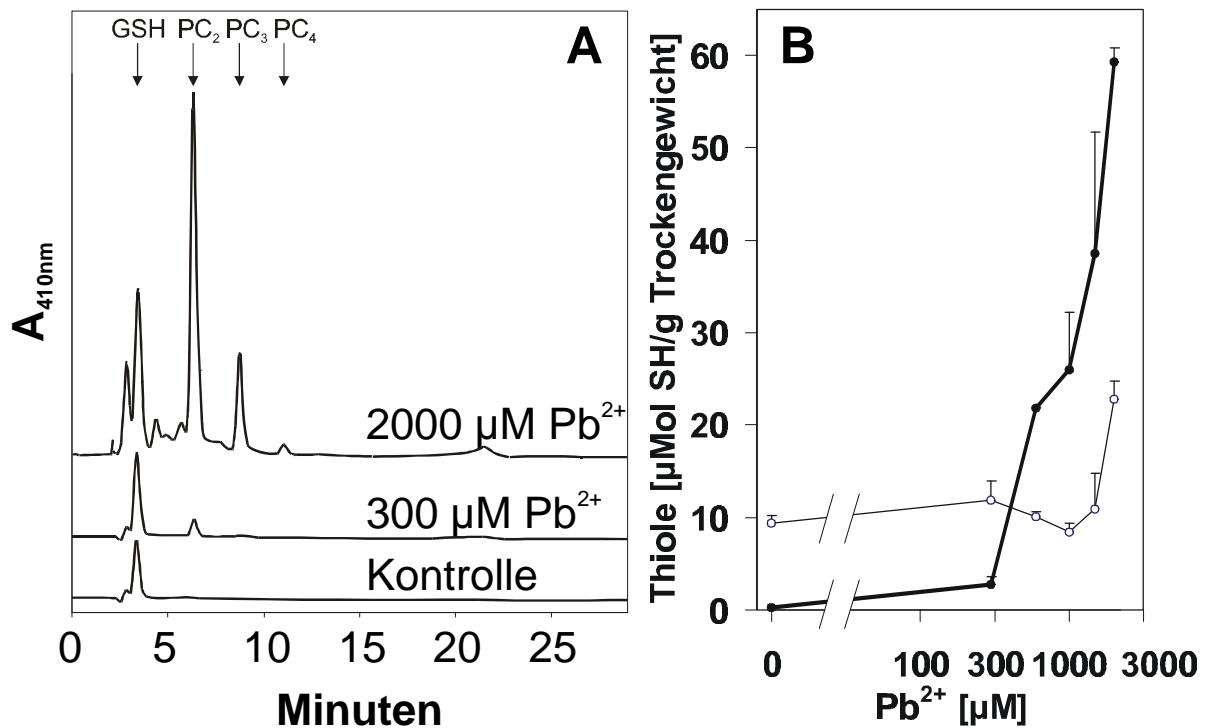
Mengen Sulfat enthalten. MS-Medium oder LS-Medium enthalten beispielsweise ca. 1,7 mM Sulfat. Für die Versuche, in denen Bleisalze ins Medium gegeben wurden, mußten dementsprechend hohe Konzentrationen eingesetzt werden, um sichtbare Effekte zu bewirken. Die eingesetzten Konzentrationen entsprachen jedoch nicht den tatsächlich wirksamen, da die Masse des Bleis als Bleisulfat ausgefallen war; Versuche in sulfatfreiem Medium verliefen nicht zufriedenstellend, da die Zellen weder ohne Schwefelquelle überlebensfähig waren noch ein adäquater Ersatz für Sulfat gefunden wurde.



**Abbildung 28:** Wachstum von *Rauvolfia serpentina*-Zellkulturen in Abhängigkeit von der Konzentration von zugegebenem Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Wachstum ist definiert als Zunahme des Trockengewichts (g/L) in vier Tagen, ausgehend von einem Inokulum von 9,3 (± 0,4) g/L. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=2).

Erst ab einer Konzentration von 1 mM (zugegebenem Blei) bewirkte Blei eine Verminderung des Wachstums von Zellkulturen (Abbildung 28), bei 2 mM war das Wachstum fast völlig gehemmt. Die in die Zellen aufgenommenen Pb<sup>2+</sup>-Ionen induzierten die Bildung von Phytochelatinen, wobei hauptsächlich PC<sub>2</sub>, weniger PC<sub>3</sub> und nur geringe Mengen PC<sub>4</sub> und PC<sub>5</sub> gebildet wurden (Abbildung 29). Obwohl bereits bei geringen Pb-Konzentrationen

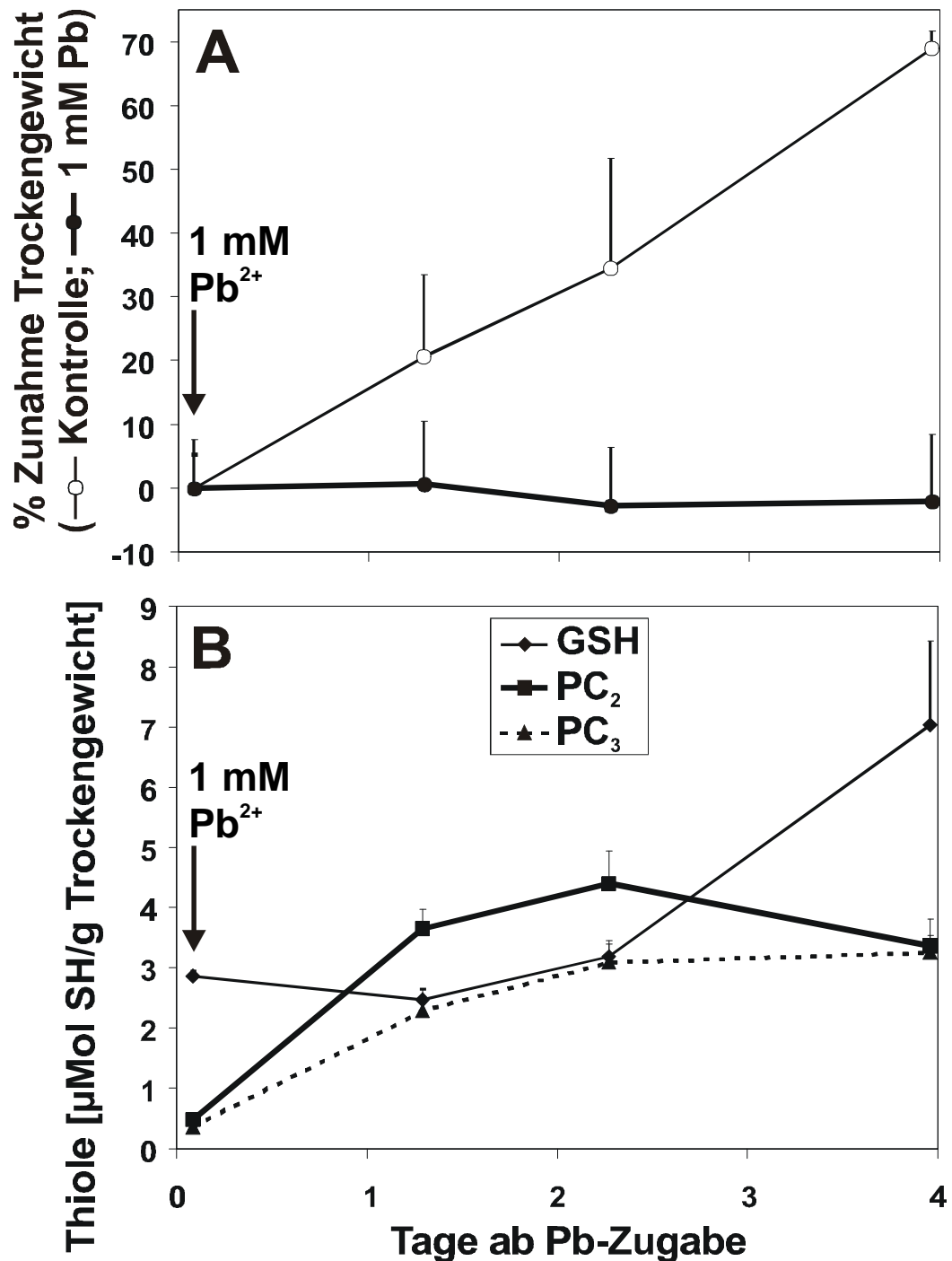
Phytochelatine gebildet wurden (z.B. 100  $\mu\text{M}$ ), stieg doch die PC-Produktion erst ab 500  $\mu\text{M}$  stärker an und erreichte ein Maximum bei 2 mM  $\text{Pb}^{2+}$ ; dabei wurden fast 60  $\mu\text{Mol}$  Phytochelatine als SH/g Trockengewicht gebildet, also etwa das 250fache der unbelasteten Kontrolle. Auch die Glutathion-Konzentration stieg an, wenn mehr als 1 mM  $\text{Pb}^{2+}$  ins Medium gegeben worden war.



**Abbildung 29A:** Thiol-Analyse von Extrakten aus *Rauvolfia serpentina*-Zellkulturen. Die HPLC-Elutionsprofile zeigen Extrakte aus Zellen, die für vier Tage mit 2000  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  oder 300  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  behandelt wurden; das unterste Chromatogramm ist die unbelastete Kontrolle. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Peaks sind: Glutathion  $\gamma\text{ECG}$  (GSH),  $(\gamma\text{EC})_2\text{G}$  (PC<sub>2</sub>),  $(\gamma\text{EC})_3\text{G}$  (PC<sub>3</sub>) und  $(\gamma\text{EC})_4\text{G}$  (PC<sub>4</sub>).

**Abbildung 29B:** Thiole (Glutathion und Phytochelatine) in *Rauvolfia serpentina*-Zellkulturen behandelt mit unterschiedlichen Konzentrationen von  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  für vier Tage. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung ( $n=2$ ).

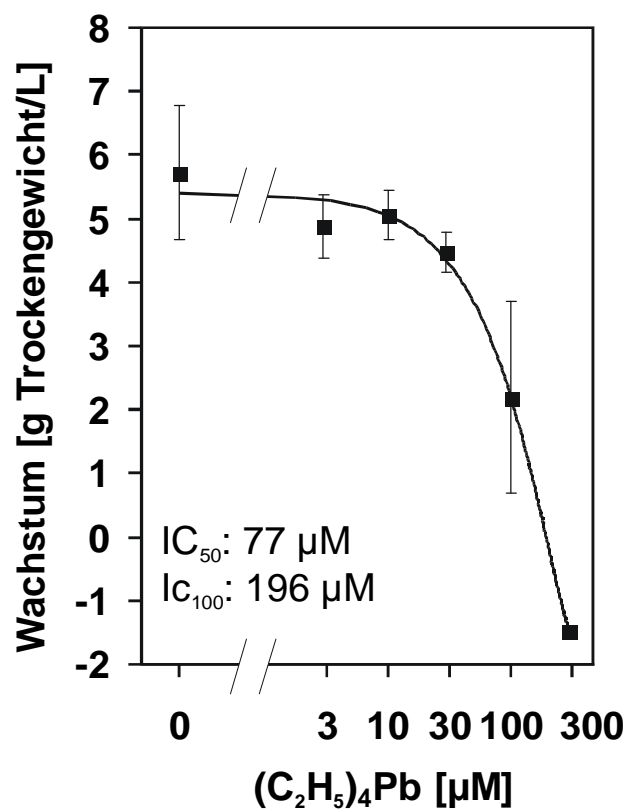
Die Kinetik eines Versuchs der Belastung von Zellkulturen mit 1 mM  $\text{Pb}^{2+}$  ist in Abbildung 30 dargestellt. Das Wachstum der belasteten Zellen war von Anfang an gehemmt, d.h. es fand überhaupt keine Zunahme der Biomasse statt, während die unbelastete Kontrolle in vier Tagen



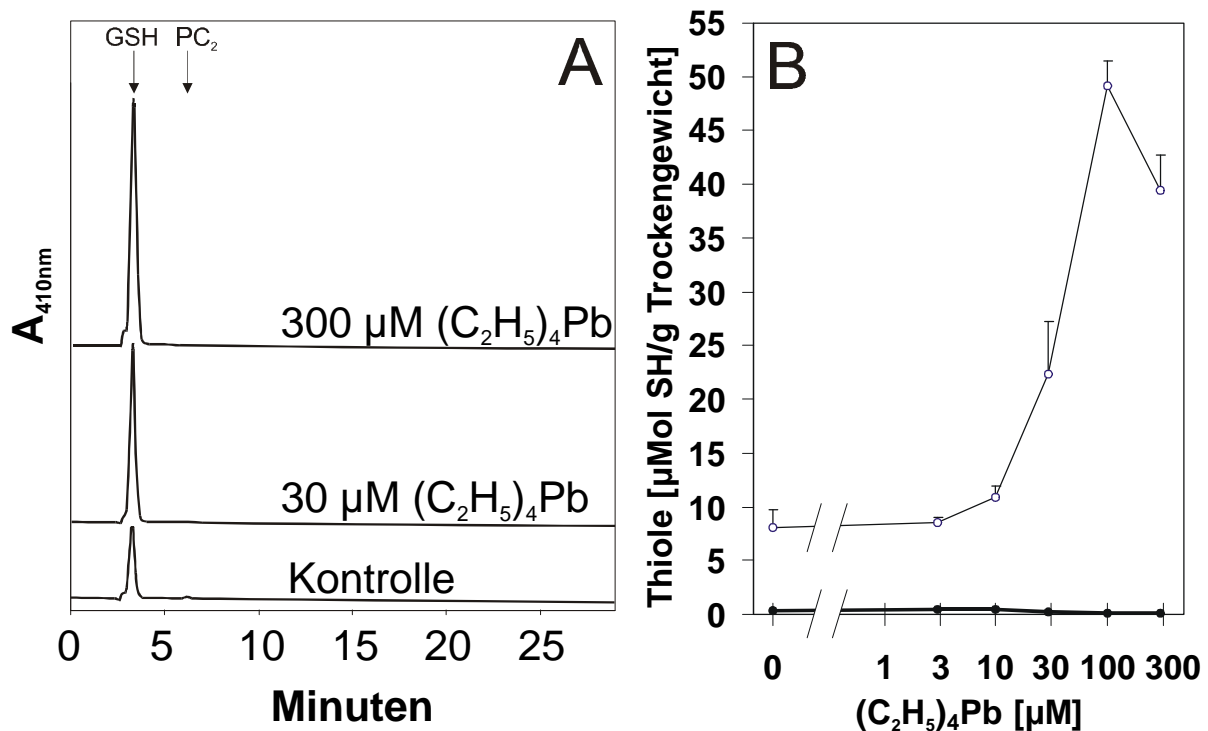
**Abbildung 30:** Kinetik des Wachstums und der Phytochelatin-Bildung in *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen. Die Zellen wurden drei Tage nach Überimpfen in frisches Medium mit 1 mM  $Pb(NO_3)_2$  belastet (Tag 0); täglich wurden drei Aliquots aus den Kolben entnommen und abgenutscht. In A ist das Wachstum der belasteten und unbelasteten Kultur als Zunahme des Trockengewichts bezogen auf den Tag 0 dargestellt. In B sind die Konzentrationen der Thiole Glutathion,  $PC_2$  und  $PC_3$  in der belasteten Kultur dargestellt ( $PC_4$  war mit maximal 0,48  $\mu$ Mol SH/g Trockengewicht vernachlässigbar).

fast 70% Biomasse zulegte. Die Konzentration der Phytochelatine (hier nur PC<sub>2</sub> und PC<sub>3</sub> dargestellt, da PC<sub>4</sub> nur in geringen Mengen gebildet wurde) nahm bis zum dritten Tag zu und erreichte dann ein Plateau; die Glutathion-Konzentration nahm ebenfalls nach kurzem Absinken wieder zu.

Neben den anorganischen Blei-Salzen wurde auch die Wirkung des Antiklopfmittels Tetraethylblei (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>Pb auf pflanzliche Zellkulturen untersucht. Dieses hatte bereits bei recht geringen Konzentrationen (10 µM) einen wachstumshemmenden Effekt, 100 µM bewirkte mehr als 50 % Wachstumshemmung (Abbildung 31).



**Abbildung 31:** Wachstum von *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen in Abhängigkeit von der Konzentration von Tetraethylblei (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>Pb. Wachstum ist definiert als Zunahme des Trockengewichts (g/L) in vier Tagen, ausgehend von einem Inokulum von 8,8 (± 0,3) g/L. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=2).



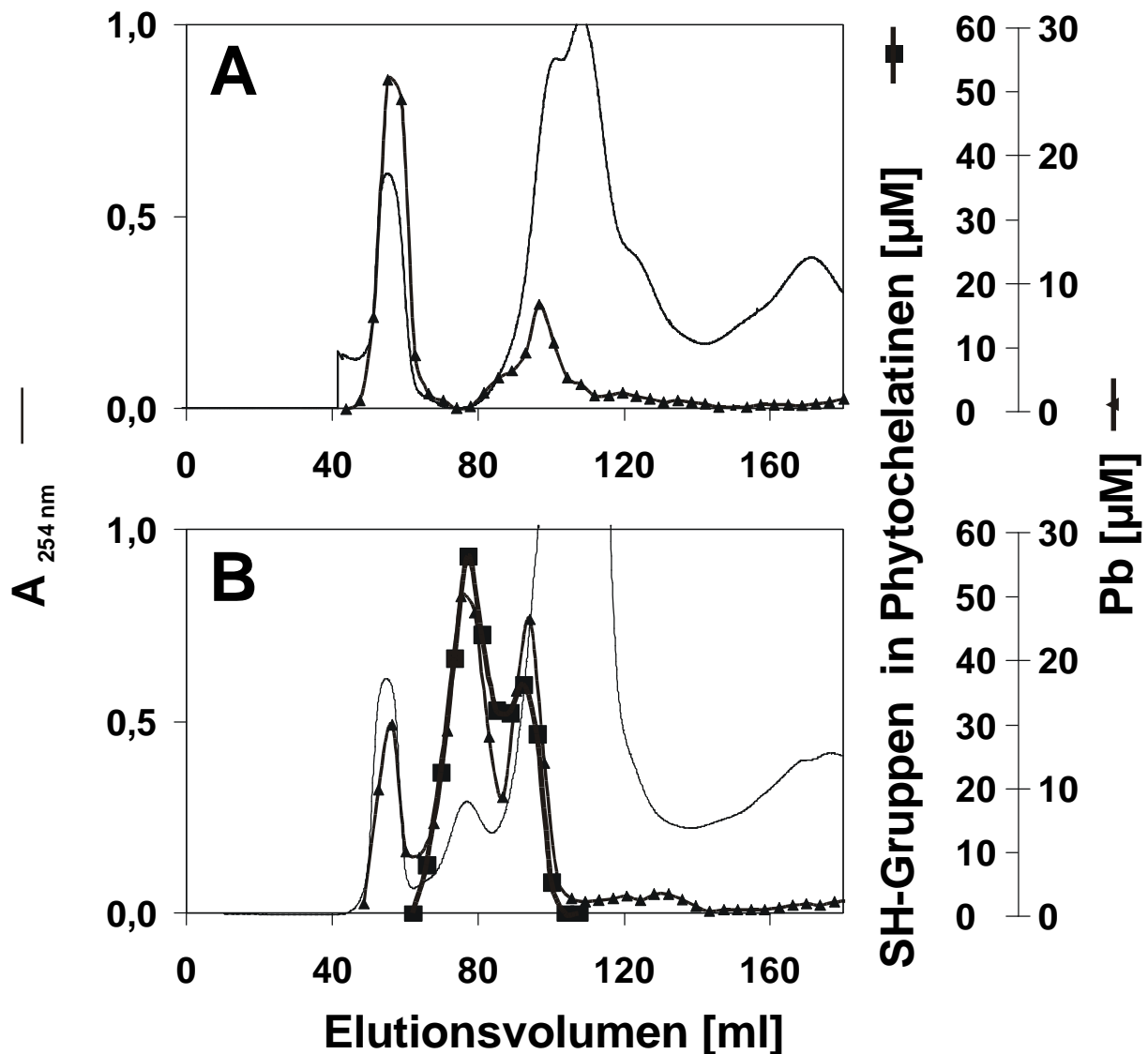
**Abbildung 32A:** Thiol-Analyse von Extrakten aus *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen. Die HPLC-Elutionsprofile zeigen Extrakte aus Zellen, die für vier Tage mit 300 μM oder 30 μM (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>Pb behandelt wurden; das unterste Chromatogramm ist die unbehandelte Kontrolle. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Peaks sind: Glutathion γECG (GSH) und (γEC)<sub>2</sub>G (PC<sub>2</sub>).

**Abbildung 32B:** Thiole (Glutathion und Phytochelatine) in *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen behandelt mit unterschiedlichen Konzentrationen von (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>Pb für vier Tage. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=2).

Allerdings bildeten die Zellkulturen als Reaktion auf Tetraethylblei keine Phytochelatine: die Konzentration von PC<sub>2</sub> blieb bei jeder getesteten Tetraethylblei-Konzentration unter 0,5 μMol SH/g Trockengewicht (Abbildung 32). Die Glutathion-Konzentration hingegen stieg bis 100 μM (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Pb stark an (bei 300 μM waren die Zellen bereits abgestorben; s. Abbildung 31); die erreichte Glutathion-Konzentration von fast 50 μMol/g Trockengewicht war fast sechsmal höher als die Konzentration in der Kontrolle.

Im Gegensatz zu den Cd-Phytochelatin-Komplexen sind die Pb-Phytochelatin-Komplexe wenig untersucht. In zwei Arbeiten konnte mit Gelfiltration kein Komplex nachgewiesen werden (Maitani et al., 1996; Leopold et al., 1998). Andererseits hatten Mehra et al. (1995) Pb-PC-Komplexe rekonstituiert und spektroskopisch untersucht. Daher erschien es interessant

zu versuchen, den Komplex nachzuweisen und ggf. zu reinigen; die Reinigung des Komplexes wurde bei Grill (1989) kurz erwähnt.



**Abbildung 33:** Gelfiltrationen von Extrakten aus *Rauwolfia serpentina*-Zellen. Die Zellen wurden mit 10 mM Tris-Cl (pH 8.0) extrahiert; 8 ml des Extrakts wurden auf eine Sephadex G25-Säule (1,6 x 64 cm;  $V_0=55 \text{ ml}$ ;  $V_t=130 \text{ ml}$ ) aufgetragen und mit 10 mM Tris-Cl (pH 8.0) in 100 mM NaCl eluiert. Die Fraktionen wurden mittels RP-HPLC auf Thiole und mittels AAS auf Blei getestet.

**A:** Extrakt aus unbelasteten Zellen, dem  $10 \mu\text{Mol Pb}^{2+}$  zugesetzt worden war.

**B:** Extrakt aus Zellen, die für vier Tage mit  $1 \text{ mM Pb}^{2+}$  belastet worden waren.

Um die Existenz eines Pb-PC-Komplexes zu zeigen, wurden Gelfiltrationsexperimente durchgeführt. Eine Gelfiltration, die als Kontrolle diente, ist in Abbildung 33A dargestellt.

Dabei wurden einem Rohextrakt aus unbelasteten *Rauwolfia serpentina*-Zellen 10  $\mu\text{Mol}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  zugesetzt und die Lösung mit einer Sephadex G25-Säule aufgetrennt. Neben dem Blei, das mit den Proteinen eluierte (ca. 59 % des Pb) erschien ein Blei-Peak bei 95 ml Elutionsvolumen (enthielt ca. 33 % des Pb). Die Gelfiltration eines Extrakts aus Blei-belasteten Zellen ist in Abbildung 33B dargestellt. Bereits am UV-Profil war ein deutlicher Unterschied zur Kontrolle erkennbar: zwischen dem Protein-Peak und dem Peak der niedermolekularen Substanzen tauchte ein weiterer UV-absorbierender Peak bei 77 ml Elutionsvolumen auf. Dieser korrespondierte mit dem zweiten Pb-Peak. Der erste Pb-Peak enthielt das an Proteine gebundene Pb (etwa 18 % des gesamten Pb), der zweite Peak enthielt vor allem  $\text{PC}_3$  und etwas  $\text{PC}_2$  und  $\text{PC}_4$  sowie 47 % des gesamten Pb, der dritte Pb-Peak vor allem  $\text{PC}_2$  und 29 % des gesamten Pb. Der dritte Peak erschien bei einem Elutionsvolumen von 95 ml und war damit nicht von dem zweiten Pb-Peak in der Kontroll-Gelfiltration zu unterscheiden (Abbildung 33A). Die Konzentrationen in den beiden Phytochelatin-haltigen Peaks waren in guter Übereinstimmung mit der Vorstellung, daß je zwei SH-Gruppen ein  $\text{Pb}^{2+}$  komplexieren: im ersten Peak war das Verhältnis SH:Pb 2,1:1, im zweiten 1,9:1; die Korrelation zwischen der Pb- und der PC-Konzentration in diesen Fraktionen war hochsignifikant ( $r=0,94$ ;  $p<0,001$ ). Diese Daten legen nahe, daß unter den gewählten Bedingungen der Gelfiltration ein Komplex zwischen  $\text{Pb}^{2+}$  und Phytochelatinen existiert.

Nach beschriebenen Methoden (Grill, 1989; Grill et al., 1991) sollte eine Reinigung der Komplexe durchgeführt werden. Die übliche Abfolge Ionenaustauscherchromatographie, Ammoniumsulfat-Fällung, Ultrafiltration, Gelfiltration führte jedoch zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis (Tabelle 5). Bei drei aufeinanderfolgenden Versuchen mit den gleichen Zellen gingen von dem im Rohextrakt vorhandenen Blei 66 ( $\pm 11$ ) % bei der Anionenaustauscherchromatographie, 31 ( $\pm 13$ ) % bei der Ammoniumsulfat-Fällung, 2 ( $\pm 2$ ) % bei der Ultrafiltration verloren, so daß am Ende weniger als 2 % des Blei übrigblieben; von den Phytochelatinen ging ähnlich viel verloren: 67 ( $\pm 9$ ) % bei der Anionenaustauscherchromatographie, 24 ( $\pm 3$ ) % bei der Ammoniumsulfat-Fällung, 5 ( $\pm 6$ ) % bei der Ultrafiltration, so daß am Ende etwa 4 % übrigblieben. Auch bei einigen weiteren Versuchen konnte keine gute Aufreinigung erzielt werden, wobei auffiel, daß zwar am Ende immer nur ein sehr geringer Anteil des Komplexes übrigblieb, der Verlust bei den einzelnen Reinigungsschritten jedoch nicht gut reproduzierbar war. Bei den meisten



Reinigungsversuchen stellte sich jedoch die Ammoniumsulfat-Fällung als der Schritt heraus, bei dem am meisten Verlust durch Ausfallen von  $\text{PbSO}_4$  auftrat.

Obwohl bereits bei der Anionenaustauscherchromatographie viel Blei und Phytochelatine verloren gingen, sollte gerade der Fällungs-Schritt möglichst optimiert werden. Um das Ausfallen von unlöslichem  $\text{PbSO}_4$  zu verhindern, wurden andere Verbindungen (Ammoniumacetat, Kaliumhydrogenphosphat, Aceton, Ethanol) verwendet, die mit  $\text{Pb}^{2+}$  keine unlöslichen Verbindungen bilden. Auch diese Versuche blieben erfolglos, da diese wiederum Proteine nicht selektiv genügend fällten. Daher wurde im weiteren nicht mehr versucht, auf diese Weise den Pb-Phytochelatin-Komplex zu reinigen.

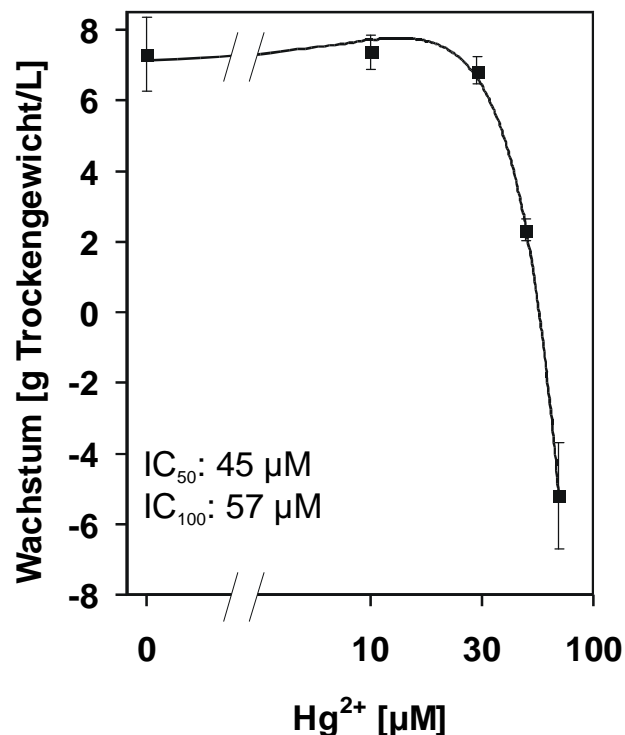
	Reinigung 1		Reinigung 2		Reinigung 3	
	% PC	% Pb	%PC	% Pb	%PC	% Pb
<b>Rohextrakt</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
<b>DEAE-Pool</b>	26,1	23,7	42,4	33,9	30,1	14,7
<b>Überstand Ammoniumsulfatfällung</b>	5,4	4,7	17,4	5,9	3,6	1,3
<b>Überstand Ultrafiltration</b>	3,2	1,6	5,3	3,5	3,6	0,6

**Tabelle 5:** Versuche, den Pb-Phytochelatin-Komplex nach Grill et al. (1991) zu reinigen. Dargestellt sind drei Versuche, aus den gleichen Zellen (zuvor für vier Tage mit 1 mM  $\text{Pb}^{2+}$  belastete *Rauwolfia serpentina*-Zellen), mittels DEAE-Anionenaustauscherchromatographie, Ammoniumsulfat-Fällung und Ultrafiltration den Komplex anzureichern (Details s. Material und Methoden). Tabelliert ist, wieviel der ursprünglich vorhandenen Phytochelatine und wieviel des ursprünglich vorhandenen Pb nach jedem Reinigungsschritt verblieben waren.

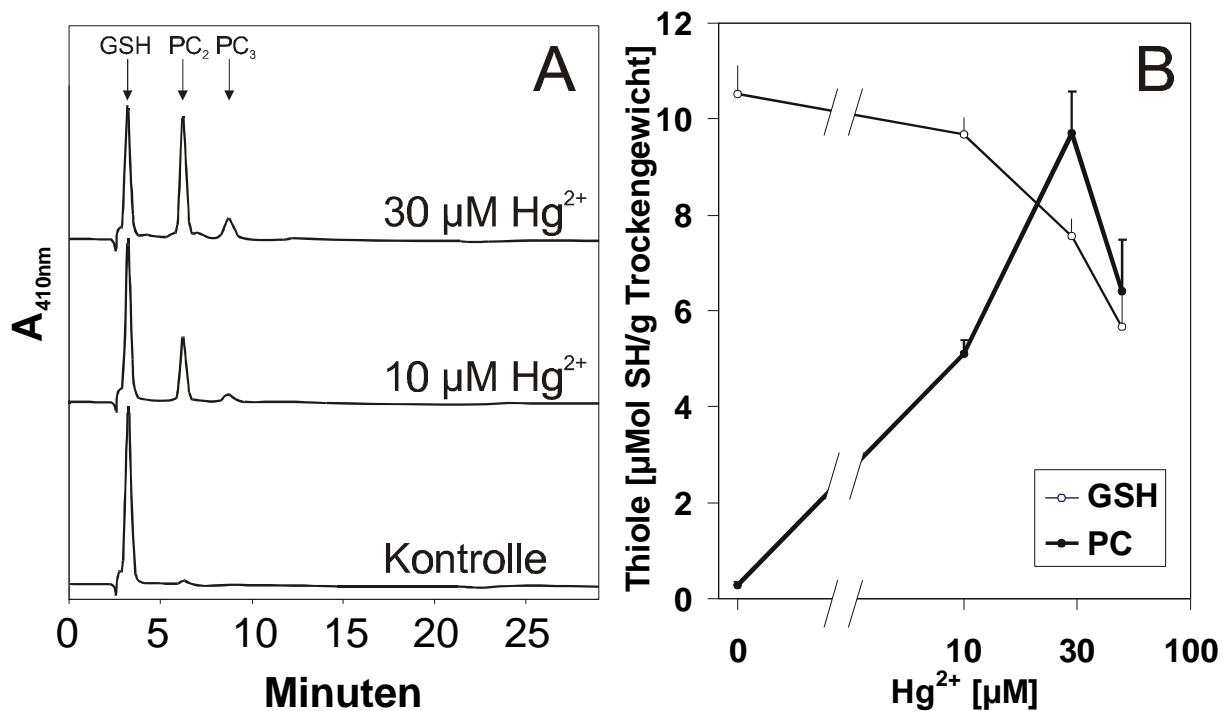
### C.1.3. Quecksilber

Quecksilber (Hg) gilt als besonders toxisches Element, v.a. in seiner kationischen Form (Clarkson, 1998). Auch pflanzliche Zellkulturen (*Rauvolfia serpentina*) wurden durch  $\text{Hg}^{2+}$  besonders stark im Wachstum gehemmt (Abbildung 34): bereits etwa  $45 \mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$  führten zu 50 % Wachstumshemmung, und  $57 \mu\text{M}$  führten zu völliger Hemmung des Wachstums.

Die Zellkulturen reagierten durch die Bildung von Phytochelatinen (Abbildung 35), wobei auch beim Quecksilber vorwiegend  $\text{PC}_2$  gebildet wurde, weniger  $\text{PC}_3$  und kaum  $\text{PC}_4$ . Bis zu  $30 \mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$  nahm die PC-Konzentration zu und erreichte ein Maximum von fast  $10 \mu\text{Mol}$  SH-Gruppen pro g Trockengewicht;  $50 \mu\text{M}$  hemmte die Zellen offensichtlich so stark, daß nicht mehr so viel Phytochelatine gebildet wurden, bei  $70 \mu\text{M}$  waren die Zellen bereits abgestorben (s. Abbildung 34), so daß Phytochelatine nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Über den getesteten Konzentrationsbereich nahm die Konzentration von Glutathion kontinuierlich ab.



**Abbildung 34:** Wachstum von *Rauvolfia serpentina*-Zellkulturen in Abhängigkeit von der Konzentration von  $\text{Hg}^{2+}$ . Wachstum ist definiert als Zunahme des Trockengewichts (g/L) in vier Tagen, ausgehend von einem Inokulum von  $8,7 (\pm 0,1)$  g/L. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n=3$ ).

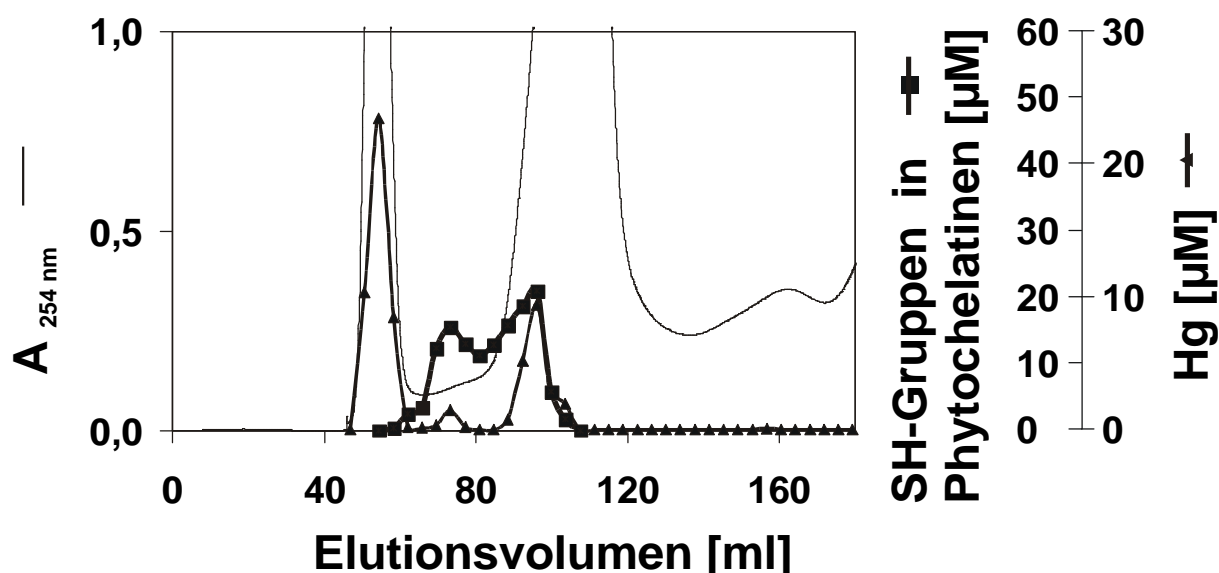


**Abbildung 35A:** Thiol-Analyse von Extrakten aus *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen. Die HPLC-Elutionsprofile zeigen Extrakte aus Zellen, die für vier Tage mit 30 μM Hg<sup>2+</sup> oder 10 μM Hg<sup>2+</sup> behandelt wurden; das unterste Chromatogramm ist die unbehandelte Kontrolle. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Peaks sind: Glutathion γECG (GSH), (γEC)<sub>2</sub>G (PC<sub>2</sub>) und (γEC)<sub>3</sub>G (PC<sub>3</sub>).

**Abbildung 35B:** Phytochelatine und Glutathion in *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen in Abhängigkeit von der Hg<sup>2+</sup>-Konzentration. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=3).

Ähnlich wie die Blei-Phytochelatin-Komplexe sind die Phytochelatin-Komplexe mit Quecksilber wenig bekannt. In der bisher umfangreichsten Untersuchung, in der die Komplexe von Phytochelatinen mit unterschiedlichen Elementen mittels Gelfiltration studiert wurden (Maitani et al., 1996), konnte Hg aus technischen Gründen nicht verwendet werden. Daher erschien es interessant, die Hg-Spezies in Extrakten aus Hg-belasteten Zellen mittels Gelfiltration zu untersuchen.

In der Gelfiltration eluierte Hg in drei Peaks (Abbildung 36): im ersten eluierte das an Proteine gebundene Quecksilber, im zweiten und dritten das an Phytochelatine gebundene; freies Hg trat nicht auf. Auffällig war die große Menge an Quecksilber, das an Proteine



**Abbildung 36:** Gelfiltration von  $\text{Hg}^{2+}$ -belasteten *Rauwolfia serpentina*. Die für vier Tage mit  $30 \mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$  belasteten Zellen wurden mit  $10 \text{ mM}$  Tris-Cl ( $\text{pH}$  8.0) extrahiert;  $8 \text{ ml}$  des Extrakts wurden auf eine Sephadex G25-Säule ( $1,6 \times 64 \text{ cm}$ ;  $V_0=55 \text{ ml}$ ;  $V_t=130 \text{ ml}$ ) aufgetragen und mit  $10 \text{ mM}$  Tris-Cl ( $\text{pH}$  8.0) in  $100 \text{ mM}$  NaCl eluiert. Die Fraktionen wurden mittels RP-HPLC auf Thiole und mittels AAS auf Quecksilber getestet.

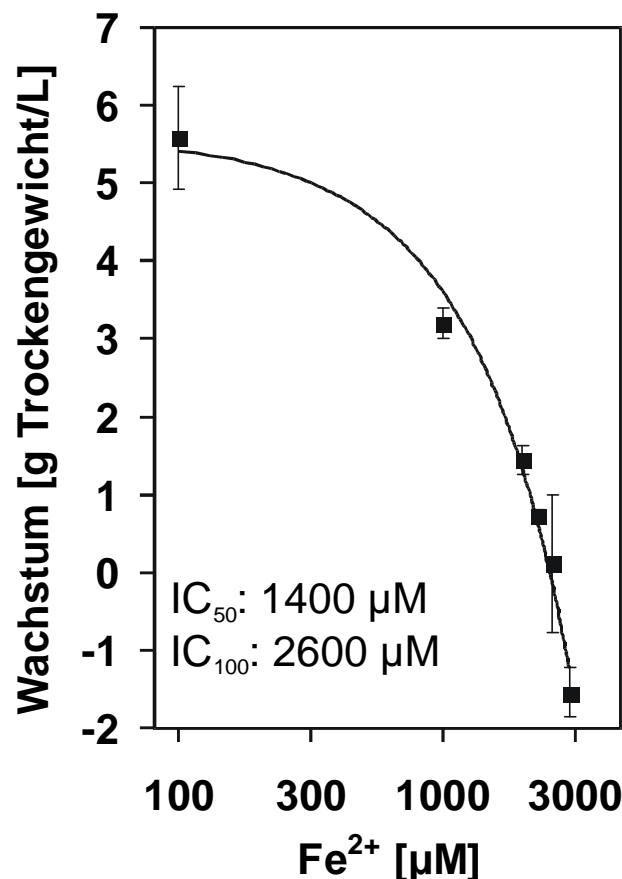
	nMol 1.Peak (Protein)	nMol 2.Peak (PC <sub>3</sub> )	nMol 3.Peak (PC <sub>2</sub> )	nMol alle Peaks
Phytochelatine als SH-Gruppe	4	207	298	510
Anteil PC an gesamtem PC	0,8%	40,7%	58,6%	100%
$\text{Hg}^{2+}$	161	10	79	250
Anteil Hg an gesamtem Hg	64,4%	4,0%	31,6%	100%
<b>Verhältnis PC-SH: <math>\text{Hg}^{2+}</math></b>	<b>0,02</b>	<b>20,9</b>	<b>3,8</b>	<b>2,04</b>

**Tabelle 6:** Bilanz der Fraktionierung eines Extrakts aus  $\text{Hg}^{2+}$ -belasteten *Rauwolfia serpentina*-Zellen mittels Gelfiltration (s. Abbildung 36). Die drei quecksilberhaltigen Peaks entsprachen einem Elutionsvolumen von  $46\text{-}61 \text{ ml}$  (1.Peak; enthielt die Proteine),  $61\text{-}82 \text{ ml}$  (2. Peak; enthielt hauptsächlich  $\text{PC}_3$ ),  $82\text{-}106 \text{ ml}$  (3. Peak, enthielt hauptsächlich  $\text{PC}_2$ ). Die Hauptmenge des Quecksilbers eluierte mit den Proteinen, die gemessenen PC-Mengen würden jedoch ausreichen, um das Quecksilber im Verhältnis  $2:1$  (SH: $\text{Hg}^{2+}$ ) zu komplexieren.

gebunden war (64 %; s. Tabelle 6). Der zweite Quecksilber-Peak enthielt zwar viel Phytochelatine (v.a. PC<sub>3</sub>), jedoch nur geringe Mengen Quecksilber, was zu einem sehr hohen SH:Hg<sup>2+</sup>-Verhältnis führte; im dritten Peak hingegen ergab die hohe Phytochelatin- und Quecksilber-Konzentration ein Verhältnis SH:Hg<sup>2+</sup> von etwa 4:1. Die gesamte Menge an Phytochelatinen im Extrakt (integriert aus den Daten der Gelfiltration) würde ausreichen, um das enthaltene Quecksilber im Verhältnis 2:1 zu komplexieren.

#### C.1.4. Eisen, Kupfer, Zinn

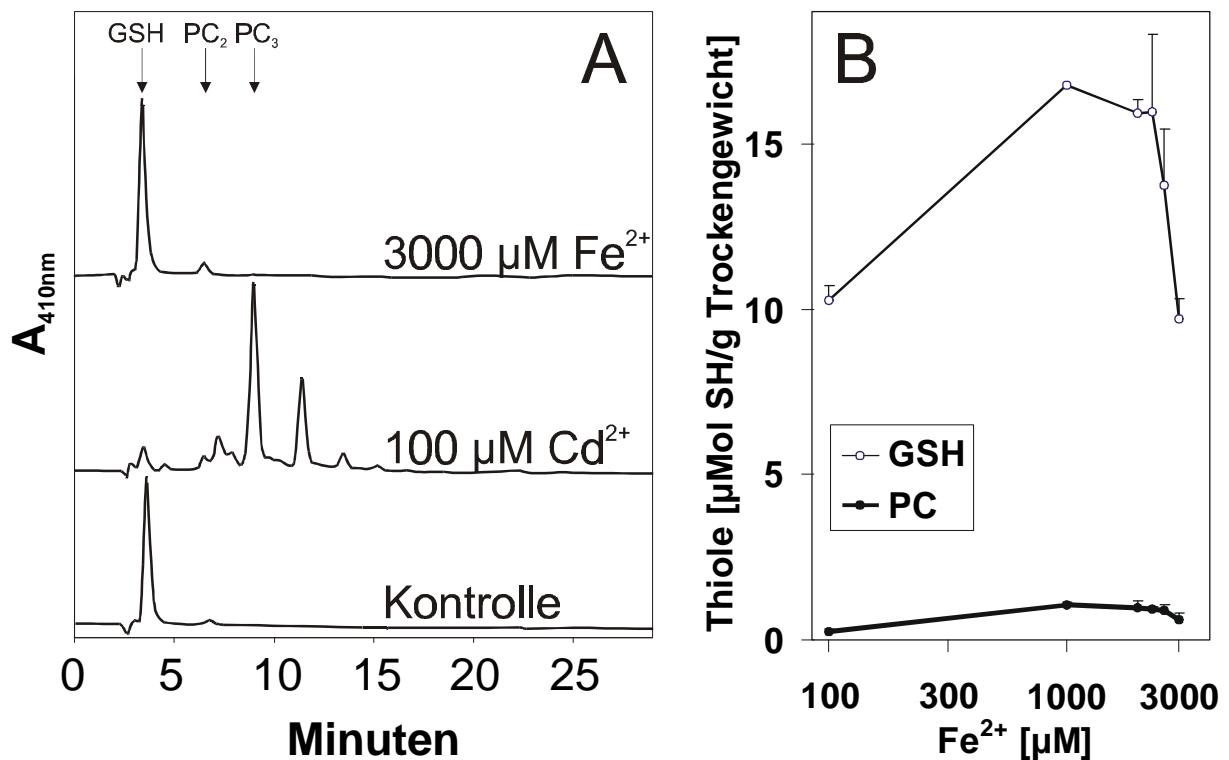
Drei weitere Metalle wurden etwas genauer untersucht, und zwar Eisen, Kupfer und Zinn. Bei allen drei wurde getestet, inwieweit sie das Wachstum von *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen beeinflussen und wie sie die Bildung von Phytochelatinen induzieren. Während Cu<sup>2+</sup> und Sn<sup>2+</sup>



**Abbildung 37:** Wachstum von *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen in Abhängigkeit von der Konzentration von FeSO<sub>4</sub> (die unbehandelte Kontrolle enthielt 100 µM FeSO<sub>4</sub>, die normale Konzentration im LS-Medium). Wachstum ist definiert als Zunahme des Trockengewichts (g/L) in vier Tagen, ausgehend von einem Inokulum von 8,6 (± 0,1) g/L. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=2).

als phytochelatin-induzierende Elemente bekannt waren (Grill et al., 1987), war von  $\text{Fe}^{2+}$  keine Induktion von Phytochelatinen bekannt. Maitani et al. (1996) berichteten jedoch die Bindung von  $\text{Fe}^{2+}$  an Phytochelatine, die durch Zugabe von  $\text{Ag}^+$  induziert worden waren. In einem Vorversuch konnten Phytochelatin-Peaks im HPLC-Chromatogramm beobachtet werden; daher wurden mehrere  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentrationen (1 mM oder mehr) getestet.

Die normale Konzentration von  $\text{Fe}^{2+}$  im LS-Medium beträgt 100  $\mu\text{M}$ . Bei den erhöhten Konzentration des Versuchs traten wachstumshemmende Effekte auf, und zwar hemmten etwa 1400  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  das Wachstum zu 50 %, etwa 2600  $\mu\text{M}$  zu 100 % (Abbildung 37).

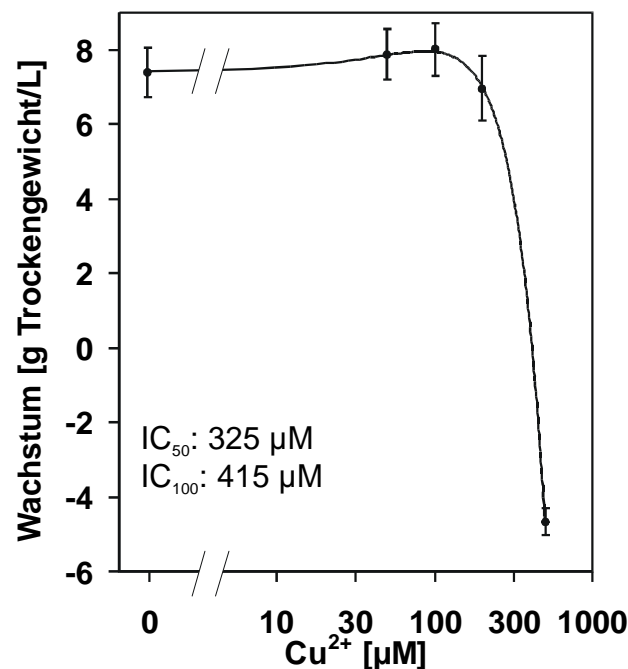


**Abbildung 38A:** Thiol-Analyse von Extrakten aus *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen. Die HPLC-Elutionsprofile zeigen Extrakte aus Zellen, die für vier Tage mit 3000  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  oder 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  behandelt wurden; das unterste Chromatogramm ist die unbehandelte Kontrolle. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Peaks sind: Glutathion  $\gamma\text{ECG}$  (GSH),  $(\gamma\text{EC})_2\text{G}$  ( $\text{PC}_2$ ) und  $(\gamma\text{EC})_3\text{G}$  ( $\text{PC}_3$ ).

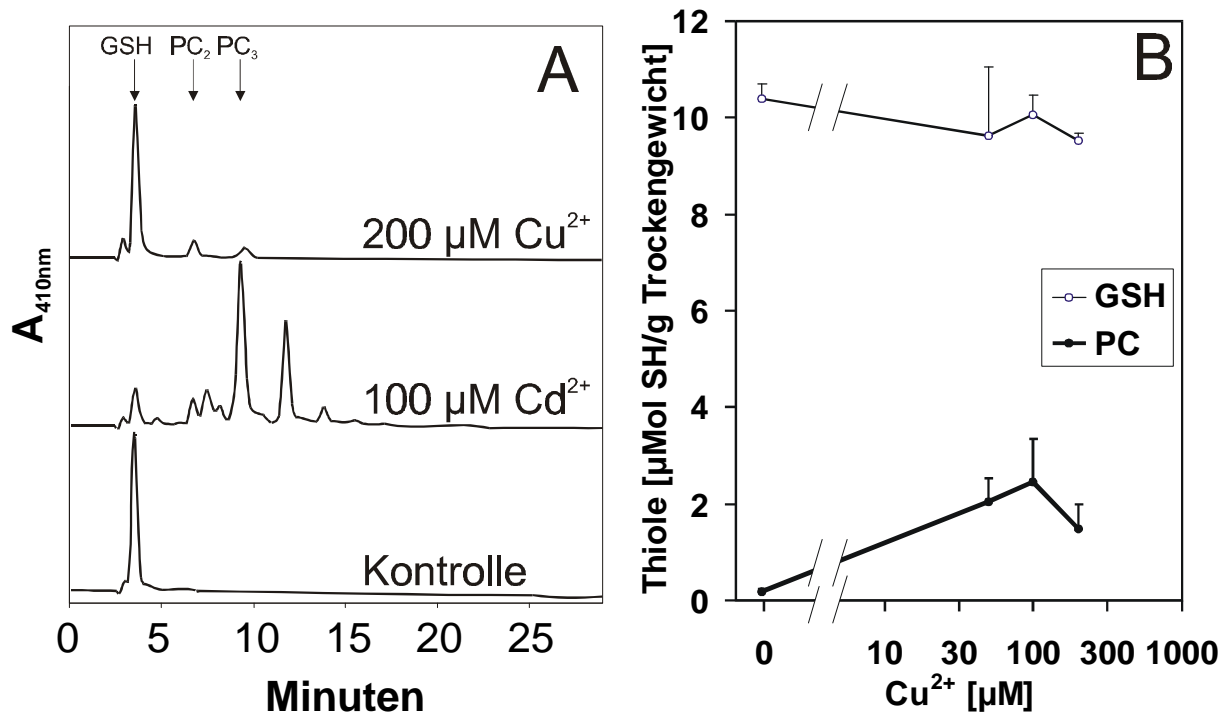
**Abbildung 38B:** Phytochelatine und Glutathion in *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen in Abhängigkeit von der  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung ( $n=2$ ).

Eisen induzierte eine (nicht sehr starke) Bildung von Phytochelatinen (Abbildung 38): Die PC<sub>2</sub>-Menge war in den mit 1000 µM Fe<sup>2+</sup> behandelten Zellen etwa viermal höher als in der Kontrolle, und fiel bei höheren Konzentrationen wieder ab. Auch die Glutathion-Konzentration war leicht erhöht; auch hier wurde das Maximum (1,6 mal höhere Konzentration als die Kontrolle) bei 1000 µM Fe<sup>2+</sup> erreicht, bei höheren Fe-Konzentrationen fiel die GSH-Konzentration wieder ab.

Kupfer ist bekannt dafür, daß es Phytochelatine induziert (Grill et al., 1987). Obwohl Kupfer ein für Pflanzen essentielles Element ist, zeigte es beträchtliche Toxizität in Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina* (Abbildung 39). Die Konzentration, die das Wachstum 50% hemmte, war etwa 325 µM; bei 500 µM waren die Zellen bereits abgestorben. Die Phytochelatin-Induktion durch Cu<sup>2+</sup> war signifikant, jedoch deutlich schwächer als durch Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> oder Hg<sup>2+</sup> (s. Abbildungen 29, 35). Die höchste Phytochelatin-Konzentration wurde bei einer Cu<sup>2+</sup>-Konzentration von 100 µM erreicht; sie betrug 2,5 µMol SH/g Trockengewicht und war damit 13mal höher als in der Kontrolle (Abbildung 40). Die gebildeten Phytochelatine waren ausschließlich PC<sub>2</sub> und PC<sub>3</sub>; die Glutathion-Konzentration wurde nicht beeinflusst.



**Abbildung 39:** Wachstum von *Rauvolfia serpentina*-Zellkulturen in Abhängigkeit von der Konzentration von Cu<sup>2+</sup>. Wachstum ist definiert als Zunahme des Trockengewichts (g/L) in vier Tagen, ausgehend von einem Inokulum von 8,6 (± 0,8) g/L. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=2).

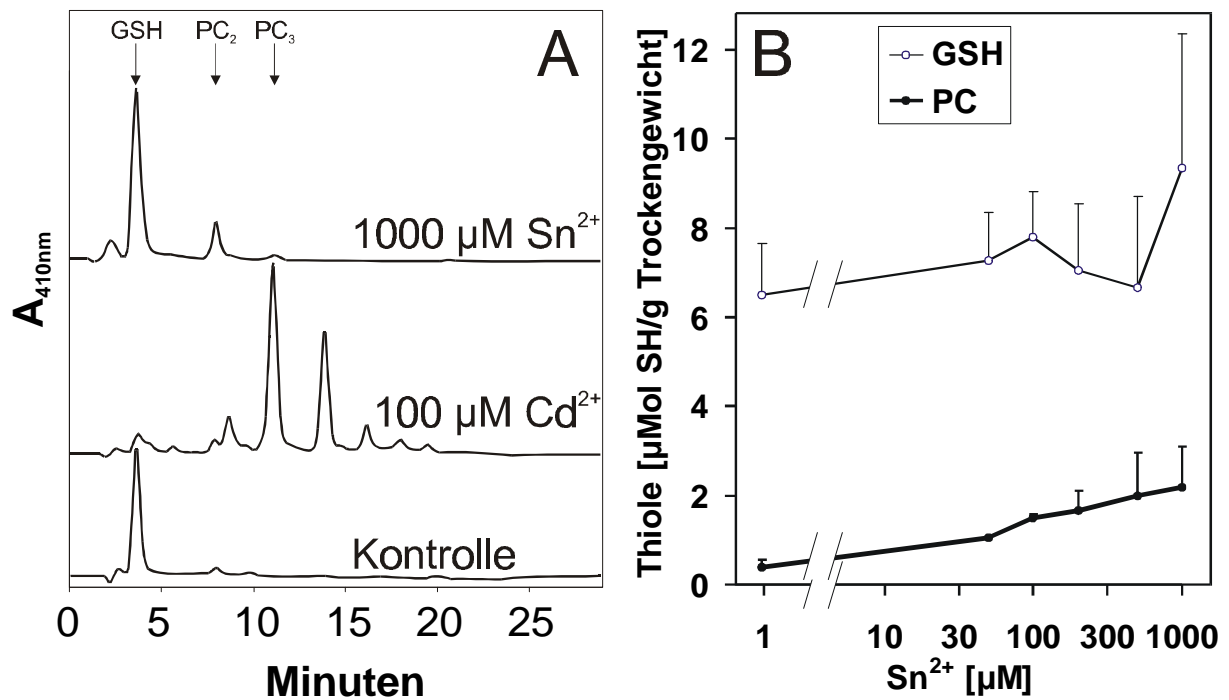


**Abbildung 40A:** Thiol-Analyse von Extrakten aus *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen. Die HPLC-Elutionsprofile zeigen Extrakte aus Zellen, die für vier Tage mit 200 µM Cu<sup>2+</sup> oder 100 µM Cd<sup>2+</sup> behandelt wurden; das unterste Chromatogramm ist die unbehandelte Kontrolle. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Peaks sind: Glutathion γECG (GSH), (γEC)<sub>2</sub>G (PC<sub>2</sub>) und (γEC)<sub>3</sub>G (PC<sub>3</sub>).

**Abbildung 40B:** Phytochelatine und Glutathion in *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen in Abhängigkeit von der Cu<sup>2+</sup>-Konzentration. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=2).

Zinn (Sn<sup>2+</sup>) zeigte in den verwendeten Konzentrationen (bis 1 mM) keine Toxizität gegenüber *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen. Das Wachstum war nicht gehemmt gegenüber der Kontrolle und wurde daher hier nicht grafisch dargestellt. Die Induktion von Phytochelatinen (PC<sub>2</sub> und PC<sub>3</sub>) erreichte bei 1000 µM Sn<sup>2+</sup> ein Maximum mit 2,2 µMol SH/g Trockengewicht (Abbildung 41). Die Glutathion-Konzentration veränderte sich über den getesteten Konzentrationsbereich kaum, zeigte jedoch einen Anstieg bei 1000 µM Sn<sup>2+</sup>.





**Abbildung 41A:** Thiol-Analyse von Extrakten aus *Rauvolfia serpentina*-Zellkulturen. Die HPLC-Elutionsprofile zeigen Extrakte aus Zellen, die für vier Tage mit 1000 µM Sn<sup>2+</sup> oder 100 µM Cd<sup>2+</sup> behandelt wurden; das unterste Chromatogramm ist die unbehandelte Kontrolle. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Peaks sind: Glutathion γECG (GSH), (γEC)<sub>2</sub>G (PC<sub>2</sub>) und (γEC)<sub>3</sub>G (PC<sub>3</sub>).

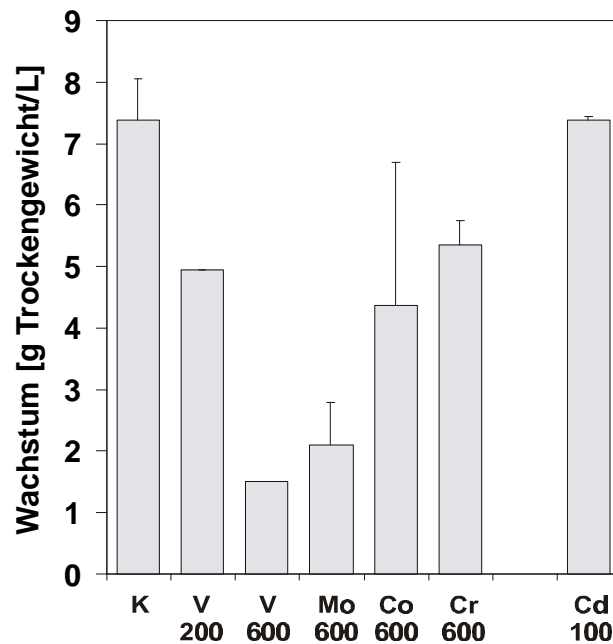
**Abbildung 41B:** Phytochelatine und Glutathion in *Rauvolfia serpentina*-Zellkulturen in Abhängigkeit von der Sn<sup>2+</sup>-Konzentration. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=2).

### C.1.5. Vanadium, Chrom, Molybdän, Cobalt

Zusätzlich zu den für ihre Phytochelatin-Induktion bekannten Ionen sollten noch einige Elemente überprüft werden, die laut Grill et al. (1987) keine Phytochelatine induzieren: Vanadium, Chrom, Molybdän und Cobalt.

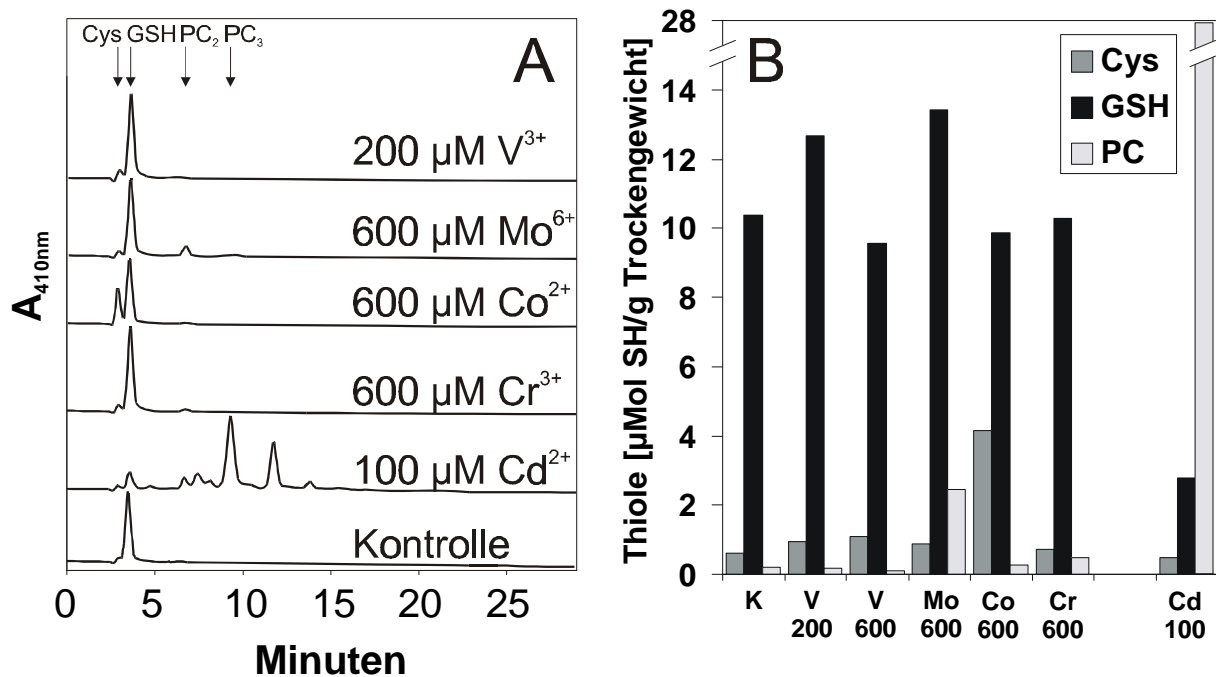
Dazu wurden in einem Versuch Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina* mit Vanadium-, Molybdän-, Cobalt- oder Chrom-Salzen (je 600 µM) belastet; als positive Kontrolle diente Cd<sup>2+</sup> (100 µM). Das Wachstum der Zellen wurde in unterschiedlichem Maße durch die Metallsalze gehemmt (Abbildung 42); Vanadium inhibierte das Wachstum am stärksten,

gefolgt von Molybdän, Cobalt und Chrom, während 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  das Wachstum nicht signifikant beeinflusste.



**Abbildung 42:** Wachstum von *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen in Abhängigkeit von der Behandlung mit unterschiedlichen Metallsalzen (K ist die unbehandelte Kontrolle): 200  $\mu\text{M}$  bzw. 600  $\mu\text{M}$   $\text{V}^{3+}$ , 600  $\mu\text{M}$   $\text{Mo}^{6+}$ , 600  $\mu\text{M}$   $\text{Co}^{2+}$ , 600  $\mu\text{M}$   $\text{Cr}^{3+}$  oder 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ . Wachstum ist definiert als Zunahme des Trockengewichts (g/L) in vier Tagen, ausgehend von einem Inokulum von 8,6 ( $\pm$  0,8) g/L. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=2).

Von den getesteten Metallen hatte Vanadium keinen meßbaren Einfluß auf die Thiolkonzentrationen (Cystein, Glutathion und Phytochelatine) (Abbildung 43). Chrom führte zu einer geringfügigen Erhöhung der Phytochelatin-Konzentration (ca. 2,5fach höher als in der Kontrolle), Molybdän zu einer deutlichen Erhöhung (ca. 13fach höher als in der Kontrolle). Cobalt induzierte die Bildung von Cystein (ca. 7fach höher als in der Kontrolle). Keines der Metalle konnte jedoch den Thiol-Pool der Zellen auch nur annähernd so beeinflussen wie das Cadmium, das eine 150fache Erhöhung der Phytochelatin-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle bewirkte.



**Abbildung 43A:** Thiol-Analyse von Extrakten aus *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen. Die HPLC-Elutionsprofile zeigen Extrakte aus Zellen, die für vier Tage mit 200 µM V<sup>3+</sup>, 600 µM Mo<sup>6+</sup>, 600 µM Co<sup>2+</sup>, 600 µM Cr<sup>3+</sup> oder 100 µM Cd<sup>2+</sup> behandelt wurden; das unterste Chromatogramm ist die unbehandelte Kontrolle. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Peaks sind: Cystein (Cys), Glutathion γECG (GSH), (γEC)<sub>2</sub>G (PC<sub>2</sub>) und (γEC)<sub>3</sub>G (PC<sub>3</sub>).

**Abbildung 43B:** Thiole (Cystein, Glutathion und Phytochelatine) in *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen in Abhängigkeit von der Behandlung mit unterschiedlichen Metallsalzen (K ist die unbehandelte Kontrolle): 200 µM bzw. 600 µM V<sup>3+</sup>, 600 µM Mo<sup>6+</sup>, 600 µM Co<sup>2+</sup>, 600 µM Cr<sup>3+</sup> oder 100 µM Cd<sup>2+</sup>.

### C.1.6. Teildiskussion

Die Elemente Blei und Quecksilber induzierten wie auch Cadmium stark die Bildung von Phytochelatinen in Zellkulturen von *Rauwolfia serpentina*. Anders als beim Cadmium wurden jedoch v.a. die kürzeren Phytochelatine PC<sub>2</sub> und PC<sub>3</sub> gebildet. Mittels Gelfiltration konnte eindeutig die Existenz von Phytochelatin-Blei- und Phytochelatin-Quecksilber-Komplexen gezeigt werden. Die PC-Konzentrationen in den phytochelatinhaltigen Peaks waren signifikant korreliert mit den Metall-Konzentrationen. Im Falle des Blei-PC-Komplexes war die Stöchiometrie SH-Gruppe zu Pb<sup>2+</sup> 2:1. Diese Stöchiometrie berichteten auch schon Grill (1989) und Mehra et al. (1995) für Pb-PC-Komplexe. Im Gegensatz zu Grill (1989) gelang es

jedoch nicht, den Pb-PC-Komplex weiter aufzureinigen, da bei jedem Reinigungsschritt große Verluste des Komplexes auftraten. Für weitere Versuche zur Reinigung dieses Komplexes sollte insbesondere auf die Ammoniumsulfat-Fällung verzichtet werden, da bei diesem Schritt Bleisulfat ausfällt. Die Wichtigkeit der Phytochelatine bei der Entgiftung von  $\text{Pb}^{2+}$  zeigte sich darin, daß in der Gelfiltration 76 % an Phytochelatine gebunden waren, während der Rest an Protein gebunden war. Bei einer Kontrollgelfiltration banden sogar fast 60 % an das Protein. In der Zelle würde das zu einer beträchtlichen Vergiftung der Proteine führen, wenn das  $\text{Pb}^{2+}$  nicht von Phytochelatinen weggefangen würde.

In noch stärkerem Maße gilt dies für Quecksilber, da es aufgrund seiner besonders hohen Affinität zu SH-Gruppen (Jocelyn, 1972) sehr stark an die Thiolgruppen von Proteinen binden kann. Sogar unter den Bedingungen der Gelfiltration waren daher fast 2/3 des  $\text{Hg}^{2+}$  an Proteine gebunden. Es wären jedoch genügend Phytochelatine vorhanden gewesen, um alles  $\text{Hg}^{2+}$  zu binden. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß bei der Extraktion durch die Freisetzung des möglicherweise in der Vakuole deponierten PC-Komplexes (Vögeli-Lange & Wagner, 1990)  $\text{Hg}^{2+}$  leichter an Proteine anderer Kompartimente binden konnte.

Inwieweit allerdings die mit Gelfiltration gezeigten Komplexe so auch *in vivo* existieren, muß offen bleiben. Durch die Untersuchungen von Mehra et al. (1995, 1996a) konnte gezeigt werden, daß Phytochelatin-Komplexe mit Pb und Hg möglich sind; andererseits konnten zwei Gruppen mit Gelfiltration keinen Pb-PC-Komplex nachweisen (Maitani et al., 1996; Leopold et al., 1998). Man mag dies auf das verwendete Säulenmaterial zurückführen oder andere technische Unterschiede in der Durchführung des Experiments. Jedoch bleibt die Frage, ob und wie stark die Komplexe bei der Extraktion und bei der Chromatographie verändert werden. Besonders die Gelfiltration von Hg-belasteten Zellen zeigte eine Möglichkeit für eine solche Veränderung auf, nämlich die Bindung von Hg an Proteine, obwohl aufgrund der vorhandenen Menge von Phytochelatinen der Verdacht nahelag, daß *in vivo* die Phytochelatine das gesamte Quecksilber gebunden hatten.

Die Induktion von Phytochelatinen in *Rauvolfia serpentina*-Zellen durch  $\text{Fe}^{2+}$  war von Grill et al. (1987) nicht berichtet worden. Allerdings bildeten Tomaten-Zellkulturen nach Zugabe von  $\text{FeSO}_4$  Phytochelatine und auch in Enzymextrakten induzierte  $\text{Fe}^{2+}$  die Phytochelatin-Bildung (Chen et al., 1997). Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, daß die Phytochelatin-Induktion durch  $\text{Fe}^{2+}$  eine indirekte ist, d.h. durch die Freisetzung von direkt induzierenden

Ionen wie  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  bewirkt wird (s. Bracken & Klaasen, 1987), zeigt doch die Fe-induzierte Phytochelatin-Bildung in Enzymextrakten, daß  $\text{Fe}^{2+}$  vermutlich die PC-Bildung direkt induziert. Dies wird auch dadurch unterstützt, daß sich unter gewissen Umständen Fe-PC-Komplexe bilden können, wie Maitani et al. (1996) berichteten.

Auch bei einigen anderen Elementen, die bisher nicht als phytochelatin-induzierend galten (Grill et al., 1987), zeigten sich überraschende Effekte. Während Vanadium weder Phytochelatine induzierte noch andere erkennbare Effekte auf die Thiolkonzentrationen in *Rauvolfia serpentina*-Zellen hatte, wurden sowohl nach Zugabe von  $\text{Cr}^{3+}$ - als auch von  $\text{Mo}^{6+}$ -Ionen Phytochelatine gebildet. Im Falle von Chrom war die Induktion zwar nicht stark (nur 2,5mal mehr PCs als in der Kontrolle), im Falle des Molybdän jedoch schon. Die nach Zugabe von  $600 \mu\text{M Mo}^{6+}$  gebildete PC-Menge (13mal mehr als in der Kontrolle) entsprach etwa der bei Zugabe von  $100 \mu\text{M Cu}^{2+}$  oder  $1000 \mu\text{M Sn}^{2+}$  gebildeten. Interessant war auch der Effekt von Cobalt: Dieses induzierte zwar nicht die Bildung von Phytochelatinen, jedoch wurde die Konzentration an Cystein auf das siebenfache erhöht. Offensichtlich scheint dies eine allgemeine Strategie zu sein, denn auch Zellkulturen des Cobalt-Hyperakkumulators *Crotalaria cobalticola* zeigten nach Cobalt-Zugabe erhöhte Cystein-Konzentrationen (M. Oven, persönliche Mitteilung).

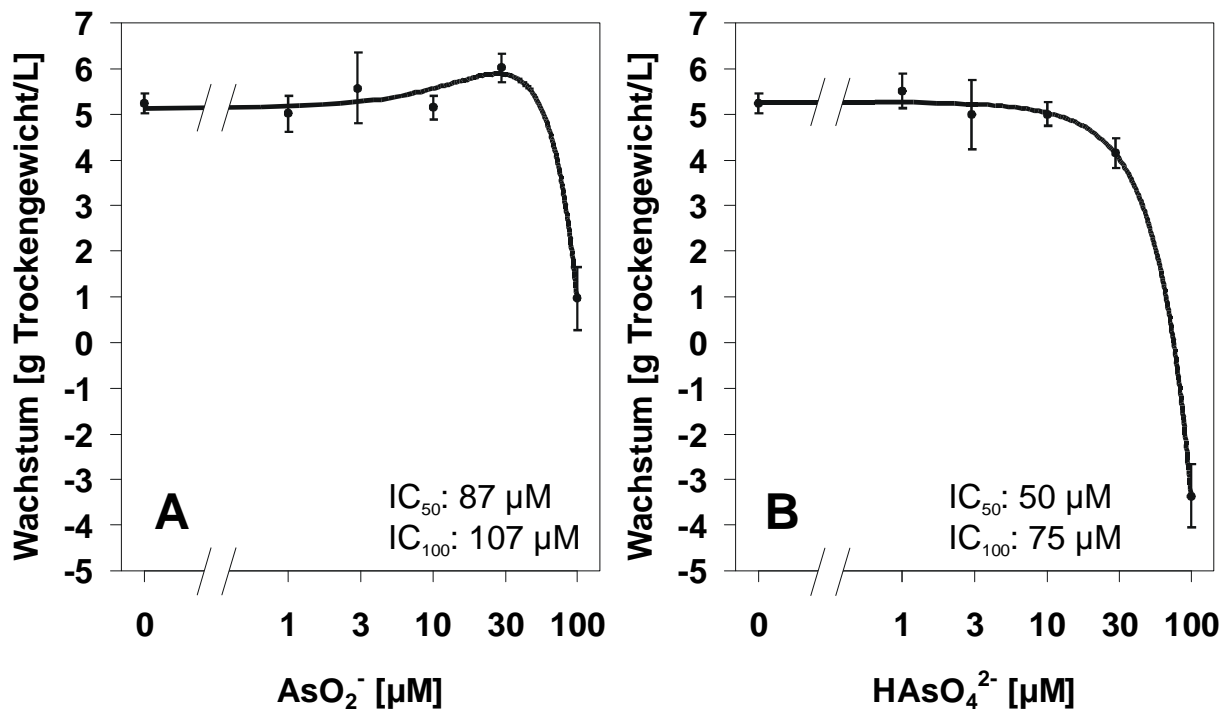
## **C.2. Effekt des Halbmetalls Arsen**

Der wichtigste Teil der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Rolle, die die Phytochelatine bei der Entgiftung von Arsen in Pflanzen spielen. Arsen unterscheidet sich von den im vorigen Kapitel dargestellten Elementen (Cd, Pb, Hg) dadurch, daß es ein Halbmetall ist und in wässriger Lösung nicht als Metallkation vorliegt, sondern als Oxyanion (Wiberg, 1985). Die Interaktion von trivalentem Arsen mit Thiolgruppen war seit längerem bekannt (z.B. Jocelyn, 1972); auch die Bildung von Phytochelatinen als Reaktion auf Arsenat bzw. Arsenit wurde beschrieben (Grill et al., 1987; Maitani et al., 1996). Hingegen gab es keine Daten über die tatsächliche Form der Entgiftung von Arsen durch Phytochelatine, insbesondere über die Bildung eines Komplexes analog zu Phytochelatin-Komplexen mit Cadmium, Kupfer, Blei oder Quecksilber (Grill et al., 1985; Grill, 1989). Daher sollte nicht nur die Bildung von Phytochelatinen als Reaktion auf Arsen-Verbindungen untersucht werden, sondern auch, wie ein möglicher Phytochelatin-Arsen-Komplex aussehen könnte und welche Rolle dieser Komplex bei der Arsen-Entgiftung spielt.

### **C.2.1. Phytochelatin-Induktion durch anorganische Arsen-Spezies: Konzentrations- und Zeitabhängigkeit**

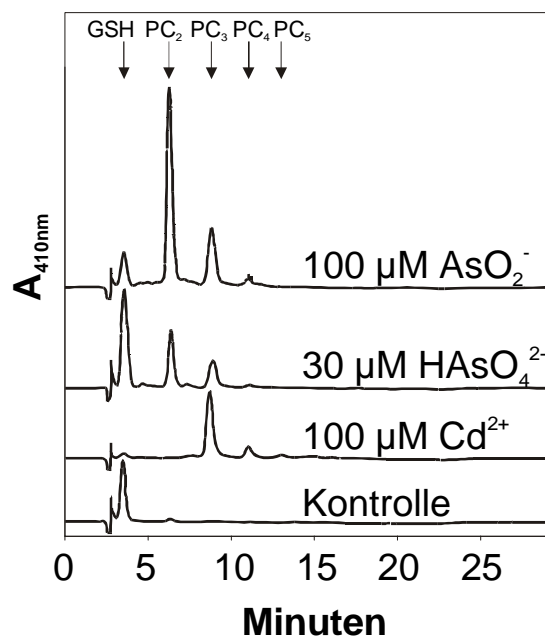
Die Oxyanionen Arsenit und Arsenat hemmten das Wachstum von Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina*, wobei Arsenat toxischer als Arsenit wirkte (Abbildung 44); die Konzentrationen, die 50 % Wachstumshemmung hervorriefen, waren etwa 87  $\mu\text{M}$  Arsenit bzw. 50  $\mu\text{M}$  Arsenat. Eine Arsenat-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  führte bereits zum Absterben von Zellen, so daß das Trockengewicht nach vier Tagen sogar unter dem Inokulum lag.

Arsenit- bzw. Arsenat-belastete Zellen reagierten auf diese Ionen durch die Bildung von Phytochelatinen, wie die HPLC-Analyse von Extrakten zeigte (Abbildung 45). Die Retentionszeiten stimmten sehr gut überein mit Retentionszeiten von Phytochelatin-Standards und Extrakten aus Cd-belasteten Zellen, während in Extrakten aus Zellen ohne Belastung nur Spuren von Phytochelatinen nachgewiesen werden konnten. Das hauptsächlich gebildete Peptid war bei Arsenit wie bei Arsenat  $\text{PC}_2$ , gefolgt von  $\text{PC}_3$  und Spuren von  $\text{PC}_4$  und  $\text{PC}_5$ ; Cadmium-Belastung hingegen führte (unter diesen Bedingungen) zur hauptsächlich gebildeten Bildung von  $\text{PC}_3$  und  $\text{PC}_4$ . Ein weiterer Unterschied war die starke Abnahme des Glutathions, die man bei Cd-Belastung beobachtete; diese war bei Arsenit- oder Arsenatbelastung nicht zu sehen.

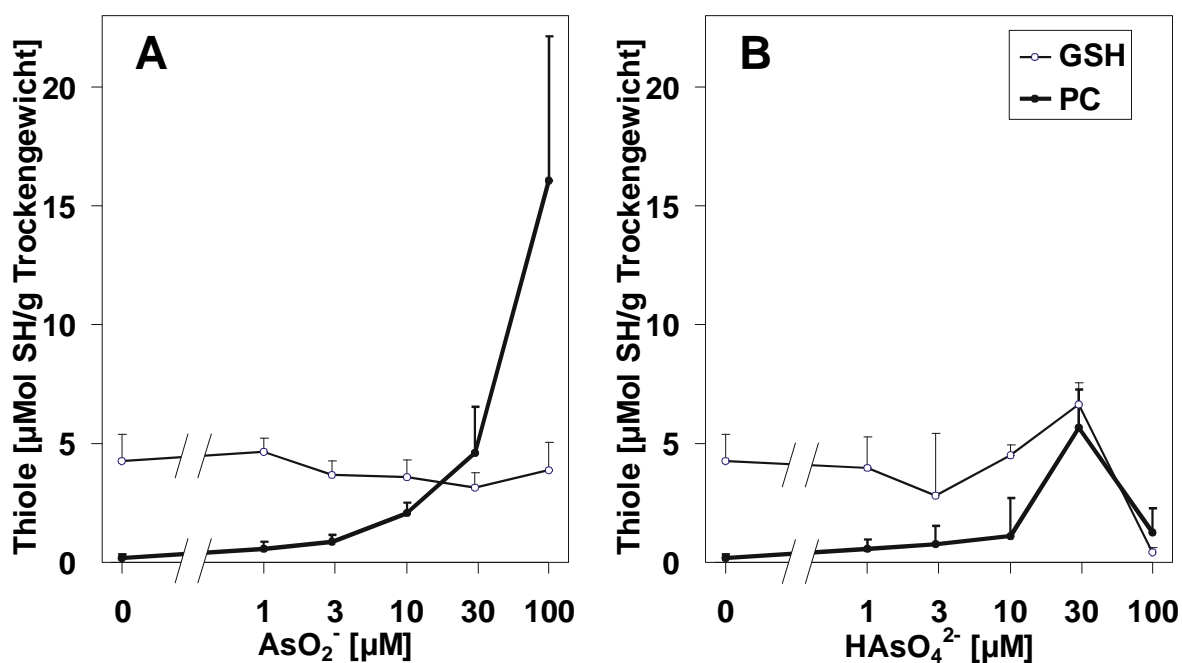


**Abbildung 44:** Wachstum von *Rauvolfia serpentina*-Zellkulturen in Abhängigkeit von der Konzentration von Arsenit (A) und Arsenat (B). Wachstum ist definiert als Zunahme des Trockengewichts (g/L) in vier Tagen, ausgehend von einem Inokulum von 9,9 ( $\pm 0,4$ ) g/L. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n=3$ ). Die Konzentrationen, die eine Wachstumsinhibition von 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) bzw. eine Wachstumsinhibition von 100% ( $\text{IC}_{100}$ ) hervorriefen, wurden aus der Regression der Daten errechnet.

Eine erhöhte Bildung von Phytochelatinen war bereits bei der geringsten getesteten Konzentration festzustellen: gegenüber der Kontrolle, in der ca. 0,2  $\mu\text{Mol}$  Phytochelatin-SH/g Trockengewicht enthalten waren, enthielten Zellen, die mit 1  $\mu\text{M}$  Arsenit oder Arsenat belastet wurden, ca. 0,6  $\mu\text{Mol}$  Phytochelatin-SH/g Trockengewicht. Diese Menge stieg bis zu 16,1  $\mu\text{Mol}$  Phytochelatin-SH/g Trockengewicht in Zellen mit 100  $\mu\text{M}$  Arsenit bzw. 5,7  $\mu\text{Mol}$  Phytochelatin-SH/g Trockengewicht in Zellen mit 30  $\mu\text{M}$  Arsenat an (Abbildung 46). 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  induzierte vergleichsweise 6,7  $\mu\text{Mol}$  Phytochelatin-SH/g Trockengewicht.

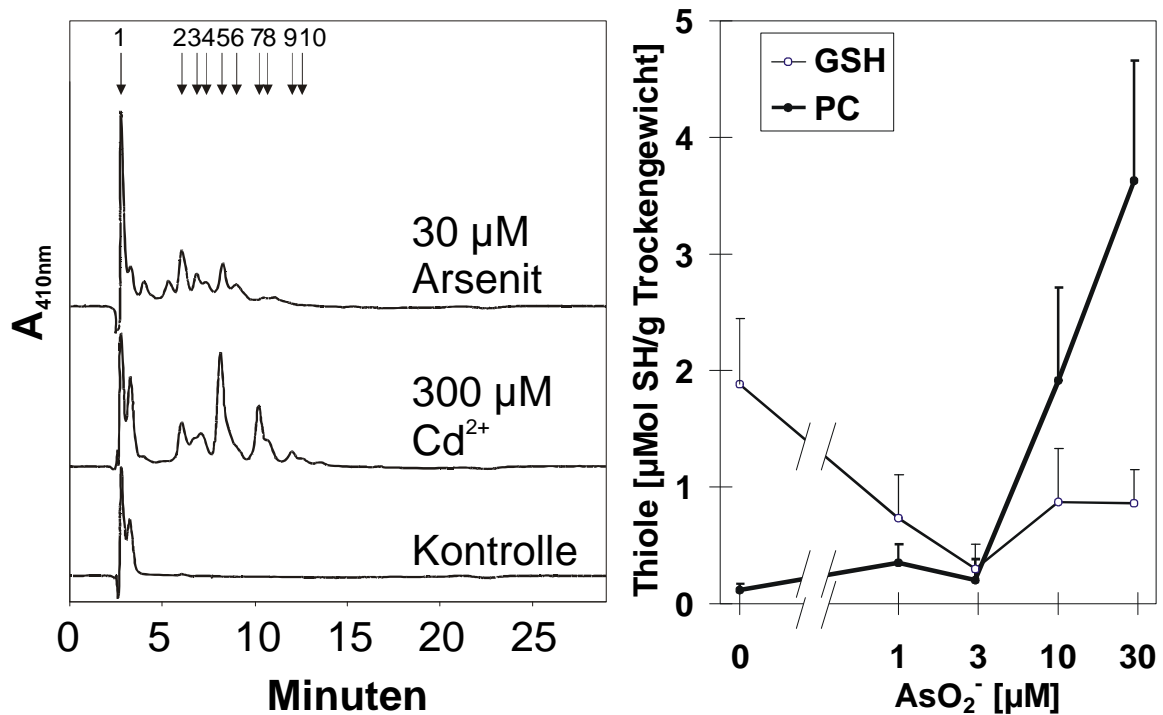


**Abbildung 45:** Thiol-Analyse von Extrakten aus *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen. Die HPLC-Elutionsprofile zeigen Extrakte aus Zellen, die für vier Tage mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{AsO}_2^-$ , 30  $\mu\text{M}$   $\text{HAsO}_4^{2-}$  oder 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  behandelt wurden; das unterste Chromatogramm zeigt die unbehandelte Kontrolle. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Peaks sind: Glutathion  $\gamma\text{ECG}$  (GSH),  $(\gamma\text{EC})_2\text{G}$  ( $\text{PC}_2$ ),  $(\gamma\text{EC})_3\text{G}$  ( $\text{PC}_3$ ),  $(\gamma\text{EC})_4\text{G}$  ( $\text{PC}_4$ ) und  $(\gamma\text{EC})_5\text{G}$  ( $\text{PC}_5$ ).



**Abbildung 46:** Thiole (Glutathion und Phytochelatine) in *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen behandelt mit unterschiedlichen Konzentrationen von Arsenit (A) oder Arsenat (B) für vier Tage. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung ( $n=3$ ).

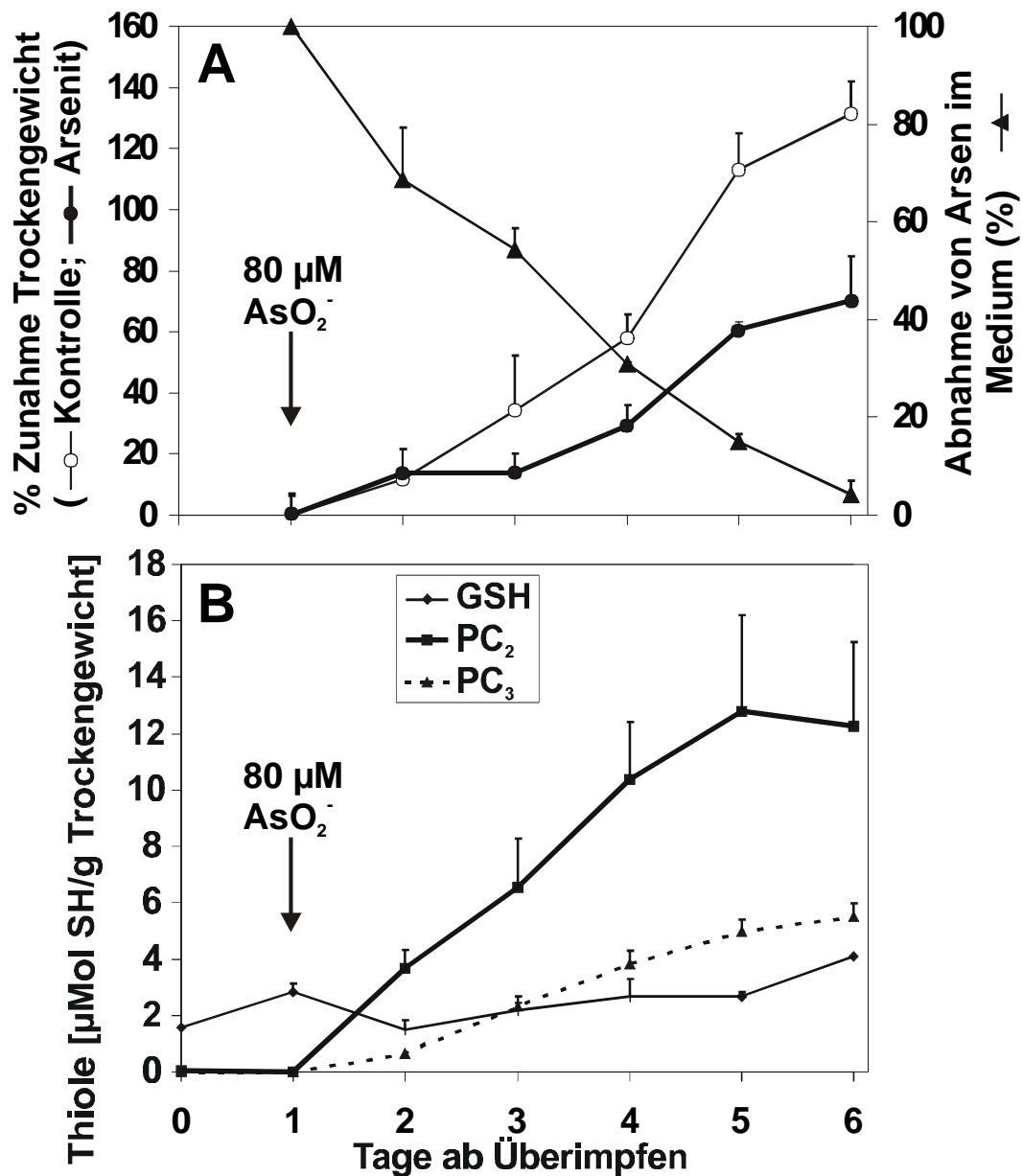




**Abbildung 47A:** Thiol-Analyse von Extrakten aus *Agrostis tenuis*-Zellkulturen. Die HPLC-Elutionsprofile zeigen Extrakte aus Zellen, die für vier Tage mit 30 µM AsO<sub>2</sub><sup>-</sup> oder 300 µM Cd<sup>2+</sup> behandelt wurden; das unterste Chromatogramm ist die unbehandelte Kontrolle. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Peaks sind: 1 (Glutathion γECG; GSH), 2 ((γEC)<sub>2</sub>G; PC<sub>2</sub>), 3 ((γEC)<sub>2</sub>; desgly-PC<sub>2</sub>), 4 ((γEC)<sub>2</sub>S; hm-PC<sub>2</sub>), 5 ((γEC)<sub>3</sub>G; PC<sub>3</sub>), 6 ((γEC)<sub>3</sub> und (γEC)<sub>3</sub>S; desgly-PC<sub>3</sub> und hm-PC<sub>3</sub>), 7 ((γEC)<sub>4</sub>G; PC<sub>4</sub>), 8 ((γEC)<sub>4</sub> und (γEC)<sub>4</sub>S; desgly-PC<sub>4</sub> und hm-PC<sub>4</sub>), 9 ((γEC)<sub>5</sub>G; PC<sub>5</sub>), 10 ((γEC)<sub>5</sub> und (γEC)<sub>5</sub>S; desgly-PC<sub>5</sub> und hm-PC<sub>5</sub>).

**Abbildung 47B:** Thiole (Glutathion und Phytochelatine) in *Agrostis tenuis*-Zellkulturen behandelt mit unterschiedlichen Konzentrationen von Arsenit. In *Agrostis tenuis* waren neben den herkömmlichen γ(EC)<sub>n</sub>G-Peptiden auch desgly-PCs (γ(EC)<sub>n</sub>) und hydroxymethyl-PCs (γ(EC)<sub>n</sub>S) vorhanden; die dargestellten PCs repräsentieren die Summe dieser drei Peptid-Familien. Die Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=2).

Auch in Zellkulturen von *Agrostis tenuis* wurden bei Arsenit-Belastung Phytochelatine gebildet (Abbildung 47A). Neben den hauptsächlichsten Peaks der (γEC)<sub>n</sub>G zeigten sich Peaks, die etwas später eluierten; diese repräsentierten vermutlich desgly-PCs (γEC)<sub>n</sub> und



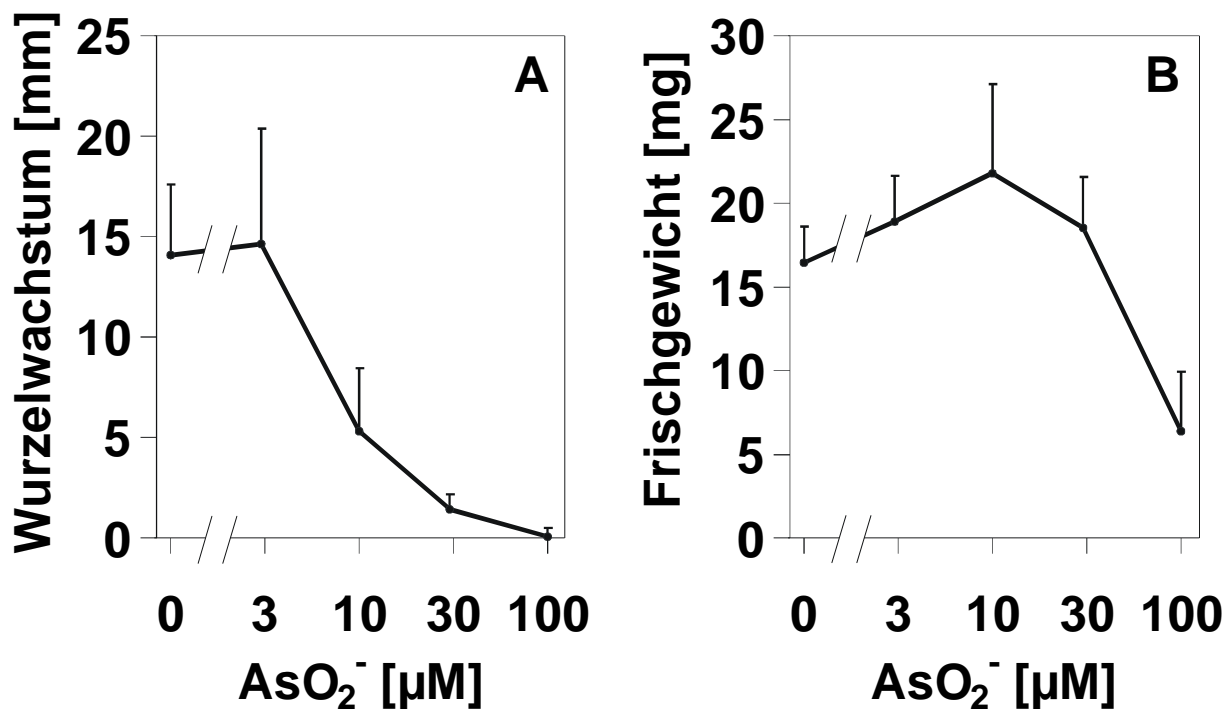
**Abbildung 48:** Kinetik des Wachstums, der As-Aufnahme und der PC-Bildung in *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen. Die Zellen wurden am Tag 0 in frisches Medium überimpft, die Belastung erfolgte mit  $80 \mu\text{M}$  Arsenit am Tag 1; täglich wurden drei Aliquots aus den Kolben entnommen und abgenutscht. In A ist das Wachstum der belasteten und unbelasteten Kultur als Zunahme des Trockengewichts bezogen auf den Tag 1 dargestellt; außerdem die Abnahme des Arsens im Medium. In B sind die Konzentrationen der Thiole Glutathion, PC<sub>2</sub> und PC<sub>3</sub> in der belasteten Kultur dargestellt (PC<sub>4</sub> war mit maximal  $0,22 \mu\text{Mol SH/g}$  Trockengewicht vernachlässigbar). In der unbehandelten Kontrolle war die Konzentration der Phytochelatine immer unter  $0,15 \mu\text{Mol SH/g}$  Trockengewicht, die Glutathion-Konzentration stieg bis zum Tag 4 auf  $6,7 \mu\text{Mol SH/g}$  Trockengewicht und sank dann wieder ab, um am Tag 6 nur gering über der belasteten Kultur zu liegen.

hydroxymethyl-PCs ( $\gamma$ EC)<sub>n</sub>S (Klapheck et al., 1994). Die maximale Phytochelatin-Konzentration (3,2  $\mu$ Mol Phytochelatin-SH/g TG) wurde bei der hier verwendeten maximalen Arsenit-Konzentration von 30  $\mu$ M erreicht (Abbildung 47B).

Die Kinetik (Zeitverlauf) eines Belastungsversuchs ist in Abbildung 48 dargestellt. Das Wachstum der belasteten *Rauvolfia serpentina*-Zellen war ab dem zweiten Tag nach Belastung inhibiert im Vergleich zur Kontrolle; nach fünf Tagen mit 80  $\mu$ M Arsenit waren die Zellen etwa 50 % im Wachstum gehemmt (Abbildung 48A). Im gleichen Zeitraum wurde fast das gesamte Arsen aufgenommen, da die Arsen-Konzentration im Medium um 96 % abnahm; die Abnahme war über die fünf Tage fast linear. Die Zunahme von PC<sub>2</sub> und PC<sub>3</sub> war ebenfalls linear in diesem Zeitraum, erreichte jedoch am fünften Tag ein Plateau; der Glutathion-Pool nahm am ersten Tag etwas ab, wurde jedoch in den folgenden Tagen wieder aufgefüllt (Abbildung 48B). Die Konzentration der Phytochelatine in der unbelasteten Kontrolle erreichte etwa 1% des Werts in den arsenit-behandelten Zellen; der Glutathion-Gehalt der Kontrolle stieg zunächst etwas an, sank danach jedoch wieder, so daß er nach fünf Tagen nur 14 % über dem der Arsen-behandelten Zellen lag.

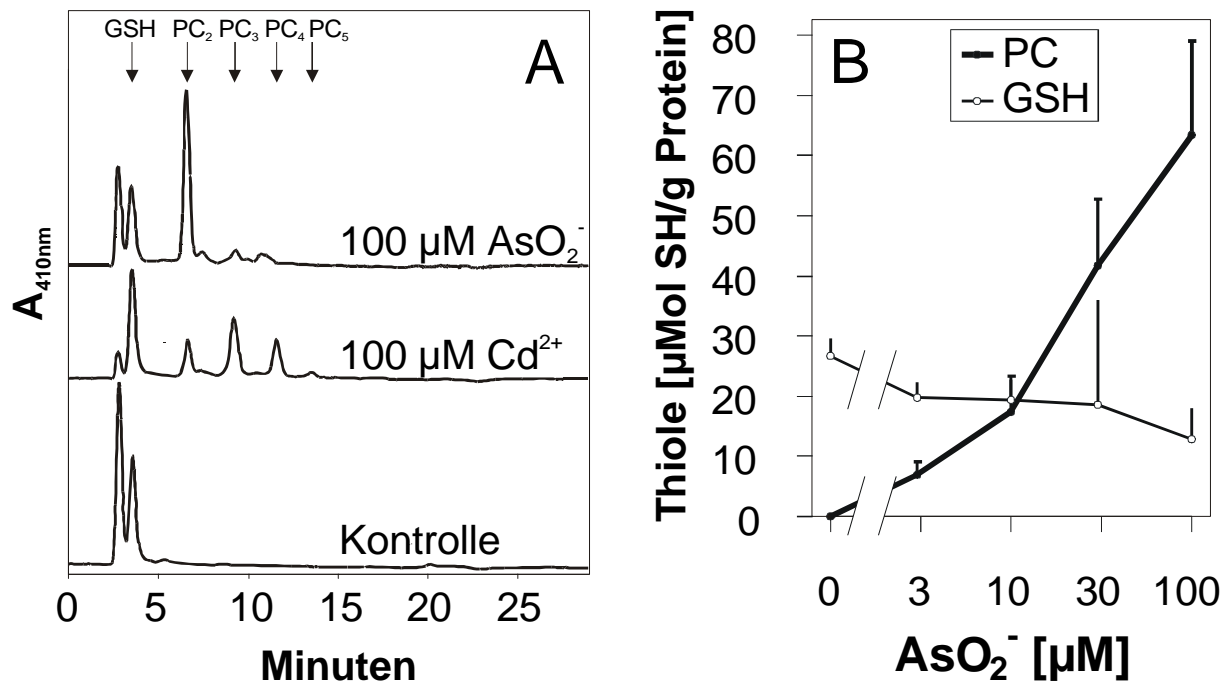
### C.2.2. Phytochelatin-Induktion in *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen

Die Induktion von Phytochelatinen ist recht gut untersucht in Zellkulturen; um ihre Relevanz auch für ganze Pflanzen zu untersuchen, wurden *Arabidopsis thaliana*-Keimlinge (Varietät RLD) getestet. Das Wachstum der Keimlinge, die nach einer Woche von normalem MS-Medium auf arsenhaltiges transferiert worden waren, wurde zum einen anhand des Wurzelwachstums (sechs Tage nach dem Transfer), zum anderen anhand des Frischgewichts beim Ernten (14 Tage nach dem Transfer) bestimmt. Später waren die Wurzeln der einzelnen Pflanzen schon ineinander verwachsen und konnten nicht mehr gemessen werden. Bei mehr als 3  $\mu$ M Arsenit war das Wurzelwachstum deutlich gehemmt, bei 100  $\mu$ M fand kein Wurzelwachstum mehr statt (Abbildung 49A). Das Frischgewicht hingegen war sogar höher bei Keimlingen, die mit 10  $\mu$ M Arsenit belastet worden waren, als bei der Kontrolle ohne Arsenit; erst bei über 30  $\mu$ M war das Frischgewicht geringer als bei der Kontrolle (Abbildung 49B). Ähnlich zeigte sich der Effekt von Arsen auf die Keimung von *Arabidopsis*-Samen: nach 14 Tagen auf MS-Platten mit 100  $\mu$ M Arsenit waren nur 20 % der Samen gekeimt, mit 30  $\mu$ M waren es 97 %.



**Abbildung 49:** Wurzelwachstum (A) und Frischgewicht (B) von Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* (RLD). Die Keimlinge wurden nach einer Woche von MS-Platten auf MS-Platten mit der angegebenen Arsenit-Konzentration transferiert. Das Wurzelwachstum individueller Keimlinge (Mittelwert mit Standardabweichung; n=20) wurde sechs Tage nach dem Transfer bestimmt, das Frischgewicht von Pools aus je 10 Keimlingen (Mittelwert mit Standardabweichung; n=4) 14 Tage nach dem Transfer.

*Arabidopsis*-Keimlinge produzierten bei Belastung mit Arsenit Phytochelatine, genauso wie bei Belastung mit  $\text{Cd}^{2+}$  (s. C1.1). Allerdings überwog, ähnlich wie bei Zellkulturen, auch hier das  $\text{PC}_2$ , während die mit Cd hauptsächlich gebildeten Spezies  $\text{PC}_3$  und  $\text{PC}_4$  waren (Abbildung 50A). Bereits bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  Arsenit enthielten die Keimlinge etwa 100mal mehr PC als die unbelastete Kontrolle. Die höchste Konzentration erreichten sie bei der das Wachstum völlig hemmenden Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Arsenit (Abbildung 50B); die dabei gebildete PC-Konzentration von 63  $\mu\text{Mol}$  SH-Gruppen in PC/g Protein war fast doppelt so hoch wie die bei 100  $\mu\text{M}$  Cd gebildete (36  $\mu\text{Mol}$  SH-Gruppen in PC/g Protein). Auf Gesamtprotein bezogen erhöhte sich der Anteil der  $\gamma$ -GluCys-Peptide (Glutathion und Phytochelatine) von 0,8 Gewichtsprozent in der Kontrolle auf 2,0 Gewichtsprozent bei 100  $\mu\text{M}$  Arsenit.



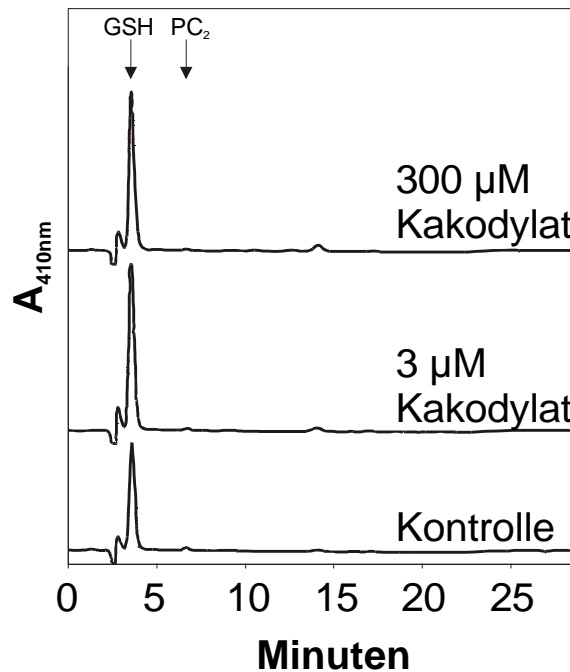
**Abbildung 50A:** Thiol-Analyse von Extrakten aus *Arabidopsis*-Keimlingen. Die HPLC-Elutionsprofile zeigen Extrakte aus Keimlingen, die für 14 Tage mit 100 μM AsO<sub>2</sub><sup>-</sup> oder 100 μM Cd<sup>2+</sup> behandelt wurden; das unterste Chromatogramm ist die unbehandelte Kontrolle. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Peaks sind: Glutathion γECG (GSH), (γEC)<sub>2</sub>G (PC<sub>2</sub>), (γEC)<sub>3</sub>G (PC<sub>3</sub>), (γEC)<sub>4</sub>G (PC<sub>4</sub>) und (γEC)<sub>5</sub>G (PC<sub>5</sub>).

**Abbildung 50B:** Phytochelatine und Glutathion in Arsenit-belasteten *Arabidopsis*-Keimlingen. Die Keimlinge wurden nach einer Woche von MS-Agar-Platten auf MS-Agar-Platten mit der angegebenen As-Konzentration transferiert. Nach weiteren 14 Tagen wurden je 10 Keimlinge gepoolt und auf Protein, Phytochelatine und Glutathion analysiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=4).

### C.2.3. Phytochelatin-Induktion durch organische Arsen-Verbindungen

Neben den anorganischen As-Spezies Arsenit und Arsenat treten auch in der Umwelt eine Vielzahl von organischen As-Spezies auf; die verbreitetsten sind verschiedene methylierte Moleküle, z.B. Kakodylat (Dimethylarsinsäure (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>As(O)OH). Außerdem werden organische As-Präparate als Medikament eingesetzt, insbesondere gegen *Trypanosoma* und *Leishmania*; eines davon ist Melarsoprol (s. auch Einleitung). Die Wirkung dieser beiden Moleküle auf das Wachstum und die PC-Bildung in Zellkulturen wurde untersucht.

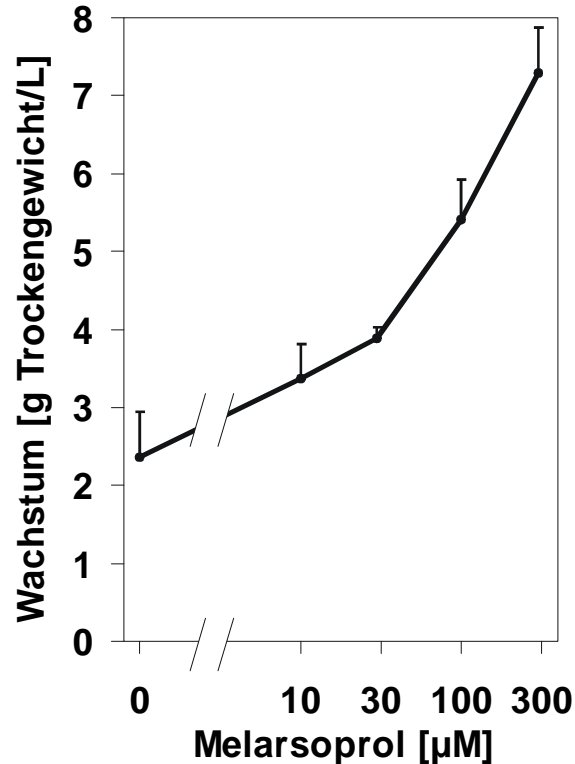
Selbst die höchste getestete Kakodylat-Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  hatte keinen Einfluß auf das Wachstum der Zellkulturen. Auch die Menge des Glutathions und der Phytochelatine war nicht signifikant verändert (Abbildung 51).



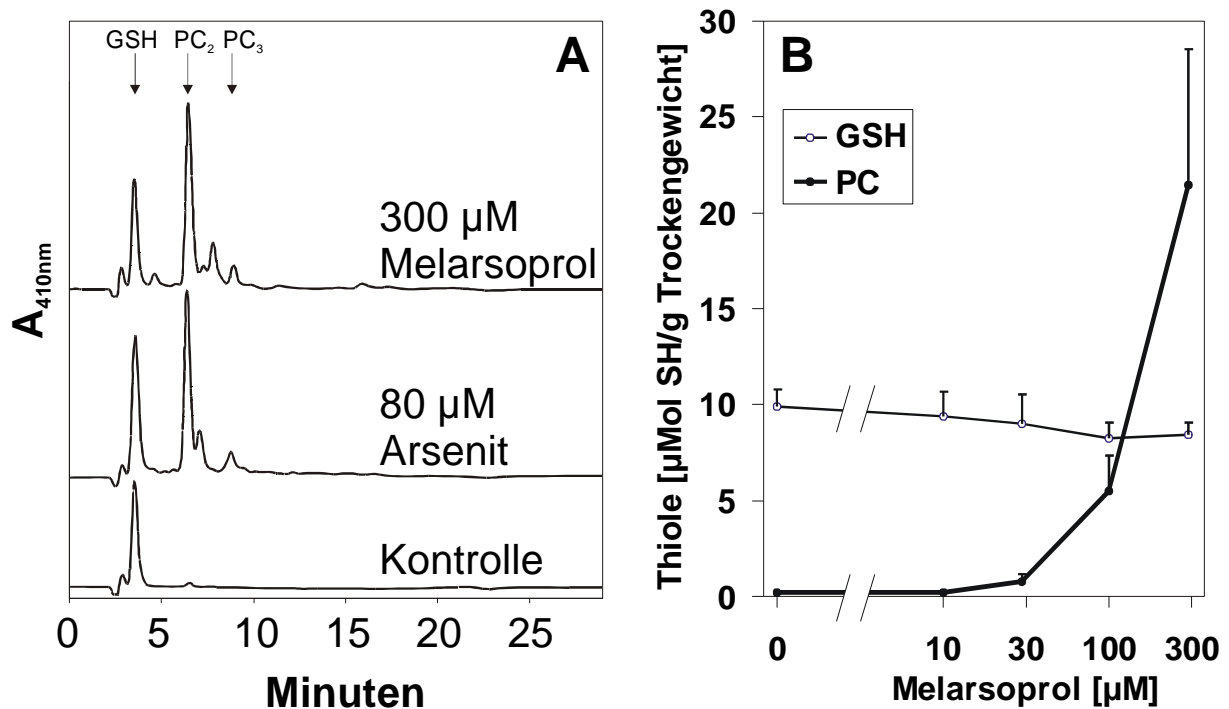
**Abbildung 51:** Thiol-Analyse von Extrakten aus *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen. Die HPLC-Elutionsprofile zeigen Extrakte aus Zellen, die für vier Tage mit 300  $\mu\text{M}$  oder 3  $\mu\text{M}$  Kakodylat behandelt wurden; das unterste Chromatogramm ist die unbehandelte Kontrolle. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Peaks sind: Glutathion  $\gamma\text{ECG}$  (GSH) und  $(\gamma\text{EC})_2\text{G}$  ( $\text{PC}_2$ ).

Anders war die Situation beim Melarsoprol: Dieses schien sogar das Wachstum der Zellkulturen anzuregen (Abbildung 52). Die Zunahme des Trockengewichts war bei den mit 300  $\mu\text{M}$  Melarsoprol behandelten Zellen fast dreimal höher als bei der Kontrolle, auch das Frischgewicht spiegelte diesen Effekt wieder. Dieser Effekt war jedoch nicht auf das Melarsoprol selbst zurückzuführen, sondern im wesentlichen auf das Propylenglykol, in dem es gelöst wurde: Bei Zugabe von Propylenglykol allein (in einer Menge, die der bei der höchsten Melarsoprol-Behandlung entsprach) betrug das Wachstum 6 g/L. Im Gegensatz zum Kakodylat induzierte Melarsoprol die Bildung von Phytochelatinen (Abbildung 53A); ähnlich wie beim Arsenit bildeten die Zellen hauptsächlich  $\text{PC}_2$  und weniger  $\text{PC}_3$ . Die Konzentration, die bei 300  $\mu\text{M}$  Melarsoprol erreicht wurde, war mit 19  $\mu\text{Mol SH/g}$  Trockengewicht sogar höher als die mit 100  $\mu\text{M}$  Arsenit erreichte PC-Konzentration von 16  $\mu\text{Mol SH/g}$

Trockengewicht (Abbildung 53A). Da Melarsoprol das Wachstum der Zellen nicht hemmte, können vielleicht noch höhere PC-Konzentrationen durch höhere Melarsoprol-Konzentrationen erreicht werden.



**Abbildung 52:** Wachstum von *Rauvolfia serpentina*-Zellkulturen in Abhängigkeit von der Konzentration von Melarsoprol. Wachstum ist definiert als Zunahme des Trockengewichts (g/L) in vier Tagen, ausgehend von einem Inokulum von 8,2 ( $\pm$  0,2) g/L. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=3). Da das zugegebene Melarsoprol in Propylenglykol gelöst war, wurde als zusätzliche Kontrolle Propylenglykol zugegeben in einer Menge, die der in der höchsten Melarsoprol-Konzentration (300 µM) entspricht. Das Wachstum dieser Kontrolle betrug 6,0 ( $\pm$  1,0) g/L.



**Abbildung 53A:** Thiol-Analyse von Extrakten aus *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen. Die HPLC-Elutionsprofile zeigen Extrakte aus Zellen, die für vier Tage mit 300 µM Melarsoprol oder 80 µM Arsenit behandelt wurden; das unterste Chromatogramm ist die unbehandelte Kontrolle. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Peaks sind: Glutathion  $\gamma$ ECG (GSH),  $(\gamma\text{EC})_2\text{G}$  (PC<sub>2</sub>) und  $(\gamma\text{EC})_3\text{G}$  (PC<sub>3</sub>).

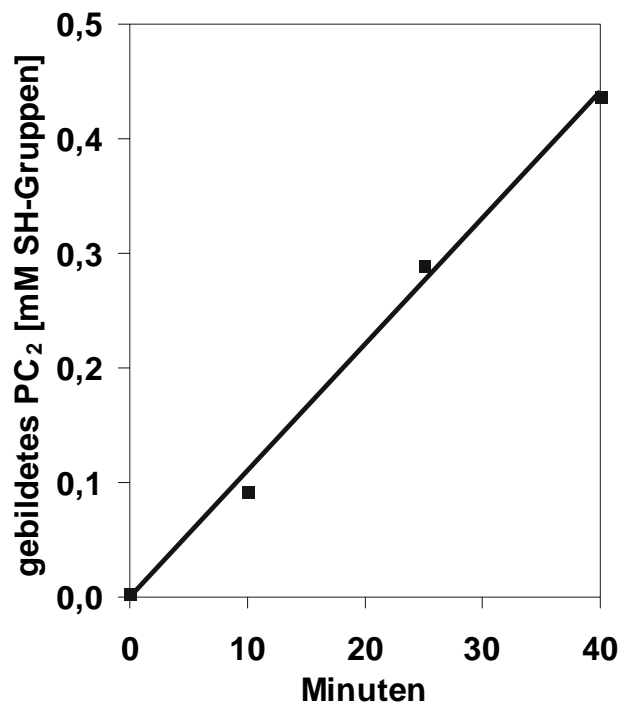
**Abbildung 53B:** Phytochelatine und Glutathion in *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen in Abhängigkeit von der Melarsoprol-Konzentration. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=3).

#### C.2.4. Phytochelatin-Bildung *in vitro*

Die Bildung der Phytochelatine *in vivo* könnte durch direkte Aktivierung der PC-Synthase durch Arsenit oder Arsenat bewirkt werden, oder aber durch die Freisetzung von in der Zelle gebundenen Kationen wie  $\text{Zn}^{2+}$  oder  $\text{Cu}^{2+}$  (s. Bracken & Klaasen, 1987). Um den Mechanismus *in vitro* zu untersuchen, wurden zellfreie Extrakte von *Silene vulgaris* verwendet (Grill et al., 1989). Im Ansatz waren 5 mM EDTA enthalten, um diese Metallionen zu komplexieren und von einer Aktivierung der PC-Synthase abzuhalten. Die meisten Versuche dieser Art wurden von Matjaz Oven durchgeführt (Schmöger et al., 2000). Nur ein kurzer Versuch, der von mir durchgeführt wurde, soll hier exemplarisch beschrieben werden.



In dem Versuch sollte die Bildung der Phytochelatine in den ersten 40 Minuten untersucht werden. Es zeigte sich dabei, daß Arsenit auch im *in vitro*-System Phytochelatine induziert, und zwar unmittelbar nach Zugabe und linear über die untersuchte Zeit (Abbildung 54). Daß die Induktion direkt durch Arsenit erfolgt und nicht durch im Ansatz enthaltene  $\text{Zn}^{2+}$ - oder  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen wurde durch die Anwesenheit von 5 mM EDTA sichergestellt.



**Abbildung 54:** Kinetik der arsenit-induzierten *in vitro* Biosynthese von Phytochelatinen. Dargestellt ist die Bildung von PC<sub>2</sub> in den ersten 40 Minuten nach dem Zusetzen von Arsenit zum Reaktionsansatz. Der Reaktionsansatz enthielt 0,8 nkat PC-Synthase (leicht angereinigter Rohextrakt aus *Silene vulgaris*-Zellkulturen), 1 mM Arsenit, 10 mM Glutathion und 5 mM EDTA in 100 mM Tris-Cl (pH 8.0).

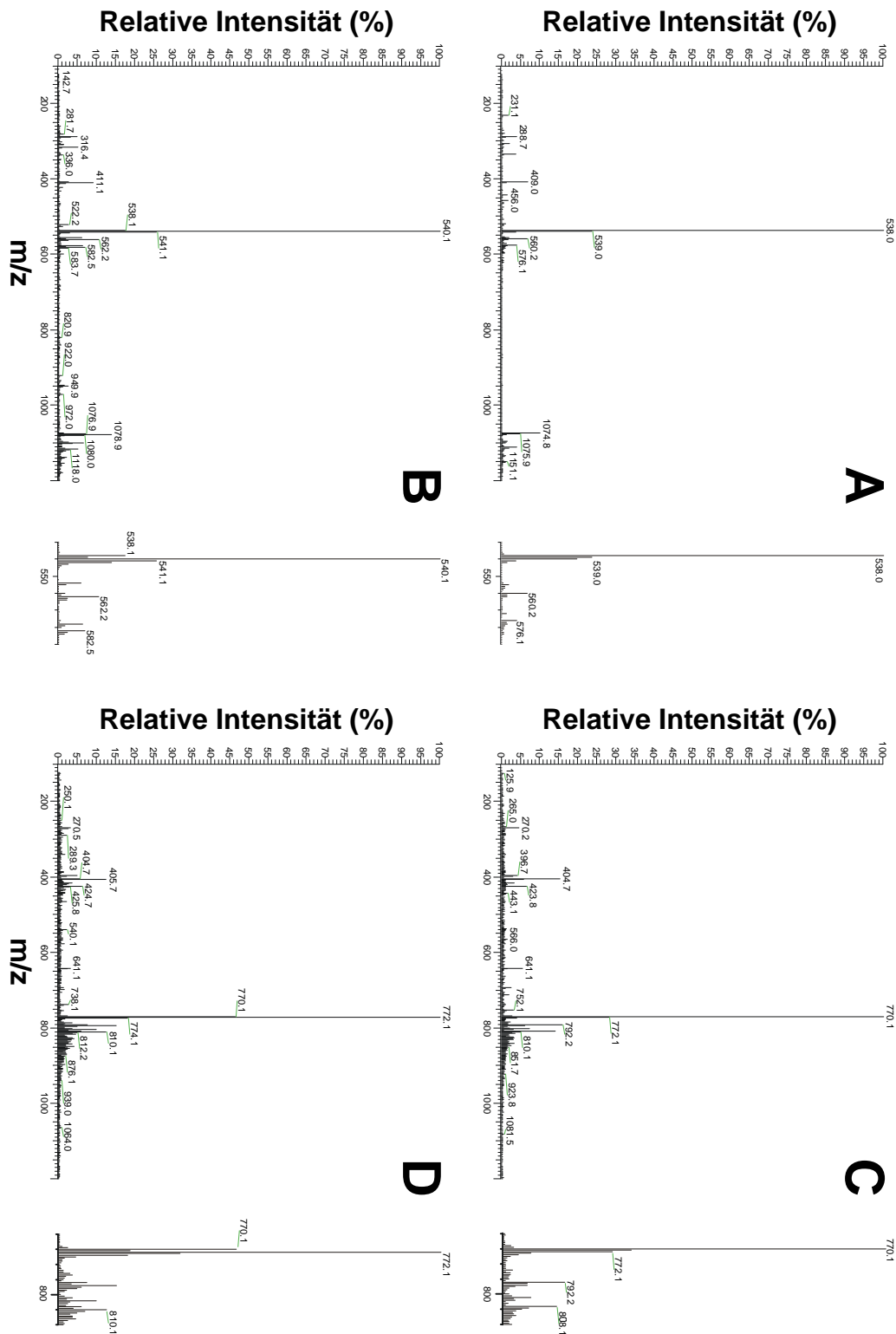
### C.2.5. Nachweis der gebildeten Peptide durch Massenspektrometrie

Um zu zeigen, daß die durch As induzierten Substanzen wirklich Phytochelatine sind, wurden diese gereinigt und massenspektroskopisch analysiert. Zum Vergleich wurden Glutathion sowie PC<sub>2</sub> und PC<sub>3</sub>, die aus mit  $\text{Cd}^{2+}$  inkubierten *Silene*-Extrakten gereinigt worden waren, verwendet. Die Analysen wurden im Institut für Organische Chemie und Biochemie der TU München durchgeführt.

Die Abbildung 55 zeigt das ESI-MS-Spektrum von PC<sub>2</sub>, gereinigt aus Arsenit-belasteten Zellen (A); PC<sub>2</sub>-Standard (B); PC<sub>3</sub>, gereinigt aus Arsenit-belasteten Zellen (C); PC<sub>3</sub>-Standard (D). In der Tabelle 7 sind die wichtigsten Massenpeaks von PC<sub>2</sub> und ihre relative Intensität aufgetragen; daneben ist die Zuordnung dieser Massenpeaks tabelliert. Die Identifikation und Nomenklatur folgt dabei Isobe et al. (1990) und Kneer et al. (1992).

Während die Standards die erwarteten Peaks mit höchster Intensität bei 540 (PC<sub>2</sub>) bzw. 772 (PC<sub>3</sub>) zeigten, traten bei den aus Arsenit-belasteten Zellen isolierten Phytochelatinen als intensivste Peaks 538 und 770 auf; auch Peaks geringerer Intensität (m+Na<sup>+</sup>; m+K<sup>+</sup>; Fragmentionen) zeigten diese Verringerung um zwei Masseneinheiten. Dieser Shift wurde interpretiert als intramolekulare Oxidation, d.h. daß zwei SH-Gruppen des PC-Moleküls eine Disulfidbrücke ausbildeten. Auch in den Standards traten die Massenpeaks der oxidierten PCs auf; der Anteil an oxidiertem PC<sub>2</sub> betrug 15 %, der an oxidiertem PC<sub>3</sub> 33 %. Auch Leopold et al. (1998) fanden hauptsächlich die Massenpeaks oxidiertter PCs in Extrakten aus Zellkulturen, die mit Cd<sup>2+</sup> und Cu<sup>2+</sup> belastet worden waren. Um zu testen, ob die gefundenen Peaks tatsächlich oxidierte PCs darstellten, wurden die entsprechenden Proben nochmals unmittelbar vor der MS-Analyse mit NaBH<sub>4</sub> reduziert. Die dabei gebildeten Salze (v.a. Borat) störten allerdings die ESI-MS, so daß auf eine andere MS-Methode ausgewichen wurde. Mit MALDI-TOF-MS konnte die Existenz der (nunmehr reduzierten) Moleküle von PC<sub>2</sub> eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 56).

Neben den intensivsten Peaks traten noch sogenannte Satellitenpeaks auf (Budzikiewicz, 1992). Dies erklärt sich aus der Zusammensetzung der Moleküle aus mehreren Isotopen des gleichen Elements. Der Peak mit der höchsten Intensität repräsentiert in der MS die „monoisotopische“ Masse, d.h. die Moleküle, die nur die jeweils häufigsten (zumeist leichtesten) Isotope enthalten (bei den Phytochelatinen also <sup>1</sup>H, <sup>12</sup>C, <sup>14</sup>N, <sup>16</sup>O und <sup>32</sup>S). Daneben treten üblicherweise noch in deutlich geringer Intensität die Moleküle auf, die zumindest ein Atom mit einer Masseneinheit mehr enthalten (d.h. in unserem Fall <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>17</sup>O und <sup>33</sup>S); extrem selten jedoch sind die Moleküle, die zwei Masseneinheiten schwerer sind. Eine Ausnahme bilden Moleküle, die Cl, Br oder S enthalten, da bei diesen Elementen das zwei Da schwerere Isotop verhältnismäßig häufig ist (<sup>34</sup>S hat einen Anteil von 4,22% am Gesamt-S). Das führte auch in unserem Falle bei den Phytochelatinen zu deutlich erkennbaren Massenpeaks bei 542 (PC<sub>2</sub>) bzw. 774 (PC<sub>3</sub>).

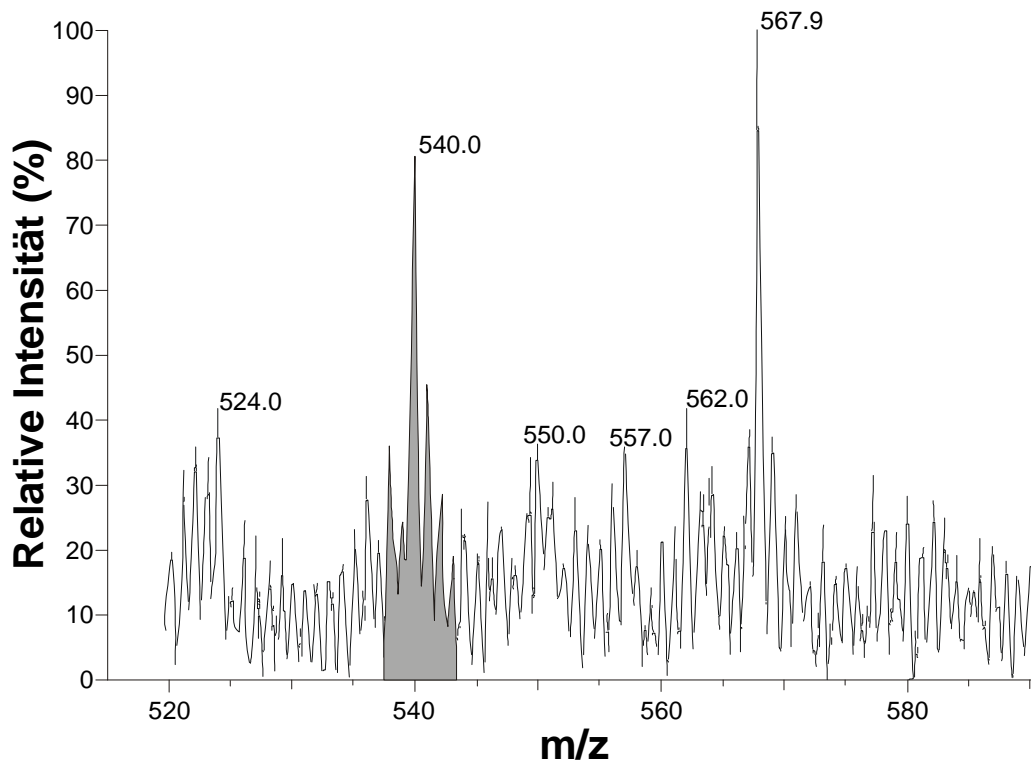


**Abbildung 55:** ESI-MS-Spektren von arsenit-induziertem PC<sub>2</sub> (A), PC<sub>2</sub>-Standard (B), arsenit-induziertem PC<sub>3</sub> (C), PC<sub>3</sub>-Standard (D). Dargestellt sind die relativen Intensitäten der protonierten Massen ( $m+H^+$ ), zum einen als Übersicht in einem breiteren Massenbereich, zum anderen als Ausschnitt um die Masse des Peptids. Die arsenit-induzierten Peptide zeigten als intensivsten Massenpeak den Peak des intramolekular oxidierten Moleküls.

m/z	Identifikation	PC <sub>2</sub> - Standard (%)	PC <sub>2</sub> aus As-Zellen (%)
289	?	5,0	3,8
290	?	3,0	<2
316	?	5,0	<2
334	A <sup>''</sup> <sub>3</sub> (intramolekular oxidiert)	<2	3,5
409	Y <sup>''</sup> <sub>4</sub> (intramolekular oxidiert)	2,5	6,8
411	Y <sup>''</sup> <sub>4</sub>	9,1	<2
522	?	2,7	<2
<b>538</b>	intramolekular oxidiertes PC <sub>2</sub> MH <sup>+</sup>	<b>17,5</b>	<b>100,0</b>
<b>539</b>	intramolekular oxidiertes PC <sub>2</sub> (M+1)H <sup>+</sup>	<b>5,9</b>	<b>23,7</b>
<b>540</b>	PC <sub>2</sub> MH <sup>+</sup>	<b>100,0</b>	<b>19,5</b>
<b>541</b>	PC <sub>2</sub> (M+1)H <sup>+</sup>	<b>25,7</b>	<b>3,6</b>
<b>542</b>	PC <sub>2</sub> (M+2)H <sup>+</sup>	<b>13,9</b>	<2
<b>543</b>	PC <sub>2</sub> (M+3)H <sup>+</sup>	<b>2,8</b>	<2
554	?	6,0	<2
555	?	2,1	<2
560	PC <sub>2</sub> MNa <sup>+</sup> (intramolekular oxidiert)	<2	6,5
562	PC <sub>2</sub> MNa <sup>+</sup>	10,4	<2
563	PC <sub>2</sub> (M+1)Na <sup>+</sup>	2,4	<2
564	PC <sub>2</sub> (M+2)Na <sup>+</sup>	2,1	<2
576	PC <sub>2</sub> MK <sup>+</sup> (intramolekular oxidiert)	<2	3,8
578	PC <sub>2</sub> MK <sup>+</sup>	6,2	<2
579	PC <sub>2</sub> (M+1)K <sup>+</sup>	2,1	<2
583	?	6,8	<2
584	?	2,5	<2

**Tabelle 7:** Massenspektrometrische Analyse von PC<sub>2</sub> (Standard) und PC<sub>2</sub> (aus arsenit-belasteten Zellen). Tabelliert sind neben den Massen (m/z) die vermutlichen Identitäten der Massenpeaks und deren relative Intensität (bezogen auf den jeweils höchsten Massenpeak). Nur Massenpeaks mit einer relativen Intensität > 2 % sind dargestellt.

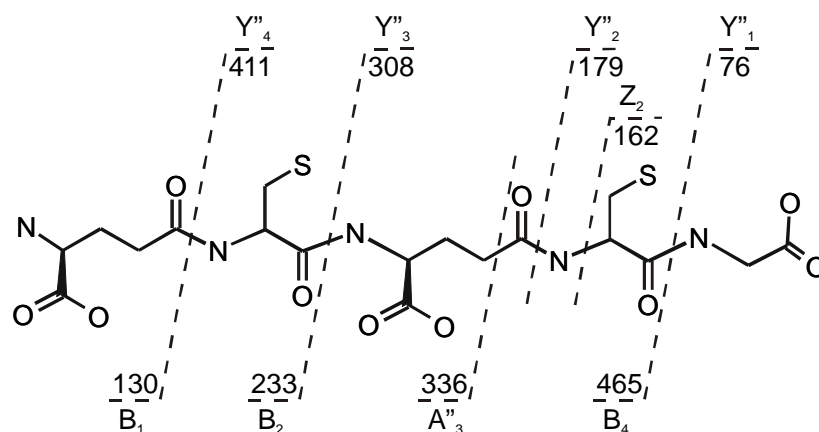
Außer den Peakscharen des intensivsten Peaks und seiner durch Isotopen hervorgerufenen Satellitenpeaks traten in den Spektren noch zwei weitere Peakscharen auf: bei  $PC_2$  bei Massen von 562 und folgende und 578 und folgende, bei  $PC_3$  bei 794 und folgende und 810 und folgende. Der Massenunterschied von 22 Da bzw. 38 Da ließ sich erklären durch die Bildung von  $m+Na^+$  bzw.  $m+K^+$ -Ionen statt der  $m+H^+$ -Ionen (Budzikiewicz, 1992).



**Abbildung 56:** MALDI-TOF-MS-Spektrum von  $PC_2$ . Das aus arsenit-belasteten *Rauvolfia serpentina*-Zellen mittels Gelfiltration und RP-HPLC gereinigte Peptid wurde unmittelbar vor der MS-Analyse mit  $NaBH_4$  reduziert. Es zeigte sich der Massenpeak des reduzierten  $PC_2$  bei  $m/z=540$  mit seinen Satellitenpeaks bei 541, 542 und 543 (grau markiert); außerdem traten auch noch die Massenpeaks des intramolekular oxidierten  $PC_2$  auf ( $m/z=538$  und  $539$ ). Die anderen Massenpeaks waren nur teilweise identifizierbar (s. Tabelle 7).

Obwohl die massenspektroskopische Analyse im MS-Modus und nicht im MS/MS-Modus (Fragmentierung der Moleküle zur Strukturaufklärung) durchgeführt wurde, waren die größeren Fragmentionen erkennbar. Das größte Fragmention hat bei  $PC_2$  einen Massenpeak von 411. In Abbildung 57 sind die Fragmentierungen anhand der Strukturformel von  $PC_2$  dargestellt (nach Kneer et al., 1992). Auch die Fragmentionen bestätigten die Identifizierung der gereinigten Peptide als  $PC_2$  und  $PC_3$ .

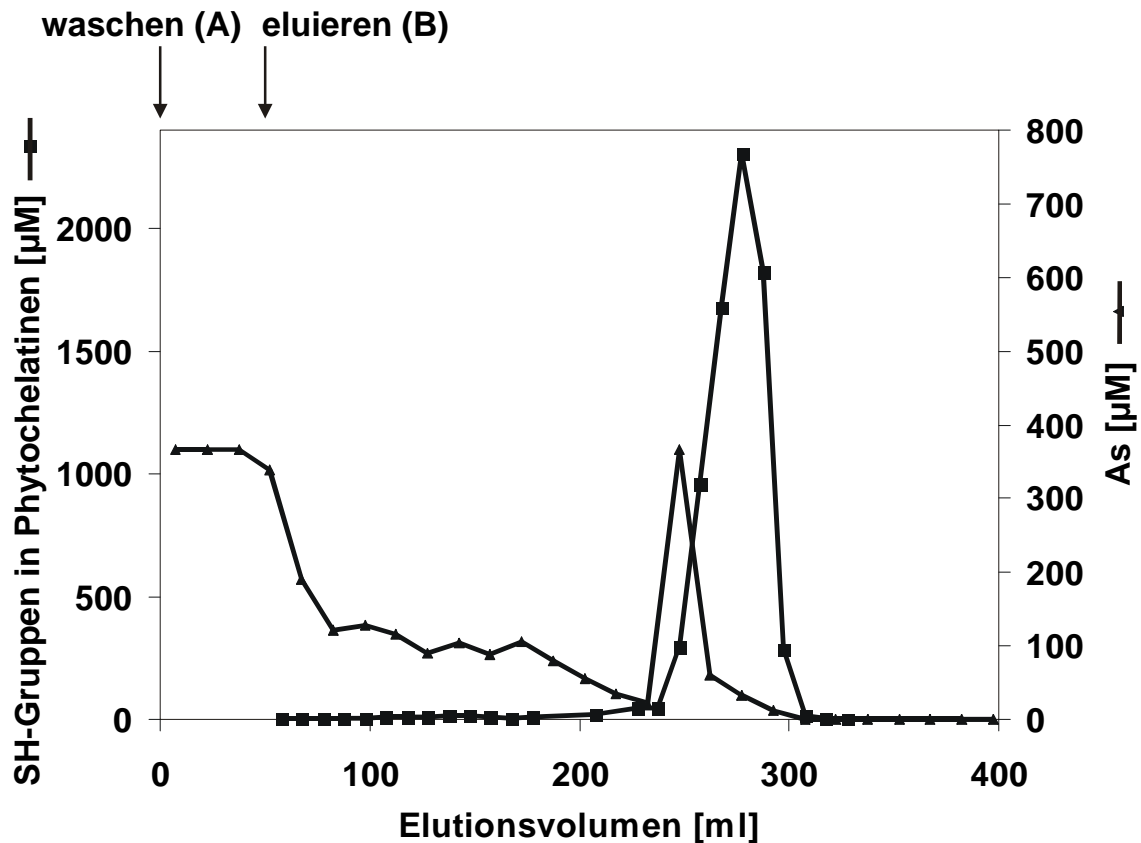
Die PC-Standards waren hinreichend sauber, um direkt in die MS injiziert zu werden; die gereinigten Proben enthielten jedoch noch Verunreinigungen. Es erschien also sinnvoller, die Proben nach nochmaliger RP-HPLC-Trennung zu analysieren (LC-MS). Beim PC<sub>2</sub> trat dabei vor dem größten UV-absorbierenden Peak (PC<sub>2</sub> bei RT=9,2 min) ein kleinerer Peak (RT=8,4 min) auf. Die massenspektroskopische Analyse ergab eine Masse von 481; es handelte sich hierbei also um (intramolekular oxidiertes) desgly-PC<sub>2</sub> (γ-Glu-Cys-γ-Glu-Cys). Die PC<sub>3</sub>-Probe enthielt neben PC<sub>3</sub> (RT=11,6 min) noch einen Rest von PC<sub>2</sub>, jedoch keine nachweisbaren Mengen von desgly-PC<sub>3</sub>.



**Abbildung 57:** Fragmentierungsschema von PC<sub>2</sub> bei der massenspektroskopischen Analyse (nach Kneer et al., 1992). Angegeben sind die Massen der erwarteten Fragmentionen und ihre Bezeichnung (s. auch Tabelle 7).

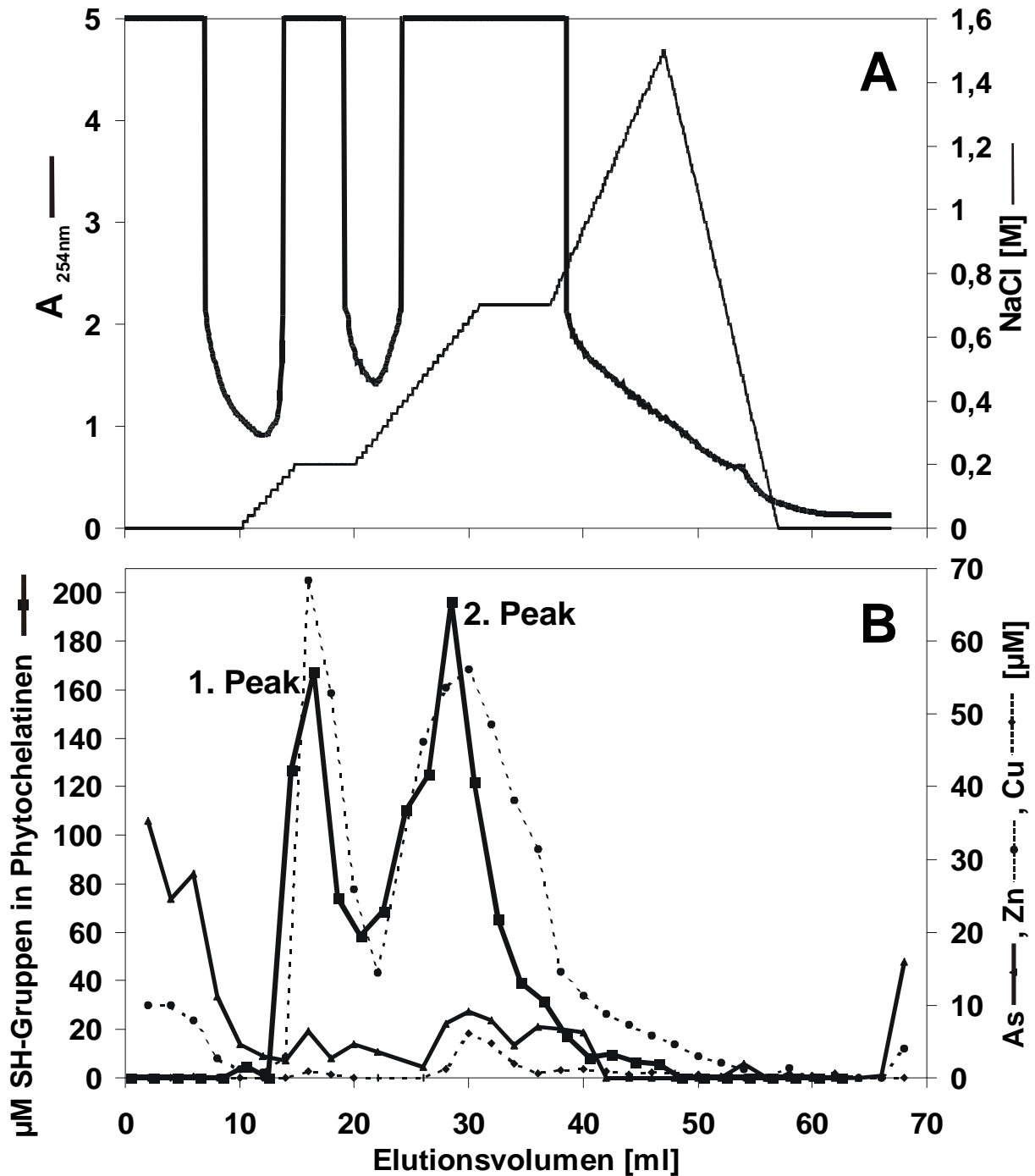
### C.2.6. Komplexierung von Arsen durch Phytochelatine: Anionenaustauscher-Chromatographie

Die Reinigung von Phytochelatin-Metallkomplexen umfaßte als ersten Schritt oft eine Anionenaustauscher-Chromatographie (Grill et al., 1987, 1991). Daher wurden beim Versuch, die vermuteten As-PC-Komplexe zu reinigen, auch eine solche Chromatographie (Säulenmaterial DEAE-Biogel) verwendet. Ein typisches Elutionsprofil ist in Abbildung 58 dargestellt. Dieser Lauf zeigte, daß die Masse des Arsens während des Waschens mit Auftragspuffer eluierte, und nur eine ganz geringe Menge zusammen mit PCs coeluierte. Bei anderen Läufen zeigte sich ein ähnliches Bild, jedoch eluierte das Arsen z.T. schon während des Probenauftrags. Da sich unter diesen Bedingungen keine As-PC-Komplexe reinigen ließen, wurde dieser Ansatz im weiteren nicht mehr verfolgt.



**Abbildung 58:** DEAE-Biogel-Anionenaustauscherchromatographie: 100 g *Rauwolfia serpentina*-Zellen, die mit 80 µM Arsenit belastet worden waren, wurden mit 50 ml 20 mM Tris-Cl (pH 8.6) extrahiert; der auf 200 ml verdünnte Extrakt (eingestellt auf pH 8.6) wurde aufgetragen, mit 50 ml Auftragspuffer A (10 mM Tris-Cl, pH 8.6) gewaschen und mit Elutionspuffer B (10 mM Tris-Cl, 500 mM NaCl, pH 8.6) eluiert. Die Fraktionen wurden mit AAS auf Arsen und mit HPLC auf Phytochelatine getestet. Nur geringe Mengen des Arsens coeluierten mit den PCs.

Eine neuere Publikation von Sneller et al. (1999) zeigte mit einem anderen Säulenmaterial (Mono Q) eine (partielle) Koelution von Arsen mit Phytochelatinen aus Wurzeln von *Silene vulgaris*. Daher wurde getestet, ob dieses auch in Extrakten aus *Rauwolfia serpentina*-Zellen gezeigt werden kann. Die Phytochelatine konnten mit Mono Q in zwei Peaks getrennt werden; der erste (eluierte bei 0,2 M NaCl) enthielt hauptsächlich PC<sub>2</sub>, der zweite (eluierte bei 0,58 M NaCl) hauptsächlich PC<sub>3</sub>. Das Arsen eluierte auch hier hauptsächlich während des Waschens, allerdings koeluierte Arsen auch in geringer Menge mit den Phytochelatinen (Abbildung 59). Das überraschende war jedoch, daß Zink in großer Menge, und in deutlich geringerem Ausmaß Kupfer, mit den Phytochelatinen eluierte. Zumindest unter den hier angewendeten Extraktions- und Elutionsbedingungen scheinen die Phytochelatine hauptsächlich Zn (80 %)



**Abbildung 59:** Mono-Q-Anionenaustauscherchromatographie: 23,5 g *Rauwolfia serpentina*-Zellen, die für drei Tage mit 30  $\mu\text{M}$  Arsenat belastet worden waren, wurden mit 23,5 ml Tris-Cl (20 mM, pH 8.0) extrahiert; der Extrakt (ca. 100 mg Protein) wurde auf 40 ml verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Nach 10 ml Waschen mit Puffer A (20 mM Tris-Cl pH 8.0) wurde ein Gradient von 0-1,5 M NaCl in Puffer A zur Elution benutzt. In A ist die UV-Absorption und der NaCl-Gradient dargestellt. Die Fraktionen wurden mit ICP-AES auf Arsen, Zink und Kupfer und mit HPLC auf Phytochelatine getestet (B). Zusammen mit den Phytochelatinen eluierte Zink, etwas Kupfer und ein Teil des Arsens.



und etwas Cu (3 %) und As (17 %) zu komplexieren; die Mengen der Phytochelatin-SH-Gruppen und der Metalle/Metalloide legten es nahe, Komplexe mit zwei SH-Gruppen pro  $Zn^{2+}$  bzw.  $Cu^{2+}$  und drei SH-Gruppen pro  $As^{3+}$  zu postulieren (Tabelle 8).

	nMol 1.Peak	nMol 2.Peak	nMol beide Peaks
<b>SH-Gruppen in Phytochelatinen</b>	748	1619	2381
<b>Zn</b>	294	708	1007
<b>Cu</b>	3	40	43
<b>As</b>	28	115	142
<b>Summe <math>Me^+</math>-Äquivalente</b>	676	1841	2525
<b>Verhältnis SH: <math>Me^+</math></b>	<b>1,11</b>	<b>0,88</b>	<b>0,94</b>
<b>Anteil der PC-SH-Gruppen, die Zn binden (%)</b>	87	77	80
<b>Anteil der PC-SH-Gruppen, die Cu binden (%)</b>	0,8	4	3
<b>Anteil der PC-SH-Gruppen, die As binden (%)</b>	<b>12</b>	<b>19</b>	<b>17</b>

**Tabelle 8:** Mono Q-Anionenaustauscherchromatographie (s. Abbildung 59): Mengen von Phytochelatinen und Metallen in den beiden Phytochelatin-haltigen Peaks. Die Phytochelatine in den beiden Peaks würden genügen, um alles Zn und Cu im Verhältnis 2:1 (SH: $Me^{2+}$ ) und alles As im Verhältnis 3:1 (SH: $Me^{3+}$ ) zu komplexieren, da das Verhältnis SH-Gruppen zu  $Me^+$ -Äquivalente etwa 1:1 ist.

### C.2.7. Komplexierung von Arsen durch Phytochelatine: Gelfiltrationen

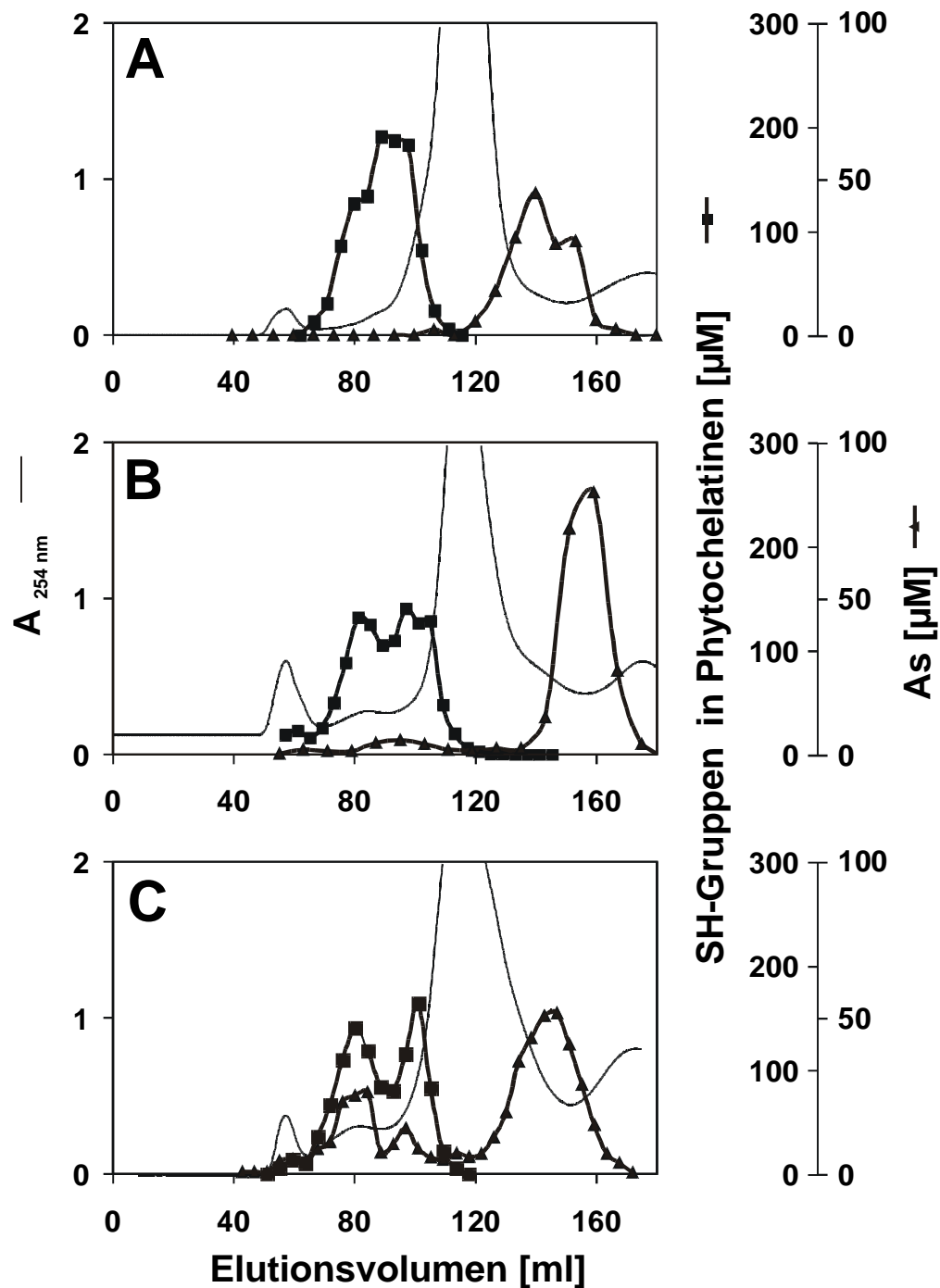
Die verbreitetste Methode, um Komplexe von Metallen mit Biomolekülen nachzuweisen, ist die Gelfiltration (z.B. Grill et al., 1985; Lobinski & Potin-Gautier, 1998), da diese Trennmethode im Vergleich zu anderen chromatographischen Methoden weniger stark die Wechselwirkungen zwischen Metall und Ligand beeinflusst. Gelfiltrationen eines Rohextrakts

aus Arsenit-belasteten *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen bei Standardbedingungen (10 mM Tris-Cl pH 8.0; 100 mM NaCl) zeigten jedoch, daß das Arsen nicht zusammen mit den Phytochelatinen eluierte, sondern an der gleichen Stelle wie freies Arsenit (Abbildung 60A). Ein ähnliches Ergebnis wurde auch mit Arsenat-belasteten Zellkulturen erzielt: Auch hier konnte kein Komplex gezeigt werden, das Arsen eluierte wie freies Arsenit, d.h. das dem Medium zugesetzte Arsenat war in den Zellen zu Arsenit reduziert worden (Arsenat eluierte bei der Gelfiltration unabhängig vom pH etwa 35 ml vor Arsenit).

In schwach saurem Puffer werden Arsen-Thiol-Komplexe stabilisiert und Oxidation vermindert (Jocelyn, 1972); auch die Vakuole, in der PC-Cd-Komplexe und möglicherweise auch PC-Komplexe mit anderen Metallen abgelagert werden (Vögeli-Lange & Wagner, 1990), ist sauer. Daher wurden die Zellen mit Acetat-Puffer (pH 4.0) extrahiert und mit dem gleichen Puffer (+ 100 mM NaCl) gelfiltrierte. Unter diesen Bedingungen koeluierte 10 % des aufgetragenen Arsens mit den Phytochelatinen, 90 % jedoch eluierten als freies Arsenit (Abbildung 60B).

Um einen möglicherweise existierenden Komplex weiter zu stabilisieren bzw. das Gleichgewicht zwischen Bildung und Auflösung des Komplexes in Richtung des Komplexes zu verschieben, wurde eine geringe Konzentration Arsenit (5  $\mu$ M) zum Laufpuffer für die Gelfiltration gegeben. Unter diesen Bedingungen eluierte 35 % des Arsens mit den Phytochelatinen (Abbildung 60C). Der PC-Arsen-Komplex konnte in zwei Peaks getrennt werden, wobei der erste etwa gleich viel PC<sub>3</sub> und PC<sub>2</sub> enthielt, der zweite 80 % PC<sub>2</sub>. Die Konzentrationen der Phytochelatine und des Arsens waren in diesen Fraktionen korreliert ( $r=0,71$ ;  $p<0,002$ ), besonders gut war die Korrelation jedoch im ersten Peak ( $r=0,93$ ;  $p<0,0001$ ). Das Verhältnis SH-Gruppen zu Arsen war mit 5:1 unerwartet hoch.

Eine weitere Reinigung des Komplexes, um ihn genauer zu charakterisieren, gelang nicht. Die Bindung zwischen Arsen und Phytochelatinen wurde bereits im ersten Schritt des Reinigungsschemas, der Anionenaustauscherchromatographie (Grill et al., 1991), destabilisiert (s. C.2.6).



**Abbildung 60:** Gelfiltrationen von Arsenit-belasteten *Rauwolfia serpentina*. Die für vier Tage mit 80  $\mu\text{M}$  Arsenit belasteten Zellen wurden mit 10 mM Tris-Cl (pH 8.0) (A) bzw. 10 mM  $\text{NaCH}_3\text{COO}$  (pH 4.0) (B,C) extrahiert; 8 ml des Extrakts wurden auf eine Sephadex G25-Säule (1,6 x 64 cm;  $V_0=55$  ml;  $V_t=130$  ml) aufgetragen und mit 10 mM Tris-Cl (pH 8.0) in 100 mM NaCl (A), 10 mM  $\text{NaCH}_3\text{COO}$  (pH 4.0) in 100 mM NaCl (B) bzw. 10 mM  $\text{NaCH}_3\text{COO}$  (pH 4.0) in 100 mM NaCl mit 5  $\mu\text{M}$  Arsenit (C) eluiert. Die Fraktionen wurden mittels RP-HPLC auf Thiole und mittels AAS auf Arsen getestet. In A coeluierten 0 % des Arsens mit den Phytochelatinen, in B 10 % und in C 35 %.

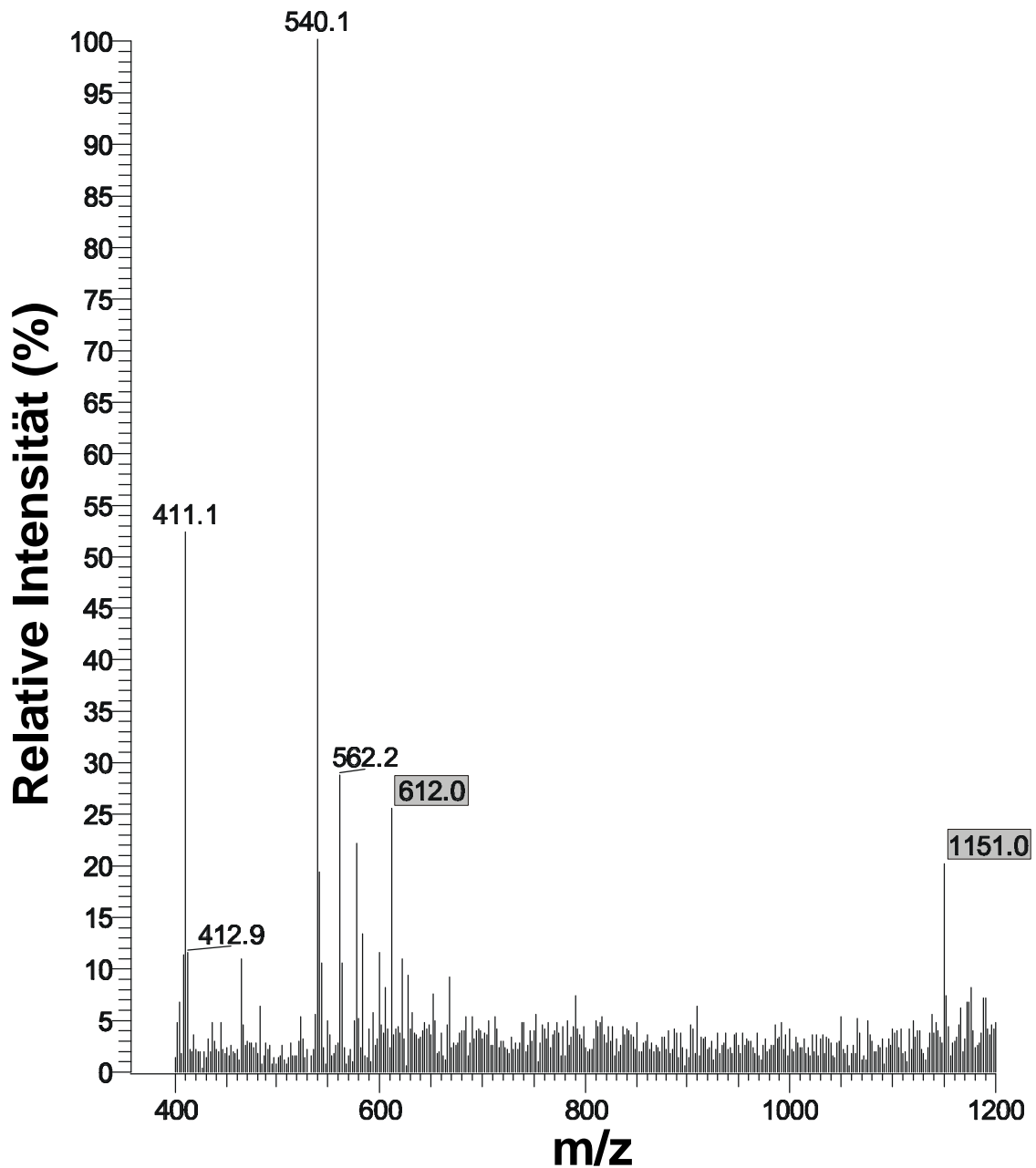
Um den Effekt des pH-Werts genauer zu untersuchen, wurden Komplexe zwischen Arsenit und PC<sub>2</sub> bzw. Glutathion synthetisiert; für diese Rekonstitution wurden die Thiole in einem molaren Verhältnis von 3:1 gegenüber Arsen verwendet. Die Gelfiltrationen zeigten ähnliche Ergebnisse wie die Gelfiltrationen von Zellextrakten (Tabelle 9).

Koelution von As mit dem Peptid		
	pH 8.0	pH 4.0
As-GSH-Komplex	43%	95%
As-PC <sub>2</sub> -Komplex	0%	38%

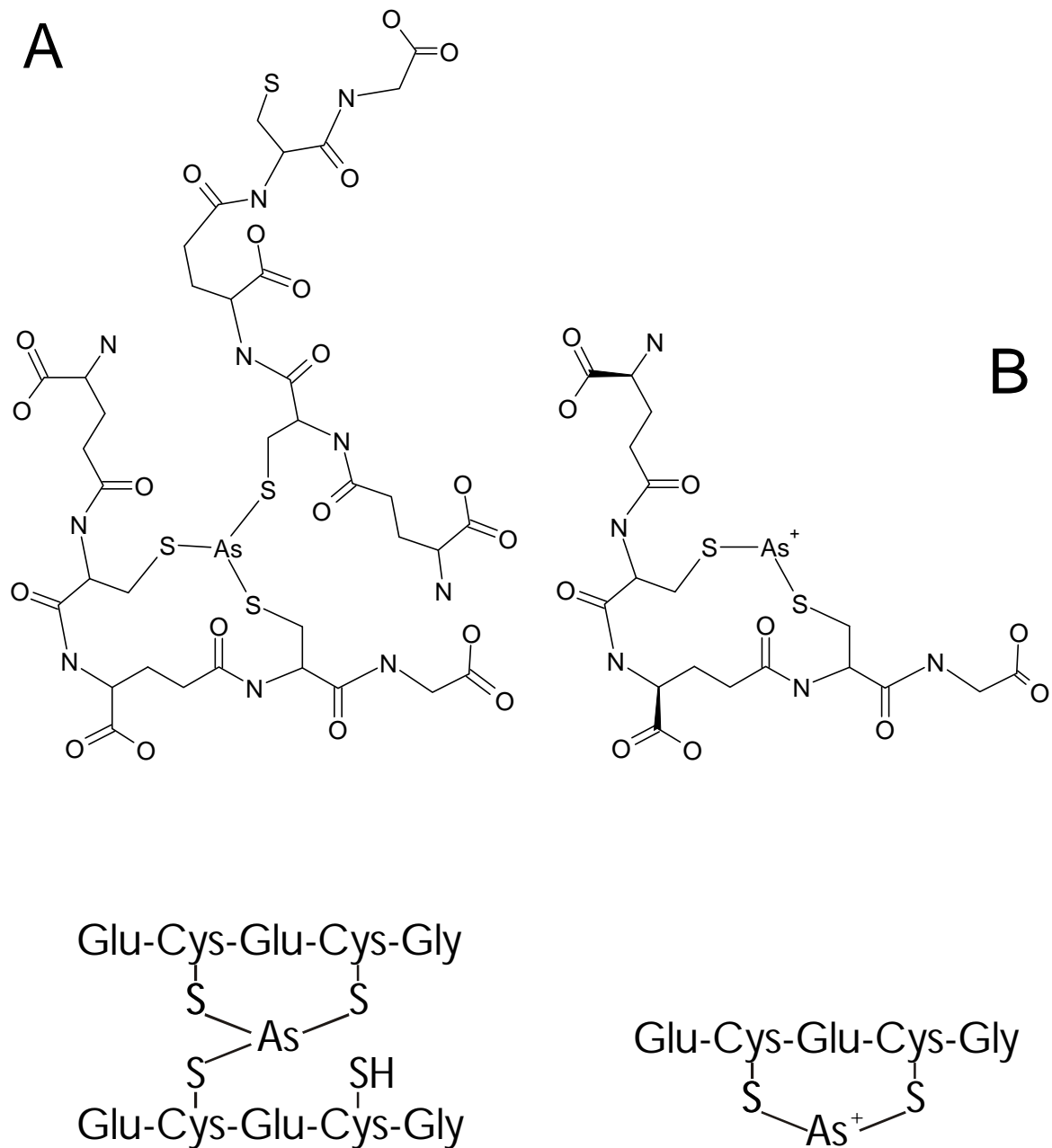
**Tabelle 9:** Gelfiltrationen (Sephadex G25; s. Abbildung 60) von rekonstituierten As-GSH- bzw. As-PC<sub>2</sub>-Komplexen bei verschiedenem pH-Wert des Elutionspuffers. Die Komplexe waren mit einem molaren Verhältnis SH:As von 3:1 synthetisiert worden; tabelliert sind die Anteile des aufgetragenen Arsens, die mit dem Peptid koeluierten.

### C.2.8. Komplexierung von Arsen durch Phytochelatine: Massenspektrometrie

Um zu prüfen, ob ein rekonstituierter As-PC<sub>2</sub>-Komplex existiert und um anhand der Masse des eventuell existierenden Komplexes auf die Struktur zu schließen, wurde eine massenspektrometrische Analyse des rekonstituierten Komplexes aus PC<sub>2</sub> und As mit ESI-MS durchgeführt. Zusätzlich zu den bekannten Peaks (v.a. bei  $m/z=540$ ; s. C.2.4) zeigten sich zwei neue Massenpeaks bei 612 und 1151 Da (Abbildung 61). Ein Vergleich mit zu erwartenden Massen ergab für den 1151 Da-Peak einen Komplex aus zwei PC<sub>2</sub>-Molekülen, die ein As über drei ihrer SH-Gruppen koordinieren (Abbildung 62A); die wahrscheinliche Struktur, die durch den 612 Da-Peak repräsentiert wird, ist ein kationischer Komplex aus einem PC<sub>2</sub>-Molekül und einem As (Abbildung 62B).



**Abbildung 61:** ESI-MS-Spektrum des rekonstituierten As-PC<sub>2</sub>-Komplexes. Neben dem Massenpeak des freien PC<sub>2</sub> ( $m+H^+$  540) treten neue Massenpeaks bei 612 und 1151 Da auf. Die abgeleiteten Strukturen sind in Abbildung 62 dargestellt.

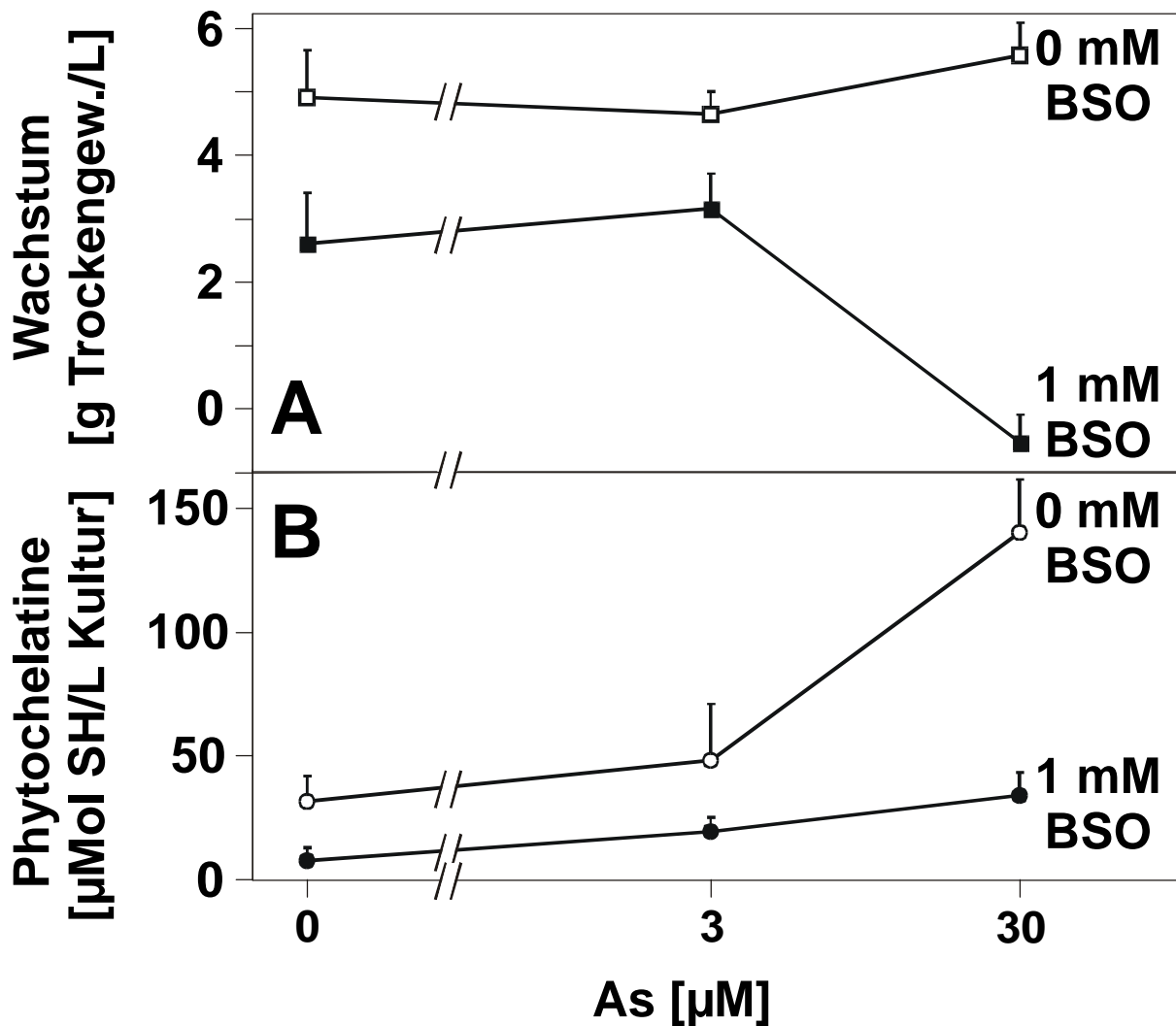


**Abbildung 62:** Abgeleitete hypothetische Strukturen der mit ESI-MS nachgewiesenen As-PC<sub>2</sub>-Komplexe mit den Massenpeaks bei 1151 Da (A) und 612 Da (B).

### C.2.9. Inhibierung der As-induzierten Phytochelatin-Bildung durch BSO

Ob Phytochelatine tatsächlich *in vivo* zur Entgiftung von Arsen beitragen, kann am besten untersucht werden, indem spezifische Biosynthese-Inhibitoren zugegeben werden. Für die Phytochelatin-Synthese sind keine Inhibitoren bekannt, jedoch für die Synthese der Vorstufe

Glutathion; Buthionin-Sulfoximin (BSO) ist der am häufigsten verwendete (Griffith & Meister, 1979).



**Abbildung 63:** Effekt von Buthioninsulfoximin (BSO), eines Inhibitors der GSH-Biosynthese, auf das Wachstum (A) und die PC-Synthese (B) in *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen belastet mit unterschiedlichen Arsenit-Konzentrationen. Das Inokulum vor der Belastung betrug  $7,4 (\pm 0,7)$  g Trockengewicht/L; in diesen waren  $38,1 (\pm 8,9)$   $\mu\text{Mol}$  GSH und  $17,7 (\pm 2,2)$   $\mu\text{M}$  Phytochelatine (als SH-Gruppe) enthalten. Drei Stunden nach der Zugabe von BSO wurden die Zellkulturen mit den angegebenen Arsenit-Konzentrationen belastet. Die Werte (Zunahme des Trockengewichts und Bildung von Phytochelatinen) wurden nach weiteren vier Tagen bestimmt; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung ( $n=3$ ).

*Rauvolfia serpentina*-Zellkulturen erhielten zunächst 1 mM BSO, und nach drei Stunden unterschiedliche Konzentrationen von Arsenit (Abbildung 63). Während in der Kontrolle (kein BSO) die Arsenit-Konzentration keine Auswirkung auf das Wachstum hatte (s. auch Abbildung 44), starben die Zellen bei der Kombination 30  $\mu$ M Arsenit und 1 mM BSO ab, so daß das Trockengewicht nach vier Tagen unter dem Inokulum lag; BSO allein hatte zwar auch schon eine Verminderung des Wachstums zur Folge, allerdings erst in der sehr hohen Konzentration von 1 mM. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich erwartungsgemäß bei der Bildung von Phytochelatinen: Während Zellkulturen ohne BSO Phytochelatine als Reaktion auf Arsenit bildeten (s. auch Abbildung. 46), blieb die Phytochelatinbildung in BSO-behandelten Zellkulturen fast aus. Die Phytochelatinmenge war in Zellkulturen mit 1 mM BSO und 30  $\mu$ M Arsenit um 75 % reduziert, die GSH-Menge um 50 %. Interessanter erscheinen die Werte, wenn man sie mit den Ausgangswerten vor der Behandlung mit BSO und Arsenit vergleicht: pro Liter enthielten die Zellkulturen 55,8  $\mu$ Mol  $\gamma$ -Glu-Cys-Peptide (38,1  $\mu$ Mol GSH; 17,7  $\mu$ Mol PC); durch Neusynthese von zunächst Glutathion erhöhten die Zellkulturen ohne BSO, aber mit 30  $\mu$ M Arsenit diese Menge um 267% (204,7  $\mu$ Mol  $\gamma$ -Glu-Cys-Peptide, davon 64,5  $\mu$ Mol GSH und 140,2  $\mu$ Mol PC), während die Zugabe von 1 mM BSO gerade eine Erhöhung um 18% erlaubte (66,2  $\mu$ Mol  $\gamma$ -Glu-Cys-Peptide, davon 32,2  $\mu$ Mol GSH und 34  $\mu$ Mol PC).

### C.2.10. Teildiskussion: Arsen und Phytochelatine

Während die Induktion von Phytochelatinen durch klassische Schwermetalle wie Cd, Pb, Cu oder Zn gut untersucht ist, war über das Halbmetall Arsen recht wenig bekannt. Daß Phytochelatine durch Arsenat induziert werden, zeigten bereits Grill et al. (1987) und Maitani et al. (1996). Arsenit genauso wie Arsenat induzierten in Zellkulturen wie in ganzen Pflanzen Phytochelatine, sogar mehr als Cadmium (bei gleicher externer sublethaler Konzentration); inwieweit auch organische Arsenverbindungen Phytochelatine induzieren, bleibt im Detail zu klären. Kakodylat auf jeden Fall hatte keinen Effekt, während sich Melarsoprol als sehr potenter Induktor erwies. Dabei war allerdings überraschend, daß das Propylenglykol, in dem das Melarsoprol gelöst war, das Wachstum der Zellkulturen stimulierte. Weitere Untersuchungen mit Melarsoprol konnten nicht durchgeführt werden, da nur geringe Mengen der kommerziell nicht erhältlichen Chemikalie zur Verfügung standen.

Die Bildung der Phytochelatine nach Zugabe von anorganischen Arsen-Verbindungen (Arsenit und Arsenat) zeigte eine ähnliche Konzentrations- und Zeitabhängigkeit wie nach



Zugabe von Cadmium (Grill et al., 1987). Allerdings induzierte Arsen, genauso wie die meisten Elemente, ausgenommen Cadmium, überwiegend die kürzeren Peptide PC<sub>2</sub> und PC<sub>3</sub>. Auch grob gereinigte PC-Synthase-Enzympräparationen (Schmöger et al., 2000) und heterolog exprimierte PC-Synthase (Vatamaniuk et al., 2000) produzierten nach Arsenit-Zugabe Phytochelatine.

Daß die gebildeten Substanzen tatsächlich Phytochelatine waren, wurde zunächst durch RP-HPLC gezeigt; nicht nur die mit Standards identischen Retentionszeiten sprachen dafür, sondern auch das Auftreten von weiteren Peaks in *Agrostis tenuis*-Zellen, einer Art, die auch nach Cd<sup>2+</sup>-Zugabe hydroxymethyl-Phytochelatine bildet (Klapheck et al., 1994). Einen endgültigen Beweis jedoch lieferte die Massenspektroskopie: Sowohl Molekülpeak als auch Satellitenpeaks und Fragmentationenpeaks ließen sich eindeutig Phytochelatinen zuordnen (PC<sub>2</sub> bzw. PC<sub>3</sub>). Allerdings traten, anders als in den verwendeten Standards, intramolekular oxidierte Phytochelatine auf, die massenpektrometrisch durch ihre um zwei Da verminderte Masse erkannt werden konnten. Intramolekular oxidierte Phytochelatine fanden auch schon Leopold et al. (1998) in cadmium-belasteten Tomaten-Zellkulturen; daher kann man annehmen, daß ein beträchtlicher Teil der Oxidation durch die Reinigung und Probenvorbereitung zustande kommt.

Schwieriger ist die Frage, welche Rolle die Phytochelatine *in vivo* bei der Arsen-Entgiftung spielen. Phytochelatine entgiften Metalle, indem sie diese als Thiolat-Komplexe binden, ähnlich wie Metallothionein (Kägi, 1991); diese Komplexe konnte für Cd<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup> und Pb<sup>2+</sup> durch optische Spektroskopie (Mehra et al., 1995, 1996a, 1996b) und EXAFS-Spektroskopie (Strasdeit et al., 1991; Pickering et al., 1999) gezeigt werden, für andere Elemente fehlen diese Daten. Ein anderer Weg, um Komplexe nachzuweisen, ist die Cochromatographie von Metall und Ligand; die verbreitetste und schonendste Methode ist die Gelfiltration. Schon Maitani et al. (1996) konnten mit Gelfiltration keinen As-PC-Komplex nachweisen; dieses Ergebnis ließ sich bei pH 8.0 reproduzieren. Bei saurem pH (pH 4.0) konnte jedoch eine Cochromatographie von Arsen und Phytochelatinen gezeigt werden; der Komplex wurde durch Zugabe von Arsenit im Laufpuffer weiter stabilisiert. Daß diese Koelution von Arsen mit Phytochelatinen nicht zufällig war, zeigte sich daran, daß im Gelfiltration-Elutionsprofil zwei Phytochelatin-Peaks auftraten, die signifikant mit den Arsen-Peaks korreliert waren. Allerdings eluierte auch bei einer Gelfiltration bei pH 4.0 mit Arsenit im Laufpuffer noch 65 % des Arsens als freies Arsenit; die apparente Stöchiometrie SH-

Gruppen zu As in den phytochelatin-haltigen Fraktionen war 5:1, was überraschend hoch war. Ein großer Teil der Phytochelatine schien dabei kein Arsen zu binden, sei es daß die Phytochelatine oxidiert waren, oder daß sie andere Elemente gebunden hatten.

Die Existenz eines synthetisierten Komplexes aus Arsenit und PC<sub>2</sub> konnte mit Gelfiltration und mit ESI-MS gezeigt werden; dies war der erste massenspektroskopische Nachweis eines PC-Metall-Komplexes. Mittlerweile wurden auch Cd-PC-Komplexe massenspektrometrisch untersucht (Yen et al., 1999). Die bei der ESI-MS gefundenen Massen deuten auf eine Koordinierung eines As durch drei SH-Gruppen hin. Dies stimmt mit den durch NMR bestätigten Strukturen von As-GSH-Komplexen überein, bei denen drei Peptidmoleküle ein As koordinieren (Scott et al., 1993). Analog zu PC<sub>2</sub>-As-Komplexen sind auch die Komplexe von Trypanothion (N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis-(glutathionyl)-spermidin) mit Arsen; diese treten in *Leishmania* auf, ihre Überproduktion führt zu erhöhter Toleranz gegenüber Arsen- und Antimonverbindungen (Mukhopadhyay et al., 1996). Thiole gelten allgemein als exzellente Liganden für As, insbesondere Thiole mit benachbarten (vicinalen) SH-Gruppen; als Antidot bei Arsen-Vergiftungen sei hier nur Dimercaptopropanol erwähnt (Webb & van Heyningen, 1947). Auch Peptide mit einem Cys-Cys-X-X-Cys-Cys-Motiv interagieren spezifisch und mit hoher Affinität mit Arsenverbindungen (Griffin et al., 1998).

Die Schwierigkeiten, chromatographisch einen As-PC-Komplex zu zeigen, oder gar zur Homogenität zu reinigen, sind nur teilweise auf die Eigenheiten des Elements Arsen zurückzuführen. Zum einen sind solche Komplexe im basischen weniger stabil als im leicht sauren, wie schon für As-GSH-Komplexe gezeigt wurde (Jocelyn, 1972); zum anderen lassen sich Phytochelatine leicht oxidieren, insbesondere katalysiert durch As<sup>III</sup>/As<sup>V</sup>-Übergänge. Solche Oxidationen, die eher unter basischen Bedingungen als unter sauren stattfinden, zerstören den Komplex. Das Vorkommen von oxidierten PCs in der ESI-MS-Analyse deutete in diese Richtung, könnte jedoch auch durch die Probenvorbereitung bedingt sein (s. auch Leopold et al., 1998). Auch eine den Komplex destabilisierende Interaktion des Arsens mit dem Gelfiltrations-Säulenmaterial ist beschrieben (Gailer & Lindner, 1998).

Grundsätzlich gelangt man jedoch mit den verwendeten biochemischen Methoden überhaupt an die Grenzen bei der Charakterisierung der PC-Komplexe. Die kinetische Instabilität der PC-(Halb)Metall-Komplexe läßt es nicht zu, ihre *in vivo*-Struktur bei der Extraktion und Chromatographie zu erhalten. Die Extraktion führt zur Zerstörung der intrazellulären

Kompartimentierung und dadurch zu weiteren (unerwünschten) Reaktionen. Die auffällige Cochromatographie von Zink mit Phytochelatinen bei der MonoQ-Ionenaustauscherchromatographie (Abbildung 59 und Sneller et al., 1999) könnte z.B. daher kommen, daß das normalerweise in der Vakuole von organischen Säuren gebundene Zink bei pH 8.0 eher an Phytochelatine bindet (Wang et al., 1992). Die bisher gereinigten PC-Komplexe stellen daher bestenfalls eine Näherung des *in vivo*-Zustands dar; daß bisher v.a. der Cd-Komplex genauer untersucht wurde (Grill et al., 1987; Kneer & Zenk, 1997; Plocke, 1991), könnte auf die Stabilisierung dieser Komplexe durch Einbau längerer Phytochelatine und Sulfid zurückzuführen sein.

Bei der weiteren Untersuchung von Phytochelatin-Komplexen sollten also Methoden im Vordergrund stehen, die *in vivo* und *in situ* angewendet werden können. Die Reinigung von Vakuolen, dem Speicherkompartiment, in dem auch PC-Komplexe landen (Vögeli-Lange & Wagner, 1990), ist eine Möglichkeit; andere sind die Anwendung von elektronenmikroskopischen Techniken (Van Steveninck et al., 1990; Lichtenberger & Neumann, 1997) oder Ganz-Zell-NMR (Cullen & Hettipathirana, 1994). Gerade in jüngerer Zeit wurden vermehrt röntgenspektroskopische Methoden verwendet, um die Koordinierungsumgebung von Elementen aufzuklären. So konnten Pickering et al. (2000) zeigen, daß in *Brassica juncea* Arsen im wesentlichen von drei SH-Gruppen koordiniert wird; sie ließen es zwar offen, ob Glutathion oder Phytochelatin der Ligand ist, jedoch unterstützte dieses Ergebnis, erzielt mit einer ganz anderen Methode, die hier dargestellten Ergebnisse.

Unabhängig von der Frage, wie Arsen *in vivo* komplexiert wird, zeigte das Experiment mit dem GSH-Biosynthese-Inhibitor BSO, daß Glutathion und/oder Phytochelatin an der Arsen-Entgiftung beteiligt sind; die Glutathion- und Phytochelatin-Konzentrationen waren mit BSO stark vermindert, die Zellen reagierten deutlich sensitiver auf Arsen.

Auch wenn die direkte Interaktion zwischen As und PC *in vivo* nicht gezeigt werden konnte, sprechen doch drei einander ergänzende Argumentationslinien dafür, daß Phytochelatine *in planta* Arsen binden und so entgiften:

1. Die verschiedenen Ergebnisse, die zeigten, daß Arsen *in vitro* und wohl auch *in vivo* an Phytochelatine bindet.

2. Die Wirkung von BSO, die deutlich machte, daß Phytochelatine oder die Vorstufe GSH an der Entgiftung von Arsen beteiligt sind.

3. Schließlich die Mutantanalyse: PC-Synthase-defiziente Mutanten von *Arabidopsis* und *Schizosaccharomyces pombe* waren gegenüber Arsenat sensitiver als der Wildtyp (Ha et al., 1999); die Überexpression des Gens in Hefe führte zu größerer Resistenz gegenüber Arsenit und Arsenat (Vatamaniuk et al., 1999).

Gerade der letzte Punkt, nämlich die Mutantanalyse, hilft bei der Beantwortung der Frage weiter, ob Glutathion oder Phytochelatine *in vivo* die Arsen-Entgiftung bewerkstelligen. Pickering et al. (2000) ließen dies zwar offen, die hier vorgestellten Ergebnisse in Kombination mit den beschriebenen Mutantanalysen wiesen jedoch klar die Phytochelatine als die bei der Arsen-Entgiftung entscheidenden Moleküle aus: In arsen-belasteten Pflanzen war nicht die Glutathion-Konzentration erhöht, sondern die Phytochelatin-Konzentration; bei der Gelfiltration war die Arsen-Konzentration mit der Phytochelatin-Konzentration, nicht mit der Glutathion-Konzentration korreliert; und schließlich war es die Überexpression des PC-Synthase-Gens, nicht das eines Gens der Glutathion-Biosynthese, das in Hefen zu größerer Resistenz gegenüber Arsenit und Arsenat führte (Vatamaniuk et al., 1999).

### C.3. Effekt der Elemente Antimon, Bismut und Selen

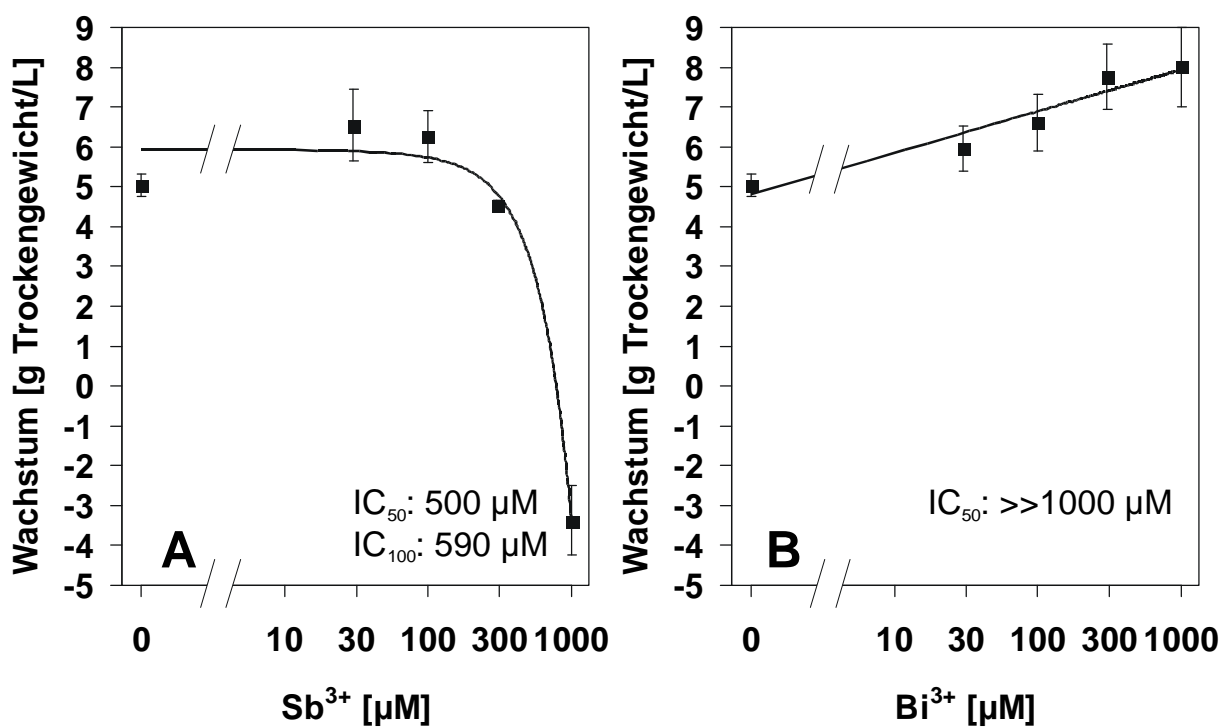
Antimon und Bismut stehen in der Stickstoffgruppe unter dem Arsen und sind diesem daher chemisch verwandt (Wiberg, 1985); allerdings nimmt der metallische Charakter vom Arsen über das Antimon zum Bismut zu. Während Arsen sowohl als Kation als auch als Anion auftreten kann, bevorzugt Antimon (und noch mehr) Bismut die kationische Form. Ähnlich wie Arsen treten in wässrigen Lösungen des dreiwertigen Kations v.a. hydratisierte Formen von  $\text{Sb}(\text{OH})_3$  und  $\text{Bi}(\text{OH})_3$  auf. Wie Arsen zählt Antimon nach dem System von Nieboer & Richardson (1980) zu den „Borderline“-Ionen, Bismut hingegen schon zu den „Class B“-Ionen. Grill et al. (1987) konnten zeigen, daß sowohl  $\text{Sb}^{3+}$  als auch  $\text{Bi}^{3+}$  Phytochelatine induzieren. Von diesem Ergebnis ausgehend sollte die Konzentrationsabhängigkeit dieser Induktion und die mögliche Komplexierung der beiden Metallionen durch Phytochelatine untersucht werden. Dies sollte insbesondere auch im Vergleich mit Arsen erfolgen.

Selen als Vertreter der Sauerstoffgruppe ist von deutlicherem Nichtmetallcharakter als das daneben stehende Arsen; wie dieses tritt es jedoch hauptsächlich in Form von Oxyanionen auf, also als Selenat ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) oder Selenit ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) (Wiberg, 1985). Daher war es sowohl beim Arsen als auch beim Selen überraschend, daß sie Phytochelatine induzierten, während die anderen induzierenden Ionen Metall-Kationen waren (Grill et al., 1987). Die Induktion durch Selen konnte jedoch nicht reproduziert werden (Zenk, 1996). Im Rahmen des Selen-Stoffwechsels, der im wesentlichen über die Wege des Schwefel-Stoffwechsels führt (Anderson, 1993), wurde auch die Bindung von Selen an Thiole wie Glutathion diskutiert (Ganther, 1971); daher war die Bildung von Phytochelatin-Selen-Komplexen vorstellbar. Sowohl die mögliche Induktion von Phytochelatinen durch Selenit und Selenat sollte untersucht werden, als auch, ob Phytochelatin-Selen-Komplexe gebildet werden.

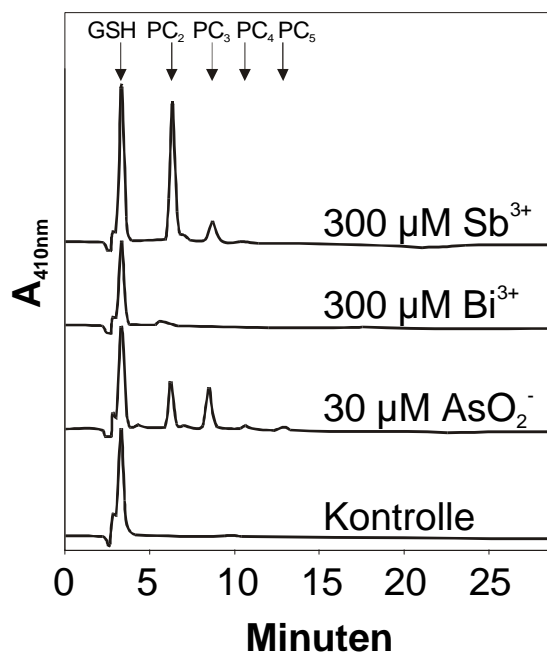
#### C.3.1. Antimon und Bismut

Antimon und Bismut unterschieden sich in ihrer phytotoxischen Wirkung: Antimon wirkte in Konzentrationen über 300  $\mu\text{M}$  wachstumshemmend auf Zellkulturen, die Konzentration, die 50 % Wachstumshemmung hervorrief, war etwa 500  $\mu\text{M}$ ; bei einer  $\text{Sb}^{3+}$ -Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  starben die Zellen ab (Abbildung 64). Hingegen stieg die Biomasse bei Zugabe von  $\text{Bi}^{3+}$  sogar an, eine wachstumshemmende Konzentration konnte nicht erreicht werden.

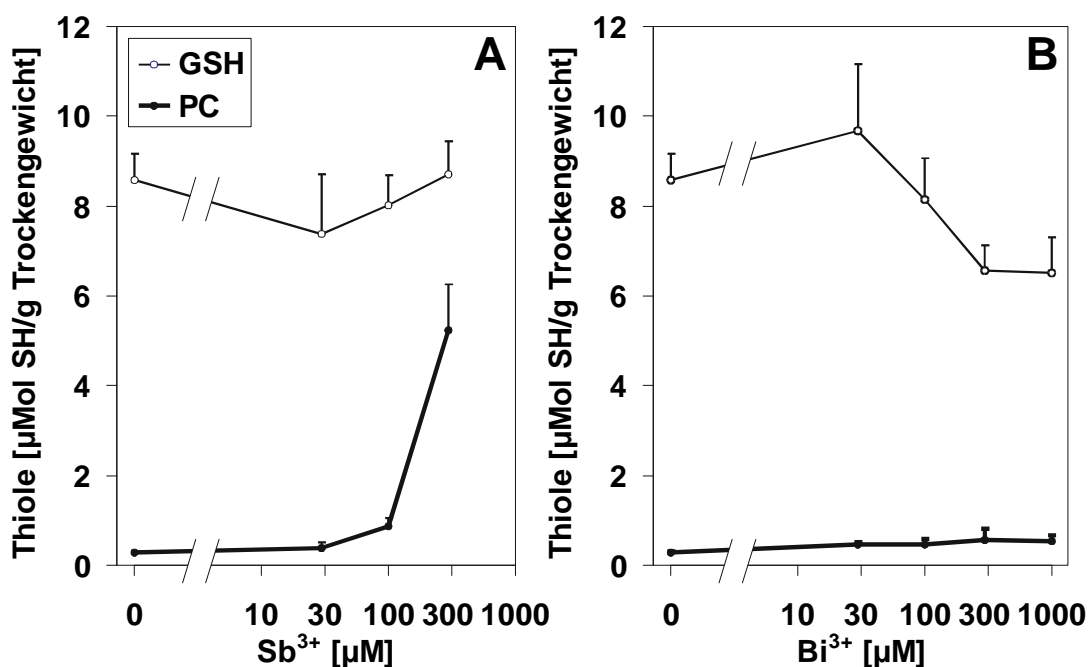
Antimon induzierte die Bildung von Phytochelatinen, insbesondere PC<sub>2</sub>; daneben trat auch PC<sub>3</sub> auf, jedoch keine nachweisbaren Mengen von längeren Phytochelatinen (Abbildung 65). Die maximal erreichte Konzentration war 5 µMol SH in Phytochelatinen/g Trockengewicht (Abbildung 66A); die Glutathion-Konzentration schwankte zwar etwas, fiel jedoch nicht deutlich ab. Bismut hingegen induzierte Phytochelatine nur in geringem Maße (Abbildung 65); die maximal erreichte Konzentration lag mit 0,5 µMol SH/g Trockengewicht nur unwesentlich über der Konzentration von 0,2 µMol SH/g Trockengewicht, die in der Kontrolle erreicht wurde (Abbildung 66B). Allerdings fiel die Glutathion-Konzentration über 30 µM Bi<sup>3+</sup> deutlich ab.



**Abbildung 64:** Wachstum von *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen in Abhängigkeit von der Konzentration von  $\text{Sb}^{3+}$  (A) und  $\text{Bi}^{3+}$  (B). Wachstum ist definiert als Zunahme des Trockengewichts (g/L) in vier Tagen, ausgehend von einem Inokulum von 6,1 ( $\pm$  0,5) g/L. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=3).

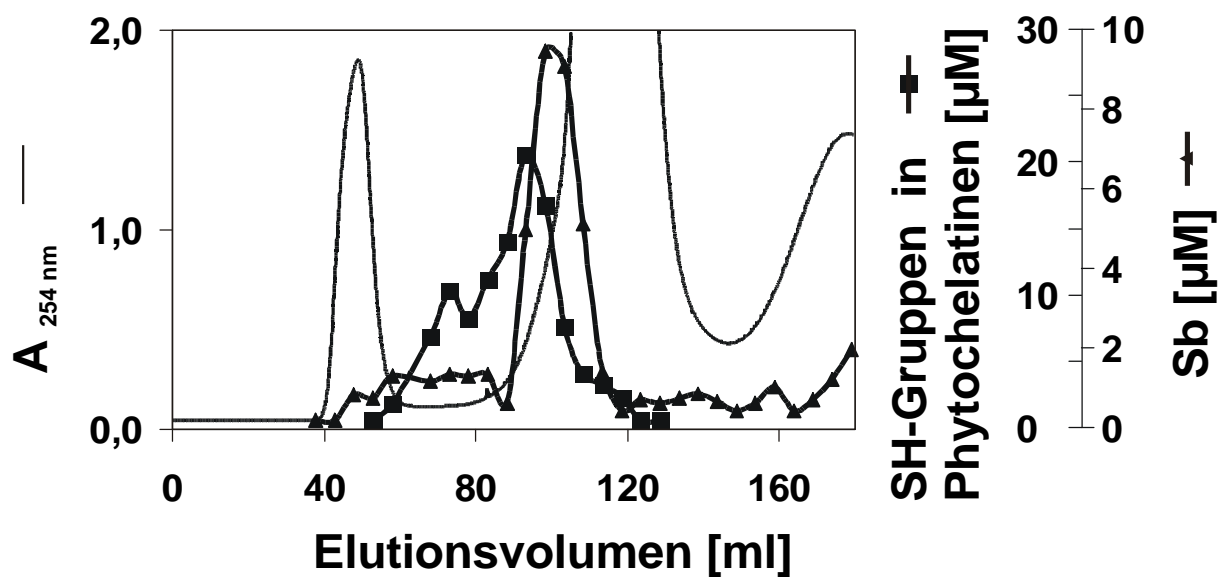


**Abbildung 65:** Thiol-Analyse von Extrakten aus *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen. Die HPLC-Elutionsprofile zeigen Extrakte aus Zellen, die für vier Tage mit 300  $\mu\text{M}$   $\text{Sb}^{3+}$ , 300  $\mu\text{M}$   $\text{Bi}^{3+}$  oder 30  $\mu\text{M}$   $\text{AsO}_2^-$ , behandelt wurden; das unterste Chromatogramm ist die unbehandelte Kontrolle. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Peaks sind: Glutathion  $\gamma\text{ECG}$  (GSH),  $(\gamma\text{EC})_2\text{G}$  ( $\text{PC}_2$ ),  $(\gamma\text{EC})_3\text{G}$  ( $\text{PC}_3$ ),  $(\gamma\text{EC})_4\text{G}$  ( $\text{PC}_4$ ) und  $(\gamma\text{EC})_5\text{G}$  ( $\text{PC}_5$ ).



**Abbildung 66:** Thiole (Glutathion und Phytochelatine) in *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen behandelt mit unterschiedlichen Konzentrationen von  $\text{Sb}^{3+}$  (A) oder  $\text{Bi}^{3+}$  (B) für vier Tage. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung ( $n=3$ )

Um zu testen, ob es einen Sb-Phytochelatin-Komplex gibt, wurden Gelfiltrationsexperimente durchgeführt. Etwa 82 % des Antimons eluierte in der Gelfiltration in einem Peak bei einem Elutionsvolumen von 100 ml, während 18 % im höhermolekularen Bereich eluierten (Abbildung 67). Da bei einer Kontroll-Gelfiltration mit zu einem unbelasteten Extrakt zugesetztem Antimon dieses bei einem Elutionsvolumen von 130 ml eluierte, repräsentierte der Peak bei 100 ml nicht freies  $\text{Sb}^{3+}$ . Andererseits überschneidet sich der Phytochelatin-Peak mit zwei Maxima bei 75 und 100 ml nur zum Teil mit dem Antimon-Peak. Ein Teil des Antimons im Peak bei 100 ml kann als an  $\text{PC}_2$  gebunden betrachtet werden, ein geringer Teil des zwischen 50 und 90 ml eluierenden Antimons an  $\text{PC}_3$ ; die gesamte Menge an Phytochelatinen (500 nmol) könnte die gesamte Menge an Sb (175 nmol) in einer Stöchiometrie von etwa 3:1 (SH-Gruppen zu Sb) binden. Bismut-behandelte Extrakte wurden aufgrund der geringen Phytochelatin-Induktion durch  $\text{Bi}^{3+}$  nicht mittels Gelfiltration untersucht.

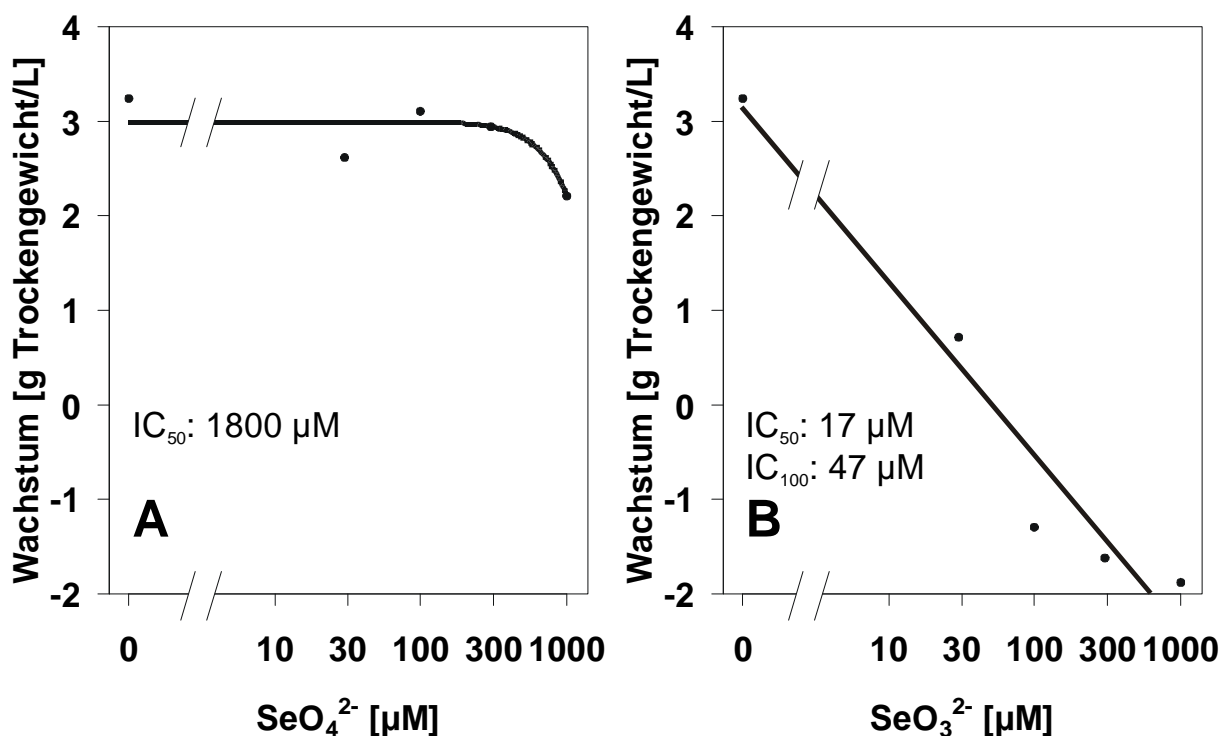


**Abbildung 67:** Gelfiltration von  $\text{Sb}^{3+}$ -belasteten *Rauwolfia serpentina*. Die für vier Tage mit  $500 \mu\text{M}$   $\text{Sb}^{3+}$  belasteten Zellen wurden mit  $10 \text{ mM}$  Tris-Cl (pH 8.0) extrahiert;  $8 \text{ ml}$  des Extrakts wurden auf eine Sephadex G25-Säule ( $1,6 \times 64 \text{ cm}$ ;  $V_0=55 \text{ ml}$ ;  $V_t=130 \text{ ml}$ ) aufgetragen und mit  $10 \text{ mM}$  Tris-Cl (pH 8.0) in  $100 \text{ mM}$  NaCl eluiert. Die Fraktionen wurden mittels RP-HPLC auf Thiole und mittels AAS auf Antimon getestet.



### C.3.2. Selenat und Selenit

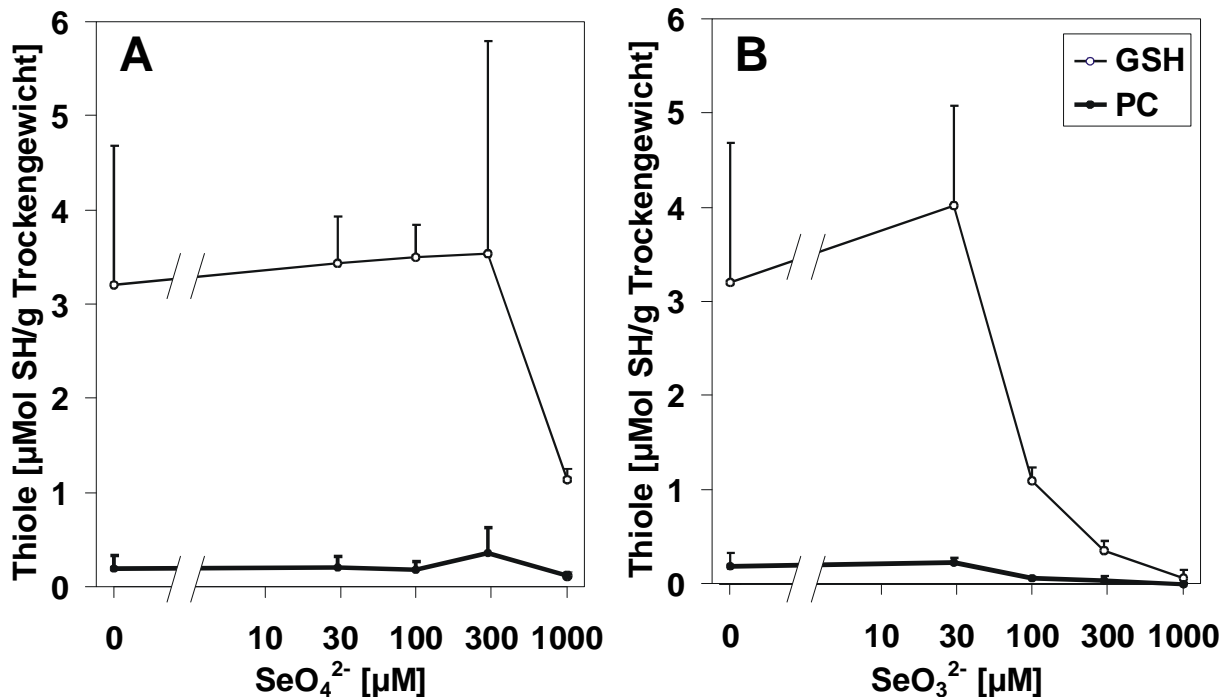
Selenit und Selenat wirkten in sehr unterschiedlichem Maße toxisch auf Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina*. Während bereits 30  $\mu\text{M}$  Selenit das Wachstum zu 78 % hemmten, wuchsen mit 1000  $\mu\text{M}$  Selenat belastete Kulturen noch fast so gut wie die Kontrolle (Wachstumshemmung 32 %) (Abbildung 68). Die daraus errechneten Konzentrationen, die 50% Wachstumshemmung hervorriefen, waren etwa 17  $\mu\text{M}$  Selenit und 1800  $\mu\text{M}$  Selenat. Bei 100  $\mu\text{M}$  und mehr Selenit starben die Zellen ab, so daß die Biomasse in so belasteten Kolben unter dem Inokulum lag.



**Abbildung 68:** Wachstum von *Rauvolfia serpentina*-Zellkulturen in Abhängigkeit von der Konzentration von Selenat (A) und Selenit (B). Wachstum ist definiert als Zunahme des Trockengewichts (g/L) in vier Tagen, ausgehend von einem Inokulum von 3,0 ( $\pm 0,4$ ) g/L. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus drei Stichproben.

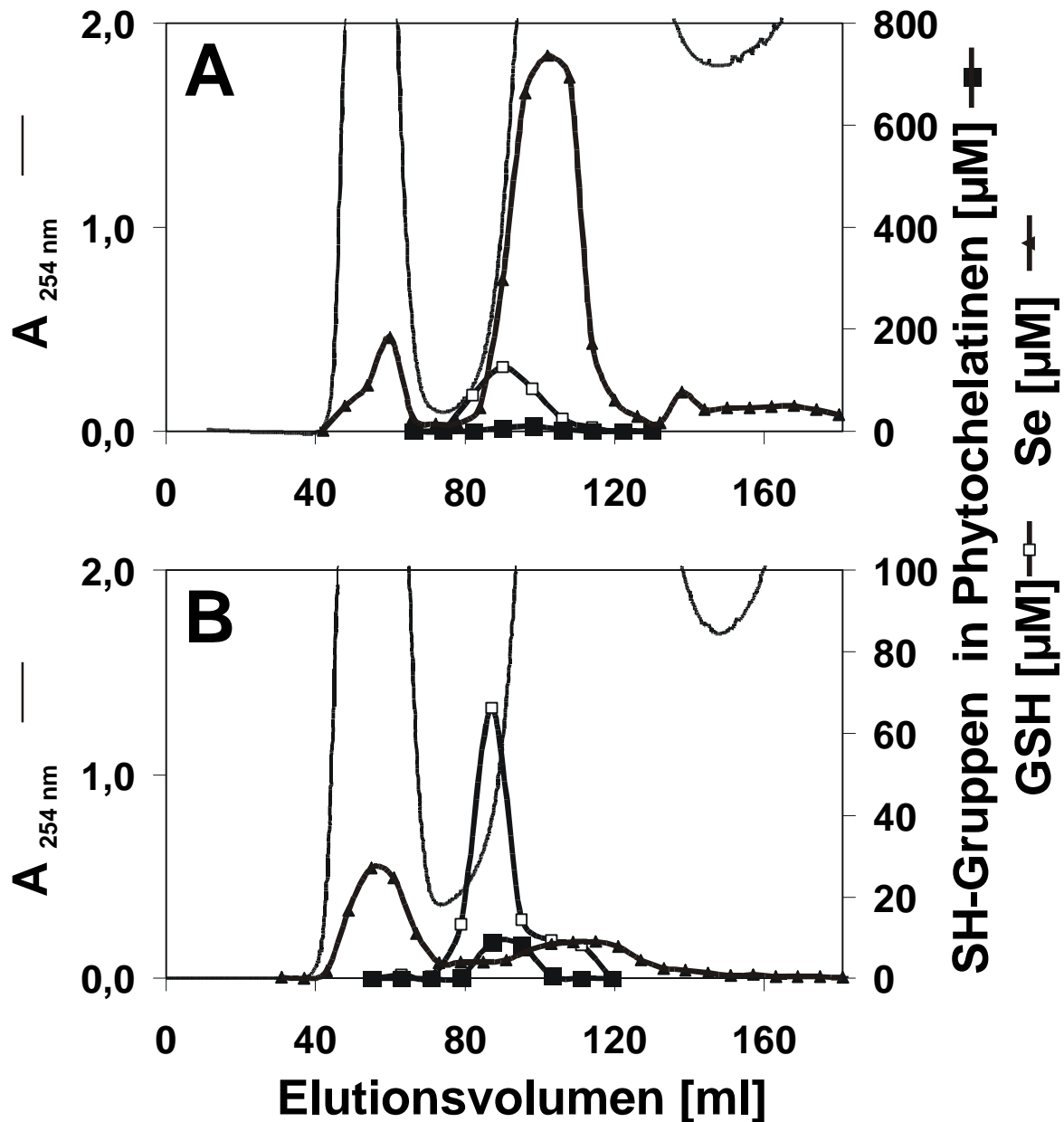
Im Gegensatz zu publizierten Daten (Grill et al., 1987) konnten allerdings in Selenit- bzw. Selenat-belasteten Zellen keine erhöhten Phytochelatin-Konzentrationen nachgewiesen werden. Die gebildeten Mengen an PC<sub>2</sub> waren identisch mit den Mengen in den unbelasteten Kontrollen, d.h. die Zellen enthielten etwa 0,2  $\mu\text{Mol}$  (als SH-Gruppe)/g Trockengewicht (Abbildung 69). Die Glutathion-Konzentrationen blieben bei Belastung mit Selenat bis zur

zweithöchsten getesteten Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  gleich, danach fielen sie ab; bei mehr als 30  $\mu\text{M}$  Selenit fielen die GSH-Konzentrationen ab, was auf das Absterben der Zellen bei diesen Konzentrationen zurückzuführen war.



**Abbildung 69:** Thiole (Glutathion und Phytochelatine) in *Rauwolfia serpentina*-Zellkulturen behandelt mit unterschiedlichen Konzentrationen von Selenat (A) oder Selenit (B) für vier Tage. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=2)

Um einen Eindruck von der Speziation des Selen zu bekommen, also herauszufinden, in welcher Form das Selen in den Zellen vorlag, wurden Gelfiltrationen mit Selenit- und Selenat-belasteten Zellen durchgeführt. In beiden Fällen verteilte sich das Selen auf zwei Peaks (Abbildung 70A und 70B). Der erste Peak enthielt das in Proteinen gebundene Selen, der zweite das niedermolekulare Selen. Dabei zeigte sich ein wesentlicher Unterschied zwischen den Selenat- und den Selenit-belasteten Extrakten: während Selenit zu 63 % in Proteine eingebaut worden war, fand sich nur 12 % des Selenats als hochmolekulares Selen in Proteinen wieder. Das restliche Selen eluierte in einem breiten Peak mit einem Peakmaximum bei 100 ml (Selenat) bzw. 110 ml (Selenit). Obwohl bei Kontrollgelfiltrationen zugesetztes Selenat bzw. Selenit bei den gleichen Elutionsvolumina eluierte, waren die entsprechenden



**Abbildung 70:** Gelfiltrationen von Selenat- bzw. Selenit-belasteten *Rauwolfia serpentina*-Zellen. Die für vier Tage mit  $1000 \mu\text{M Na}_2\text{SeO}_4$  (A) bzw.  $30 \mu\text{M Na}_2\text{SeO}_3$  (B) belasteten Zellen wurden mit  $10 \text{ mM Tris-Cl}$  (pH 8.0) extrahiert und lyophilisiert;  $1 \text{ g}$  des Lyophilisats wurde in  $8 \text{ ml H}_2\text{O}$  gelöst, auf eine Sephadex G25-Säule ( $1,6 \times 64 \text{ cm}$ ;  $V_0=55 \text{ ml}$ ;  $V_t=130 \text{ ml}$ ) aufgetragen und mit  $10 \text{ mM Tris-Cl}$  (pH 8.0) in  $100 \text{ mM NaCl}$  eluiert. Die Fraktionen wurden mittels RP-HPLC auf Thiole und mittels AAS auf Selen getestet. Beim Extrakt aus Selenat-belasteten Zellen eluierten  $12 \%$  des Selen in der Proteinfraction, beim Extrakt aus Selenit-belasteten Zellen waren es  $63 \%$ .

Peaks schmaler als bei den Selen-belasteten Extrakten. Das niedermolekulare Selen enthielt daher wohl im Falle der Selenat-belasteten Extrakte Selenat und Selen-Aminosäuren; im Falle des Selenit-belasteten Extrakts Selenit, Selen-Aminosäuren und vielleicht auch Selenat. Die möglicherweise Selen-bindenden Thiole Glutathion und PC<sub>2</sub> eluierten vor Selenit, jedoch mit einem Teil des Selenat-Peaks. Allerdings waren die Konzentrationen an beiden Thiolen zu gering, um das Selen in den Selenat-belasteten Extrakten zu binden; auf 16,4 µMol Selen kamen 2,5 µMol Glutathion und 0,2 µMol PC<sub>2</sub>.

### C.3.3. Teildiskussion Antimon, Bismut und Selen

Ähnlich wie Arsen induzierten Antimon und Bismut die Bildung von Phytochelatinen in pflanzlichen Zellkulturen. So wie jedoch der metallische Charakter der drei Elemente Arsen, Antimon und Bismut in dieser Richtung zunimmt, nahm die Toxizität ab. 50 % Wachstumshemmung wurden in Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina* erzeugt durch 87 µM Arsenit oder 500 µM Sb<sup>3+</sup>; mit Bi<sup>3+</sup> konnte keine Konzentration erreicht werden, die 50 % Wachstumshemmung hervorrief. Auch die Bildung von Phytochelatinen nahm von Arsen über Antimon zum Bismut ab. Während maximal 16,1 µMol SH in Phytochelatinen (pro g Trockengewicht) in Arsenit-belasteten Zellkulturen gebildet wurden (Abbildung 46), waren es beim Sb<sup>3+</sup> maximal 6,1, beim Bi<sup>3+</sup> maximal nur noch 0,6. Aufgrund der geringen Phytochelatin-Induktion durch Bi<sup>3+</sup> könnte man vermuten, daß es vielleicht nicht direkt die Phytochelatin-Bildung induziert, sondern indirekt durch die Freisetzung von induzierenden Metall-Kationen; dieser Mechanismus konnte gezeigt werden für die Induktion von Metallothioneinen durch Bi<sup>3+</sup> (Bracken & Klaassen, 1987). Da allerdings Bi<sup>3+</sup> in Enzymassays die PC-Synthase stark aktivierte (Grill et al., 1989), ist wohl von einer direkten Phytochelatin-Induktion auszugehen.

Im Gegensatz zum Arsen, das in Gelfiltrationen bei pH 8.0 als freies Arsenit oder Arsenat eluierte, eluierte Antimon zusammen mit den Phytochelatinen. Der PC<sub>2</sub>- und der Antimon-Peak waren allerdings um etwa fünf ml gegeneinander verschoben, so daß diese Koelution kein eindeutiger Beweis für die Existenz eines PC-Sb-Komplexes war. Eine genauere Analyse, ggf. unter Verwendung einer hochauflösenden Gelfiltrations-Säule, wäre also nötig, um diese Frage eindeutig zu klären. Die Konzentrationen an Phytochelatinen und Antimon in den Gelfiltrations-Fractionen legen nahe, einen Komplex ähnlich wie beim Arsen-PC-Komplex zu postulieren, nämlich je drei SH-Gruppen pro Sb<sup>3+</sup>. Die Antimon-

Entgiftungsmechanismen bei Pflanzen sind nur unzureichend untersucht; ähnlich wie beim Arsen spielen methylierte Antimon-Verbindungen eine gewisse Rolle (Craig et al., 1999). Offensichtlich ist jedoch die Bildung von Phytochelatinen auch für die Detoxifizierung von Antimon in Pflanzen ein bedeutender Mechanismus.

Selen ist für die meisten Pflanzen kein essentielles Element und kann in entsprechenden Konzentrationen phytotoxisch wirken (Anderson, 1993). Dabei unterschied sich die Toxizität von Selenit und Selenat: In manchen Systemen war Selenit toxischer als Selenat (Hopper & Parker, 1999), in anderen war es umgekehrt (Wanek et al., 1999). Die stärkere Phytotoxizität von Selenit war in den in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturen sehr ausgeprägt: eine etwa 100fach geringere Konzentration von Selenit als Selenat hemmte bereits zu 50 % das Wachstum der Zellen.

Eine Erklärung dafür ergab sich aus den Gelfiltrationen von Extrakten aus Zellen, die mit Selenit oder Selenat belastet worden waren. Während 63 % des Selens nach Selenit-Belastung an oder in Proteinen gebunden war, waren es nach Selenat-Belastung nur 12 %. Als hauptsächlichster toxischer Effekt gilt der unspezifische Einbau von Selen-Aminosäuren in Proteine (Anderson, 1993). Diese Aminosäuren (SeCys und SeMet) werden jedoch bevorzugt nach Zugabe von Selenit gebildet, da beim Selen-Stoffwechsel der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Reduktion des Selenat zum Selenit ist (de Souza et al., 1998; Zayed et al., 1998); aufgenommenes Selenat hingegen bleibt hauptsächlich Selenat und wird nicht umgewandelt. Durch Überexpression der ATP-Sulfurylase in *Brassica juncea* konnte eine stärkere Selenat-Reduktion erreicht werden (Pilon-Smits et al., 1999). Auch in den *Rauvolfia serpentina*-Zellen schien Selen nach Selenat-Zugabe hauptsächlich als Selenat vorzuliegen, während nach Selenit-Zugabe neben protein-gebundenem Selen auch niedermolekulares Selen auftrat, das allerdings aufgrund der früheren Elution wohl nicht Selenit war, sondern in Form von Selen-Aminosäuren vorlag.

Pflanzen entgiften Selen zum einen durch die Bildung von flüchtigen Verbindungen wie Dimethylselenid (DMSe) (Chasteen, 1998), zum anderen durch Bildung von Aminosäure-Derivaten, die nicht in Proteine eingebaut werden (z.B. Se-Methyl-Selenocystein; Brown & Shrift, 1982). Vermutlich treten in allen Organismen eine größere Zahl von bisher nur unzureichend bekannten Selen-Aminosäure-Derivaten auf (Lobinski et al., 2000). Phytochelatine wurden jedoch als Entgiftungsmechanismus für Selen nur von Grill et al.

(1987) und Maitani et al. (1996) erwähnt. Die von Grill et al. (1987) beschriebene Bildung von Phytochelatinen nach Zugabe von Selenit konnte später nicht reproduziert werden (Zenk, 1996). Auch in dieser Arbeit gab es keine Hinweise auf eine erhöhte Phytochelatin-Bildung als Reaktion auf Selenit oder Selenat. Weder zeigten die HPLC-Chromatogramme die entsprechenden Peaks noch konnte eine signifikante Koelution von Phytochelatinen und Selen in der Gelfiltration beobachtet werden. Andererseits erscheint die Bindung von Selenit an Phytochelatine in analoger Weise möglich wie es von der Bindung an Glutathion bekannt ist (Ganther, 1971; Björnstedt et al., 1995). Statt des dabei gebildeten Selenodiglutathion (GS-Se-SG) würde dabei beispielsweise ein intramolekulares Selenotrisulfid des PC<sub>2</sub> entstehen. Es ist auch nicht ausgeschlossen, daß Selenocystein oder ein Derivat davon in die Peptidkette eines Phytochelatins eingebaut wird; ein Selen-Derivat der Glutathionvorstufe  $\gamma$ -Glu-Cys ist aus Pflanzen bekannt ( $\gamma$ -Glutamyl-Se-methylselenocystein; Guo & Wu, 1998). Daher ist vorstellbar, daß in geringen Mengen auch  $\gamma$ -Glu-Sec- $\gamma$ -Glu-Sec-Gly oder  $\gamma$ -Glu-Cys- $\gamma$ -Glu-Sec-Gly in Pflanzen gebildet werden können.

## C.4. Die Phytochelatin-Synthase benötigt keine Dimerisierung zur Aktivität

### C.4.1. Fragestellung und Strategie

Die Phytochelatin-Synthase, das Enzym, das die Bildung von Phytochelatinen aus Glutathion katalysiert, wurde zum erstenmal aus *Silene vulgaris* beschrieben und gereinigt (Grill et al., 1989). Eine Bestimmung der Molekularmasse mittels Gelfiltration ergab für das aktive Protein 95 kDa und 50 kDa. Da bei weiteren Reinigungsschritten die Aktivität bei 95 kDa verschwand und nur die Aktivität bei 50 kDa übrigblieb, wurde angenommen, daß das Enzym als Oligomer aktiv sei. Unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-Gelelektrophorese zeigte sich für das Enzym eine einzelne Bande bei 25 kDa; daher wurde vermutet, daß das aktive Enzym (95 kDa) ein Tetramer aus vier 25 kDa-Untereinheiten sei, wobei auch das Dimer (50 kDa) noch Aktivität zeigt.

Die erfolgreiche Klonierung des Phytochelatin-Synthase-Gens (in *Arabidopsis* AtPCS1) durch drei Arbeitsgruppen (Clemens et al., 1999; Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999) ermöglichte es, mittels molekularbiologischer Methoden die Frage nach der aktiven Form der PC-Synthase anzugehen. Neben der AtPCS1-Sequenz gibt es im Genom von *Arabidopsis* eine zweite homologe Sequenz, die mit AtPCS2 bezeichnet wurde (Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999). Diese unterscheidet sich vor allem durch eine Deletion von 90 bp von der AtPCS1-Sequenz. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Grill et al. (1989) wurde aus den cDNA-Sequenzen für die PC-Synthase (AtPCS1) eine Molekularmasse von 55 kDa vorhergesagt (Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999). Eine Erklärung für die Diskrepanz könnte sein, daß die PC-Synthase ihre Aktivität als Homodimer zweier 55 kDa-Untereinheiten entfaltet. Um dieses zu prüfen, sollte die mögliche Interaktion der beiden Untereinheiten getestet werden. Eine verbreitete Methode, um die Interaktion zweier Proteine zu testen, ist das Yeast-Two-Hybrid-System (Chien et al., 1991; Fritz & Green, 1992).

Im Yeast-Two-Hybrid-System können Interaktionen zwischen zwei Proteinen *in vivo* in Hefen getestet werden (Clontech, 1997). Diese Methode basiert darauf, daß eukaryotische Transkriptionsfaktoren häufig aus zwei Domänen bestehen, die voneinander getrennt werden können, nämlich einer Bindedomäne (BD) und einer Aktivierungsdomäne (AD). Die Bindedomäne bindet an einer spezifischen Aktivierungsstelle des Promoters, während die Aktivierungsdomäne die Transkription des Gens einleitet. Nur wenn beide Domänen

vorhanden und nahe beieinander sind, kann die Transkription aktiviert werden. Im Yeast-Two-Hybrid-System werden die normalerweise in einer Polypeptidkette zusammenhängende Bindedomäne und Aktivierungsdomäne physikalisch getrennt und können daher zunächst nicht die Transkription der (Reporter-)Gene aktivieren (Abbildung 71). Indem nun Fusionsproteine (Hybridproteine) zwischen der Bindedomäne und einem interessierenden Protein 1 (P1) sowie zwischen der Aktivierungsdomäne und einem interessierenden Protein 2 (P2) in Hefen erzeugt werden, können die beiden Hybride (BD-P1 und AD-P2) wieder nahe genug zusammen gebracht werden, wenn P1 und P2 interagieren. Dies führt dann zur Aktivierung der Transkription, anhand derer man erkennen kann, ob die Interaktion zwischen P1 und P2 stattgefunden hat. Die jeweiligen Fusionsproteine werden erzeugt, indem die Hefen mit zwei Vektoren kotransformiert werden, nämlich einem Vektor, der die DNA-Sequenz für die AD fusioniert mit der DNA-Sequenz für P2 enthält (pGAD424), und einem Vektor, der die DNA-Sequenz für die BD fusioniert mit der DNA-Sequenz für P1 enthält (pGBT9).

Im verwendeten Yeast-Two-Hybrid-System werden als Transkriptionsfaktor Aktivierungsdomäne und Bindedomäne des Hefe-GAL4-Proteins verwendet. In den verwendeten Hefen enthalten sind zwei Reportergene unter der Kontrolle einer Aktivierungsstelle, die spezifisch von GAL4 aktiviert wird. Das eine Reportergen ist *HIS3*, dessen Genprodukt das Wachstum auf histidinfreiem Medium erlaubt; das andere ist *lacZ*, das für die  $\beta$ -Galaktosidase codiert. Als interessierende Proteine P1 und P2 werden das PC-Synthase-Gen von *Arabidopsis* verwendet (AtPCS1); dies weicht ab von der üblichen Praxis, wo zwei verschiedene Proteine getestet werden.

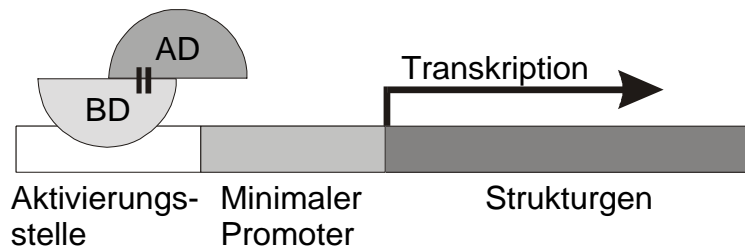
Die Strategie für die Durchführung des Versuchs ist unter Material und Methoden dargestellt.

Die wesentlichen Hauptschritte waren:

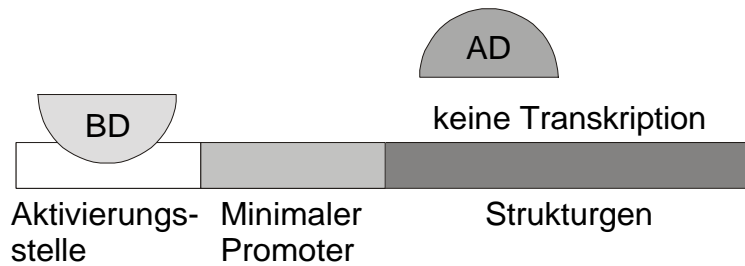
1. Amplifikation der AtPCS1-cDNA aus *Arabidopsis thaliana*-cDNA mittels PCR;
2. Klonierung des so gewonnenen Produkts in den beiden YTH-Vektoren (pGAD424 und pGBT9) in *Escherichia coli*;
3. Kotransformation von *Saccharomyces cerevisiae* mit dem aus *E. coli* gewonnenen Vektor mit der Aktivierungsdomäne (pGAD424) und dem Vektor mit der Bindedomäne (pGBT9);
4. Testen der doppelt-transformierten *S. cerevisiae* auf PC-Synthase-Aktivität und Interaktion zwischen den beiden möglichen Untereinheiten.



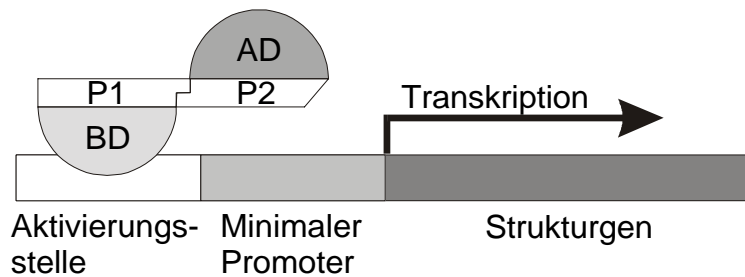
**A: native Situation (AD und BD physikalisch verbunden)**



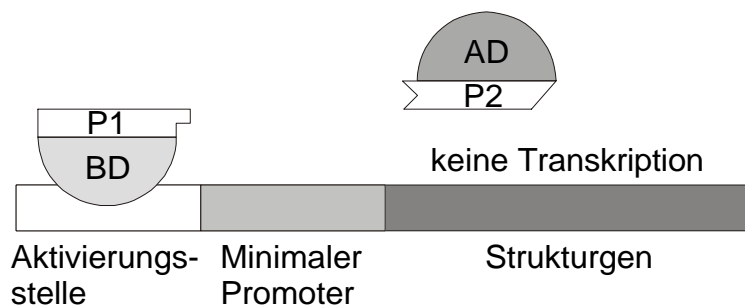
**B: AD und BD physikalisch getrennt**



**C: Interaktion zwischen BD-P1 und AD-P2**



**D: Keine Interaktion zwischen BD-P1 und AD-P2**



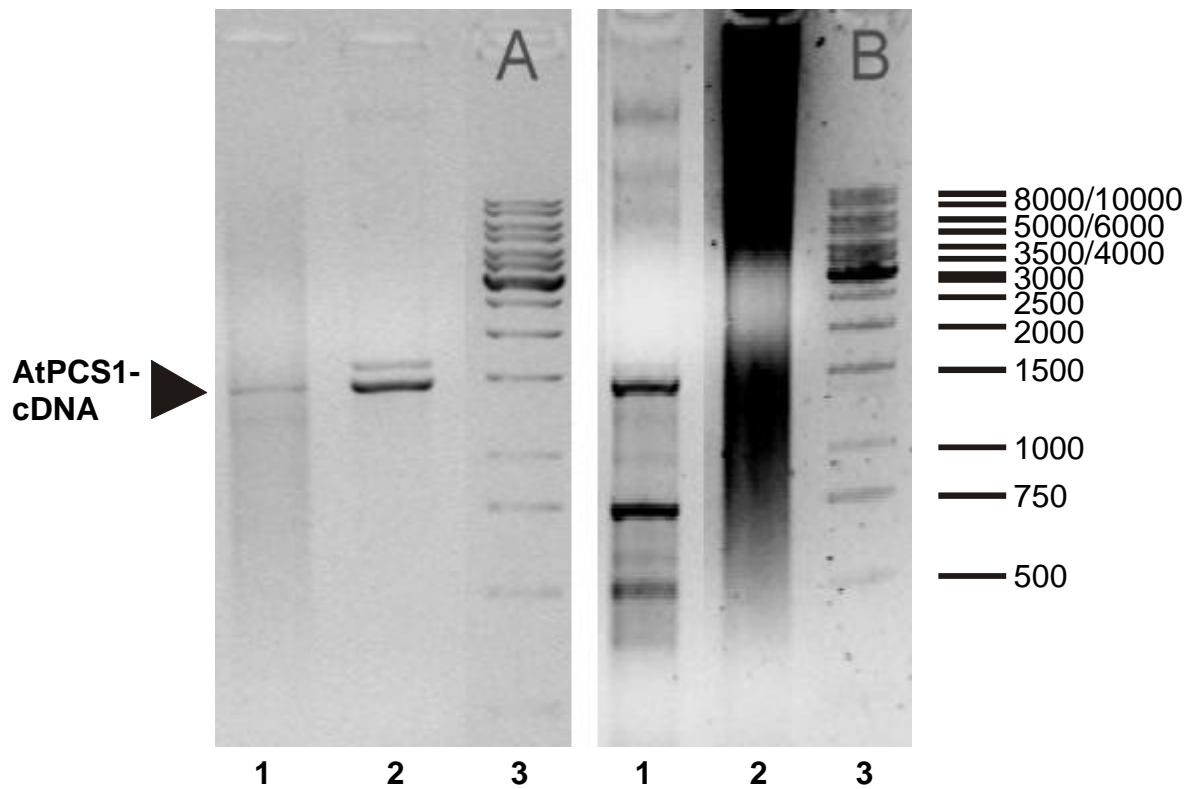
**Abbildung 71:** Schematische Darstellung des Yeast-Two-Hybrid-Systems. Dargestellt sind (A) die native Situation, indem der vollständige Transkriptionsfaktor (AD und BD auf einer Polypeptidkette) die Transkription ermöglicht; (B) die Situation, wo durch Trennung von AD und BD keine Transkription erfolgt; (C) die Situation, wo durch Interaktion der fusionierten Proteine AD und BD nahe zueinander kommen und die Transkription ermöglichen; (D) die Situation, wo die fusionierten Proteine nicht interagieren und keine Transkription erfolgt.

### C.4.2. PCR-Amplifikation

Um genügend DNA der PC-Synthase für die anschließenden Klonierungsschritte in *E. coli* zur Verfügung zu haben, wurde die gewünschte PCS-DNA mittels PCR aus einer cDNA-Library von *Arabidopsis thaliana* amplifiziert. Die dafür verwendeten Primer waren so gewählt, daß außerhalb des Strukturgens auf beiden Seiten eine Restriktionsschnittstelle eingebaut wurde und das Amplifikat in die YTH-Vektoren (pGAD424 und pGBT9) dann im Leseraster und in richtiger Orientierung ligiert werden konnte. Mit den Primern sollte die Amplifikation sowohl der AtPCS1 als auch der AtPCS2 möglich sein.

Durch die PCR konnte ein Fragment mit der erwarteten Größe für die AtPCS1 (etwa 1,5 kb) amplifiziert werden (Abbildung 72). Im Gel zeigte sich eine weitere Bande bei 1,8 kb, jedoch keine Bande bei 1,4 kb; diese Fragmentgröße wäre für die AtPCS2 zu erwarten gewesen, die offensichtlich in der verwendeten cDNA-Library nicht enthalten war. Um die Amplifikationsgenauigkeit in der PCR zu erhöhen, wurden im weiteren statt der Taq-Polymerase Polymerasen mit 3'-5'-Exonuklease-Proof-Reading-Aktivität verwendet. Die zunächst eingesetzte Vent-Polymerase amplifizierte allerdings unter allen getesteten Bedingungen die AtPCS1-Sequenz nicht oder nur in sehr geringem Maße; selbst unter optimierten Bedingungen konnte nur eine geringe Menge PCR-Produkt erhalten werden (Abbildung 72A). Die Pwo-Polymerase hingegen ermöglichte die Amplifikation (Abbildung 72B).

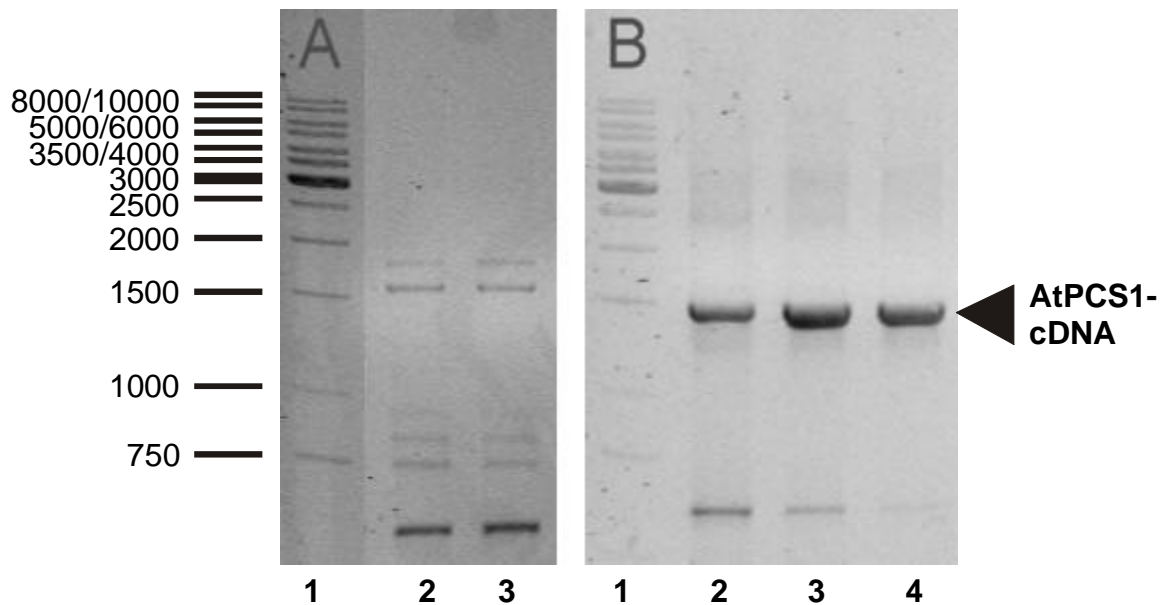
Um die Ausbeute und Reinheit des PCR-Produkts zu erhöhen, wurde eine verschachtelte PCR (nested PCR) angewandt. Dabei wird in einem ersten Schritt ein größeres DNA-Fragment, das die eigentliche Zielsequenz enthält (hier: die AtPCS1-cDNA), mit „äußeren“ Primern amplifiziert. Das so gewonnene PCR-Produkt dient als Matrize für eine zweite PCR mit den „inneren“ Primern. Die verwendeten Primer sind im Material- und Methoden-Teil dargestellt. Das mit den äußeren Primern erhaltene PCR-Produkt von 1626 bp Größe (Abbildung 73A) wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit den inneren Primern reamplifiziert; dadurch konnte ein PCR-Produkt der gewünschten Größe (1489 bp) in ausreichender Menge und Reinheit gewonnen werden (Abbildung 73B). Die amplifizierte DNA wurde nach elektrophoretischer Auftrennung für die weiteren Arbeitsschritte aus dem Gel eluiert.



**Abbildung 72:** Analyse von PCR-Amplifikationen der AtPCS1 aus *Arabidopsis*-cDNA im Agarose-Gel (alle PCR-Reaktionen außer A1 mit PCR-Programm P3, Annealing-Temperatur 47°C).

**A:** Spur 1: Reaktion mit Vent-Polymerase (optimierte Bedingungen; Programm P2); Spur 2: Reaktion mit Taq-Polymerase; Spur 3: Molekulargewichtsmarker (1 kb-Leiter).

**B:** Spur 1: Reaktion mit Pwo-Polymerase; Spur 2: Reaktion mit Vent-Polymerase; Spur 3: Molekulargewichtsmarker (1 kb-Leiter).

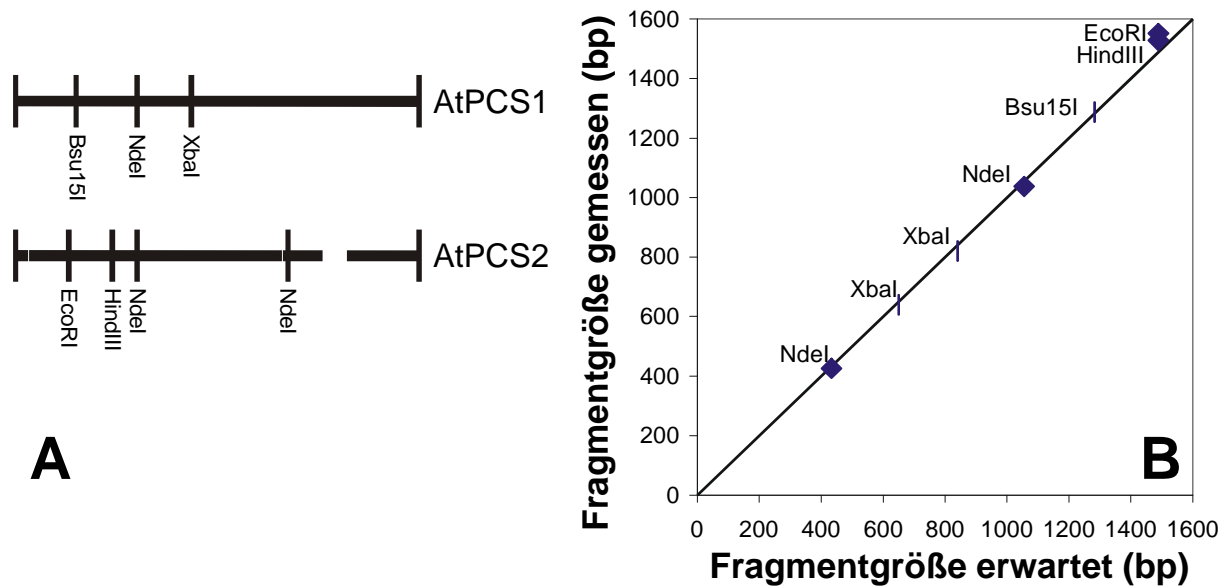


**Abbildung 73:** Analyse von PCR-Amplifikationen der AtPCS1 aus *Arabidopsis*-cDNA im Agarose-Gel.

**A:** Spur 1: Molekulargewichtsmarker (1 kb-Leiter); Spur 2 und 3: DNA-Amplifikat (1,6 kb) aus Reaktion mit Pwo-Polymerase (mit äußeren Primern) (PCR-Programm P3; Annealing-Temperatur 55°C).

**B:** Spur 1: Molekulargewichtsmarker (1 kb-Leiter); Spur 2-4: DNA-Amplifikat (1,5 kb) aus der Reamplifikation der 1,5 kb-Bande aus A (Reaktion mit Pwo -Polymerase; innere Primer) (PCR-Programm P3; Annealing-Temperatur 47°C).

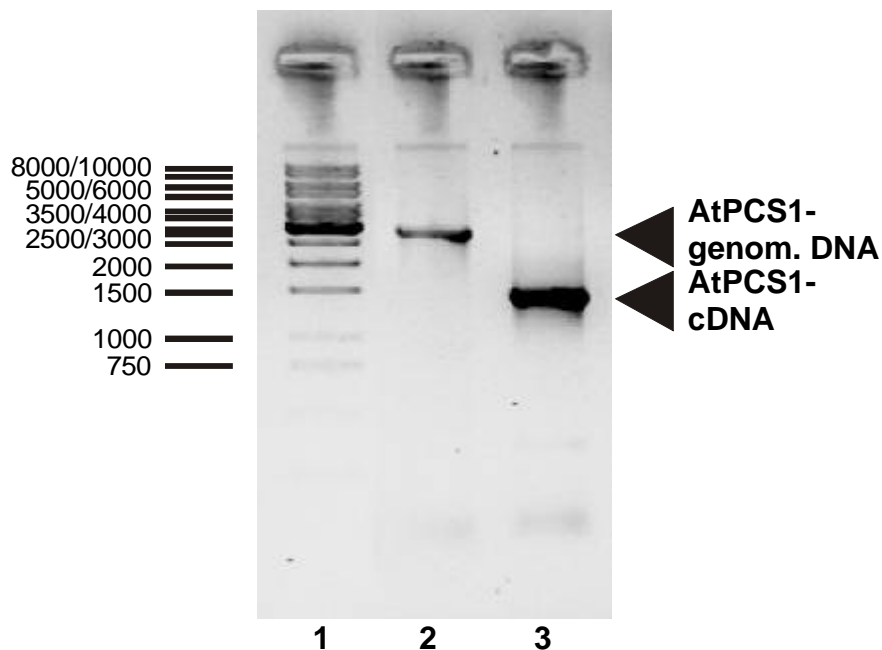
Um zu testen, ob das PCR-Produkt wirklich die cDNA der AtPCS1 darstellt, wurde das DNA-Fragment mit fünf verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Diese Enzyme waren so gewählt, daß anhand der erhaltenen Fragmente zwischen der AtPCS1 und der AtPCS2 unterschieden werden konnte (Abbildung 74A). In Abbildung 74B sind die erwarteten Fragmentgrößen gegen die gemessenen Fragmentgrößen aufgetragen. Wie erwartet schnitten EcoRI und HindIII das PCR-Produkt nicht, während NdeI, XbaI und Bsu15I die erwarteten DNA-Fragmente erzeugten. Den endgültigen Beweis für die korrekte Identität des PCR-Produkts als AtPCS1-cDNA erbrachte die Sequenzierung (s. unten).



**Abbildung 74:** Überprüfung der amplifizierten PCS-cDNA mit Restriktionsenzymen.

**A:** Restriktionskarte der AtPCS1-cDNA und der AtPCS2-cDNA.

**B:** Korrelation der für die AtPCS1-cDNA erwarteten mit der tatsächlich gemessenen Fragmentgröße.



**Abbildung 75:** Analyse von PCR-Amplifikationen (Programm P1) der AtPCS1 im Agarose-Gel. Spur 1: Molekulargewichtsmarker (1 kb-Leiter); Spur 2: Amplifikation aus genomischer DNA (isoliert aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* (RLD)); Spur 3: Reamplifikation eines Produkts einer früheren PCR aus cDNA.

Mit den verwendeten Primern konnte auch ein PCR-Produkt aus genomischer DNA von *Arabidopsis* amplifiziert werden. Die Größe der Bande ergab etwa 3000 bp, was gut mit der Erwartung von 2818 bp übereinstimmte (Abbildung 75).

### C.4.3. Transformation von *Escherichia coli*

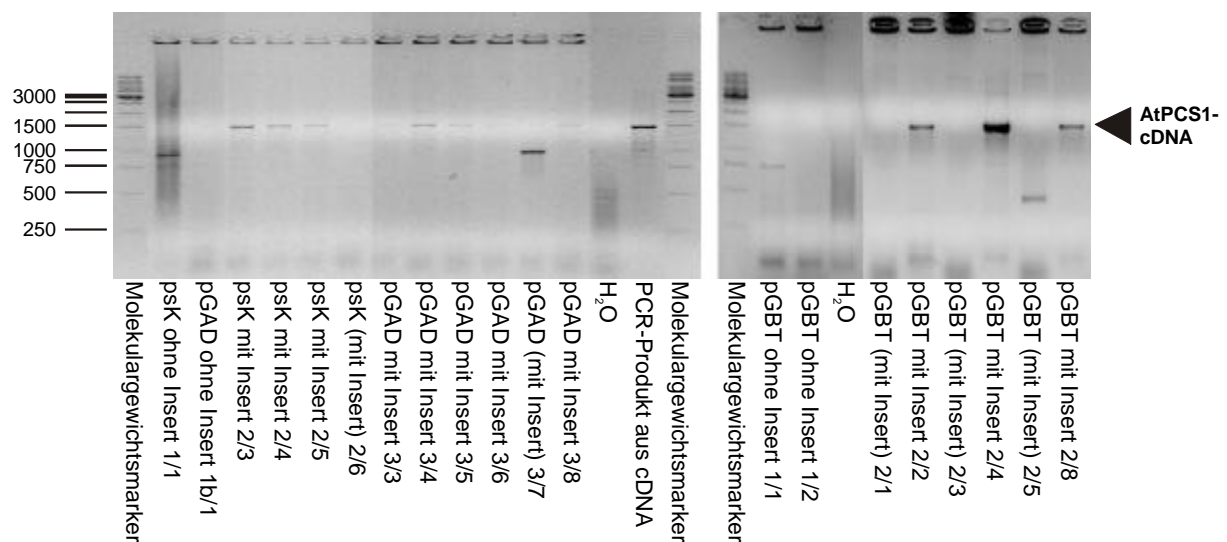
Das PCR-Produkt wurde aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert. Die Vektoren (pSK; pGAD424 und pGBT9) und die Insert-DNA wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI und PstI verdaut. Die anschließende Ligation erfolgte mit einem zehnfachen molaren Überschuß der Insert-DNA. Die Transformation der Vektor-Insert-Konstrukte erfolgte in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (DH5 $\alpha$ ). In Tabelle 10 sind die Transformationseffizienzen der verschiedenen Konstrukte dargestellt. Sie entsprachen den Erwartungen, insbesondere ergaben die Vektoren mit Insert eine deutliche höhere Transformationseffizienz als die entsprechenden Vektoren (doppelt-verdaut und religiert) ohne Insert (Faktor 18 bei psK, Faktor 9 bei pGAD424, Faktor 2,5 bei pGBT9).

Nummer	Vektor	ng	Insert	ng	Behandlung	Transformanten/ $\mu\text{g}$ Vektor-DNA
1	pSK	500	-	0	BamHI/PstI, ligiert	$1 \cdot 10^3$
1b	pGAD424	500	-	0	BamHI/PstI, ligiert	$4 \cdot 10^2$
2	pSK	40	AtPCS1	200	BamHI/PstI, ligiert	$21 \cdot 10^3$
3	pGAD424	88	AtPCS1	200	BamHI/PstI, ligiert	$4 \cdot 10^3$
4	pSK	200	AtPCS1	100	BamHI/PstI, ligiert	$5 \cdot 10^2$
5	pGAD424	440	AtPCS1	100	BamHI/PstI, ligiert	$2 \cdot 10^2$
6	pSK	10	AtPCS1	0	ungeschnitten	$2021 \cdot 10^3$
7	pGAD424	10	AtPCS1	0	ungeschnitten	$874 \cdot 10^3$
8	pSK	100	-	0	BamHI/PstI, unligiert	0
9	pGAD424	100	-	0	BamHI/PstI, unligiert	$9 \cdot 10^2$
10	-	0	-	0	nur Carrier-DNA	-
B1	pGBT9	10	-	0	BamHI/PstI, ligiert	$4 \cdot 10^3$
B2	pGBT9	10	AtPCS1	30	BamHI/PstI, ligiert	$11 \cdot 10^3$
B3	-	0	AtPCS1	30	nur Insert-DNA	-

**Tabelle 10:** Transformationseffizienz verschiedener Konstrukte in chemisch kompetenten *E. coli* (DH5 $\alpha$ ).

Um zu testen, ob die Transformanten tatsächlich die Insert-DNA trugen, wurden PCR-Reaktionen mit den Transformanten-Kolonien durchgeführt. In Abbildung 76 sind die Ergebnisse einiger dieser PCR-Reaktionen dargestellt. Von den je 18 getesteten Transformanten enthielten in psK 61 % tatsächlich das Insert, in pGAD 89 %, in pGBT 44 %. Für die weiteren Schritte (Transformation der Hefen) wurde DNA aus eindeutig positiven Klonen verwendet; als negative Kontrolle diente dabei auch DNA aus *E. coli*-Klonen, die eindeutig kein Insert enthielten (z.B. pGBT B2/3).

Zur Verifikation der Insert-DNA DNA eines ausgewählten Klons (pGBT-PCS1 2/2) sequenziert (Toplab, Martinsried). Die erhaltene Vollängensequenz ergab keinen Unterschied zur publizierten Sequenz der AtPCS1.



**Abbildung 76:** Kolonie-PCR einiger *E. coli*-Transformanten. Als Matrize für diese Reaktionen wurde von jeder Kolonie mit einer Pipettenspitze etwas abgenommen und im PCR-Ansatz resuspendiert (PCR-Programm P3; Annealing-Temperatur 47°C). Die Nummern der Klone entsprechen den in Tabelle 10 aufgeführten Konstrukten; die Nummer nach dem Schrägstrich ist die laufende Nummer der pro Konstrukt ausgestrichenen Klone. Als Kontrolltemplates wurden H<sub>2</sub>O (Negativkontrolle) und PCR-Produkt einer früheren Reaktion (Positivkontrolle) eingesetzt.

#### C.4.4. Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Transformation der Hefen (HF7c) wurden je etwa 0,1 µg Vektor-DNA und 100 µg Carrier-DNA verwendet. In Tabelle 11 sind die verschiedenen verwendeten Konstrukte in ihren Kombinationen aufgelistet. Die Transformationen wurden als Kotransformationen durchgeführt; dabei enthielt der Vektor pGAD424 eine Fusion aus der Aktivierungsdomäne und dem PCS1-Gen, der Vektor pGBT9 eine Fusion aus der Bindungsdomäne und dem PCS1-Gen (Kombinationen Nummer 7-10). Als negative Kontrollen dienten Kombinationen aus pGAD424 (Aktivierungsdomäne mit fusioniertem PCS1-Gen) und pGBT9 (nur Bindedomäne ohne oder mit unvollständigem PCS1-Gen) (Nummern 4 und 5) bzw. pGAD424 (nur Aktivierungsdomäne ohne oder mit unvollständigem PCS1-Gen) und pGBT9 (Bindedomäne mit fusioniertem PCS1-Gen) (Nummern 3 und 6). Als positive Kontrollen wurden die vom Hersteller Clontech mitgelieferten Vektoren pTD mit pVA verwendet, bzw. pGAD424 (Aktivierungsdomäne mit fusioniertem HB6-Gen) mit pGBT9 (Bindedomäne mit fusioniertem ABI2-Gen). Für die Proteine HB6 und ABI2 ist bekannt, daß sie im Yeast-Two-Hybrid-System interagieren (A. Himmelbach, persönliche Mitteilung).

Nummer	Vektor 1	Insert	Vektor 2	Insert	
1	pTD		pVA		positive Kontrolle
2	pGAD424	HB6	pGBT9	ABI2	positive Kontrolle
3	pGAD424	-	pGBT9	PCS1 Klon 2/4	negative Kontrolle
4	pGAD424	PCS1 Klon 3/3	pGBT9	-	negative Kontrolle
5	pGAD424	PCS1 Klon 3/3	pGBT9	PCS1 Klon 2/3 (trunkiert)	negative Kontrolle
6	pGAD424	PCS1 Klon 3/7 (trunkiert)	pGBT9	PCS1 Klon 2/4	negative Kontrolle
7	pGAD424	PCS1 Klon 3/3	pGBT9	PCS1 Klon 2/4	
8	pGAD424	PCS1 Klon 3/3	pGBT9	PCS1 Klon 2/2	
9	pGAD424	PCS1 Klon 3/8	pGBT9	PCS1 Klon 2/4	
10	pGAD424	PCS1 Klon 3/8	pGBT9	PCS1 Klon 2/2	
11	-	-	-	-	negative Kontrolle (nur Carrier-DNA)

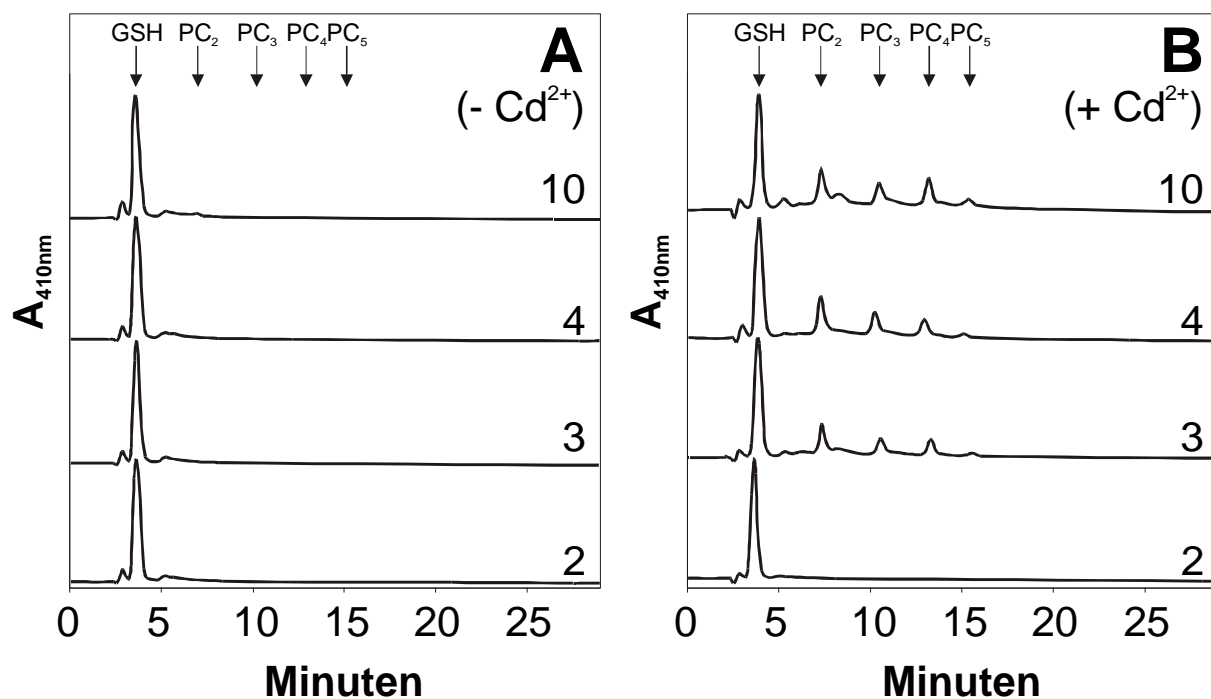
**Tabelle 11:** Konstrukte, die bei der Transformation der Hefen eingebracht wurden. Die Hefen (HF7c) wurden kotransformiert mit je 0,1 µg Vektor-DNA und 100 µg Carrier-DNA; bei der negativen Kontrolle Nummer 11 wurde nur Carrier-DNA verwendet.



Die Transformationsansätze wurden auf SD-Platten (-Leu -Trp) zur Selektion ausplattiert und nach vier Tagen auf Transformanten analysiert. Die Transformationseffizienz war recht unterschiedlich: Obwohl jeweils etwa gleich viel Vektor-DNA (100 ng) eingesetzt worden war, waren pro Ansatz sieben bis dreihundert Transformanten-Kolonien zu sehen. Die negative Kontrolle Nummer 11, bei der keine Vektor-DNA, sondern nur Carrier-DNA verwendet wurde, ergab erwartungsgemäß keine Transformanten.

### C.4.5. Aktivität der PC-Synthase in transformierten Hefen

Es mußte allerdings noch überprüft werden, ob die PC-Synthase tatsächlich funktionell in Hefe exprimiert wurde, d.h. ob die entsprechend transformierten Hefen tatsächlich Phytochelatine bei Belastung mit  $\text{Cd}^{2+}$  produzierten.



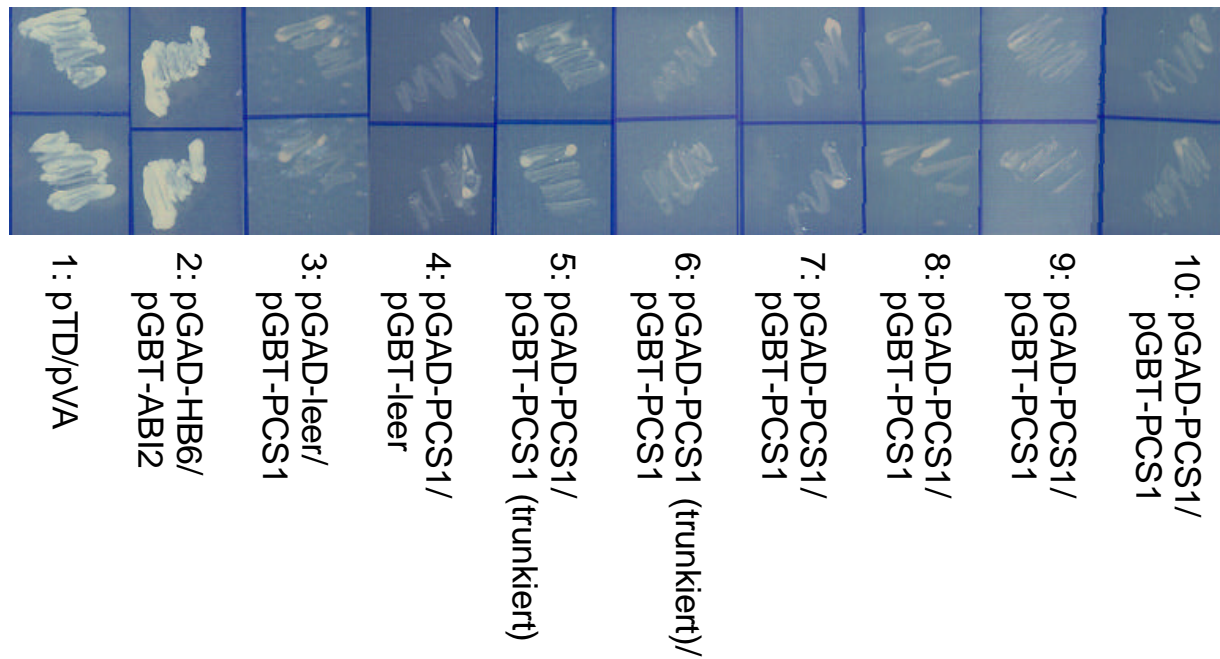
**Abbildung 77:** Thiol-Analyse von Extrakten aus transformierten Hefen. Die HPLC-Elutionsprofile zeigen Extrakte aus Hefen, die für 19 Stunden unbehandelt (A) bzw. mit  $50 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  behandelt wuchsen (B). Nummer 10: mit pGAD424-PCS1 und pGBT9-PCS1 kotransformierte Hefen; Nummer 4: mit pGAD424-PCS1 und leerem pGBT9 kotransformierte Hefen; Nummer 3: mit leerem pGAD424 und pGBT9-PCS1 kotransformierte Hefen; Nummer 2: mit pGAD424-HB6 und pGBT9-ABI2 kotransformierte Hefen. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Peaks sind: Glutathion  $\gamma\text{ECG}$  (GSH),  $(\gamma\text{EC})_2\text{G}$  ( $\text{PC}_2$ ),  $(\gamma\text{EC})_3\text{G}$  ( $\text{PC}_3$ ),  $(\gamma\text{EC})_4\text{G}$  ( $\text{PC}_4$ ) und  $(\gamma\text{EC})_5\text{G}$  ( $\text{PC}_5$ ).

Dazu wurden Flüssigkulturen der transformierten Hefen mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  für 19 Stunden belastet, dann geerntet und für die Phytochelatin-Analyse extrahiert. Hefen, die nicht mit  $\text{Cd}^{2+}$  belastet worden waren, produzierten keine Phytochelatine (Abbildung 77A). Hingegen produzierten alle Hefen, die mit zumindest einem PCS1-Gen transformiert worden waren, nach Zugabe von  $\text{Cd}^{2+}$  Phytochelatine, und zwar  $\text{PC}_2$ ,  $\text{PC}_3$ ,  $\text{PC}_4$  und  $\text{PC}_5$  (Abbildung 77B). Das galt sowohl für die Kontrollen, in die nur der eine Vektor mit Insert transformiert worden war, der andere jedoch leer (z.B. Nummer 3 und 4), als auch für die mit pGAD-PCS1 und pGBT-PCS1 kotransformierten (z.B. Nummer 10). Die Kontrollen, in die keine PCS1 transformiert worden war (Nummer 1 und 2) produzierten keine Phytochelatine. Die PC-Synthase war also offensichtlich aktiv in den transformierten Hefen, und zwar nur in den mit AtPCS1 transformierten Hefen.

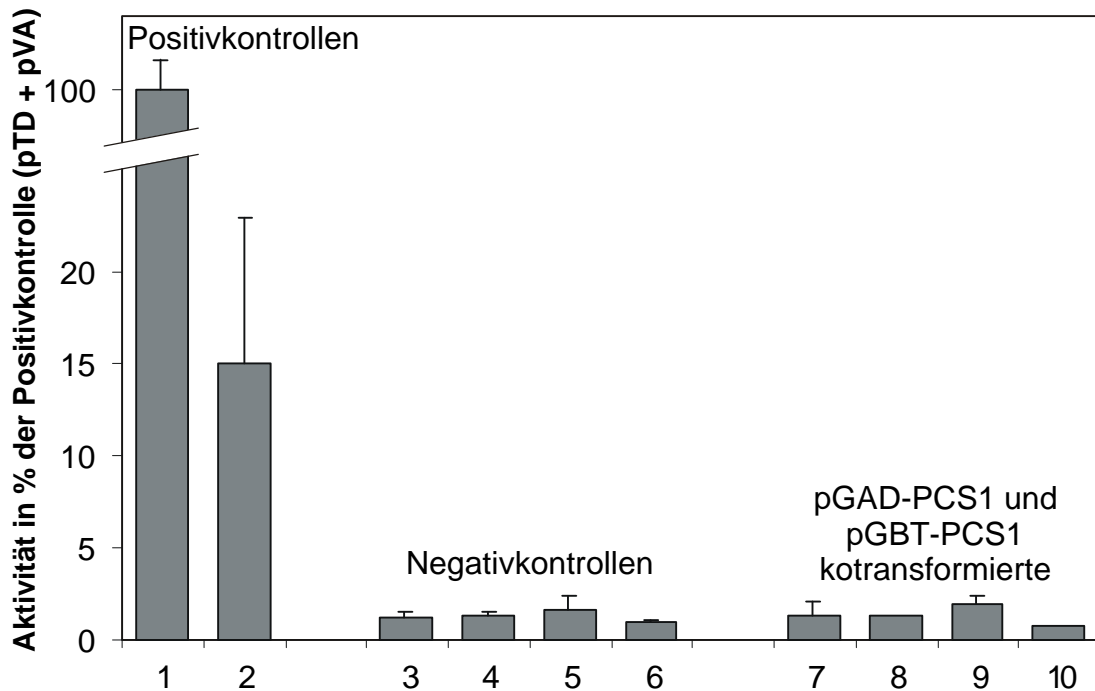
### C.4.6. Test auf Interaktion

Für den Test auf Interaktion zwischen den beiden eingebrachten Proteinen hat das verwendete Yeast-Two-Hybrid-System zwei Marker: nur wenn das mit der Aktivierungsdomäne fusionierte Protein mit dem mit der Bindedomäne fusionierten Protein interagiert, werden die beiden Reportergene transkribiert. Die Aktivierung des einen Reportergens (*HIS3*) führt dazu, daß transformierte Hefen, in denen die Interaktion stattfindet, auf Medium ohne Histidin wachsen können. Die Aktivierung des anderen Reportergens (*lacZ*) kann durch Testen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität überprüft werden.

Für den Test auf Wachstum ohne Histidin wurden bis zu 50 Transformanten jedes Ansatzes (s. Tabelle 11) auf SD-Platten ohne Histidin ausgestrichen. Nach sechs Tagen wurde auf Wachstum geprüft. In Abbildung 78 sind je zwei Ausstriche pro Ansatz dargestellt: gewachsen waren nur die positiven Kontrollen (Nummer 1 und 2), weder die negativen Kontrollen (Nummern 3, 4, 5, 6) waren gewachsen noch die Hefe-Klone, die auf Interaktion getestet werden sollten (Nummern 7, 8, 9, 10). Um auszuschließen, daß für die Interaktion  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen oder andere Schwermetallionen notwendig sind, wurde der gleiche Versuch mit SD-Platten ohne His, die auch  $\text{Cd}^{2+}$  enthielten, wiederholt. Das Ergebnis war das gleiche, das heißt es zeigte sich keine Interaktion.



**Abbildung 78:** Test auf Interaktion durch Wachstum auf SD-Platten ohne His. Von den bis zu 50 ausgestrichenen transformanten Hefe-Klonen sind pro Ansatz nur zwei gezeigt; die anderen verhielten sich völlig gleichartig. Nur die positiven Kontrollen (Nummer 1 und 2) konnten wachsen.



**Abbildung 79:** Test auf  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Je zwei Hefe-Klone pro Konstrukt wurden über Nacht in SD-Medium angezogen und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Dargestellt wird die Aktivität hier als Prozent der Aktivität der Positivkontrolle 1 (pTD + pVA) (Mittelwert und Standardabweichung; n=2).

Neben dem qualitativen Test auf Wachstum auf Platten ohne His gibt es quantitative Tests auf  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Ein entsprechender Versuch ist in Abbildung 79 dargestellt. Dabei zeigte sich, daß die Stärke der Interaktion von ABI1 und HB6 (Positivkontrolle 2) zwar nur 15 % der Positivkontrolle 1 (pTD + pVA) betrug, jedoch deutlich meßbar war; die entsprechende Aktivität in den Negativkontrollen war mit 1 - 1,7 % vernachlässigbar. Von den Negativkontrollen nicht verschieden (0,7 - 1,9 %) war die Aktivität in den mit pGAD-PCS1 und pGBT-PCS1 kotransformierten Hefen, bei denen vielleicht eine Interaktion zu erwarten gewesen wäre. Sowohl mit dem Wachstumstest auf SD-Platten ohne His als auch mit dem Test auf  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität konnte somit keine Interaktion festgestellt werden.

### C.4.7. Teildiskussion

Die Fragestellung war gewesen: Ist die PC-Synthase nur aktiv als Homodimer? Eine entsprechende Dimerisierung setzt eine Interaktion zwischen den beiden möglichen Untereinheiten voraus. Um *in vivo* solche Interaktionen zu testen, hat sich in den letzten Jahren das Yeast-Two-Hybrid-System bewährt (Fritz & Green, 1992).

Die untransformierten Hefen bzw. die mit anderen Konstrukten als der PC-Synthase transformierten Hefen zeigten keine PC-Synthase-Aktivität. Obwohl die Cd-induzierte Phytochelatin-Bildung außer in *Schizosaccharomyces pombe* und anderen Hefen auch in *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen wurde (Kneer et al., 1992), scheint zumindest der für die Transformation verwendete Stamm HF7c keine nachweisbaren Mengen an Phytochelatinen zu produzieren. Die in den mit der AtPCS1 transformierten Hefen auftretende Bildung von Phytochelatinen ist also eindeutig auf diese eingebrachte DNA-Sequenz zurückzuführen. Die Bildung wurde, wie auch aus Pflanzen bekannt, durch  $\text{Cd}^{2+}$  induziert; die dabei gebildeten Phytochelatine unterschiedlicher Länge entsprachen dabei sehr gut dem aus *Arabidopsis* bekannten Muster (s. Abbildung 27A), nämlich etwa gleich große Mengen an PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub> und PC<sub>4</sub> und etwas PC<sub>5</sub>.

Hingegen war keine Interaktion zwischen den PCS1-AD- und PCS1-BD-Fusionsproteinen festzustellen, weder mit dem His-Test noch mit dem Test auf  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Wenn also die PC-Synthase aktiv war, jedoch keine Interaktion festzustellen war, bedeutet dies, daß die PC-Synthase ihre Aktivität nicht als Homodimer von etwa 100 kDa entfaltet,

sondern offensichtlich als Monomer von etwa 50 kDa. Dies gilt zumindest für die PC-Synthase aus *Arabidopsis thaliana*; ob es auch für andere Pflanzen gilt, ist noch ungeklärt. Die Aktivität eines 100 kDa-Proteins als PC-Synthase wurde nämlich bei der Reinigung des Enzyms aus *Silene vulgaris* gezeigt (Grill et al., 1989).

Wie häufig, wenn das Ergebnis eines Experiments negativ ist, bleibt ein Restzweifel. Bei den meisten experimentellen Ansätzen wird Wert auf die Ausschaltung von falschen Positiven gelegt, so auch beim Yeast-Two-Hybrid-System (z.B. Bartel et al., 1993). Zu diesem Zweck waren auch die Kontrollen konzipiert worden: neben Konstrukten, bei denen die Interaktion bekannt war (pTD + pVA; pGAD-HB6 + pGBT-ABI1) wurden Negativkontrollen verwendet, die nur den einen Vektor mit Insert und den anderen ohne Insert trugen. Auch diese (z.B. Nummer 4) zeigten jedoch Phytochelatin-Synthase-Aktivität. Allerdings würden die Tests des Yeast-Two-Hybrid-Systems nur ein positives Ergebnis anzeigen, wenn das Fusionsprotein PCS1-AD mit dem Fusionsprotein PCS1-BD interagieren würde, nicht jedoch wenn es eine Interaktion zwischen PCS1-AD und PCS1-AD gäbe bzw. zwischen PCS1-BD und PCS1-BD. Da anders als sonst üblich die getesteten Proteine nicht verschieden, sondern gleich sind, ist diese Interaktion möglich. Dementsprechend könnten diese Interaktionen kompetitiv zueinander sein; bei einer vielleicht sogar nur geringen (sterisch bedingten) Bevorzugung der Interaktion PCS1-AD mit PCS1-AD gegenüber PCS1-AD mit PCS1-BD wäre letztere Interaktion möglicherweise nicht mehr nachweisbar.

Grundsätzlich ist das Yeast-Two-Hybrid-System ein zuverlässiges System für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Die Korrelation zwischen *in vitro*-Interaktions-Messungen und dem Yeast-Two-Hybrid-System ist generell gut (Estojak et al., 1995). Allerdings werden schwache Interaktionen eventuell übersehen, wobei diese (*in vitro* gemessenen) Interaktionen häufig vielleicht keine physiologische Funktion haben. Es fehlen jedoch andere *in vivo* Methoden, mit denen die Yeast-Two-Hybrid-System-Ergebnisse überprüft werden können.

Für weitere Untersuchungen am PC-Synthase-Protein, seien es Fragen des enzymatischen Mechanismus, der Struktur des Enzyms oder der Regulation der Aktivität, sind mit der 1999 erfolgten Klonierung des Gens wichtige Werkzeuge vorhanden. Mit heterolog exprimierter PC-Synthase könnte dabei beispielsweise die Interaktion *in vitro* untersucht werden.

## D. Diskussion

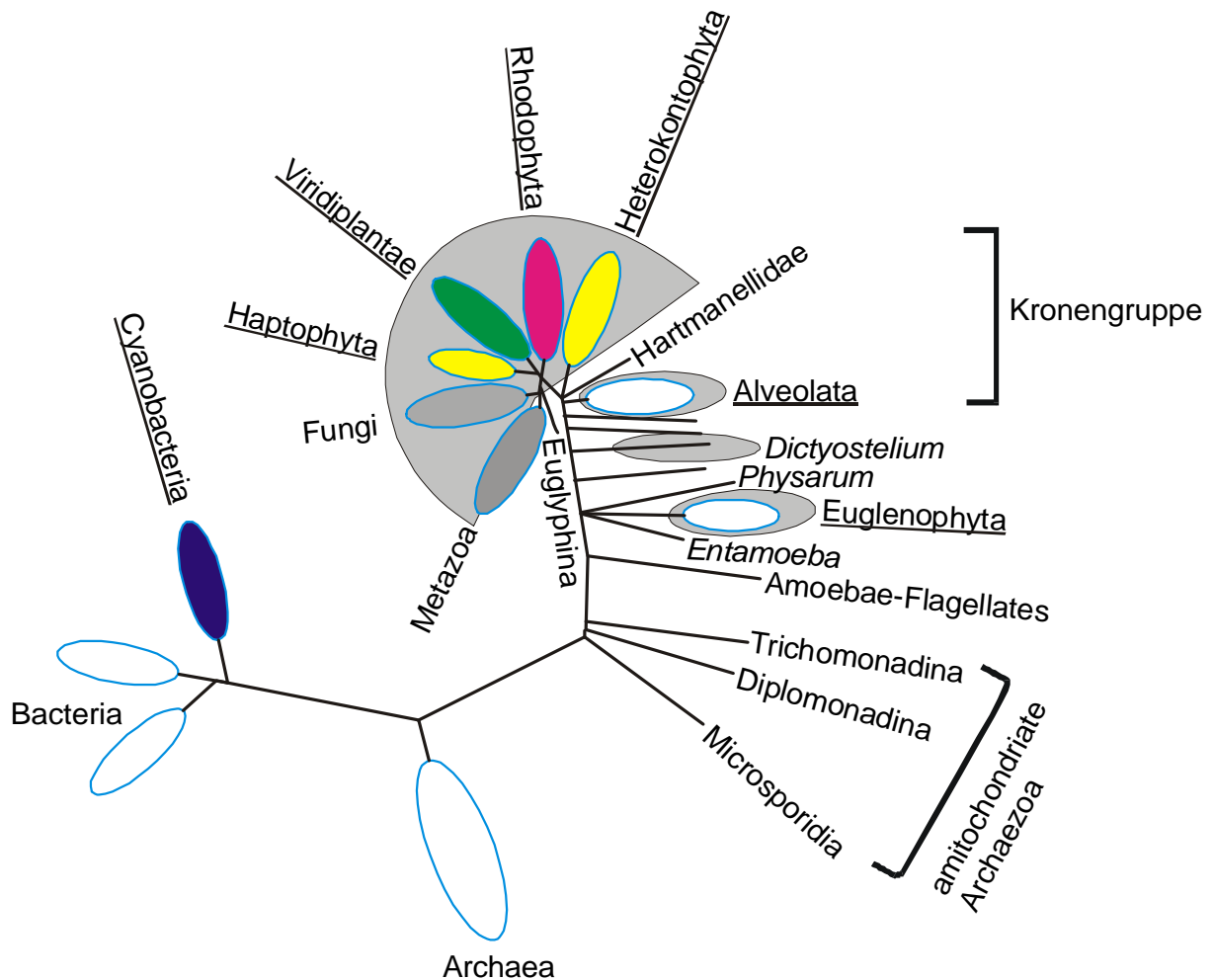
### D.1. Wie ubiquitär sind Phytochelatine?

Schon der Name „Phytochelatine“ (abgeleitet vom griechischen  $\phi\upsilon\tau\omicron\nu\nu$  = Pflanze) legt nahe, daß diese Peptide dem Pflanzenreich angehören. Auch die Entdeckungsgeschichte der Phytochelatine deutet in diese Richtung: sie wurden in der Spalthefe (Kondo et al., 1983, 1984) und in höheren Pflanzen und pflanzlichen Zellkulturen entdeckt (Grill et al., 1985). Erst später wurden andere Organismengruppen (Algen und weitere Pilze) untersucht (Gekeler et al., 1988; Kneer et al., 1992). Bereits früh wurden die Phytochelatine als funktionelle Analoge der Metallothioneine verstanden (Grill et al., 1987); da Metallothioneine zu diesem Zeitpunkt nur aus Tieren bekannt waren und Phytochelatine nur aus Pflanzen, schien die Trennung klar: Tiere entgiften Schwermetalle mit Metallothioneinen, Pflanzen mit Phytochelatinen.

Tatsächlich wurden Phytochelatine aus allen untersuchten höheren Pflanzen (Bryophyta, Pteridophyta und Spermatophyta) nachgewiesen (Grill et al., 1987; Gekeler et al., 1989); außerdem aus photosynthetisierenden Protisten (Euglenophyta, Dinophyta, Haptophyta, Heterokontophyta, Chlorophyta, Rhodophyta), aus Pilzen (Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes) und aus Oomyceten (heterotrophe Heterokontophyta) (Kondo et al., 1984; Gekeler et al., 1988; Kneer et al., 1992; Kneer, 1993; Ahner et al., 1995; Miersch et al., 1997). Allerdings wurden andere Organismen, die herkömmlicherweise nicht zum Pflanzenreich gezählt werden, nicht untersucht. Insbesondere die verschiedenen Gruppen von heterotrophen Protisten („Protozoa“) wurden nicht auf Phytochelatin-Bildung hin untersucht. Auch bei den Tieren wurden nur zwei Arten auf Phytochelatine getestet, nämlich Ratten und Salinenkrebse (Gekeler, 1988). Beide bildeten keine Phytochelatine.

Wenn man die Gruppen, die nachweislich Phytochelatine bilden, in einem Stammbaum der Organismen markiert (nach Sogin et al., 1996 und Bhattacharya & Medlin, 1998), zeigt sich, daß Phytochelatine in vielen verschiedenen Gruppen der Eukaryota gebildet werden (Abbildung 80). Diese Gruppen (höhere Pflanzen, Pilze, verschiedene „Algen“-Gruppen) sind nicht näher miteinander verwandt; während zwar die meisten zur sogenannten „Kronengruppe“ gehören, sind doch insbesondere die Euglenophyta eine früh am Stammbaum abzweigende Gruppe. Bei den anderen eukaryotischen Organismen, die im Stammbaum

zwischen diesen phylogenetisch entfernten Gruppen liegen, kann man annehmen, daß sie vielleicht auch Phytochelatine produzieren, was aber nicht getestet wurde.



**Abbildung 80:** Allgemeiner Stammbaum des Lebens nach Sogin et al. (1996) und Bhattacharya & Medlin (1998). Dieser Stammbaum basiert auf Sequenzen der *ss-rDNA*. Die Längen der Äste entsprechen der evolutionären Distanz. Die Gruppen, in denen Vertreter mit Phytochelatinbildung nachgewiesen oder aufgrund PC-Synthase-homologer Gene vermutet wurden, sind grau hinterlegt. Die Namen von Gruppen mit autotrophen Vertretern sind unterstrichen. Alveolata umfaßt u.a. die Dinophyceae und Ciliata; Heterokontophyta u.a. die Chrysophyceae, Xanthophyceae, Diatomeae, Phaeophyceae und Oomycetes; Viridiplantae die Chlorophyceae und höheren Pflanzen; Fungi nur die Eumycota (Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes); Metazoa die vielzelligen Tiere. Die anderen dargestellten heterotrophen eukaryotischen Gruppen wurden früher als Protozoa zusammengefaßt (Amöben, Geißeltierchen etc.).

Man kann zwar nicht davon ausgehen, daß der Stammbaum, wie er in Abbildung 80 dargestellt ist, völlig den tatsächlichen Verwandtschaftsverhältnissen entspricht, da die Zuordnung mancher Gruppen noch umstritten ist (Sogin et al., 1996; Doolittle, 1999). Jedoch lassen sich die groben Linien der Verwandtschaft mittlerweile erkennen. Eine dieser Erkenntnisse ist, daß „Pflanzen“ oder „Algen“ keine phylogenetisch einheitliche Gruppe sind, da die Algen ihre Autotrophie durch mehrere, z.T. sekundäre Aufnahmen von Plastiden erlangten (Bhattacharya & Medlin, 1998). Dies läßt es unwahrscheinlich erscheinen, daß unter den Eukaryonten nur die „Pflanzen“, also autotrophe Organismen, und außerdem die Pilze, Phytochelatine produzieren. Es ist wahrscheinlicher, daß auch die mit den autotrophen Organismen verwandten heterotrophen Phytochelatine bilden. Dies konnte man schon bei den Heterokontophyta zeigen, bei denen neben den autotrophen Kieselalgen, Goldalgen, Braunalgen auch die heterotrophen Oomyceten Phytochelatine bilden (Gekeler et al., 1988; Ahner et al., 1995; Miersch et al., 1997). Ähnlich dürfte die Situation wohl auch bei den Alveolata sein, zu denen neben den Dinophyceen unter anderen die Wimpertierchen (Ciliata) gehören; Dinophyceen bilden Phytochelatine (Gekeler et al., 1988), Ciliaten wurden bisher nicht untersucht. Bei einer weiteren Gruppe, nämlich den Schleimpilzen, gibt es ebenfalls Hinweise auf die Bildung von Phytochelatinen. Eine Datenbankrecherche ergab eine EST-Sequenz aus dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum*, die eine hohe Homologie zu den Phytochelatin-Synthase-Sequenzen aufweist. Diese homologe Sequenz war bei den ursprünglichen Publikationen über das PCS-Gen (Clemens et al., 1999; Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999) noch nicht gemeldet worden, erst in den jüngsten Reviews wurde sie erwähnt (Cobbett, 2000a, 2000b). Bereits früher wurden bei *Dictyostelium* mittels HPLC Substanzen gefunden, die wohl Phytochelatine waren (E. Grill, unveröffentlichte Ergebnisse). Man kann aus diesen bisher noch unvollständigen Befunden schließen, daß die Phytochelatin-Bildung vielleicht sogar ein ubiquitärer Mechanismus der Eukaryota ist.

Eine Ausnahme gibt es, nämlich die vielzelligen Tiere (Metazoa). Diese bilden, soweit bekannt, keine Phytochelatine (Gekeler, 1988). Allerdings muß diese Aussage vielleicht mittlerweile revidiert werden. Bei der Klonierung des Gens der Phytochelatin-Synthase (Clemens et al., 1999; Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999) wurden nämlich nicht nur homologe DNA-Sequenzen in *Arabidopsis*, Weizen und der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* gefunden, sondern auch im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*. Mittlerweile gibt es auch (noch unvollständige) Berichte über homologe Gene in anderen Tieren, nämlich einem



## D. Diskussion

TaPCS1	.....	.....	.....	.....	MEVA	SLYRRVLPSP
AtPCS1	.....	.....	.....	.....	MAMA	SLYRRSLPSP
CePCS1	.....	.....	.....	.....	MSVTAK	NFYRRPL.PE
SpPCS1	MNIVKRAVPE	LLRGMNTNATP	NIGLIKNKVV	SFEAVGQLKK	SFYKRQL	.PK
TaPCS1	PAVEFASAEG	KRLFAEALQG	CTMEGFFNLI	SYFQTQSEPA	FCGLASLSVV	
AtPCS1	PAIDFSSAEG	KLIFNEALQK	GTMEGFFRLI	SYFQTQSEPA	YCGLASLSVV	
CePCS1	TCIEFSSELG	KKLFTEALVR	GSANIYFKLA	SQFRTQDEPA	YCGLSTLVMV	
SpPCS1	QCLAFDSSLG	KDVFLRALQE	GRMENYFSLA	QQMVTQNEPA	FCGLGTLMI	
TaPCS1	LNALAIIDPGR	PWKGPWRWFN	KSMLDCCEPL	HKVKAEGITF	GKVVCLAHCA	
AtPCS1	LNALSIDPGR	KWKGPWRWFD	ESMLDCCEPL	EVVKEKGISF	GKVVCLAHCS	
CePCS1	LNALAVDPEK	VWKAAPWRFYH	ESMLDCCVPL	ENIRKSGINL	QQFSCLAKCN	
SpPCS1	LNSLKVDPGR	LWKGSWRWYD	QYMLDCCRSI	SDIEKDGVTI	EEFSCLANCN	
TaPCS1	GARVQSFRAD	QTT..IHDRF	AHLTRCAS.Q	DCHLISSYHR	SPFKQTGTGH	
AtPCS1	GAKVEAFRTS	QST..IDDFR	KFVVKCTSSE	NCHMISTYHR	SVFKQTGNH	
CePCS1	RLKSTVSYGD	NSPDFLKKFR	TSLVNSVRS	DQVLVASYDR	SVLGQTGSGH	
SpPCS1	GLRTITKCVK	DVS..FDEFR	KDVISCSTIE	NKIMAISFCR	KVLGQTGDGH	
TaPCS1	FSPIGGYHAE	KDMALILDVA	RFKYPPHWVP	LTLLDWANNT	TDEATGLLRG	
AtPCS1	FSPIGGYNAE	RDMALILDVA	RFKYPPHWVP	LKLLWEAMDS	IDQSTGKRRG	
CePCS1	FSPLAAYHED	SDQVLIMDVA	RFKYPPHWVK	LETLQKALCS	VDVTIKLPRG	
SpPCS1	FSPVGGFSES	DNKILILDVA	RFKYP CYWVD	LKLMYEMF	IDKASCQPRG	
TaPCS1	FMLVSR.RSS	APSLLYTVSC	GHGSWKSMAK	YCVEDVPNLL	KDES LDNVIT	
AtPCS1	FMLISR.PHR	EPGLLYTLSC	KDESWIEIAK	YLKEDVPRIV	SSQHVDVVEK	
CePCS1	LVELELKKGT	RPLIMYGLKA	YVNINDSFA	TSV I SWNOFL	LCDPLEDDDE	
SpPCS1	YVLEP..MH	IPLGVLTIVGL	NKYSWRNVSK	HILQQAATVK	NADNLAEILL	
TaPCS1	LLSRLVESLP	ANAGDLIKCV	IEVRRKEEGE	SLSKEEKER	LFLKEKVLQQ	
AtPCS1	IISVVFKSLP	SNFNQFIRWV	AEIRITEDSN	QNSLAEKSR	LKLKQLVLKE	
CePCS1	EFQLCCRKFG	QCFAHAMCC	TQKTFDADQK	NSCTECSTDQ	NEACKMICSE	
SpPCS1	SINQ..SSIP	LIQERSN..S	SKSGDFEHFK	ECIRSTKTYH	LFLKHTNTNV	
TaPCS1	IRDSDLFRVV	HELQYPKGLC	GSCSSSDED	SLAEIAATVC	COGAFLSGN	
AtPCS1	VHETELFKHI	NKFLSTVG..	.....YED	SLTYAAAKAC	COGAELSGS	
CePCS1	IRRTRFAEVF	SSSAVAA...	.....	...LLIAWPF	EKGYSERSDR	
SpPCS1	EYITMAFWAI	FSLPMIQKAL	PKGVL EEIQS	LLKEVEISEI	NTQLTALKKQ	
TaPCS1	LVS RDGFCCR	ETCIKCIEAN	GDGLKTVISG	TVVSKGNEQA	VDLLLPTSSS	
AtPCS1	PS..KEFCCR	ETCVKCIKGP	DDSEGTVVVG	VVVRDGNEQK	VDLLVPSTQT	
CePCS1	IGNLAEKYKN	EFS AETM NEM	SE.....	.....	.....	
SpPCS1	LD SLTHCCKT	DTGCCSSSCC	KNT.....	.....	.....	
TaPCS1	KTSLCNSNLK	SKIVKYPSS	DVLTVLLLV	QBN TWLG IKD	ENVKAEFQSL	
AtPCS1	.....ECEC	GPEATYPAGN	DVFTALLLAL	PPQTWSGIKD	QALMHMKQL	
CePCS1	.....	.....	.....	.....	.....	
SpPCS1	.....	.....	.....	.....	.....	
TaPCS1	VSTDNLDPDLL	KQEILHLRRQ	LHYLAGCKQE	ACQEPSP..	.	
AtPCS1	ISMASLPTLL	QEEVLHLRRQ	LQLLKRCQEN	KEEDDLAAPA	Y	
CePCS1	.....	.....	.....	.....	.	
SpPCS1	.....	.....	.....	.....	.	

**Abbildung 81:** Alignment der aus den DNA-Sequenzen abgeleiteten Peptidsequenzen der PC-Synthasen aus *Arabidopsis thaliana* (AtPCS1), *Triticum aestivum* (TaPCS1), *Caenorhabditis elegans* (CePCS1) und *Schizosaccharomyces pombe* (SpPCS1). Dunkelgrau markiert sind zwischen den Sequenzen identische Aminosäuren, hellgrau ähnliche Aminosäuren.

Regenwurm und einer Zuckmücke (*Chironomus oppositus*) (Cobbett, 2000a, 2000b). In der Abbildung 81 sind die aus den bisher bekannten DNA-Sequenzen abgeleiteten Peptidsequenzen dargestellt. Die Homologie der Sequenzen zueinander ist sehr unterschiedlich, wie anhand der Aminosäure-Identitäten und -Ähnlichkeiten in Tabelle 12 dargestellt wird. Während die beiden pflanzlichen Sequenzen fast 60 % identische Aminosäuren aufweisen, sind es im Vergleich zwischen den pflanzlichen und der Hefesequenz bzw. der Fadenwurmsequenz nur etwas mehr als ein Drittel. Da sowohl die pflanzlichen als auch die Hefe-PC-Synthase tatsächlich Phytochelatine synthetisieren, erscheint dies für die PC-Synthase aus *Caenorhabditis* ebenfalls wahrscheinlich. Erste eigene Versuche, Phytochelatine aus mit  $\text{Cd}^{2+}$  oder  $\text{AsO}_2^-$  belasteten *Caenorhabditis* nachzuweisen, waren allerdings erfolglos (Daten nicht gezeigt); andererseits berichten Ha et al. (1999) von induzierbaren HPLC-Peaks, die  $\text{PC}_2$  sein könnten, aber noch genauer analysiert werden müssen.

	AtPCS1	TaPCS1	SpPCS1	CePCS1
AtPCS1	-			
TaPCS1	58,4/66,1	-		
SpPCS1	35,1/45,0	34,0/41,8	-	
CePCS1	33,5/43,5	32,0/40,3	35,8/44,3	-

**Tabelle 12:** Vergleich der Peptidsequenzen der PC-Synthasen aus *Arabidopsis thaliana* (AtPCS1), *Triticum aestivum* (TaPCS1), *Caenorhabditis elegans* (CePCS1) und *Schizosaccharomyces pombe* (SpPCS1). Die jeweils erste Zahl stellt die Aminosäure-Identität, die zweite die Aminosäure-Ähnlichkeit der paarweise verglichenen Sequenzen dar (in %).

Solange also bei *Caenorhabditis* die tatsächliche Bildung von Phytochelatinen nicht nachgewiesen ist, kann man nicht sicher sagen, daß der Besitz eines zur PC-Synthase homologen Gens hinreichend ist, auch die Phytochelatin-Bildung zu postulieren. In den untersuchten Pflanzen und Hefen (und auch *Dictyostelium*) scheint dieser Zusammenhang jedoch gegeben zu sein. Daher können in der Abbildung 80 wohl auch die Schleimpilze und (teilweise) die Metazoa mit etwas Vorsicht markiert werden als Gruppen, die Phytochelatine bilden.

Zumindest im Bereich der Pilze und Metazoa (die als Schwestergruppen gelten; Sogin et al., 1996) ist das Vorkommen der PC-Synthase wohl nicht ubiquitär. *Saccharomyces cerevisiae* bildet nur in geringen Mengen Phytochelatine (Kneer et al., 1992); offensichtlich scheint sie diese jedoch durch ein anderes Enzym zu bilden, als die anderen Organismen. Im vollständig sequenzierten Genom von *S. cerevisiae* findet sich nämlich keine Sequenz, die eine Homologie zur PC-Synthase aufweist. Auch das menschliche Genom (soweit bisher sequenziert) enthält keine homologe Sequenz. Ähnlich scheint die Situation bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zu sein, bei der im ebenfalls vollständig sequenzierten Genom (Adams et al., 2000) keine zur PC-Synthase homologe Sequenz zu finden ist. Wenn die vorläufigen Daten zum Vorkommen einer entsprechenden Sequenz in einer Zuckmücke (Cobbett, 2000a, 2000b) sich bestätigen, würde das bedeuten, daß innerhalb einer Insektenordnung, den Diptera, Arten mit Phytochelatin-Synthase und solche ohne Phytochelatin-Synthase vorkommen. Phylogenetisch ließe sich dies am ehesten durch den sekundären Verlust des entsprechenden Gens erklären. Warum jedoch manche Arten das PC-Synthase-Gen verloren haben, läßt sich bisher nicht sagen. Der Schluß von Cobbett (2000a, 2000b), daß wohl Organismen, die im Boden oder im Wasser leben, eher ein PC-Synthase-Gen besitzen, erscheint angesichts der geringen Zahl untersuchter Organismen etwas voreilig. Auf jeden Fall ist es kein Zufall, daß gerade bei den Pilzen und den Metazoa die PC-Synthase nicht ubiquitär vorkommt; in diesen Gruppen ist als weiteres Schwermetall-Entgiftungssystem die Bildung von Metallothioneinen verbreitet. In einigen Pilzen wurde die Spezialisierung der Phytochelatine auf die Cd-Entgiftung gezeigt, während die Cu-Entgiftung von Metallothioneinen übernommen wird (Perego & Howell, 1997). Gerade aus dem Vorkommen des Phytochelatin-Systems oder des Metallothionein-Systems oder beider Systeme in verschiedenen Pilzen und Tieren ließe sich einiges über die Funktionen beider Systeme in ihrer Wechselwirkung zueinander herausfinden. Da mittlerweile auch über die Metallothioneine in Pflanzen einiges, aber nicht genügend bekannt ist (Rauser, 1999), läßt sich die bisherige Trennung „Pflanzen machen Phytochelatine, Tiere Metallothioneine und Pilze beides“ wohl nicht mehr aufrechterhalten (Grill et al., 1987; Kneer et al., 1992).

## D.2. Welche Elemente induzieren Phytochelatine?

Obwohl bereits Grill et al. (1987) einen Überblick über die Metallionen gaben, die in Pflanzen oder pflanzlichen Zellkulturen Phytochelatine induzieren, ist offensichtlich bei einigen Metallen noch umstritten, ob sie die Phytochelatinbildung induzieren. So konnte die von Grill et al. (1987) berichtete PC-Bildung nach Zugabe von Ni, Se, Te und W nicht reproduziert werden (Zenk, 1996). Allerdings gibt es auch außer der erwähnten Arbeit nur zwei weitere Publikationen, die eine größere Anzahl von Metallionen auf ihre Fähigkeit zur PC-Induktion untersuchten (Maitani et al., 1996; Chen et al., 1997). In diesen konnten Phytochelatine auch nach Zugabe von Se und Ni nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, daß neben dem häufig verwendeten  $\text{Cd}^{2+}$  auch  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{AsO}_2^-$ ,  $\text{HAsO}_4^{2-}$ ,  $\text{Sb}^{3+}$ ,  $\text{Bi}^{3+}$  und  $\text{Sn}^{2+}$  Phytochelatine in Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina* induzieren (Abbildungen 29, 35, 40, 45, 65, 41);  $\text{SeO}_3^{2-}$  und  $\text{SeO}_4^{2-}$  hingegen regten die Phytochelatin-Bildung nicht an. In geringem Maße waren  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  und  $\text{Mo}^{6+}$  in der Lage, Phytochelatine zu induzieren (Abbildungen 38, 43). Ob diese Bildung auf die direkte Aktion dieser Elemente zurückzuführen war, wurde nicht untersucht; möglich wäre eine Freisetzung anderer, phytochelatin-induzierender Ionen durch einen Überschuß der angebotenen Metalle, wie dies auch bei Metallothioneinen berichtet wurde (Bracken & Klaassen, 1987). Aus den eigenen Daten und der Literatur (Grill et al., 1987; Maitani et al., 1996; Zenk, 1996; Chen et al., 1997) ergibt sich das Bild, das in Abbildung 82 dargestellt ist. Neben einem „Kern“ von Elementen, die *in vivo* eindeutig Phytochelatine induzieren, gibt es Elemente, bei denen diese Induktion umstritten ist. Das sind solche, die einmal induzierend beschrieben wurden und einmal als nicht-induzierend (Cr, Mo, W, Fe, Ni, Se, Te).

Da die Phytochelatin-Bildung durch die PC-Synthase katalysiert wird, sollten für die Beantwortung der Frage, welche Elemente die PC-Bildung induzieren, auch Enzymassays in Betracht gezogen werden. Die Isolierung des Gens der PC-Synthase (Clemens et al., 1999; Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999) ermöglichte dabei eine detailliertere Untersuchung als die Versuche mit angereinigten Enzymextrakten.

In drei Publikationen wurden verschiedene Elemente darauf getestet, ob sie *in vitro* die PC-Synthase zur Bildung von PCs aktivieren (Grill et al., 1989; Chen et al., 1997; Vatamaniuk et

H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac															

**Abbildung 82:** Konsensus der Phytochelatin-Bildung *in vivo* induzierenden Elemente. Die dunkelgrau markierten sind Elemente, bei denen mehrfach gezeigt werden konnte, daß sie PCs induzieren; die hellgrau markierten solche, bei denen abweichende Ergebnisse erzielt wurden und die daher umstritten sind. Dick umrahmt sind die Elemente, die zu den „Class B“-Ionen gezählt werden, mitteldick die, die zu den „Borderline“-Ionen gezählt werden (Nieboer & Richardson, 1980).

H																	He	
Li	Be												B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg												Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr	
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe	
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn	
Fr	Ra	Ac																

**Abbildung 83:** Konsensus der Elemente, die *in vitro* die PC-Synthase zur Bildung von Phytochelatinen aktivieren. Die dunkelgrau markierten sind Elemente, bei denen mehrfach gezeigt werden konnte, daß sie PCs induzieren; die hellgrau markierten solche, bei denen abweichende Ergebnisse erzielt wurden und die daher umstritten sind. Dick umrahmt sind die Elemente, die zu den „Class B“-Ionen gezählt werden, mitteldick die, die zu den „Borderline“-Ionen gezählt werden (Nieboer & Richardson, 1980).

al., 2000). Dabei wurden insgesamt weniger Elemente getestet als bei den *in vivo* Versuchen; deswegen fehlen einige Elemente, die *in vivo* Phytochelatine induzieren. Bei den anderen herrscht jedoch im wesentlichen Einigkeit, welche Elemente die PC-Synthase aktivieren (Abbildung 83); nur Fe, Co und Ni waren nicht eindeutig. Alle Elemente, die *in vitro*

eindeutig die PC-Synthese induzierten, taten dies auch *in vivo*. Die von uns (Schmöger et al., 2000) berichtete *in vitro*-Aktivierung der PC-Synthase durch Arsen (s. auch Abbildung 54) wurde von Vatamaniuk et al. (2000) bestätigt.

Ion	IC <sub>50</sub> [μM]	maximale PC-Bildung [μMol SH/g Trockengewicht]	bei Konzentration [μM]
Cd <sup>2+</sup>	>200	30,8	200
Pb <sup>2+</sup>	1330	59,3	2000
AsO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	87	16,1	100
Hg <sup>2+</sup>	45	9,7	30
Sb <sup>3+</sup>	500	6,1	500
AsO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	50	5,7	30
Cu <sup>2+</sup>	325	2,5	100
Sn <sup>2+</sup>	>>1000	2,2	1000
Fe <sup>2+</sup>	1400	1,0	1000
Bi <sup>3+</sup>	>>1000	0,6	300
SeO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1800	0,3	300
SeO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	17	0,2	30
Kontrolle		0,2	0

**Tabelle 12:** Vergleich der Toxizität und Phytochelatin-Induktion in *Rauvolfia serpentina*-Zellkulturen (zusammengestellt aus den Abbildungen im Ergebnis-Teil). Die Zellkulturen wurden drei Tage nach dem Überimpfen in frisches Medium mit dem angegebenen Metall- oder Metalloid-Ion belastet und nach weiteren vier Tagen geerntet. Als Toxizitätsmaß diente IC<sub>50</sub> (Konzentration, die das Wachstums 50 % hemmte). Angegeben ist auch die Menge an Phytochelatinen, die maximal bei einer getesteten Konzentration gebildet wurde. Bei einigen wenig toxischen Elementen (Sn<sup>2+</sup>, Bi<sup>3+</sup>) konnten die IC<sub>50</sub> nicht erreicht werden, beim SeO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ist die entsprechende Konzentration extrapoliert.

Die in dieser Arbeit verwendeten Elemente zeigten gegenüber den Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina* sehr unterschiedliche Toxizitäten (Tabelle 12). Bei einigen Elementen waren die Zellkulturen sogar bei Konzentrationen von 1 mM nur unwesentlich im Wachstum gehemmt, während bereits etwa 17 μM Selenit, 45 μM Hg<sup>2+</sup> oder 50 μM Arsenat 50 % Wachstumshemmung hervorriefen. Auch die Bildung von Phytochelatinen war sehr unterschiedlich, wobei die Elemente, die am besten Phytochelatine induzierten, Cd, Pb,

Arsenit und Hg waren. Selenit- und selenat-belastete Zellen enthielten nur so viel Phytochelatine wie die unbelastete Kontrolle. Wenn auch nicht im Detail, so doch in der Tendenz, stimmten die gebildeten PC-Mengen mit den in der Literatur beschriebenen (Grill et al., 1987) überein. Eine Korrelation zwischen der Toxizität und der PC-Bildung zeigt sich nicht. Die gebildete Phytochelatin-Menge dürfte eher darauf zurückzuführen sein, wieviel des jeweiligen Elements überhaupt in die Zellen aufgenommen wurde und reflektiert daher vielleicht die intrazelluläre Konzentration des Elements, nicht jedoch die extrazelluläre.

Was sind nun die gemeinsamen chemischen Eigenschaften der Elemente, die Phytochelatine induzieren? Zumindest bei denen, die in dieser Hinsicht unumstritten sind, fällt auf, daß sie zur 10.-15. Gruppe des Periodensystems gehören (früher Nebengruppen 1B-2B; Hauptgruppen 3B-5B); die umstrittenen gehören der 16. Gruppe an bzw. der 6. und 8.-10. Gruppe. Nach der Charakterisierung von Nieboer & Richardson (1980) induzieren alle untersuchten „Class B“-Metalle Phytochelatine, alle untersuchten „Class A“-Metalle induzieren nicht (s. Abbildung 1). Einige (nicht alle) der „Borderline“-Metalle induzieren ebenfalls die Phytochelatin-Bildung. Daraus ließe sich postulieren, daß die bisher nicht untersuchten Metallionen der „Class B“, nämlich  $Pt^{2+}$  und  $Tl^{3+}$  ebenfalls die Phytochelatin-Bildung induzieren dürften. Die „Borderline“-Metallionen, bei denen die Induktion der Phytochelatine umstritten ist (Cr, Fe, Co, Ni), zeigen schon gewisse Ähnlichkeiten zu den nicht-induzierenden „Class A“-Ionen. In Bezug auf biologische Systeme bedeutet die Klassifizierung in die drei Gruppen v.a., an welche Liganden eines Komplexbildners das Metallion bevorzugt bindet. Je stärker der „Class-B“-Charakter, desto stärker die Bevorzugung von S-Liganden, z.B. die Bindung an Thiolat-Gruppen von Phytochelatinen. In ähnlicher Weise wie die Phytochelatine werden Metallothioneine durch Cd, Zn, Cu, Hg, Au, Ag, Co, Ni, Bi induziert, allerdings auch durch viele andere Faktoren (Kägi, 1991). Obwohl die Phytochelatine noch als Reaktion auf eine größere Anzahl von Elementen als die Metallothioneine gebildet werden, unterstützt die große Schnittmenge an Elementen, die beide Systeme induzieren (Cd, Zn, Cu, Hg, Au, Ag, Bi, vielleicht auch Co, Ni; Kägi, 1991), doch die grundsätzliche Ähnlichkeit der Funktion beider Systeme bei der Bindung und Entgiftung von Schwermetallen.

Bei einigen Elementen ist die Induktion von Phytochelatinen umstritten. Ein Grund, der dafür angeführt wurde, ist eine möglicherweise geringe Menge, die analytisch schwer nachweisbar wäre (Zenk, 1996). Allerdings waren in Zellkulturen, die nicht mit Schwermetallen belastet

wurden, immer etwa 0,2-0,3  $\mu\text{Mol}$  Phytochelatine (als SH/g Trockengewicht) nachweisbar; diese Hintergrundkonzentration, die durch die im Medium enthaltenen  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen induziert wurde, konnte analytisch ohne Probleme gemessen werden. Die Unterschiede in den getesteten biologischen Systemen könnten eher für unterschiedliche Effekte der umstrittenen Elemente verantwortlich sein, sei es daß die entsprechenden Ionen sehr unterschiedlich aufgenommen wurden oder daß die Spezifität der PC-Synthase in den einzelnen Arten sich unterschied. Bei manchen der Elemente, insbesondere solchen, die erst in hohen Konzentrationen geringe Mengen von Phytochelatinen induzierten (z.B.  $\text{Fe}^{2+}$ ; Abbildung 38), ist eine indirekte Aktivierung ähnlich wie bei Metallothioneinen (Bracken & Klaassen, 1987) vorstellbar, d.h. daß durch den Überschuß an  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  freigesetzt wurden, die ihrerseits die PC-Synthase aktivierten.

Genauere Analysen der Eigenschaften der PC-Synthase werden diese Fragen wohl klären. Die erste Publikation (Vatamaniuk et al., 2000) zeigte, daß wohl die Bildung von Metall-Glutathion-Komplexen entscheidend ist; diese dienen dann als Substrat der PC-Synthase, während die direkte Bindung des Metalls an das Enzym eher eine untergeordnete Rolle spielt. Allerdings wurden in dieser Publikation nicht alle entsprechenden Metallionen getestet; überraschend dabei war jedoch, daß  $\text{Mg}^{2+}$  etwa genauso stark wie Arsenat und  $\text{Ni}^{2+}$  die PC-Synthase aktivierte. Dies ist schwer vorstellbar, da  $\text{Mg}^{2+}$  ein eindeutiges „Class A“-Ion ist und keine ausgeprägte Affinität zu Thiolgruppen zeigt. Ein entsprechender GSH-Mg-Komplex ist daher nicht bekannt, auch konnte in früheren Arbeiten (Grill et al., 1989; Chen et al., 1997) die PC-Synthase-Aktivierung durch  $\text{Mg}^{2+}$  nicht gezeigt werden.

### **D.3. Welche Struktur haben die Phytochelatin-Komplexe und wo sind sie lokalisiert?**

Obwohl in der Literatur häufig kein Unterschied gemacht wird zwischen der metall-induzierten Bildung von Phytochelatinen und der Bildung von PC-Komplexen (z.B. Zenk, 1996), sollte dies doch zunächst unterschieden werden. Mit den üblichen analytischen Methoden (RP-HPLC) werden Phytochelatine ohne daran gebundenes Metall nachgewiesen, also apo-Phytochelatine. Die Kenntnis über die Komplexe, die diese mit den Metallen bilden, ist außer im Falle des Cadmium rudimentär. Dies wurde auch in einigen Reviews zum Ausdruck gebracht (Rauser, 1995, 1999). Zumeist wurde durch die postulierte und in vielen Fällen gezeigte Entgiftungsfunktion auf die Bildung von Komplexen geschlossen.



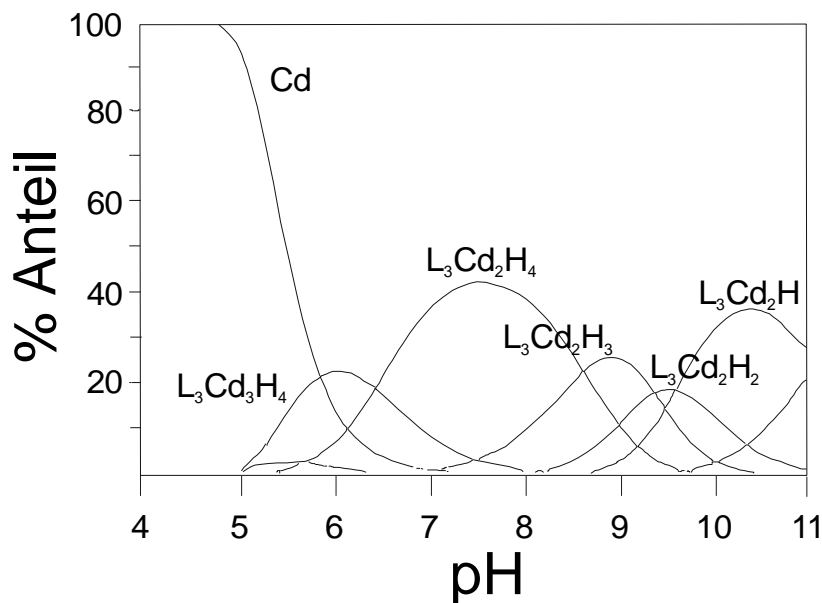
Es gab bisher im wesentlichen zwei methodische Vorgehensweisen, um über PC-Komplexe Informationen zu erhalten. Die eine war die chromatographische Auftrennung der Komplexe, sei es mit Gelfiltration (Grill et al., 1985) oder mit Anionenaustauscherchromatographie, gefolgt von Ammoniumsulfatfällung und Gelfiltration (Grill et al., 1991), z.T. bis zur Homogenität, und die folgende spektroskopische Analyse der Komplexe. Die andere war die *in vitro* Rekonstitution von Komplexen durch einfaches Zusammenmischen der Phytochelatine und des Metalls mit anschließender spektroskopischer Analyse (z.B. Mehra & Winge, 1988; Mehra & Mulchandani, 1995; Mehra et al., 1995, 1996a, 1996b).

Es muß zunächst gefragt werden: Bilden alle Elemente, die Phytochelatin-Bildung induzieren, auch *in vivo* Komplexe mit Phytochelatinen? Der Nachweis ist nicht so einfach zu führen. Eine der Hauptschwierigkeiten in der vorliegenden Arbeit war es, eine eindeutige Aussage über das Vorliegen eines As-PC-Komplexes zu erhalten. Die dafür verwendete Methode, nämlich eine Gelfiltration bei leicht basischem pH (Tris-Cl pH 8.0) erwies sich dafür als ungeeignet (Abbildung 60A). Die fehlende Koelution von Phytochelatinen und Arsen führte zu dem Schluß, daß unter diesen Bedingungen kein As-PC-Komplex existiert. Mit etwas moderneren, aber prinzipiell gleichen Systemen (Gelfiltration mit direkt gekoppelter ICP; SEC-ICP) arbeiteten Maitani et al. (1996) und Leopold et al. (1998); sie konnten keine PC-Komplexe mit As, Pb oder Zn nachweisen. Daher stellt sich die Frage: gibt es diese Komplexe oder zeigen die Gelfiltrationen nur eine artifizielle Dissoziation?

Theoretisch sind die Komplexe mit den Metallen, die Phytochelatine induzieren, vorstellbar. Wie bereits erwähnt, sind die PC-induzierenden Elemente solche, die Schwefel-Liganden bevorzugen; daher sollten sie ähnlich wie Cadmium Thiolat-Komplexe bilden. Entsprechende Thiolat-Komplexe sind z.B. für Arsen (Jocelyn, 1972) und Selen (Björnstedt et al., 1995) mit Glutathion bekannt, für Ag, Au, Bi, Cd, Cu, Co, Fe und Hg mit Metallothioneinen (Stillman et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit konnten mittels Gelfiltration (Sephadex G25; 10 mM Tris-Cl pH 8.0, 100 mM NaCl) Komplexe von Phytochelatinen mit  $Pb^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  und  $Sb^{3+}$  gezeigt werden (Abbildungen 33, 36, 67). Unter veränderten Bedingungen (Elutionspuffer 10mM NaAc pH 4.0, 100 mM NaCl, 5  $\mu$ M  $AsO_2^-$ ) konnte auch die Existenz eines Phytochelatin-Arsen-Komplexes gezeigt werden (Abbildung 60C). Rekonstituierte Komplexe von Phytochelatinen mit  $Cu^+$ ,  $Ag^+$ ,  $Pb^{2+}$  und  $Hg^{2+}$  konnten mit UV-Spektroskopie und CD-Spektroskopie untersucht werden (Mehra & Winge, 1988; Mehra & Mulchandani, 1995; Mehra et al., 1995, 1996a, 1996b). Mit Massenspektrometrie konnte in der vorliegenden

Arbeit die Existenz eines (rekonstituierten)  $\text{PC}_2$ -As-Komplexes bewiesen werden. Da es sich bei der Metall-Thiolat-Bindung jedoch nicht um eine kovalente, sondern um eine Komplexbindung handelt, ist die Stabilität dieser Bindung, sowohl in thermodynamischer als auch in kinetischer Hinsicht, zu untersuchen.

Bei den Phytochelatinen ist v.a. der Einfluß des pH-Werts auf die Stabilität des Komplexes besser bekannt. Mit potentiometrischen Methoden untersuchten Johanning & Strasdeit (1998) das System  $\text{PC}_2$ -Cd. Bei einer Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  Cd und  $75 \mu\text{M}$   $\text{PC}_2$  waren bei pH 5.5 50% des Cd nicht komplexiert (Abbildung 84); selbst bei pH 7.3 waren noch 0,5 % des Cd nicht komplexiert. Die Dissoziation der Komplexe im Säuren wurde bereits von Grill et al. (1985) beschrieben. Dies gilt im Detail nur für das Cadmium, während z.B. für  $\text{Ag}^+$  gezeigt werden konnte, daß Phytochelatine im Säuren (pH 5.0 oder pH 2.0) mehr Metall binden können als bei neutralem pH (Mehra et al., 1996). Auch die Ergebnisse in dieser Arbeit, die die Stabilisierung der As-PC-Komplexe bei pH 4.0 zeigten (Abbildung 60), weisen darauf hin, daß die verschiedenen Elemente sich nicht alle so wie Cadmium verhalten.



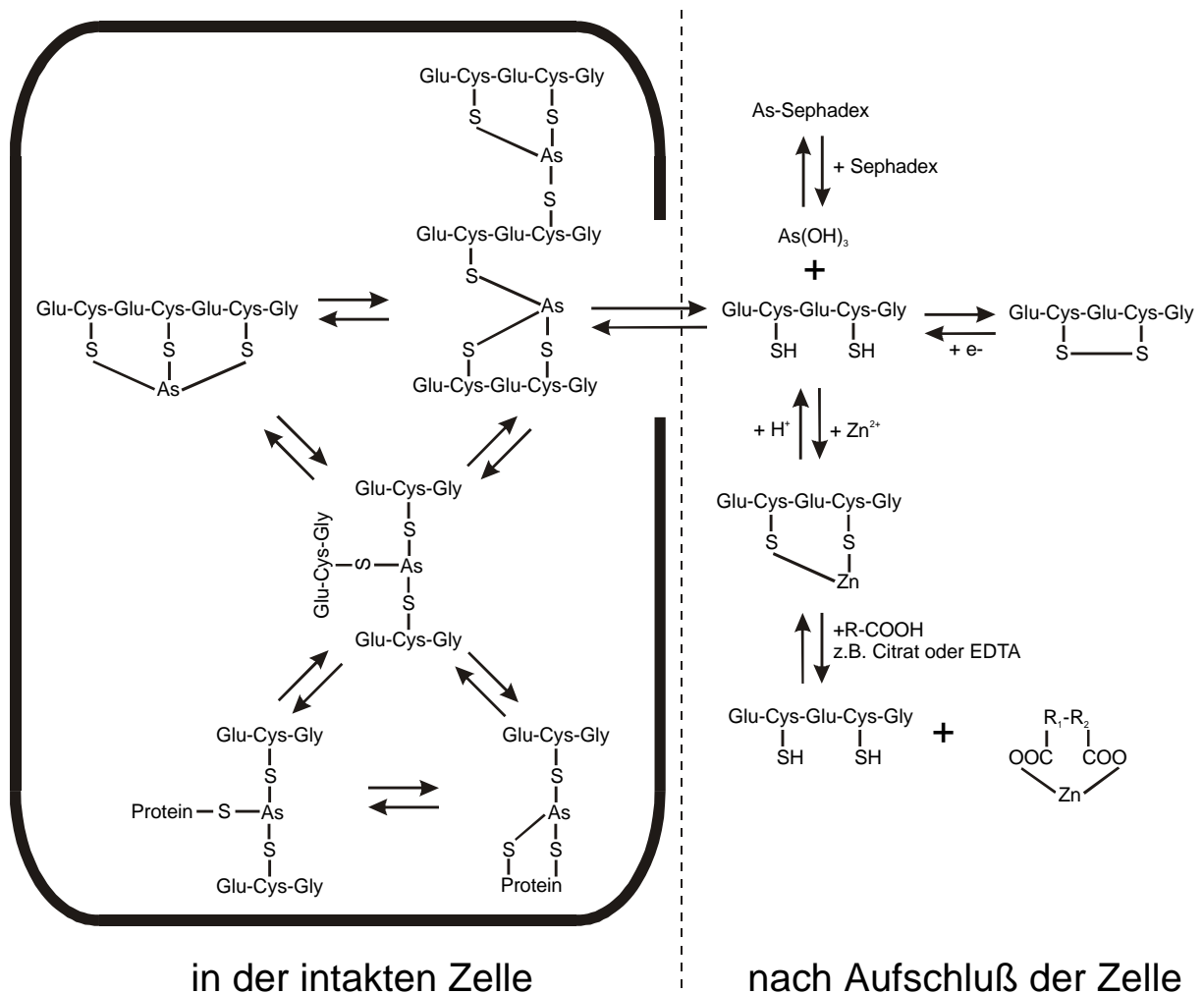
**Abbildung 84:** pH-abhängige Verteilung der Komplexspezies eines  $\text{PC}_2$ -Cd-Systems ( $50 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ ,  $75 \mu\text{M}$   $\text{PC}_2$ ) (nach Johanning und Strasdeit, 1998). Vollständig protoniertes, neutrales  $\text{PC}_2$  entspricht  $\text{H}_5\text{L}$ , vollständig deprotoniertes  $\text{L}$ .

Die kinetische Labilität der Metall-Metallothionein-Bindung wurde von Kägi (1991) als eines der Merkmale erwähnt, die diese Proteine zu ihrer Funktion bei der Metall-Homöostase

befähigen. Obwohl die Struktur der Metallothioneine aufgrund ihrer einheitlichen Größe und ihrer hochkonservierten Trennung in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domäne einen thermodynamisch verhältnismäßig stabilen Komplex ermöglicht, der auch röntgenkristallographisch untersucht werden kann (Öz et al., 1999), sind die kinetischen Effekte beträchtlich. Beispielsweise verdrängt  $\text{Cd}^{2+}$  das  $\text{Zn}^{2+}$  aus  $\text{Zn}_7$ -Metallothionein bei Raumtemperatur zufällig in beiden Domänen, bei erhöhter Temperatur bindet das Cadmium nur in der  $\alpha$ -Domäne. Aufgrund ihrer geringeren Größe und der Längenheterogenität der Polypeptid-Kette stellen die Phytochelatine wohl noch ein komplexeres System dar. Allein die Tatsache, daß PC-Metall-Komplexe sich nicht kristallisieren ließen und auch die NMR-Spektroskopie hochkomplexe, schwer interpretierbare Ergebnisse erbrachte (Zenk, 1996; Grill, persönliche Mitteilung), zeigt deren kinetische Labilität. Offensichtlich lockern sich die einzelnen Metall-Thiolat-Bindungen immer wieder, neue Bindungen zu einer anderen Thiolat-Gruppe werden ausgebildet und wieder gelöst; in einer Mischung von Phytochelatinen verschiedener Längen lassen sich daher keine distinkten Komplex-Spezies unterscheiden, sondern es bildet sich vermutlich ein fluktuierender Komplex beträchtlicher Größe.

Demgegenüber wurde in einigen Publikationen (besonders Plocke & Kägi, 1992) die Ansicht vertreten, als ob aus der Zusammensetzung der Komplexe, wie man sie in der Gelfiltration fand, und aus der dabei gefundenen Molekularmasse genaue Stöchiometrien für distinkte Komplexe abzuleiten wären. Ein Komplex sollte dabei beispielsweise aus sechs  $\text{PC}_2$ -Molekülen, zwei  $\text{PC}_3$ -Molekülen, einem Sulfid und sechs  $\text{Cd}^{2+}$  bestehen, mit einer molekularen Masse von 5464 Da. So etwas ist mit sehr großer Skepsis zu betrachten. Schon die Abhängigkeit der apparenten Molekularmasse, wie sie mit Gelfiltration bestimmt wurde, von der Ionenstärke des verwendeten Puffers (Grill et al., 1987), zeigte, daß die Molekularmassen solcher Komplexe in der beschriebenen Form sehr variabel sind und nicht unbedingt *in vivo* existieren.

Die biologisch letztlich interessierende Frage ist nicht: Kann es bei irgendeinem pH-Wert und sonstigen definierten Bedingungen einen PC-Metall-Komplex geben? Was biologisch interessiert ist: Gibt es einen PC-Metall-Komplex *in vivo*, welche Struktur hat der *in vivo*-Komplex und wo in der Zelle ist er lokalisiert? Die bisher gewonnenen Informationen über die Komplexe, sei es durch Spektroskopie rekonstituierter Komplexe oder durch chromatographische Trennung *in vivo* gebildeter Komplexe, müssen mit großer Vorsicht interpretiert werden.



**Abbildung 85:** Vereinfachtes postuliertes Modell der chemischen Umlagerungen von PC-Metallkomplexen am Beispiel des Arsens. Innerhalb der Zelle spielt die Umlagerung von As-Komplexen mit GSH,  $\text{PC}_2$  und  $\text{PC}_3$  untereinander eine große Rolle. Beim Zellaufschluß wird die Dissoziation von Komplexen begünstigt; die freigesetzten  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen (und  $\text{Cu}^{2+}$ ) binden bei dem pH von 8.0 bevorzugt an Phytochelatine und verdrängen das As (was durch Ansäuern und/oder Zugabe von Komplexbildnern für  $\text{Zn}^{2+}$  wie z.B. Citrat oder EDTA vermindert werden kann). Arsen kann außerdem bei der Gelfiltration mit dem Säulenmaterial (Sephadex) interagieren. Bei diesem Modell wurde aus Gründen der Vereinfachung der Komplexe stabilisierende Effekt von Sulfid vernachlässigt.

Für die Interpretation ist es nötig, die verschiedenen Einflußfaktoren, von denen einige bereits erwähnt wurden, im Auge zu behalten. Ein entsprechendes vereinfachtes Modell der Umlagerungen und Dissoziationen der PC-Komplexe wird in Abbildung 85 postuliert. In der intakten Zelle findet eine andauernde Umlagerung der Komplexe zwischen dem

Metall/Metalloid (in dem dargestellten Fall Arsen) und den Phytochelatinen unterschiedlicher Länge statt. Diese PC-Metall-Komplexe stehen im Gleichgewicht mit Glutathion-Metall-Komplexen und Protein-Metall-Komplexen. Daß das Gleichgewicht PC-Metall-Komplex  $\leftrightarrow$  Protein-Metall-Komplex auf der Seite des PC-Komplexes liegt, macht die detoxifizierende Wirkung der Phytochelatine aus. Beim Aufbrechen der Zellen zur Herstellung eines Extrakts dissoziieren die Komplexe teilweise völlig, hauptsächlich durch die Änderung des pH-Werts, der Ionenstärke und durch Oxidation der Phytochelatine. Die unter den gegebenen Bedingungen noch stabilen Komplexe haben eine geringere molekulare Masse als die *in vivo*-Komplexe. Freigesetzte apo-Phytochelatine können andere Metalle binden, z.B.  $\text{Zn}^{2+}$ - und  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen, die *in vivo* in der Vakuole an Citrat oder andere organische Säuren gebunden waren (s. Abbildung 59). Durch niedrigeren pH oder Zugabe von Citrat oder EDTA kann die Bildung der Zn-PC-Komplexe verhindert werden, und damit As-PC-Komplexe stabilisiert werden (Abbildung 60B). Auch die Interaktion mit dem Gelfiltrations-Säulenmaterial, z.B. As mit Sephadex, wurde beschrieben (Gailer & Lindner, 1998).

Was läßt sich jetzt aus den vorhandenen Informationen für die *in vivo*-Komplexe ableiten? Ein wichtiger Parameter ist zunächst die Molekularmasse der Komplexe. Anhand dieser wurde der erste Beweis erbracht, daß Phytochelatin-Komplexe keine Metallothioneine sind, da die PC-Cd-Komplexe mit 3,6 kDa laut Gelfiltration deutlich kleiner als diese waren (Grill et al., 1985, 1987). Die gefundene Masse war allerdings stark abhängig von der Ionenstärke des bei der Gelfiltration verwendeten Puffers: 8 kDa bei 10 mM, 3,6 kDa bei 300-600 mM (Grill et al., 1987). Mit massenspektroskopischen Methoden wurden Phytochelatin-Komplexe erst in jüngerer Zeit untersucht. Dabei gefundene Massen (884 Da, 1116 Da, 1348 Da) ließen sich als einzelne Phytochelatin-Moleküle ( $\text{PC}_3$ ,  $\text{PC}_4$ ,  $\text{PC}_5$ ) mit je einem, seltener zwei  $\text{Cd}^{2+}$  interpretieren (Yen et al., 1999). Auch die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Massenpeaks für As-PC-Komplexe (612 und 1151 Da) ließen sich als einfache Komplexe aus einem bzw. zwei  $\text{PC}_2$ -Molekülen und einem  $\text{As}^{3+}$  interpretieren. Die mit Gelfiltration gezeigten Massen waren jedoch immer deutlich höher, und deuteten daher auf eine komplexere Struktur hin. Insbesondere die bei den meisten Komplexen gefundene Mischung von Phytochelatinen unterschiedlicher Länge unter teilweiser Beteiligung von Sulfid (Dameron et al., 1989; Reese et al., 1992; Speiser et al., 1992a; Kneer & Zenk, 1997) deutet auf eine größere Masse; die schwer interpretierbaren NMR-Ergebnisse (Zenk, 1996; Grill, persönliche Mitteilung) sogar auf eine Masse noch deutlich über 8-10 kDa. Alles dies sind jedoch letztlich nur Ergebnisse verschiedener *in vitro*-Untersuchungen. Am nächsten an den *in*

*vivo*-Zustand kommen wohl noch aus einigen Hefen (*Candida glabrata* und *Schizosaccharomyces pombe*) gewonnene Nanokristallite, die aus etwa 85 CdS-Einheiten und einer Umhüllung von etwa 30 PC<sub>2</sub>- oder desgly-PC<sub>2</sub>-Peptiden bestehen (Dameron et al., 1989). Dies bedeutet bei einem Durchmesser von 200 pm eine Molekularmasse von 25-30 kDa. Größere, extrazelluläre CdS-Partikel wurden in diesen Hefen auch gefunden; diese hatten bei einem Durchmesser von etwa 290 pm eine geschätzte Molekularmasse von über 100 kDa. Da der Anteil von Sulfid bei anderen Organismen und wohl auch bei anderen Elementen geringer sein dürfte (z.B. Kneer & Zenk, 1997), ist es schwer, entsprechende Schlüsse für beispielsweise Pflanzen zu ziehen.

Über die Art der Bindung zwischen den Phytochelatinen und dem Metall gibt es eine Reihe von Untersuchungen, die gereinigte oder rekonstituierte Komplexe mit spektroskopischen Methoden untersuchten. Dabei zeigten sowohl UV-Spektroskopie als auch CD-Spektroskopie deutlich, daß die Bindung des Cd, oder auch des Pb, Cu, Ag oder Hg über das Thiolat erfolgt (Mehra & Winge, 1988; Mehra & Mulchandani, 1995; Mehra et al., 1995, 1996a, 1996b). Dies konnte durch EXAFS-Spektroskopie bestätigt werden (Strasdeit et al., 1991; Pickering et al., 1999); auch für Arsen konnten Pickering et al. (2000) einen Thiolat-Komplex nachweisen. Unterstützt wurde dies durch eine elektronenmikroskopische Analyse, die *in situ* eine gute Übereinstimmung zwischen den in Vakuolen gefundenen Spektren von Cd-Präzipitaten und Modellsubstanzen fand (Lichtenberger & Neumann, 1997). Diese Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen von gereinigten oder rekonstituierten Komplexen und *in situ*-Analysen läßt es fast sicher erscheinen, daß die Metall-Thiolat-Bindung den wichtigsten Anteil an der Phytochelatin-Komplex-Struktur hat. Daneben können allerdings auch Cd-Cd-Cluster-Bildungen oder Cd-O-Bindungen nicht ausgeschlossen werden (Pickering et al., 1999).

Eine wesentliche Eigenschaft von Phytochelatin-Komplexen ist die Heterogenität der Peptide. In Cd-PC-Komplexen traten zwar kürzere Phytochelatine (PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub>, PC<sub>4</sub>) als Hauptbestandteile auf, jedoch auch längere bis zu PC<sub>11</sub> (Grill et al., 1987). Da die längeren in immer geringeren Mengen vorkamen, ist wohl nicht auszuschließen, daß es in geringen Mengen, und daher an der analytischen Nachweisgrenze, noch längere Phytochelatine gibt. Allerdings wurde die Bildung von längeren Phytochelatinen im wesentlichen durch Cd<sup>2+</sup> induziert; bei den meisten Elementen wurden v.a. PC<sub>2</sub> und PC<sub>3</sub> gebildet, z.B. bei Induktion durch As, Pb oder Hg (Abbildungen 45, 29, 35). Es ist bisher nicht untersucht, welche biologische Relevanz die unterschiedliche Länge der Phytochelatine hat. Es wurde zwar

postuliert, daß die Stabilisierung von Phytochelatin-Cadmium-Komplexen entweder durch Einbau von Sulfid, oder durch Einbau längerer Phytochelatine zustande kommt (Kneer & Zenk, 1997); jedoch blieb bisher ein Vergleich mit anderen Elementen aus.

Eine für die Phytochelatin-Thematik noch unzulänglich beantwortete Frage ist, wo die Komplexe in der Zelle lokalisiert sind. Nur für das Cd gibt es Untersuchungen, die zeigten, daß die Cd-PC-Komplexe in Pflanzen in den Vakuolen abgelagert werden. Dies wurde sowohl durch Reinigung der Vakuolen (Vögeli-Lange & Wagner, 1990) als auch durch Elektronenmikroskopie gezeigt (Lichtenberger & Neumann, 1997). Für die anderen Elemente steht der Beweis der Lokalisation noch aus. Da die Phytochelatin-Synthase als cytosolisches Enzym gilt (Grill et al., 1989), obwohl eine Lokalisation beispielsweise mit Antikörpern noch nicht berichtet wurde, müssen die Phytochelatin-Komplexe aus dem Cytosol in die Vakuole transportiert werden. Die dabei beteiligten Transport-Proteine sind nur sehr unzureichend bekannt. Bisher ist nur das HMT1 aus *Schizosaccharomyces pombe* näher charakterisiert, ein Protein, das zur Familie der ABC-Transporter gehört (Ortiz et al., 1992, 1995). Dieses Protein transportiert unter ATP-Verbrauch apo-Phytochelatine und Phytochelatin-Komplexe in die Vakuole. Weitere Transportvorgänge z.B. von  $\text{Cd}^{2+}$  mittels eines  $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiporters sind noch unzulänglich erforscht (Salt & Wagner, 1993). Interessant wäre auch herauszufinden, wo Tiere, falls sie mit den PC-Synthase-homologen Proteinen Phytochelatine synthetisieren, die Komplexe ablagern.

Insgesamt scheint es so, als ob die Erforschung der Phytochelatine mit den herkömmlichen Mitteln der Biochemie, also chromatographische Auftrennung und spektroskopische Analyse an einem toten Punkt angekommen wäre. Ein wichtiger Ansatz ist sicher mit der Klonierung des PC-Synthase-Gens hinzugekommen (Clemens et al., 1999; Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999). Die Möglichkeiten, das Enzym heterolog zu exprimieren oder mutierte Formen des Enzyms zu generieren, werden wohl bald zu einem genaueren Verständnis der Phytochelatin-Bildung und ihrer Regulation führen; erste Ergebnisse wurden bereits publiziert (Vatamaniuk et al., 2000). Andererseits darf der zellbiologische Ansatz nicht vernachlässigt werden. Die Stabilität und Struktur der Phytochelatin-Komplexe ist in hohem Maße vom pH-Wert abhängig; daher ist es nötig, zu wissen, in welchem Zellkompartiment die Komplexe lokalisiert sind. Einfache und zuverlässige Methoden stehen dafür aber noch aus. Eine Kombinationsstrategie müßte dafür wohl eingeschlagen werden. Zum einen die Isolierung von Zellorganellen (d.h. vor allem Vakuolen), zum anderen die *in-situ*-Lokalisation mittels

Elektronenmikroskopie. Neben der reinen Kolo-kalisation von Phytochelatinen und Metall muß dabei auch die Bindungsform analysiert werden, wie das mit analytischer Elektronenmikroskopie durch Lichtenberger & Neumann (1997) bereits geschah. Weitere Methoden sollten jedoch noch entwickelt werden, um mit möglichst minimaler Störung *in situ* zu arbeiten. Neben röntgenspektroskopischen Techniken (Pickering et al., 2000) oder Ganz-Zell-NMR (Cullen & Hettipathirana, 1994) sind auch moderne lichtmikroskopische Methoden erfolgversprechend. Die Messung von Glutathion-Konzentrationen mittels Fluoreszenz-Färbung und Konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (Fricker et al., 2000) ließe sich wohl auch auf Phytochelatin-Messungen übertragen. Von herausragender Bedeutung ist schließlich die weitere Charakterisierung der Proteine, die den Transport verschiedener Schwermetall-Spezies, sei es in die Vakuole oder in andere Kompartimente, bewerkstelligen.

### **D.4. Phytoremediation und Phytochelatine**

Die heutige Wissenschaft muß immer auch mögliche Anwendungen bereitstellen, die aus der Grundlagenforschung erwachsen. Die in den letzten Jahren am stärksten diskutierte Anwendung der Schwermetallphysiologie der Pflanzen ist die Phytoremediation. Phytoremediation ist die mit Hilfe von Pflanzen durchgeführte Reinigung von Böden oder Gewässern von verschmutzenden organischen oder anorganischen Stoffen (Meagher, 2000).

Organische Stoffe im Boden können durch Mikroorganismen abgebaut, d.h. vollständig mineralisiert werden (Zeier, 1993). Unsere Kenntnis der entsprechenden Mechanismen bei Pflanzen sind noch unzureichend. Der Abbau einiger organischer Schadstoffe wurde untersucht (Meagher, 2000), darunter Trichlorethylen, PCB und Trinitrotoluol.

Im Gegensatz zu den organischen Stoffen ist die Physiologie der Schwermetallaufnahme und -entgiftung besser bekannt. Allerdings können Schwermetalle nicht einfach abgebaut werden. Die vorgeschlagenen Strategien zum Einsatz von Pflanzen zur Entgiftung von schwermetallbelasteten Böden oder Gewässern basieren im wesentlichen auf der Fähigkeit der Pflanzen, Elemente (auch toxische) aus dem Boden aufzunehmen und gegenüber dem Boden aufzukonzentrieren. So wurde die Phytoextraktion für die Reinigung von Böden und die Rhizofiltration für die von Gewässern vorgeschlagen (Salt et al., 1995). Die Hauptprobleme bei der Phytoremediation sind: Verfügbarkeit des Elements im Boden; Aufnahme in die



Pflanze über die Wurzeln; Transport in die oberirdischen Teile; Toleranz der Pflanze gegenüber toxischen Elementen (häufig in einem Gemisch).

Die Isolierung von Genen, die an der Schwermetallentgiftung und -toleranz beteiligt sind, führte immer wieder zu der Hoffnung, damit gentechnologisch für die Phytoremediation geeignete Pflanzen schaffen zu können (Raskin, 1996; Cunningham & Ow, 1996). Auch die Isolierung des Phytochelatins-Synthase-Gens (Clemens et al., 1999; Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999) warf diese Hoffnung auf. Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*), die die pflanzliche PC-Synthase überexprimierten, waren nicht nur toleranter gegenüber  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , Arsenit, Arsenat und  $\text{Hg}^{2+}$ , sondern akkumulierten auch mehr Schwermetalle in der Zelle (Clemens et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999). Wäre dies auch ein erfolgversprechende Strategie bei Pflanzen? Allein für sich genommen, wohl eher nicht. Pflanzen produzieren bereits Phytochelatine und selbst eine geringe Expression reicht aus, um die vorhandene Toleranz gegenüber Schwermetallen zu ermöglichen (Clemens et al., 1999). Daher würde eine Erhöhung der PC-Synthase-Expression nicht unbedingt zu höherer Schwermetalltoleranz führen, zumal eher andere Schritte im Schwefelstoffwechsel (z.B. die  $\gamma$ -Glutamyl-Cysteinyl-Synthetase) geschwindigkeitsbestimmend sind (Noctor et al., 1996).

Die wichtigeren Probleme, die für eine funktionierende Phytoremediation von Schwermetallen zu lösen wären, sind die Aufnahme des Metalls in die Wurzel und der Transport in die oberirdischen Organe (Ernst, 1996b). Wenn auch durch Zugabe von Komplexoren wie EDTA in den Boden die Aufnahme von beispielsweise Pb dramatisch erhöht werden konnte (Huang & Cunningham, 1996; Vassil et al., 1998), bleibt doch gerade die Erforschung der pflanzlichen Mechanismen zur Aufnahme und zum Transport der Schwermetalle vordringlich. Nur so lassen sich gegebenenfalls Pflanzen züchten, die geeigneter für die Phytoremediation sind (Raskin, 1996). Die Mechanismen, die den ganzen pflanzlichen Organismus schwermetalltolerant machen, sind nur unzureichend bekannt; die besser untersuchten Mechanismen der Schwermetalltoleranz sind im wesentlichen zelluläre Mechanismen (z.B. die Phytochelatinsynthese). Viele dieser Mechanismen (z.B. Transport in die Vakuole oder Sulfidsynthese) sind sogar nur aus Hefen besser bekannt (Ow, 1996). Aber: „plant cells are not just green yeast“ (Bascham & Raikhel, 2000).

## E. Zusammenfassung

1. Die Bildung von Phytochelatinen als Reaktion auf die Zugabe von  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen wurde außer in Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina* auch in Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* gezeigt. Die Phytochelatin-Induktion durch  $\text{Pb}^{2+}$  wurde in *R. serpentina*-Zellkulturen näher untersucht; eine maximale Bildung wurde dabei bei 2 mM  $\text{Pb}^{2+}$ -Zugabe erreicht. Hingegen führte die Zugabe von Tetraethylblei nicht zur Bildung von Phytochelatinen. Mittels Gelfiltration konnte in Extrakten aus Pb-belasteten Zellen ein Pb-Phytochelatin-Komplex gezeigt werden; dieser konnte jedoch nicht weiter gereinigt werden. Auch  $\text{Hg}^{2+}$  induzierte die Bildung von Phytochelatinen stark und ein Hg-Phytochelatin-Komplex konnte mittels Gelfiltration gezeigt werden. Die konzentrationsabhängige Phytochelatin-Induktion durch  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Sn}^{2+}$  wurde näher untersucht. Auch  $\text{Fe}^{2+}$  induzierte, entgegen früheren Berichten, in geringem Maße die Bildung von Phytochelatinen. Einige weitere Metallionen wurden daraufhin getestet, ob sie die Bildung von Phytochelatinen induzieren. Während  $\text{V}^{3+}$  keinen Effekt hatte, konnte eine geringe Phytochelatin-Bildung nach Zugabe von  $\text{Cr}^{3+}$  und  $\text{Mo}^{6+}$  beobachtet werden.  $\text{Co}^{2+}$  induzierte eine erhöhte Bildung von Cystein.
2. Ein zentraler Punkt war die Untersuchung der Rolle der Phytochelatine bei der Entgiftung von Arsen in Pflanzen. Sowohl in Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina* und *Agrostis tenuis* als auch in Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* wurde eine dramatische Induktion von Phytochelatinen nach der Zugabe von Arsenit ( $\text{As}^{3+}$ ) oder Arsenat ( $\text{As}^{5+}$ ) beobachtet. Der Anteil von  $\gamma$ -Glu-Cys-Peptiden (Glutathion und Phytochelatine) am Gesamtprotein erhöhte sich von 0,8 Gewichtsprozent (bei der Kontrolle) auf 2,0 Gewichtsprozent (bei 100  $\mu\text{M}$  Arsenit). Auch die organische Arsen-Verbindung Melarsoprol (ein Medikament gegen Trypanosomen) induzierte die Phytochelatin-Bildung. Die Identität der gebildeten Peptide  $\text{PC}_2$  und  $\text{PC}_3$  konnte durch Massenspektrometrie (ESI-MS) bestätigt werden. Ein Arsen-Phytochelatin-Komplex konnte nicht gereinigt werden. Jedoch konnte unter optimierten Bedingungen (pH 4.0 und 5  $\mu\text{M}$  Arsenit im Laufpuffer) mit Gelfiltration die Existenz eines solchen *in vivo* gebildeten Komplexes gezeigt werden. Die massenspektrometrische Analyse eines synthetisierten As- $\text{PC}_2$ -Komplexes ergab die erwartete Stöchiometrie von drei SH-Gruppen pro  $\text{As}^{3+}$ . Die Zugabe des Glutathion-Biosynthese-Inhibitors Buthionin-Sulfoximin (BSO) führte zu einer stärker toxischen Wirkung des Arsens und zu einer Verminderung der Glutathion- und Phytochelatin-Bildung. Zusammen mit den anderen

Befunden wurde daher postuliert, daß Phytochelatine durch die Bindung des Arsens eine zentrale Rolle bei seiner Entgiftung spielen.

3. Als weitere Elemente der 5. Hauptgruppe wurden Antimon und Bismut, als weiteres Halbmetall Selen auf ihre Wirkung auf das Zellwachstum und die Phytochelatinsbildung hin getestet. Antimon und Bismut induzierten Phytochelatine; mit Gelfiltration konnte ein Sb-Phytochelatins-Komplex gezeigt werden. Selen (als Selenat und Selenit) hingegen induzierte keine Phytochelatine, entgegen früheren Berichten. Mit Gelfiltration konnte gezeigt werden, daß das Selen als niedermolekulares Selen vorliegt, sei es als anorganisches Selenat/Selenit oder als organische Verbindung; ein größerer Anteil des Selen (63 %) war nach Selenit-Zugabe an Proteine gebunden als nach Selenat-Zugabe (12 %).
4. Es wurde untersucht, ob die Phytochelatins-Synthase als Homodimer aus zwei ca. 50 kDa-Untereinheiten aktiv ist. Diese Untersuchung wurde mit dem Yeast-Two-Hybrid-System durchgeführt. Dazu wurde die PC-Synthase aus *Arabidopsis*-cDNA (AtPCS1) mittels PCR amplifiziert, in beide Yeast-Two-Hybrid-Vektoren (pGAD424 und pGBT9) ligiert und in *Escherichia coli* kloniert. Die daraus gewonnenen Vektoren wurden in *Saccharomyces cerevisiae* kotransformiert. Sowohl die mit nur einem Vektor mit der PC-Synthase transformierten Hefen als auch die mit beiden Vektoren kotransformierten Hefen zeigten nach  $\text{Cd}^{2+}$ -Zugabe Phytochelatins-Bildung, während mit Kontrollkonstrukten transformierten keine Phytochelatine bildeten. Mit beiden Reportergenen des Yeast-Two-Hybrid-Systems (Wachstum auf histidin-freiem Medium und  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität) konnte keine Interaktion zwischen dem AD-PCS1-Fusionsprotein und dem BD-PCS1-Protein gezeigt werden. Die Bildung von Homodimeren scheint keine für die enzymatische Wirkung notwendige Eigenschaft der PC-Synthase zu sein.
5. Die Frage, in welchen Organismen Phytochelatine vorkommen, wurde diskutiert. Da phylogenetisch nicht näher verwandte Organismen Phytochelatine bilden, wurde postuliert, daß Phytochelatine nicht nur in Pflanzen (photosynthetisierende Eukaryota) und Pilzen vorkommen, sondern unter den Eukaryota ubiquitär sind. Dies wurde durch die rezente Entdeckung gestützt, daß auch der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und der Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* zur PC-Synthase homologe Gene besitzen. Einige Pilze und Tiere (*Saccharomyces cerevisiae* und *Drosophila melanogaster*) scheinen das

PC-Synthase-Gen sekundär verloren zu haben. Weiter wurde diskutiert, welche Elemente Phytochelatine induzieren. Neben allen bisher untersuchten „Class B“-Metallen (Pd, Ag, Au, Hg, Bi) sind es sicher einige der „Borderline“-Metalle (Cu, Zn, Cd, Ga, In, Sn, Pb, As, Sb), jedoch keine der „Class A“-Metalle (z.B. Alkali- und Erdalkali-Metalle). Bei einigen Elementen ist umstritten, ob sie die Phytochelatin-Bildung induzieren (Cr, Mo, W, Fe, Co, Ni, Se, Te). Die Frage, welche der Phytochelatine induzierenden Elemente *in vivo* Komplexe mit den Phytochelatinen bilden, wurde diskutiert. Aufgrund der Erfahrung, daß ein As-Phytochelatin-Komplex bei pH 8.0 nicht mittels Gelfiltration gezeigt werden konnte, wurde insbesondere in Frage gestellt, inwieweit chromatographische Techniken für die *in vivo*-Situation relevante Ergebnisse liefern. Verschiedene Mechanismen, die einen Komplex bei der Extraktion und der Chromatographie destabilisieren, wurden diskutiert. Zuletzt wurde erwogen, inwieweit die Überexpression der Phytochelatin-Synthase eine Rolle bei der Phytoremediation von Schwermetallen spielen könnte. Es wurde postuliert, daß Faktoren wie die Metall-Aufnahme in die Pflanze und der Transport in oberirdische Organe der Pflanze eine größere Rolle bei der Entwicklung von Phytoremediations-Verfahren spielen.



## Literaturverzeichnis

- Adams MD et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195.
- Ahner BA, Kong S, Morel FMM (1995) Phytochelation production in marine algae. 1. An interspecies comparison. *Limnology and Oceanography* 40: 649-657.
- Ahner BA, Morel FMM (1995) Phytochelation production in marine algae. 2. Induction by various metals. *Limnology and Oceanography* 40: 658-665.
- Ahner BA, Morel FMM, Moffett JW (1997) Trace metal control of phytochelatin production in coastal waters. *Limnology and Oceanography* 42: 601-608.
- Ahner BA, Price NM, Morel FMM (1994) Phytochelatin production by marine phytoplankton at low free metal ion concentrations: laboratory studies and field data from Massachusetts Bay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91: 8433-8436.
- Anderson JW (1993) Selenium interaction in sulfur metabolism. In LJ de Kok, I Stulen, H Rennenberg, C Brunold, WE Rauser, eds, *Sulfur nutrition and assimilation in higher plants: regulatory agricultural and environmental aspects*. SPB Academic Publishing, The Hague, pp 49-60.
- Anon. (1997) Hans Rudolf Felix, Schweizer Forscher und Unternehmer, hat ein neues Verfahren zur biologischen Sanierung verseuchter Böden entwickelt. *Süddeutsche Zeitung* 28./29.6.1997: 14.
- Aposhian HV (1989) Biochemical toxicology of arsenic. *Reviews in Biochemical Toxicology* 10: 265-299.
- Aposhian HV (1997) Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 37: 397-419.
- Asher CJ, Reay PF (1979) Arsenic uptake by barley seedlings. *Australian Journal of Plant Physiology* 6: 459-466.
- Azcue JM, Nriagu JO (1994) Arsenic: historical perspectives. In JO Nriagu, ed, *Arsenic in the environment. Part I: cycling and characterization*. Wiley, New York, pp 1-15.
- Bacchi CJ, Yarlett N, Goldberg B, Bitonti AJ, McCann PP (1991) Polyamine metabolism in African trypanosomes. In GH Coombs, MJ North, eds, *Biochemical protozoology*. Taylor and Francis, London, pp 469-481.
- Baker AJM, Brooks RR (1989) Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1: 81-126.
- Barrett SV, Barrett MP (2000) Anti-sleeping sickness drugs and cancer chemotherapy. *Parasitology Today* 16: 7-9.
- Bartel P, Chien C-T, Sternglanz R, Fields S (1993) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *BioTechniques* 14: 920-924.
- Bartolf M, Brennan E, Price CA (1980) Partial characterization of a cadmium-binding protein from the roots of cadmium-treated tomato. *Plant Physiology* 66: 438-441.
- Bassham DC, Raikhel NV (2000) Plant cells are not just green yeast. *Plant Physiology* 122: 999-1001.
- Bergdahl IA (1998) Lead-binding proteins - a way to understand lead toxicity. *Analisis Magazine* 26: M81-M84.
- Bernhard WR, Kägi JHR (1987) Purification and characterization of atypical cadmium-binding polypeptides from *Zea mays*. In JHR Kägi, Y Kojima, eds, *Metallothionein II: Proceedings of the "Second international meeting on metallothionein and other low molecular weight metal-binding proteins"*, Zürich, August 21-24, 1985. Birkhäuser, Basel, pp 309-315.

- Bhattacharya D, Medlin L (1998) Algal phylogeny and the origin of land plants. *Plant Physiology* 116: 9-15.
- Björnstedt M, Kumar S, Holmgren A (1995) Selenite and selenodiglutathione: reactions with thioredoxin systems. *Methods in Enzymology* 252: 209-219.
- Blasius E (1985) Jander-Blasius: Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie (12. Auflage). Hirzel, Stuttgart.
- Böck A, Forchhammer K, Heider J, Baron C (1991) Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. *Trends in Biochemical Sciences* 16: 463-467.
- Bordin G, Rodriguez A (2000) 2<sup>nd</sup> international Workshop on metallothioneins 4-5<sup>th</sup> October 1999: Proceedings. Joint Research Centre (Institute for Reference Materials and Measurements), Geel.
- Bordin G, Virtanen V, Rodriguez AR (1998) Caractérisation du polymorphisme de métallothionéines par CZE-DAD. *Analisis Magazine* 26: M61-M64.
- Bracken WM, Klaassen CD (1987) Induction of metallothionein in rat primary hepatocytic cultures: evidence for direct and indirect induction. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 22: 163-174.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brown SL, Chaney RL, Lloyd CA, Angle JS, Ryan JA (1996) Relative uptake of cadmium by garden vegetables and fruits grown on long-term biosolid-amended soils. *Environmental Science & Technology* 30: 3508-3511.
- Brown TA, Shrift A (1982) Selenium: toxicity and tolerance in higher plants. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 57: 59-84.
- Buchanan-Wollaston V (1994) Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. Identification of a gene encoding a senescence-specific metallothionein-like protein. *Plant Physiology* 105: 839-846.
- Buchanan-Wollaston V, Ainsworth C (1997) Leaf senescence related genes by subtractive hybridisation. *Plant Molecular Biology* 33: 821-834.
- Buchet J-P, Lison D (2000) Clues and uncertainties in the risk assessment of arsenic in drinking water. *Food and Chemical Toxicology* 38: S81-S85.
- Budzikiewicz H (1992) Massenspektrometrie. Eine Einführung (3. Auflage). VCH, Weinheim.
- Chassaing H, Lobinski R (1998) Polymorphism and identification of metallothionein isoforms by reversed-phase HPLC with on-line ion-spray mass spectrometric detection. *Analytical Chemistry* 70: 2536-2543.
- Chasteen TG (1998) Volatile chemical species of selenium. In J Frankenberger WT, RA Engberg, eds, *Environmental chemistry of selenium*. Marcel Dekker, New York, pp 589-612.
- Chen J, Zhou J, Goldsbrough PB (1997) Characterization of phytochelatin synthase from tomato. *Physiologia Plantarum* 101: 165-172.
- Chien C-T, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S (1991) The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88: 9578-9582.
- Choi D, Kim HM, Yun HK, Park J-A, Kim WT, Bok SH (1996) Molecular cloning of a metallothionein-like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology* 112: 353-359.
- Clarkson TW (1998) Human toxicology of mercury. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 11: 303-317.
- Clemens S, Kim EJ, Neumann D, Schroeder JI (1999) Tolerance to toxic metals by a gene

- family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO Journal* 18: 3325-3333.
- Clendennen SK, May GD (1997) Differential gene expression in ripening banana fruit. *Plant Physiology* 115: 463-469.
- Cobbett CS (2000a) Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 211-216.
- Cobbett CS (2000b) Phytochelatin and their role in heavy metal detoxification. *Plant Physiology* 123: 825-832.
- Collier HB (1981) A Zn<sup>2+</sup> binding constituent of fabaceans. *Biochimica et Biophysica Acta* 675: 427-429.
- Cone JE, del Rio RM, Davis JN, Stadtman TC (1976) Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: identification of selenocysteine as the organoselenium moiety. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 73: 2659-2663.
- Coupe SA, Taylor JE, Roberts JA (1995) Characterisation of an mRNA encoding a metallothionein-like protein that accumulates during ethylene-promoted abscission of *Sambucus nigra* L. leaflets. *Planta* 197: 442-447.
- Craig PJ, Forster SN, Jenkins RO, Miller D (1999) An analytical method for the detection of methylantimony species in environmental matrices: methylantimony levels in some UK plant material. *Analyst* 124: 1243-1248.
- Cullen WR, Hettipathirana DI (1994) Application of whole cell NMR techniques to study the interaction of arsenic compounds with *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Applied Organometallic Chemistry* 8: 463-471.
- Cullen WR, Reimer KJ (1989) Arsenic speciation in the environment. *Chemical Reviews* 89: 713-764.
- Cunningham SD, Ow DW (1996) Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology* 110: 715-719.
- Dameron CT, Reese RN, Mehra RK, Kortan AR, Carroll PJ, Steigerwald ML, Brus LE, Winge DR (1989) Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites. *Nature* 338: 596-597.
- de Knecht JA, van Dillen M, Koevoets PLM, Schat H, Verkleij JAC, Ernst WHO (1994) Phytochelatin in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Physiology* 104: 255-261.
- de Kok LJ, Stulen I (1993) Role of glutathione in plants under oxidative stress. In LJ de Kok, I Stulen, H Rennenberg, C Brunold, WE Rauser, eds, *Sulfur nutrition and assimilation in higher plants: regulatory agricultural and environmental aspects*. SPB Academic Publishing, The Hague, pp 125-138.
- de Miranda JR, Thomas MA, Thurman DA, Tomsett AB (1990) Metallothionein genes from the flowering plant *Mimulus guttatus*. *FEBS Letters* 260: 277-280.
- de Plaen G, Malaisse F, Brooks RR (1982) The 'copper flowers' of Central Africa and their significance for prospecting and archaeology. *Endeavour, New Series* 6: 72-77.
- de Souza MP, Pilon-Smits EAH, Lytle CM, Hwang S, Tai J, Honma TSU, Yeh L, Terry N (1998) Rate-limiting steps in selenium assimilation and volatilization by Indian mustard. *Plant Physiology* 117: 1487-1494.
- de Vos CHR, Vonk MJ, Vooijs R, Schat H (1992) Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiology* 98: 853-858.
- Delnomdedieu M, Basti MM, Otvos JD, Thomas DJ (1993) Transfer of arsenite from glutathione to dithiols: a model of interaction. *Chemical Research in Toxicology* 6: 598-602.



- Dhar RK, Biswas BK, Samanta G, Mandal BK, Chakraborti D, Roy S, Jafar A, Islam A, Ara G, Kabir S, Khan AW, Ahmed SA, Hadi SA (1997) Groundwater arsenic calamity in Bangladesh. *Current Science* 73: 48-59.
- Dietz K-J, Baier M, Krämer U (1999) Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In MNV Prasad, J Hagemeyer, eds, *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems*. Springer, Berlin, pp 73-97.
- Dill K, Adams ER, O'Connor RJ, Chong S, McGown EL (1987) One-dimensional and two-dimensional nuclear magnetic resonance studies of the reaction of phenyldichloroarsine with glutathione. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 257: 293-301.
- Doolittle WF (1999) Phylogenetic classification and the universal tree. *Science* 284: 2124-2128.
- Edmonds JS, Francesconi KA (1981) Arseno-sugars from brown kelp (*Ecklonia radiata*) as intermediates in cycling of arsenic in a marine ecosystem. *Nature* 289: 602-604.
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82: 70-77.
- Ernst W (1974) *Schwermetallvegetation der Erde*. Gustav Fischer, Stuttgart.
- Ernst WHO (1996a) Phytotoxicity of heavy metals. In C Rodriguez-Barrueco, ed, *Fertilizers and environment*. Kluwer, Dordrecht, pp 423-430.
- Ernst WHO (1996b) Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. *Applied Geochemistry* 11: 163-167.
- Estojak J, Brent R, Golemis EA (1995) Correlation of two-hybrid affinity data with *in vitro* measurements. *Molecular and Cellular Biology* 15: 5820-5829.
- Finkelman RB (1999) Trace elements in coal: environmental and health significance. *Biological Trace Element Research* 67: 197-204.
- Florijn PJ, van Beusichem ML (1993) Cadmium distribution in maize inbred lines: effects of pH and level of Cd supply. *Plant and Soil* 153: 79-84.
- Foley RC, Singh KB (1994) Isolation of a *Vicia faba* metallothionein-like gene, expression in foliar trichomes. *Plant Molecular Biology* 26: 435-444.
- Forchhammer K, Böck A (1991) Biologie und Biochemie des Elements Selen. *Naturwissenschaften* 78: 497-504.
- Forshufvud S, Smith H, Wassén A (1961) Arsenic content of Napoleon I's hair probably taken immediately after his death. *Nature* 192: 103-105.
- Fowler BA, Hildebrand CE, Kojima Y, Webb M (1987) Nomenclature of metallothionein. In JHR Kägi, Y Kojima, eds, *Metallothionein II: Proceedings of the "Second international meeting on metallothionein and other low molecular weight metal-binding proteins"*, Zürich, August 21-24, 1985. Birkhäuser, Basel, pp 19-22.
- Fricker MD, May M, Meyer AJ, Sheard N, White NS (2000) Measurement of glutathione levels in intact roots of *Arabidopsis*. *Journal of Microscopy* 198: 162-173.
- Friederich M, Kneer R, Zenk MH (1998) Enzymic synthesis of phytochelatins in gram quantities. *Phytochemistry* 49: 2323-2329.
- Friedheim EAH (1949) Mel B in the treatment of human trypanosomiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 29: 173-180.
- Fritz CC, Green MR (1992) Fishing for partners: a method for studying protein-protein interactions *in vivo* is beginning to bear fruit. *Current Biology* 2: 403-405.
- Gailer J, Lindner W (1998) On-column formation of arsenic-glutathione species detected by size-exclusion chromatography in conjunction with arsenic-specific detectors. *Journal of Chromatography B* 716: 83-93.
- Ganther HE (1971) Reduction of the selenotrisulfide derivative of glutathione to a persulfide analog by glutathione reductase. *Biochemistry* 10: 4089-4098.

- Gekeler W (1988): Phytochelatine. Vorkommen im Pflanzenreich und Untersuchungen zur Biosynthese. Doktorarbeit, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Gekeler W, Grill E, Winnacker E-L, Zenk MH (1988) Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Archives of Microbiology* 150: 197-202.
- Gekeler W, Grill E, Winnacker E-L, Zenk MH (1989) Survey of the plant kingdom for the ability to bind heavy metals through phytochelatins. *Zeitschrift für Naturforschung Sektion B* 44: 361-369.
- Girling CA, Peterson PJ, Minski MJ (1978) Gold and arsenic concentrations in plants as an indication of gold mineralisation. *Science of the Total Environment* 10: 79-85.
- Godbold DL, Horst WJ, Collins JC, Thurman DA, Marschner H (1984) Accumulation of zinc and organic acids in roots of zinc tolerant and non-tolerant ecotypes of *Deschampsia caespitosa*. *Journal of Plant Physiology* 116: 59-69.
- Gorby MS (1994) Arsenic in human medicine. In JO Nriagu, ed, *Arsenic in the environment. Part II: human health and ecosystem effects*. Wiley, New York, pp 1-16.
- Greger M (1999) Metal availability and bioconcentration in plants. In MNV Prasad, J Hagemeyer, eds, *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems*. Springer, Berlin, pp 1-27.
- Griffin BA, Adams SR, Tsien RY (1998) Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* 281: 269-272.
- Griffith OW, Meister A (1979) Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *Journal of Biological Chemistry* 254: 7558-7560.
- Grill E (1987): Phytochelatine, die schwermetall-bindenden Peptide der Höheren Pflanzen. Doktorarbeit, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Grill E (1989) Phytochelatins in plants. In DH Hamer, DR Winge, eds, *Metal ion homeostasis: molecular biology and biochemistry*. Alan R. Liss, New York, pp 283-300.
- Grill E, Gekeler W, Winnacker E-L, Zenk MH (1986) Homo-phytochelatins are heavy metal-binding peptides of homo-glutathione containing Fabales. *FEBS Letters* 205: 47-50.
- Grill E, Löffler S, Winnacker E-L, Zenk MH (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86: 6838-6842.
- Grill E, Thumann J, Winnacker E-L, Zenk MH (1988a) Induction of heavy-metal binding phytochelatins by inoculation of cell cultures in standard media. *Plant Cell Reports* 7: 375-378.
- Grill E, Winnacker E-L, Zenk MH (1985) Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230: 674-676.
- Grill E, Winnacker E-L, Zenk MH (1987) Phytochelatins, a class of heavy-metal binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 84: 439-443.
- Grill E, Winnacker E-L, Zenk MH (1988b) Occurrence of heavy metal binding phytochelatins in plants growing in a mining refuse area. *Experientia* 44: 539-540.
- Grill E, Winnacker E-L, Zenk MH (1991) Phytochelatins. *Methods in Enzymology* 205: 333-341.
- Grondin K, Haimeur A, Mukhopadhyay R, Rosen BP, Ouellette M (1997) Co-amplification of the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase gene *gsh1* and of the ABC transporter gene *pgpA* in arsenite-resistant *Leishmania tarentolae*. *EMBO Journal* 16: 3057-3065.

- Guo X, Wu L (1998) Distribution of free seleno-amino acids in plant tissue of *Melilotus indica* L. grown in selenium-laden soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 39: 207-214.
- Ha S-B, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS (1999) Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* 11: 1153-1163.
- Hamer DH (1986) Metallothionein. *Annual Review of Biochemistry* 55: 913-951.
- Harmens H, den Hartog PR, ten Bookum WM, Verkleij JAC (1993) Increased zinc tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke is not due to increased production of phytochelatin. *Plant Physiology* 103: 1305-1309.
- Harmens H, Koevoets PLM, Verkleij JAC, Ernst WHO (1994) The role of low molecular weight organic acids in the mechanism of increased zinc tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. *New Phytologist* 126: 615-621.
- Harrington CF, Roberts DJ, Nickless G (1996) The effect of cadmium, zinc, and copper on the growth, tolerance index, metal uptake, and production of malic acid in two strains of the grass *Festuca rubra*. *Canadian Journal of Botany* 74: 1742-1752.
- Hart JJ, Welch RM, Norvell WA, Sullivan LA, Kochian LV (1998) Characterization of cadmium binding, uptake, and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. *Plant Physiology* 116: 1413-1420.
- Hayashi Y, Nakagawa CW, Mutoh N, Isobe M, Goto T (1991) Two pathways in the biosynthesis of cadystins ( $\gamma$ EC)<sub>n</sub>G in the cell-free system of the fission yeast. *Biochemistry and Cell Biology* 69: 115-121.
- Hell R (1997) Molecular physiology of plant sulfur metabolism. *Planta* 202: 138-148.
- Hopper JL, Parker DR (1999) Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulfate. *Plant and Soil* 210: 199-207.
- Howden R, Cobbett CS (1992) Cadmium-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 100: 100-107.
- Howden R, Goldsbrough PB, Andersen CR, Cobbett CS (1995) Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiology* 107: 1059-1066.
- Hsieh H-M, Liu W-K, Chang A, Huang PC (1996) RNA expression patterns of a type 2 metallothionein-like gene from rice. *Plant Molecular Biology* 32: 525-529.
- Hsieh H-M, Liu W-K, Huang PC (1995) A novel stress-inducible metallothionein-like gene from rice. *Plant Molecular Biology* 28: 381-389.
- Huang JW, Chen J, Berti WR, Cunningham SD (1997) Phytoremediation of lead-contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environmental Science & Technology* 31: 800-805.
- Huang JW, Cunningham SD (1996) Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologist* 134: 75-84.
- Isobe M, Uyakul D, Liu K, Goto T (1990) FAB-MS/MS spectrometry in determining the primary structure of  $\gamma$ -glutamyl-containing peptides. *Agricultural and Biological Chemistry* 54: 1651-1660.
- Jackson PJ, Delhaize E, Kuske CR (1992) Biosynthesis and metabolic roles of cadystins ( $\gamma$ -EC)<sub>n</sub>G and their precursors in *Datura innoxia*. *Plant and Soil* 146: 281-289.
- James LF, Panter KE, Mayland HF, Miller MR, Baker DC (1989) Selenium poisoning in livestock: a review and progress. In LW Jacobs, ed, *Selenium in the agriculture and the environment*. American Society of Agronomy/Soil Science Society of America, Madison, pp 123-131.
- Jocelyn PC (1972) Biochemistry of the SH group: the occurrence, chemical properties, metabolism and biological function of thiols and disulphides. Academic Press,

- London.
- Johanning J, Strasdeit H (1998) Eine komplexchemische Basis für die biologische Funktion der Phytochelatine. *Angewandte Chemie* 110: 2642-2644.
- Jolliffe DM (1993) A history of the use of arsenicals in man. *Journal of the Royal Society of Medicine* 86: 287-289.
- Jones MM (1995) Chemistry of chelation: chelating agent antagonists for toxic metals. In RA Goyer, MG Cherian, eds, *Toxicology of metals: biochemical aspects*. Springer, Berlin, pp 279-304.
- Jonnalagadda SB, Nenzou G (1997) Studies on arsenic rich mine dumps II. The heavy element uptake by vegetation. *Journal of Environmental Science and Health A* 32: 455-464.
- Juang R-H, McCue KF, Ow DW (1993) Two purine biosynthetic enzymes that are required for cadmium tolerance in *Schizosaccharomyces pombe* utilize cysteine sulfinate *in vitro*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 304: 392-401.
- Kägi JHR (1991) Overview of Metallothionein. *Methods in Enzymology* 205: 613-626.
- Kägi JHR, Kojima Y (eds) (1987) *Metallothionein II: Proceedings of the "Second international meeting on metallothionein and other low molecular weight metal-binding proteins"*, Zürich, August 21-24, 1985. Birkhäuser, Basel.
- Kaiser J (1998) Toxicologists shed new light on old poisons. *Science* 279: 1850-1851.
- Kalef E, Gitler C (1994) Purification of vicinal dithiol-containing proteins by arsenical-based affinity chromatography. *Methods in Enzymology* 233: 395-403.
- Karim MM (2000) Arsenic in groundwater and health problems in Bangladesh. *Water Research* 34: 304-310.
- Kawashima I, Inokuchi Y, Chino M, Kimura M, Shimizu N (1991) Isolation of a gene for a metallothionein-like protein from soybean. *Plant Cell Physiology* 32: 913-916.
- Kawashima I, Kennedy TD, Chino M, Lane BG (1992) Wheat E<sub>c</sub> metallothionein genes: like mammalian Zn<sup>2+</sup> metallothionein genes, wheat Zn<sup>2+</sup> metallothionein genes are conspicuously expressed during embryogenesis. *European Journal of Biochemistry* 209: 971-976.
- Klaassen CD (ed) (1999) *Metallothionein IV*. Birkhäuser, Basel.
- Klapheck S, Fliegner W, Zimmer I (1994) Hydroxymethyl-phytochelatin [(γ-Glutamylcysteine)<sub>n</sub>-Serine] are metal-induced peptides of the Poaceae. *Plant Physiology* 104: 1325-1332.
- Klapheck S, Schlunz S, Bergmann L (1995) Synthesis of phytochelatin and homophytochelatin in *Pisum sativum* L. *Plant Physiology* 107: 515-521.
- Kneer R (1993) *Phytochelatin. Analytik, Komplexstruktur, Schwermetalltoleranz, Verbreitung im Pilzreich und präparative, enzymatische Synthese*. Doktorarbeit, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Kneer R, Kutchan TM, Hochberger A, Zenk MH (1992) *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin. *Archives of Microbiology* 157: 305-310.
- Kneer R, Zenk MH (1992) Phytochelatin protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochemistry* 31: 2663-2667.
- Kneer R, Zenk MH (1997) The formation of Cd-phytochelatin complexes in plant cell cultures. *Phytochemistry* 44: 69-74.
- Köhl KI, Lösch R (1999) Experimental characterization of heavy metal tolerance in plants. In MNV Prasad, J Hagemeyer, eds, *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems*. Springer, Berlin, pp. 371-389.
- Kondo N, Imai K, Isobe M, Goto T, Murasugi A, Wada-Nakagawa C, Hayashi Y (1984) Cadystin A and B, major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced

- in a fission yeast - separation, revision of structures and synthesis. *Tetrahedron Letters* 25: 3869-3872.
- Kondo N, Isobe M, Imai K, Goto T (1983) Structure of cadystin, the unit-peptide of cadmium-binding peptides induced in a fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Tetrahedron Letters* 24: 925-928.
- Koshiuka K, Elstner E, Williamson E, Said JW, Tada Y, Koeffler HP (2000) Novel therapeutic approach: organic arsenical (melarsoprol) alone or with all-trans-retinoic acid markedly inhibit growth of human breast and prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *British Journal of Cancer* 82: 452-458.
- Krämer U, Cotter-Howells JD, Charnock JM, Baker AJM, Smith JAC (1996) Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379: 635-638.
- Krämer U, Pickering IJ, Prince RC, Raskin I, Salt DE (2000) Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiology* 122: 1343-1353.
- Kubota H, Sato K, Yamada T, Maitani T (2000) Phytochelatin homologs induced in hairy roots of horseradish. *Phytochemistry* 53: 239-245.
- Lakso JU, Peoples SA (1975) Methylation of inorganic arsenic by mammals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23: 674-676.
- Lamoureux GL, Rusness DG (1993) Glutathione in the metabolism and detoxification of xenobiotics in plants. In LJ de Kok, I Stulen, H Rennenberg, C Brunold, WE Rausser, eds, *Sulfur nutrition and assimilation in higher plants: regulatory agricultural and environmental aspects*. SPB Academic Publishing, The Hague, pp 221-237.
- Lane B, Kajioka R, Kennedy T (1987) The wheat-germ E<sub>c</sub> protein is a zinc-containing metallothionein. *Biochemistry and Cell Biology* 65: 1001-1005.
- Lane TW, Morel FMM (2000) A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97: 4627-4631.
- Lange OL, Ziegler H (1963) Der Schwermetallgehalt von Flechten aus dem Acarosporium sinopicae auf Erzschlackenhalde des Harzes. *Mitteilungen der Floristisch-soziologischen Arbeitsgemeinschaft Neue Folge* 10: 156-183.
- Läuchli A (1993) Selenium in plants: uptake, functions, and environmental toxicity. *Botanica Acta* 106: 455-468.
- Ledger SE, Gardner RC (1994) Cloning and characterization of five cDNAs for genes differentially expressed during fruit development of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*). *Plant Molecular Biology* 25: 877-886.
- Lee J, Reeves RD, Brooks RR, Jaffré T (1977) Isolation and identification of a citrate-complex of nickel from nickel-accumulating plants. *Phytochemistry* 16: 1503-1505.
- Leopold I, Günther D, Neumann D (1998) Application of high performance liquid chromatography - inductively coupled plasma mass spectrometry to the investigation of phytochelatin complexes and their role in heavy metal detoxification in plants. *Analisis Magazine* 26: M28-M32.
- Leustek T, Saito K (1999) Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiology* 120: 637-643.
- Lichtenberger O, Neumann D (1997) Analytical electron microscopy as a powerful tool in plant cell biology: examples using electron energy loss spectroscopy and X-ray microanalysis. *European Journal of Cell Biology* 73: 378-386.
- Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 18: 100-127.
- Liu J, Rosen BP (1997) Ligand interactions of the ArsC arsenate reductase. *Journal of Biological Chemistry* 272: 21084-21089.
- Lobinski R, Edmonds JS, Suzuki KT, Uden PC (2000) Species-selective determination of

- selenium compounds in biological materials. *Pure and Applied Chemistry* 72: 447-461.
- Lobinski R, Potin-Gautier M (1998) Metals and biomolecules - bioinorganic analytical chemistry. *Analisis Magazine* 26: M21-M24.
- Löffler S, Hochberger A, Grill E, Winnacker E-L, Zenk MH (1989) Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of heavy metals by the reaction product. *FEBS Letters* 258: 42-46.
- Maitani T, Kubota H, Sato K, Yamada T (1996) The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiology* 110: 1145-1150.
- Mallick N, Pandey S, Rai LC (1994) Involvement of a cadmium-induced low molecular weight protein in regulating cadmium toxicity in the diazotrophic cyanobacterium *Anabaena doliolum*. *BioMetals* 7: 299-304.
- Mallick N, Rai LC (1998) Characterization of Cd-induced low molecular weight protein in a N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum* with special reference to co-/multiple tolerance. *BioMetals* 11: 55-61.
- Margoshes M, Vallee BL (1957) A cadmium-binding protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society* 79: 4813-4814.
- Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants (2. Auflage). Academic Press, London.
- Marshall E (1986) High selenium levels confirmed in six states. *Science* 231: 111.
- Mathys W (1977) The role of malate, oxalate, and mustard oil glucosides in the evolution of zinc-resistance in herbage plants. *Physiologia Plantarum* 40: 130-136.
- Mattusch J, Wennrich R, Schmidt A-C, Reisser W (2000) Determination of arsenic species in water, soils and plants. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 366: 200-203.
- Mayland HF, James LF, Panter KE, Sonderegger JL (1989) Selenium in seleniferous environments. In LW Jacobs, ed, *Selenium in the agriculture and the environment*. American Society of Agronomy/Soil Science Society of America, Madison, pp 15-50.
- Meagher RB (2000) Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 153-162.
- Mehra RK, Kodati R, Abdullah R (1995) Chain length-dependent Pb(II)-coordination in phytochelatins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 215: 730-736.
- Mehra RK, Miclat J, Kodati VR, Abdullah R, Hunter TC, Mulchandani P (1996a) Optical spectroscopic and reverse-phase HPLC analyses of Hg(II) binding to phytochelatins. *Biochemical Journal* 314: 73-82.
- Mehra RK, Mulchandani P (1995) Glutathione-mediated transfer of Cu(I) into phytochelatins. *Biochemical Journal* 307: 697-705.
- Mehra RK, Tran K, Scott GW, Mulchandani P, Saini SS (1996b) Ag(I)-binding to phytochelatins. *Journal of Inorganic Biochemistry* 61: 125-142.
- Mehra RK, Winge DR (1988) Cu(I) binding to the *Schizosaccharomyces pombe*  $\gamma$ -glutamyl peptides varying in chain lengths. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 265: 381-389.
- Mehra RK, Winge DR (1991) Metal ion resistance in fungi: molecular mechanisms and their regulated expression. *Journal of Cellular Biochemistry* 45: 30-40.
- Meuwly P, Thibault P, Schwan AL, Rauser WE (1995) Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. *Plant Journal* 7: 391-400.
- Michalke B, Schramel P (1998) The coupling of capillary electrophoresis to ICP-MS. *Analisis Magazine* 26: M51-M56.
- Miersch J, Bärlocher F, Bruns I, Krauss G-J (1997) Effects of cadmium, copper, and zinc on growth and thiol content of aquatic hyphomycetes. *Hydrobiologia* 346: 77-84.

- Milne JB (1998) The uptake and metabolism of inorganic selenium species. In WT Frankenberger Jr., RA Engberg, eds, Environmental chemistry of selenium. Marcel Dekker, New York, pp 459-477.
- Moxon AL, Rhian M (1943) Selenium poisoning. *Physiological Review* 23: 305-337.
- Mukhopadhyay R, Dey S, Xu N, Gage D, Lightbody J, Ouellette M, Rosen BP (1996) Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93: 10383-10387.
- Müller-Jung J (1996) Quecksilber - das schleichende Gift: Globale Belastung nimmt zu / Konzentrationen in Gewässern unterschätzt / Weltkongreß in Hamburg. *Frankfurter Allgemeine Zeitung* 7.8.1996: N3.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Murasugi A, Wada C, Hayashi Y (1983) Occurrence of acid-labile sulfide in cadmium-binding peptide 1 from fission yeast. *Journal of Biochemistry* 93: 661-664.
- Murphy A, Taiz L (1995) Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes: correlation with copper tolerance. *Plant Physiology* 109: 945-954.
- Murphy A, Zhou J, Goldsbrough PB, Taiz L (1997) Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 113: 1293-1301.
- Mutoh N, Hayashi Y (1988) Isolation of mutants of *Schizosaccharomyces pombe* unable to synthesize cadystin, small cadmium-binding peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 151: 32-39.
- Näveke A (1996) Mit Molke gegen Schwermetalle. Chemiker wollen verseuchte Böden mit Abfällen reinigen. *Süddeutsche Zeitung* 12.9.1996: 56.
- Nelson AA, Fitzhugh OG, Calvery HO (1943) Liver tumors following cirrhosis caused by selenium in rats. *Cancer Research* 3: 320-326.
- Nieboer E, Richardson DHS (1980) The replacement of the nondescriptive term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution (Series B)* 1: 3-26.
- Nissen P, Benson AA (1982) Arsenic metabolism in freshwater and terrestrial plants. *Physiologia Plantarum* 54: 446.
- Noctor G, Strohm M, Jouanin L, Kunert K-J, Foyer CH, Rennenberg H (1996) Synthesis of glutathione in leaves of transgenic poplar overexpressing  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiology* 112: 1071-1078.
- Nriagu JO (1985) Historical perspective on the contamination of food and beverages with lead. In KR Mahaffey, ed, *Dietary and environmental lead: human health effects*. Elsevier, Amsterdam, pp 1-41.
- Nriagu JO, Pacyna JM (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333: 134-139.
- Ochiai E-I (1995) Toxicity of heavy metals and biological defense. *Journal of Chemical Education* 72: 479-484.
- O'Halloran TV, Culotta VC (2000) Metallochaperones: an intracellular shuttle service for metal ions. *Journal of Biological Chemistry* 275: 25057-25060.
- Ohlendorf HM (1989) Bioaccumulation and effects of selenium in wildlife. In LW Jacobs, ed, *Selenium in the agriculture and the environment*. American Society of Agronomy/Soil Science Society of America, Madison, pp 133-177.
- Ortiz DF, Kreppel L, Speiser DM, Scheel G, McDonald G, Ow DW (1992) Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar

- membrane transporter. *EMBO Journal* 11: 3491-3499.
- Ortiz DF, Ruscitti T, McCue KF, Ow DW (1995) Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane peptide. *Journal of Biological Chemistry* 270: 4721-4728.
- Ow DW (1996) Heavy metal tolerance genes: prospective tools for bioremediation. *Resources, Conservation and Recycling* 18: 135-149.
- Öz G, Pountney DL, Armitage IM (1999) Metallothionein structure update. In CD Klaassen, ed, *Metallothionein IV*. Birkhäuser, Basel, pp 37-43.
- Pantsar-Kallio M, Manninen PKG (1997) Simultaneous determination of toxic arsenic and chromium species in water samples by ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 779: 139-146.
- Pellerin P, O'Neill MA (1998) The interaction of the pectic polysaccharide Rhamnogalacturonan II with heavy metals and lanthanides in wines and fruit juices. *Analisis Magazine* 26: M32-M36.
- Perego P, Howell SB (1997) Molecular mechanisms controlling sensitivity to toxic metal ions in yeast. *Toxicology and Applied Pharmacology* 147: 312-318.
- Peterson PF, Butler GW (1962) The uptake and assimilation of selenite by higher plants. *Australian Journal of Biological Sciences* 15: 126-146.
- Pickering IJ, Prince RC, George GN, Rauser WE, Wickramasinghe WA, Watson AA, Dameron CT, Dance IG, Fairlie DP, Salt DE (1999) X-ray absorption spectroscopy of cadmium phytochelatin and model systems. *Biochimica et Biophysica Acta* 1429: 351-364.
- Pickering IJ, Prince RC, George MJ, Smith RD, George GN, Salt DE (2000) Reduction and coordination of arsenic in Indian Mustard. *Plant Physiology* 122: 1171-1177.
- Pilegaard K (1994) Deposition of airborne metals around the lead-zinc mine in Maarmorilik monitored by lichens and mosses. *Meddelelser om Grønland, Bioscience* 43: 1-20.
- Pilon-Smits EAG, Hwang S, Lytle CM, Zhu Y, Tai JC, Bravo RC, Chen Y, Leustek T, Terry N (1999) Overexpression of ATP sulfurylase in indian mustard leads to increased selenate uptake, reduction, and tolerance. *Plant Physiology* 119: 123-132.
- Plocke DJ, Kägi JHR (1992) Spectral characteristics of cadmium-containing phytochelatin complexes isolated from *Schizosaccharomyces pombe*. *European Journal of Biochemistry* 207: 201-205.
- Prasad MNV (1995) Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environmental and Experimental Botany* 35: 525-545.
- Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284: 805-808.
- Raskin I (1996) Plant genetic engineering may help with environment cleanup. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93: 3164-3166.
- Raskin I, Nanda Kumar PBA, Dushenkov V, Salt DE (1994) Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in Biotechnology* 5: 285-290.
- Rauser WE (1990) Phytochelatins. *Annual Review of Biochemistry* 59: 61-86.
- Rauser WE (1995) Phytochelatins and related peptides: structure and function. *Plant Physiology* 109: 1141-1149.
- Rauser WE (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochemistry and Biophysics* 31: 19-48.
- Rauser WE, Hartmann H-J, Weser U (1983) Cadmium-thiolate protein from the grass *Agrostis gigantea*. *FEBS Letters* 164: 102-104.



- Rea PA, Li Z-S, Lu Y-P, Drozdowicz YM (1998) From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 727-760.
- Reddy GN, Prasad MNV (1990) Heavy metal-binding proteins/peptides: occurrence, structure, synthesis and functions. A review. *Environmental and Experimental Botany* 30: 251-264.
- Reese RN, White CA, Winge DR (1992) Cadmium-sulfide crystallites in Cd-( $\gamma$ EC)<sub>n</sub>G peptide complexes from tomato. *Plant Physiology* 98: 225-229.
- Reese RN, Winge DR (1988) Sulfide stabilization of the cadmium- $\gamma$ -glutamyl peptide complex of *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry* 263: 12832-12835.
- Reynolds TL, Crawford RL (1996) Changes in abundance of an abscisic acid-responsive, early cysteine-labeled metallothionein transcript during pollen embryogenesis in bread wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Molecular Biology* 32: 823-829.
- Robinson NJ, Wilson JR, Turner JS (1996) Expression of the type 2 metallothionein-like gene MT2 from *Arabidopsis thaliana* in Zn<sup>2+</sup>-metallothionein-deficient *Synechococcus* PCC 7942: putative role for MT2 in Zn<sup>2+</sup> metabolism. *Plant Molecular Biology* 30: 1169-1179.
- Sagner S, Kneer R, Wanner G, Cosson J-P, Deus-Neumann B, Zenk MH (1998) Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in *Sebertia acuminata*. *Phytochemistry* 47: 339-347.
- Saito K (2000) Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino-acids. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 188-195.
- Salt DE, Blaylock M, Kumar NPBA, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I, Raskin I (1995) Phytoremediation, a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Bio/Technology* 13: 468-474.
- Salt DE, Rauser WE (1995) MgATP-dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiology* 107: 1293-1301.
- Salt DE, Wagner GJ (1993) Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a Cd<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity. *Journal of Biological Chemistry* 268: 12297-12302.
- Samecka-Cymerman A, Kempers AJ (1998) Bioindication of gold by aquatic bryophytes. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 26: 90-94.
- Sandermann jr. H (1994) Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept. *Pharmacogenetics* 4: 225-241.
- Sanità di Toppi L, Gabbriellini R (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41: 105-130.
- Schat H, Kalff MMA (1992) Are phytochelatins involved in differential metal tolerance or do they merely reflect metal-imposed strain? *Plant Physiology* 99: 1475-1480.
- Schmöger MEV, Oven M, Grill E (2000) Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiology* 122: 793-801.
- Schwarz K, Foltz CM (1957) Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degradation. *Journal of the American Chemical Society* 79: 3292-3293.
- Scott N, Hatlelid KM, MacKenzie NE, Carter DE (1993) Reactions of arsenic (III) and arsenic (V) species with glutathione. *Chemical Research in Toxicology* 6: 102-106.
- Seiler RL (1996) Synthesis of data from studies by National Irrigation Water-Quality Program. *Water Resources Bulletin* 32: 1233-1245.
- Shimizu M, Hochadel JF, Fulmer BA, Waalkes MP (1998) Effect of glutathione depletion and metallothionein gene expression on arsenic-induced cytotoxicity and c-myc expression *in vitro*. *Toxicological Sciences* 45: 204-211.

- Singh RP, Tripathi RD, Sinha SK, Maheshwari R, Srivastava HS (1997) Response of higher plants to lead contaminated environment. *Chemosphere* 34: 2467-2493.
- Sitte P, Ziegler H, Ehrendorfer F, Bresinsky A (1991) Lehrbuch der Botanik für Hochschulen (begründet von E. Strasburger, F. Noll, H. Schenck, A.F.W. Schimper) (33. Auflage). Gustav Fischer, Stuttgart.
- Smith K, Mills A, Thornton JM, Fairlamb AH (1991) Trypanothione metabolism as a target for drug design: molecular modelling of trypanothione reductase. In GH Coombs, MJ North, eds, *Biochemical protozoology*. Taylor and Francis, London, pp 482-492.
- Sneller FEC, van Heerwaarden LM, Kraaijeveld-Smit FJL, ten Bookum WM, Koevoets PLM, Schat H, Verkleij JAC (1999) Toxicity of arsenate in *Silene vulgaris*, accumulation and degradation of arsenate-induced phytochelatin. *New Phytologist* 144: 223-232.
- Sogin ML, Silberman JD, Hinkle G, Morrison HG (1996) Problems with molecular diversity in the Eukarya. In DM Roberts, P Sharp, G Alderson, MA Collins, eds, *Evolution of microbial life*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 167-184.
- Speiser DM, Abrahamson SL, Bañuelos GS, Ow DW (1992a) *Brassica juncea* produces a phytochelatin-cadmium-sulfide complex. *Plant Physiology* 99: 817-821.
- Speiser DM, Ortiz DF, Kreppel L, Scheel G, McDonald G, Ow DW (1992b) Purine biosynthetic genes are required for cadmium tolerance in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and Cellular Biology* 12: 5301-5310.
- Stadtman TC (1990) Selenium biochemistry. *Annual Review of Biochemistry* 59: 111-127.
- Stähle HJ (1998) Gesundheitsstörungen durch Amalgam? *Medizinische Klinik* 93: 99-106.
- Steffens JC (1990) The heavy metal-binding peptides of plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41: 553-575.
- Steinberger K (1998) Das Gift, das aus dem Brunnen steigt: In Bangladesch sind Millionen Menschen durch arsenhaltiges Trinkwasser bedroht. *Süddeutsche Zeitung* 23.10.1998: 2.
- Steinberger K (1999) Das Gift der roten Brunnen: Immer noch verseucht Arsen die Menschen in Bangladesch. *Süddeutsche Zeitung* 30.6.1999: 12.
- Steinkellner H, Mun-Sik K, Helma C, Ecker S, Ma T-H, Horak O, Kundi M, Knasmüller S (1998) Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 31: 183-191.
- Stillman MJ, Green AR, Gui Z, Fowle D, Presta PA (1999) Circular dichroism, emission and exafs studies of Ag(I), Cd(II), Cu(I), and Hg(II) binding to metallothioneins and modeling the metal binding site. In CD Klaassen, ed, *Metallothionein IV*. Birkhäuser, Basel, pp. 23-35.
- Strasdeit H, Duhme A-K, Kneer R, Zenk MH, Hermes C, Nolting H-F (1991) Evidence for discrete Cd(SCys)<sub>4</sub> units in cadmium phytochelatin complexes from EXAFS spectroscopy. *Journal of the Chemical Society - Chemical Communications* 1991: 1129-1130.
- Stybło M, Delnomdedieu M, Hughes MF, Thomas DJ (1995) Identification of methylated metabolites of inorganic arsenic by thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography B* 668: 21-29.
- Suzuki KT, Imura N, Kimura M (eds) (1993) *Metallothionein III: Biological roles and medical applications*. Birkhäuser, Basel.
- Szpunar J, Pellerin P, Makarov A, Doco T, Williams P, Medina B, Lobinski R (1998) Speciation analysis for biomolecular complexes of lead in wine by size-exclusion HPLC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectroscopy* 13: 749-754.
- Tahvonen R (1996) Contents of lead and cadmium in foods and diets. *Food Reviews International* 12: 1-70.

- Tanji K, Läuchli A, Mejer J (1986) Selenium in the San Joaquin Valley. *Environment* 28: 6-11, 34-39.
- Thomson CD (1998) Selenium speciation in human body fluids. *Analyst* 123: 827-831.
- Thumann J, Grill E, Winnacker E-L, Zenk MH (1991) Reactivation of metal-requiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes. *FEBS Letters* 284: 66-69.
- Tomsett AB, Thurman DA (1988) Molecular biology of metal tolerances of plants. *Plant Cell and Environment* 11: 383-394.
- Tritschler J, Faus-Kessler T, Köhler J, Peichl L (1998) Der Zusammenhang zwischen zwei Meßnetzen zum Biomonitoring: Metalle in Moosen und Schwefel in Fichtennadeln. *Forstwissenschaftliches Centralblatt* 117: 14-22.
- Tseng WP, Chu HM, How SW, Fong JM, Lin CS, Yeh S (1968) Prevalence of skin cancer in an endemic area of chronic arsenicism in Taiwan. *Journal of the National Cancer Institute* 40: 453-463.
- Tung G, Temple PJ (1996) Uptake and localization of lead in corn (*Zea mays* L.) seedlings, a study by histochemical and electron microscopy. *Science of the Total Environment* 188: 71-85.
- Uthus EO (1992) Evidence for arsenic essentiality. *Environmental Geochemistry and Health* 14: 55-58.
- Vacchina V, Chassaing H, Oven M, Zenk MH, Lobinski R (1999) Characterisation and determination of phytochelatin in plant extracts by electrospray tandem mass spectrometry. *Analyst* 124: 1425-1430.
- Vacchina V, Lobinski R, Oven M, Zenk MH (2000) Signal identification in size-exclusion HPLC-ICP-MS chromatograms of plant extracts by electrospray tandem mass spectrometry (ES MS/MS). *Journal of Analytical Atomic Spectroscopy* 15: 529-534.
- van der Zaal BJ, Neuteboom LW, Pinas JE, Chardonens AN, Schat H, Verkleij JAC, Hooykaas PJJ (1999) Overexpression of a novel Arabidopsis gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiology* 119: 1047-1055.
- van Steveninck RFM, Babare A, Fernando DR, van Steveninck ME (1993) The binding of zinc in root cells of crop plants by phytic acid. *Plant and Soil* 155/156: 525-528.
- van Steveninck RFM, Babare A, Fernando DR, van Steveninck ME (1994) The binding of zinc, but not cadmium, by phytic acid in roots of crop plants. *Plant and Soil* 167: 157-164.
- van Steveninck RFM, van Steveninck ME, Fernando DR (1992) Heavy-metal (Zn, Cd) tolerance in selected clones of duck weed (*Lemna minor*). *Plant and Soil* 146: 271-280.
- van Steveninck RFM, van Steveninck ME, Fernando DR, Edwards LB, Wells AJ (1990) Electron probe X-ray microanalytical evidence for two distinct mechanisms of Zn and Cd binding in a Zn tolerant clone of *Lemna minor* L. *Comptes Rendus de l' Academie des Sciences Series III* 310: 671-678.
- Vassil AD, Kapulnik Y, Raskin I, Salt DE (1998) The role of EDTA in lead transport and accumulation by Indian Mustard. *Plant Physiology* 117: 447-453.
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu Y-P, Rea PA (1999) AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and *in vitro* reconstitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96: 7110-7115.
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu Y-P, Rea PA (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase: blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *Journal of Biological Chemistry* 275: 31451-31459.
- Vögeli-Lange R, Wagner GJ (1990) Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. Implication of a transport function for cadmium-

- binding peptides. *Plant Physiology* 92: 1086-1093.
- Wanek PL, Vance GF, Stahl PD (1999) Selenium uptake by plants: Effects of soil steaming, root addition, and selenium augmentation. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 30: 265-278.
- Wang J, Evangelou BP, Nielsen MT, Wagner GJ (1991) Computer-simulated evaluation of possible mechanisms for quenching heavy metal ion activity in plant vacuoles I. Cadmium. *Plant Physiology* 97: 1154-1160.
- Wang J, Evangelou BP, Nielsen MT, Wagner GJ (1992) Computer-simulated evaluation of possible mechanisms for sequestering metal ion activity in plant vacuoles II. Zinc. *Plant Physiology* 99: 621-626.
- Wang Y, Böck A, Neuhierl B (1999) Acquisition of selenium tolerance by a selenium non-accumulating *Astragalus* species via selection. *BioFactors* 9: 3-10.
- Warren HV, Delavault RE, Barakso J (1964) The role of arsenic as a pathfinder in biogeochemical prospecting. *Economic Geology* 59: 1381-1385.
- Webb EC, van Heyningen R (1947) The action of British anti-lewisite (BAL) on enzyme systems. *Biochemical Journal* 41: 74-78.
- Webb JL (1966) Arsenicals. In JL Webb, ed, *Enzyme and metabolic inhibitors volume III: iodoacetate, maleate, N-ethylmaleimide, alloxan, quinones, arsenicals*. Academic Press, New York, pp 595-793.
- Weider B, Fournier JH (1999) Activation analyses of authenticated hairs of Napoleon Bonaparte confirm arsenic poisoning. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 20: 378-382.
- Welz B (1998) Speciation analysis. The future of atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectroscopy* 12: 413-417.
- Whittaker VP (1947) An experimental investigation of the 'ring hypothesis' of arsenical toxicity. *Biochemical Journal* 41: 56-62.
- Wiberg N (1985) Hollemann-Wiberg: *Lehrbuch der Anorganischen Chemie* (91.-100. Auflage). de Gruyter, Berlin.
- Williams LE, Pittman JK, Hall JL (2000) Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 104-126.
- Winski SL, Carter DE (1995) Interactions of rat red blood cell sulfhydryls with arsenate and arsenite. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 46: 379-397.
- Xiong Z-T (1998) Lead uptake and effects on seed germination and plant growth in a Pb hyperaccumulator *Brassica pekinensis* Rupr. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 60: 285-291.
- Yen T-Y, Villa JA, DeWitt JG (1999) Analysis of phytochelatin-cadmium complexes from plant tissue culture using nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry and capillary liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 34: 930-941.
- Yoshimura E, Kobayashi R, Furihata K, Kajiwarra H, Yamazaki S (2000)  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectral assignment of phytochelatin. *Magnetic Resonance in Chemistry* 38: 141-142.
- Zayed A, Lytle CM, Terry N (1998) Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta* 206: 284-292.
- Zeier J (1993) *Biologische Bodensanierung: Illusionen und Realitäten*. Einführungsvorlesung von Prof. Dr. Josef Zeier, Professor für Bodenbiologie an der ETH Zürich. *ETH Zürich* 249: 3-6.
- Zenk MH (1996) Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene* 179: 21-30.
- Zhou JM, Goldsbrough PB (1994) Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6: 875-884.
- Zhou JM, Goldsbrough PB (1995) Structure, organization and expression of the

metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Molecular and General Genetics* 248: 318-328.

Zinoni F, Birkmann A, Leinfelder W & Böck A (1987) Cotranslational insertion of selenocysteine into formate dehydrogenase from *Escherichia coli* directed by a UGA codon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 84: 3156-3160.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. E. Grill, der mir immer mit Ratschlägen zur Seite stand; ich konnte sehr vieles bei ihm lernen.

Eine große Unterstützung war immer Dr. K. Lenzian; ihm gebührt herzlichster Dank.

Allen, die irgendwann im Schwermetall-Labor arbeiteten und mich unterstützten, möchte ich danken; insbesondere gilt mein Dank Irene Pils, Claudia Eltschig, Karin Münch und Irmi Karbach.

Herrn H. Hartl, Anorganische Chemie der LMU München, möchte ich dafür danken, daß er unter der Unzahl von (immer ganz besonders eiligen) AAS-Analysen nicht zusammenbrach.

Herrn B. Cordes und W. Winkler (Organische Chemie, TU München) möchte ich für die massenspektrometrischen Analysen danken.

Meinen Kollegen Yi Yang und Axel Himmelbach möchte ich danken für die Einführung in das Yeast-Two-Hybrid-System.

Es gibt einige, bei denen ich mich dafür bedanken möchte, daß sie mich aufbauen konnten, wenn mal wieder einiges schief lief; dazu gehören insbesondere Carin Hübner und Claudia Deigele.

Die ganz besonders fruchtbare Zeit mit Matjaz Oven im Labor werde ich sicher nie vergessen.  
Hvala lepa!

Schließlich möchte ich denen danken, die mich vor allem während des Zusammenschreibens unterstützten, nämlich meinen Eltern und unserer Katze Blessie.