

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Botanik

Phytochelatinsynthese und
Glutathion-S-Konjugat Abbau in *Saccharomyces cerevisiae*:
Ein Modell für *Arabidopsis thaliana*

Jana Wünschmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. W. Liebl

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. E. Grill
2. Priv.-Doz. Dr. E.J. Glawischnig
3. apl. Prof. Dr. K. Lenzian

Die Dissertation wurde am 17.11.2008 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 08.12.2008
angenommen.

Für meine Familie.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Schwefel- und Glutathion-Metabolismus	1
1.2 Schwermetall-komplexierende Peptide	4
1.2.1 Metallothioneine	5
1.2.2 Phytochelatine	7
1.3 Entgiftung von Xenobiotika	11
1.3.1 Glutathion-S-Konjugate und ihre Detoxifizierung	12
1.4 Die Phytochelatin-Synthase	14
1.5 Zielstellung der Arbeit	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Molekularbiologische Methoden	18
2.1.1 Verwendete <i>Escherichia (E.) coli</i> -Stämme und ihre Kultivierung	18
2.1.2 Methoden für die DNA-Isolation	18
2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	19
2.1.4 Kolonie-PCR	20
2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese	20
2.1.6 Größenstandards	21
2.1.7 Aufreinigung von DNA	21
2.1.8 Bestimmung der DNA-Konzentration mittels λ -DNA	22
2.1.9 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	22
2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten	22
2.1.11 Transformation von <i>E. coli</i> mit rekombinanter DNA	22
2.1.12 Vektoren und Plasmide	23
2.1.13 Klonierungsstrategien	23
2.1.14 Oligonukleotide	25
2.2 Genetische Methoden in <i>S. cerevisiae</i>	28
2.2.1 Verwendete <i>S. cerevisiae</i> Stämme und ihre Kultivierung	28
2.2.2 Minipräparation genomischer DNA aus Hefe	30
2.2.3 Transformation von DNA in <i>S. cerevisiae</i>	31
2.2.4 Herstellung der Hefe-Deletionsmutanten	32
2.2.5 Test des Wachstumsphänotyps von <i>S. cerevisiae</i> („Tüpfeltest“)	33

2.2.6	<i>Markerrescue</i> unter Verwendung des loxP-Cre-Rekombinase-Systems	33
2.2.7	<i>Plasmidrescue</i> aus <i>S. cerevisiae</i>	34
2.3	Physiologische Experimente	35
2.3.1	Belastungsversuche mit Cadmium	35
2.3.2	<i>Pulse-Chase</i> -Versuche mit Monochlorobiman	35
2.4	HPLC-Analyse	36
2.4.1	Herstellung der HPLC-Standards	36
2.4.2	Zellaufschluss	36
2.4.3	<i>Reversed phase – high performance liquid chromatographie</i>	37
2.5	Proteinbiochemische Methoden	39
2.5.1	Proteinextraktion	39
2.5.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	39
2.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.5.4	Verwendete Größenstandards	40
2.5.5	Coomassie-Färbung	41
2.5.6	Western Blot	41
2.5.7	Immunologischer Nachweis	41
2.5.8	Verwendete Antikörper	42
2.6	Fluoreszenzmikroskopie	42
2.6.1	Mikroskop	42
2.6.2	Probenvorbereitung	42
2.6.3	Färbung der Vakuolenmembran mit FM4-64	43
2.7	Geräte und Chemikalien	43
2.7.1	Geräte	43
2.7.2	Chemikalien / Reagenzien	44
2.7.3	Enzyme	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Charakterisierung der Phytochelatin-Biosynthese in <i>S. cerevisiae</i>	45
3.1.1	Die Phytochelatinsynthese <i>in vitro</i>	45
3.1.2	Die Phytochelatinsynthese <i>in vivo</i>	46
3.1.3	Einfluss weiterer Schwermetall-Ionen	52
3.1.4	Abhängigkeit der PC-Synthese von vakuolären Transportern	54
3.2	Der Abbau von Glutathion-S-Konjugaten in <i>S. cerevisiae</i>	58
3.2.1	Monochlorobiman als Modellsubstrat für die Konjugation an Glutathion	58
3.2.2	Charakterisierung des GS-Biman Abbaus	61
3.2.3	Intrazelluläre Verteilung von GS-Biman	72

3.2.4	Sekretion von Biman-Derivaten	73
3.2.5	Charakterisierung von Cis2p	79
3.3	Rekonstruktion von pflanzlichen Stoffwechselwegen in <i>S. cerevisiae</i>	83
3.3.1	Expression von AtPCS1 und AtPCS2 in Hefe	83
3.3.2	Lokalisation von AtPCS1 und AtPCS2 in der Hefe	86
3.3.3	PC-Synthese durch AtPCS1 und AtPCS2 in <i>S. cerevisiae</i>	89
3.3.4	Die Rolle von AtPCS1 und AtPCS2 beim GS-Biman-Abbau	92
3.3.5	Einfluss des C-Terminus von AtPCS1 und AtPCS2 auf die PC-Synthese und den GS-Biman Abbau	97
3.3.6	Charakterisierung von homologen PCS Genen aus Nostoc und Bradyrhizobium	100
4	Diskussion	107
4.1	Die Carboxypeptidasen CPY und CPC sind analog zu Phytochelatin- Synthasen	107
4.2	Funktionelle Divergenz von homologen Phytochelatin-Synthasen	125
	Zusammenfassung	133
	Summary	135
	Literaturverzeichnis	136
	Anhang	163

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>A. thaliana</i> (At)	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>B. japonicum</i> (Bj)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
BFA	Brefeldin A
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cystein
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
CG	Cysteinylglycin
CGase	Cysteinylglycin-Dipeptidase
CPC	Carboxypeptidase C
CPY	Carboxypeptidase Y
C-Terminus	Carboxyterminus
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescence protein</i>
FG	Frischgewicht
GSH	Glutathion
GS-Konjugat(e)	Glutathion-S-Konjugat(e)
GST	Glutathion-S-Transferase
HMW	<i>High molecular weight</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
kDa	Kilodalton
LiAc	Lithiumacetat
LMW	<i>Low molecular weight</i>
MBB	Monobromobiman
MCB	Monochlorobiman

MQH ₂ O	Millipore gefiltertes entionisiertes Wasser
MS	Massenspektrometrie
MT	Metallothionein
<i>Nostoc sp. (Ns)</i>	<i>Nostoc spec</i>
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC _n	Phytochelatine
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PCS	Phytochelatin-Synthase
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
s.	siehe
<i>S. cerevisiae (Sc)</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe (Sp)</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
S-Medium	Minimalmedium
TCA	Trichloressigsäure
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
Vgl.	Vergleich
v/v	Volumenanteil/Volumenanteil
w/v	Gewichtsanteil/Volumenanteil
Wt	Wildtyp
YNB	Yeast Nitrogen Base
γEC	gamma-Glutamylcystein
γ-GT	gamma-Glutamyltranspeptidase

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1	Schwefel- und Glutathion-Metabolismus in <i>S. cerevisiae</i>	1
Abb. 2	Modell für den Glutathion-Abbau in tierischen Zellen	3
Abb. 3	Primärstruktur von PCs und PC-Cd-Komplexen	7
Abb. 4	Entgiftung von Cd ²⁺ -Ionen in Pflanzen und Hefen	9
Abb. 5	Detoxifizierung von GS-Konjugaten in Pflanzen und Tieren	12
Abb. 6	Enzymmechanismen von NsPCS und AtPCS1	16
Abb. 7	Schematische Darstellung für die Deletion eines Gens in <i>S. cerevisiae</i>	32
Abb. 8	Die CPY katalysierte PC ₂ -Synthese <i>in vitro</i>	46
Abb. 9	Vergleich von Wildtyp und Δcpy nach Belastung mit 100 μ M Cd ²⁺	47
Abb. 10	Vergleich von Wildtyp und Δcpy nach Belastung mit variablen Cd ²⁺ -Konzentrationen.	48
Abb. 11	Protein <i>alignment</i> der zwei Carboxypeptidasen CPY und CPC	50
Abb. 12	Einfluss von CPC auf die PC ₂ -Synthese nach Cadmium-Belastung	51
Abb. 13	Abhängigkeit der PC ₂ -Produktion von variablen Cd ²⁺ -Konzentrationen bei Δcpc und $\Delta cpy\Delta cpc$	52
Abb. 14	Wachstumsphänotyp in Abhängigkeit von variablen Konzentrationen an Cadmium, Kupfer und Zink	53
Abb. 15	Vergleich von Wildtyp und $\Delta ycf1$ nach Belastung mit variablen Cd ²⁺ -Konzentrationen	54
Abb. 16	Einfluss der vakuolären Transporter Ycf1p und Bpt1p auf die PC ₂ -Synthese	56
Abb. 17	Reaktion von GSH und Monochlorobiman zu einem fluoreszierenden Glutathion-S-Konjugat	58
Abb. 18	Etablierung der <i>Pulse-Chase</i> Bedingungen	60
Abb. 19	Ablauf der <i>Pulse-Chase</i> Versuche für die Charakterisierung des GS-Biman Abbaus in Hefe	62
Abb. 20	GS-Biman Abbau im Wildtyp	63
Abb. 21	Einfluss von CPY und CPC auf den Abbau von GS-Biman	65
Abb. 22	GS-Biman Abbau in der Doppelmutante für die Carboxypeptidasen	66
Abb. 23	Vergleich der einzelnen Carboxypeptidasen	67
Abb. 24	GS-Biman Abbau nach Verlust der γ -Glutamyltranspeptidase Cis2p	68
Abb. 25	Kombinierter Verlust von Cis2p und CPY bzw. CPC	69
Abb. 26	GS-Biman Abbau in der Dreifachmutante $\Delta cis2\Delta cpy\Delta cpc$	71

Abb. 27	Intrazelluläre Verteilung der GS-Biman Konjugate	72
Abb. 28	Nachweisbare Biman-Derivate im Medium und im Zellrohextrakt	73
Abb. 29	Sekretion von Biman-Derivaten ins Medium	74
Abb. 30	Einfluss der Carboxypeptidasen und der γ -Glutamyltranspeptidase auf die Sekretion von Biman-Derivaten	75
Abb. 31	Aufnahme von GS-Konjugaten aus dem Medium in die Zelle	77
Abb. 32	Einfluss von Brefeldin A und Azid auf die Sekretion von GS-Derivaten	79
Abb. 33	Nachweis zur korrekten Integration der eGFP-Fusionskassette	80
Abb. 34	Abbau von GS-Biman nach der Fusion von Cis2p mit eGFP im Wildtyp	82
Abb. 35	Expression von AtPCS1 und AtPCS2 in Hefe	84
Abb. 36	Einfluss von Cd^{2+} auf die Proteinstabilität von AtPCS1	85
Abb. 37	Lokalisation der eGFP-Fusionsproteine	87
Abb. 38	Einfluss von Cd^{2+} -Ionen auf die Lokalisation	88
Abb. 39	Vergleich der PC-Synthese von AtPCS1 und AtPCS2	90
Abb. 40	PC-Synthese von AtPCS1 und AtPCS2 nach Belastung mit variablen Cd^{2+} -Konzentrationen	91
Abb. 41	γ EC-Biman Bildung nach Expression von AtPCS1	93
Abb. 42	Cadmiumabhängige γ EC-Biman Bildung von AtPCS1	94
Abb. 43	γ EC-Biman Bildung von AtPCS1 in Abhängigkeit von verschiedenen Schwermetallen	95
Abb. 44	γ EC-Biman Bildung von AtPCS2 in Abhängigkeit von verschiedenen Schwermetallen	96
Abb. 45	Einfluss des C-Terminus von AtPCS1 und AtPCS2 auf die PC-Synthese nach Belastung mit variablen Cd^{2+} -Konzentrationen	98
Abb. 46	Rolle der verkürzten Versionen von AtPCS1 und AtPCS2 auf den GS-Biman Abbau in Abhängigkeit von verschiedenen Schwermetallen	99
Abb. 47	Protein <i>alignment</i> von AtPCS1 Δ C, AtPCS2 Δ C, NsPCS und BjPCS	101
Abb. 48	PC-Synthese durch NsPCS und BjPCS	102
Abb. 49	PC-Synthese durch NsPCS nach verlängerter Belastungszeit mit variablen Cd^{2+} -Konzentrationen	103
Abb. 50	γ EC-Biman Bildung durch NsPCS und BjPCS	104
Abb. 51	γ EC-Biman Bildung von NsPCS und BjPCS in Abhängigkeit von variablen Cd^{2+} -Konzentrationen	105
Abb. 52	CdS-Bildung in Wildtyp- und $\Delta ycf1$ -Zellen	113
Abb. 53	Enzymatische Aktivität von CPY und CPC für die PC-Biosynthese und die γ EC-Biman Bildung	117

Abb. 54	Schematische Darstellung des GS-Konjugat Abbaus in tierischen und pflanzlichen Organismen	118
Abb. 55	Modell für die Detoxifizierung von Xenobiotika in <i>S. cerevisiae</i>	124
Abb. 56	Evolutionäre Beziehungen von homologen Phytochelatinsynthesen	125
Abb. 57	Vergleich der PC ₂ -Synthese von AtPCS1ΔC, AtPCS2ΔC und NsPCS	132

1 EINLEITUNG

1.1 Schwefel- und Glutathion-Metabolismus

Schwefel stellt ein essentielles Element für alle Organismen dar. Während der tierische Organismus auf die Zufuhr von schwefelhaltigen Aminosäuren mit der Nahrung angewiesen ist, können Pflanzen, Bakterien und Pilze schwefelhaltige Verbindungen bilden, indem sie Sulfat aus ihrer Umgebung assimilieren. Die Aktivierung und anschließende Reduktion des Sulfats zum Sulfid (Abb. 1) ist die Grundlage für die Biosynthese der Aminosäuren Cystein und Methionin, für Glutathion, für Eisen-Schwefel-Redoxzentren und für Thioredoxine. Je nach Organismus sind zwei Möglichkeiten für die Biosynthese von Cystein bekannt, die im Folgenden näher erläutert werden.

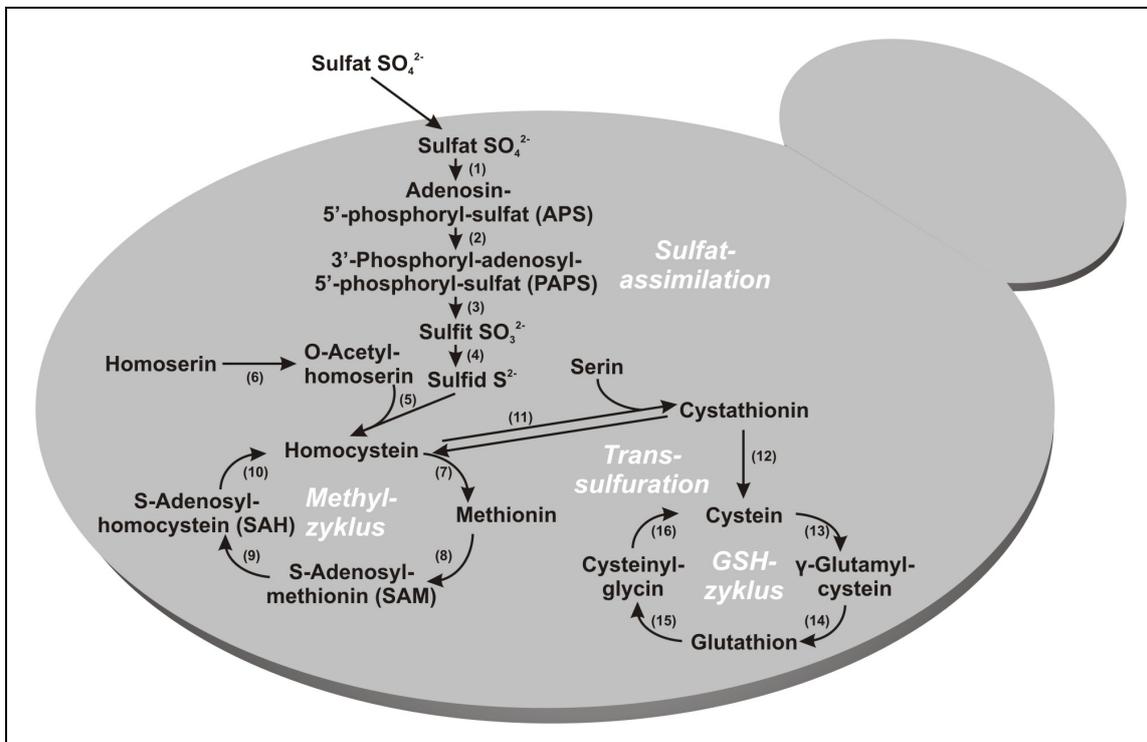


Abb. 1 Schwefel- und Glutathion-Metabolismus in *S. cerevisiae*

Der Schwefelmetabolismus kann in drei Abschnitte unterteilt werden: die Sulfat-Assimilation, der Methyl-Zyklus und die Transsulfuration. Durch letztere erfolgt die Biosynthese von Cystein, welches wiederum als Vorstufe für die Biosynthese von GSH dient. Detaillierte Erläuterungen siehe Text. (1) ATP Sulfurylase (Met3p), (2) APS Kinase (Met14p), (3) PAPS Reduktase (Met16p), (4) Sulfid Reduktase (Met5p, Met10p), (5) O-Acetyl-homoserin Sulfydrylase (Met25p), (6) Homoserin-trans-Acetylase (Met2p), (7) Homocystein-Methyltransferase (Met6p), (8) S-Adenosylmethionin Synthase (Sam1p, Sam2p), (9) S-Adenosylmethionin Demethylase, (10) Adenosylhomocysteinase, (11) Cystathionin β -Synthetase (Cys4), (12) Cystathionin γ -Lyase (Cys3p), (13) γ -Glutamylcystein Synthetase (Gsh1p), (14) Glutathion-Synthetase (Gsh2p), (15) γ -Glutamyltranspeptidase (Cis2p) und (16) Cysteinylglycin Dipeptidase. Abbildung nach Thomas und Surdin-Kerjan (1997).

Pflanzen, *Schizosaccharomyces (S.) pombe* und Enterobakterien wie *Escherichia (E.) coli* und *Salmonella typhimurium* übertragen Sulfid direkt auf O-Acetylserin und bilden dabei Cystein (Soda, 1987; Saito, 2000; Höfgen et al., 2001; Brzywczy et al., 2002; Hell et al., 2002). In *Saccharomyces (S.) cerevisiae* hingegen kondensiert das Sulfid zuerst mit O-Acetylhomoserin, wodurch Homocystein entsteht. Erst nach der Transsulfuration, in der sich Homocystein mit Serin assoziiert, wird Cystathionin gebildet, welches zu Cystein, α -Ketobutyrat und Ammonium dissoziiert (Thomas und Surdin-Kerjan, 1997). Homocystein stellt aber in *S. cerevisiae* nicht nur die Vorstufe für Cystein, sondern auch für die zweite schwefelhaltige Aminosäure Methionin dar. Über den sogenannten Methyl-Zyklus wird durch die Biosynthese von Methionin und S-Adenosylmethionin (SAM) die Voraussetzung für die Biosynthese von Polyamiden, Biotin und fast allen Transmethylierungs-Reaktionen in der Zelle geschaffen (Thomas und Surdin-Kerjan, 1997).

Im Gegensatz zu der Sulfatreduktion ist die Glutathion-Biosynthese in Pflanzen, Hefen und Protisten vergleichbar. Das Tripeptid Glutathion (GSH, ECG, γ -Glu-Cys-Gly, γ -Glutamylcysteinylglycin) wird in zwei aufeinanderfolgenden ATP-abhängigen Reaktionen gebildet (Meister und Anderson, 1983). Im ersten Schritt katalysiert die γ -Glutamylcystein Synthetase (EC 6.3.2.2) die Bildung von γ -Glutamylcystein (γ EC) aus Cystein und Glutamat. Im zweiten Schritt entsteht GSH durch die C-terminale Verknüpfung eines Glycins mit dem γ EC-Dipeptid. Die Reaktion wird von der GSH-Synthetase (EC 6.3.2.3) katalysiert. Die für die GSH-Biosynthese benötigten Aminosäuren Serin und Glycin werden aus 3-Phosphoglycerat gewonnen (Cooper, 1983).

Der Abbau von GSH ist bisher nur im tierischen Organismus genau charakterisiert. Meister identifizierte 1974 den γ -Glutamylzyklus (Abb. 2), welcher für die Hydrolyse von GSH und die Wiederaufnahme der entstandenen Aminosäuren in die Zellen verantwortlich ist (Meister, 1974). Die Abbaureaktionen werden durch die plasmamembran-gebundene γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT) und Cysteinylglycin-Dipeptidase (CGase) katalysiert (Lieberman et al., 1995; Habib et al., 1996; Lieberman et al., 1996; Habib et al., 2003). Die γ -GT überträgt den gebundenen Glutamyl-Rest vom extrazellulären GSH auf Wasser oder andere Aminosäuren, wodurch entweder Glutamat oder γ -Glutamyl-Aminosäuren entstehen (Abb. 2). Das verbleibende Cysteinylglycin- (CG-) Dipeptid des GSH wird an der Zelloberfläche durch eine Dipeptidase zu Cystein und Glycin hydrolysiert. Die gebildeten Aminosäuren gelangen über spezielle Transporter wieder in das Zellinnere. Innerhalb der Zelle konvertiert die

γ -Glutamylcyclotransferase die γ -Glutamyl-Aminosäuren in freie Aminosäuren und 5-oxo-Prolin, welches in einer ATP-abhängigen Reaktion durch die Aktivität der 5-Oxoprolinase zu Glutamat hydrolysiert wird. Aus dem gebildeten Glutamat und dem importieren Cystein und Glycin synthetisieren die γ -Glutamylcystein-Synthetase und die GSH-Synthetase erneut GSH. Die höchsten Aktivitäten für die γ -GT, CGase und 5-Oxoprolinase sind in tierischen Organismen in sekretorischen Geweben, wie Leber und Niere, nachweisbar.

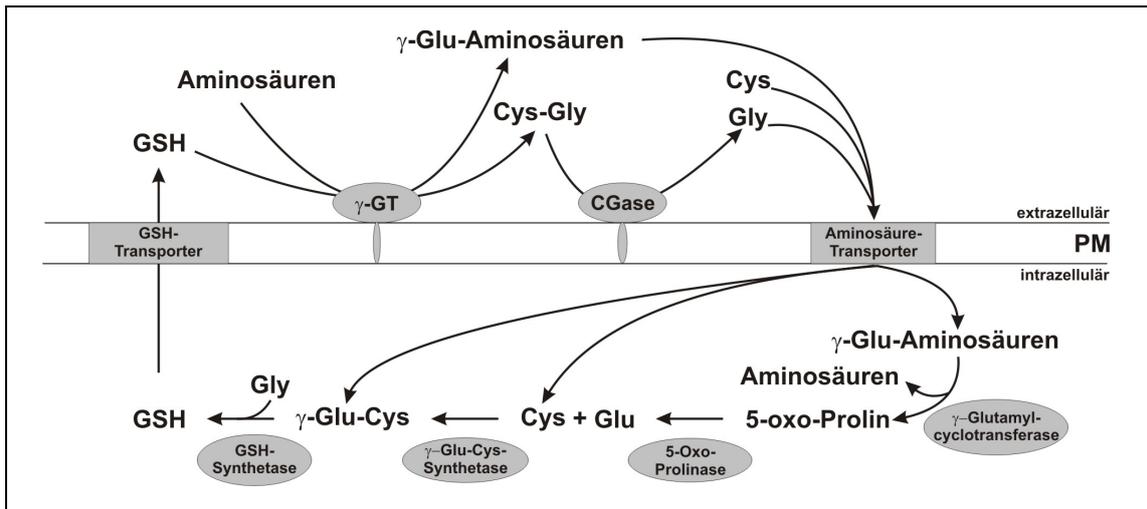


Abb. 2 Modell für den Glutathion-Abbau in tierischen Zellen

Dargestellt ist der γ -Glutamylzyklus in tierischen Zellen. Detaillierte Erläuterung siehe Text (Abbildung nach Martin et al., 2007).

In *A. thaliana* sind drei funktionelle γ -GTs charakterisiert (Grzam et al., 2007; Martin et al., 2007; Ohkama-Ohtsu et al., 2007a; Ohkama-Ohtsu et al., 2007b), die bei der Abwehr von oxidativem Stress, dem Transport von GSH bzw. dem Abbau von Glutathion-S- (GS-) Konjugaten involviert sind. Ein Nachweis für die Beteiligung an der Hydrolyse von GSH konnte bisher nicht erbracht werden. Noch weniger ist über putative CGasen und 5-Oxoprolinasen bekannt. Kürzliche Untersuchungen der 5-oxo-Prolin Biosynthese in *A. thaliana* ließen starke Zweifel an der Relevanz des traditionellen γ -Glutamylzyklus in der Pflanze aufkommen (Ohkama-Ohtsu et al., 2008).

Auch in der Hefe *S. cerevisiae* gibt es keine Hinweise auf einen kompletten γ -Glutamylzyklus (Jaspers et al., 1985). Sequenzvergleiche ergaben nur ein strukturelles Homolog zur γ -GT. Der identifizierte Leserahmen (YLL299w) kodiert für das Protein Cis2, dessen Aktivität für die Hydrolyse von GSH eindeutig belegt werden konnte (Mehdi et al., 2001). Für die Aktivität von γ -Glutamylcyclotransferasen, 5-Oxoprolinasen und CGasen liegen noch keine Befunde vor. Kumar und Mitarbeiter lieferten den genetischen Beweis für einen alternativen Abbauweg des GSH in Hefe

(Kumar et al., 2003). Sie konnten schließlich einen Proteinkomplex aus drei Peptidasen identifizieren (Dug1p-3p), der unabhängig von der γ -GT in der Lage ist, den Abbau von GSH zu katalysieren (Ganguli et al., 2007).

Neben seiner Funktion als Speicher- und Transportmolekül für reduzierten Schwefel übernimmt GSH eine Vielzahl von weiteren Funktionen in der Zelle, die hauptsächlich aus den besonderen strukturellen Eigenschaften des Moleküls hervorgehen. Die γ -Glutamylbindung des Glutamats an das Cystein gewährleistet die hohe intrazelluläre Stabilität von GSH (Meister und Anderson, 1983), wodurch Konzentrationen von bis zu 10 mM erreicht werden können. Des Weiteren machen die hochreaktive Thiol-Gruppe und das sehr niedrige Redox-Potenzial von ca. -240 bis -250 mV GSH zu einem zellulären Redox-Puffer. Indem auf diese Weise der reduzierte Status aufrechterhalten wird, werden funktionelle Thiolgruppen geschützt. Durch die Schwefelgruppe des Cysteins besitzt GSH die Möglichkeit, endogene und exogene Verbindungen zu komplexieren, wodurch beispielsweise Zellschädigungen vermindert werden können. Zu diesen Komponenten gehören unter anderem Schwermetalle und elektrophile Substanzen, wie viele Xenobiotika.

1.2 Schwermetall-komplexierende Peptide

Schwermetalle sind ein essentieller und natürlicher Bestandteil unserer Umwelt. Erosionen, Vulkanaktivitäten und Staubtransport sind natürliche Quellen, um Schwermetalle der Umwelt zuzuführen. Allerdings erfolgt durch industrielle Prozesse wie beispielsweise der Erzaufbereitung, der chemischen Industrie und der Energiegewinnung ein zusätzlicher anthropogener Eintrag von Schwermetallen in Wasser, Boden und Luft. Die angereicherten Metalle im Boden und im Grundwasser werden durch die Wurzeln der Pflanzen aufgenommen und gelangen so in die Nahrungsketten von Mensch und Tier. Da bisher keine einheitliche wissenschaftliche Definition für Schwermetalle vorliegt, gelten häufig alle Elemente mit einer Dichte von mehr als 5 g/cm^3 als Schwermetalle. Zu den toxischen Schwermetallen gehören unter anderem Cadmium, Quecksilber und Blei. Dabei ist die Toxizität häufig nur eine Frage der aufgenommenen Menge und der Verweildauer im Organismus. Viele Schwermetalle besitzen sogar wichtige biologische Funktionen und sind als Bestandteile vieler enzymatischer Cofaktoren essentiell für den Organismus. In geringen Konzentrationen sind diese sogenannten Spurenelemente, wie Eisen, Zink, Kupfer, Mangan und Molybdän unentbehrlich. Eisen wird beispielsweise für Enzyme in Redox-Systemen benötigt, als Bestandteil von Cytochromen, Ferredoxin, Hämoglobin,

Leghämoglobin. Enzyme wie die Alkohol-Dehydrogenase, Kohlensäure-Anhydrase, Superoxid-Dismutase und DNA-bindenden Zinkfinger-Proteine enthalten Zink. Auch Kupfer ist Bestandteil vieler Enzyme wie Ascorbat-Oxidase und Superoxid-Dismutase. Mangan wird hingegen hauptsächlich als Kofaktor von Enzymen benötigt, z.B. im wasserspaltenden Komplex vom Photosystem II. Molybdän ist in Enzymen der N₂-Fixierung und der Nitratreduktion zu finden. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass es sich bei ca. einem Drittel aller strukturell charakterisierten Proteine um Metalloproteine handelt (Finney und O'Halloran, 2003).

Die Aufnahme von essentiellen Schwermetall-Ionen wird durch ein komplexes Homöostase-Netzwerk realisiert und reguliert. Dabei werden die Schwermetalle selektiv in den Organismus aufgenommen und in die einzelnen Organe transportiert, um dort von Zellen aufgenommen und ins Medium sekretiert zu werden. Die Umwandlung in organische Verbindungen oder Metall-Liganden-Komplexe erleichtert die intrazelluläre Kompartimentierung. Die zwei am besten charakterisierten schwermetall-bindenden Liganden sind die Phytochelatine (PCs) und die Metallothioneine (MTs).

1.2.1 Metallothioneine

Metallothioneine (MTs) wurden erstmal vor 50 Jahren als cadmium-bindende Proteine aus der Pferdeniere isoliert und charakterisiert (Margoshes und Vallee, 1957). Seither wurden sie sowohl in Tieren, Pflanzen und Pilzen als auch in einigen Bakterien gefunden. MTs sind Proteine mit einer geringen molekularen Masse (4-14 kDa) und einem hohen Anteil an Cystein-Resten (Kägi et al., 1981; Hamer, 1986; Coyle et al., 2002). Fast alle Cystein-Reste sind in metall-bindenden Domänen arrangiert und stellen Sulfhydryl-Liganden für die Koordination von bivalenten Metall-Ionen dar. Die Klassifizierung der MTs orientiert sich an der Anordnung der Cystein-Reste (Cobbett und Goldsbrough, 2002): MTs der Klasse 1 besitzen 20 hoch konservierte Cysteine, wohingegen die MTs der Klasse 2 keine strenge Anordnung der Cystein-Reste aufweisen. MTs der Klasse 1 sind hauptsächlich bei den Vertebraten verbreitet. Pflanzen, Pilze und Avertebraten weisen eher die MTs der Klasse 2 auf. Die pflanzlichen MTs der Klasse 2 werden weiterhin nach ihrer Aminosäuresequenz in die Klassen MT1-MT4 unterschieden (Cobbett und Goldsbrough, 2002).

Es zeigte sich, dass MTs nicht nur bei der Cadmium-Bindung sondern auch bei der Kupfer- und Zink-Homöostase eine bedeutende Rolle spielen (Palmiter, 1998; Suhy et

al., 1999; Coyle et al., 2002). Die Beteiligung bei der Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies und bei der Kontrolle der Signaltransduktion (Tamai et al., 1993; Palmiter, 1998) sowie die Induzierbarkeit durch andere Metall-Ionen (Hg, Au, Ag, Co, Ni, Bi) und viele weitere Faktoren (z.B. Hormone, Wachstumsfaktoren, Cytokine, Vitamine, Antibiotika, verschiedene Stressbedingungen) verdeutlichen die vielfältigen Funktionen von MTs (Kägi, 1991). Die große Anzahl von orthologen MT-Genen in Säugern und ihre spezifische Induktion deuten darauf hin, dass sie Bestandteil eines ausbalancierten regulatorischen Netzwerks sind. Deren Funktionen sind bis heute nur ansatzweise verstanden.

Erste Analysen der sieben in *A. thaliana* identifizierten MTs zeigten vergleichbare Expressionsmuster innerhalb der Klassen. Mitglieder von MT1 werden hauptsächlich in Wurzeln, MTs der Klasse 2 in Blättern, der Klasse 3 in Früchten bzw. Blättern und MTs der Klasse 4 in Samen exprimiert (Zhou und Goldsbrough, 1994; Hsieh et al., 1995; Zhou und Goldsbrough, 1995; Hsieh et al., 1996; Guo et al., 2003). Allerdings wird die Expression der MT-RNA durch unterschiedliche Faktoren induziert (Rauser, 1999), die insgesamt keinen klaren Rückschluss auf die Funktion der MTs zulassen. Für *A. thaliana* ließ sich zeigen, dass die MTs aller Klassen nach Expression in Hefe zu einer erhöhten Cu^{2+} -Toleranz führten. Für MTs der Klasse 1 konnte die Beteiligung an der Kupfer-Homöostase vermutet werden, wohingegen die MTs der Klasse 4 in einer erhöhten Zink-Toleranz und Zink-Akkumulation resultierten (Guo et al., 2008). Die Bindung von Cu^{2+} -, Zn^{2+} - und Cd^{2+} -Ionen an MTs von *Quercus suber* konnte erst kürzlich *in vivo* bestätigt werden (Domènech et al., 2006; Domènech et al., 2007).

Die Hefe *S. cerevisiae* besitzt eine MT Familie aus etwa 15 Kopien des *CUP1* Gens und einer Kopie von *CRS5* (Fogel und Welch, 1982; Culotta et al., 1994). Der Verlust von *CUP1* führt zu einer Hypersensitivität gegenüber hohen Kupfer-Konzentrationen (Hamer et al., 1985). Strukturanalysen von Cup1p zeigten die Koordination von sechs bis acht Cu(I)-Ionen im Cu-S-Cluster durch zehn der 12 Cystein-Reste (Hamer et al., 1985). Die Komplexierung von acht Cu^+ -Ionen gewährleistet die höchste Stabilität vor dem proteolytischen Abbau des Proteins (Winge et al., 1985; Byrd et al., 1988). Cup1p ist aber auch in der Lage, Cd^{2+} -, Zn^{2+} - und Ag^+ -Ionen *in vitro* zu binden (Winge et al., 1985). Crs5p zeigt nur geringe Sequenzhomologien zu Cup1p, obwohl es alle Eigenschaften von eukaryotischen MTs aufweist (Culotta et al., 1994). Die Komplexierung von Cu^+ -Ionen durch Crs5p resultierte im Vergleich zu Cup1p in kinetisch labileren Komplexen (Jensen et al., 1996), wohingegen Cd^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen

zu stabileren Komplexen führten (Pagani et al., 2007). Vermutlich agiert Crs5p als Regulator des komplexen Metall-Homöostase-Netzwerkes in der Hefe.

1.2.2 Phytochelatine

Phytochelatine (PCs) sind cysteinreiche Peptide, die keine strukturellen Ähnlichkeiten zu MTs aufweisen. Hayashi entdeckte diese Peptide erstmals in *Schizosaccharomyces (S.) pombe* und nannte sie „Cadystine“ (Murasugi et al., 1981). Unabhängig davon identifizierten Grill und Mitarbeiter die gleichen Peptide in Zellen von *Rauvolfia (R.) serpentina* nach Belastung mit Cd^{2+} -Ionen und nannten sie „Phytochelatine“ (Grill et al., 1985). Es zeigte sich, dass diese Peptide aus alternierenden 2-11 Glu-Cys-Einheiten aufgebaut sind mit einem carboxyterminalen Glycin (Abb. 3A). Dabei bilden die Glutamatreste an der γ -Carboxygruppe die Peptidbindung zum Cystein aus, wie es von dem Tripeptid GSH bekannt ist. Anfänglich wurden PCs als funktionelles Analog zu MTs betrachtet, wobei die schwermetall-komplexierenden Peptide in die tier-spezifischen MTs und die pflanzen-spezifischen PCs unterteilt wurden. Als die ersten MTs in Pflanzen charakterisiert und Mikroorganismen sowohl mit PCs als auch mit MTs identifiziert wurden, änderte man die Bezeichnung in „nicht-tierische“ PCs um (Cobbett und Goldsbrough, 2002). Erst mit der Identifizierung und Charakterisierung der PC-Synthase (EC 2.3.2.15; Grill et al., 1989; Vatamaniuk et al., 2000) wurden weitere funktionelle Homologe auch im Tierreich entdeckt. Obwohl die Bezeichnung dieser schwermetall-komplexierenden Peptide nicht mehr eindeutig den Pflanzen zugeordnet werden kann, hat sich der Begriff „Phytochelatine“ im Laufe der Zeit in der Literatur durchgesetzt.

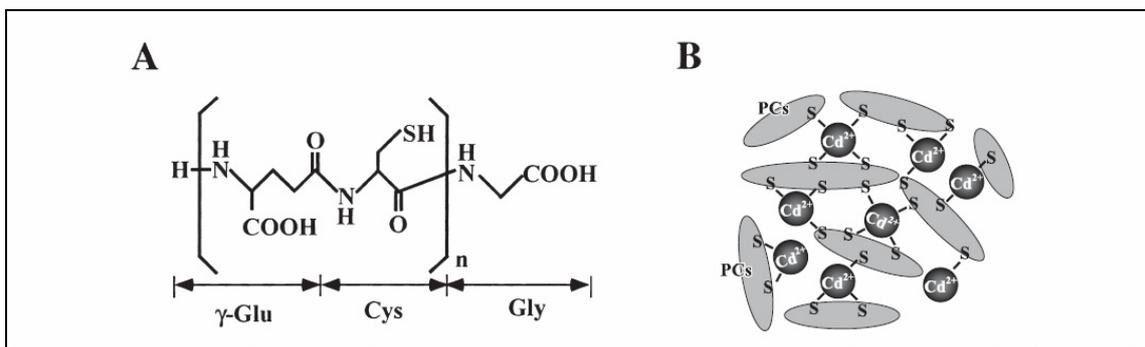


Abb. 3 Primärstruktur von PCs und PC-Cd-Komplexen

Die Struktur von PCs (A) lautet im allgemeinen $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, wobei $n=2-11$. Schwermetall-Ionen wie beispielsweise Cd^{2+} werden durch ein, zwei, drei oder maximal vier Schwefelatome von einem oder mehreren PC-Molekülen in den sogenannten PC-Cd-Komplexen (B) gebunden (Hirata et al., 2005).

PCs und strukturell verwandte PCs konnten in allen untersuchten höheren Pflanzen (Bryophyta, Pteridophyta und Spermatophyta) (Grill et al., 1987; Gekeler et al., 1989), in photosynthetisierenden Protisten (Euglenophyta, Dinophyta, Haptophyta, Heterokontophyta, Chlorophyta, Rhodophyta), in Pilzen (Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes) und in Oomyceten (heterotrophe Heterokontophyta) nachgewiesen werden (Kondo et al., 1984; Gekeler et al., 1988; Kneer und Zenk, 1992; Ahner et al., 1994). Auch in den Zellen der Hefe *S. cerevisiae* existieren neben MTs noch geringe Konzentrationen an PCs (Kneer et al., 1992). In einigen Organismen konnten auch leicht veränderte Peptide beobachtet werden. Beispielsweise wurden sogenannte des-Gly Varianten in *S. pombe* (Hayashi et al., 1991a) und *Candida (C.) glabrata* (Mehra et al., 1988) gefunden. Obwohl diese Art der PCs kaum in höheren Pflanzen verbreitet ist, waren in *Zea mays* nach Behandlung mit Cd^{2+} -Ionen beträchtliche Mengen davon nachweisbar (Bernhard und Kägi, 1987). Andere Varianten in Pflanzen unterscheiden sich in der carboxyterminalen Aminosäure der γ -Glu-Cys Wiederholungen. Das $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ala}$ Peptid wurden erstmals aus Fabaceen (Phaseoleae) isoliert und als Homo-Phytochelatin (hPC) bezeichnet (Grill et al., 1986; Klapheck et al., 1995). In Poaceen ließen sich hydroxymethyl-Phytochelatine belegen, die ein carboxyterminales Serin aufweisen (Klapheck et al., 1994). Die sogenannten iso-PCs besitzen am Carboxyterminus entweder ein Glutamat wie in *Zea mays* (Meuwly et al., 1993) oder ein Glutamin wie im Meerrettich (*Armoracia rusticana*) (Kubota et al., 2000).

Cd^{2+} -Ionen sind nicht limitierend für die Bildung von PC-Komplexen *in vivo*. In Zellsuspensionskulturen von *R. serpentina* waren Phytochelatine nach Zugabe von Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Sb^{3+} , Ag^+ , Hg^{2+} , As^{5-} , Cu^+ , Sn^{2+} , Au^{3+} und Bi^{3+} nachweisbar (Grill et al., 1987), wobei Cd^{2+} die stärkste Induktion hervorrief. Anhand von Gelfiltrationen ließen sich die PC-Komplexen aus Pflanzen (Grill et al., 1985) und aus Hefen (Reese und Winge, 1988) näher charakterisieren. Zumeist wurden zwei verschiedene Komplexe identifiziert. Der LMW (*low molecular weight*) Komplex besteht hauptsächlich aus PC_3 bei einer Stöchiometrie SH:Cd von 3:1. Der HMW (*high molecular weight*) Komplex hingegen weist hauptsächlich PC_4 und längere PCs bei einer Stöchiometrie SH:Cd von 1,5:1 auf und enthält zudem Sulfid (Abb. 4). Allerdings bestehen die Komplexe wohl immer aus einer Mischung von Phytochelatinen verschiedener Längen (Abb. 3B), wobei die Bindungsstärke mit zunehmender PC-Länge steigt. Bisher konnten *in vivo* PC-Komplexe mit Cadmium, Kupfer und Arsen charakterisiert werden (Maitani et al., 1996; Schmöger et al., 2000)

Die Kompartimentierung von Schwermetallen innerhalb der Zelle stellt den wichtigsten Mechanismus in der Metall-Homöostase und -Entgiftung dar. Dabei repräsentiert die Vakuole das zentrale Speicherkompartiment. Schwermetall-Ionen wie beispielsweise Cadmium gelangen entweder als freie Ionen (Cd^{2+}) oder gebunden an Thiol-Komponenten (GSH oder PCs) in die Vakuole (Ortiz et al., 1995; Salt und Rauser, 1995; Li et al., 1997). In *S. pombe* werden PCs und PC-Cd-Komplexe über den ABC-(ATP-binding cassette) Transporter Hmt1p in die Vakuole transportiert (Abb. 4) (Ortiz et al., 1992; Ortiz et al., 1995). Hmt1p ist verwandt mit den *multi-drug resistance* Proteinen (MRPs), die u.a. an der Entgiftung von Xenobiotika beteiligt sind. Obwohl der Verlust von *HMT1* in einer Cd^{2+} -Hypersensitivität resultiert, kann die Expression des Gens nicht durch Cd^{2+} induziert werden (Ortiz et al., 1995).

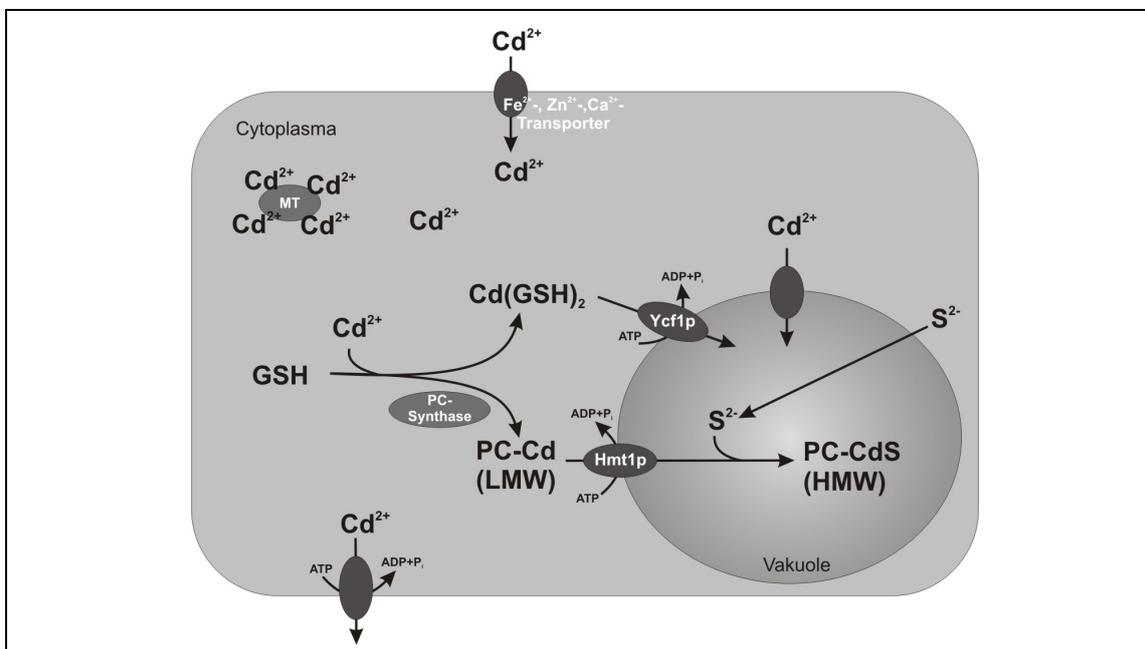


Abb. 4 Entgiftung von Cd^{2+} -Ionen in Pflanzen und Hefen

Nach der Komplexierung von Cd^{2+} an GSH bzw. PC erfolgt der Transport über ABC-Transporter in die Vakuole (Hmt1p bei *S. pombe*, Ycf1p bei *S. cerevisiae*). In der Vakuole werden unter Addition von Sulfid aus den PC-Cd-Komplexen HMW Komplexe gebildet. Der direkte Import von Cd^{2+} -Ionen in die Vakuole kann durch CDF-Proteine oder Kationen/ H^+ -Antiporter erfolgen. Weitere Möglichkeiten der Cd^{2+} -Detoxifizierung sind in der Komplexierung durch MTs und dem gerichteten Efflux durch P-Typ ATPasen zu sehen. Für Referenzen siehe Text.

In *S. cerevisiae* erfolgt die Kompartimentierung der Cd^{2+} -Ionen in Form von Cd-Bisglutathion ($\text{Cd}(\text{GSH})_2$) durch den Transporter Ycf1p (Abb. 4; Li et al., 1996; Li et al., 1997). Dieser vakuoläre ABC-Transporter weist sowohl Ähnlichkeiten zu MRPs als auch zu Hmt1p auf. Die Expression von *YCF1* lässt sich im Gegensatz zu *HMT1* durch Cd^{2+} -Ionen induzieren (Vido et al., 2001). Allerdings gibt es keine Hinweise auf den Transport von PCs, wohingegen eine Affinität für GS-Konjugate bestätigt werden konnte (Li et al., 1997). Ein weiteres MRP Homolog in der Hefe ist der vakuoläre ABC-

Transporter Bpt1p (Petrovic et al., 2000; Sharma et al., 2002), der ebenso wie Ycf1p am Transport von GS-Konjugaten und an der Entgiftung von Cd^{2+} -Ionen beteiligt ist (Klein et al., 2002; Sharma et al., 2002). In Pflanzen werden die PCs gezielt durch den Tonoplasten in die Vakuole transportiert (Salt und Rauser, 1995). Insgesamt konnten im Genom von *A. thaliana* 120 Gene identifiziert werden, die für ABC-Transporter kodieren (Garcia et al., 2004). Allerdings ist von den meisten weder das Substrat noch die Funktion bekannt (Gaillard et al., 2008). 15 dieser Proteine konnten der Gruppe der MRPs zugeordnet werden (Martinoia et al., 2002), von denen bisher sieben Mitglieder analysiert wurden (AtMRP1-AtMRP7). Für drei Proteine (AtMRP1-3) ließ sich die Spezifität für GS-Konjugate nachweisen (Lu et al., 1997; Lu et al., 1998). AtMRP3, 6 und 7 sind zwar Teil eines Cadmium-regulierten Gen-Clusters, aber es fehlen die experimentellen Nachweise für den Transport von Cd^{2+} -Ionen (Gaillard et al., 2008).

Am Transport von Cd^{2+} durch Zellmembranen sind noch fünf weitere Transporter-Klassen beteiligt (Mendoza-Cozatl et al., 2005):

- CDF-Proteine (*cation diffusion facilitator family* oder *cation efflux family*),
- Kationen/ H^+ -Antiporter,
- Nramp (*neutral resistance-associated macrophage protein*),
- ZIP (ZRT, IRT-ähnliche Proteine) und
- CPx-Typ ATPasen.

In *S. cerevisiae* erfolgt die Cd^{2+} -Aufnahme in die Zelle zum einen durch die Zink-Transporter Zrt1p-Zrt3p der ZIP-Klasse (MacDiarmid et al., 2000) und zum anderen durch Transporter der Nramp-Klasse (Smf1p, Smf2p (Liu et al., 1997)). Der Transport in die Vakuole erfolgt hingegen meist über Proteine der CDF-Gruppe (Zrc1p und Cot1p; MacDiarmid et al., 2000). Auch in Pflanzen ist ein Großteil der genannten Transporter-Klassen an der Sequestrierung von Cd^{2+} -Ionen beteiligt (Mäser et al., 2001). Bisher gelang es nur für die Kationen/ H^+ Antiporter CAX2 und CAX4, sowohl die Lokalisation in der Vakuolenmembran als auch den Transport von Cd^{2+} -Ionen in die Vakuole zu belegen (Korenkov et al., 2007a; Korenkov et al., 2007b).

Der aktive Efflux von Metall-Ionen ist der wichtigste Toleranzmechanismus in Bakterien (Silver, 1996). P-Typ ATPasen vermitteln den spezifischen Transport von Cu^{2+} -, Ag^+ -, Zn^{2+} -, Co^{2+} -, Pb^{2+} - und/oder Cd^{2+} -Ionen aus der Zelle (Solioz und Vulpe, 1996; Axelsen und Palmgren, 2001). Die P-Typ ATPase Pca2p reguliert in *S. cerevisiae* beispielsweise den intrazellulären Cd^{2+} -Gehalt durch den verstärkten Efflux von Cd^{2+} -Ionen (Adele et al., 2007). Auch kupfer-spezifische P-Typ ATPasen konnten bereits in

Eukaryonten gefunden werden (Solioz und Vulpe, 1996; Axelsen und Palmgren, 2001). In Pflanzen misslang bisher der positive Nachweis einer derartigen Aktivität. Mills und Mitarbeiter lieferten zwar erste Hinweise nach Expression von *AtHMA4* in Hefe, allerdings konnten die Ergebnisse nicht reproduziert werden (Mills et al., 2003; Bernard et al., 2004).

1.3 Entgiftung von Xenobiotika

Neben den lebensnotwendigen Verbindungen nimmt jeder Organismus auch eine Vielzahl an nicht verwertbaren Stoffen auf (Fremdstoffe, Xenobiotika), die einen natürlichen oder anthropogenen Ursprung aufweisen können. Dazu zählen u.a. Herbizide, Pestizide, Antibiotika und Drogen. Um Anreicherungen in den Zellen zu vermeiden, unterliegen die meist lipophilen Substanzen einer Biotransformation, wodurch eine schnelle Sekretion der Zellgifte realisiert werden kann. Der Metabolismus von Fremdstoffen wird üblicherweise in drei Phasen eingeteilt (Ishikawa, 1992; Sandermann, 1992). In der ersten Phase wird der Fremdstoff aktiviert. Daran schließt sich oftmals die Addition zelleigener, niedermolekularer Verbindungen an (Phase 2), bevor in Phase 3 Kompartimentierungs- oder Speicherprozesse ablaufen.

In Phase 1 kommt es zu einer Funktionalisierung der Xenobiotika durch Oxidation, Reduktion, Hydrolyse oder Dehalogenierung. In den meisten Fällen wird durch das Einführen einer funktionellen Gruppe wie -OH, -NH₂, -SH oder -COOH die Toxizität der Verbindungen reduziert und die Löslichkeit erhöht. Die wichtigsten Enzyme dafür stellen die Cytochrom p450 Monooxygenasen (EC 1.14) dar. Diese Häm-Proteine enthalten ein Fe-Protoporphyrin IX als prosthetische Gruppe und sind ubiquitär in Bakterien, Pflanzen und Tieren verbreitet. Für eine effiziente Detoxifizierung bedarf es meist erst der Aktivierung der Fremdstoffe in Phase 1, um sie für die weitere Metabolisierung in Phase 2 zugänglich zu machen.

In Phase 2 werden die Xenobiotika an körpereigene, wasserlösliche Metabolite gekoppelt. Dies erfolgt beispielsweise durch Glucuronidierung, Sulfatierung, Acetylierung, GSH- und Aminosäure-Konjugation und Methylierung. Die Reaktionen werden durch entsprechende Transferasen katalysiert. Die erhaltenen Konjugate sind entweder nicht mehr oder nur noch gering toxisch für die Zelle. Substanzen, die funktionelle Gruppen besitzen, die der Katalyse der Phase 2 - Enzyme zugänglich sind, werden in Phase 1 nicht verändert, sondern gleich in die Phase 2 geleitet.

In der Phase 3 findet entweder die Einlagerung oder die Sekretion der gebildeten Konjugate statt. Während in tierischen Zellen die konjugierten Xenobiotika direkt über die Niere oder die Gallenflüssigkeit aus der Zelle ausgeschieden werden, spricht man in den pflanzlichen Zellen nur von einer lokalen Ausscheidung. Die löslichen Konjugate akkumulieren in der Vakuole, wohingegen die unlöslichen Konjugate (gekoppelt mit Lignin, Stärke, Pektin oder anderen Polysacchariden) über Exozytose aus den Zellen gelangen und im Apoplasten oder in der Zellwand akkumulieren (Sandermann, 1994).

1.3.1 Glutathion-S-Konjugate und ihre Detoxifizierung

Eine Möglichkeit Xenobiotika zu entgiften, ist die Kopplungsreaktion mit GSH, katalysiert durch Glutathion-S-Transferasen (GST, EC 2.5.1.18). Die Superfamilie der GST ist sowohl cytoplasmatisch als auch mitochondrial und mikrosomal lokalisiert und ubiquitär verbreitet (Hayes et al., 2005). Bei der Kopplungsreaktion liefert das GSH - mit der freien SH-Gruppe des Cysteins - den nukleophilen Angriffspunkt für die Thioetherbindung mit den elektrophilen Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Schwefelatomen des Xenobiotikums. Es entstehen die sogenannten Glutathion-S- (GS-) Konjugate, die zumindest in tierischen Zellen entweder über den Mercaptursäureweg entgiftet (Abb. 5) oder direkt aus der Zelle sekretiert werden (Inoue et al., 1982; Ishikawa et al., 1997).

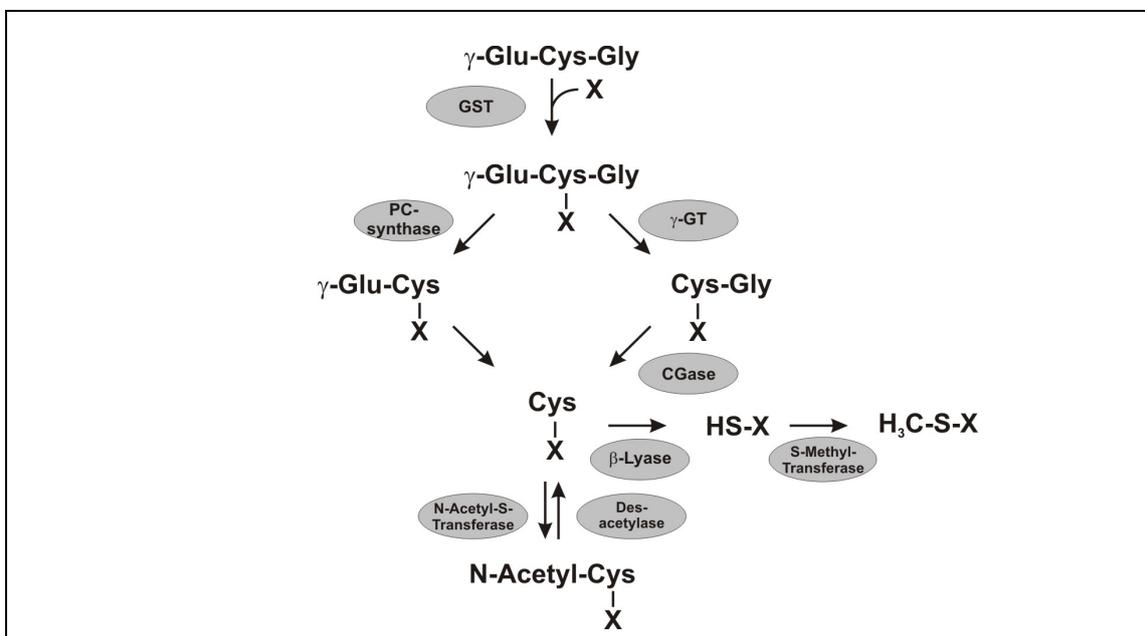


Abb. 5 Detoxifizierung von GS-Konjugaten in Pflanzen und Tieren

Glutathion-S-Transferasen (GSTs) katalysieren die Konjugation von GSH an elektrophile Xenobiotika (X) unter Bildung von GS-Konjugaten. Der Abbau der Komplexe erfolgt in tierischen Zellen in aufeinanderfolgenden Reaktionen durch die γ-GT und die CGase. In Pflanzen findet ein alternativer Abbau über die PC-Synthase statt. Die verbleibenden Cystein-S-Konjugate werden entweder zu Mercaptursäuren umgebaut und ausgeschieden oder unterliegen einer Bioaktivierung zu freien Thiolen.

Im weiteren Entgiftungsprozess stellen die gebildeten Konjugate vorerst das Substrat für die membranständige γ -GT dar. Die Abspaltung des N-terminalen Glutamats führt zur Bildung des S-substituierten Cysteinylglycin- (CG-) Dipeptids (Hinchman und Ballatori, 1990). Membranständige CGasen oder die Aminopeptidase M sind für den Verlust des C-terminalen Glycins verantwortlich (Hughey et al., 1978; Kozak und Tate, 1982). Die N-Acetyl-Transferase vermittelt im Anschluss unter Verbrauch von Acetyl-CoA die Bildung von N-acetylierten Cystein-S-Konjugaten, den sogenannten Mercaptursäuren. Diese sind weniger toxisch und hydrophiler als die Ausgangsverbindungen, was ihre Ausschleusung aus der Zelle erleichtert (Inoue et al., 1981; Lock et al., 1986). Allerdings existiert zu der zuletzt beschriebenen Reaktion auch noch eine Konkurrenzreaktion. Die Hydrolyse der Cystein-S-Konjugate durch die β -Lyase führt zu einer Bioaktivierung (Toxifizierung) der Verbindungen (Cooper und Pinto, 2006). Die entstandenen freien Thiole weisen eine höhere Lipophilie auf und können erneut als Zellgifte wirken. Die physiologische Relevanz dieser Reaktion wird in der Literatur intensiv diskutiert (Cooper und Pinto, 2006).

In Pflanzen konnte neben dem Abbau von GS-Konjugaten über die γ -GT (Grzam et al., 2007; Ohkama-Ohtsu et al., 2007b) noch ein alternativer Abbauweg über die PC-Synthase (PCS) identifiziert werden (Beck et al., 2003; Blum et al., 2007). Dabei katalysiert die PCS die C-terminale Abspaltung des Glycins unter Freigabe des S-substituierten γ -Glutamylcystein- (γ EC-) Dipeptids (Beck et al., 2003; Blum et al., 2007). Die katalytische Aktivität für die weitere Prozessierung zum Cystein-S-Konjugat ist noch unbekannt. Ebenso fehlen über die Enzyme für den weiteren Abbau der Cystein-Konjugate entsprechende Nachweise. Untersuchungen mit Herbiziden lieferten erste Hinweise, dass die Konjugate in Pflanzen eher einer Malonylierung als einer Acetylierung unterliegen (Lamoureaux und Rusness, 1993; Onisko et al., 1994). In Brassica Arten ließen sich auch Enzyme mit C-S Lyase und S-Methyltransferase Aktivität nachweisen, deren Rolle in der Umwandlung von endogenen Sekundärmetaboliten gesehen wird (Kiddle et al., 1999; Coiner et al., 2006).

Anhand der vorliegenden Befunde ist der Abbau von GS-Konjugaten über den Mercaptursäureweg auch in der Hefe *S. cerevisiae* zu vermuten. Ubiyovk und Mitarbeiter zeigten die Beteiligung des einzigen Proteins mit γ -GT Aktivität (Cis2p) an der Abspaltung des N-terminalen Glutamats von GS-Konjugaten (Ubiyovk et al., 2006). Allerdings kann über die weitere Prozessierung der Komplexe nur spekuliert werden, da experimentelle Daten für beispielsweise membranständige Dipeptidasen fehlen (Mehdi et al., 2001; Adamis et al., 2008).

1.4 Die Phytochelatin-Synthase

Die Hypersensitivität von *A. thaliana*-Mutanten (*cad1*, *cad2*) gegenüber Cd^{2+} wurde erstmals 1995 mit einem fehlenden PC-Spiegel in Verbindung gebracht (Howden et al., 1995a; Howden et al., 1995b). Fünf Jahre später identifizierten drei Gruppen unabhängig voneinander das für die PC-Synthese verantwortliche Gen – die PC-Synthase (PCS) – aus Weizen (*Triticum aestivum*, GenBank Acc.No. AF093752), *S. pombe* (GenBank Acc.No. Z68144) und *A. thaliana* (GenBank Acc.No. AF135155) (Clemens et al., 1999; Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999). Anhand von Deletionsmutanten und nach heterologer Expression der Gene in Hefe ließ sich die physiologische Rolle der PCS für die Entgiftung von Schwermetallen durch die Biosynthese von PCs bestätigen (für Details siehe Clemens, 2006). Dabei konnte sowohl die Beteiligung von Cadmium als auch von Arsen, Quecksilber und Kupfer belegt werden (Ha et al., 1999; Wysocki et al., 2003; Clemens, 2006).

Die PCS1 aus *A. thaliana* (*AtPCS1*; At5g44070) weist eine cytoplasmatische Lokalisation auf (R. Blum, persönliche Mitteilung) und wird konstitutiv in der Pflanze exprimiert. Transkriptionsanalysen ergaben eine Cd^{2+} -abhängige Regulation der Expression in den frühen Entwicklungsphasen der Pflanze (Lee und Korban, 2002). Die Aktivität von *AtPCS1* kann durch Schwermetall-Ionen direkt beeinflusst werden (Vatamaniuk et al., 2000). Nach Expression in heterologen Hefe-Systemen konnte eine erhöhte Schwermetall-Toleranz und die Biosynthese von PCs nachgewiesen werden. Des Weiteren ließ sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Beteiligung von *AtPCS1* am Abbau von GS-Konjugaten nachweisen (Beck et al., 2003; Grzam et al., 2006; Blum et al., 2007). Auch diese enzymatische Aktivität der PCS konnte durch die Zugabe von Schwermetall-Ionen verstärkt werden (Beck et al., 2003; Grzam et al., 2006; Blum et al., 2007). Zusätzlich zu dem *AtPCS1* Gen gelang es ein zweites PCS Gen im Genom von *A. thaliana* zu identifizieren (*AtPCS2*, At1g03980). Dieses unterliegt genau wie *AtPCS1* einer konstitutiven Expression, allerdings deutlich schwächer (Cazale und Clemens, 2001; Lee und Kang, 2005). Nach Lee und Mitarbeiter ist die geringe Expression auf eine schwache Promotoraktivität und eine geringe Translationseffizienz der *AtPCS2* mRNA zurückzuführen (Lee und Kang, 2005). Die Überexpression von *AtPCS2* unter dem 35S-Promotor in *A. thaliana* führte zu keiner vollständigen Komplementation einer *AtPCS1*-Mutanten (*cad1-3*) (Lee und Kang, 2005). Dabei kann von der Funktionalität des Proteins als PCS ausgegangen werden (Cazale und Clemens, 2001).

Mittlerweile konnte die kodierende Sequenz für die PCS nicht nur in allen höheren Pflanzen, einigen Pilzen und Algen, sondern auch in Nematoden gefunden werden (Clemens et al., 2001). Dabei ist die hohe Konservierung des N-terminalen Bereichs auffällig, während der C-Terminus starke Abweichungen in der Aminosäuresequenz aufweist. Datenbank-gestützte Analysen zeigten zudem PCS-ähnliche Sequenzen in einigen Prokaryoten (Harada et al., 2004; Tsuji et al., 2005). Interessant ist, dass alle prokaryotischen PCS Homologe nur halb so groß sind wie ihre eukaryotischen Verwandten (220-237 Basenpaare im Vergleich zu 421-506 Basenpaare) (Rea, 2006). Im direkten Vergleich besitzen sie nur den konservierten N-terminalen Bereich, wohingegen der variable C-Terminus fehlt.

Eines dieser prokaryotischen PCS-Homologen ist das alr0975 Protein von *Nostoc spec.* PCC 7120 (NsPCS). Es besteht aus 242 Aminosäuren, die eine 34% Übereinstimmung mit dem N-Terminus von AtPCS1 aufweisen (Abb. 6). Anhand von *in vitro* Analysen konnte für NsPCS die Abspaltung des C-terminalen Glycins von GSH und die Biosynthese von geringen Mengen an PC₂ gezeigt werden (Tsuji et al., 2005). Erst kürzlich gelang die Kristallisation der nativen und der γ -Glu-Cys-acylierten Form des Proteins (Vivares et al., 2005). Anhand dieser Ergebnisse bestätigte sich, dass die PCS zu der Superfamilie der Papaine gehört und eine ähnliche katalytische Aktivität wie Cystein-Proteasen aufweist (Vatamaniuk et al., 2004).

Die PC-Synthese lässt sich in zwei Schritte unterteilen. In der ersten – schwermetall-unabhängigen – Phase wird von GSH das C-terminale Glycin abgespalten. Das entstandene γ -Glu-Cys Dipeptid wird im zweiten – schwermetall-abhängigen – Schritt auf das Akzeptormolekül GSH bzw. auf bereits synthetisierte PCs übertragen (Abb. 6). Die PCS übernimmt die Funktion einer Dipeptidyltransferase (Grill et al., 1989). Das Enzym weist zwei Substratbindestellen auf (Abb. 6) (Vatamaniuk et al., 2000). Für die erste Acylierung konnte das Cys⁵⁶ im N-Terminus von AtPCS1 bestimmt werden (Vatamaniuk et al., 2004). Für die genaue Position der zweiten Acylierung, die nur in Anwesenheit von Schwermetallen beobachtet werden kann, gibt es bisher keine Hinweise. Vermutlich befindet sie sich entweder im C-Terminus oder an einer zweiten Stelle im N-Terminus, welche aber die Gegenwart des C-Terminus benötigt (Romanyuk et al., 2006).

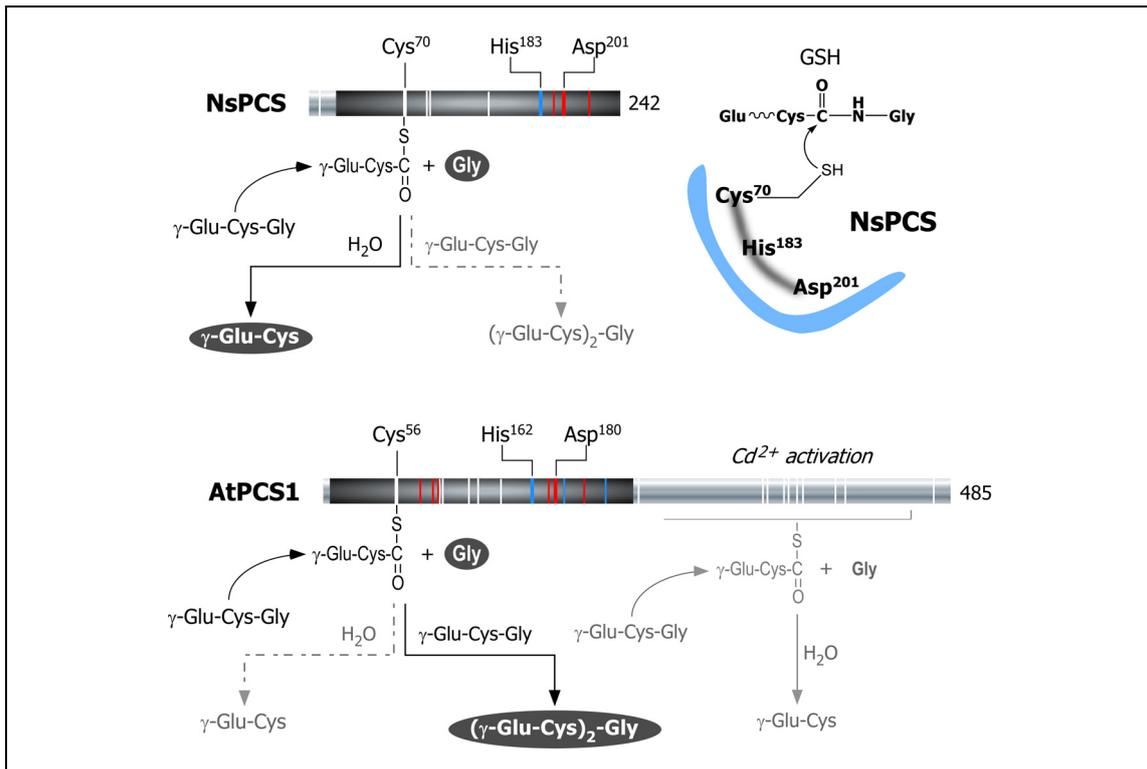


Abb. 6 Enzymmechanismen von NsPCS und AtPCS1

Die Position der Cystein-, Histidin- und Aspartat-Reste sind mit Hilfe von vertikalen Balken in weiß, blau bzw. rot dargestellt. Die katalytische Triade wird in AtPCS1 durch die Aminosäuren Cys⁵⁶, His¹⁶² und Asp¹⁸⁰ gebildet und stimmt mit den Resten Cys⁷⁰, His¹⁸³ und Asp²⁰¹ von NsPCS überein. NsPCS favorisiert nach der Abspaltung von Glycin die Bildung von freiem γ -Glu-Cys gegenüber der Transpeptidierung zu PC₂ ((γ -Glu-Cys)₂-Gly). AtPCS1 hingegen bevorzugt deutlich die PC₂-Synthese. Während NsPCS nur an einer Stelle acyliert wird, unterliegt AtPCS1 der Acylierung an zwei Stellen. Die Position der zweiten Acylierung ist bisher unbekannt (Rea, 2006).

Durch gerichtete Mutation und durch den Vergleich mit der Kristallstruktur von NsPCS ließ sich die, für Cystein-Proteasen typische, katalytische Triade identifizieren (Romanyuk et al., 2006). Wie bereits vermutet, handelt es sich dabei um Cys⁵⁶, His¹⁶² und Asp¹⁸⁰ bei AtPCS1 und um Cys⁷⁰, His¹⁸³ und Asp²⁰¹ bei NsPCS (Abb. 6) (Vivares et al., 2005). Alle katalytisch wichtigen Aminosäuren befinden sich im N-terminalen Bereich der PCS, wohingegen dem C-Terminus noch keine klare Funktion zugesprochen werden kann. C-terminal verkürzte Versionen von AtPCS1 zeigten eine verminderte Cd²⁺-Toleranz und geringere PC-Syntheseraten (Romanyuk et al., 2006).

1.5 Zielstellung der Arbeit

Die Komplexität von pflanzlichen Organismen erschwert die Identifizierung und Charakterisierung von Stoffwechselprozessen und ihren regulatorischen Mechanismen. Aufgrund der hohen Redundanz von Genen und der Langwierigkeit genetischer Experimente in Pflanzen werden zur Analyse einzelner Metabolismen häufig geeignete Modellsysteme verwendet. *S. cerevisiae* stellt den wohl am besten charakterisierten, einzelligen, eukaryotischen Organismus dar. Aufgrund der vergleichbaren intrazellulären Kompartimentierung verlaufen viele Stoffwechselwege ähnlich wie in pflanzlichen Systemen. Zudem erleichtern die unkomplizierte Kultivierung, die kurzen Generationszeiten und die einfache genetische Manipulierbarkeit des Organismus die Identifizierung von grundlegenden molekularen Mechanismen.

Ziel dieser Arbeit ist es, die pflanzlichen Stoffwechselwege für die Biosynthese von PCs und dem Abbau von GS-Konjugaten in dem Modellorganismus *S. cerevisiae* zu charakterisieren. Grundlage dafür ist die Identifizierung der hefeeigenen Enzymaktivitäten, die für diese Prozesse verantwortlich sind und deren Reduktion auf ein Minimum. Im Gegensatz zu vielen anderen eukaryotischen Organismen wird in *S. cerevisiae* die Biosynthese von PCs nicht durch ein PCS-homologes Protein realisiert. Stattdessen deuten *in vitro* Analysen auf eine Beteiligung von vakuolären Carboxypeptidasen hin. Für den Abbau von GS-Konjugaten liegen bisher nur Hinweise auf die Beteiligung der γ -GT Cis2p vor. Um die Funktionen der einzelnen Proteine zu untersuchen, sollen die entsprechenden Deletionsmutanten verwendet werden. Phänotypische Analysen hinsichtlich der Cd^{2+} -Toleranz und der PC-Biosynthese bzw. dem Abbau von GS-Konjugaten sollen auftretende Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp verdeutlichen und die Beteiligung der Proteine an den jeweiligen Stoffwechselprozessen bestätigen. Schließlich soll durch den kombinierten Verlust der ausgewählten Proteine im besten Fall eine komplette Blockierung der PC-Biosynthese bzw. des GS-Konjugat Abbaus in *S. cerevisiae* erreicht werden. Durch die heterologe Expression verschiedener pflanzlicher Gene der PC-Biosynthese und des GS-Konjugat Abbaus in dem Modellsystem sollen die entsprechenden Enzymaktivitäten für die untersuchten Metabolismen wieder komplementiert werden. Daraufhin soll die kombinierte Expression der pflanzlichen Gene eine Rekonstruktion der pflanzlichen Stoffwechselwege in *S. cerevisiae* erlauben.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Verwendete *Escherichia (E.) coli*-Stämme und ihre Kultivierung

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5 α	F ⁻ , ϕ 80dlacZ_M15, (lacZYA-argF) U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17 (rk ⁻ , mk ⁺), phoA, supE44, λ ⁻ , thi-1, gyrA96, relA1	Invitrogen (Karlsruhe)
XL1blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr)]	Invitrogen (Karlsruhe)

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Flüssigmedium im Schüttler (ca. 200 rpm/min) oder auf LB-Agarplatten jeweils bei 37°C.

Die Selektion von Transformanten erfolgte durch Zusatz des Antibiotikums Ampicillin (100 μ g/ml Endkonzentration) zum Nährmedium.

LB-Medium

Hefeextrakt	0,5% (w/v)
Pepton	1,0% (w/v)
NaCl	1,0% (w/v)
Agar (Festmedium)	1,5% (w/v)

pH-Wert auf 7,0 einstellen.

2.1.2 Methoden für die DNA-Isolation

2.1.2.1 Plasmid-Minipräparation aus *E. coli* durch alkalische Lyse

Eine *E. coli* Einzelkolonie wurde in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin angeimpft und üN bei 37°C wachsen gelassen. Von der Kultur wurden 4 ml in ein Eppendorfgefäß abzentrifugiert (16.000xg, 1 min, RT) und der Überstand verworfen. Nach der Resuspension der Zellen in 100 μ l Lösung 1 erfolgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von 200 μ l Lösung 2. Die Zellen wurden kurz geschwenkt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Neutralisation des Lysates ließ sich durch die Zugabe von 150 μ l Lösung 3 erreichen. Die Suspension wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend ließen sich die Zelltrümmer und Proteine durch eine Zentrifugation bei 16.000xg für 10 min bei 4°C pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß

überführt. Durch Zugabe von 2,5 Volumen 100% Ethanol erfolgte die Fällung der enthaltenen Nukleinsäuren für 30-60 min bei -20°C. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 16.000xg und 4°C wurde das Nukleinsäurepellet mit 70%igen Ethanol gewaschen, zentrifugiert und an der Luft oder unter Vakuum getrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl MQH₂O aufgenommen und anschließend die RNA, durch Zugabe von 5 µl RNase A Lösung (10 mg/ml) verdaut (15 min, 37°C).

- Lösung 1: 50 mM Glukose
 10 mM EDTA
 25 mM Tris/HCl, pH 8,0
- Lösung 2: 0,2 M NaOH
 1% SDS
- Lösung 3: 60 ml 5M Kaliumacetat, pH 5,2
 11,5 ml Eisessig

2.1.2.2 Plasmid-Mini- und Midipräparationen mit Hilfe von Kit-Systemen

Plasmid-DNA aus einer *E. coli* Übernachtskultur wurde mit folgenden Kit-Systemen nach dem Herstellerprotokoll isoliert

- Jet Star Plasmid Preparation Kit: Genomed (Löhne)
- Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system: Promega (Mannheim)

2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Komponenten	Konzentration	Eingesetztes Volumen [µl]
Template (x ng/µl)	20 – 100 ng	x
10x Puffer	1x	2
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 mM	2
dNTP-Mix (2,5 mM jedes)	0,2 mM jedes	1,5
Forward-Primer (20 µM)	1 µM	1
Reverse-Primer (20 µM)	1 µM	1
DNA-Polymerase	0,2 U	0,2
Mit MQH ₂ O auf 20 µl auffüllen.		

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen im Tgradient (Biometra) durchgeführt:

Initialdenaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	45 s	} 25 Zyklen
Annealing	primerabhängig(*)	45 s	
Elongation	72°C	abhängig von der Länge des Amplifikates (**)	
Finale Elongation	72°C	10 min	
Lagerung	4 °C	∞	

(*) Die benötigte Annealingtemperatur für einen Primer lässt sich aufgrund seines GC-Gehaltes (Anteil der organischen Basen Guanin und Cytosin in Prozent) und seiner Länge in Basenpaaren (PL) näherungsweise durch folgende Formel berechnen:

$$T_m = 64,3^\circ\text{C} + 0,41 \times \text{GC}\% - 650/\text{PL}$$

(**) Die zu wählende Elongationszeit ist nicht nur abhängig von der Länge des Amplifikates, sondern auch von der verwendeten Polymerase.

2.1.4 Kolonie-PCR

Für die schnelle und effiziente Überprüfung von transformierten Plasmiden in *E. coli* und *S. cerevisiae* wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dafür wurden 10 µl dH₂O in die PCR-Gefäße vorgelegt und etwas Material einer frischen Kolonie des entsprechenden Stammes mit einem sterilen Zahnstocher oder einer sterilen Pipettenspitze darin resuspendiert. Der PCR-Ansatz wurde wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben pipettiert. Zur Zerstörung der Zellen und zur Gewährleistung der kompletten Denaturierung wurde der erste Schritt der PCR-Reaktion für 10 Minuten bei 95°C durchgeführt. Die Zyklenzahl wurde auf 30 erhöht.

2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der PCR- und Klonierungsprodukte sowie für die Isolation von Vektoren und PCR-Produkten nach der Restriktionsspaltung diente die Agarose-Gelelektrophorese. Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Molekülgröße erfolgte bei Agarose-Konzentrationen von 0,8% bzw. 1,0% (w/v) in 1xTAE als Elektrophorese-Puffer. Für die Visualisierung der DNA unter UV-Licht wurde den Gelen 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V Gleichspannung in der Gelkammer. Als Größenstandard (Kapitel 2.1.6) diente

entweder mit *Hind*III gespaltene λ -DNA oder der 1kb-Marker (Fermentas). Vor dem Probenauftrag in die Gelkammern wurden die DNA-Proben mit 6xGelladepuffer (Endkonzentration 1x) versetzt. Für das Agarosegel wurden 0,8% bzw. 1% (w/v) Agarose in 1xTAE-Puffer aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurde Ethidiumbromid zugesetzt und das Gel gegossen.

EtBr-Stammlösung:	100 mg Ethidiumbromid in 10 ml dH ₂ O gelöst
Gelladepuffer (6fach Orange G):	50% (v/v) Glycerol 0,25% (w/v) Orange G 1 mM EDTA (pH 8,0)
50fach TAE-Puffer:	2 M Trisbase 5,71% (v/v) Eisessig 50 mM EDTA pH 8,0

2.1.6 Verwendete Größenstandards

λ - <i>Hind</i> III-Marker	eigene Herstellung (*)
1 kb DNA-Leiter	MBI Fermentas

(*) 300 μ l λ -DNA (300 μ g/ μ l) wurden in einem Endvolumen von 1600 μ l für 1 Stunde bei 37°C mit *Hind*III verdaut. Im Anschluss wurde das Enzym hitzeinaktiviert (20 min, 65°C) und der Ansatz mit 200 μ l Gelladepuffer versehen (Endkonzentration: 50 ng/ μ l).

2.1.7 Aufreinigung von DNA

Ethanol-Fällung

Für die Präzipitation wurden DNA-haltige Lösungen mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat und 2,5 Volumen 100%igen Ethanol versetzt. Die Fällung erfolgte entweder für 30 min bei -80°C oder für 60 min bis üN bei -20°C. Die DNA wurde durch Zentrifugation (30 min, 16.000xg, 4°C) pelletiert und nach Entfernung des Überstandes mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach der Trocknung des DNA-Pellets an der Luft oder unter Vakuum, erfolgte die Resuspension in MQH₂O.

Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Nach der Agarose-Gelelektrophorese wurden die entsprechenden DNA-Fragmente unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Elution aus der Gelmatrix erfolgte mit dem peqlab Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers.

2.1.8 Bestimmung der DNA-Konzentration mittels λ -DNA

Um die Konzentration von DNA-Fragmenten zu bestimmen, wurde der λ -HindIII-Marker verwendet. Durch den Intensitätsvergleich der Markerbanden mit den Banden der zu untersuchenden DNA-Probe, konnte die Menge der jeweiligen DNA auf dem Gel berechnet werden. Durch Einbeziehen des Volumens an pipettierter DNA ergab sich die Konzentration der zu bestimmenden Probe.

2.1.9 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Spaltung von 1 μ g DNA wurden mindestens 2 U Restriktionsenzym in den vom Hersteller vorgeschlagenen Puffer (Fermentas) verwendet. Die Inkubation erfolgte für 3 h bis üN bei 37°C. Gegebenfalls wurde das Enzym durch 15-minütige Inkubation bei 65°C hitzeinaktiviert. Die Aufreinigung der DNA aus dem Restriktionsansatz geschah entweder mit Hilfe der Ethanol-Fällung oder durch Extraktion aus Agarosegelen (Kapitel 2.1.7).

2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA Fragmenten mit linearisiertem Vektor wurde ein molares Verhältnis von Vektor:Insert von 1:3 und 1:5 eingesetzt. Die Ligation erfolgte in einem 10 μ l Ansatz mit der T4 Ligase (Fermentas) in dem vom Hersteller bereitgestellten Puffer. Der Ansatz wurde entweder für 1 h bei 22°C oder üN bei 16°C inkubiert und anschließend in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

2.1.11 Transformation von *E. coli* mit rekombinanter DNA

Die Transformation von Plasmid-DNA und Ligationsansätzen erfolgte über Hitzeschock in chemisch kompetente Zellen. Dafür wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und je 90 μ l mit dem Ligationsansatz bzw. der Plasmid-DNA versehen. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis, wurden die Ansätze für 30 s bei 42°C dem Hitzeschock ausgesetzt. Anschließend erfolgte für 5 min eine Inkubation auf Eis bevor die Zellsuspensionen mit 900 μ l LB-Medium versetzt und für 60 min bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Medium mit Ampicillin ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert.

2.1.12 Vektoren und Plasmide

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und klonierten Plasmide sowie die entsprechenden *E. coli*-Stämme sind der Stammsammlung sowie dem Anhang zu entnehmen.

p424gpd, p425gpd, p426gpd (Mumberg et al., 1995)

DNA-Bereiche die sich 3'-seitig des Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase 1-Promotors (GPD-Promotor) befinden, werden konstitutiv in *S. cerevisiae* exprimiert. Aufgrund der durch den 2-Mikron-Replikationsursprung vermittelten hohen Kopienzahl und der effizienten Transkription, können rekombinante Proteine überexprimiert werden.

pSH47, pSH63, pSH65 (Güldener et al., 2002)

Vektoren der pSH-Reihe wurden für die Expression der *CRE-Rekombinase* in *S. cerevisiae* konstruiert. Die Transkription des fusionierten Leserahmens erfolgt ausgehend von einem durch Galaktosezusatz induzierbaren und Glukose reprimierbaren Promotor (*GAL1*-Promotor). Eine transformierte Hefezelle enthält 1-2 Kopien des Vektors.

pUGxx (Güldener et al., 2002)

Die Vektoren der pUG-Reihe dienen zur Amplifikation von Deletionskassetten mit flankierenden loxP-Seiten. Die Plasmide können sich nicht in *S. cerevisiae* replizieren.

pYM28 (Janke et al., 2004)

Dieser Vektor dient als Template für die Amplifikation einer Kasette für die C-terminale Fusion von Hefegenen mit dem eGFP-tag. Die Selektion der Transformanten erfolgt mit Hilfe des assoziierten *HIS3*-Selektionsmarkers.

2.1.13 Klonierungsstrategien

pGAL1

Die *multiple cloning site* und der CYC1-Terminator wurden über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Kpn*l aus dem Plasmid p426gpd ausgeschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen pSH47 kloniert.

pGAL1:eGFP

Die *multiple cloning site* und der eGFP-Tag wurden über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Kpn*I aus dem Plasmid p426gpd:eGFP ausgeschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen pSH47 kloniert.

pGAL1::AtPCS1

Die cDNA von AtPCS1 wurde mit den Primern PCS1_EcoRIfor (#21) und PCS1_Sallrev (#22) von dem Plasmid pet28a-AtPCS1 (Stamm-Nr.: #644) amplifiziert und anschließend mit *Eco*RI und *Sal*I verdaut. Das geschnittene PCR-Produkt wurde danach in den ebenfalls mit *Eco*RI und *Sal*I geschnittenen Vektor pSH47 kloniert.

pGAL1::AtPCS2

Die cDNA von AtPCS1 wurde mit den Primern PCS2_BamHIfor (#23) und PCS2_XhoIrev (#24) von der cDNA der Δ PCS1 Linie von *A. thaliana* amplifiziert und aufgrund der geringen Ausbeute anfangs *blunt end* in den mit *Spe*I geschnittenen pSK-Vektor kloniert (pSK-AtPCS2). Dieser wurde erneut als Template für die genannten Primer genutzt und das PCR-Produkt anschließend mit *Bam*HI und *Xho*I verdaut und in den geschnittenen pSH47 kloniert.

pGAL1::AtPCS1 Δ C

Die ersten 654 Basenpaare der cDNA von AtPCS1 wurde mit den Primern PCS1_BamHIfor (#25) und PCS1-218tr-Sal-Sac-rev (#30) von dem Plasmid pGAL1::AtPCS1 amplifiziert und anschließend mit *Bam*HI und *Sal*I verdaut. Das geschnittene PCR-Produkt wurde anschließend in den ebenfalls mit *Bam*HI und *Sal*I geschnittenen Vektor pSH47 kloniert.

pGAL1::AtPCS2 Δ C

Die ersten 651 Basenpaare der cDNA von AtPCS2 wurde mit den Primern PCS2_BamHIfor (#23) und PCS2_Xho_Mitte_rev (#31) amplifiziert, entsprechend verdaut und in den *Bam*HI und *Xho*I geschnittenen pSH47 ligiert.

pGAL1::AtPCS1:eGFP

Die Amplifikation der cDNA von AtPCS1 erfolgte mit den Primern PCS1_BamHIfor (#25) und PCS1_oT_XhoIrev (#26) von dem Plasmid pet28a-AtPCS1 (Stamm-Nr.: #644). Die erhaltene cDNA ohne Stopp-Codon wurde im Anschluss mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I verdaut und in den geschnittenen pGAL1:eGFP kloniert.

pGAL1::AtPCS2:eGFP

Für die Fusion von AtPCS2 mit eGFP wurde mit den Primern PCS2_BamHlfor (#23) und PCS2_oT_Xholrev (#27) die entsprechende cDNA von dem Plasmid pSK-AtPCS2 amplifiziert und schließend verdaut. Die Ligation erfolgte in den mit *Bam*HI und *Xho*I geschnittenen pGAL1:eGFP.

pGAL1::AtHB6:eGFP

Die cDNA von AtHB6 wurde mit den Primern HB6_BamHlfor (#28) und HB6_Xhol-nostop_rev (#29) von dem Plasmid pSPYNE-35S/pUG-YFP^N-HB6 (Stamm-Nr.: #1264) amplifiziert, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und anschließend in den ebenfalls geschnittenen pGAL1:eGFP ligiert.

pGAL1::NsPCS

Mit Hilfe der Primer NsPCS_EcoRI_for (#32) und NsPCS_Sal_Sac_rev (#33) wurde das Gen *alr0975* von der genomischen DNA aus *Nostoc* sp. PCC7120 amplifiziert und anschließend verdaut. Die Ligation erfolgte in das mit *Eco*RI und *Sal*I geschnittene Plasmid pSH47.

pGAL1::BjPCS

Von der genomischen DNA des *B. japonicum* Stammes USDA110 wurde mit den Primern BjPCS_EcoRI_for (#34) und BjPCS-Sal_rev (#35) das Gen *BLL7663* amplifiziert und anschließend in das mit *Eco*RI und *Sal*I geschnittene Plasmid pSH47 ligiert.

2.1.14 Oligonukleotide

Die aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

Nr.	Primer	Sequenz (5`-3`)*	Beschreibung
Herstellung der Hefe-Deletionsmutanten			
# 01	CPY_818_for	GGT TTG GAC CTC GAC CTG GAT CAT C	CPY Deletion
# 02	CPY_2629_rev	ATT AAA AAT TTT TGG TTT TGG CTT AGC AGC	CPY Deletion
# 03	CPC_Ura_for	GCT TCA GCT TCT TAT TAG CAT CAA ATA CGC CTC ATT CGG CAT GTC GAA AGC TAC ATA TAA	CPC Deletion vom Plasmid pAG36

# 04	CPC_Ura_rev	ACG ATT ACC GGA AAT CCA ACT GTT GAC CAT TTC CAA ACT TTT AGT TTT GCT GGC CGC ATC	CPC Deletion vom Plasmid pAG37
# 05	CPC_loxP_for	TTT AAA ACA GCT ATA CAA AAA GTG ATA CCG ACA TAC AAT GCA GCT GAA GCT TCG TAC GC	CPC Deletion mit loxP
# 06	CPC_loxP_rev	GCA AGG TTA AGA GTG AAA CAT TTT TAG AGC ACT ACT AGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG	CPC Deletion mit loxP
# 07	CPCchk5for	CGG CGC TAG CAT TCT ACG AA	bindet 139 bp upstream vom Start von <i>YBR139w</i>
# 08	CPCchk3rev	CAG TTG TGA AGC CTC TGG AT	bindet 293 bp downstream vom Stop von <i>YBR139w</i>
# 09	bpt1_for_neu	AAG AAA ATT TTG TCT AAA AAA GAT TAA TAT AAA GAC AAT GCA GCT GAA GCT TCG TAC GC	<i>BPT1</i> Deletion mit loxP
# 10	bpt1_rev_neu	AAT GTT CTA TAT CTT CAT ATA TAA TAA TCA ATG TCA TTA GCA TAG GCC ACT AGT GGA TC	<i>BPT1</i> Deletion mit loxP
# 11	chk_bpt1_for	CTA TAC CAA GGT CTC TTC TG	bindet 94 bp upstream vom Start von <i>BPT1</i>
# 12	chk_bpt1_rev	GAA TTG GCG TGA CCG TAC AT	bindet 70 bp downstream vom Stop von <i>BPT1</i>
# 13	Chk2_bpt1_for	CGT TAT CTC CTG CCA TTG TC	bindet 1637 bp downstream vom Start innerhalb von <i>BPT1</i>
# 14	Chk2_bpt1_rev	ATT GAA TGC GGC CGA TGC TA	bindet 1575 bp upstream vom Stop innerhalb von <i>BPT1</i>
eGFP-tagging von <i>CIS2</i>			
# 15	Cis2tagfor	GAG TGA CTA TTG GAG AAA AAG AGG AAT CTC CTC CGT ATA CCG TAC GCT GCA GGT CGA C	eGFP-tagging von <i>CIS2</i>
# 16	Cis2tagrev	GGA AAC TTA CTG AAA AAG GCA AAG CTC GCA TGA TCT GGA TAT CGA TGA ATT CGA GCT CG	eGFP-tagging von <i>CIS3</i>
# 17	cis2chkfor	CCG TAC TAA GCA CTC TCA AG	bindet 145 bp upstream vom Stop innerhalb von <i>CIS2</i>
# 18	cis2chkrev	CGC GCA GTA TCA AGC CAT CA	bindet 295 bp downstream vom Stop von <i>CIS2</i>

# 19	His5+_for	ATGCAGGCTGGAGCTTACGA	Überprüfung der <i>HIS3</i> Insertion
# 20	His5+_rev	GCATGGCAACAGCCAGAGAT	Überprüfung der <i>HIS3</i> Insertion
PCS-Konstrukte			
# 21	PCS1_EcoRIfor	TAT ATA TAG <u>AAT TCA</u> TGG CTA TGG CGA GTT TA	cDNA Amplifikation von <i>AtPCS1</i>
# 22	PCS1_Sallrev	TAT ATA TAG <u>TCG ACC</u> TAA TAG GCA GGA GCA GC	cDNA Amplifikation von <i>AtPCS1</i>
# 23	PCS2_BamHIfor	TAT ATA TAG <u>GAT CCA</u> TGT CTA TGG CGA GTT TGT A	cDNA Amplifikation von <i>AtPCS2</i>
# 24	PCS2_XhoIrev	TAT ATA TAC <u>TCG AGT</u> TAG GCA GGA GCA GAG AGT T	cDNA Amplifikation von <i>AtPCS2</i>
# 25	PCS1_BamHIfor	TAT ATA TAG <u>GAT CCA</u> TGG CTA TGG CGA GTT TA	cDNA Amplifikation von <i>AtPCS1</i>
# 26	PCS1_oT_XhoIrev	TAT ATA TAC <u>TCG AGA</u> TAG GCA GGA GCA GCG AG	cDNA Amplifikation von <i>AtPCS1</i> ohne Stop-Codon
# 27	PCS2_oT_XhoIrev	TAT ATA TAC <u>TCG AGG</u> GCA GGA GCA GAG AGT TC	cDNA Amplifikation von <i>AtPCS2</i> ohne Stop-Codon
# 28	HB6_BamHI_for	CGG <u>GAT CCT</u> ATG ATG AAG AGA TTA AGT AGT	cDNA Amplifikation von <i>AtHB6</i>
# 29	HB6_XhoI_nostop_rev	ATT <u>CTC GAG</u> ATT CCA ATG ATC AAC <u>GGT GG</u>	cDNA Amplifikation von <i>AtHB6</i> ohne Stop-Codon
# 30	AtPCS1-218tr-Sal-Sac-rev	TAT ATA <u>GTC GAC GAG CTC</u> TAT CTA GAT ATG AGC ATG AAC C	cDNA Amplifikation von <i>AtPCS1</i> ohne C-Terminus
# 31	PCS2_Xho_Mitte_rev	TAT ATA TAC <u>TCG AGT</u> TAT CTT GAT ATA AGC ATG AAC C	cDNA Amplifikation von <i>AtPCS2</i> ohne C-Terminus
# 32	NsPCS_EcoRI_for	TAT ATA <u>GAA TTC</u> ATG ATA GTT ATG AAA CTC TTT ATC	Amplifikation von <i>NsPCS</i> - alternatives Start-Codon wurde durch ATG ersetzt
# 33	NsPCS_Sal_Sac_rev	TAT ATA <u>GTC GAC GAG CTC</u> TAA TCT TGT GTT TTA CTT ACG	Amplifikation von <i>NsPCS</i>
# 34	BjPCS_EcoRI_for	TAT ATA <u>GAA TTC</u> ATG AAG CGA TGG CGC TAC	Amplifikation von <i>BjPCS</i>
# 35	BjPCS_Sal_rev	TAT ATA <u>GTC GAC</u> TTA CTC TAT CAA CAG CAG CCC	Amplifikation von <i>BjPCS</i>

Sequenzierungsprimer			
# 36	Gal1-Prom_for	CCC GGA TTC TAG AAC TAG TGG A	bindet am extremen 3'-Bereich des GAL1-Promotors
# 37	GDP-Prom_Sequ_for	CCA GAA CTT AGT TTC GAC GG	bindet am extremen 3'-Bereich des GPD-Promotors
# 38	CYC1-Term_rev	TTC GGT TAG AGC GGA TGT GG	bindet am extremen 5'-Bereich des CYC1-Terminators
# 39	EGFP_Sequ_rev	ACT TGT GGC CGT TTA CGT CG	bindet am extremen 5'-Bereich des eGFP Gens

(*) Die kursiven Bereiche der Primer beinhalten Plasmidsequenz. Die unterstrichenen Basenpaare zeigen die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonukleasen.

2.2 Genetische Methoden in *S. cerevisiae*

2.2.1 Verwendete *S. cerevisiae* Stämme und ihre Kultivierung

Stamm	Genotyp	Quelle
BY4741	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0	Euroscarf Acc.No. Y00000
BY4742	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0	Euroscarf Acc.No. Y10000
Δ cpy	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YMR297w::HIS3	Diese Arbeit
Δ cpc	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YBR139w::kanMX	Euroscarf Acc.No. Y03278
Δ cpc	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YBR139w::loxP	Diese Arbeit
Δ cpy Δ cpc	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; Ymr297w::HIS3, YBR139w::kanMX	Diese Arbeit
Δ cup1	ABDE1; arg4-8; leu2-112; his7-2; trp1-289; ade5; cup1 Δ	(Hamer, 1986)
Δ cis2	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YLR299w::kanMX	Euroscarf Acc.No. Y05209
Δ cis2 Δ cpy	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YLR299w::kanMX; YML297w::HIS3	Diese Arbeit

$\Delta cis2\Delta cpc$	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YLR299w::kanMX; YBR139w::URA3	Diese Arbeit
$\Delta cis2\Delta cpy\Delta cpc$	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YLR299w::kanMX; YMR297w::HIS3, YBR139w::URA3	Diese Arbeit
$\Delta cis2\Delta cpy\Delta cpc$	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YLR299w::kanMX; YMR297w::HIS3; YBR139w::loxP	Diese Arbeit
$\Delta ycf1$	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YDR135c::KanMX	Euroscarf Acc.No. Y04069
$\Delta bpt1$	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YLL015w::loxP	Diese Arbeit
$\Delta ycf1\Delta bpt1$	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YDR135c::KanMX; YLL015w::loxP	Diese Arbeit
Cis2:eGFP	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0, YLR299w-eGFP	Diese Arbeit

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte bei 30°C im Vollmedium (YP-Medium) mit den entsprechenden C-Quellen bzw. im Minimalmedium (S-Medium). Die Inkubation von Flüssigkulturen erfolgte auf dem Schüttler bei 200 rpm. Transformanten wurden auf Minimalmedium mit dem entsprechenden Dropout selektioniert.

Vollmedium (YP)

Hefeextrakt		1% (w/v)
Pepton		2% (w/v)
Agar (Festmedium)		1,5% (w/v)
YPD	Glukose	2% (w/v)
YPG	Galaktose	2% (w/v)

Den pH-Wert auf 6,5 einstellen.

Minimalmedium (S)

YNB (Yeast Nitrogen Base)		0,17% (w/v)
Ammoniumsulfat		0,50% (w/v)
SD	Glukose	2,0% (w/v)
SG	Galaktose	2,0% (w/v)
SS	Sucrose	2,0% (w/v)
Agar (Festmedium)		1,5% (w/v)

Den pH-Wert auf 5,8 einstellen.

Nach dem Autoklavieren wurde zu dem Minimalmedium die entsprechende 10xDropout Lösung gegeben.

Aminosäure/Nucleobase	10xKonzentration
L-Adenin Hemisulfat-Salz	200 mg/l
L-Arginin HCL	200 mg/l
L-Histidin HCl Monohydrat	200 mg/l
L-Isoleucin	300 mg/l
L-Leucin	1.000 mg/l
L-Lysin HCl	300 mg/l
L-Methionin	200 mg/l
L-Phenylalanin	500 mg/l
L-Threonin	200 mg/l
L-Tryptophan	200 mg/l
L-Tyrosin	200 mg/l
L-Uracil	200 mg/l
L-Valin	1.500 mg/l

2.2.2 Minipräparation genomischer DNA aus Hefe

Für die Präparation der genomischen DNA aus *S. cerevisiae* wurden die Zellen einer 10 ml ÜN-Kultur für 5 min bei 3.500xg geerntet und mit 1 ml dH₂O gewaschen. Das Pellet wurde danach in 500 µl Lysispuffer aufgenommen und ca. 400 µl Glasperlen zugegeben. Das Gemisch wurde 2 min kräftig gevortext und anschließend auf Eis inkubiert, bis die Glasperlen sedimentiert waren. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 275 µl 7 M Ammoniumacetat pH 7,0 versehen. Anschließend erfolgte zuerst eine Inkubation für 5 min bei 65°C und danach eine Inkubation für 5 min auf Eis. Nachfolgend wurden 500 µl Chloroform zugeben und die entstehenden Phasen gründlich gemischt. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 13.000xg wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch die Zugabe von 1 ml Isopropanol und anschließender Inkubation für 5 min bei RT. Das Pellet wurde nach einer Zentrifugation für 5 min bei 13.000xg mit

70%igem Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und abschließend in 50 μ l MQH₂O aufgenommen.

Zur Überprüfung des DNA-Gehaltes diente die Agarose-Gelelektrophorese. Aufgrund der hohen Salzkonzentration und eventueller DNasen wurden nachfolgende PCR Reaktionen unverzüglich angesetzt.

Lysispuffer: 100 mM Tris/HCl pH 8,0
50 mM EDTA
1% SDS

2.2.3 Transformation von DNA in *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach dem Protokoll der „*High efficiency LiAc transformation*“ von Gietz und Woods (2002). 50 ml YPD wurden aus einer 5 ml \bar{u} N-Kultur angeimpft und bis zu einer Zellzahl von 3×10^7 Zellen wachsen gelassen (Die Zellzahl ließ sich mit der Zählkammer nach Neugebauer bestimmen). Anschließend wurden die Zellen durch einen Zentrifugationsschritt bei 1.000xg für 5 min geerntet und mit 25 ml dH₂O gewaschen. Nach der Zugabe von 1 ml 100 mM LiAc wurde die Lösung in ein neues Eppendorfgefäß überführt, kurz zentrifugiert (15 s) und das LiAc entfernt. Das Pellet wurde in 400 μ l 100 mM LiAc aufgenommen (Endvolumen 500 μ l), sodass eine Zellzahl von 2×10^9 Zellen/ml eingestellt wurde. Die Zellsuspension wurde gevortext und in 50 μ l Aliquots auf Eppendorfgefäße verteilt, für 15 s zentrifugiert und das restliche LiAc entfernt. In der Zwischenzeit wurde bereits die *carrier*-DNA (Einzelstrang-DNA) für 5 min bei 100°C gekocht und unverzüglich auf Eis gestellt. Zu dem Zellpellet wurden in angegebener Reihenfolge folgende Komponenten zugegeben:

240 μ l PEG 4000 (50% w/v)
36 μ l 1,0 M LiAc
10 μ l *carrier*-DNA (10 μ g/ml)
x μ l DNA
mit MQH₂O auf 360 μ l auffüllen.

Das Pellet wurde durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette resuspendiert und anschließend für 40 min bei 42°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation des Transformationsansatzes wurde das Pellet in 100 μ l MQH₂O aufgenommen und auf SD-Platten mit dem entsprechenden Supplementen ausplattiert.

2.2.3.1 Herstellung der *carrier*-DNA

Die DNA aus Lachssperma (Sigma) wurde mit einer Konzentration von 10 mg/ml in 1xTE (pH 7,5) unter ständigem Rühren (ca. 1 Stunde) bei RT gelöst. Anschließend wurde die DNA für 2x30s mit Ultraschall behandelt (Leistung 100%), bevor sie einmal mit Phenol (pH 8,0 und TE gesättigt), einmal mit Phenol:Chloroform (1:1) und sechsmal mit Chloroform extrahiert wurde. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen einer 3 M NaAc-Lösung (pH 6,0) und durch Zugabe von 2,5 Volumen eisgekühlten EtOH (100%) gefällt. Das Pellet wurde im Anschluss mit 75%igem EtOH gewaschen und bei RT getrocknet. Nach dem Lösen in dem Ausgangsvolumen an 1xTE wurde die DNA für 20 Minuten im kochenden Wasser denaturiert und danach unmittelbar auf Eis gestellt. Die carrier-DNA wurde in Aliquots bei -20°C gelagert.

2.2.4 Herstellung der Hefe-Deletionsmutanten

Alle erwähnten Deletionen wurden, wenn nicht anders erwähnt, in dem Wildtyp-Hefestamm BY4741 durchgeführt. Abb. 7 stellt den Ablauf für die Herstellung von Deletionsmutanten in Hefe schematisch dar.

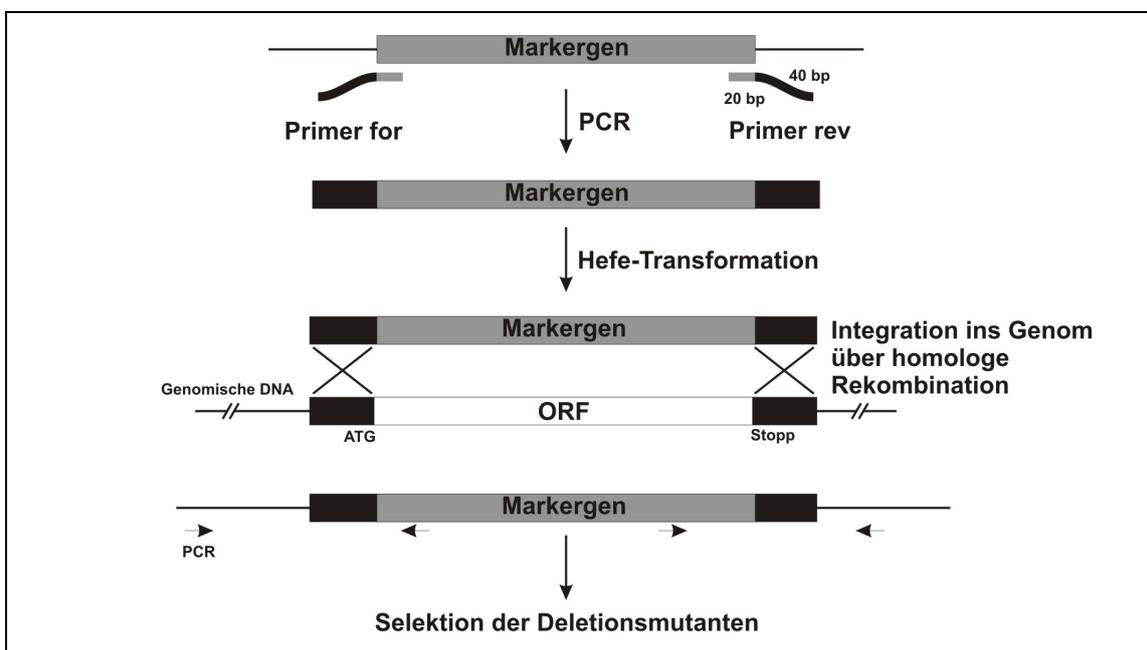


Abb. 7 Schematische Darstellung für die Deletion eines Gens in *S. cerevisiae*

Die Deletionskassetten für die entsprechenden Gene wurden mit den unten angegebenen Primern amplifiziert (Kapitel 2.1.14), in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und mittels des Geextraktions-Kit aus dem Gel isoliert (Kapitel 2.1.7). Für die Transformationen wurden ca. 100 ng der jeweiligen Deletionskassette eingesetzt.

Zu deletierendes Gen	Primer forward	Primer reverse	Plasmid	Selektionskassette
<i>CPY</i> (YML297w)	(*)	(*)	#309	<i>HIS3</i>
<i>CPC</i> (YBR139w)	#3	#4	pAG36	<i>URA3</i>
<i>CPC</i> (YBR139w)	#5	#6	pUG73	loxP- <i>LEU2</i> -loxP
<i>BPT1</i> (YLL015w)	#9	#10	pUG73	loxP- <i>LEU2</i> -loxP

(*) Deletion von YML297w (CPY)

Für die Deletion des *CPY* Gens wurde das Plasmid #309 in den entsprechenden Hefestamm transformiert. Die Konstruktion des Plasmides erfolgte durch Laurent Meyer, indem zuerst das *CPY* Gen über die *SacII* und *HindIII* Schnittstelle (Position 518 and 2792 in Bezug auf das *CPY* Gen; GenBank Acc.No. M15482.1) in den pSK-Vektor inseriert wurde. Aus diesem wurde der Bereich zwischen den beiden *BamHI* Schnittstellen entfernt (1112 bp) und durch den *BamHI* Bereich des *HIS3* Gens ersetzt (Position 64 and 1818 in Bezug auf das *HIS3* Gen; GenBank Acc.No. X03245.1). Für die Transformation in den haploiden Wildtyp Stamm BY4741 wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym *SaII* linearisiert. Die Transformanden ließen sich auf Selektionsmedium ohne Histidin selektieren.

Für die Überprüfung der korrekten Integration der Deletionskassette ins Genom wurde eine diagnostische PCR durchgeführt (Abb. 7). Als Template diente die genomische DNA der putativen Transformanden und des Wildtyps. Dabei wurden Primer verwendet, die 3`- und 5`-seitig der kodierenden Sequenz binden (Kapitel 2.1.14).

2.2.5 Test des Wachstumsphänotyps von *S. cerevisiae* („Tüpfeltest“)

Die entsprechenden Hefestämme wurden ün im SD- bzw. YPD-Medium kultiviert. Nach der Bestimmung der OD₆₀₀, erfolgte die Einstellung der Zellzahl auf 10⁷ Zellen/ml. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe bis 10³ Zellen/ml hergestellt. Von den Verdünnungen wurden je 10 µl auf die entsprechenden Agarplatten aufgetropft und vier Tage bei 30°C kultiviert.

2.2.6 Markerrescue unter Verwendung des loxP-Cre-Rekombinase-Systems

Der *Markerrescue* mit dem loxP-Rekombinase-System erfolgte nach dem Protokoll von Güldener et al. (2002). Dafür wurden die entsprechenden Stämme mit dem Plasmid

pSH47 transformiert (Kapitel 2.2.3) und auf Minimalmedium ohne Uracil selektiert. Von den Transformanden wurden Einzelkolonien üN in 5 ml YPG bei 30°C inkubiert, um die Expression der *CRE-Rekombinase* zu induzieren. Am nächsten Morgen wurden 100-200 Zellen auf YPD-Platten ausplattiert und 2 Tage bei 30°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte das Überstempeln auf Selektivmedium für den entsprechenden Marker und YPD-Medium. Von den Kolonien, welche nur noch auf YPD wachsen konnten, wurde die genomische DNA isoliert (Kapitel 2.2.2) und der Verlust des Selektionsmarkers mittel PCR-Analyse verifiziert.

Für die Entfernung des Plasmides wurden die entsprechenden Einzelkolonien üN in 5 ml YPD inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte der Transfer von 200 µl der üN-Kultur in 5 ml frischen YPD-Medium. Nach weiterer Inkubation bei 30°C erfolgte am Abend eine 1:100 Verdünnung in 5 ml YPD und die weitere Kultivierung. Im Anschluss wurden 100-200 Zellen auf YPD-Platten ausplattiert und 2 Tage bei 30°C inkubiert. Das Überstempeln erfolgte auf Minimalmedium ohne Uracil und YPD. Von den Kolonien, welche nur noch auf YPD wachsen konnten, wurde die genomische DNA isoliert und der Verlust des Selektionsmarkers mittel PCR-Analyse verifiziert.

2.2.7 *Plasmidrescue aus S. cerevisiae*

10 ml des entsprechenden Selektionsmediums wurden mit einer Transformande beimpft und ca. 24 h bei 30°C inkubiert. Die Hefesuspension wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in mehreren Schritten abzentrifugiert (20.000xg, 30 s) und das Zellpellet in 200 µl Lysispuffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,3 g Glasperlen (Roth, Ø 0,25-0,5 mm) und 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1). Das Gemisch wurde 1 min gevortext, anschließend für 1 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei RT aufgetaut. Nach der Wiederholung dieser Prozedur wurde die Suspension zentrifugiert (5 min, 20.000xg) und die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte nach Zugabe von 100%igen Ethanol für 1 h bei -20°C. Nach Zentrifugation bei 16.000xg für 15 min bei 4°C wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Nach der Resuspension in 20 µl dH₂O wurden 4 µl der DNA für die Transformation von *E. coli* (Kapitel 2.1.11) eingesetzt.

Lysispuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
 1 mM EDTA
 100 mM NaCl

1% (w/v) SDS

2% (v/v) Triton X-100

2.3 Physiologische Experimente

2.3.1 Belastungsversuche mit Cadmium

Eine Einzelkolonie des entsprechenden Hefestammes wurde in Minimalmedium angeimpft und über den Tag wachsen gelassen. Am Abend wurde aus dieser Vorkultur eine \bar{u} N-Kultur angeimpft, um ein gleichmäßiges Wachstum der Zellen zu realisieren. Die Hauptkultur wurde in 50 ml Medium auf eine $OD_{600}=0,1$ angeimpft und 3 h bei 30°C und 200 rpm wachsen gelassen. Anschließend erfolgte die Belastung der Kulturen mit den angegebenen Konzentrationen an $Cd(NO_3)_2$. Die Zellen ließen sich durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 7.500xg pelletieren. Nach einem Waschschrift mit 1,5 ml dH_2O wurden die Zellen in 2 ml Reaktionsgefäße überführt, zentrifugiert und das Zellpellet bei -80°C bis zum Aufschluss gelagert.

2.3.2 *Pulse-Chase*-Versuche mit Monochlorobiman

Eine Einzelkolonie des entsprechenden Hefestammes wurde in Minimalmedium angeimpft und \bar{u} N wachsen gelassen. Am Morgen wurde die Hauptkultur mit 120 bzw. 150 ml Minimalmedium mit einer $OD_{600}=0,15$ angeimpft und bis zu einer $OD_{600}=0,5$ bei 30°C wachsen gelassen. Die Zellen ließen sich durch einen 5-minütigen Zentrifugationsschrift bei 5.000xg ernten und wurden im Anschluss in ca. 500 - 1000 μ l Minimalmedium resuspendiert. Durch Zugabe von 100 μ M MCB begann die 10-minütige Belastung der Zellen bei 30°C. Um das MCB schnell zu entfernen, wurden die Zellen für 30 s bei 16.000xg zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen mit 1 ml Minimalmedium gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen entweder in ihrem Ausgangsvolumen an Minimalmedium resuspendiert bzw. für die Untersuchungen zur Sekretion der Biman-Derivate in einem Zehntel des Ausgangsvolumens. Die erste Probennahme erfolgte unmittelbar nach der Resuspension. Die weiteren Proben wurden zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten abgenommen. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 16.000xg und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellpellets bis zum Aufschluss bei -80°C gelagert.

2.4 HPLC-Analyse

2.4.1 Herstellung der HPLC-Standards

2.4.1.1 *In vitro* Bildung von Phytochelatinen

Zu dem Reaktionsansatz aus 100 mM Tris-HCl pH 8,5, 10 mM Glutathion und 60 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ wurden 1 mM DTT und 30 μl einer 1:10 verdünnten AtPCS1 Enzymlösung gegeben. Der Ansatz wurde für mindestens drei Stunden bei 35°C inkubiert und anschließend mit 1/50 Volumen an Essigsäure abgestoppt.

2.4.1.2 *In vitro* Derivatisierung von Glutathion-Derivaten

Die zu derivatisierenden Substanzen Glutathion, Cysteinylglycin, γ Glutamylcystein und Cystein wurden in einer Konzentration von 1 mM mit 1 μM EDTA, 100 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ pH 8,0 und 1 mM Monobromobiman (MBB) versehen. Der Reaktionsansatz wurde für 20 min bei 35°C im Dunkeln inkubiert und anschließend abgeblasen. Anhand von MS-Analysen ließ sich zeigen, dass ca. 94-95% des verwendeten Glutathions mit MBB markiert werden konnten (R. Blum, persönliche Mitteilung).

2.4.2 Zellaufschluss

2.4.2.1 Analyse der Phytochelatine

Zu den Zellpellets wurde das gleiche Volumen an Glasperlen (Roth, \varnothing 0,25-0,5 mm) und 500 μl 0,6 N NaOH mit 1 mg/ml NaBH_4 gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen für 3x30s im Minibeadbeater bei 4°C aufgeschlossen. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT, ließen sich die Zellbestandteile durch eine Zentrifugation bei 16.000xg und 4°C für 10 min pelletieren. 400 μl des Überstandes wurden zu 100 μl 3,6 N HCl gegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis, ließen sich die gefällten Proteine durch eine Zentrifugation bei 16.000xg für 10 min bei 4°C pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen und in HPLC Gläschen gegeben.

2.4.2.2 Analyse der Biman-Derivate

Zu den Zellpellets wurde das gleiche Volumen an Glasperlen (Roth, \varnothing 0,25-0,5 mm) und 500 μl 1xfach Glycinpuffer pH 3,0 gegeben. Die Zellen ließen sich im Minibeater für 3x30s bei 4°C aufschließen. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation

bei 4°C und 16.000xg wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Mit der Inkubation des Zellextraktes für 10 min bei 70°C und 15 min auf Eis mit abschließender Zentrifugation (10 min, 4°C, 16.000xg) konnten weitere Verunreinigungen entfernt werden. Der Überstand wurde abgenommen und in HPLC Gläschen umgefüllt.

Glycinpuffer (1x) pH 3,0: 80 mM Glycin
 80 mM NaCl
 10 mM EDTA, pH 8,0
 19,2% (v/v) 0,1 M HCl

2.4.3 Reversed phase – high performance liquid chromatographie

Die Analyse der Phytochelatine und der Glutathion-S-Konjugate erfolgte nach der chromatographischen Trennung mit Hilfe des Summit HPLC Systems der Firma Dionex. Für die Auftrennung wurde jeweils eine C18-Säule (Bischoff, ProntoSIL 120-5-C18 AQ) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Chromeleon Client 6.50. Die Peaks konnten durch den Vergleich der Retentionszeiten von Referenzsubstanzen (Kapitel 2.4.1) identifiziert werden.

System	Komponente	Model
Hochdruck	Pumpe	P680 Hochdruckgradientensystem
	Autosampler	ASI-100 (gekühlt)
	Interface	UCI-50
	UV-Detektor	UVD340U
Niederdruck	Fluoreszenz-Detektor	RF 2000
	Pumpe	P680 Isokratische Pumpe
	Pumpe	P680 Niederdruckgradientensystem
	Autosampler	ASI-100
	UV-Detektor	UVD170U

2.4.3.1 Niederdruck-Chromatographie – Analyse der Phytochelatine

Nach dem in Kapitel 2.4.2.1 beschriebenen Aufschlussverfahren wurden die einzelnen Proben mittels HPLC auf die enthaltenen Phytochelatine untersucht. Dazu wurde die

Methode nach Grill et al. (1987), modifiziert nach Kneer et al. (1993), verwendet. Der sensitive Nachweis von Phytochelatinen beruht auf der selektiven Reaktion von Thiolen mit dem Reagenz 5,5'-bisdithio(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellman's Reagenz) (Ellman, 1959). Die Reaktion findet nach der Säulentrennung in einer Reaktionsschleife (5 ml Volumen) im Wasserbad bei 50°C statt. Das dabei gebildete gelb gefärbte Thiolatanion kann anhand seiner Extinktion bei 410 nm quantifiziert werden. Für die Analyse der Phytochelatine wurden jeweils 200 µl der Probe injiziert und bei einer Flussrate von 2 ml/min über einen Acetonitril-Gradienten getrennt (0% v/v B; - 3min 7% v/v B; - 4 min 25% v/v B; - 18,5 min 100% v/v B; - 19,5 min 100% v/v B; - 24 min 0% v/v B; - 27 min 0% v/v B). Für die Quantifizierung wurden folgende Korrekturfaktoren in die Berechnung einbezogen:

Thiol	Korrekturfaktor
Glutathion	1
PC ₂	1
PC ₃	1,3
PC ₄	1,5

Laufmittel A: 0,1% (v/v) TFA
 Laufmittel B: 20% (v/v) Acetonitril
 0,1% (v/v) TFA
 Ellman`s Reagenz: 20% (v/v) Acetonitril
 10% (v/v) Ellman`s-Stammlösung
 10% (v/v) 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 8.0)
 Stammlösung Ellman`s: 0,06% (w/v) Ellman`s Reagenz
 (5,5'-bisdithio(2-nitrobenzoesäure))
 0,5% (v/v) 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 8.0)

2.4.3.2 Hochdruck-Chromatographie – Analyse der Biman-Derivate

Nach dem in Kapitel 2.4.2.2 beschriebenen Aufschlussverfahren wurden die Proben mittels HPLC auf die enthaltenen Biman-Derivate untersucht. Dafür wurden je 100 µl der Probe injiziert und bei einer Flussrate von 1,5 ml/min unter isokratischen Bedingungen bei 14% Laufmittel B aufgetrennt. Da Biman-Derivate fluoreszieren,

können sie – nach der Auftrennung in der HPLC – bei einer Wellenlänge von 390 nm angeregt und durch Lichtemission bei 480 nm quantifiziert werden.

Laufmittel A: 0,25% (v/v) Essigsäure pH 3,9

Laufmittel B: 100% Methanol

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Proteinextraktion

Für die Analyse des Zellrohextraktes von *S. cerevisiae* wurden stets $1,5 \cdot 10^8$ Zellen geerntet (16.000xg, 4°C, 5 min), mit dH₂O gewaschen und das Pellet in 240 µl 50 mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert. Nach Zugabe von 60 µl des fünffachen Aufschlusspuffers erfolgte eine zehnmünütige Inkubation auf Eis. Die Fällung der Proteine erfolgte mit Trichloressigsäure (TCA). Dafür wurde zu den Proteinlösungen TCA in einer Endkonzentration von 14% gegeben und für 30 min bei -20°C inkubiert. Danach wurden die Proteine durch eine Zentrifugation bei 16.000xg für 30 min pelletiert, mit ca. 500 µl eiskaltem 80%igen Aceton gewaschen und erneut für 30 min bei 16.000xg zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in 100 µl 1xLaemmli-puffer (Kapitel 2.5.3) aufgenommen. Die Proben wurden für 5 min bei 100°C gekocht. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden je 10 µl der Proteinproben auf das SDS-Gel aufgetragen.

Aufschlusspuffer (5x): 1,25 mM NaOH
 5% β-Mercaptoethanol

2.5.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentrationsbestimmungen erfolgten mit dem Bio-rad DC-Protein-Assay nach den Angaben des Herstellers. Die Eichgerade wurde mit BSA erstellt.

2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde die Methode der diskontinuierlichen Elektrophorese nach (Laemmli, 1970) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde in Elektrophorese-Einheiten (PerfectBlue Doppelgelsystem Twin ExW S) der Firma peqlab mit einem 12- bzw. 10%igen Trenngel und einem 4%igen Sammelgel durchgeführt. Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben mit

Laemmli-Puffer versehen und für 5 min bei 95°C gekocht. Der Gellauf erfolgte im Sammelgel bei 80V und im Trenngel bei 120V.

	12% Trenngel	10% Trenngel	4% Sammelgel
Acrylamidlösung	4,0 ml	3,35 ml	390 µl
dH ₂ O	3,35 ml	4,0 ml	2,3 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	255 µl
10% SDS	100 µl	100 µl	30 µl
TEMED	5 µl	5 µl	3 µl
APS	50 µl	50 µl	15 µl
Gesamtvolumen	10 ml	10 ml	3 ml

Acrylamidlösung: 30% (w/v) Acrylamid / 0,8% (w/v) Bisacrylamid
Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
SDS-Lösung: 10% (w/v) SDS
TEMED: unverdünnt
APS-Lösung: 10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)
Elektrodenpuffer (1x): 25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1% SDS
6xLaemmli-Probenpuffer: 0,3 M Tris/HCl, pH 6,8
10% (w/v) SDS
30% (v/v) Glycerol
0,1% (w/v) Bromphenolblau
100 mM DTT

2.5.4 Verwendete Größenstandards

Protein Marker prestained, Broad Range (NEB, Biolabs)

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)

2.5.5 Coomassie-Färbung

Das SDS-Gel wurde für mindestens 1 h in der Coomassie-Färbelösung unter Schütteln inkubiert. Für die Entfärbung des Hintergrundes wurde das Gel zuerst für 1-3 h im Entfärber 1 und im Anschluss im Entfärber 2 unter Schütteln inkubiert.

Färbelösung:	0,2 g Coomassie R250
	0,05 g Coomassie G250
	10% Essigsäure
	0,8% EtOH
Entfärber 1:	10% Essigsäure
	45% EtOH
Entfärber 2:	7% Essigsäure

2.5.6 Western Blot

Nach der SDS-Page wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (Whatman, Schleicher&Schuell, Protran, Drassel, Deutschland) im semi-dry Blotverfahren transferiert. Die Membran und sechs Lagen Filterpapier wurden auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten und in Transferpuffer gelegt. Auf die Blotapparatur (Anode) wurden luftblasenfrei zuerst drei Lagen Filterpapier, dann die Membran, anschließend das SDS-Gel und abschließend wieder drei Lagen Filterpapier gelegt. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 25V.

Transferpuffer:	25 mM Tris/HCl
	192 mM Glycin
	20% Methanol
	pH-Wert auf 8,3 einstellen.

2.5.7 Immunologischer Nachweis

Nach dem Transfer wurde die Membran entweder für 1 h oder üN bei 4°C in der Blockierungslösung inkubiert. Dadurch konnten unspezifische Bindungsstellen des primären Antikörpers auf der Membran abgesättigt werden. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran für 1 h oder üN bei 4°C mit dem primären Antikörper (Kapitel 2.5.8). Nach dem Waschen (3x5 min) in 1x TBS/T, wurde die Membran für 1 h im sekundären Antikörper (Kapitel 2.5.8) geschwenkt, bevor sie abschließend drei Mal für 15 min in 1x TBS/T gewaschen wurde. Die Detektion erfolgte mit dem Pierce Super Signal West Femto Trial Kit nach den Angaben des Herstellers. Die Lichtdetektion erfolgte mit einer CCD-Kamera (ORCAII ERG, Hamamatsu Photonics,

http://jp.hamamatsu.com) und der SimplePCI Imaging Software (Version 5.0.0.1503, Compix Inc., Imaging Systems, USA).

TBS (10x): 1,5 M NaCl
 0,2 M Tris/HCl pH 7,5

TBS/T: 1x TBS
 0,05% Tween 20

Blockierungslösung: 5% (w/v) Milchpulver in 1xTBS/T

2.5.8 Verwendete Antikörper

Primärer Antikörper	Firma/Quelle	Verdünnung in Western Blot-Analyse
Mouse-anti- α -GFP	Santa-Cruz (USA)	1:1.000
Rabbit-anti- α -AtPCS1	Picault et al., 2006	1:2.500

Sekundärer Antikörper	Firma/Quelle	Verdünnung in Western Blot-Analyse
Goat-anti mouse	Pierce (USA)	1:10.000
Goat-anti rabbit	Pierce (USA)	1:10.000

2.6 Fluoreszenzmikroskopie

2.6.1 Mikroskop

Für die mikroskopischen Aufnahmen wurde das inverse konfokale Mikroskop Fluoview FV1000 und das motorisierte aufrechte Mikroskop BX61 der Firma Olympus verwendet. Zum Einsatz kamen bei der inversen Mikroskopie der Argonlaser mit $\lambda = 405$ nm (MCB) und der Argonlaser mit $\lambda = 488$ nm (eGFP, FM4-64). Die Vergrößerung erfolgte mit dem 60er Objektiv (LUMPLFL: 60x/1,1 Wasser, *working distance*: 2mm) bzw. mit dem 100er Objektiv (UPLFLN: 100x/1,3 Öl, Ph3, *working distance*: 0,2mm).

2.6.2 Probenvorbereitung

Für die Untersuchungen zur zellulären Lokalisation der eGFP-Konstrukte und der Biman-Derivate wurden die entsprechenden Hefesuspensionen kurz zentrifugiert, in dH₂O aufgenommen und auf den Objektträger pipettiert. Nach dem Auflegen des

Deckglases wurden die Proben unverzüglich mit dem jeweils angegebenen Mikroskop und entsprechenden Lasern bzw. Filtern analysiert.

2.6.3 Färbung der Vakuolenmembran mit FM4-64

Für die Visualisierung der Vakuolenmembran wurden die Hefezellen mit 2 µl FM4-64 für 45 min bei 30°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit YPD Medium wurden die Zellen in 1 ml Medium resuspendiert und für weitere 30 min bei 30°C inkubiert.

FM4-64 (Molecular Probes): 0,33 mM in 67% DMSO

2.7 Geräte und Chemikalien

2.7.1 Geräte

Gerät	Modell	Firma
Blotaparatur	Trans-Blot semi dry	BioRad
CCD-Kamera	ORCAII ERG	Hamamatsu Photonics
Feinwaage	Handy	Sartorius analytic
Fluoreszenzmikroskop	Fluoview FV1000	Olympus
Fluoreszenzmikroskop	BX61	Olympus
Gelelektrophoreseapparatur	E844 (400 V-400 mA)	Consort
HPLC	Summit	Dionex
Inkubator	ED 53	WTC Binder
Inkubator	IPP 400	Memmert
Laminar Flow Workstation		Microflow
Magnetrührer	Stuart	Bibby
Minibeadbeater		Biospec Products, Bartlesville,
PCR-Cycler	Tgradient	Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
pH-Meter	pH 526	WTW

Photometer	Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrometer	Pharmacia Biotech, Freiburg
Photometer	Reprostar 3	Camag
SDS-Gelelektrophorese-Apparatur	PerfectBlue Doppelsystem Twin ExW S	peqlab
Thermomixer	comfort	Eppendorf
Thermoshaker	Laboshake	Gerhardt
Tischzentrifuge	5415D	Eppendorf
UV	P91D	Mitsubishi
Vortexer	MS1	IKA
Waage	BP 3100 S	Sartorius
Zentrifuge	Avanti J-25	Beckmann Coulter

2.7.2 Chemikalien / Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden - soweit nicht anders angegeben - von den Firmen Roth (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München), MBI Fermentas (St. Leon-Roth) und J.T. Baker (Deventer, Holland) in pA- bzw. HPLC-Gradienten-Qualität bezogen. Die Modellsubstrate MCB und MBB stammten von der Firma Calbiochem (San Diego, USA).

2.7.3 Enzyme

Enzym	Firma
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas
Taq Polymerase	MBI Fermentas
High Fidelity Taq	Roche (Mannheim)
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
RNase A	Roth
Carboxypeptidase Y	Fluka

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung der Phytochelatin-Biosynthese in *S. cerevisiae*

Die Entgiftung von Schwermetallen wie Cadmium, Kupfer und Arsen erfolgt in vielen Organismen durch die Biosynthese von Phytochelatinen (Maitani et al., 1996; Schmöger et al., 2000). Dazu zählen nicht nur mehrzellige Organismen wie *A. thaliana* (Howden et al., 1995b) und *C. elegans* (Vatamaniuk et al., 2001), sondern auch eukaryotische Einzeller wie beispielsweise *S. pombe* (Clemens et al., 1999). In allen untersuchten Spezies konnte die Bildung der PCs auf die Aktivität eines PCS homologen Proteins zurückgeführt werden. Obwohl die Bäckerhefe *S. cerevisiae* genau wie *S. pombe* zu der Klasse der Ascomyceten gehört, ergaben Sequenzvergleiche mit ihrem Genom kein strukturelles Homolog. Dennoch zeigten physiologische Untersuchungen, dass auch *S. cerevisiae* in der Lage ist nach Aufnahme von Schwermetallen PCs zu bilden. Somit stellt sich die Frage, wie in diesem Organismus die Biosynthese der metall-komplexierenden Peptide realisiert wird. In diesen Prozess könnten entweder Proteine der GSH Biosynthese (Hayashi et al., 1992) oder die vakuolärer Carboxypeptidase Y (Imai et al., 1996) involviert sein. Analysen von Andreas Beck zeigten, dass die Carboxypeptidase Y (CPY) in der Lage ist, *in vitro* PCs zu synthetisieren.

3.1.1 Die Phytochelatinsynthese *in vitro*

Anhand von Vorversuchen ließ sich zeigen, dass die aus *S. cerevisiae* aufgereinigte Carboxypeptidase Y (CPY) die Synthese von Phytochelatinen allein in Gegenwart von GSH und einem Reduktionsmittel (β -Mercaptoethanol) katalysieren kann. In einem getesteten pH-Bereich von 3,0 bis 11,0 zeigte sich ein ausgeprägtes Maximum der Enzymaktivität bei pH 6,0 - 6,5 (Abb. 8A). Dabei ließen sich nur PCs bis zu einer Kettenlänge von $n=2$ nachweisen, wobei maximal 1,0% des GSH-Substrates zu PC_2 reagierte. Die Identität der Peptide wurde mittels LC-MS verifiziert. Im Gegensatz zu der Abhängigkeit der PC-Synthese durch Schwermetalle in Pflanzen, ließ sich die Synthese der PCs durch die CPY nicht mit Cd^{2+} -Ionen beeinflussen (Abb. 8B). Somit scheint die CPY-Aktivität schwermetall-unabhängig zu sein.

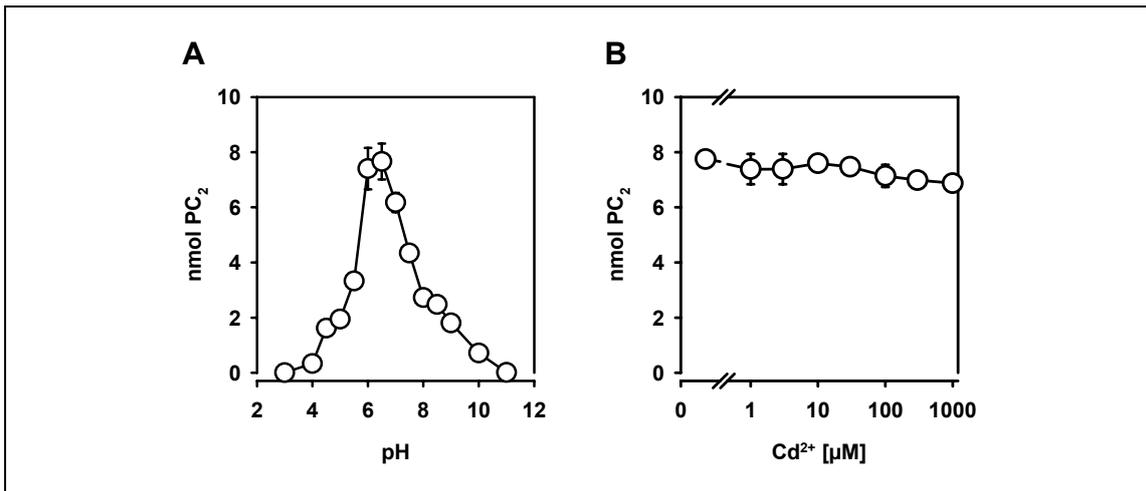


Abb. 8 Die CPY katalysierte PC₂-Synthese *in vitro*

Die dargestellten Versuche wurden in 100 mM Puffer mit 80 mM GSH, 10 mM β-Mercaptoethanol und 0,15 Units CPY in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 90 Minuten bei 30°C im Wasserbad durchgeführt. Um Oxidationen zu vermeiden, wurden die Ansätze mit N₂ überschichtet. Die Werte stammen aus einer Dreifachbestimmung. Für die Bestimmung der pH-Abhängigkeit (A) fand ein Citrat-Phosphat-Borat-Puffer (pH 3,0 - 11,0) Anwendung. Der Einfluss der Cd²⁺-Ionen auf die PC-Synthese mit CPY wurde bei pH 6,0 (Citrat-Puffer) nach Zugabe von 0,1 M Cd(NO₃)₂ in den entsprechenden Konzentrationen analysiert (B). Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 310 µl 0,1%iger TFA. Danach wurden die Proben für 5 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (16.000xg, 5 min). Der Überstand wurde mit Hilfe der HPLC analysiert.

3.1.2 Die Phytochelatinsynthese *in vivo*

3.1.2.1 Die Beteiligung der Carboxypeptidase Y

Um die erhaltenen Befunde der *in vitro* Analysen *in vivo* zu bestätigen, sollte die PC-Synthese des Wildtyps mit der Deletionsmutante für die CPY (Δcpy) verglichen werden. Für die Konstruktion des Δcpy Stammes erfolgte die Disruption des CPY Gens im Wildtyp BY4741 nach der in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Methode. Von den erhaltenen Transformanten wurde die genomische DNA isoliert und mittels PCR-Analysen die korrekte Insertion des *HIS3* Selektionsmarkers in die kodierende Sequenz des CPY Gens bestätigt.

Die höchste Induktion der PC-Synthese bei pflanzlichen Organismen ließ sich bisher durch Cd²⁺-Ionen hervorrufen (Zenk, 1996). Deswegen sollten auch bei den folgenden Experimenten Cadmium in Form von Cd(NO₃)₂ als Stressfaktor für die Hefezellen verwendet werden. Die bisherigen Analysen der PC-Synthese im Wildtyp erfolgten nach 24-stündiger Inkubation mit Cd²⁺-Ionen. Um einen genaueren Einblick in die PC-Synthese des Wildtyps und der Einzelmutante zu erhalten, wurde anfangs eine kinetische Studie beider Stämme in An- und Abwesenheit von 100 µM Cd²⁺

aufgenommen. Die Inokulation der Hauptkulturen erfolgte mit einer $\bar{u}N$ -Kultur, sodass eine $OD_{600}=0,1$ eingestellt wurde. Nach dreistündiger Inkubation wurden $100 \mu\text{M Cd}^{2+}$ -Ionen zugesetzt und die Zellen weiterhin unter Schütteln inkubiert. Nach 0, 4, 9, 18 und 24 Stunden wurden jeweils die Zellen aus den entsprechenden Kolben durch Zentrifugation geerntet, der Zellrohextrakt isoliert und mittels HPLC hinsichtlich ihres GSH- und PC-Gehaltes analysiert (Abb. 9).

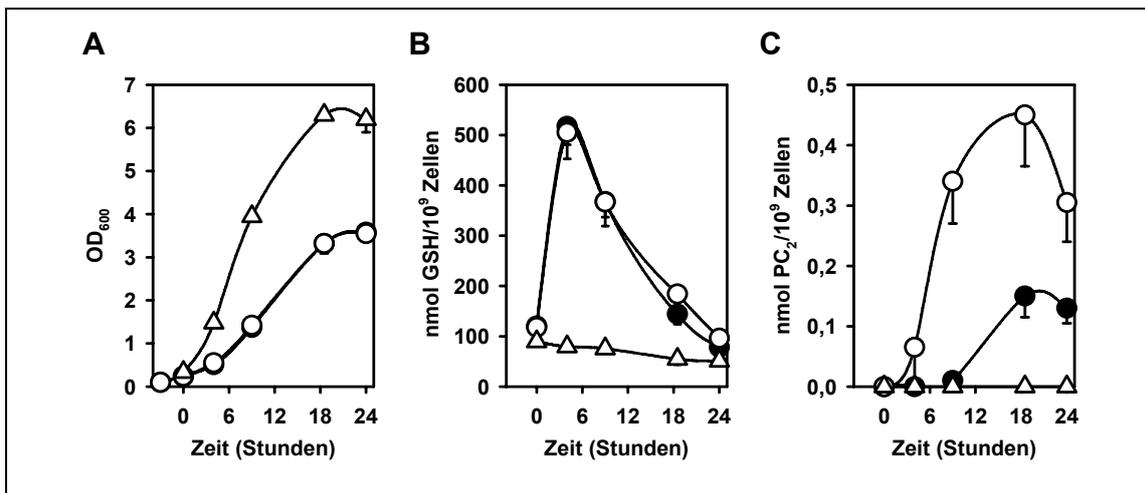


Abb. 9 Vergleich von Wildtyp und Δcpy nach Belastung mit $100 \mu\text{M Cd}^{2+}$

Zellen vom Wildtyp-Stamm (○) und der Δcpy Einzelmutante (●) wurden in der exponentiellen Wachstumsphase mit $100 \mu\text{M Cd}^{2+}$ belastet. Als Vergleich wurde eine unbelastete Wildtyp-Kontrolle (Δ) mitgeführt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und ihre OD_{600} bestimmt (A). Die Analyse der entsprechenden Zellrohextrakte erfolgte nach der Auftrennung mit Hilfe der HPLC in Bezug auf den GSH-Gehalt (B) und die synthetisierten PC₂-Mengen (C). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Beim Vergleich der beiden Stämme ließen sich hinsichtlich ihres Wachstums und ihres GSH-Gehaltes nach Cd^{2+} -Belastung keine Unterschiede feststellen (Abb. 9A,B). Nach 24 Stunden hatte sowohl der Wildtyp als auch die Einzelmutante eine OD_{600} von 3,5 erreicht, was ungefähr 50% des Wachstums der Kontrolle ohne Cd^{2+} -Zugabe entspricht (Abb. 9A). Hinsichtlich des GSH-Gehaltes war innerhalb der ersten drei Stunden nach Schwermetallzugabe ein fünffacher Anstieg der Konzentration bei beiden Stämmen zu verzeichnen. Innerhalb von 24 Stunden relativierte sich der Spiegel wieder auf das Niveau der unbelasteten Kontrolle (Abb. 9B). Deutliche Unterschiede ließen sich in Bezug auf die PC-Synthese zwischen den Stämmen erkennen. Der Wildtyp zeigte bereits drei Stunden nach Cd^{2+} -Zugabe eine Anreicherung an PC₂ und erreichte nach 10 bis 20 Stunden das Maximum von ca. $0,4 \text{ nmol}/10^9$ Zellen. Bei der Einfachmutante ließen sich erst nach 10 Stunden Cd^{2+} -Belastung geringe PC₂-Mengen beobachten. Nach ca. 20 Stunden war der Nachweis von PC₂ mit einer Konzentration von $0,15 \text{ nmol}/10^9$ Zellen möglich, was etwa 30% des Wildtyps entsprach. In beiden

Stämmen konnten ohne Cd^{2+} -Ionen keine PC_2 Moleküle nachgewiesen werden. Des Weiteren ließen sich auch in Anwesenheit von Cd^{2+} keine längerkettigen PCs detektieren.

Obwohl die *in vitro* Versuche mit der CPY keine Induktion der PC_2 -Synthese durch eine erhöhte Schwermetallkonzentration zeigten (Abb. 8), sollte dieser Befund *in vivo* verifiziert werden. Dafür wurden jeweils 50 ml einer Hauptkultur mit einer ΔN -Kultur des Wildtyps bzw. der Einzelmutante Δcpy auf eine $\text{OD}_{600}=0,1$ inokuliert. Nach drei Stunden erfolgte die Zugabe von 0, 30, 100 bzw. 300 μM Cd^{2+} . Die vorangegangenen Versuche (Abb. 9) zeigten eine maximale PC_2 -Produktion beim Wildtyp zwischen 10 und 20 Stunden nach der Belastung mit Cd^{2+} -Ionen. Aufgrund dessen erfolgte die Ernte der Zellen für den nachfolgenden Versuch nach 18 Stunden Inkubation mit Schwermetall-Ionen. Der Zellrohextrakt wurde isoliert und mittels HPLC hinsichtlich GSH- und PC-Gehalt analysiert (Abb. 10).

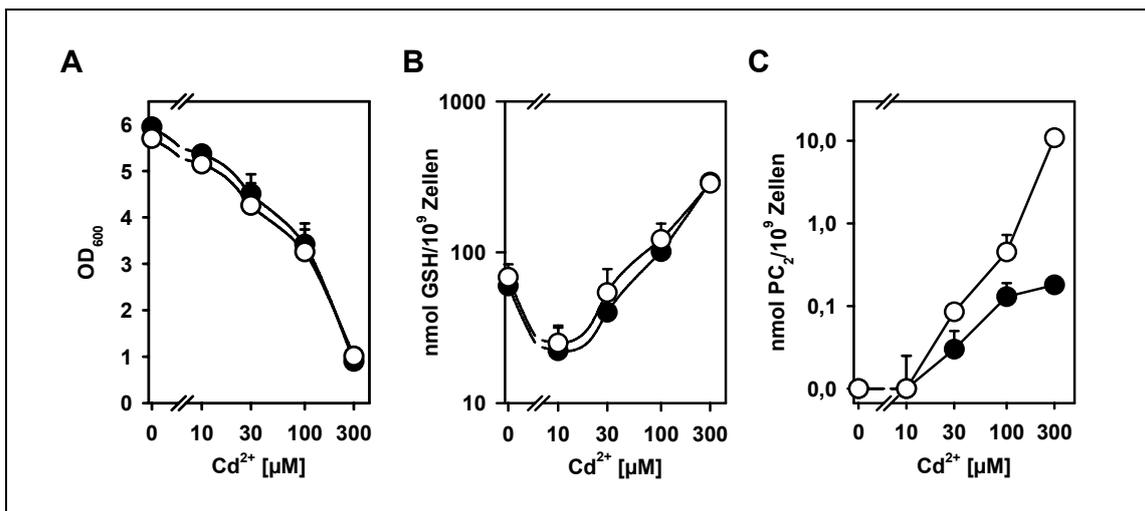


Abb. 10 Vergleich von Wildtyp und Δcpy nach Belastung mit variablen Cd^{2+} -Konzentrationen.

Die Zellen vom Wildtyp-Stamm (○) und der Δcpy Einzelmutante (●) wurden in der exponentiellen Wachstumsphase mit den angegebenen Konzentrationen an Cd^{2+} belastet. Nach 18 Stunden wurde die OD_{600} gemessen (A) und die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Die Analyse der Zellrohextrakte erfolgte nach Auftrennung mit der HPLC auf den GSH-Gehalt (B) und die synthetisierten PC_2 (C). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Erneut ließen sich zwischen dem Wildtyp und der Δcpy keine Unterschiede im Wachstum und im GSH-Gehalt erkennen (Abb. 10A,B). Die steigende Konzentration an Cd^{2+} -Ionen führte bei beiden Stämmen zu einer Hemmung des Wachstums und zu einer Erhöhung des GSH-Spiegels. Die Belastung mit 300 μM Cd^{2+} beispielsweise resultierte in einer 80%igen Reduzierung des Wachstums und in einem fünffachen höheren GSH-Pool im Vergleich zur unbelasteten Kontrolle. Deutliche Unterschiede

waren hinsichtlich der PC₂-Synthese zu beobachten. Zwar ließ sich bei beiden Stämmen eine Zunahme der PC₂-Konzentration mit steigender Cd²⁺-Belastung feststellen, jedoch offenbarten sich hohe Konzentrationsunterschiede. Während mit 30 µM Cd²⁺ der Wildtyp nur etwa das Doppelte der PC₂-Konzentration der Δ*cpy* Mutante zeigte, war nach Belastung mit 300 µM Cd²⁺ die 50fache Menge erkennbar. Die maximale Konzentration lag im Wildtyp bei 10 nmol PC₂/10⁹ Zellen und in der Einfachmutante bei 0,2 nmol/10⁹ Zellen. Alle getesteten Cadmium-Konzentrationen induzierten nachweislich weiterhin nur die PC-Synthese bis zu PC₂.

Die vorliegenden Daten belegten die PC₂-Synthese in *S. cerevisiae* nach Belastung mit Cd²⁺-Ionen. Durch den funktionellen Verlust der CPY konnte zwar eine 70%ige Reduzierung der PC-Synthese erreicht werden, allerdings kam es zu keiner kompletten Inhibierung. Mit Hilfe von LC-MS-Analysen ließ sich auch in der Δ*cpy*-Mutante eine verbleibende Menge an PC₂ mit einer Masse-zu-Ladungszahl von 540 bestätigen. Aufgrund dieser Befunde war davon auszugehen, dass es noch eine weitere enzymatische Aktivität gibt, welche an der Synthese von PCs in der Hefe beteiligt ist.

3.1.2.2 Beteiligung der Carboxypeptidase C

Anhand von Sequenzvergleichen und Datenbankrecherchen nach CPY-ähnlichen, enzymatischen Aktivitäten ließ sich im Genom von *S. cerevisiae* ein strukturelles Homolog für die CPY finden. Der entsprechende ORF (YBR139w) kodiert für eine putative vakuoläre Serin-Carboxypeptidase mit C-Aktivität. Die Aminosäuresequenz des Proteins (CPC) weist eine 54%ige Identität und eine 64%ige Ähnlichkeit zur Aminosäuresequenz der CPY auf (Saccharomyces Genome Database, Abb. 11).

	1	50	100
YMR297W	MKAFTSLLCGLGLSTTAKAISHQRPLGLDKDVLVLAQAEKFGLDLDDLHLLKELDSNVLDAWAQLEHLYENOVMSLETSTKPKFPEAIKTKKDWDEYVVKV		
YBR139WMKYINLVFVLDQLLISIKYASFGRAFSLEEDDTTFANLDK.....QL..KLEQNTQQTLLKLDRLNHDDPL.....ETTFE		
	101	150	200
YMR297W	DALENYQLRVNKKIDPKIKLIGIDPNVIOYTYGILDVEDEDKHFBEWTFESRNDPAKDPVILWLNGGPGCSSITGLLEFELGPSSIGEDIKPTENPYSWNSNAT		
YBR139W	SSVDYDYSLRLRVDEBSKLGID.TVKQNSGYMDYKDS.KHFBEWTFESRNDPAKDPVILWLNGGPGCSSITGLLEFELGPSSIGEDIKPTENPYSWNSNAT		
	201	250	300
YMR297W	VIEFLDOPVNVGFSYSGSSGVSNTVAAGKDVVNELELEFDQFPEYVNGGQDFHIIAGESYAGHYIPVFASETLL.SHKDRNFNLTSVLIGNGLTDPLTOYNY	*	
YBR139W	MIEFLDQPLGVGFSY.GDERVSSIKLAGKDAVIFLELEFPAFPHL..RSNDFHIIAGESYAGHYIPVFASETLL.SHKDRNFNLTSVLIGNGLTDPLTOYNY		
	301	350	400
YMR297W	EEMACGEGGEPVLPSEECSAMEDSLERCLGLIESCYDSOSVWSVYPATIVCNNAQLAPYQRTGKRVNVDIRKDCGEGN..ICVPTLQDIDDYINQDYVK		
YBR139W	EEMACGKGGYHPVLSSEECCKMSKAAGRCRRRLNKLCTYASKSLEPLVATAVCDSSALLEPYINTGKRVNVDIRGCEEDNSTDGMCTYTGTRYVDOIMNFEPEVQ		
	401	450	500
YMR297W	EAVCAEVDVHYEACNFDLNRNLEFAGDWMKPYHTAVTDLLENQDLPLLVVAGDKDEICNWLGNKAWTDVLPWKYDEEFASQKVENWIASITDEVAAGEVKSVMK	*	
YBR139W	EITLGSVDVHNYSGCDNDVFTGFLTEGDSKPEQQYLAELLNHNLEPVITVAGDKDVICNWLGNKAWTDVLPWKYDEEFASQKVENWIASITDEVAAGEVKSVMK		
	501	546	
YMR297W	HEFTYLRVENGHGMVPRDVPENALSMVNEWTIHGGSLSL.....		
YBR139W	PEFTLRVYDAGHMVPRDQPEASLEMVNSWTISGNRAFSDLSTLENAS		

Abb. 11 Protein alignment der zwei Carboxypeptidasen CPY und CPC

Die Aminosäuresequenz der Proteine CPY (Ymr297wp) and CPC (Ybr139wp) wurden mittels ClustalW verglichen. Schwarz markiert sind die identischen Aminosäuren, Grau verdeutlicht ähnliche Aminosäuren-Substitutionen. Die Punkte stellen Lücken dar. Die Aminosäuren, welche die katalytische Triade bilden, sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Die unterstrichenen Aminosäuren entsprechen der typischen Domäne für Proteine der S10-Peptidase Klasse, der Serin-Carboxypeptidasen (NCBI, *Conserved Domain Database*).

Um eine Beteiligung von CPC an der PC-Synthese zu zeigen, sollte sowohl die Einfachmutante Δcpc als auch die Doppelmutante $\Delta cpy\Delta cpc$ hinsichtlich ihrer PC₂-Synthese analysiert werden. Dafür wurde in der Einfachmutante Δcpc (Euroscarf) das CPY-Gen wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben deletiert. Von den erhaltenen Transformanten wurde die genomische DNA isoliert und mit Hilfe von diagnostischer PCR der Verlust beider Gene verifiziert.

Für die Charakterisierung der PC₂-Produktion sollte der Wildtyp, die Δcpc Einfachmutante und die $\Delta cpy\Delta cpc$ Doppelmutante verglichen werden. Die Zellen wurden dafür entsprechend angeimpft und nach 3 Stunden mit 100 μM Cd²⁺ belastet. Die Zellernte erfolgte nach 0, 12 und 24 Stunden Inkubation mit den Schwermetallionen. Die Zellrohextrakte wurden mit Hilfe der HPLC auf ihren GSH- und PC₂-Gehalt analysiert (Abb. 12).

Die Δcpc Einfachmutante und die $\Delta cpy\Delta cpc$ Doppelmutante zeigten hinsichtlich ihres GSH-Gehaltes keine Unterschiede zum Wildtyp (Abb. 12A). Bei allen drei Stämmen konnte direkt nach der Belastung mit Cd²⁺ ein GSH-Spiegel von ca. 80 pmol/10⁹ Zellen bestimmt werden. Nach 12 Stunden war ein um den Faktor 3 erhöhter GSH-Gehalt nachweisbar, der sich innerhalb der nächsten 12 Stunden auf das Niveau vor der Cd²⁺-Belastung regulierte. Der Verlust der CPC-Aktivität im Wildtyp hatte ebenso keinen Einfluss auf die PC₂-Synthese (Abb. 12). Nach 12 Stunden ließ sich sowohl im Wildtyp als auch in der Einfachmutante eine PC₂-Konzentration von ca. 1,4 nmol/10⁹ Zellen

nachweisen. Nach 24 Stunden konnte eine Reduktion des PC₂-Spiegels um ca. 50% beobachtet werden. In der Mutante für beide Carboxypeptidasen ($\Delta cpy\Delta cpc$) waren über den gesamten Zeitraum keine Phytochelatine nachweisbar (Abb. 12B).

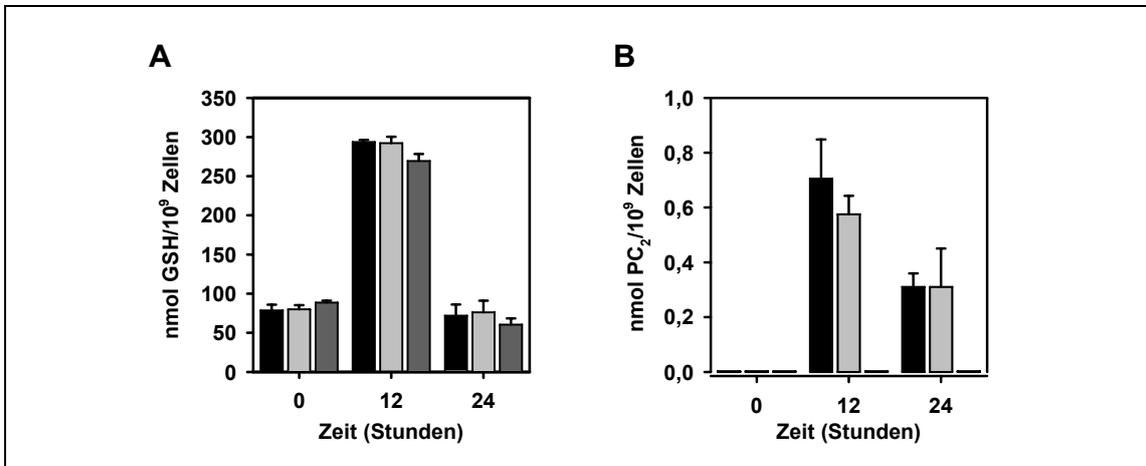


Abb. 12 Einfluss von CPC auf die PC₂-Synthese nach Cadmium-Belastung

Die Zellen vom Wildtyp (schwarz), der Einfachmutante Δcpc (hellgrau) und der Doppelmutante $\Delta cpy\Delta cpc$ (dunkelgrau) wurden in der exponentiellen Wachstumsphase mit 100 μM Cd²⁺ belastet und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Nach der Trennung der Zellrohextrakte mit Hilfe der HPLC ließen sich die GSH- (A) und die PC₂-Mengen (B) bestimmen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Ausgehend von der Cd²⁺-abhängigen PC₂-Synthese im Wildtyp und in der Einfachmutante Δcpy (Abb. 10) wurden auch die Einfachmutante Δcpc und die Doppelmutante $\Delta cpy\Delta cpc$ darauf untersucht (Abb. 13). In Bezug auf Wachstum und GSH-Gehalt waren zwischen den beiden Mutanten keine signifikanten Unterschiede festzustellen (Abb. 13A,B). Erneut zeigte sich eine starke Inhibierung des Wachstums und eine Erhöhung des GSH-Spiegels mit steigender Cd²⁺-Konzentration. Die Daten belegten weiterhin, dass auch bei höheren Cd²⁺-Konzentrationen keine PCs in der Doppelmutante synthetisiert wurden. Die Einfachmutante hingegen zeigte eine deutliche Induktion der PC₂-Synthese, vergleichbar zum Wildtyp (Abb. 13C).

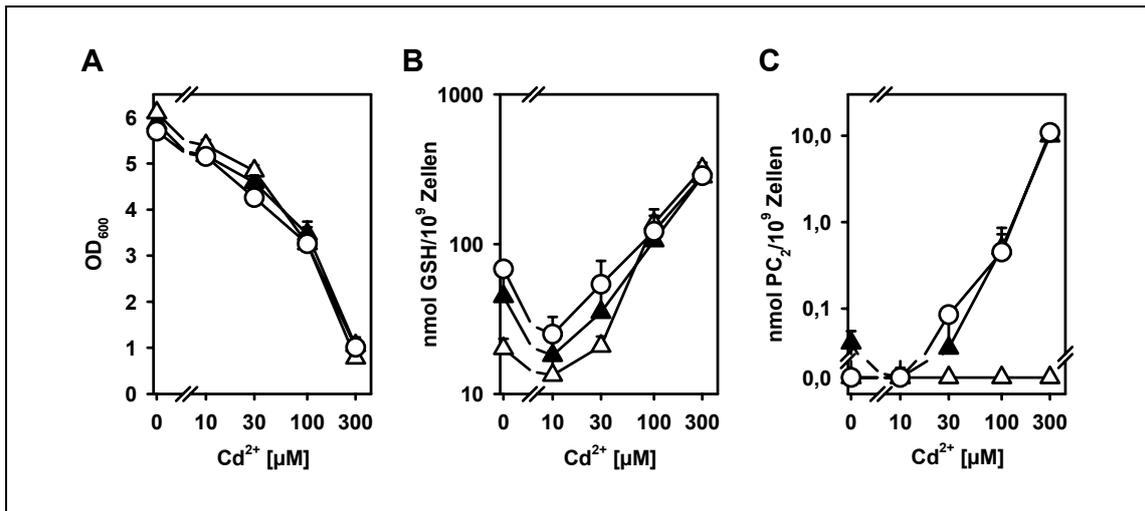


Abb. 13 Abhängigkeit der PC₂-Produktion von variablen Cd²⁺-Konzentrationen bei **Δcpc** und **ΔcpyΔcpc**

Die Zellen vom *Δcpc*-Stamm (▲), der *ΔcpyΔcpc* Doppelmutante (Δ) und des Wildtyps (○) wurden in der exponentiellen Wachstumsphase mit den angegebenen Konzentrationen an Cd²⁺ belastet. Nach 18 Stunden wurde die OD₆₀₀ gemessen (A) und die Zellen geerntet. Die Analyse der deproteinierten Zellrohextrakte erfolgte nach Auftrennung mit der HPLC auf den GSH-Gehalt (B) und die synthetisierten PC₂ (C). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Der Verlust der CPC Aktivität hatte in den Wildtyp-Zellen keinen Einfluss auf die PC₂-Biosynthese (Abb. 13C). Erst nach der zusätzlichen Deletion des *CPY* Gens konnte eine komplette Blockierung des Biosynthese-Weges erreicht werden. Selbst nach Inkubation mit hohen Cd²⁺-Konzentrationen waren keine PCs nachweisbar. Interessanterweise ließen sich bei keinem der untersuchten Mutantenstämme Wachstumsunterschiede im Vergleich zum Wildtyp feststellen. Womit bestätigt wäre, dass die PC-Synthese von *S. cerevisiae* keinen Einfluss auf die Cadmium-Toleranz der Zellen hat. Ob dies auch auf andere Schwermetall-Ionen zutrifft, soll im Folgenden untersucht werden.

3.1.3 Einfluss weiterer Schwermetall-Ionen

Nach Kneer et al. (1992) sollen nicht nur die toxischen Cd²⁺-Ionen die PC-Synthese in *S. cerevisiae* induzieren, sondern auch die essentiellen Zink- und Kupfer-Ionen. Für die Entgiftung von Kupfer-Ionen sind vor allem die so genannten Metallothioneine (MTs) in Hefe verantwortlich (Fogel und Welch, 1982; Butt und Ecker, 1987). Diese cysteinreichen Peptide werden durch das *CUP1* Gen kodiert. Für die nachfolgenden Untersuchungen sollte die Deletionsmutante für das *CUP1* Gen (*Δcup1*) miteinbezogen werden. Mit Hilfe des Tüpfeltests wurde der Wachstumsphänotyp vom Wildtyp, der

Einzelmutanten Δcpy und Δcpc , der Doppelmutanten $\Delta cpy\Delta cpc$ und der $\Delta cup1$ Mutante nach Belastung mit den Cd^{2+} -, Cu^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen verglichen (Abb. 14).

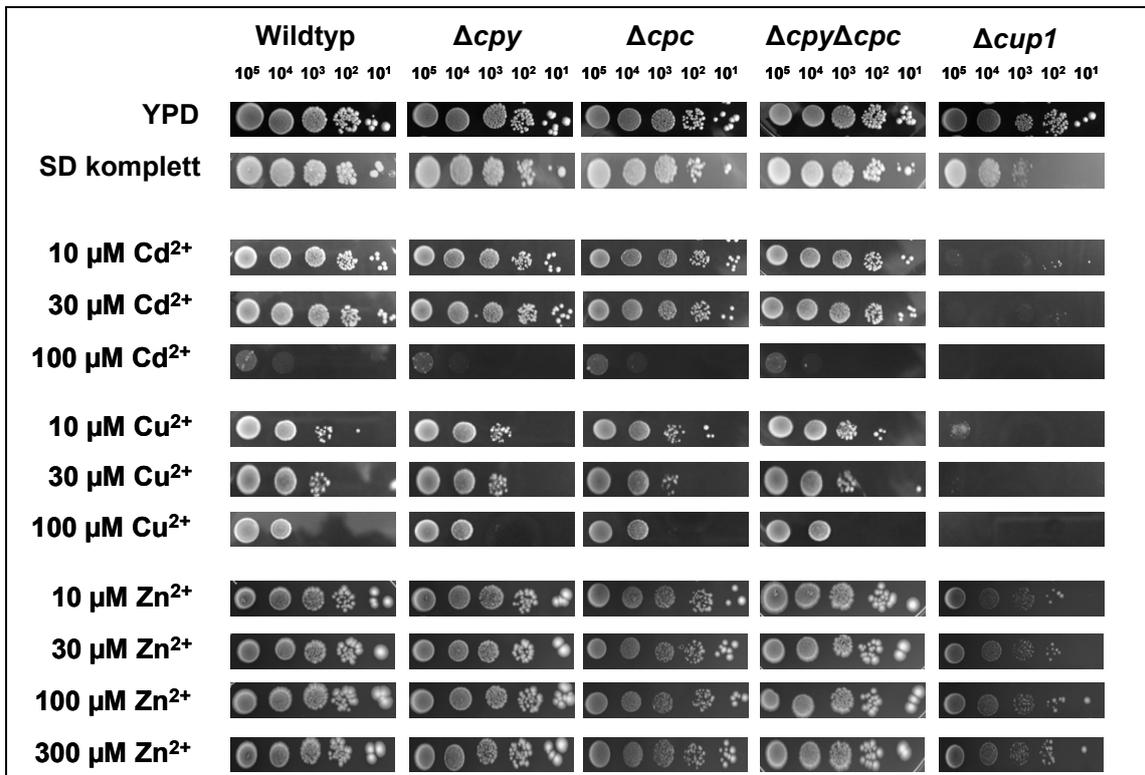


Abb. 14 Wachstumsphänotyp in Abhängigkeit von variablen Konzentrationen an Cadmium, Kupfer und Zink

Die jeweiligen Hefe-Stämme wurden $\bar{u}N$ in SD-Medium kultiviert und die angegebenen Verdünnungen auf SD-Medium mit den entsprechenden Schwermetallen aufgebracht. Die Inkubation erfolgte bei $30^\circ C$ für 4-6 Tage.

Bei allen getesteten Stämmen zeigte sich auf den schwermetallfreien Medien ein vergleichbares Wachstum. Nur bei der $\Delta cup1$ Mutante war ein leicht verzögertes Wachstum auf dem SD-Medium auffällig. Die Zugabe von Cd^{2+} -Ionen verstärkte den Effekt. Während bereits geringe Cd^{2+} -Konzentrationen das Wachstum der $\Delta cup1$ komplett inhibierten, wiesen die anderen Stämme erst einen Effekt ab $100 \mu M$ Cd^{2+} auf. Dabei war die Reduzierung des Wachstums beim Wildtyp und den Deletionsmutanten vergleichbar. Auch die Belastung mit den Cu^{2+} -Ionen führte bei der $\Delta cup1$ Mutante zu einer kompletten Hemmung des Wachstums. Die anderen Stämme zeigten erneut eine vergleichbare Beeinflussung des Wachstums durch die Metallionen. Mit steigender Konzentration war das Wachstum der Zellen gehemmt. Allerdings schienen $100 \mu M$ Cu^{2+} weniger toxisch zu wirken als die vergleichbare Konzentration an Cd^{2+} -Ionen. Bei den hier getesteten Zn^{2+} -Konzentrationen ließ sich kein Einfluss auf das Wachstum der Zellen feststellen. Auch die $\Delta cup1$ Mutante zeigte auf den Zink-Platten ein zu der unbelasteten Kontrolle vergleichbares Wachstum.

Der Verlust der PC-Biosynthese in der $\Delta cpy\Delta cpc$ Mutante führte weder nach Belastung mit Cd^{2+} - noch mit Cu^{2+} -Ionen zu einem phänotypischen Unterschied im Vergleich zum Wildtyp. Somit kann vermutet werden, dass die gebildeten PCs keine entscheidende Rolle bei der Entgiftung der genannten Metalle spielen. Ganz im Gegensatz zu den MTs. Durch den Verlust des *CUP1* Gens wirken bereits geringe Konzentrationen an Cd^{2+} und Cu^{2+} toxisch auf die Zellen. Bei der Entgiftung von Zink scheinen weder PCs noch MTs in der Hefezelle eine entscheidende Rolle zu spielen.

3.1.4 Abhängigkeit der PC-Synthese von vakuolären Transportern

Beide Carboxypeptidasen CPY und CPC weisen eine vakuoläre Lokalisation auf (Nasr et al., 1994; Huh et al., 2003). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die PC-Synthese ebenfalls in der Vakuole stattfindet. Es gibt zahlreiche Nachweise für spezielle ATP-abhängige (ABC-) Transporter, welche in der Membran der Vakuole lokalisiert sind und für den Transport von beispielsweise GSH oder GSH-Cd-Komplexen verantwortlich sind (Li et al., 1996; Li et al., 1997; Klein et al., 2002; Sharma et al., 2002). Dabei ist der Transporter Ycf1p bisher am besten charakterisiert.

Mit Hilfe der Deletionsmutante für das *YCF1*-Gen ($\Delta ycf1$, Euroscarf) sollte untersucht werden, ob der ABC-Transporter einen Einfluss auf die PC_2 -Synthese in *S. cerevisiae* hat. Dafür wurde der GSH- und PC-Gehalte des Wildtyps mit der $\Delta ycf1$ Mutante nach Cd^{2+} -Belastung verglichen. Die Ergebnisse sind in Abb. 15 dargestellt.

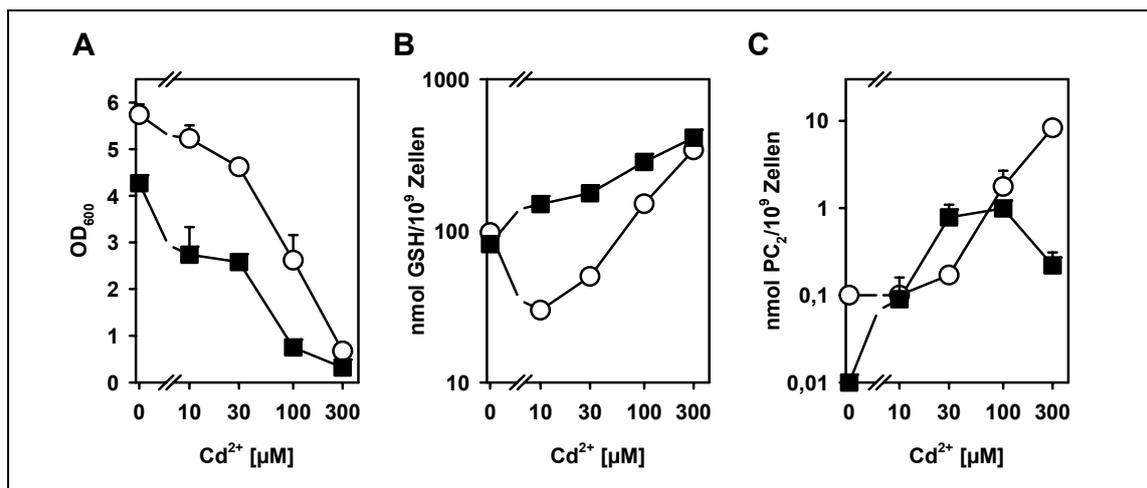


Abb. 15 Vergleich von Wildtyp und $\Delta ycf1$ nach Belastung mit variablen Cd^{2+} -Konzentrationen

Die Zellen vom Wildtyp (○) und von der $\Delta ycf1$ -Mutante (■) wurden in der exponentiellen Phase mit den angegebenen Konzentrationen an Cd^{2+} -Ionen belastet und nach 18 Stunden Inkubationsdauer geerntet. Das Wachstum der Zellen ist in (A) dargestellt. Die Zellrohextrakte wurden mit Hilfe der HPLC hinsichtlich ihres Gehaltes an GSH (B) und PC_2 (C) analysiert. Die Werte repräsentieren Dreifachbestimmungen.

Im Vergleich zum Wildtyp zeigte die *Δycf1* Mutante bereits ohne Schwermetallbelastung ein schlechteres Wachstum (Abb. 15A), obwohl die Zellen mit der gleichen OD₆₀₀ angeimpft wurden. Das Wachstum des mutierten Stammes war mit zunehmender Cd²⁺-Konzentration stets um ca. 50% im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Hinsichtlich des GSH ließ sich bei der *Δycf1* Mutante ein stark erhöhter Spiegel nach Belastung mit geringen Cd²⁺-Konzentrationen nachweisen. So war der GSH-Spiegel nach Inkubation mit 10 μM Cd²⁺ um einen Faktor 5 höher als beim Wildtyp. Nach Belastung mit 300 μM Cd²⁺ wies die Mutante nur noch den 1,2fachen GSH-Gehalt des Wildtyps auf. Die PC₂-Synthese ließ ein anderes Bild erkennen. Bei geringeren Cd²⁺-Konzentrationen von bis zu 30 μM war in der *Δycf1* Mutante eine vergleichbare bzw. leicht erhöhte PC₂-Konzentration im Vergleich zum Wildtyp nachweisbar. Höhere Konzentrationen an Cd²⁺-Ionen von 100 und 300 μM resultierten hingegen in einem geringeren PC₂-Pool. Das geringe Wachstum der *Δycf1* Zellen spiegelt die hohe Toxizität der Metall-Ionen wieder, wodurch auch die geringe Syntheserate der PCs bei höheren Cd²⁺-Belastungen im Vergleich zum Wildtyp erklärt werden könnte.

Nach weiteren Berichten gibt es noch einen zusätzlichen vakuolären Transporter, der ebenfalls für den Import von GSH-Cd-Komplexen in die Vakuole verantwortlich ist (Petrovic et al., 2000; Klein et al., 2002). Da er auch für den Import von Bilirubin zuständig ist, wurde er als Bpt1p-Transporter bezeichnet. Um zu untersuchen, ob der Verlust dieses Transporters die PC-Synthese beeinflusst, wurde sowohl die Einfachmutante *Δbpt1* als auch die Doppelmutante *Δycf1Δbpt1* analysiert.

Für die Konstruktion der Einfach- und der Doppelmutante wurde das loxP-Cre-Rekombinase-System nach Güldener et al. (2002) angewendet. Die Deletionskassette mit dem *LEU2*-Gen wurde mit den entsprechenden Primern von dem Plasmid pUG73 amplifiziert und in den haploiden Wildtyp-Stamm und die Einfachmutante *Δycf1* transformiert. Nach der Selektion der Transformanten wurde die genomische DNA isoliert und die positiven Rekombinationsereignisse mittels diagnostischer PCR nachgewiesen. Um die Mutante auch für weitere Deletionskassetten verwenden zu können, wurde sowohl mit der Einfach- als auch mit der Doppelmutante ein *Markerrescue* durchgeführt (Kapitel 2.2.6). Im Anschluss erfolgte die Analyse der Einfachmutante *Δbpt1* und der Doppelmutante *Δycf1Δbpt1* auf ihren GSH- und PC₂-Gehalt in Abwesenheit und in Anwesenheit von 30 μM und 100 μM Cd²⁺. Um den Einfluss der einzelnen Transporter auf die PC₂-Biosynthese besser zu verdeutlichen,

wurde der Wildtyp und die $\Delta ycf1$ Mutante mit in die Untersuchung eingeschlossen (Abb. 16).

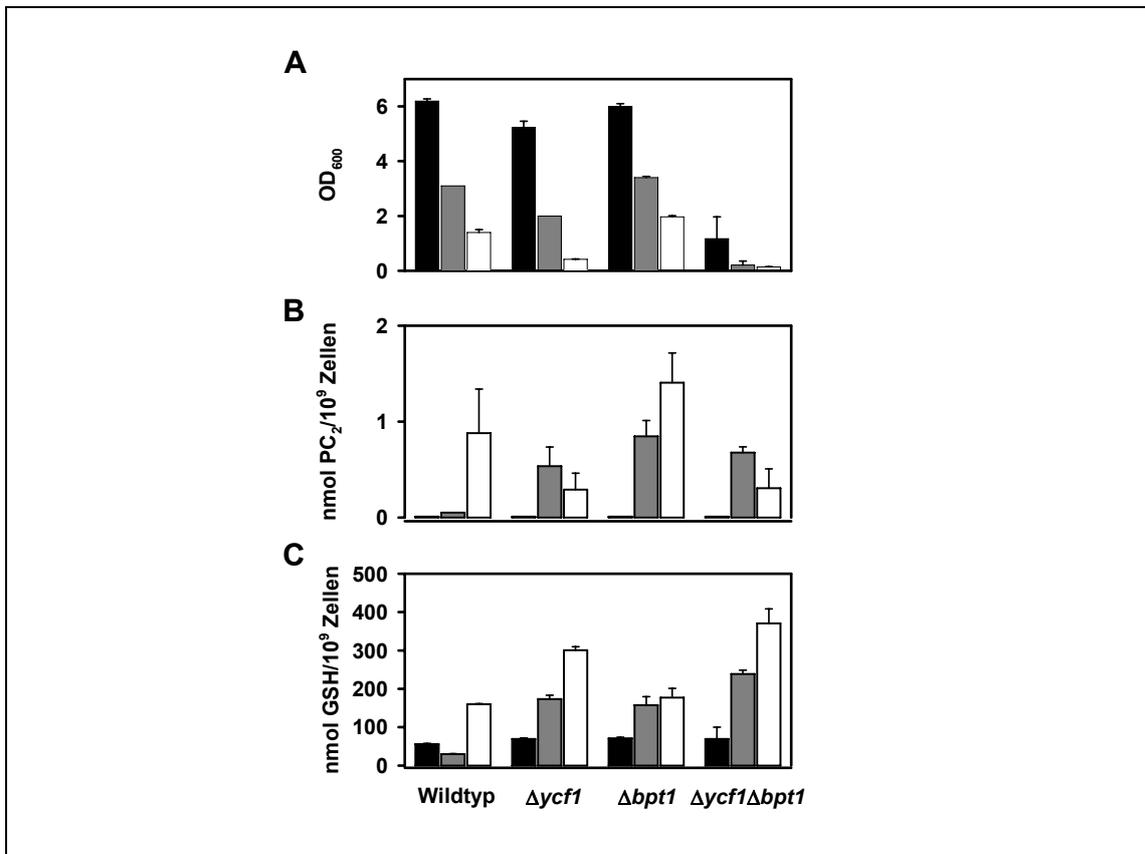


Abb. 16 Einfluss der vakuolären Transporter Ycf1p und Bpt1p auf die PC₂-Synthese

Die Zellen des Wildtyps, der $\Delta ycf1$, der $\Delta bpt1$ und der $\Delta ycf1\Delta bpt1$ Mutante wurden für 18 Stunden in Abwesenheit (schwarze Balken) bzw. in Anwesenheit von 30 μM Cd²⁺ (graue Balken) oder 100 μM Cd²⁺ (weiße Balken) inkubiert. Im Anschluss wurde das Wachstum der Zellen (A) und nach Isolation des Zellrohextraktes der Gehalt an PC₂ (B) und GSH (C) mit Hilfe der HPLC bestimmt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung.

Bei der Einfachmutante $\Delta bpt1$ waren hinsichtlich der Cd²⁺-Toleranz keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp feststellbar. Ein deutlich reduziertes Wachstum wies hingegen die Doppelmutante $\Delta ycf1\Delta bpt1$ auf. Im schwermetallfreien Medium wuchsen die Zellen um ca. 70% schlechter als beim Wildtyp. Durch Zugabe der Cd²⁺-Ionen erfolgte eine weitere Reduzierung (Abb. 16A). Interessanterweise ergaben die Analysen der $\Delta bpt1$ Mutante eine fünffache Erhöhung des PC₂- und GSH-Gehaltes nach Belastung mit 30 μM Cd²⁺. Mit 100 μM Cd²⁺ war der GSH-Spiegel zwar mit dem Wildtyp vergleichbar, trotzdem konnte eine 50%ig höhere PC₂-Konzentration nachgewiesen werden. Der PC₂-Spiegel der Doppelmutante entsprach dem der $\Delta ycf1$ Mutante. Der höhere GSH-Spiegel war vermutlich wieder auf die hohe Toxizität der Metall-Ionen zurückzuführen.

Die Daten sind im Einklang mit der Beteiligung von Ycf1p und Bpt1p an der Entgiftung von Cd²⁺-Ionen, wobei Ycf1p eine größere Rolle als Bpt1p spielen könnte. Nach dem Verlust beider Gene wirkten bereits geringe Cd²⁺-Konzentrationen toxisch für die Zellen. Allerdings hatte die verringerte Cd²⁺-Toleranz keinen Einfluss auf die PC₂- oder GSH-Synthese. Womit ein direkter Einfluss der ABC-Transporter auf die PC-Synthese in der Hefe *S. cerevisiae* ausgeschlossen werden konnte.

3.2 Der Abbau von Glutathion-S-Konjugaten in *S. cerevisiae*

3.2.1 Monochlorobiman als Modellssubstrat für die Konjugation an Glutathion

Um den Abbau von GS-Konjugaten untersuchen zu können, muss das zu konjugierende Substrat Eigenschaften aufweisen, die eine effiziente und hoch empfindliche Analytik ermöglichen. Dafür bieten sich Markierungen mit radioaktiven oder fluoreszierenden Substanzen an. Aufgrund der einfacheren Handhabung wurde in der vorliegenden Arbeit auf Fluoreszenzmarkierungen zurückgegriffen. Dafür standen zwei heterozyklische Verbindungen zur Verfügung: Monochloro- und Monobromobiman. Beide Substanzen sind nicht fluoreszierende membrangängige Moleküle, die erst nach der Reaktion mit Thiolen einen stark fluoreszierenden Komplex ergeben. Nach der Anregung bei 390 nm und der Emission bei 490 nm lassen sich, aufgrund der hohen Sensitivität der Nachweismethode und der hohen Stabilität der Konjugate, Konzentrationen bis in den picomolaren Bereich nachweisen. Die beiden Substanzen unterscheiden sich allerdings hinsichtlich ihrer Spezifität.

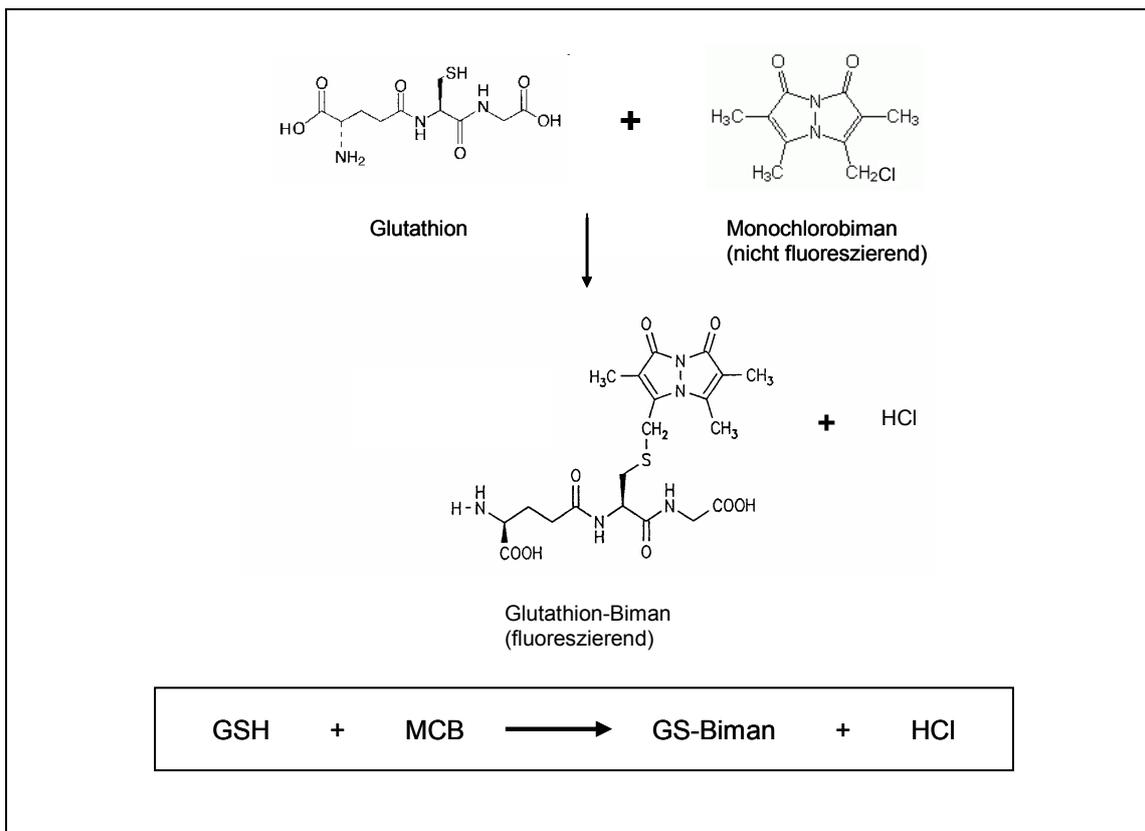


Abb. 17 Reaktion von GSH und Monochlorobiman zu einem fluoreszierenden Glutathion-S-Konjugat

Die Reaktion wird durch Glutathion-S-Transferasen katalysiert.

Monobromobiman ist sehr reaktiv und reagiert sowohl mit proteinogenem als auch mit nicht proteinogenem Schwefel. Das Chlor-Derivat weist eine geringere Reaktivität auf, wodurch in der Zelle die spezifische Markierung des Glutathions erreicht werden kann (Rice et al., 1986; Coleman et al., 1997). Zudem ließ sich zeigen, dass die Kopplungsreaktion des Monochlorobiman (MCB) mit dem GSH hauptsächlich durch die Aktivität von cytosolischen Glutathion-S-Transferasen (GST) katalysiert wird (Coleman et al., 1997; Meyer und Fricker, 2002). Die Reaktion ist in Abb. 17 dargestellt. Aufgrund der genannten Vorteile wurde MCB als Modells substrat für die Konjugation mit GSH ausgewählt.

Der Metabolismus der GS-Konjugate in Hefe soll mit Hilfe eines *pulse-chase* Versuches charakterisiert werden. Dabei ist es wichtig, den Zeitraum für die Markierung festzulegen, in dem die größtmögliche Menge an GSH markiert wird. In Keimlingen von *A. thaliana* erwies sich eine Inkubation mit 5 μM MCB über vier Stunden als nicht-toxisch für die Zellen und als ausreichend für den Nachweis des GS-Biman Abbaus mit Hilfe der HPLC (Blum et al., 2007). Aufgrund dieser Daten sollten die Hefezellen vorerst mit 5 μM MCB inkubiert werden, um den optimalen *pulse*-Zeitraum zu ermitteln.

Die Zellen des Wildtyps wurden in SD-Medium angezogen und in der frühen exponentiellen Wachstumsphase mit 5 μM MCB versehen. Zu den in Abb. 18A angegebenen Zeitpunkten wurden je 20 ml der Kultur entnommen, die Zellen geerntet und der Zellrohextrakt isoliert. Anschließend wurde die Analyse mit Hilfe der HPLC durchgeführt. Die Identifizierung und Quantifizierung der erhaltenen Peaks erfolgte anhand eines Standards (Kapitel 2.4.1.2). In Abb. 18A sind die entsprechenden Konzentrationen der nachweisbaren Biman-Derivate bezogen auf die Zellzahl (10^9 Zellen) dargestellt. Direkt nach der Zugabe des MCB ließen sich nur minimale Mengen an GS-Biman nachweisen (0,1 pmol/ 10^9 Zellen). Mit zunehmender Inkubationsdauer nahm die nachweisbare Konzentration an GS-Biman zu. So konnten bereits nach fünf Minuten 14 pmol/ 10^9 Zellen nachgewiesen werden. Innerhalb von 60 Minuten erhöhte sich die Konzentration an GS-Biman auf ca. 77 pmol/ 10^9 Zellen. Nach 20 Minuten Inkubation ließen sich weitere Peaks im Chromatogramm der HPLC erkennen. Anhand des Standards konnten diese den GS-Biman-Derivaten γ -Glutamylcystein-Biman ($\gamma\text{EC-Biman}$), Cysteinylglycin-Biman (CG-Biman) und Cystein-Biman (C-Biman) zugeordnet werden. Somit war davon auszugehen, dass bereits nach 20 Minuten Inkubation der zelluläre Abbau des GS-Bimans eingesetzt hatte.

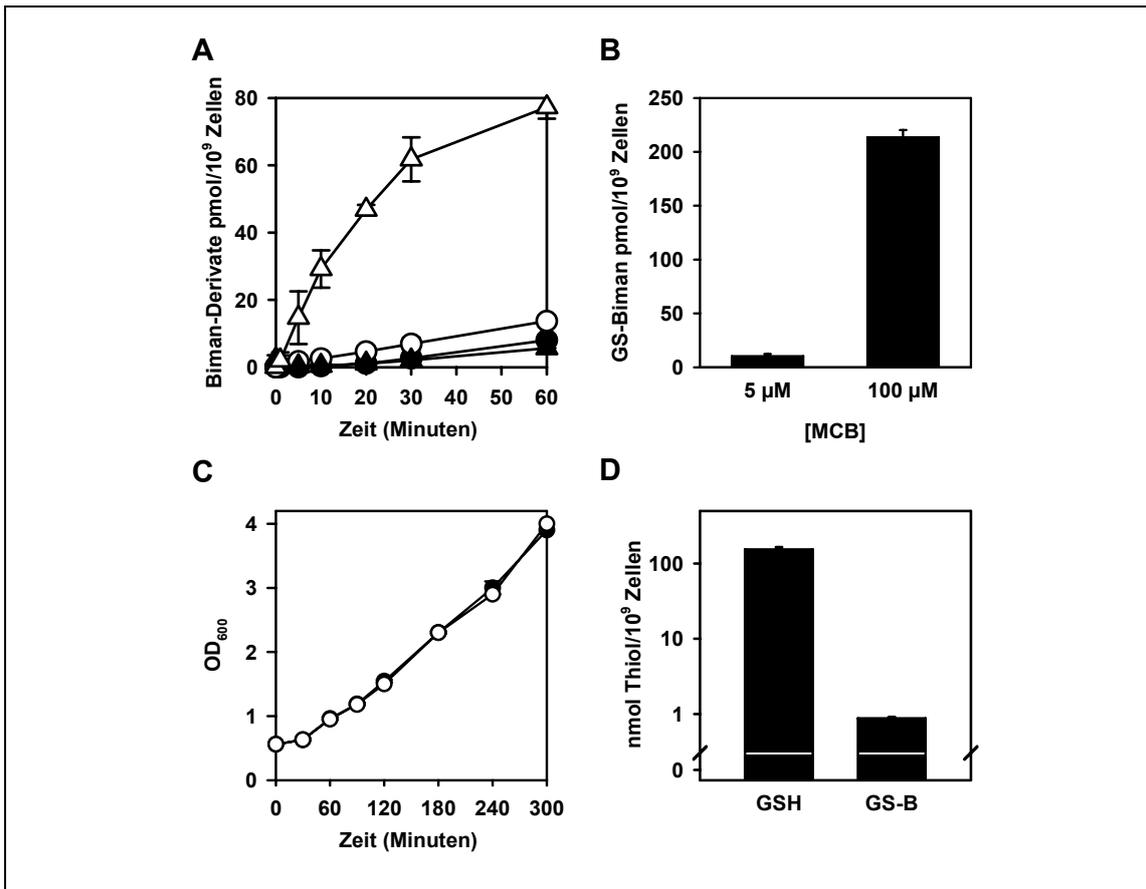


Abb. 18 Etablierung der *Pulse-Chase* Bedingungen

(A) Zeitabhängige Markierung des GSH mit 5 μM MCB. Die Zellen des Wildtyps wurden mit 5 μM MCB belastet und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Der Zellrohextrakt wurde mit Hilfe der HPLC hinsichtlich des gebildeten GS-Biman (Δ), γEC -Biman (\blacktriangle), CG-Biman (\circ) und C-Biman (\bullet) analysiert. (B) Konzentrationsabhängige Markierung des GSH mit MCB. Die Zellen des Wildtyps wurden in 20 ml Medium angezogen und entweder in diesem mit 5 μM MCB für 10 Minuten belastet oder die Zellen wurden zentrifugiert, in 1 ml Medium resuspendiert und mit 100 μM MCB für 10 Minuten belastet. Die nachweisbare Menge an GS-Biman ist dargestellt. (C) Wachstum der Wildtyp-Zellen nach Inkubation für 10 Minuten mit (\bullet) und ohne (\circ) 100 μM MCB. Die Zellen wurden anschließend mit Medium gewaschen und im Ausgangsvolumen resuspendiert. (D) Von einer Kultur mit je 10^9 Zellen des Wildtyps wurden in der frühen exponentiellen Phase mit Hilfe der HPLC der Gehalt an GSH und nach MCB-Markierung mit 100 μM MCB für 10 Minuten die gebildeten GS-Konjugate bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung.

Letztlich erwies sich ein Inkubationszeitraum von 10 Minuten als geeignet für die Charakterisierung des GS-Biman Abbaus, da noch keine Abbauprodukte in der Hefezelle nachgewiesen werden konnten. Die errechnete Menge von 29 pmol GS-Biman/ 10^9 Zellen war allerdings sehr gering, wodurch die Charakterisierung des GS-Biman-Abbaus über einen längeren Zeitraum erschwert wurde. Eine Möglichkeit, die Markierungseffizienz zu verstärken, war die Konzentration an MCB zu erhöhen. Um dies zu testen, wurde die gleiche Anzahl an Hefezellen zum einen in 20 ml mit 5 μM MCB und zum anderen in 1 ml Medium mit 100 μM MCB für 10 Minuten belastet. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen, geerntet und die Zellrohextrakte mit Hilfe

der HPLC analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 18B dargestellt. Durch die 20fache Konzentration des MCBs konnte auch die 20fache Menge an GSH markiert werden. Obwohl beide Hefekulturen mit 100 nmol MCB inkubiert wurden, ist in der zweiten Probe aufgrund der höheren Zelldichte eine effizientere Markierung des GSH zu verzeichnen. Um zu überprüfen, ob die Zugabe von 100 μ M MCB zu einer Beeinflussung der Vitalität der Hefezellen führt, wurde das Wachstum von Wildtyp-Zellen nach Belastung mit MCB mit dem Wachstum einer unbelasteten Kontrolle verglichen. Wie Abb. 18C zeigt, ließen sich keine Unterschiede zwischen beiden Proben nachweisen. Somit können toxische Effekte durch den Einsatz der höheren Konzentration des MCB ausgeschlossen werden. Um überprüfen zu können wieviel des zugegebenen MCB mit GSH reagierten, wurden je 10^9 Zellen des Wildtyps in der frühen exponentiellen Phase nach Belastung mit 100 μ M MCB parallel mit Hilfe der HPLC auf die gebildeten GS-Konjugate und den zellulären GSH-Spiegel untersucht (Abb. 18D). Dabei ließen sich ca. 150 nmol GSH/ 10^9 Zellen nachweisen, wovon ca. 0,6% durch MCB markiert werden konnten. Somit kann festgestellt werden, dass von den zugegebenen 100 nmol MCB ca. 0,9% mit GSH reagierten.

Die spezifische Markierung des GSH, der nachweisliche GS-Biman Katabolismus und die fehlende Toxizität zeigten, dass MCB ein geeignetes Modells substrat für die Charakterisierung des GS-Konjugat Abbaus darstellt.

3.2.2 Charakterisierung des GS-Biman Abbaus

Die detaillierte Analyse des GS-Biman Stoffwechsels erfolgte bisher nur im pflanzlichen System. Dabei lieferten vor allem Dauerbelastungen mit MCB in Keimlingen die ersten Erkenntnisse über den zellulären Abbau von GS-Konjugaten (Blum et al., 2007). Das Modellsystem Hefe wurde bisher nur unzureichend untersucht. Mit dem in Abb. 19 dargestellten Versuchsaufbau sollte nun auch in diesem Organismus eine detaillierte Analyse erfolgen.

Für die nachfolgenden Versuche wurden die Hefezellen in SD-Medium inokuliert und bis zur frühen exponentiellen Wachstumsphase bei 30°C inkubiert. Nach der Zellernte und Resuspension der Zellen im Medium erfolgte der *pulse* mit 100 μ M MCB für 10 Minuten. Im Anschluss wurden die Zellen einmal mit Medium gewaschen und in dem ursprünglichen Kulturvolumen resuspendiert. Unverzöglich nach der Wiederaufnahme in das Medium erfolgte die erste Probenentnahme ($t=0$) von 20 ml. Weitere Proben wurden nach 30, 60, 90, 120, 180 und 240 Minuten entnommen. Die Zellen ließen sich

durch Zentrifugation ernten und der Zellrohextrakt nach der in Kapitel 2.4.2.2 beschriebenen Methode isolieren. Die Analyse auf die enthaltenen Biman-Derivate erfolgte mit Hilfe der HPLC. Standards ermöglichten die Identifizierung und Quantifizierung der Konjugate.

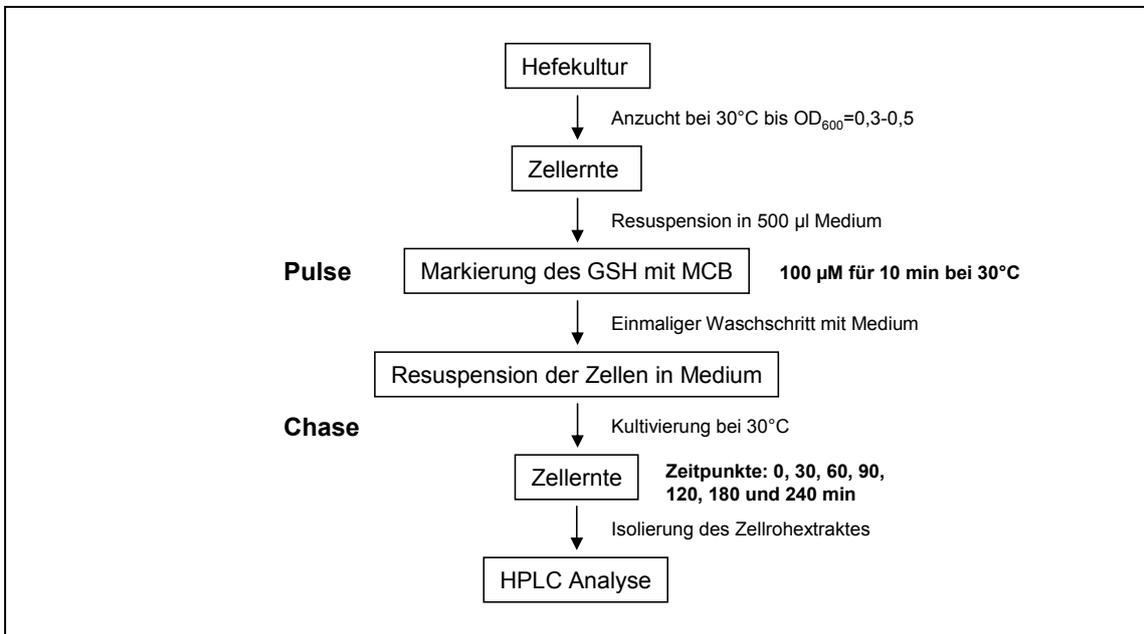


Abb. 19 Ablauf der *Pulse-Chase* Versuche für die Charakterisierung des GS-Biman Abbaus in Hefe

3.2.2.1 Der Abbau von GS-Biman im Wildtyp-Stamm

Für die initialen Analysen des Abbaus von GS-Biman Konjugaten in der Hefezelle wurde zuerst der Wildtyp-Stamm betrachtet. In Abb. 20 ist die Metabolisierung des markierten GSH in Form von GS-Biman über die Zeit dargestellt. Dabei wurden die nachweisbaren Derivate zum einen auf die Zellzahl (Abb. 20A) und zum anderen auf das entnommene Probenvolumen (20 ml; Abb. 20B) bezogen.

Beim Vergleich der beiden Abbildungen fallen deutliche Unterschiede auf. Während die Tendenz innerhalb der ersten 60 Minuten vergleichbar ist, werden mit zunehmender Inkubationsdauer in Abb. 20A geringere Konzentrationen erhalten als in Abb. 20B. Der Grund dafür ist in den unterschiedlichen Bezugsgrößen zu suchen. Bei der Umrechnung der nachweisbaren Konzentration an Biman-Derivaten auf die Zellzahl werden zwei Faktoren berücksichtigt: die Metabolisierung des GS-Biman und das Wachstum der Hefezellen. Somit kommt es zu einem multiplikativen Effekt. Innerhalb des betrachteten Zeitraums erhöht sich die Zellzahl der Hefen um den Faktor 5-6 (Abb. 18C). Der gleiche Faktor liegt zwischen der Gesamt-Biman Konzentration nach

240 Minuten in Abb. 20A und Abb. 20B. Durch den Bezug der nachweisbaren Derivate auf das Probenvolumen wird die Zunahme der Zellzahl vernachlässigt und nur die Mengenänderung der Derivate betrachtet. Für die nachfolgenden Charakterisierungen des GS-Biman Abbaus bezieht sich die Berechnung der nachweisbaren Derivate stets auf das entnommene Probenvolumen erfolgen.

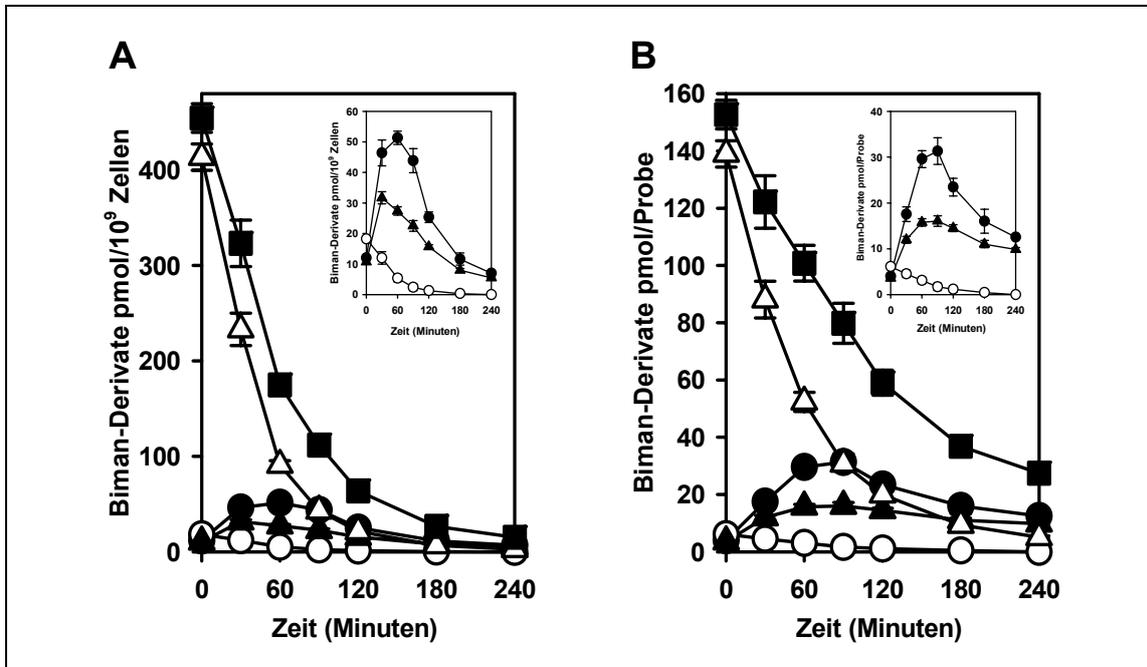


Abb. 20 GS-Biman Abbau im Wildtyp

Nachdem die Zellen des Wildtyps wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, mit MCB belastet, inkubiert und aufgearbeitet wurden, erfolgte die Analyse der Biman-Derivate nach Trennung mit Hilfe der HPLC. Nachweisbar waren GS-Biman (Δ), γ EC-Biman (\blacktriangle), CG-Biman (\circ) und C-Biman (\bullet). Zusätzlich ist noch die Summe aller Derivate (\blacksquare) aufgeführt. Die erhaltenen Mengen wurden (A) auf die Zellzahl (10^9 Zellen) und als Vergleich (B) auf das Volumen der entnommenen Probe (20 ml) bezogen. Die eingefügten Bilder weisen eine andere Skalierung auf, um die einzelnen Abbauprodukte besser zu verdeutlichen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung.

Im Wildtyp konnte zum Zeitpunkt Null ca. 90% von den nachweisbaren Derivaten dem GS-Biman zugeordnet werden (Abb. 20B). Die anderen 10% bildeten die Abbauprodukte γ EC-Biman, CG-Biman und C-Biman. Bei Betrachtung der GS-Biman Konzentration im Verlauf der vierstündigen Inkubation fiel eine stetige Abnahme der GS-Biman Menge auf. Bereits nach 30 Minuten waren nur noch 60% und nach 240 Minuten nur noch 3% der anfänglichen GS-Biman Konzentration nachweisbar. CG-Biman machte zum Zeitpunkt Null mit ca. 4% den größten Teil der Abbauprodukte aus. Im Zeitverlauf nahm die Konzentration ab, bis schließlich nach 240 Minuten kein CG-Biman mehr detektiert werden konnte. Die beiden anderen Derivate γ EC-Biman und C-Biman akkumulierten in den ersten 90 Minuten, so dass sie etwa 10 bzw. 20% der anfänglichen Konjugatmenge entsprachen. Danach sank die Konzentration auf

etwa 12 bzw. 10 pmol/Probe. Bei dem Abbau der GS-Biman-Konjugate konnte keine Akkumulation der einzelnen Derivate beobachtet werden. Vielmehr nahm die Konzentration aller nachweisbaren Produkte innerhalb des untersuchten Zeitrahmens ab. Dies spiegelt sich auch in der Gesamtmenge an detektierbaren Derivaten wieder. Nach 90 Minuten konnte ein Verlust von 50%, nach 240 Minuten sogar ein Verlust von ca. 80% des Fluoreszenzsignals beobachtet werden.

Mit den Untersuchungen im Wildtyp-Stamm konnte die Bildung und der Abbau von GS-Konjugaten aus GSH und MCB eindeutig nachgewiesen werden. Da sich sowohl γ EC-Biman als auch CG-Biman detektieren ließen, konnte ähnlich wie im pflanzlichen System von zwei divergenten Abbauwegen ausgegangen werden. Somit stellte sich die Frage, ob die Carboxypeptidasen CPY und CPC an der Spaltung des C-terminalen Cysteins beteiligt sind und den Abbau des GS-Bimans zum γ EC-Biman katalysieren.

3.2.2.2 Die Beteiligung der Carboxypeptidasen CPY und CPC am GS-Biman Abbau

Die PCS1 aus *A. thaliana* ist an zwei unterschiedlichen Stoffwechselwegen in der Pflanze beteiligt. Zum einen spielt sie eine wichtige Rolle bei der Komplexierung von Schwermetallen durch die Synthese von PCs (Grill et al., 1989; Vatamaniuk et al., 1999) zum anderen katalysiert sie die Spaltung des C-terminalen Glycins von GS-Konjugaten und ist somit ein wichtiges Enzym bei der Entgiftung von Xenobiotika (Beck et al., 2003; Blum et al., 2007). Hinsichtlich der PC-Synthese besteht folglich eine funktionelle Homologie zwischen der pflanzlichen Transpeptidase AtPCS1 und den Carboxypeptidasen CPY und CPC aus *S. cerevisiae*. In der Bäckerhefe wird die Biosynthese von PC₂ hauptsächlich durch die CPY katalysiert (Wünschmann et al., 2007). Die CPC trägt nur etwa 30% zur Gesamtproduktion bei (Kapitel 3.1.2.2). Durch die Analyse der Deletionsmutanten für CPY und CPC soll deren Einfluss auf den Abbau von GS-Biman Konjugaten untersucht werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 21 dargestellt.

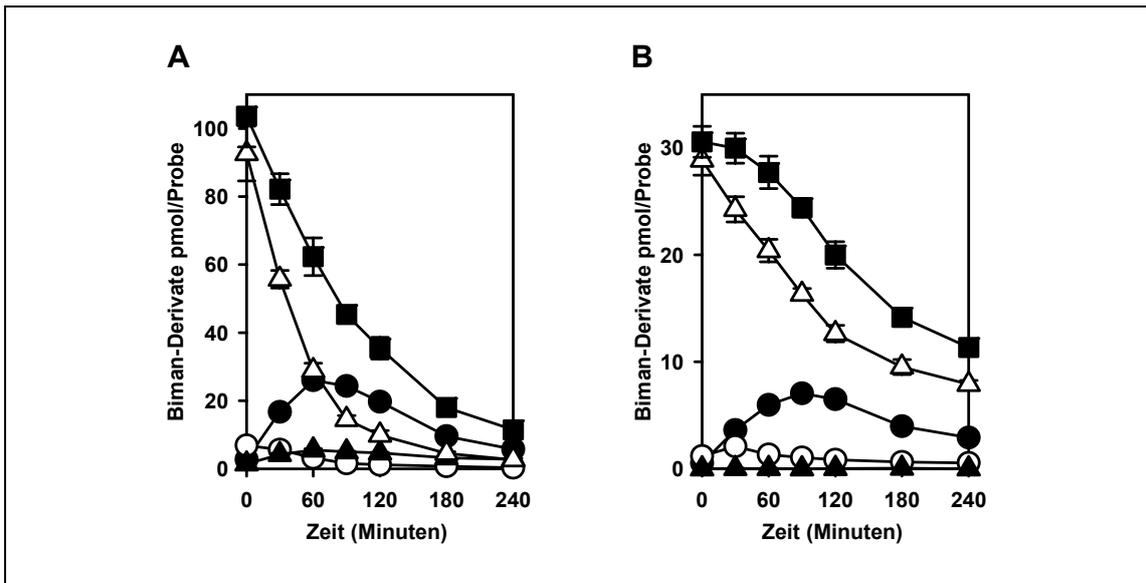


Abb. 21 Einfluss von CPY und CPC auf den Abbau von GS-Biman

Die Zellen der Einfachmutanten Δcpy (A) und Δcpc (B) wurden wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben inkubiert und aufgearbeitet. Mit Hilfe der HPLC ließen sich GS-Biman (Δ), γ EC-Biman (\blacktriangle), CG-Biman (\circ) und C-Biman (\bullet) nachweisen. Die Summe aller Derivate entsprach zum Zeitpunkt Null bei Δcpy 103 ± 9 pmol/Probe und bei Δcpc 30 ± 1 pmol/Probe. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung.

Sowohl der Δcpy als auch der Δcpc Stamm wiesen eine vergleichbare Tendenz im Abbau von GS-Biman auf. Bei beiden Stämmen war eine Abnahme der GS-Biman Konzentration über den getesteten Zeitraum zu beobachten. Allerdings führte die Mutation des *CPC* Gens nach vierstündiger Inkubation zu einer höheren Wiederfindungsrate des Fluoreszenzsignals (37%) als bei der Δcpy Mutante (11%). Bei Betrachtung der einzelnen Derivate fielen bezüglich des CG- und des C-Bimans keine Unterschiede zwischen den Stämmen auf. Allerdings wich die nachweisbare Menge an γ EC-Biman in der Δcpy Mutante signifikant von der in der Δcpc Mutante ab. Während das γ EC-Biman nach Verlust der CPY noch ca. 5% der Gesamtkonjugate ausmachte, ließen sich nach Verlust der CPC nur maximal 0,1% an γ EC-Biman nachweisen.

Bei beiden untersuchten Stämmen konnte im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 22B) eine Reduzierung der γ EC-Biman Menge beobachtet werden. Somit ließ sich die Beteiligung beider Enzyme an der C-terminalen Abspaltung des Glycins von GS-Biman Konjugaten postulieren. Durch die Analyse der Doppelmutante für beide Carboxypeptidasen ($\Delta cpy\Delta cpc$) sollte zum einen die Bedeutung der einzelnen Carboxypeptidasen als auch die Beteiligung eventueller *Bypass*-Reaktionen untersucht werden. Der Abbau von GS-Biman in der Doppelmutante ist in Abb. 22 dargestellt.

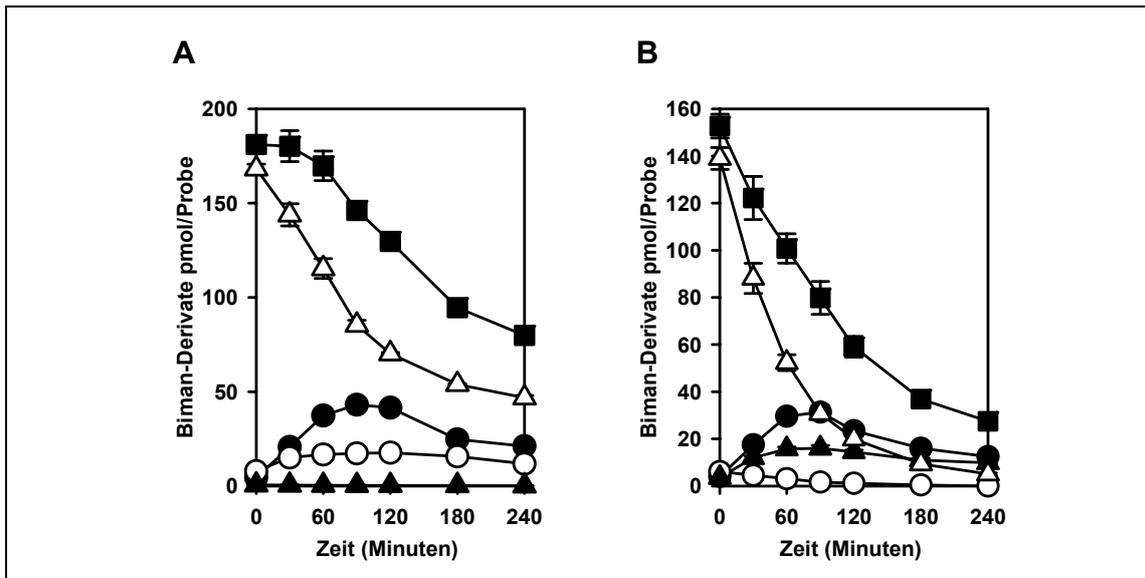


Abb. 22 GS-Biman Abbau in der Doppelmutante für die Carboxypeptidasen

Nachdem die Zellen der Doppelmutante $\Delta cpy\Delta cpc$ (A) wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, inkubiert und aufgearbeitet wurden, ließen sich mit Hilfe der HPLC eindeutig GS-Biman (Δ), CG-Biman (\circ) und C-Biman (\bullet) nachweisen. Für γ EC-Biman (\blacktriangle) konnten nur geringe Mengen nachgewiesen werden ($< 0,6$ pmol/Probe). Die Summe aller Derivate (\blacksquare) entsprach zum Zeitpunkt Null 181 ± 2 pmol/Probe. Als Vergleich sind in (B) die Daten für die Analyse der Wildtyp-Zellen gezeigt (entsprechend Abb. 20). Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung.

Auch nach der Deletion beider Carboxypeptidasen ließ sich eine Abnahme der GS-Biman Konzentration nachweisen (Abb. 22A). Nach 90 Minuten konnten nur noch ca. 50%, nach 240 Minuten nur noch ca. 30% der anfänglichen Menge beobachtet werden. Von den Biman-Derivaten waren nur CG-Biman und C-Biman eindeutig auffindbar. Die nachweisbare Konzentration von CG-Biman verdoppelte sich innerhalb der ersten 30 Minuten. Danach blieb der Spiegel relativ konstant bei ca. 9% der Summe aller Derivate. Für C-Biman war eine Akkumulation innerhalb der ersten 90 Minuten zu verzeichnen, bis etwa 20% der Gesamt-Derivate erreicht wurden. Danach sank der Spiegel bis auf ca. 10% ab. Für γ EC-Biman konnten über den gesamten Verlauf nur sehr kleine Mengen nachgewiesen werden, die unter 0,3% des markierten GSH lagen. Erneut war bei Betrachtung der Gesamt-Menge an Derivaten auffällig, dass nach vierstündiger Inkubation nur noch ca. 50% des ursprünglichen Fluoreszenzsignals detektiert werden konnten.

Beim Vergleich der Doppelmutanten für beide Carboxypeptidasen mit den entsprechenden Einfachmutanten wird deutlich, dass durch den zusätzlichen Knockout der *CPY* in der Δcpc Mutante keine weitere Verminderung der γ EC-Biman Konzentration erreicht werden konnte. Bei der direkten Gegenüberstellung der nachweisbaren Derivate zeigte sich bei allen Stämmen eine vergleichbare

Konzentration an C-Biman. Allerdings konnte in der Doppelmutante eine stärkere Akkumulation von CG-Biman dokumentiert werden. So ließ sich beispielsweise nach 60 Minuten *chase* die doppelte Menge an CG-Biman in dem Stamm $\Delta cpy\Delta cpc$ nachweisen (Abb. 23). Zusammen mit der stetigen Reduzierung des Fluoreszenzsignals deuten diese Befunde auf einen zweiten Abbauweg des GS-Bimans im Hefesystem hin.

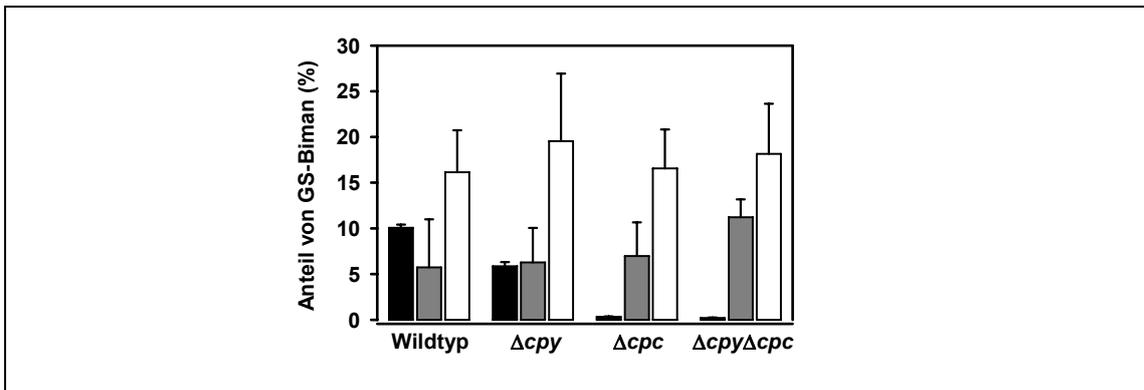


Abb. 23 Vergleich der einzelnen Carboxypeptidasen

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der Biman-Derivate γ EC-Biman (schwarz), CG-Biman (dunkelgrau) und C-Biman (weiß) 60 Minuten nach Markierung des GSH mit MCB. Die Summe aller Derivate zum Zeitpunkt Null entspricht 100%. Die Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.2.2.3 Die Rolle der γ -Glutamyltranspeptidase Cis2p

Mit den vorliegenden Daten wird deutlich, dass bei Verlust der Carboxypeptidasen ein alternativer Abbauweg des GS-Bimans stattfindet. Wie bereits in der Einleitung geschildert, konnte im tierischen System ein Enzym charakterisiert werden, welches am GS-Konjugat Abbau beteiligt ist. Es ließ sich zeigen, dass eine γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT) die Abspaltung des N-terminalen Glutamats und somit die Bildung des CG-Derivats katalysiert (Meister, 1988). In *S. cerevisiae* existiert nur ein ORF mit Homologien zu γ -GTs. Dieser Leserahmen (*YLR299w*) kodiert für das Protein Cis2p. Es stellte sich die Frage, ob dieser γ -GT beim Abbau von GS-Biman in *S. cerevisiae* die Rolle eines zweiten Schlüsselenzyms zugeordnet werden kann. Durch die Analyse des entsprechenden Deletionsstammes ($\Delta cis2$) sollte diese Frage beantwortet werden (Abb. 24).

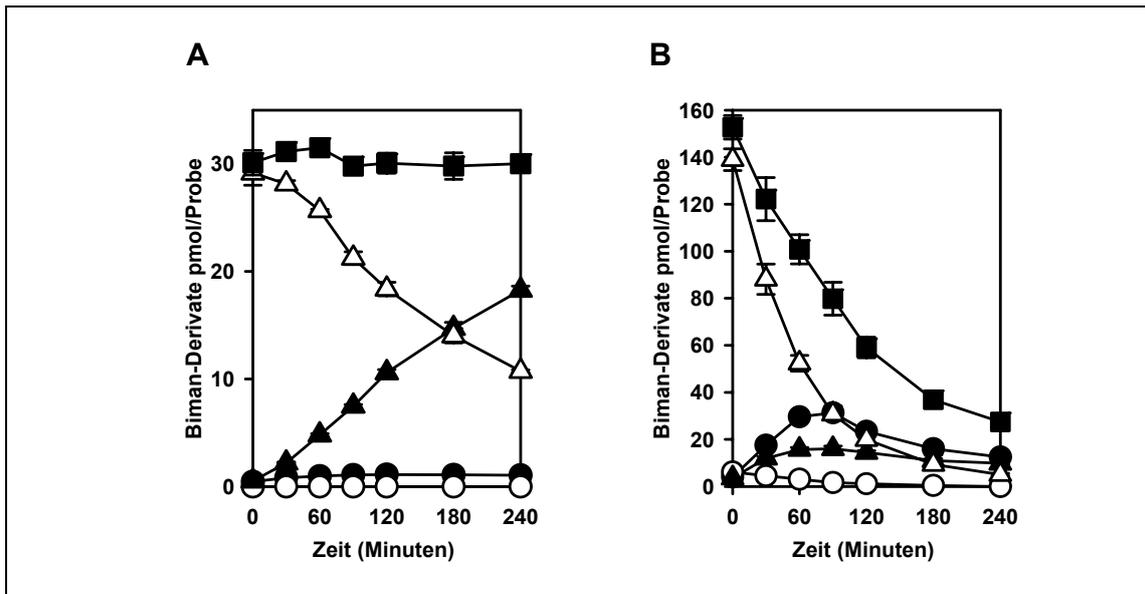


Abb. 24 GS-Biman Abbau nach Verlust der γ -Glutamyltranspeptidase Cis2p

Die Zellen des $\Delta cis2$ -Stammes wurden wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben aufgearbeitet und der Zellrohextrakt mit Hilfe der HPLC hinsichtlich der gebildeten GS-Biman Konjugate analysiert (GS-Biman (Δ), γ EC-Biman (\blacktriangle), CG-Biman (\circ) und C-Biman (\bullet)). Die Summe der gebildeten Derivate (\blacksquare) betrug zum Zeitpunkt Null 30 ± 1 pmol/Probe. Als Vergleich sind in (B) die Daten für die Analyse der Wildtyp-Zellen gezeigt (entsprechend Abb. 20). Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus einer Dreifachbestimmung.

Nach dem Verlust der γ -GT (Cis2p) konnte eine Reduzierung der GS-Biman Menge mit fortschreitender Zeit beobachtet werden (Abb. 24A). Nach 240 Minuten ließen sich nur noch ca. 35% des ursprünglichen GS-Konjugates nachweisen. Interessanterweise zeigte dieser Stamm im Gegensatz zu den bisher untersuchten Mutanten eine deutliche Akkumulation von γ EC-Biman. Innerhalb der betrachteten vier Stunden stieg die Konzentration des γ EC-Bimans bis auf 60% der Gesamtderivate. Die nachweisbare Menge an C-Biman war im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert (Abb. 24B). In dem Ausgangsstamm ließen sich Mengen von ca. 20% nachweisen, in der Deletionsmutante wurden nur ca. 3% erreicht. Noch deutlicher erkennbar wurden die Unterschiede bei Betrachtung des CG-Bimans. Durch den Verlust der Cis2p war kein CG-Biman mehr nachweisbar. Nach Addition der nachweisbaren Derivate fiel auf, dass die Summe über den untersuchten Zeitraum konstant blieb. Die Wiederfindungsrate für das Fluoreszenzsignals lag durchschnittlich bei 100%.

Anhand der vorliegenden Befunde ließ sich die Beteiligung der Cis2p am Abbauprozess von GS-Konjugaten eindeutig belegen. Das Protein stellt das Schlüsselenzym für den alternativen Abbauweg zum bereits oben erwähnten Carboxypeptidase-abhängigen Weg dar. Aufgrund der starken Akkumulation des γ EC-Bimans und des geringen C-Biman Pools ist vermutlich die γ -GT nicht nur für die

Abspaltung des N-terminalen Glutamats vom S-substituierten GSH sondern auch vom S-substituierten γ EC-Dipeptid verantwortlich. Wodurch die Relevanz des Proteins beim Abbau von GS-Konjugaten noch verstärkt wird.

Durch Kombination der Deletionen in den Stämmen $\Delta cis2\Delta cpy$ und $\Delta cis2\Delta cpc$ sollte der Einfluss der einzelnen Enzyme beim Abbau von GS-Biman charakterisiert werden. Für die Konstruktion der Doppelmutanten wurde der $\Delta cis2$ -Stamm als Ausgangsstamm verwendet. Die Deletion des *CPY* Gens geschah wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben. Das Gen für die CPC wurde mit Hilfe der homologen Rekombination durch das *URA3* Gen ersetzt (Kapitel 2.2.4). Die erhaltenen Transformanten wurden hinsichtlich der korrekten Insertion der Deletionskassetten in das Genom mit Hilfe von PCR-Analysen geprüft. Nach Belastung der Stämme mit MCB erfolgte die Analyse des GS-Biman Abbaus im Zellrohextrakt mittels HPLC. Die Ergebnisse sind in Abb. 25 dargestellt.

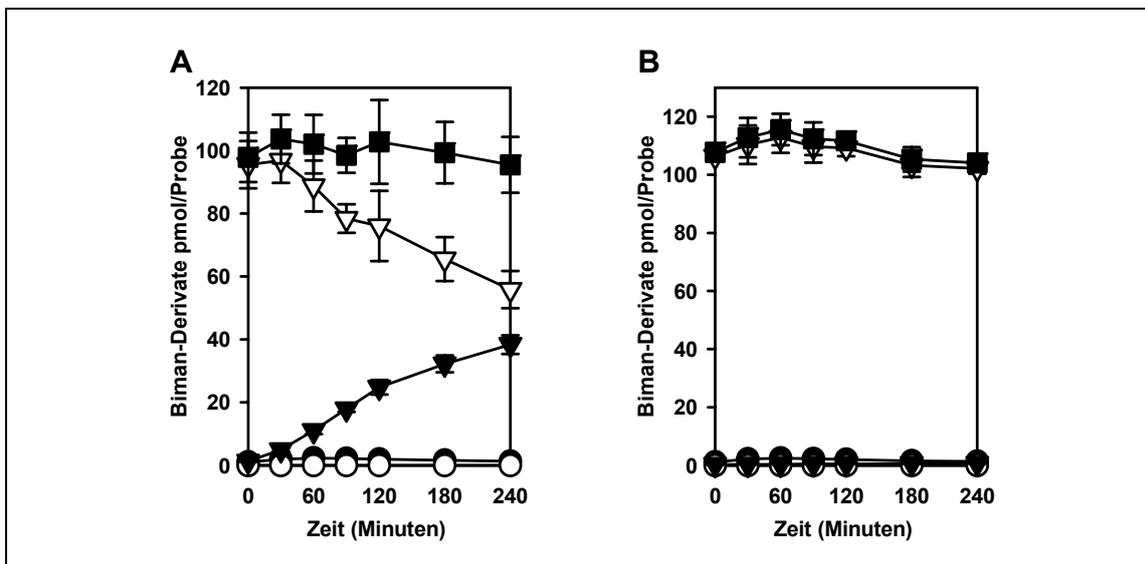


Abb. 25 Kombiniertes Verhalten von Cis2p und CPY bzw. CPC

Wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben wurden Zellen der Stämme $\Delta cis2\Delta cpy$ (A) und $\Delta cis2\Delta cpc$ (B) mit MCB behandelt und anschließend weiter inkubiert. Von den Zellen wurde der Rohextrakt isoliert und mit Hilfe der HPLC analysiert. Die Biman-Derivate GS-Biman (Δ), γ EC-Biman (\blacktriangle), CG-Biman (\circ) und C-Biman (\bullet), die Summe der gebildeten Konjugate (\blacksquare , $\Delta cis2\Delta cpy$ 97 ± 8 pmol/Probe; $\Delta cis2\Delta cpc$ 107 ± 2 pmol/Probe) sind aufgeführt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus einer Dreifachbestimmung.

Beim Vergleich der Daten für die Einfachmutante $\Delta cis2$ (Abb. 24) mit denen der Doppelmutante $\Delta cis2\Delta cpy$ (Abb. 25A) fiel ein verzögerter Abbau des GS-Bimans auf. Innerhalb der betrachteten vier Stunden Inkubation sank die Menge des GS-Bimans nur um 45%. Auch die γ EC-Biman Akkumulation war nach dem zusätzlichen Knockout der *CPY* um ca. 20% schwächer als bei der Einfachmutante. Gemeinsamkeiten ließen sich hinsichtlich CG- und C-Biman erkennen. Die nachweisbare Konzentration von

C-Biman lag wie bei der $\Delta cis2$ bei ca. 3% der Gesamtderivate, während kein Nachweis von CG-Biman erfolgen konnte. Die Summe aller detektierbaren Derivate blieb auch bei dieser Mutante über den betrachteten Zeitraum konstant.

Nach der Deletion der *CPC* im $\Delta cis2$ Hintergrund ließ sich über den gesamten Zeitverlauf keine signifikante Änderung der GS-Biman Menge nachweisen (Abb. 25B). Alle bisher detektierten Abbauprodukte des GS-Bimans konnten entweder nur in sehr geringen Konzentrationen oder gar nicht gefunden werden. Auffällig war, dass die Akkumulation des γ EC-Bimans der $\Delta cis2$ Mutante durch den Verlust der *CPC* fast komplett unterbunden werden konnte. Über den gesamten Zeitraum machte γ EC-Biman maximal 0,6% der Gesamtderivate aus. Für CG- und C-Biman ließen sich im Vergleich zur Einfachmutante keine Unterschiede feststellen. Auch bei der $\Delta cis2\Delta cpc$ Doppelmutante konnte C-Biman mit ca. 3% der Gesamtderivate nachgewiesen werden, während CG-Biman nicht detektierbar war. Die Summe aller Derivate blieb über den untersuchten Zeitrahmen konstant.

Für beide Doppelmutanten war ein abweichender GS-Biman Abbau im Vergleich zur Einfachmutante $\Delta cis2$ zu beobachten. Erneut ließ sich durch den Verlust der *CPY* ein verringerter Abbau des GS-Biman zum γ EC-Biman feststellen (Abb. 21A, S. 65). Die fast vollständige Blockierung der Degradation konnte jedoch erst nach Deletion der *CPC* erreicht werden. Diese Daten belegten erneut, dass beide Enzyme an der Spaltung des C-terminalen Glycins beteiligt sind. Die nachfolgende Analyse der Dreifachmutante für *CIS2*, *CPC* und *CPY* sollte dies bestätigen.

3.2.2.4 Blockierung des Abbaueges in der Dreifachmutante

Die Analysen der Einzel- und Doppelmutanten für *CPY*, *CPC* und *CIS2* zeigten die Beteiligung aller drei Proteine an dem Abbau von GS-Biman in Hefe. Dabei scheint allein das *Cis2* Protein für die Spaltung des N-terminalen Glutamats und die Bildung von CG-Biman verantwortlich zu sein. An der Reaktion von GS-Biman zum γ EC-Biman sind vermutlich beide Carboxypeptidasen beteiligt. Durch die Konstruktion der Dreifachmutante sollte die komplette Blockierung der GS-Biman Abbauege erfolgen. Bei der Herstellung der Dreifachmutante diente die Doppelmutante $\Delta cis2\Delta cpy$ als Ausgangsstamm. Mit Hilfe des *loxP/Cre*-Rekombinase Systems (Güldener et al., 2002) wurde das *CPC* Gen (YBR139w) durch die Insertion einer *LEU2*-Kassette über homologe Rekombination deletiert. Von den gewonnenen Transformanten wurde die genomische DNA isoliert und die vollständige Zerstörung des *CPC* Gens mit einer

PCR-Analyse bestätigt. Im Anschluss erfolgte die Entfernung des *LEU2* Selektionsmarkers über die *loxP*-Seiten mit Hilfe der Cre-Rekombinase. Der GS-Biman-Abbau der Dreifachmutante $\Delta cis2\Delta cpy\Delta cpc$ ist in Abb. 26 dargestellt.

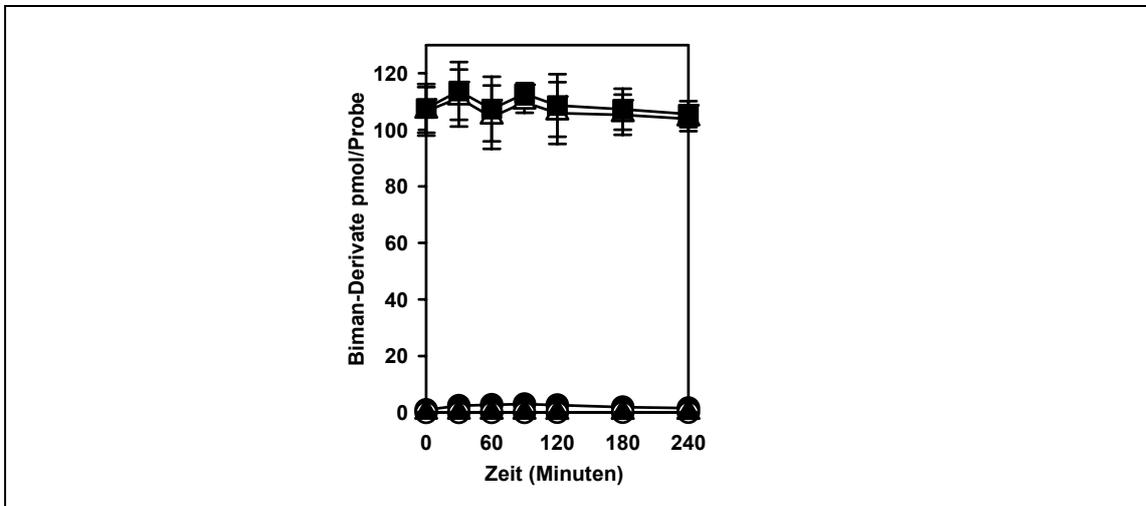


Abb. 26 GS-Biman Abbau in der Dreifachmutante $\Delta cis2\Delta cpy\Delta cpc$

Die Zellen der Dreifachmutante $\Delta cis2\Delta cpy\Delta cpc$ wurden nach der in Kapitel 3.2.2 erklärten Methode mit MCB inkubiert und aufgearbeitet. Die Abbauprodukte des GS-Bimans (Δ) sind dargestellt (γ EC-Biman (\blacktriangle), CG-Biman (\circ) und C-Biman (\bullet)). Die Summe der gebildeten Konjugate (\blacksquare) betrug zum Zeitpunkt Null 107 ± 8 pmol/Probe. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus einer Dreifachbestimmung.

Die Dreifachmutante unterschied sich kaum von der Doppelmutante $\Delta cis2\Delta cpc$ (Abb. 26 Vgl. Abb. 25B, S. 69). Erneut war bei Betrachtung der GS-Biman Menge im Laufe der untersuchten Zeit keine Änderung festzustellen. Das Gleiche galt für die Summe aller Derivate, welche im Durchschnitt über die vier Stunden konstant blieb. CG-Biman konnte auch in dieser Mutante nicht nachgewiesen werden, während für C-Biman ein relativ gleichbleibender Anteil von ca. 3% der Gesamtderivate bestimmt werden konnte. Einzig für γ EC-Biman ließ sich im Vergleich zu der Doppelmutante eine weitere Reduzierung beobachten. Statt der ursprünglichen 0,6% konnten hier nur maximal 0,1% der Gesamtderivate gemessen werden.

Es wird deutlich, dass durch den kombinierten Verlust der CPC, CPY und Cis2p Aktivität der GS-Biman Abbau in *S. cerevisiae* vollständig blockiert werden konnte. Die Dreifachmutante stellt damit ein ideales Modellsystem für die Charakterisierung von heterologen Proteinen dar, die am Abbau von GS-Konjugaten beteiligt sind.

3.2.3 Intrazelluläre Verteilung von GS-Biman

Nach der Konjugation von elektrophilen Substanzen werden die gebildeten GS-Konjugate aus dem Cytoplasma in die Vakuole transportiert (Zadzinski, 1996; Ubiyvovk, 2006). Dort erfolgen die Lagerung und die weitere Prozessierung der Konjugate. Die bisherigen Untersuchungen zeigten den Abbau des GS-Konjugats im Wildtyp in die einzelnen Derivate CG-Biman, γ EC-Biman und C-Biman. Des Weiteren ließ sich eine deutliche Reduktion des nachweisbaren Fluoreszenzsignals belegen. Nach Deletion der γ -GT *CIS2* konnte der Abbau teilweise bzw. durch den zusätzlichen Verlust von CPC und CPY komplett inhibiert werden. Dabei blieb die Quantität der nachweisbaren Fluoreszenzsignale konstant. Dieser Befund ließ sich auch nach Betrachtung der Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop bestätigen (Abb. 27).

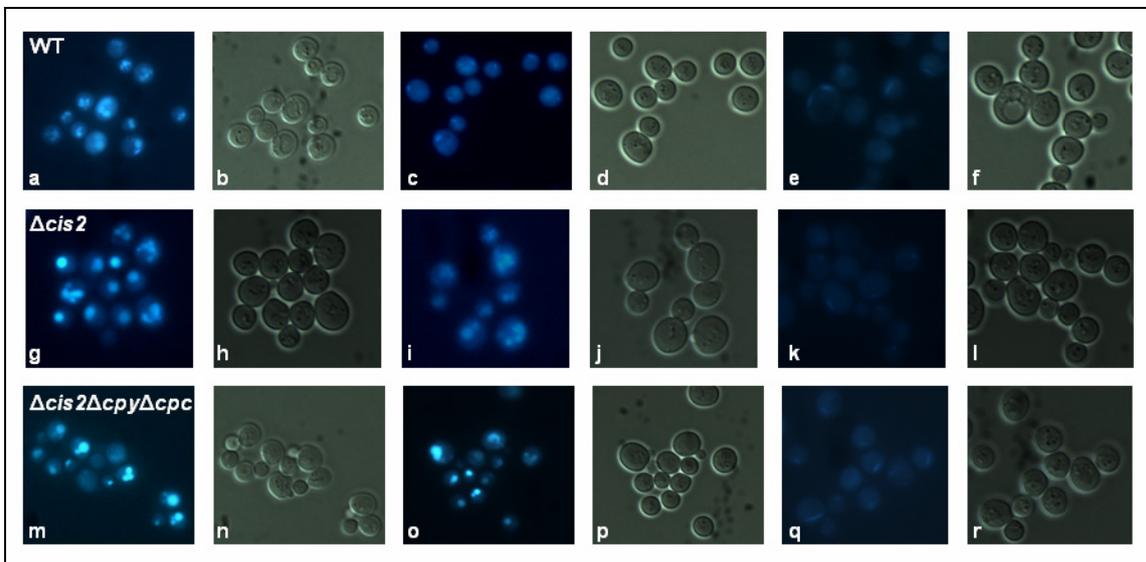


Abb. 27 Intrazelluläre Verteilung der GS-Biman Konjugate

Die Zellen des Wildtyps (a-f), der $\Delta cis2$ Mutante (g-l) und der $\Delta cis2\Delta cpry\Delta cpc$ Mutante (m-r) wurden für 30 Minuten mit 100 μ M MCB inkubiert, gewaschen und in Medium resuspendiert. Das Fluoreszenzsignal wurde direkt nach der Markierung (a,g,m), nach 90 Minuten (c) bzw. nach 150 Minuten (i,o) zusammen mit den entsprechenden Durchlichtbildern dokumentiert. Die unbelasteten Zellen sind ebenfalls (e,k,q) dargestellt.

In den Zellen des Wildtyps, der $\Delta cis2$ - und der Dreifachmutante ließen sich nach Inkubation mit MCB eindeutig Fluoreszenzsignale dokumentieren (Abb. 27a,g,m). Dabei konnte das stärkste Signal bei allen Stämmen in den Vakuolen lokalisiert werden. Nachdem die Zellen für 90 Minuten ohne MCB weiter kultiviert wurden, war in den Zellen des Wildtyps nur noch ein diffuses, sehr schwaches Signal im Cytoplasma nachweisbar (Abb. 27c). Die Zellen unterschieden sich kaum von den unbelasteten Zellen (Abb. 27e). In der Einfach- und Dreifachmutante war hingegen auch nach 150 Minuten ein starkes Fluoreszenzsignal zu beobachten (Abb. 27i,o). Intensitäts-

verluste ließen sich innerhalb des untersuchten Zeitfensters für diese beiden Mutanten nicht feststellen.

3.2.4 Sekretion von Biman-Derivaten

Interessanterweise betrug die Wiederfindungsrate für das Biman-vermittelte Fluoreszenzsignal erst 100% nach dem Verlust der Cis2p Aktivität. Mit der funktionalen γ -GT gingen im Wildtyp beispielsweise innerhalb von vier Stunden ca. 70% des Gesamtsignals verloren (Vgl. Abb. 20, S. 63). Grund dafür war entweder die Sekretion von Biman-Derivaten oder der weitere Abbau der Derivate zu nicht-fluoreszierenden Produkten. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden die Zellen des Wildtyps mit MCB belastet und sowohl die Zellen als auch das Medium auf Biman-Derivate analysiert (Abb. 28). Für den Nachweis der einzelnen Derivate im Medium wurden die Zellen nach der Belastung mit MCB in nur einem Zehntel des ursprünglichen Volumens resuspendiert. Die Probenahme von je 2 ml erfolgte zu den in Abb. 29 angegebenen Zeitpunkten.

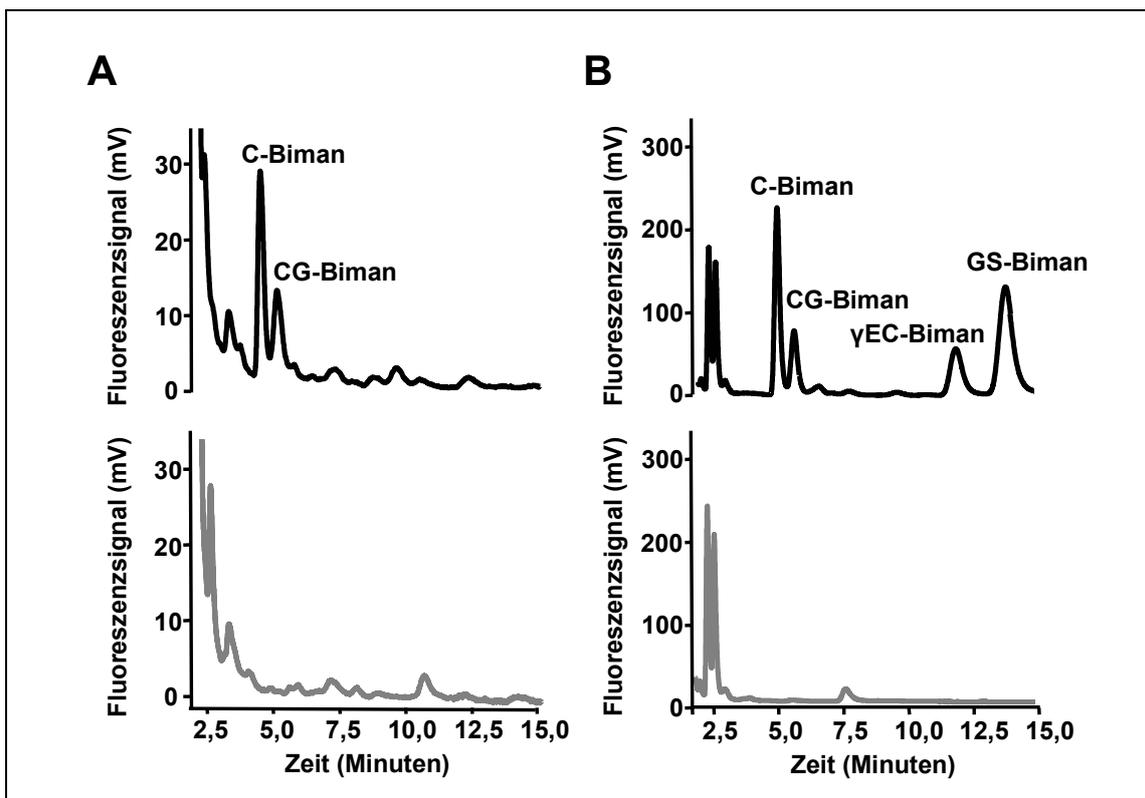


Abb. 28 Nachweisbare Biman-Derivate im Medium und im Zellrohextrakt

Die Zellen des Wildtyps wurden für 10 Minuten mit 100 μ M MCB belastet, gewaschen und anschließend in einem Zehntel des Ausgangsvolumens resuspendiert. Nach 60 Minuten wurden 2 ml abgenommen und die Zellen pelletiert. Der Überstand wurde mit 10fach Glycinpuffer pH 3,0 versetzt (Endkonzentration 1fach) und zusammen mit den Zellen wie in Kapitel 2.4.2.2 beschrieben, aufgearbeitet. Die HPLC-Analyse des Überstandes (A) und des

Zellrohextraktes (B) erfolgte sowohl von der belasteten (schwarz) als auch von der unbelasteten Probe (grau). Die identifizierbaren Peaks sind benannt.

Bereits nach 60 Minuten ließen sich im Medium eindeutig Peaks mit den Retentionszeiten für C-Biman und CG-Biman nachweisen (Abb. 28A), welche im Medium der unbelasteten Kontrolle nicht gefunden werden konnten. Auch zu späteren Zeitpunkten waren nur diese beiden Derivate zu beobachten. Peaks mit den entsprechenden Retentionszeiten für γ EC-Biman und GS-Biman wurden nicht nachgewiesen. Im Zellrohextrakt ließen sich wiederum alle vier GS-Biman Derivate belegen (Abb. 28B). Aufgrund der ausgeglichenen Mengenverhältnisse aller Derivate im Zellrohextrakt war nicht von einer Kontamination des Mediums mit Zellysate auszugehen. Anderenfalls wären auch γ EC-Biman und GS-Biman im Medium detektierbar gewesen. In Abb. 29 ist der GS-Biman Abbau im Wildtyp-Stamm in Kombination mit den sekretierten Biman-Derivaten dargestellt.

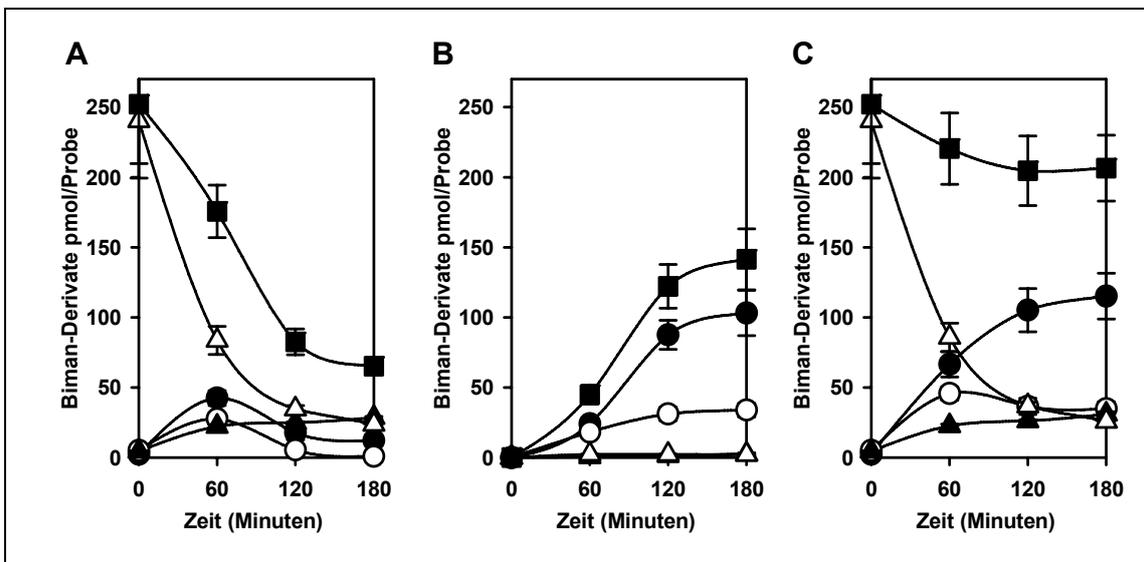


Abb. 29 Sekretion von Biman-Derivaten ins Medium

Die Zellen des Wildtyp Stammes wurden mit MCB inkubiert, mit Medium gewaschen (Kapitel 3.2.2) und in einem Zehntel des Ausgangsvolumens resuspendiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen pelletiert und der Überstand (B) mit 10fach Glycinpuffer pH 3,0 versetzt und zusammen mit den Zellen (A) für die HPLC aufbereitet. Die detektierbaren Derivate des GS-Biman (Δ) sind gezeigt (γ EC-Biman (\blacktriangle), CG-Biman (\circ) und C-Biman (\bullet)). Die Summe der gebildeten Konjugate (\blacksquare) betrug zum Zeitpunkt Null 252 ± 40 pmol/Probe. Die Kombination der nachweisbaren Derivate aus dem Zellrohextrakt und dem Medium sind in (C) dargestellt. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von einer Doppelbestimmung.

Bei Betrachtung der Biman-Konjugate in den Wildtyp-Zellen fiel auf, dass die höhere Zelldichte der Kultur keinen Einfluss auf den Abbauprozess hatte (Abb. 29A Vgl. Abb. 20, S. 63). Es konnte erneut eine deutliche Reduktion der GS-Biman Menge und der Gesamtderivate über die Zeit festgestellt werden. Im Medium ließ sich bereits nach

60 Minuten C- und CG-Biman nachweisen (Abb. 29B). Nach 180 Minuten waren vom anfänglich markierten GSH ca. 13% als CG-Biman und ca. 40% als C-Biman ins Medium abgegeben worden. Für die Sekretion von γ EC-Biman und GS-Biman konnten keine Nachweise erbracht werden. Durch die Kombination der Daten für den intrazellulären Abbau und der Sekretion (Abb. 29C) kann die Wiederfindungsrate für das Fluoreszenzsignal auf ca. 85% im Wildtyp erhöht werden. Dabei resultierte der Abbau des GS-Biman in etwa vergleichbaren Konzentrationen von γ EC-Biman und CG-Biman von etwa 35 pmol/Probe. C-Biman akkumulierte hingegen und machte nach 180 Minuten etwa einen Anteil von 45% der Gesamtderivate aus.

Die Mutanten $\Delta cpy\Delta cpc$ und $\Delta cis2$ zeigten einen stark veränderten GS-Biman Abbau im Vergleich zum Wildtyp. So konnte nach vier Stunden Inkubation in der Doppelmutante für die Carboxypeptidasen noch 50% des ursprünglichen Fluoreszenzsignals nachgewiesen werden. Im Wildtyp wurden nur 20% erreicht. Der Verlust der γ -GT resultierte sogar in einer 100%igen Wiederfindung. Aufgrund dieser Befunde müssen auch Unterschiede hinsichtlich der Sekretion von Derivaten im Vergleich zum Wildtyp feststellbar sein. Abb. 30 gibt einen Überblick über die sekretierten Derivate des Wildtyps, der Doppel- und der Einfachmutante 180 Minuten nach Inkubation mit MCB.

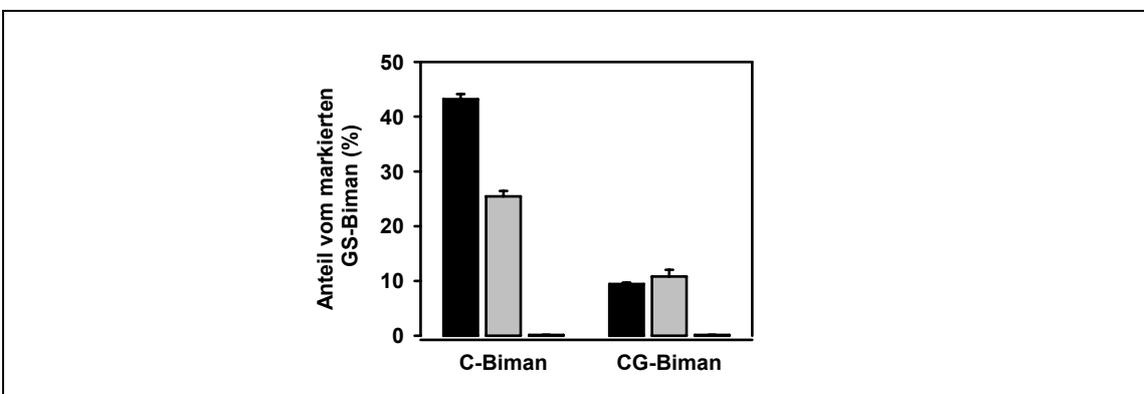


Abb. 30 Einfluss der Carboxypeptidasen und der γ -Glutamyltranspeptidase auf die Sekretion von Biman-Derivaten

Dargestellt sind die sekretierten Derivate des Wildtyps (schwarz), der $\Delta cpy\Delta cpc$ Doppelmutante (hellgrau) und der $\Delta cis2$ Mutante (dunkelgrau) 180 Minuten nach der MCB Belastung. Die erhaltenen Werte wurden auf die zum Zeitpunkt Null markierten Mengen an GS-Biman bezogen. Die präsentierten Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus einer Dreifachbestimmung.

In der Doppelmutante $\Delta cpy\Delta cpc$ ließen sich drei Stunden nach der Inkubation weniger Derivate im Überstand nachweisen als beim Wildtyp. Dabei spiegelte sich die Reduktion vor allem in der Menge des sekretierten C-Bimans wieder. Im Überstand der Doppelmutante konnte nur etwa die Hälfte der vom Wildtyp exportierten C-Biman

Menge gemessen werden. Hinsichtlich des CG-Bimans waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Stämmen feststellbar. Im Überstand der Deletionsmutante $\Delta cis2$ konnte weder CG-Biman noch C-Biman nachgewiesen werden.

Die Daten belegten die Beteiligung der γ -GT am bzw. den Einfluss der Carboxypeptidasen auf den Export von CG-Biman und C-Biman. Dabei hatte die Deletion der γ -GT einen stärkeren Effekt als die Carboxypeptidasen. Anhand der bisherigen Analysen konnte allerdings keine Aussage darüber getroffen werden, ob die sekretierten Derivate im Medium weiter prozessiert wurden bzw. ein Rücktransport in die Zelle erfolgte. Dieser Nachweis sollte anhand von bereits mit MBB derivatisierten Cystein, Cysteinylglycin, γ -Glutamylcystein und GSH erfolgen. Die entsprechenden Konjugate wurden mit einer Konzentration von 50 nM in das Medium vom Wildtyp und von der Dreifachmutante gegeben. Mit Hilfe der HPLC erfolgte die Analyse der Derivate im Medium und im Zellrohextrakt nach zwei, vier und sechs Stunden Inkubation (Abb. 31).

Direkt nach der Zugabe ließen sich alle Derivate mit der entsprechenden Konzentration im Medium mittels HPLC detektieren. Im Zellrohextrakt schlug hingegen der Nachweis fehl. Innerhalb des untersuchten Zeitintervalls waren keine Konzentrationsänderungen für γ EC-Biman, CG-Biman und C-Biman im Medium nachweisbar (Abb. 31A,B). Demnach konnte auch in den jeweiligen Zellrohextrakten kein GS-Konjugat detektiert werden. Nur bei den Proben mit GS-Biman war innerhalb der ersten 120 Minuten eine Reduktion der nachweisbaren Menge im Medium feststellbar. Es konnten nur noch 35% der Ausgangskonzentration nachgewiesen werden. Mit der Analyse der Zellrohextrakte wurde deutlich, dass ein Großteil des GS-Bimans in die Zelle aufgenommen wurde. Dabei fielen deutliche Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Dreifachmutante auf (Abb. 31A,B). Im Zellrohextrakt der Wildtyp-Zellen ließen sich nur ca. 12% des zugegebenen GS-Bimans nachweisen, während bei der Dreifachmutante fast 50% wiedergefunden werden konnten. Allerdings war im Wildtyp nicht nur GS-Biman im Zellrohextrakt nachweisbar – wie das bei der Dreifachmutante der Fall war (Daten nicht gezeigt) – sondern es waren auch bereits nach 120 Minuten die ersten Abbauprodukte zu beobachten (Abb. 31C). Erneut ließen sich im Zellrohextrakt γ EC-, CG- und C-Biman nachweisen. Interessanterweise konnten auch im Medium der Wildtyp-Zellen nach 240 und 360 Minuten nicht nur GS-Biman, sondern auch geringe Mengen an CG- und C-Biman detektiert werden (Abb. 31D). Durch Addition der Abbauprodukte des GS-Bimans im Zellrohextrakt (ca. 20%) und der

sekretierten CG- und C-Biman Derivate (ca. 20%), wurde der anfänglich beobachtete Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Dreifachmutante kompensiert.

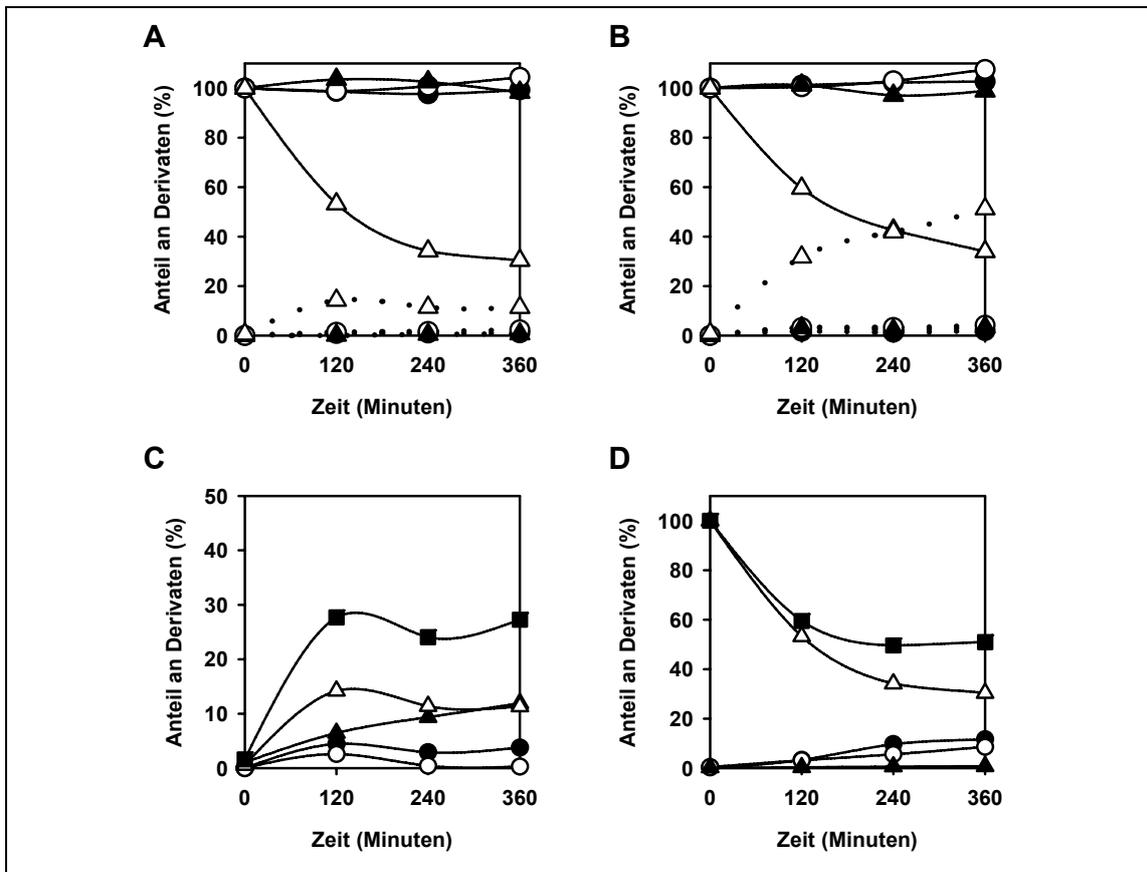


Abb. 31 Aufnahme von GS-Konjugaten aus dem Medium in die Zelle

Zu den Zellen des Wildtyps (A) und der Dreifachmutante $\Delta cis2\Delta cpy\Delta cpc$ (B) wurden in der frühen exponentiellen Phase je 100 pmol von GS-Biman (Δ), γ EC-Biman (\blacktriangle), CG-Biman (\circ) und C-Biman (\bullet) gegeben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je 2 ml der Probe entnommen. Nach der Zellernte erfolgte sowohl die Aufbereitung des Überstandes (durchgezogene Linie) als auch der Zellen (gepunktete Linie) für die HPLC. Im Zellrohextrakt (C) und im Überstand (D) des Wildtyps ließen sich nach Zugabe von GS-Biman ins Medium noch weitere Biman-Derivate detektieren. Die Summe der nachweisbaren Derivate ist ebenfalls dargestellt (\blacksquare).

Anhand der vorliegenden Befunde konnte eine signifikante Prozessierung der einzelnen Derivate im Medium ausgeschlossen werden. Des Weiteren ließ sich zeigen, dass die Zellen weder CG-Biman noch γ EC-Biman oder C-Biman aktiv in die Zelle wieder aufnehmen können. Überraschenderweise waren die Hefezellen aber in der Lage, bereits konjugiertes GSH aus dem Medium in die Zelle zu importieren. Beim Wildtyp konnte unmittelbar nach der Aufnahme des GS-Biman in die Zelle auch der Abbau in die entsprechenden Derivate und die Sekretion von C- und CG-Biman beobachtet werden.

Die Sekretion von CG- und C-Biman erfolgt vermutlich entweder über einen vesikelabhängigen Transport oder über spezifische ABC-Transporter. Um überprüfen

zu können, ob die Sekretion von CG- und C-Biman über Vesikel erfolgt, wurden die Zellen nach MCB Belastung mit dem Inhibitor Brefeldin A (BFA) inkubiert. Durch BFA zerfällt in Säugetierzellen der Golgi-Apparat innerhalb von Sekunden in viele kleine Vesikel, wodurch der Proteintransport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi blockiert werden kann (Klausner et al., 1992). Des Weiteren sollte der Einfluss von ABC-abhängigen Transportern untersucht werden, indem die Zellen nach Belastung mit MCB mit Azid behandelt wurden. Azid blockiert den Elektronenfluss am Komplex IV der Atmungskette und verhindert somit die ATP Produktion in der Zelle. Die Daten für den GS-Biman Abbau in den BFA- und Azid-behandelten Wildtyp-Zellen sind im Vergleich zu den unbehandelten Zellen in Abb. 32 dargestellt. Um den Einfluss der beiden Inhibitoren auf die Sekretion besser zu verdeutlichen, wurde jeweils die Summe der nachweisbaren Derivate im Zellextrakt und im Medium bestimmt und anschließend verglichen.

Für die unbehandelten Zellen ließ sich genau wie bei den vorhergehenden Untersuchungen ein starker Verlust des intrazellulären Fluoreszenzsignals nachweisen (Abb. 32A). Ca. 40% des Signals waren nach 180 Minuten Inkubation im Medium wiederzufinden. Die Behandlung mit 5 mg/ml BFA führte zu keinem veränderten Abbau von GS-Biman im Wildtyp (Abb. 32B). Im Medium konnten die gleichen Verhältnisse an GC- und C-Biman nachgewiesen werden wie in der unbelasteten Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Eindeutige Unterschiede fielen jedoch beim Vergleich mit der azid-behandelten Probe hinsichtlich des GS-Biman Abbaus (Abb. 32C) und des Wachstums (Abb. 32D) auf. Innerhalb der ersten 60 Minuten wurden nur 3% des GS-Bimans umgesetzt, im Gegensatz zum 50%igen Umsatz in der unbelasteten Kontrolle. Von den Abbauprodukten des GS-Bimans konnten nur γ EC-Biman und C-Biman nach der Azid-Behandlung dokumentiert werden. Es war kein CG-Biman nachweisbar (Abb. 32E). Innerhalb des betrachteten Zeitintervalls stieg die Menge an γ EC-Biman in den Zellen bis auf ca. 26%. Dahingegen sank die Konzentration des GS-Biman auf ca. 66%. Die Summe der nachweisbaren Derivate in der Zelle blieb über die Zeit konstant bei durchschnittlichen 100%. Im Medium ließ sich C-Biman nur in sehr geringer Konzentration (<1%) nachweisen (Abb. 32C).

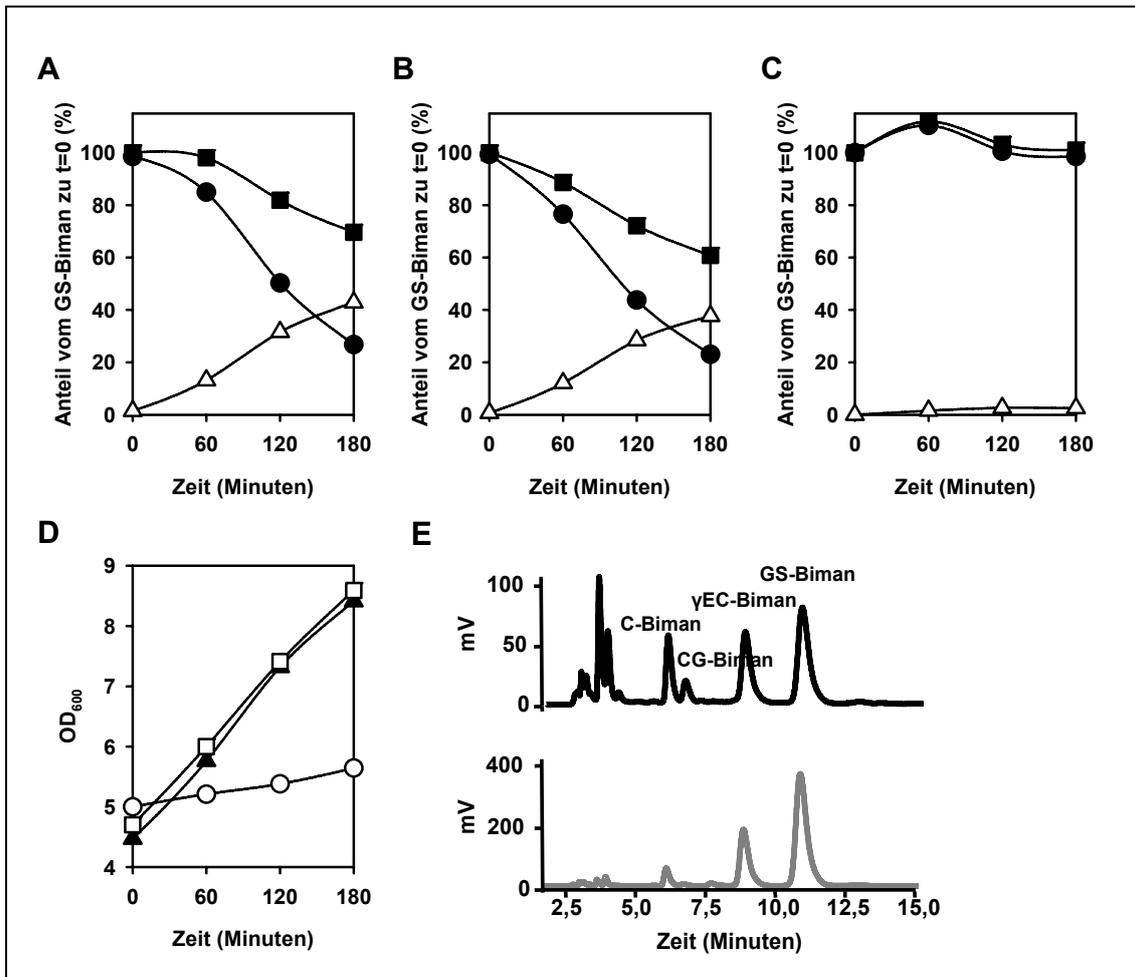


Abb. 32 Einfluss von Brefeldin A und Azid auf die Sekretion von GS-Derivaten

Die Zellen des Wildtyps wurden nach der Inkubation mit MCB in Abwesenheit (A) und Anwesenheit von 10 mg/ml BFA (B) bzw. 5mM Azid (C) kultiviert. Die Probenahme von je 2 ml erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Summe der nachweisbaren Derivate im Zellrohextrakt (●) und im Überstand (Δ) ist dargestellt. Die Summe aller detektierbaren Derivate (■) entsprach zum Zeitpunkt Null ca. 170 pmol/Probe. Das Wachstum der Zellen ist in (D) dargestellt (unbelastet: ▲; Azid: ○; BFA: □). (E) zeigt die HPLC-Chromatogramme vom Zellrohextrakt nach 180 Minuten BFA- (schwarze Linie) bzw. Azid-Behandlung (graue Linie).

Die Daten zeigten, dass die Sekretion der Konjugate CG-Biman und C-Biman nicht über Vesikel des Golgi-Apparates erfolgte. Die Behandlung mit Azid resultierte in einem der $\Delta cis2$ Mutante ähnlichen GS-Biman Abbau. Somit kann für die Cis2p Aktivität zumindest eine indirekte ATP-Abhängigkeit vermutet werden. Es ließen sich keine Aussagen treffen, ob das Protein an dem Export *per se* beteiligt ist. Diese Fragestellung soll nachfolgend beantwortet werden.

3.2.5 Charakterisierung von Cis2p

Für die γ -Glutamyltranspeptidase Cis2p der Hefe *S. cerevisiae* ist bereits bekannt, dass sie beim Abbau von GSH beteiligt ist (Mehdi et al., 2001). Anhand der

vorliegenden Daten kann zudem eine Beteiligung bei der Degradation von GS-Konjugaten vermutet werden. Die γ -GT ist ein membran-gebundenes Glykoprotein mit einer Größe von 73,1 kDa, welches sowohl in der Plasmalemma (Payne und Payne, 1984) als auch in der Vakuolenmembran (Jaspers und Penninckx, 1984) integriert sein soll.

Um die Lokalisation des Proteins zu überprüfen, sollte das Gen *CIS2* 3'-seitig mit der kodierenden Sequenz des eGFP-tags *in frame* fusioniert werden. Die dafür benötigte Integrationskassette mit der genetischen Information für den eGFP-tag und den *HIS3*-Marker wurde mit den Primer #15 und #16 von dem Plasmid pYM28 amplifiziert und anschließend in den Wildtyp BY4741 transformiert. Nach der Selektion der Transformanten auf SD-Medium ohne Histidin wurde die genomische DNA isoliert und auf die Integration der Fusionskassette analysiert. Dabei wurden die Primer #17 und #18 verwendet, die innerhalb des offenen Leserahmens für das *CIS2* Gen und außerhalb des 3'-Bereiches der kodierenden Sequenz binden. Des Weiteren wurden ein Bereich des *HIS3* Markers mit den Primern #19 und #20 amplifiziert. Die erhaltenen Fragmente der PCR Analyse sind in Abb. 33 dargestellt.

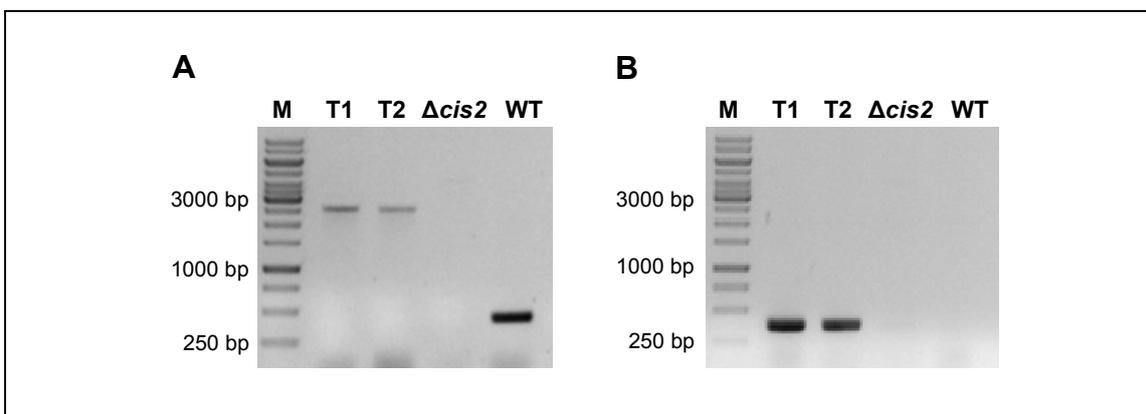


Abb. 33 Nachweis zur korrekten Integration der eGFP-Fusionskassette

Die genomische DNA des Wildtyp (WT), der $\Delta cis2$ Mutante und der Cis2p:eGFP Transformanten (T1, T2) wurden isoliert und als Template für die diagnostische PCR eingesetzt. Zur Kontrolle der korrekten Integration (A) dienten die Primer #17 und #18. Die Fragmente des *HIS3* Markers (B) wurden mit den Primern #19 und #20 amplifiziert. Die Auftrennung der PCR Produkte erfolgte in einem 0,8%igen Agarosegel.

Durch die Amplifikation des ca. 2900 bp Fragments bei den Transformanten konnte eindeutig die korrekte Integration der Fusionskassette nachgewiesen werden (Abb. 33A). Im Vergleich ergab sich mit der genomischen DNA des Wildtyps nur ein Produkt von 441 bp. Bei der $\Delta cis2$ Mutante erfolgte keine Amplifikation, da der kodierende Bereich des *CIS2* Gens komplett durch die kanMX Kassette ersetzt worden war. Somit konnte keine Bindung des Primers #17 erfolgen. Die Produkte der PCR

Analyse für den *HIS3* Marker (Abb. 33B) bestätigten dies. Es ließen sich nur Fragmente von der genomischen DNA der Transformanden amplifizieren, wodurch die Integration der Fusionskassette in das Genom verifiziert werden konnte. Sowohl der Wildtyp als auch die $\Delta cis2$ Mutante weisen kein *HIS3* Gen in ihrem Genom auf.

Nachdem auf DNA-Ebene die Fusion des *CIS2* Gens an eGFP bestätigt werden konnte, sollte anschließend die Expression des Fusionsproteins mittels Western Blot und Fluoreszenzanalyse untersucht werden. Dafür wurde zuerst der Zellrohextrakt von zwei *Cis2:eGFP* Stämmen isoliert und die Proteine mittels 12% SDS-PAGE separiert. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran schloss sich der immunologische Nachweis mit den GFP-Antikörpern an. Durch die Fusion des eGFP vergrößert sich das erwartete Molekulargewicht von *Cis2p* um ca. 26 kDa. Demzufolge liegt das Molekulargewicht von *Cis2:eGFP* bei ca. 100 kDa. In beiden untersuchten Stämmen ließ sich kein Signal mit dem GFP-Antikörper detektieren. Dieser Befund wurde auch durch längere Detektionszeiten (30 Minuten) oder eine Verdopplung der Proteinkonzentration nicht verändert. Dabei war die Funktionalität des Antikörpers gewährleistet. Die Untersuchungen mit dem Fluoreszenzmikroskop ergaben ebenfalls keine eindeutigen Nachweise für die Expression des Fusionsproteins. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den Transformanden nachweisbar. Um einen Funktionsverlust des Proteins durch die Fusion ausschließen zu können, erfolgte die Analyse des GS-Biman Abbaus in den *Cis2:eGFP* Stämmen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 34).

Bei den Untersuchungen zeigten sich deutliche Abweichungen des GS-Biman Abbaus in den Transformanden im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 34A,B). Zwar erfolgte eine Reduktion der GS-Biman Konzentration innerhalb des betrachteten Zeitintervalls, allerdings konnte nur γ EC-Biman als Abbauprodukt nachgewiesen werden (Abb. 34A). Des Weiteren wurde in den analysierten Zellen im Gegensatz zum Wildtyp nur ein geringer Verlust der Summe aller Derivate deutlich. Insgesamt erinnerte die zeitliche Entwicklung eher an den Abbau in der $\Delta cis2$ Mutante (Abb. 34C).

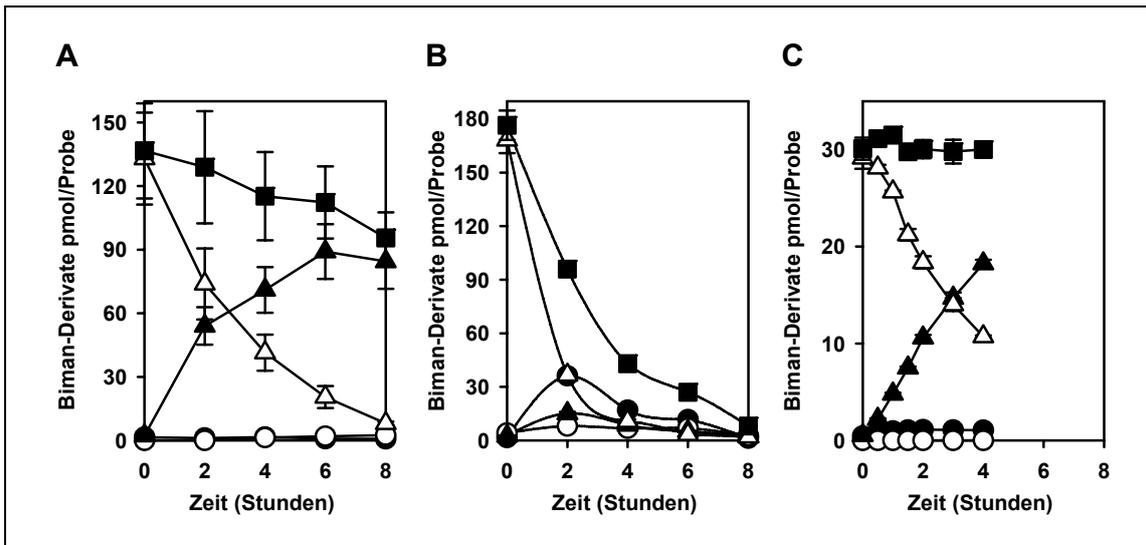


Abb. 34 Abbau von GS-Biman nach der Fusion von Cis2p mit eGFP im Wildtyp

Die Zellen zweier Transformanten (A) und der Wildtyp (B) wurden mit 100 μ M MCB belastet, gewaschen und in Medium resuspendiert (Kapitel 3.2.2). Die Analyse der Zellrohextrakte erfolgte mit Hilfe der HPLC auf GS-Biman (Δ), γ EC-Biman (\blacktriangle), CG-Biman (\circ) und C-Biman (\bullet). Als Vergleich sind in (C) die Daten für die Analyse der $\Delta cis2$ -Zellen gezeigt (entsprechend Abb. 24, S. 68).

Die vorliegenden Daten ließen eine verminderte Funktionalität der γ -GT vermuten, welche wahrscheinlich durch die C-terminale Fusion mit dem eGFP-tag hervorgerufen wurde. Somit konnten keine weiteren Aussagen über die Lokalisation und Funktionsweise von Cis2p getroffen werden.

3.3 Rekonstruktion von pflanzlichen Stoffwechselwegen in *S. cerevisiae*

Das pflanzliche System ist durch eine Vielzahl von Stoffwechselfvorgängen gekennzeichnet, die ein komplexes Netzwerk an regulatorischen Prozessen bilden. Dies erschwert die Isolierung und Charakterisierung einzelner Stoffwechselwege, besonders da viele Proteine redundante Funktionen aufweisen, häufig ganze Genfamilien für die Kodierung der genetischen Information zuständig sind und Regulatoren meist in mehrere Stoffwechselwege eingreifen. Die überschaubare Komplexität, die einfache Handhabung und schnelle genetische Manipulierbarkeit der Hefe *S. cerevisiae* macht diesen Organismus zu einem der beliebtesten Modellorganismen für eukaryotische Lebewesen. Mit den in dieser Arbeit generierten Hefestämmen wurde die Grundlage geschaffen, um die Beteiligung von Proteinen anderer Organismen an der PC-Synthese und am GS-Konjugat Abbau zu untersuchen. Im folgenden Kapitel sollen das neu etablierte Modellsystem genutzt werden, um die PCS Gene aus *A. thaliana*, *Nostoc spec.* und *B. japonicum* näher zu charakterisieren.

3.3.1 Expression von AtPCS1 und AtPCS2 in Hefe

Für die Charakterisierung von AtPCS1 und AtPCS2 in der Hefe musste sowohl die Expression der Gene als auch die Funktionalität der Enzyme gewährleistet sein. Um den Beginn und die Dauer der Expression kontrollieren zu können, wurde der *GAL1* Promotor als induzierbares Expressionssystem verwendet. Dieser kann über die Kohlenstoffquelle des Mediums reguliert werden. Während Glukose, aber auch Sucrose zu einer Repression führen, induziert Galaktose den Promotor. In den folgenden Experimenten wurde Sucrose anstelle von Glukose für die Anzucht der jeweiligen Stämme verwendet, da Glukose bereits in geringen Konzentrationen reprimierend auf den Promotor wirkt (Johnston, 1987). Die Expression der Promotor-Gen-Konstrukte erfolgte auf einem *low-copy* Plasmid, wodurch eine Überladung der Hefezelle mit dem exprimierten Protein verhindert werden sollte. Die Proteinbiosynthese wurde mit Hilfe eines immunologischen Nachweises mit PCS-spezifischen Antikörpern bestätigt. Da von beiden Proteinen die Beteiligung an der PC-Synthese nach Schwermetall-Belastung bekannt ist, kann durch Analyse der PC-Bildung die Funktionalität und Aktivität der exprimierten, heterologen Proteine überprüft werden.

Für die Expression von *AtPCS1* und *AtPCS2* wurde das induzierbare System des *GAL1* Promotor gewählt, um auftretende Effekte direkt mit der exprimierten PCS-Proteinmenge in Bezug setzen zu können. Dafür wurde die kodierende Sequenz von *AtPCS1* von dem Plasmid *pet28a-AtPCS1* mit den Primern #21 und #22 amplifiziert und in den Vektor *pSH47* über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *SalI* kloniert. Für die Sequenz der *AtPCS2* wurde die cDNA der Δ *AtPCS1*-Linie verwendet. Die cDNA wurde mit den Primern #23 und #24 amplifiziert und in den Vektor *pSH47* über die Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *XhoI* kloniert. Die fertig gestellten Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft und anschließend in die Doppelmutante Δ *cpy* Δ *cpc* transformiert. Die erhaltenen Transformanden wurden mittels Kolonie-PCR verifiziert.

Die Zellen der Doppelmutante Δ *cpy* Δ *cpc* mit den Konstrukten *pGAL1::AtPCS1* und *pGAL1::AtPCS2* wurden in Selektivmedium mit Sucrose angezogen und die Hauptkultur entsprechend in Selektivmedium mit Sucrose oder Galactose als Kohlenstoffquelle inokuliert. Zu den in Abb. 35 angegebenen Zeitpunkten wurden je $1,5 \cdot 10^8$ Zellen der Kulturen geerntet und der Proteinrohextrakt isoliert (Kapitel 2.5.1). Nach elektrophoretischer Trennung der Proteine mit Hilfe einer 10%igen SDS-PAGE erfolgte der Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran und die Inkubation mit dem PCS Antikörper (Picault et al, 2006; Abb. 35).

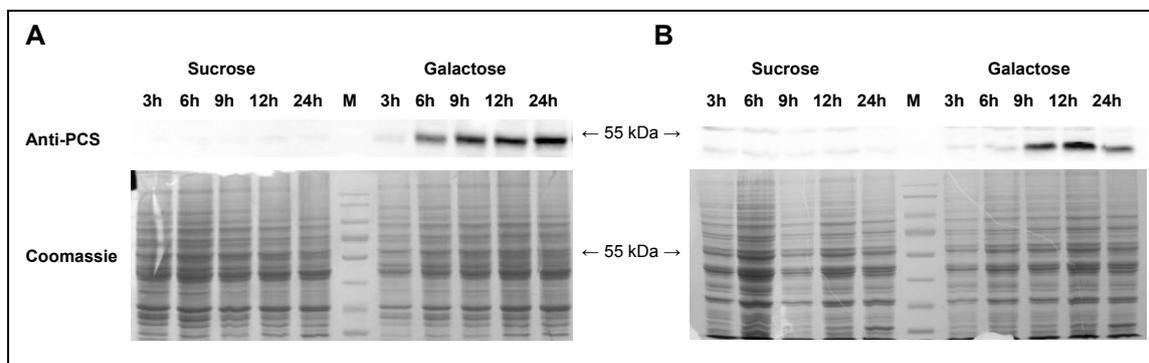


Abb. 35 Expression von *AtPCS1* und *AtPCS2* in Hefe

Die Zellen der Doppelmutante Δ *cpy* Δ *cpc* mit dem Konstrukt *pGAL1::AtPCS1* (A) bzw. *pGAL1::AtPCS2* (B) wurden in SD-Medium mit 2% Sucrose angezogen und die entsprechenden Hauptkulturen mit 2% Sucrose bzw. 2% Galactose angeimpft. Nach der Zellernte ($1,5 \cdot 10^8$ Zellen) wurde der Proteinrohextrakt isoliert und in einer 10%igen SDS-PAGE elektrophoretisch separiert und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert bzw. mit Coomassie gefärbt. Die Immundetektion erfolgte mit den PCS Antikörpern.

Mit den PCS Antikörpern war nur in den Fraktionen des galaktosehaltigen Mediums eine Proteinbande bei ca. 55 kDa für *AtPCS1* und bei ca. 51 kDa für *AtPCS2* zu beobachten. Dabei fiel auf, dass nach dreistündiger Expression nur vergleichsweise

schwache Banden nachgewiesen werden konnten. Für die Intensität der Banden konnte innerhalb des untersuchten Zeitrahmens eine Zunahme festgestellt werden. In den Proben der Hefezellen, die im sucrosehaltigen Medium angezogen wurden, ließen sich auch mit längerer Detektionszeit keine Signale nachweisen. Anhand des Coomassie-gefärbten Gels konnte von einer gleichmäßigen Beladung der SDS-Gele ausgegangen werden (Abb. 35).

Die Aktivität von AtPCS1 für die PC-Synthese kann durch Schwermetall-Ionen induziert werden. Dabei haben sich vor allem Cd^{2+} -Ionen als stärkste Aktivatoren erwiesen (Zenk, 1996). Im Hinblick auf Expressionsanalysen *in planta* kann allerdings nicht von einem transkriptionellen Einfluss ausgegangen werden, da das Expressionsniveau für AtPCS1 durch die Zugabe von Cd^{2+} -Ionen unverändert bleibt. Vielmehr wird eine Proteinstabilisierung durch Bindung von divalenten Metall-Ionen wie Cd^{2+} oder Zn^{2+} vermutet. Um die These für die Proteinstabilisierung zu überprüfen, wurden die Zellen der Doppelmutante $\Delta cpy\Delta cpc$ mit dem Konstrukt pGAL1::AtPCS1 in Selektivmedium mit Sucrose angezogen und die Hauptkultur in Selektivmedium mit Galaktose angeimpft. Nach drei Stunden wurde zu der Hälfte der Proben 50 μM Cd^{2+} gegeben. Zu den in Abb. 36 angegebenen Zeitpunkten wurde jeweils die gleiche Zellzahl von der Hefesuspension abgenommen und die Zellen geerntet. Die Proteinextrakte wurden isoliert und in einer 10% SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte die Inkubation mit dem PCS-Antikörper (Abb. 36).

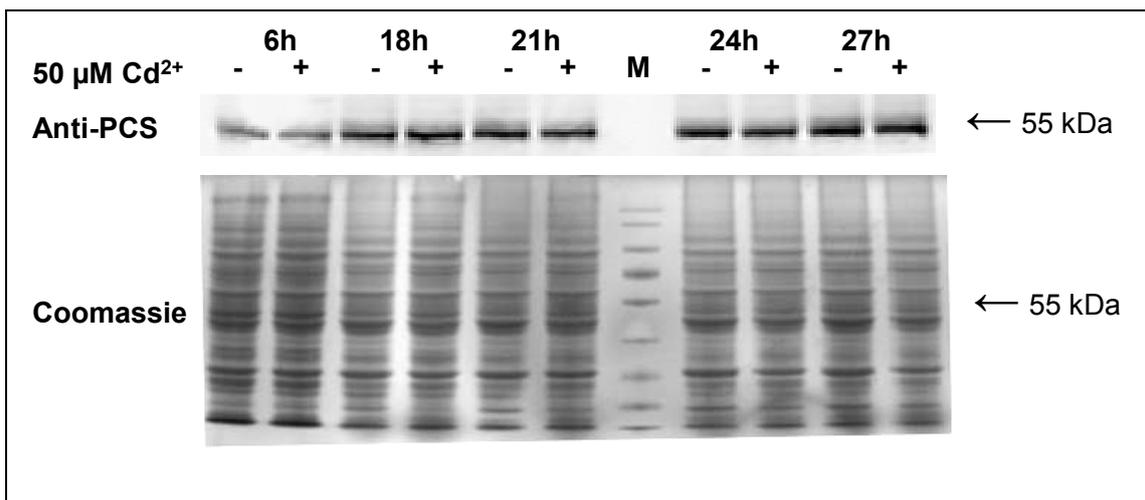


Abb. 36 Einfluss von Cd^{2+} auf die Proteinstabilität von AtPCS1

Die Zellen der Doppelmutante $\Delta cpy\Delta cpc$ mit dem Konstrukt pGAL1::AtPCS1 wurden in SD-Medium mit 2% Sucrose angezogen und die entsprechenden Hauptkulturen mit 2% Sucrose bzw. 2% Galactose mit einer $\text{OD}_{600}=0,1$ angeimpft. Nach drei Stunden erfolgte die Zugabe von 50 μM Cd^{2+} . Zu den angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Zellernte von $1,5 \cdot 10^8$ Zellen. Die Proteine des Zellrohextraktes wurden in einer 10%igen SDS-PAGE elektrophoretisch separiert

und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert bzw. mit Coomassie gefärbt. Die Immundetektion erfolgt mit den PCS-Antikörpern.

Erneut ließ sich ab sechs Stunden Inkubation im galaktosehaltigen Medium eine Proteinbande bei ca. 55 kDa nachweisen. Dabei waren keine Unterschiede der Bandenintensität durch die Zugabe der Cd²⁺-Ionen feststellbar. Nach längerer Inkubation konnte eine höhere AtPCS1-Konzentration nachgewiesen werden, allerdings waren weiterhin keine Unterschiede durch die Schwermetall-Belastung festzustellen. Im Vergleich mit dem Coomassie-gefärbten Gel zeigte sich die gleichmäßige Beladung der Gel-Taschen. Auch für AtPCS2 ergaben sich keine Hinweise für eine Proteinstabilisierung durch Cd²⁺-Ionen (Daten nicht gezeigt).

Die Daten belegten die Expression von *AtPCS1* und *AtPCS2* in den untersuchten Hefezellen nach Zugabe von Galactose. In den Hefezellen mit Sucrose im Medium war keine Expression der Proteine nachweisbar. Des Weiteren beeinflusste die Zugabe von Cd²⁺-Ionen weder die Expression noch die Proteinstabilität von *AtPCS1* in *S. cerevisiae*.

3.3.2 Lokalisation von *AtPCS1* und *AtPCS2* in der Hefe

Aus den Expressionsdaten ging deutlich hervor, dass beide Proteine in den Hefezellen synthetisiert werden. Für die genauere Charakterisierung von *AtPCS1* und *AtPCS2* sollte zunächst die Lokalisation der beiden Proteine mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Dafür wurden *AtPCS1* und *AtPCS2* mit einem Epitop-*tag* fusioniert. Anwendung fand hier der eGFP-*tag*, welcher durch den Austausch von zwei Aminosäuren eine stärkere Fluoreszenz aufweist als das Wildtyp-GFP. Zusätzlich sollte auch *AtHB6*, ein Transkriptionsfaktor der Homeodomän-Leucin-Zipper Klasse (Henriksson et al., 2005) als Kontrolle mitgeführt werden. *AtHB6* weist *in planta* eine nukleäre Lokalisation auf (Himmelbach et al., 2002). Analysen in Hefe lagen bisher noch nicht vor.

Für die Herstellung der eGFP-Konstrukte wurde in dem pGAL1 Plasmid der CYC1-Terminator über die *XhoI* und die *KpnI* Schnittstellen durch die kodierende Sequenz für den eGFP-*tag* ersetzt. Daraufhin wurden die cDNAs von *AtPCS1* und *AtPCS2* von den in Kapitel 3.3.1 generierten Plasmiden mit den Primern #25 und #26 für *AtPCS1* bzw. #23 und #27 für *AtPCS2* mit einer *proof-reading* Polymerase amplifiziert und ohne Stopp-Codon in den modifizierten Vektor kloniert. Die Amplifikation von *AtHB6* erfolgte mit den Primern #28 und #29 von dem Plasmid pSPYNE-35S/pUG-YFP^N-HB6,

welches freundlicherweise von Frau Dr. Danièle Moes zur Verfügung gestellt worden war. Die entsprechenden Konstrukte wurden anhand von Sequenzierungen überprüft und anschließend in die Doppelmutante $\Delta cpy\Delta cpc$ transformiert. Die Verifizierung der Transformanden erfolgte mittels Kolonie-PCR.

Für die Expression der Fusionsproteine wurden die jeweiligen Hefestämme über Nacht in Selektivmedium mit Galaktose angezogen und hinsichtlich der eGFP-Fluoreszenz untersucht (Abb. 37). Um cytoplasmatische und vakuoläre Strukturen besser voneinander trennen zu können, erfolgte parallel eine Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff FM4-64 (Abb. 37), welcher in Hefen spezifisch die Vakuolenmembran anfärbt (Vida und Emr, 1995).

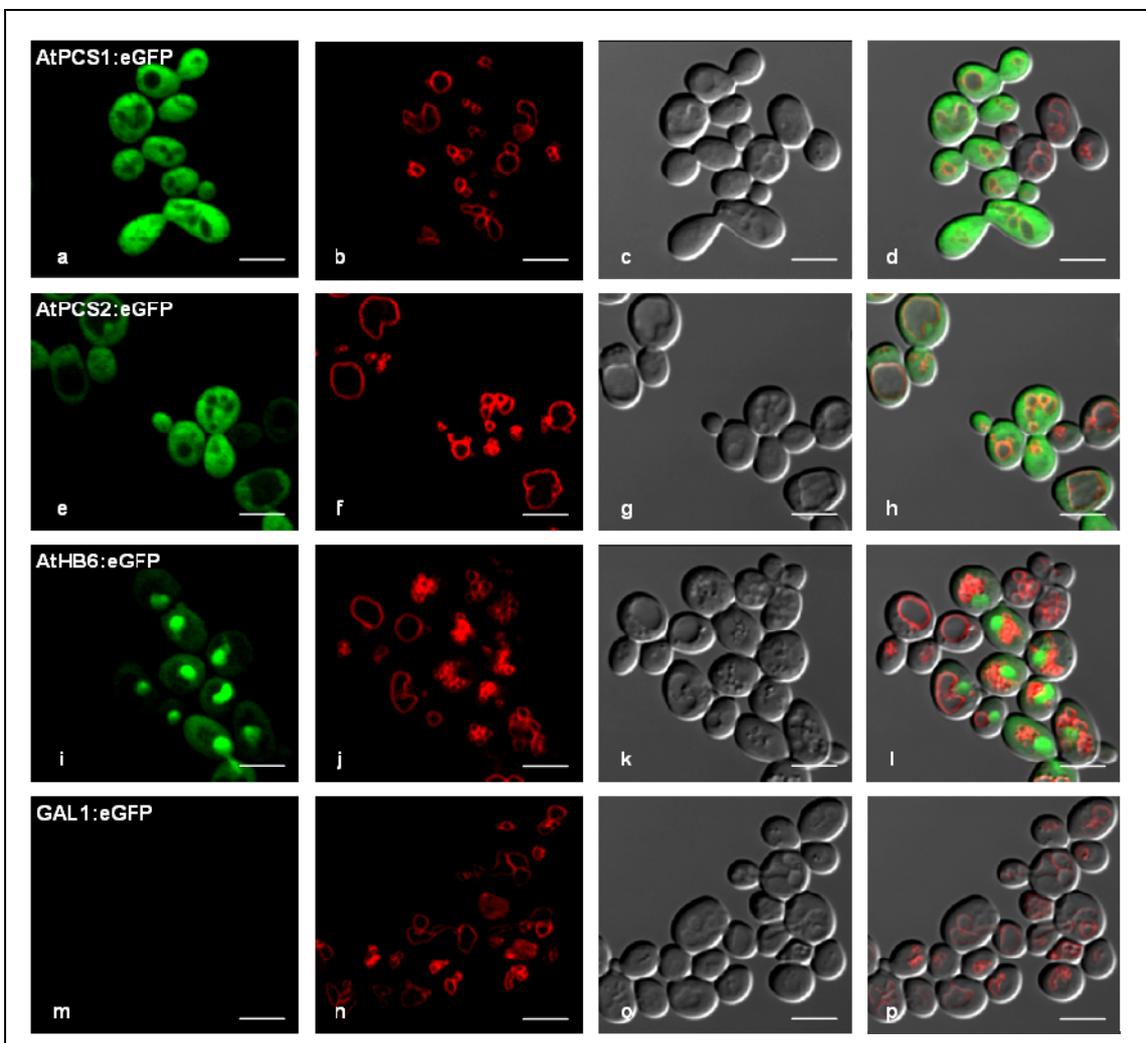


Abb. 37 Lokalisation der eGFP-Fusionsproteine

Mit Hilfe des konfokalen Mikroskops wurden die eGFP- (a,e,i,m) und FM4-64-Fluoreszenz (b,f,j,n) von der Doppelmutante $\Delta cpy\Delta cpc$ mit AtPCS1:eGFP (a-d), AtPCS2:eGFP (e-h) und AtHB6:eGFP (i-l) untersucht. Als Kontrolle wurden ebenfalls die Signale von GAL1:eGFP (m-p) dokumentiert. Für die bessere Visualisierung sind ebenfalls die DIC-Durchlichtaufnahmen (c,g,k,o) und eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale (d,h,l,p) gezeigt. Die angegebene Maßeinheit entspricht 5 μm .

Sowohl AtPCS1:eGFP als auch AtPCS2:eGFP zeigten eine cytoplasmatische Lokalisation (Abb. 37a,e). Beim Vergleich mit den Fluoreszenzsignalen des FM4-64 (Abb. 37b,f) konnte bei beiden Stämmen kein eGFP-Signal in der Vakuole detektiert werden. Bei AtHB6 hingegen zeigte sich die deutliche Akkumulation des Fluoreszenzsignals im Zellkern der Hefen (Abb. 37i). Die Kontrolle mit dem leeren Vektor ließ nur ein sehr schwaches cytoplasmatisches Fluoreszenzsignal erkennen.

Die Daten für die Induktion der PC-Synthese verdeutlichten, dass Cd^{2+} -Ionen AtPCS1 und AtPCS2 aktivieren können. Demzufolge sollte nachfolgend überprüft werden, ob die Inkubation mit Schwermetall-Ionen zu einer Veränderung der Proteinlokalisierung in der Hefe führt. Dafür wurden die Hefestämme mit den entsprechenden Konstrukten in Selektivmedium mit Sucrose bzw. Galaktose über Nacht angezogen, wobei die eine Hälfte der Kulturen im galaktosehaltigen Medium zusätzlich mit $50 \mu\text{M Cd}^{2+}$ belastet wurden. Nach 15 Stunden Inkubation wurden die Fluoreszenzsignale vom eGFP mit dem konfokalen Mikroskop dokumentiert (Abb. 38).

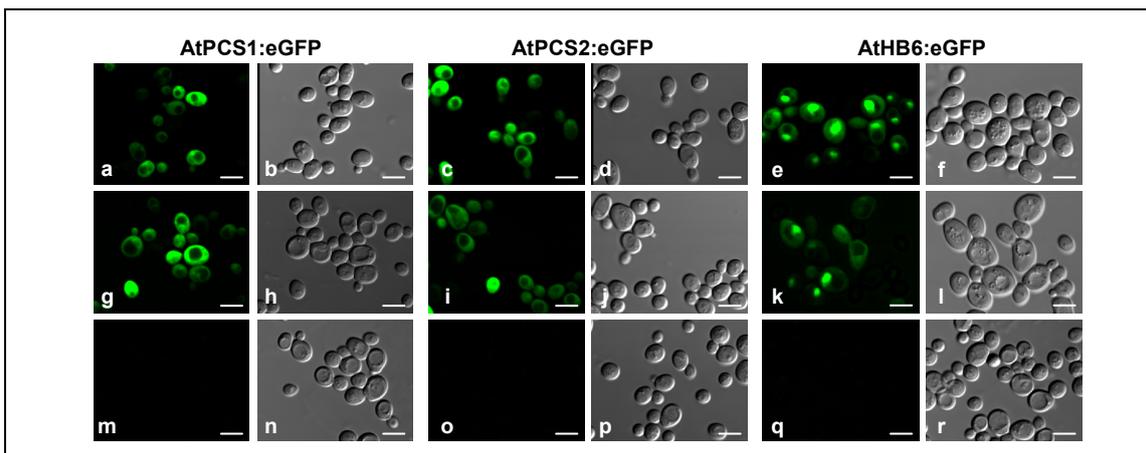


Abb. 38 Einfluss von Cd^{2+} -Ionen auf die Lokalisation

Die Doppelmutante $\Delta cpy\Delta cpc$ mit den Plasmiden AtPCS1:eGFP, AtPCS2:eGFP und AtHB6:eGFP wurden $\bar{u}N$ in Selektivmedium mit Galaktose (a-f), mit Galaktose und $50 \mu\text{M Cd}^{2+}$ (g-l) bzw. mit Sucrose (m-r) angezogen. Nach 15 Stunden wurde das Fluoreszenzsignal für eGFP und das entsprechende Durchlichtbild mit dem konfokalen Mikroskop dokumentiert. Die angegebene Maßeinheit entspricht $5 \mu\text{m}$.

Anhand der nachweisbaren Fluoreszenzsignale waren keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Lokalisation der getesteten Fusionsproteine zu erkennen. Sowohl AtPCS1:eGFP (Abb. 38a,g) als auch AtPCS2:eGFP (Abb. 38c,i) zeigten nach der Cadmiumbelastung eine cytoplasmatische Lokalisierung. Auch die Kontrolle in Form von AtHB6:eGFP (Abb. 38e,k) war nach Inkubation mit den Schwermetall-Ionen weiterhin im Kern lokalisierbar. Die Kontrollaufnahmen der Zellen im sucrosehaltigen

Medium zeigten, dass in den entsprechenden Hefestämmen kein Hintergrund-Signal detektiert werden konnte.

Zusammenfassend konnte sowohl für AtPCS1 als auch für AtPCS2 nach Expression in der Hefe eine cytoplasmatische Lokalisation festgestellt werden. Die Zugabe von Cd²⁺-Ionen aktiviert die PC-Synthese durch die genannten Enzyme. Allerdings führte die Anwesenheit der Schwermetall-Ionen zu keiner Translokation der Proteine. Somit scheint die PC-Synthese anders als durch CPY und CPC nicht vakuolär sondern cytoplasmatisch zu erfolgen. Um die Aktivität der beiden Enzyme in den Hefezellen zu verifizieren, sollte nachfolgend die PC-Synthese nach Cadmium-Belastung genauer untersucht werden.

3.3.3 PC-Synthese durch AtPCS1 und AtPCS2 in *S. cerevisiae*

Der Aktivitätsnachweis für AtPCS1 und AtPCS2 sollte mit Hilfe der PC-Synthese erfolgen. Dafür wurde die Doppelmutante $\Delta cpy\Delta cpc$ mit dem Konstrukt pGAL1::AtPCS1 bzw. pGAL1::AtPCS2 unter nicht-induzierten Bedingungen angezogen und die Hauptkultur im galaktosehaltigen Medium auf eine OD₆₀₀=0,1 inokuliert. Um den Einfluss von Cd²⁺-Ionen zu untersuchen, erfolgte nach drei Stunden Inkubation die Zugabe von 50 µM Cd²⁺ zu der Hälfte der Kulturen. Nach weiteren 12 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet, der Zellrohextrakt isoliert und hinsichtlich der gebildeten PCs mit Hilfe der HPLC analysiert. Die erhaltenen HPLC-Chromatogramme sind in Abb. 39 dargestellt. Die Peaks ließen sich mit Hilfe von *in vitro* synthetisierten Standards identifizieren (Kapitel 2.4.1.1).

Ohne Cd²⁺-Ionen ließ sich nach Expression von AtPCS1 nur GSH im Chromatogramm der HPLC nachweisen (Abb. 39A, unten). Dahingegen konnten bereits auch Fraktionen für PC₂ und PC₃ nach Expression von AtPCS2 beobachtet werden (Abb. 39B, unten). Nach Inkubation im schwermetallhaltigen Medium waren in beiden Zellrohextrakten PCs bis PC₄ nachweisbar (Abb. 39A,B oben). Dabei fiel auf, dass sich mit AtPCS2 höhere Konzentrationen an PC₂ und PC₃ ergaben als mit AtPCS1. Des Weiteren ließ sich im Chromatogramm von AtPCS1 ein zusätzlicher Peak zwischen PC₂ und PC₃ nachweisen, welcher bei AtPCS2 nicht beobachtet werden konnte.

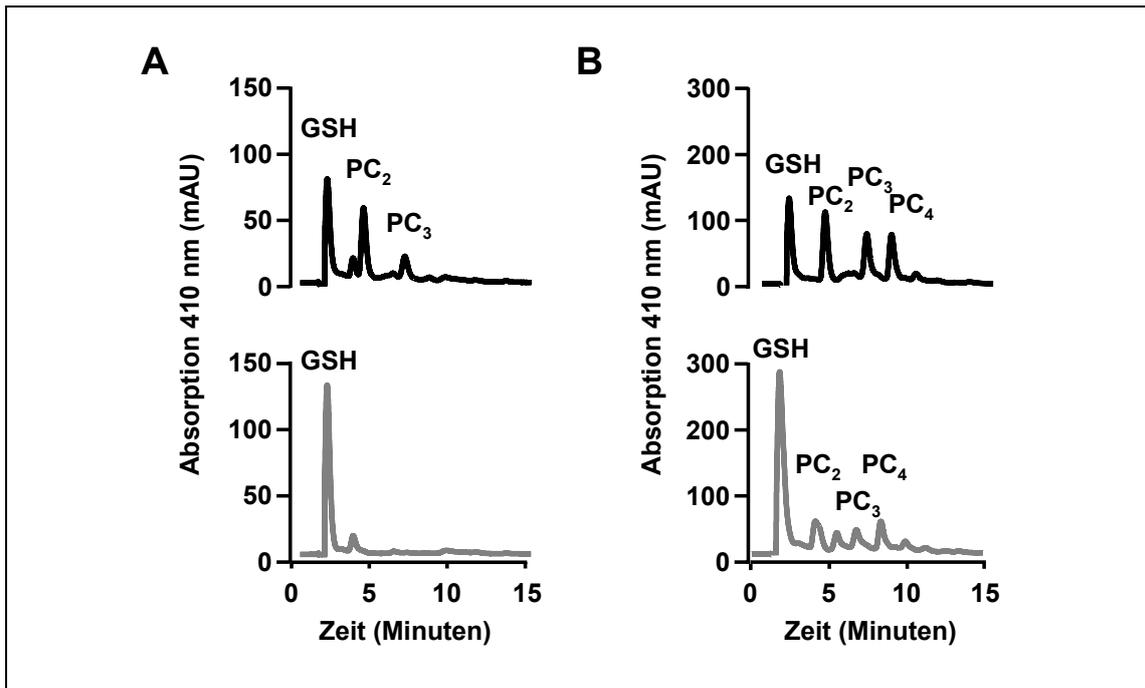


Abb. 39 Vergleich der PC-Synthese von AtPCS1 und AtPCS2

Die Zellen der Doppelmutante $\Delta cpy\Delta cpc$ mit dem Konstrukt pGAL1::AtPCS1 (grau) bzw. pGAL1::AtPCS2 (schwarz) wurden nach drei Stunden Inkubation im galaktosehaltigen Medium in Ab- (A) bzw. Anwesenheit von 50 $\mu\text{M Cd}^{2+}$ (B) für weitere 12 Stunden inkubiert. Nach der Zellernte wurde der Zellrohextrakt isoliert und mit Hilfe der HPLC analysiert.

Anhand dieser Analysen bestätigte sich eindeutig die Funktionalität von AtPCS1 und AtPCS2 in Hefezellen. Die nachweisbaren PC-Mengen ließen eine höhere Aktivität von AtPCS2 im Vergleich zu AtPCS1 vermuten, da von einer vergleichbaren Konzentration der beiden Proteine in den Hefezellen ausgegangen werden konnte (Vgl. Abb. 35A,B; S. 84). Um die Abhängigkeit der PC-Synthese von der zugegebenen Cd^{2+} -Konzentration zu zeigen, wurden die Zellen der Doppelmutante $\Delta cpy\Delta cpc$ mit den Konstrukten pGAL1::AtPCS1 bzw. pGAL1::AtPCS2 nach drei Stunden Inkubation im galaktosehaltigen Medium mit steigenden Cd^{2+} -Konzentrationen belastet. Nach weiteren 12 Stunden erfolgte die Zellernte und Analyse des Zellrohextraktes mit Hilfe der HPLC (Abb. 40).

Bezüglich des Wachstums waren keine Unterschiede nach der Expression von AtPCS1 und AtPCS2 feststellbar (Abb. 40A). Durch die zunehmende Cd^{2+} -Konzentration wurde das Wachstum beider Stämme vergleichbar gehemmt. Nach Belastung mit 300 $\mu\text{M Cd}^{2+}$ wiesen die Zellen ca. 60% weniger Wachstum als die unbelasteten Zellen auf. Die Zellen mit der Vektorkontrolle zeigten sogar eine 85%ige Reduzierung (Daten nicht gezeigt). Die nachweisbaren GSH-Spiegel waren im Mittel ebenfalls vergleichbar, obwohl die Zellen mit AtPCS2 wesentlich stärkeren Schwankungen unterlagen (Abb. 40B,C).

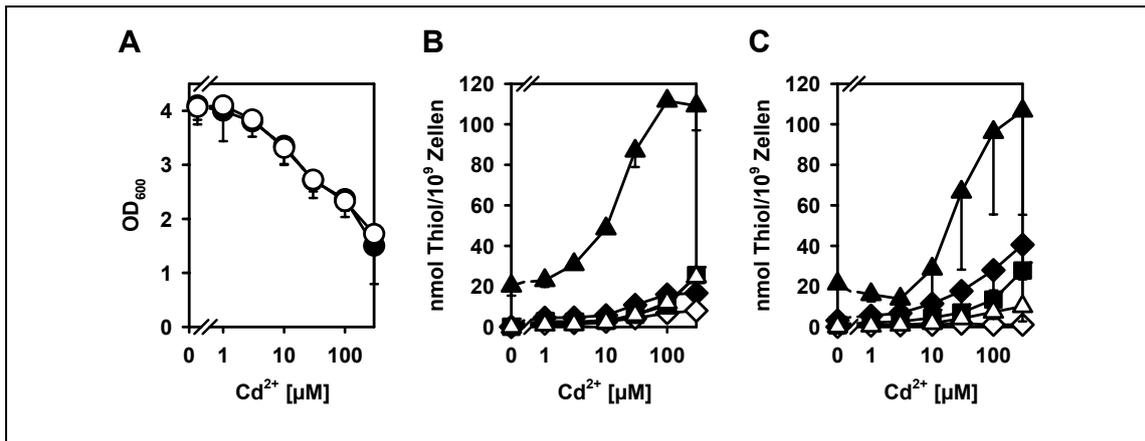


Abb. 40 PC-Synthese von AtPCS1 und AtPCS2 nach Belastung mit variablen Cd²⁺-Konzentrationen

Nach 12-stündiger Inkubation mit den angegebenen Cd²⁺-Konzentrationen wurde von den Zellen der Doppelmutante $\Delta cpy\Delta cpc$ mit dem Konstrukt pGAL1::AtPCS1 (●) bzw. pGAL1::AtPCS2 (○) das Wachstum bestimmt (A) und die Zellen geerntet. Mit Hilfe der HPLC ließen sich die gebildeten Thiole nach Expression von AtPCS1 (B) und AtPCS2 (C) dokumentieren. Neben GSH (▲) waren auch PC₂ (◆), desGlyPC₂ (◇), PC₃ (■) und PC₄ (△) nachweisbar. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Mit steigender Cd²⁺-Konzentration war ein erhöhter GSH-Pool nachweisbar. Die Zunahme lag mit der höchsten Cd²⁺-Konzentration bei einem Faktor 5. Deutlichere Unterschiede zwischen den beiden Stämmen ließen sich beim Vergleich der gebildeten PCs beobachten. Während bei AtPCS2 nur PC₂, PC₃ und PC₄ dokumentiert werden konnten, war nach der Expression von AtPCS1 auch ein Peak für desGlyPC₂ nachweisbar. Die Konzentration aller PCs stieg mit zunehmender Konzentration an Cd²⁺-Ionen. Die Summe der gebildeten PCs war für AtPCS1 und AtPCS2 vergleichbar. Jedoch machten bei den Zellen mit AtPCS1 PC₃ und PC₄ den größten Teil der synthetisierten PCs aus, während bei den Zellen mit AtPCS2 am stärksten PC₂ gebildet wurde (Abb. 40B,C). Bei den Zellen mit der Vektorkontrolle ließen sich auch bei hohen Cd²⁺-Konzentrationen keine PCs belegen (Daten nicht gezeigt).

Die Analysen zeigten eindeutig die Aktivität von AtPCS1 und AtPCS2 in der Hefe *S. cerevisiae*. Nach Inkubation mit Cd²⁺-Ionen waren beide Enzyme in der Lage die Biosynthese von PCs vergleichbar zu katalysieren. Unterschiede ließen sich nur hinsichtlich der Kettenlänge der gebildeten PCs beobachten. Nachdem nun sowohl die Expression, die Funktionalität und die katalytische Aktivität von AtPCS1 und AtPCS2 bestätigt werden konnten, sollte nachfolgend die Rolle von AtPCS1 und AtPCS2 beim GS-Biman Abbau untersucht werden.

3.3.4 Die Rolle von AtPCS1 und AtPCS2 beim GS-Biman-Abbau

Von AtPCS1 konnte die Beteiligung am Abbau von GS-Biman bereits *in vitro* gezeigt werden (Beck et al., 2003). Erst vor kurzem war es möglich, diese Funktion auch *in planta* nachzuweisen (Blum et al., 2007). Dabei ließ sich die katalytische Aktivität erneut durch die Anwesenheit von Schwermetall-Ionen verstärken. Die Rolle der AtPCS2 *in planta* wurde bisher noch nicht näher betrachtet.

Für die Charakterisierung wurden die Konstrukte pGAL1::AtPCS1 und pGAL1::AtPCS2 sowie die Vektorkontrolle pGAL1 in die Tripelmutante $\Delta cis2\Delta cpy\Delta cpc$ transformiert und entsprechend des eingebrachten Auxotrophiemarkers auf Uracil selektiert. Die erhaltenen Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR überprüft. Die Dreifachmutante mit pGAL1::AtPCS1 bzw. pGAL1 wurde unter nicht-induzierten Bedingungen angezogen und anschließend in der frühen exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600}=0,3$) mit 100 μM MCB für 10 Minuten belastet. Um die Expression zu induzieren, erfolgte die Resuspension der Zellen in galaktosehaltigem Selektivmedium in An- bzw. Abwesenheit von 50 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$. Um eine ausreichende Expression von AtPCS1 zu gewährleisten, wurden die Zellen für 15 Stunden inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Vom erhaltenen Zellpellet erfolgten die Isolation des Zellrohextraktes und die Analyse der zellulären Biman-Verbindungen mit Hilfe der HPLC. Die erhaltenen Chromatogramme sind in Abb. 41 dargestellt.

Für die Vektorkontrolle ließ sich nach 15 Stunden Inkubation nur eine Fraktion mit der entsprechenden Retentionszeit für GS-Biman in den HPLC-Chromatogrammen nachweisen (Abb. 41A). Dabei waren keine Unterschiede nach Belastung mit Cd^{2+} -Ionen erkennbar. Nach 15-stündiger Expression von AtPCS1 konnte neben dem GS-Biman Peak auch eine Fraktion für γEC -Biman beobachtet werden (Abb. 41B). Die Höhe der γEC -Peaks unterschied sich signifikant durch die Inkubation mit Cd^{2+} -Ionen. Während in der unbelasteten Probe ca. 11% des anfänglich markierten GS-Bimans in γEC -Biman umgesetzt wurden, waren es in der belasteten Probe ca. 75%.

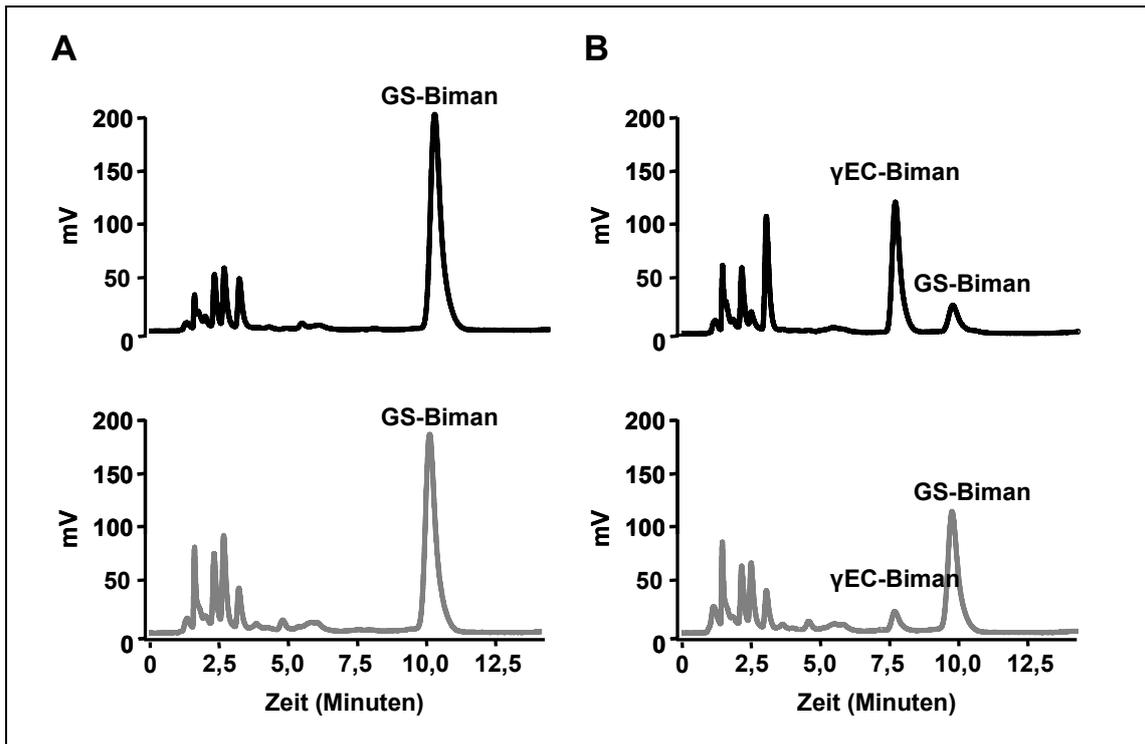


Abb. 41 γ EC-Biman Bildung nach Expression von AtPCS1

Die Zellen der Dreifachmutante $\Delta cis2\Delta cpy\Delta cpc$ mit dem Plasmid pGAL1 (A) bzw. pGAL1:AtPCS1 (B) wurden unter nicht-induzierten Bedingungen angezogen und im Anschluss mit 100 μ M MCB für 10 Minuten belastet. Nach Resuspension der Zellen in galaktosehaltigem Selektivmedium wurden die Zellen in An- (schwarz) bzw. Abwesenheit (grau) von 50 μ M Cd^{2+} für 15 Stunden inkubiert. Die Analyse des Rohextraktes erfolgte mit Hilfe der HPLC auf die gebildeten GS-Biman Derivate.

Anhand dieser ersten Analyse wurde deutlich, dass AtPCS1 die C-terminale Abspaltung des Cysteins vom GS-Biman Komplex auch nach Expression in der Hefe katalysiert. Um die γ EC-Biman Bildung durch AtPCS1 genauer charakterisieren zu können, wurde der zeitliche Verlauf dieses GS-Biman Abbaus untersucht. Dafür wurden die Zellen ($\Delta cis2\Delta cpy\Delta cpc$ mit pGAL1:AtPCS1) wie oben beschrieben angeimpft, belastet und in galaktosehaltigem Medium in An- bzw. Abwesenheit von Schwermetall-Ionen inkubiert. Die Probennahme erfolgte über 22 Stunden zu den in Abb. 42 angegebenen Zeitpunkten. Um gleichbleibende Bedingungen für den Zellaufschluß zu gewährleisten, wurden jeweils $6 \cdot 10^8$ Zellen abzentrifugiert. Die Analyse des Zellrohextraktes erfolgte mit Hilfe der HPLC. In Abb. 42 ist die γ EC-Biman Bildung (Abb. 42A) und die Summe der nachweisbaren Derivate (Abb. 42B) bezogen auf das zum Zeitpunkt Null markierte GSH dargestellt.

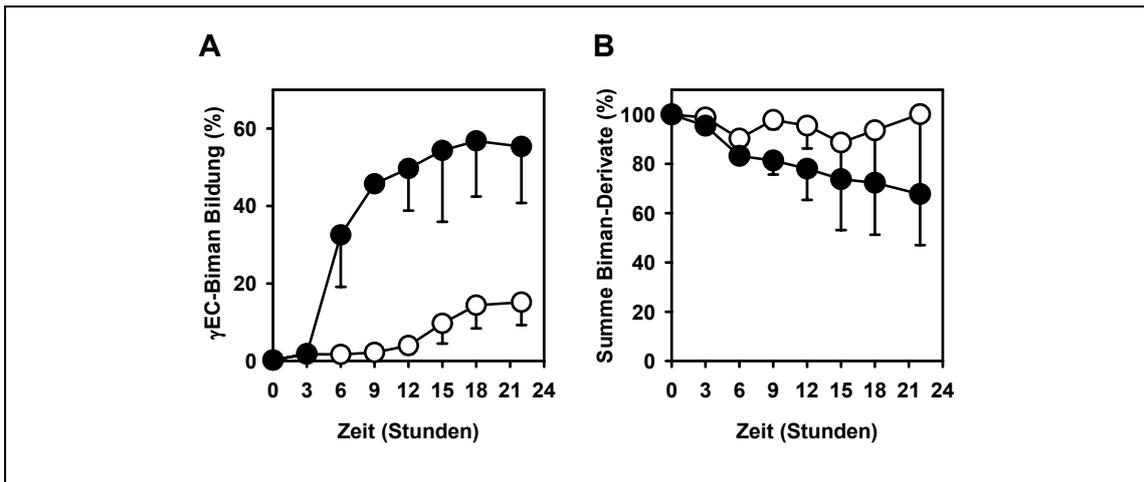


Abb. 42 Cadmiumabhängige γ EC-Biman Bildung von AtPCS1

Die $\Delta cis2\Delta cpy\Delta cpc$ Mutante mit dem Plasmid pGAL1::AtPCS1 wurde mit 100 μ M MCB inkubiert, gewaschen und in galaktosehaltigem Selektivmedium in An- (●) bzw. Abwesenheit (○) von 50 μ M Cd²⁺ resuspendiert. Die Probennahme von je $6 \cdot 10^8$ Zellen erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Analyse des Zellrohextraktes erfolgte mit Hilfe der HPLC. (A) zeigt die γ EC-Biman Bildung bezogen auf das nachweisbare GS-Biman zum Zeitpunkt Null. (B) repräsentiert die Wiederfindung des Fluoreszenzsignals. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Wie bereits die Chromatogramme in Abb. 41B vermuten ließen, bestätigte sich mit den kinetischen Untersuchungen der Einfluss von Cd²⁺-Ionen auf die γ EC-Biman Bildung. Unmittelbar nach der Markierung mit MCB konnte nur GS-Biman im Zellrohextrakt nachgewiesen werden. Auch drei Stunden nach der Inkubation ließen sich noch keine Abbauprodukte beobachten. Der erste erkennbare γ EC-Biman Peak war nach sechs Stunden Inkubation im cadmiumhaltigen Medium detektierbar. Ca. 35% des GS-Bimans waren in γ EC-Biman abgebaut worden. Die unbelasteten Zellen hingegen ließen noch keinen Abbau erkennen. Erst nach 12 Stunden zeigte sich ein deutlicher γ EC-Biman Peak, der ungefähr 4% des GS-Bimans entsprach. Die γ EC-Biman Konzentration in Cd²⁺-behandelten Zellen nahm in den nachfolgenden Stunden zu, bis nach 15 Stunden ein Niveau von ca. 55% des GS-Biman erreicht wurde. Die unbelasteten Zellen erreichten nach 18 Stunden nur einen Anteil von ca. 15%.

Die Summe der nachweisbaren Derivate (Abb. 42B) blieb bei den unbelasteten Zellen relativ konstant bei 100%. Bei den schwermetallbelasteten Zellen war innerhalb der betrachteten 22 Stunden ein maximaler Verlust von 30% zu verzeichnen. Dabei gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Dreifachmutante mit dem Expressionskonstrukt und der Vektorkontrolle (Daten nicht gezeigt).

Ausgehend von diesen Daten kann die Schwermetallabhängigkeit der AtPCS1 auch hinsichtlich der γ EC-Biman Bildung belegt werden. Durch die Anwesenheit von 50 μ M

Cd^{2+} kann die Aktivität der AtPCS1 um einen Faktor 3,5 gesteigert werden. Es stellt sich die Frage, ob es sich dabei um die optimale Induktion der Aktivität handelt. Um dies zu beantworten, wurden die Zellen nach der GSH Markierung in galaktosehaltigem Medium resuspendiert und mit den Schwermetall-Ionen Cd^{2+} , Zn^{2+} und Cu^{2+} in den Konzentrationen 1-1000 μM belastet. Die Inkubation erfolgte für 12 Stunden. Das Wachstum der Zellen und die nachweisbaren γEC -Biman Anteile sind in Abb. 43 wiedergegeben.

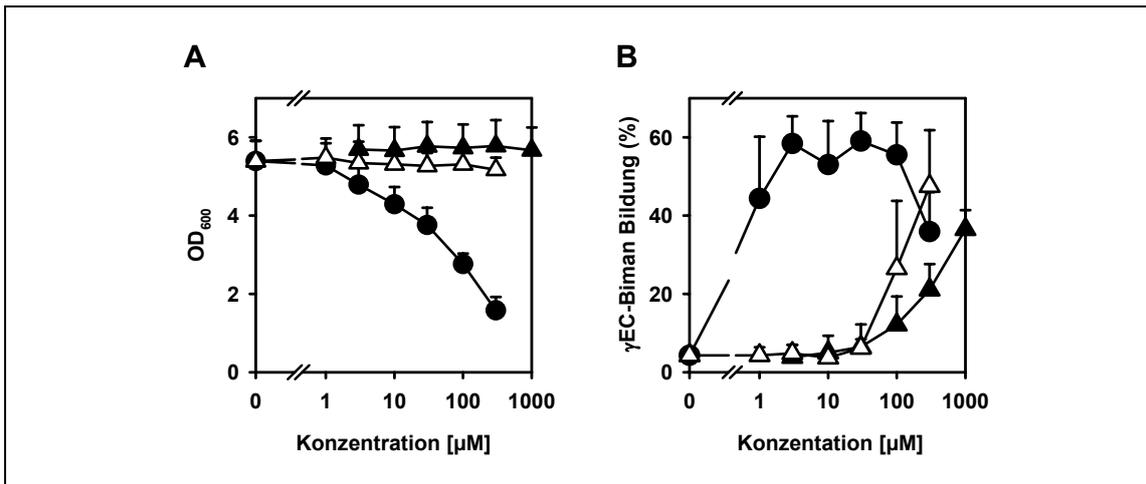


Abb. 43 γEC -Biman Bildung von AtPCS1 in Abhängigkeit von verschiedenen Schwermetallen

Die Zellen der Dreifachmutante $\Delta cis2\Delta cpy\Delta cpc$ mit dem Plasmid pGAL1:AtPCS1 wurden unter nicht-induzierten Bedingungen angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase ($\text{OD}_{600}=0,3$) mit 100 μM MCB für 10 Minuten belastet. Nach dem Waschen der Zellen erfolgte die Resuspension in galaktosehaltigem Selektivmedium. Die Zellsuspension wurde in 100 ml-Kolben à 10 ml Aliquots aufgeteilt ($\text{OD}_{600}=0,25$) und mit den entsprechenden Konzentrationen an Cd^{2+} (●), Cu^{2+} (Δ) und Zn^{2+} (▲) versehen. Nach 12 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet und der Zellohextrakt mit Hilfe der HPLC analysiert. In (A) ist das Wachstum der Zellen nach 12 Stunden Inkubation dargestellt. (B) gibt die γEC -Biman Bildung in Bezug auf die GS-Biman Konzentration zum Zeitpunkt Null wieder. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

Überraschenderweise hatten die getesteten Kupfer- und Zink-Konzentrationen (bis 300 bzw. 1000 μM) keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen (Abb. 43A). Zink schien das Wachstum sogar zu fördern. Die Gegenwart von Cd^{2+} -Ionen hingegen hemmte das Wachstum mit steigender Konzentration deutlich. Mit einer Konzentration von 300 μM Cd^{2+} wurde das Wachstum der Zellen um 70% reduziert. Die deutlichsten Effekte hinsichtlich der γEC -Biman Bildung zeigten sich ebenfalls nach Belastung mit Cd^{2+} -Ionen (Abb. 43B). Bereits die Konzentration von 1 μM der Schwermetall-Ionen reichte aus, um ca. 40% des GS-Biman in γEC -Biman abzubauen. Der maximale Umsatz konnte mit einer Konzentration von 10 μM Cd^{2+} erreicht werden und lag bei ca. 60% des GS-Bimans. Mit zunehmender Konzentration sank die nachweisbare Menge an γEC -Biman. Für die Zn^{2+} - und Cu^{2+} -Ionen ließ sich bis 10 μM kein Umsatz des

GS-Biman beobachten. Erst ab einer Belastung mit 30 μM war eine entsprechende Fraktion mit Hilfe der HPLC nachweisbar. Mit steigenden Konzentrationen ließen sich auch zunehmende γEC -Biman Mengen feststellen. So resultierte die Inkubation mit 300 μM Cu^{2+} in ca. 50% γEC -Biman, während durch 1000 μM Zn^{2+} nur ca. 35% des GS-Bimans abgebaut werden konnten.

Wie bereits erwähnt, liegen für die zweite PCS aus *A. thaliana* bisher keine Belege für die Beteiligung am GS-Konjugat Abbau vor. Um dies genauer zu untersuchen, wurde die Dreifachmutante $\Delta cis2\Delta cpy\Delta cpc$ mit dem Plasmid pGAL1::AtPCS2 mit MCB belastet und mit den Schwermetall-Ionen Cd^{2+} , Zn^{2+} und Cu^{2+} in unterschiedlichen Konzentrationen versehen. Nach 12 Stunden Inkubation wurde das Wachstum bestimmt und die γEC -Bildung mit Hilfe der HPLC nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Abb. 44 dargestellt.

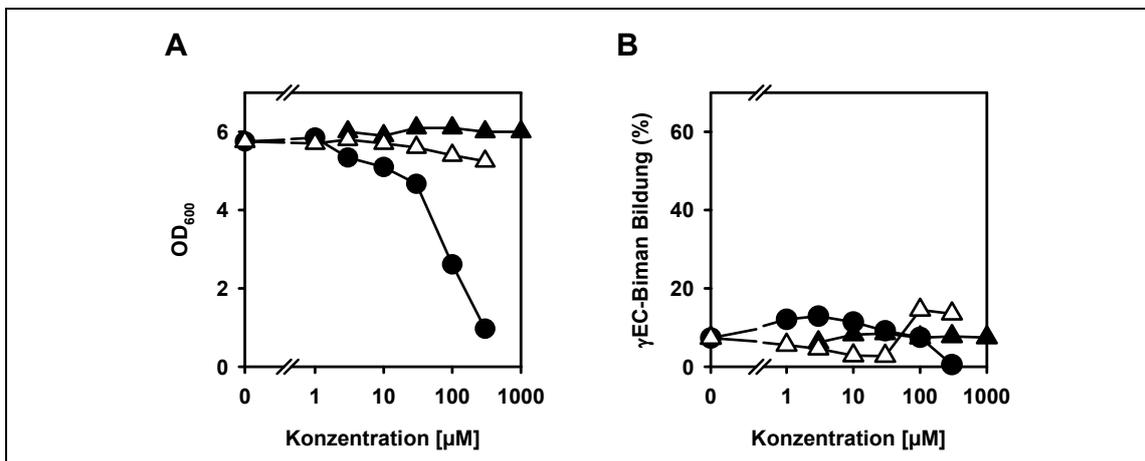


Abb. 44 γEC -Biman Bildung von AtPCS2 in Abhängigkeit von verschiedenen Schwermetallen

Die Zellen der Dreifachmutante $\Delta cis2\Delta cpy\Delta cpc$ mit dem Plasmid pGAL1::AtPCS2 wurden nach der Belastung mit MCB in galaktosehaltigem Selektivmedium resuspendiert ($\text{OD}_{600}=0,25$) und mit den entsprechenden Konzentrationen an Cd^{2+} (●), Cu^{2+} (△) und Zn^{2+} (▲) versehen. Nach 12 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet und der Zellrohextrakt mit Hilfe der HPLC analysiert. (A) zeigt das Wachstum der Zellen nach 12 Stunden Inkubation. (B) gibt die γEC -Biman Bildung in Bezug auf die GS-Biman Konzentration zum Zeitpunkt Null wieder.

Ähnlich wie für AtPCS1 besaßen die Cu^{2+} und Zn^{2+} -Ionen auch nach der Expression von AtPCS2 keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen. Die Anwesenheit von Cd^{2+} -Ionen hingegen reduzierte das Wachstum mit steigender Konzentration deutlich (Abb. 44A). Die γEC -Biman Bildung schien die hier untersuchten Schwermetall-Ionen kaum zu beeinflussen (Abb. 44B). Der Grundumsatz von GS-Biman in γEC -Biman von ca. 5% konnte durch die verwendeten Konzentrationen an Cd^{2+} - und Cu^{2+} -Ionen maximal um einen Faktor 2 gesteigert werden, während die Zn^{2+} -Ionen keine Induktion hervorriefen.

Zusammenfassend zeigten die Daten, dass nicht nur Cd^{2+} -Ionen zu einer Aktivierung von AtPCS1 führten, sondern auch Cu^{2+} und Zn^{2+} -Ionen die Glycinabspaltung von GS-Konjugaten förderten. Die optimale Aktivierung konnte mit $10 \mu\text{M Cd}(\text{NO}_3)_2$ erreicht werden, für Cu^{2+} und Zn^{2+} lag das Optimum oberhalb der hier untersuchten Konzentrationen. Ob die beiden Schwermetalle sogar einen stärkeren Umsatz des GS-Biman hervorrufen, kann anhand dieser Daten nicht ausgesagt werden. Für AtPCS2 ließ sich ebenfalls eine geringe Beteiligung am GS-Biman Abbau feststellen, allerdings führten weder Cu^{2+} noch Zn^{2+} oder Cd^{2+} zu einer signifikanten Steigerung der γEC -Biman Bildung nach AtPCS2 Expression.

3.3.5 Einfluss des C-Terminus von AtPCS1 und AtPCS2 auf die PC-Synthese und den GS-Biman Abbau

Von AtPCS1 und AtPCS2 sind 78% der kodierenden Sequenz identisch zueinander. Dabei ist die stärkste Ähnlichkeit im N-terminalen Bereich der Proteine zu finden, während der C-terminale Bereich eine höhere Variabilität aufweist (Vgl. Abb. 47, S. 101). Untersuchungen mit C-terminal verkürzten Versionen von AtPCS1 zeigten, dass der N-Terminus des Proteins für die Cd^{2+} -abhängige PC-Synthese ausreicht (Romanyuk et al., 2006). Da für AtPCS2 diesbezüglich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* keine Daten vorliegen, sollte mit den C-terminal verkürzten AtPCS1 und AtPCS2 Konstrukten zunächst die schwermetall-abhängige PC-Synthese und anschließend die Metabolisierung von GS-Konjugaten untersucht werden.

Für die Herstellung von AtPCS1 ΔC wurde mit den Primern #25 und #30 der N-terminale Bereich der AtPCS1 von den Basenpaaren 1 bis 645 amplifiziert und über die *Bam*HI und *Sal*I Restriktionsschnittstellen in den Vektor pSH47 ligiert. Für AtPCS2 ΔC wurden die Primer #23 und #30 verwendet. Die Klonierung in den Vektor pSH47 erfolgte ebenfalls über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Sal*I. Die erhaltenen Konstrukte pGAL1::AtPCS1 ΔC und pGAL1::AtPCS2 ΔC wurden mit Hilfe von Sequenzierungen überprüft und anschließend in die Hefestämme $\Delta\text{cpy}\Delta\text{cpc}$ und $\Delta\text{cis2}\Delta\text{cpy}\Delta\text{cpc}$ transformiert. Anhand von Kolonie-PCR konnte die Aufnahme der Plasmide in die Hefezellen bestätigt werden.

Für die Analyse der PC-Synthese durch den N-Terminus der beiden PCS Gene wurde die Doppelmutante mit den jeweiligen Konstrukten nach dreistündiger Inkubation im galaktosehaltigen Medium mit unterschiedlichen Cd^{2+} -Konzentrationen belastet. Nach

12 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet und mit Hilfe der HPLC auf die gebildeten Thiole untersucht (Abb. 45).

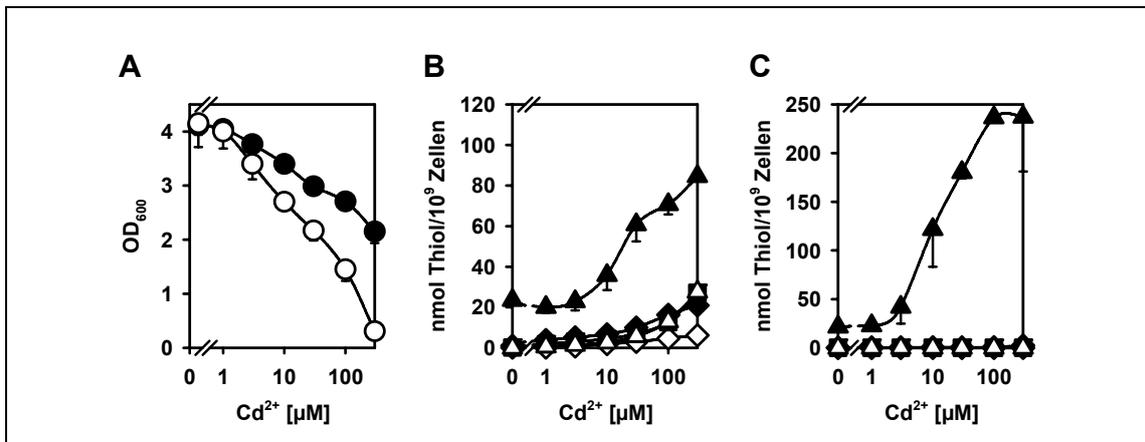


Abb. 45 Einfluss des C-Terminus von AtPCS1 und AtPCS2 auf die PC-Synthese nach Belastung mit variablen Cd²⁺-Konzentrationen

Nach 12-stündiger Inkubation mit den angegebenen Cd²⁺-Konzentrationen wurde von den Zellen der Doppelmutante $\Delta cpy\Delta cpc$ mit dem Konstrukt pGAL1::AtPCS1 Δ C (●) bzw. pGAL1::AtPCS2 Δ C (○) das Wachstum bestimmt (A) und die Zellen geerntet. Mit Hilfe der HPLC ließen sich die gebildeten Thiole nach Expression von AtPCS1 Δ C (B) und AtPCS2 Δ C (C) dokumentieren. Neben GSH (▲) waren auch PC₂ (◆), desGlyPC₂ (◇), PC₃ (■) und PC₄ (△) nachweisbar. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei unabhängigen Experimenten ermittelt.

Überraschenderweise ließen sich bereits beim Wachstum deutliche Unterschiede zwischen den Hefezellen mit AtPCS1 Δ C und AtPCS2 Δ C beobachten (Abb. 45A). Während die Zellen mit der verkürzten Version von AtPCS1 ein vergleichbares Wachstum zu den Zellen mit dem *full-length* Protein zeigten (Vgl. Abb. 40A, S. 91), wiesen die Zellen mit AtPCS2 Δ C bereits bei geringen Cd²⁺-Konzentrationen ein deutlich reduziertes Wachstum auf. Bei hohen Konzentrationen von beispielsweise 300 μ M Cd²⁺ lag die Reduktion bei durchschnittlich 85%. Bezogen auf die Biosynthese von PCs ließ sich mit steigender Cd²⁺-Konzentration in den Zellen mit AtPCS1 Δ C eine Zunahme des GSH- und PC-Pools beobachten. Obwohl der GSH-Spiegel im Vergleich zu den Zellen mit dem *full-length* Protein leicht minimiert war (Vgl. Abb. 40B, S. 91), ließen sich keine Unterschiede hinsichtlich der gebildeten PC-Mengen feststellen. Im Gegensatz dazu waren in den Zellen mit AtPCS2 Δ C auch nach Belastung mit hohen Cd²⁺-Konzentrationen nur sehr geringe Mengen an PC₂ ($\leq 2,3$ nmol/10⁹ Zellen) und PC₃ ($\leq 0,1$ nmol/10⁹ Zellen) nachweisbar. Zusätzlich war mit zunehmender Konzentration der Cd²⁺-Ionen ein starker Anstieg des GSH-Spiegels zu verzeichnen. Im Vergleich zu den unbelasteten Zellen wiesen die Zellen mit 300 μ M Cd²⁺ die zehnfache Menge an GSH pro 10⁹ Zellen auf. Da sowohl für die Zellen mit AtPCS1 Δ C als auch mit AtPCS2 Δ C ein höherer PC-Gehalt als bei der Vektorkontrolle erhalten wurde (Daten nicht gezeigt), konnte von der Expression der entsprechenden Gene ausgegangen

werden. Der immunologische Nachweis der synthetisierten Proteine misslang (Daten nicht gezeigt). Vermutlich benötigen die PCS-Antikörper die C-terminale Region der PCS-Proteine für ihre Bindung.

Während sich die verkürzte Version von AtPCS2 den Ergebnissen zufolge deutlich vom kompletten Protein unterschied, ließen sich bei AtPCS1 keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Cd^{2+} -abhängigen PC-Synthese nachweisen. Es stellte sich die Frage, ob der Verlust der C-terminalen Bereiche einen Einfluss auf den Abbau von GS-Konjugaten hat. Um dies näher zu untersuchen, wurden die Zellen der Dreifachmutante $\Delta cis2\Delta cpy\Delta cpc$ mit den Konstrukten pGAL1::AtPCS1 Δ C bzw. pGAL1::AtPCS2 Δ C in der frühen exponentiellen Wachstumsphase mit 100 μM MCB für 10 Minuten belastet, gewaschen, in galaktosehaltigem Selektivmedium resuspendiert und mit den Schwermetall-Ionen Cd^{2+} , Zn^{2+} und Cu^{2+} in den Konzentrationen 1-1000 μM belastet. Nach 12 Stunden wurden die Zellen geerntet und mit Hilfe der HPLC auf die gebildeten GS-Biman Derivate untersucht (Abb. 46).

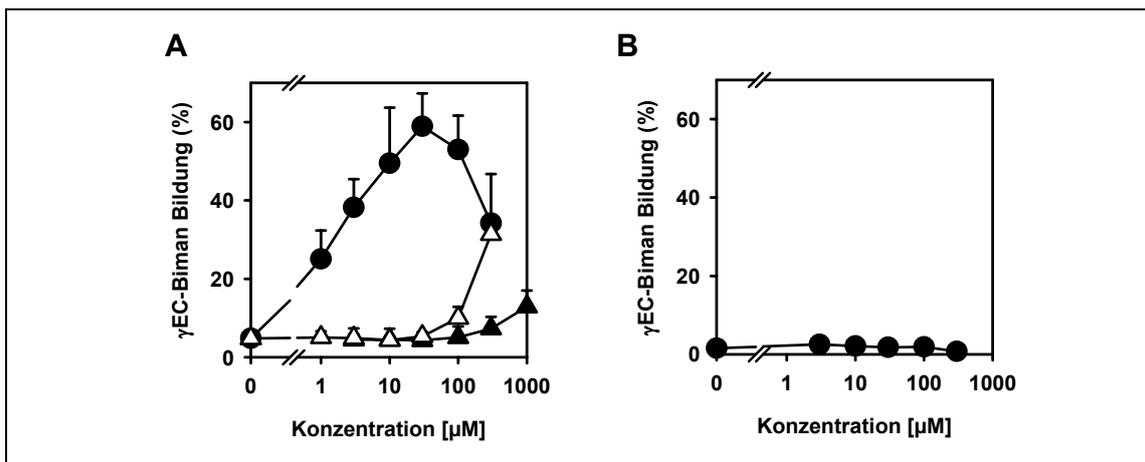


Abb. 46 Rolle der verkürzten Versionen von AtPCS1 und AtPCS2 auf den GS-Biman Abbau in Abhängigkeit von verschiedenen Schwermetallen

Die Zellen der Dreifachmutante $\Delta cis2\Delta cpy\Delta cpc$ mit dem Plasmid pGAL1:AtPCS1 Δ C (A) und pGAL1:AtPCS2 Δ C (B) wurden nach Belastung mit 100 μM MCB für 10 Minuten in galaktosehaltigem Selektivmedium resuspendiert ($\text{OD}_{600}=0,2$) und mit den entsprechenden Konzentrationen an Cd^{2+} (●), Cu^{2+} (Δ) und Zn^{2+} (\blacktriangle) versehen. Nach 12 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet und der Zellrohextrakt mit Hilfe der HPLC analysiert. Dargestellt ist die γEC -Biman Bildung in Bezug auf die GS-Biman Konzentration zum Zeitpunkt Null. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Bei AtPCS1 Δ C ließ sich bereits bei geringen Cd^{2+} -Konzentrationen γEC -Biman nachweisen (Abb. 46A). Mit steigender Konzentration der Schwermetall-Ionen erhöhte sich die Menge des Abbauproduktes. Der maximale Umsatz von ca. 60% GS-Biman zu γEC -Biman erfolgte bei einer Konzentration von 30 μM Cd^{2+} . Danach sank der nachweisbare Anteil von γEC -Biman wieder. Die Inkubation mit Cu^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen

führten erst bei Konzentrationen von 100 μM bzw. 300 μM zu signifikanten γEC -Biman Mengen. Der Anteil des GS-Biman Derivates erreichte bei 300 μM Cu^{2+} ca. 30%, während bei 1000 μM Zn^{2+} nur ca. 10% erzielt werden konnten. Für die γEC -Bildung durch AtPCS2 ΔC wurde nur der Einfluss von Cd^{2+} -Ionen untersucht. Da die Cu^{2+} - als auch die Zn^{2+} -Ionen bereits bei dem Vollängen-Protein AtPCS2 einen sehr geringen Einfluss auf die γEC -Biman Bildung hatten (Vgl. Abb. 44B, S. 96), wurden sie bei diesem Versuch vernachlässigt. Für Cd^{2+} konnte über den gesamten Konzentrationsbereich von 1-300 μM Cd^{2+} eine sehr geringe γEC -Biman Bildung (ca. 2,5%) durch AtPCS2 ΔC nachgewiesen werden (Abb. 46B).

Die vorliegenden Daten zeigten einen sehr geringen Einfluss der C-terminalen Domäne von AtPCS1 sowohl auf die PC-Synthese als auch auf den Abbau von GS-Konjugaten zu den entsprechenden γEC -Derivaten. Für AtPCS2 führte hingegen der Verlust der C-terminalen Region zu einer fast kompletten Inaktivierung des Proteins.

3.3.6 Charakterisierung von homologen PCS Genen aus Nostoc und Bradyrhizobium

Bisher ließen sich PCS bzw. PCS-ähnliche Gene nicht nur in eukaryotischen Organismen wie *S. pombe* (Clemens et al., 1999), *A. thaliana* (Vatamaniuk et al., 1999) und *C. elegans* identifizieren (Clemens et al., 2001; Vatamaniuk et al., 2001), sondern auch in Prokaryoten wie beispielsweise *Nostoc sp.* (Harada et al., 2004; Tsuji et al., 2005). Alle Proteine besitzen N-terminal einen hochkonservierten Bereich, während die C-terminale Domäne entweder stark variiert oder wie im Fall von *Nostoc* sogar fehlt. Obwohl NsPCS hohe Homologien zu den obengenannten PCS Genen aufweist, zeigten Analysen des Proteins zwar die Beteiligung am Abbau von GSH, allerdings ließ sich nur eine geringe bzw. keine PC-Synthese nachweisen (Harada et al., 2004; Tsuji et al., 2005). Es stellt sich die Frage, ob diese funktionelle Divergenz zu den PCS Genen aus *A. thaliana* mit dem Hefesystem reproduziert werden kann. Zusätzlich zur NsPCS sollte als Vergleich noch eine weitere bisher unbekannt prokaryotische PCS analysiert werden. Mit Hilfe von Sequenzvergleichen wurde ein Pool von Organismen mit putativen PCS Genen ermittelt. Die Kriterien der hohen Homologie, des möglichst komplett sequenzierten Genoms und der Verfügbarkeit der genomischen DNA führten schließlich zu dem Bakterium *Bradyrhizobium (B.) japonicum*. Der offene Leserahmen *BLL7663* des Stammes USDA110 kodiert für ein hypothetisches Protein aus 220 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von ca. 24 kDa. Das Protein

wird im Folgenden als BjPCS bezeichnet. Die Übereinstimmungen von NsPCS und BjPCS mit AtPCS1 und AtPCS2 sind in Abb. 47 gezeigt.

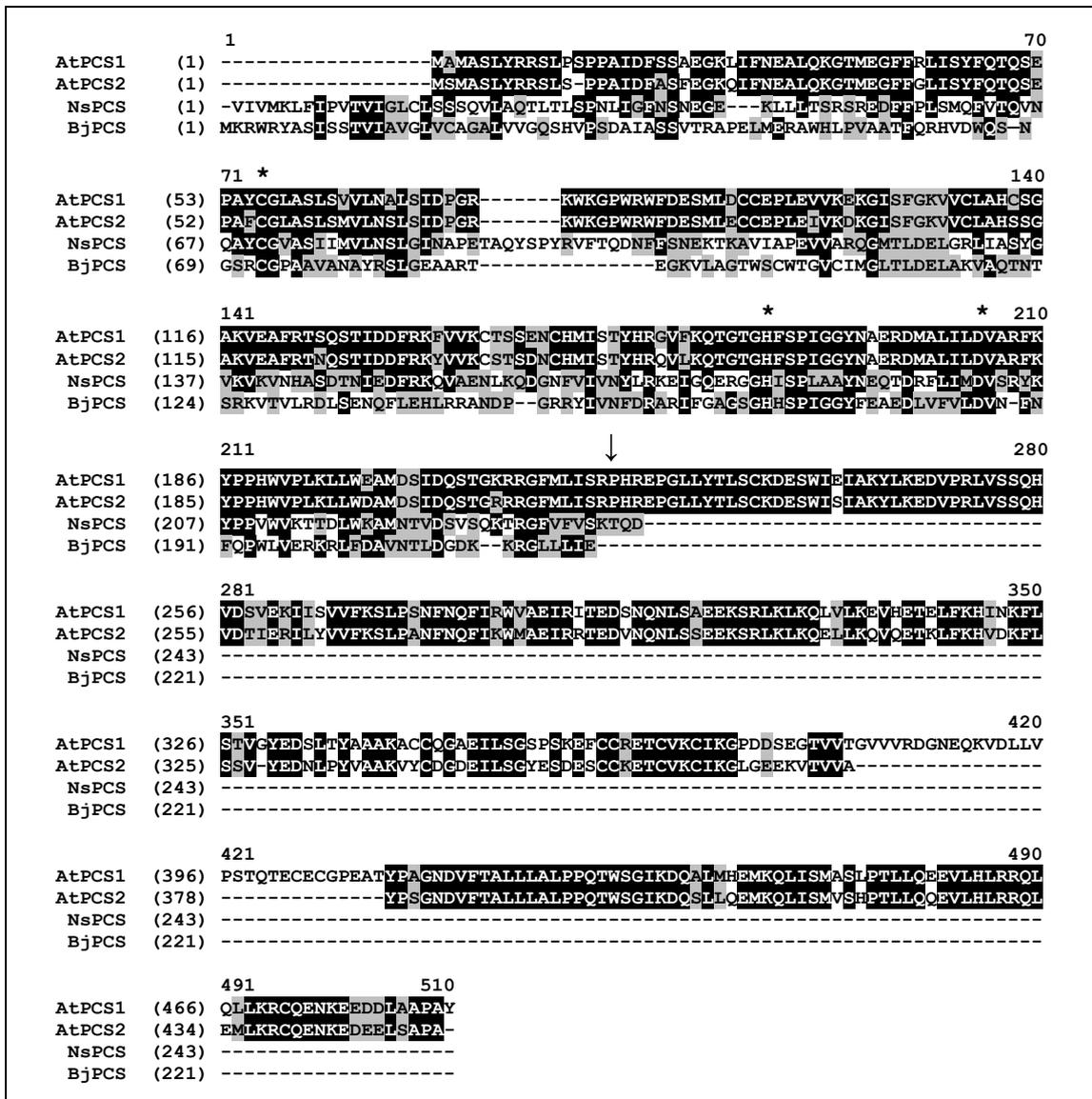


Abb. 47 Protein alignment von AtPCS1ΔC, AtPCS2ΔC, NsPCS und BjPCS

Die Aminosäuresequenz der Proteine AtPCS1, AtPCS2, NsPCS und BjPCS wurden mittels ClustalW verglichen. Schwarz markiert sind die identischen Aminosäuren, Grau verdeutlicht ähnliche Aminosäuren-Substitutionen. Die Striche stellen Lücken dar. Die Aminosäuren, welche die katalytische Triade bilden, sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Der Pfeil (↓) kennzeichnet das Ende der C-terminal verkürzten AtPCS1- bzw. AtPCS2-Varianten.

Während der N-Terminus von AtPCS2 sehr starke Ähnlichkeiten zu AtPCS1 aufweist (90%), zeigen NsPCS und BjPCS deutliche Unterschiede. Für NsPCS sind nur 34% der Aminosäuren identisch zu AtPCS1, bei BjPCS sogar nur 19%. Die nachfolgenden Analysen sollten zeigen, ob die hohen Abweichungen der Aminosäuresequenz einen Einfluss auf die Funktionalität der Enzyme haben.

Für die Herstellung der Konstrukte wurde aus dem Cyanobakterium *Nostoc sp.* PCC 7120 die genomische DNA isoliert und mit Hilfe der Primer #32 und #33 das Gen *aln0975* (NsPCS) amplifiziert. Mit den Primern #24 und #35 erfolgte die Amplifikation des PCS Gens von der genomischen DNA des *B. japonicum* Stammes USDA110, welche freundlicherweise von Herrn Prof. Göttfert (Lehrstuhl für Molekulargenetik, TU Dresden) zur Verfügung gestellt worden war. Über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *SaII* erfolgte die Klonierung der beiden Gene in den Vektor pSH47. Die beiden fertigen Konstrukte pGAL1::NsPCS und pGAL1::BjPCS wurden freundlicherweise von R. Blum für die nachfolgenden Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Für die Analyse der beiden Proteine erfolgte die Transformation der Konstrukte in den Hefestamm $\Delta cpy\Delta cpc$ und $\Delta cis2\Delta cpy\Delta cpc$. Die gewonnenen Transformanden wurden mit Hilfe von Kolonie-PCR überprüft.

Für die Betrachtung der PC-Biosynthese wurden die Gene NsPCS und BjPCS in der Doppelmutante $\Delta cpy\Delta cpc$ durch Zugabe von Galaktose exprimiert. 12 Stunden nach der Zugabe von variablen Cd^{2+} -Konzentrationen erfolgte die Zellernte und die Analyse der Zellrohextrakte mit Hilfe der HPLC. In Abb. 48 ist die Cd^{2+} -abhängige PC-Synthese bezogen auf die Zellzahl dargestellt.

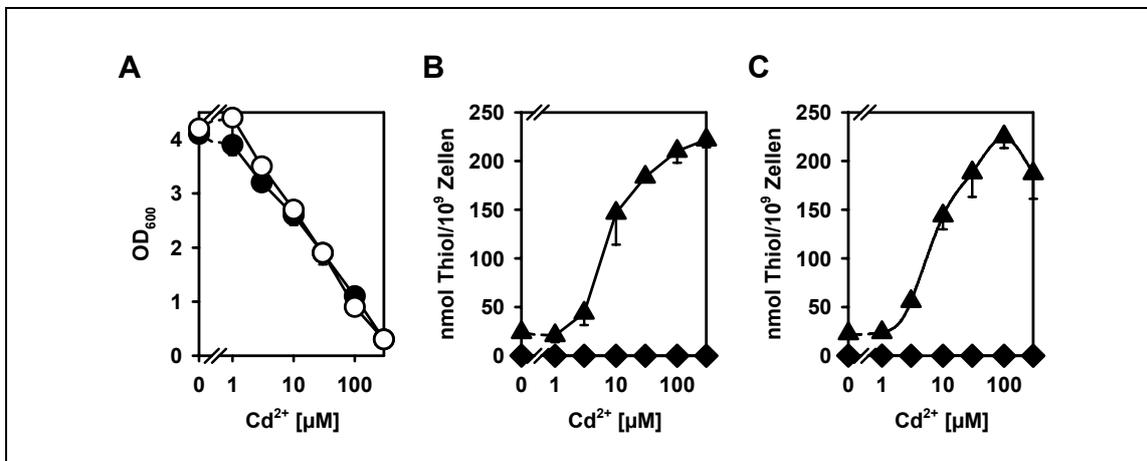


Abb. 48 PC-Synthese durch NsPCS und BjPCS

Zu den Zellen der Doppelmutante $\Delta cpy\Delta cpc$ mit dem Plasmid pGAL1::NsPCS (\circ) bzw. pGAL1::BjPCS (\bullet) wurden nach dreistündiger Inkubation im galaktosehaltigen Medium die angegebenen Cd^{2+} -Konzentrationen gegeben ($OD_{600}=0,3$). Nach 12 Stunden wurden das Wachstum der Zellen bestimmt (A) und die Zellen geerntet. Mit Hilfe der HPLC ließ sich nach Expression von NsPCS (B) und BjPCS (C) nur GSH (\blacktriangle) nachweisen. Es konnten keine Peaks für PC_2 (\blacklozenge) dokumentiert werden. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen repräsentieren eine Doppelbestimmung.

Auffällig war die starke Wachstumshemmung mit zunehmender Cd^{2+} -Konzentration bei beiden Stämmen. Im Vergleich zu den unbelasteten Zellen wiesen die Zellen mit $300 \mu M$ Cd^{2+} beispielsweise eine ca. 90%ige Reduzierung des Zellwachstums auf

(Abb. 48A). Hinsichtlich der nachweisbaren Thiole ließen sich zwischen den Zellen mit NsPCS und BjPCS keine signifikanten Unterschiede erkennen (Abb. 48B,C). Beide Stämme zeigten mit steigender Konzentration der Schwermetall-Ionen einen stetigen Anstieg des GSH-Gehaltes. So konnte nach Inkubation mit 300 μM Cd^{2+} ein ca. neunfach erhöhter GSH-Spiegel in den Zellen beobachtet werden. Interessanterweise waren in keinem der Stämme PCs nachweisbar. Dabei ergaben die Sequenzanalysen der verwendeten Konstrukte keine Unterschiede zu den annotierten Sequenzen. Wodurch von einer vollständigen und fehlerfreien Translation der Gene ausgegangen werden konnte. Allerdings schlugen auch hier die immunologischen Nachweise der gebildeten Proteine fehl. Ursache dafür war die fehlende Spezifität der PCS-Antikörper für den N-terminalen Bereich der PCS.

Anhand dieser Daten lag die Vermutung nahe, dass beide PCS-ähnlichen Proteine keine Rolle bei der Schwermetall-Entgiftung spielen. Auch längere Inkubationszeiten von bis zu 24 Stunden erbrachten bei BjPCS keine anderen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Mit NsPCS war allerdings bereits nach 15-stündiger Schwermetall-Belastung ein geringer Pool an PC_2 -Molekülen im Vergleich zu Zellen mit der Vektorkontrolle nachweisbar. Die Daten sind in Abb. 49 gezeigt.

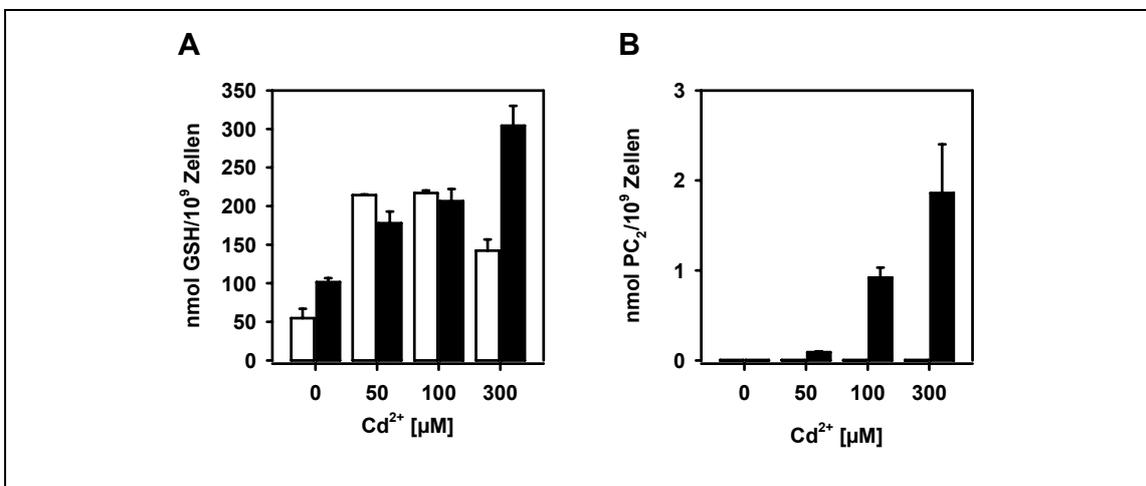


Abb. 49 PC-Synthese durch NsPCS nach verlängerter Belastungszeit mit variablen Cd^{2+} -Konzentrationen

Die Zellen der Doppelmutante $\Delta\text{cpy}\Delta\text{cpc}$ mit der Vektorkontrolle pGAL1 (weiße Balken) bzw. dem Plasmid pGAL1::NsPCS (schwarze Balken) wurden nach drei Stunden Inkubation im galaktosehaltigen Medium mit den angegebenen Konzentrationen an Cd^{2+} versehen. Nach 15 Stunden Belastung wurden die Zellen zentrifugiert, der Zellrohextrakt isoliert und mit Hilfe der HPLC auf den GSH- (A) und PC_2 -Gehalt (B) analysiert. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus einer Doppelbestimmung.

Während der GSH-Gehalt der Zellen mit dem leeren Plasmid und mit dem NsPCS Konstrukt sich kaum unterschied (Abb. 49A), waren in den Zellen mit NsPCS nach

Belastung mit $100 \mu\text{M Cd}^{2+}$ eindeutig PCs in Form von PC_2 nachweisbar (Abb. 49B). Die Menge an PC_2 stieg mit zunehmender Konzentration der Schwermetall-Ionen. Allerdings hatte die geringe Konzentration an PCs keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen (Daten nicht gezeigt). Längerkettige PCs konnten nicht beobachtet werden.

NsPCS und BjPCS wiesen im Vergleich zum N-Terminus von AtPCS1 starke Abweichungen hinsichtlich der PC-Biosynthese auf. Somit stellte sich die Frage, ob die Enzyme stattdessen hauptsächlich in den Abbau von GS-Konjugaten involviert sein könnten. Um dies zu untersuchen, wurde die Dreifachmutante $\Delta cis2\Delta cpy\Delta cpc$ mit den entsprechenden Konstrukten für die induzierte Expression von NsPCS und BjPCS mit MCB belastet und anschließend die Cd^{2+} -abhängige γEC -Biman Bildung über 22 Stunden betrachtet (Abb. 50).

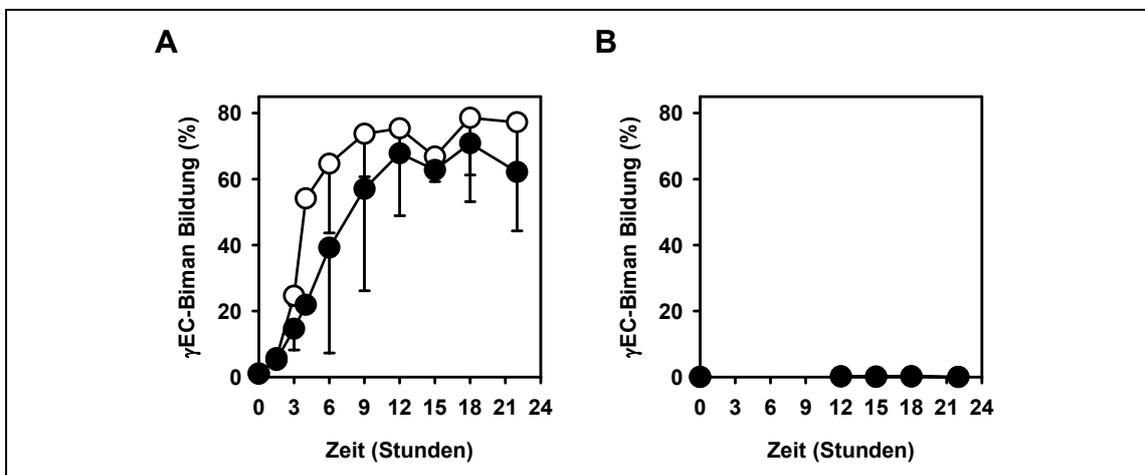


Abb. 50 γEC -Biman Bildung durch NsPCS und BjPCS

Die $\Delta cis2\Delta cpy\Delta cpc$ Mutante mit dem Plasmid pGAL1::NsPCS (A) und pGAL1::BjPCS (B) wurde nach der Inkubation mit $100 \mu\text{M MCB}$ in galaktosehaltigem Selektivmedium in An- (●) bzw. Abwesenheit (○) von $50 \mu\text{M Cd}^{2+}$ resuspendiert. Die Probennahme erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. Der Zellrohextrakt wurde mit Hilfe der HPLC auf die gebildeten GS-Biman Konjugate analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Durch die Expression von NsPCS ließ sich eine sehr schnelle und hohe γEC -Biman Bildung beobachten (Abb. 50A). Bereits nach drei Stunden waren in den unbelasteten Zellen ca. 25% des GS-Bimans in γEC -Biman umgewandelt worden. Die γEC -Biman Konzentration stieg an, bis nach neunstündiger Expression ein konstantes Niveau von durchschnittlich 80% erreicht wurde. Durch die Zugabe von $50 \mu\text{M Cd}^{2+}$ verzögerte sich die γEC -Biman Bildung im Vergleich zu den unbelasteten Zellen. Trotzdem erreichten auch diese Zellen nach neun Stunden Inkubation eine gleichbleibende γEC -Biman Konzentration von ca. 70% des GS-Bimans. Für die Untersuchungen von BjPCS wurden nur der Zeitrahmen von 12 bis 24 Stunden Inkubation im galaktosehaltigen

Medium untersucht (Abb. 50B). Alle getesteten Proben zeigten sowohl in An- bzw. Abwesenheit von Cd^{2+} keine γEC -Biman Bildung. Es ließ sich nur GS-Biman mit Hilfe der HPLC nachweisen.

Da für BjPCS mit der hier getesteten Cd^{2+} -Konzentration kein positiver Nachweis für die γEC -Biman Bildung erbracht werden konnte, sollten noch weitere Konzentrationen von Cd^{2+} untersucht werden. NsPCS zeigte hingegen bereits in Abwesenheit von Cd^{2+} -Ionen eine sehr starke Aktivität für den Abbau von GS-Konjugaten. Trotzdem sollte auch für dieses Enzym der Einfluss weiterer Schwermetall-Ionen wie Zn^{2+} und Cu^{2+} analysiert werden (Abb. 51).

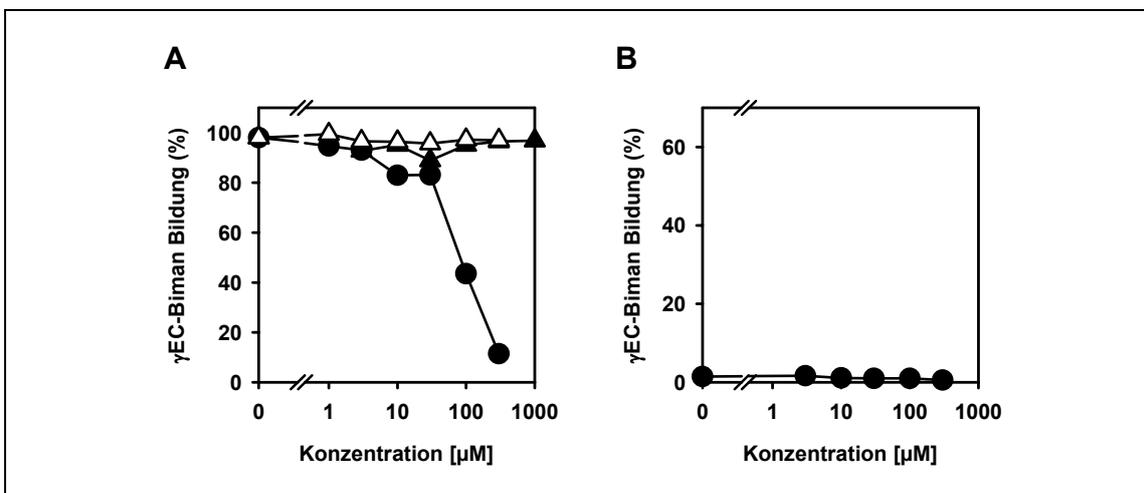


Abb. 51 γEC -Biman Bildung von NsPCS und BjPCS in Abhängigkeit von variablen Cd^{2+} -Konzentrationen

Die Zellen der $\Delta cis2\Delta cpy\Delta cpc$ Mutante mit dem Plasmid pGAL1::NsPCS (A) bzw. pGAL1::BjPCS (B) wurden mit MCB markiert und anschließend in galaktosehaltigem Medium mit den Schwermetallen Cd^{2+} (●), Cu^{2+} (Δ) und Zn^{2+} (▲) in den angegebenen Konzentrationen versehen. Für BjPCS wurde nur der Einfluss von Cd^{2+} -Ionen (●) untersucht. Nach der Expressionsdauer von vier Stunden für NsPCS bzw. von 12 Stunden für BjPCS wurden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet und mit Hilfe der HPLC hinsichtlich der gebildeten GS-Konjugate analysiert.

Überraschenderweise zeigten die Zellen der Dreifachmutante mit NsPCS bereits nach vierstündiger Expression in Abwesenheit von Schwermetallen einen ca. 95%igen Umsatz von GS-Biman zu γEC -Biman (Abb. 51A). Für die unterschiedlichen Cu^{2+} - und Zn^{2+} -Konzentrationen ließ sich kein veränderter γEC -Biman Gehalt nachweisen. Allerdings resultierten die steigenden Cd^{2+} -Konzentrationen in einer signifikanten Reduktion der γEC -Biman Bildung. In Anwesenheit von 300 μM Cd^{2+} konnten nur noch ca. 10% des GS-Biman zu dem γEC -Derivat abgebaut werden. Für die Zellen mit BjPCS war auch nach 12-stündiger Expression und variablen Cd^{2+} -Konzentrationen kein γEC -Biman mit Hilfe der HPLC nachweisbar. Der Einfluss von Cu^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen wurde nicht untersucht.

Anhand der vorliegenden Daten konnte eindeutig die Präferenz von NsPCS für den Abbau von GS-Konjugaten gegenüber der Biosynthese von PCs belegt werden. Dabei konnten keine Nachweise für eine schwermetall-abhängige Aktivierung des Enzyms erhalten werden. Die Befunde bestätigen die vermuteten funktionellen Unterschiede zwischen prokaryotischen und eukaryotischen PCS.

4 DISKUSSION

4.1 Die Carboxypeptidasen CPY und CPC sind analog zu Phytochelatin-Synthasen

Schwermetalle wie Arsen, Cadmium und Quecksilber wirken bereits in geringen Konzentrationen toxisch, indem sie in den Zellen nicht nur oxidativen Stress (Schützendübel und Polle, 2002), Lipid-Peroxidationen (Howlett und Avery, 1997) und die Inaktivierung von Proteinen hervorrufen, sondern auch die DNA schädigen (Bertin und Averbeck, 2006). Ihre Toxizität wird meist durch vergleichbare chemische und physikalische Eigenschaften mit essentiellen Metall-Ionen begründet. So wird Arsen, in Form von Arsenat, über Phosphat-Transporter importiert (Bun-ya et al., 1996), während Cd^{2+} -Ionen durch Transporter der ZIP- und Nramp-Familie aufgenommen werden, welche eigentlich für den Import von divalenten Kationen wie Zink, Mangan, Kupfer oder Eisen zuständig sind (Guerinot, 2000; Thomine et al., 2000; Forbes und Gros, 2001; Gaither und Eide, 2001; Gomes et al., 2002). Um die zelluläre und genetische Integrität aufrecht zu erhalten, haben alle Organismen Strategien entwickelt, um auf die Schwermetall-Ionen zu reagieren. Zu diesen Strategien zählen u. a. Entgiftungsprozesse, die Reparatur oder Entfernung beschädigter Moleküle und die Verzögerung der Zellteilung, um die Weitergabe beschädigter Zellkomponenten zu verhindern (Yen et al., 2005).

Cadmium induziert die Glutathion-Biosynthese.

Innerhalb der Hefezelle kommt es durch die Schwermetall-Ionen zu starken transkriptionellen Veränderungen, die sich vor allem auf die Gene der Sulfat-Assimilation und der GSH-Biosynthese beziehen (Bun-ya et al., 1996; Momose und Iwahashi, 2001; Vido et al., 2001; Fauchon et al., 2002; Haugen et al., 2004; Thorsen et al., 2007). Vido und Mitarbeiter stellten nach einstündiger Cd^{2+} -Belastung eine mehr als zehnfach erhöhte *GSH1* mRNA Konzentration fest, die sich auch in einer erhöhten GSH-Konzentration widerspiegelte (Vido et al., 2001). Auch in den untersuchten Wildtypzellen dieser Arbeit war nach vier Stunden Cadmium-Inkubation im Vergleich zu den unbelasteten Zellen ein fünffach erhöhter GSH-Spiegel zu beobachten (Abb. 9, S. 47). Durch die Anwesenheit von Cd^{2+} -Ionen kommt es zur Aktivierung einer Vielzahl an Transkriptionsfaktoren. Die beiden wichtigsten sind dabei Met4p und Yap1p. Im Fall von Met4p verhindern die Schwermetall-Ionen die Ubiquitinierung des Transkriptionsfaktors und lösen damit seine Aktivierung aus (Yen et al., 2005;

Baudouin-Cornu und Labarre, 2006). Dadurch werden vor allem die Gene der Transsulfuration und *GSH1* für die Biosynthese von γ -EC in ihrer Expression hochreguliert (Dormer et al., 2000; Fauchon et al., 2002). Yap1p akkumuliert aufgrund der Cd^{2+} -Ionen im Zellkern und induziert verstärkt die Gene für die GSH-Biosynthese (Azevedo et al., 2003; Azevedo et al., 2007). Die beobachteten Veränderungen konnten sowohl durch Transkriptom-, als auch durch Proteom- und Metabolom-Analysen in *S. cerevisiae* bestätigt werden (Vido et al., 2001; Fauchon et al., 2002; Lafaye et al., 2005a; Lafaye et al., 2005b). Der gesamte Schwefelmetabolismus, welcher normalerweise die Produktion von Methionin und Cystein für die Proteinbiosynthese realisiert, wird durch die Anwesenheit von Cadmium auf die GSH-Biosynthese umgestellt (Fauchon et al., 2002). Um das Sulfat optimal umzuverteilen, werden zum einen die Proteinbiosyntheserate reduziert und zum anderen einige Enzyme der Glykolyse, die reich an schwefelhaltigen Aminosäuren sind, durch schwefel-ärmere Isoenzyme ersetzt (Fauchon et al., 2002; Lafaye et al., 2005a). Insgesamt können dadurch bis zu 30% der schwefelhaltigen Aminosäuren eingespart werden (Tamás et al., 2006). Auch dieser Prozess wird durch den Transkriptionsfaktor Met4p reguliert (Yen et al., 2005).

Phytochelatine haben keinen Einfluss auf die Cadmium-Toleranz in S. cerevisiae.

Durch die stark erhöhte zelluläre Konzentration an GSH wird die effiziente Komplexierung der Cd^{2+} -Ionen von zwei GSH Molekülen unter Bildung der Cd-bis-Glutathion-Komplexe gewährleistet. Was mit den Komplexen nach dem Transport in die Vakuole geschieht (Li et al., 1997), ist bislang nicht hinreichend geklärt (Baudouin-Cornu und Labarre, 2006). Eine weitere Möglichkeit die freien, reaktiven Metall-Ionen in ihrer Toxizität zu mindern, ist die Komplexierung durch MTs oder PCs (Cobbett und Goldsbrough, 2002). *S. cerevisiae* gehört wie *C. glabrata* und *Neurospora crassa* zu der Gruppe von Mikroorganismen, die sowohl MTs als auch PCs produzieren können (Mehra et al., 1988; Kneer et al., 1992). Obwohl die MTs, kodiert durch mehrere Kopien von *CUP1*, hauptsächlich an der Entgiftung von Cu^{2+} -Ionen beteiligt sind, konnte auch eine erhöhte Cadmium-Toleranz beobachtet werden (Winge et al., 1985). Zusätzlich waren auch geringe Mengen an PCs nach Inkubation mit Cd^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen nachweisbar (Kneer et al., 1992). Die Frage nach der physiologischen Relevanz beider komplexbindender Peptide an der Entgiftung von Cadmium ist in *S. cerevisiae* noch nicht ausreichend beantwortet. Die Befunde dieser Arbeit bestätigen die PC_2 -Synthese in *S. cerevisiae* nach Cd^{2+} -Belastung (Abb. 9, S. 47). Ähnlich wie in pflanzlichen Zellkulturen konnte die stärkste PC-Produktion in der exponentiellen

Wachstumsphase der Zellen beobachtet werden (Chen et al., 1997; Inouhe et al., 2000). Allerdings sind die nachweisbaren PC-Konzentrationen im Vergleich zu anderen PC-produzierenden Organismen sehr gering. So konnte in *S. pombe* nach sechs Stunden Inkubation mit 100 μM Cd^{2+} etwa die 500fache Menge an PCs gegenüber *S. cerevisiae* detektiert werden (Wünschmann et al., 2007).

Im Gegensatz zu vielen anderen PC-synthetisierenden eukaryotischen Organismen weist *S. cerevisiae* kein strukturelles Homolog für die PC-Synthase (PCS) auf. Somit stellte sich die Frage, wie in dem Organismus die Biosynthese realisiert wird. Für die Beteiligung der GSH-Synthetase wie in *S. pombe* gab es in *S. cerevisiae* keine experimentellen Grundlagen (Hayashi et al., 1992; Al-Lahham et al., 1999). Vielmehr zeigte Imai 1996, dass PCs bis PC_3 auch durch die enzymatische Aktivität der Carboxypeptidase Y (CPY), einer aus *S. cerevisiae* aufgereinigten Carboxypeptidase, *in vitro* synthetisiert werden können (Imai et al., 1996). Unter vergleichbaren Versuchsbedingungen ließ sich zwar die PC-Synthese *per se* bestätigen, allerdings waren nur PCs mit einer maximalen Kettenlänge von $n=2$ nachweisbar (Abb. 8, S. 46). Auch die *in vivo* Analysen der Hefezellen ließen keine höheren PCs als PC_2 erkennen (Abb. 9, S. 47). Durch die funktionale Inaktivierung der CPY gelang es, die PC-Synthese um 70% zu reduzieren. Somit wurde erstmals auch *in vivo* die Beteiligung des Enzyms bestätigt (Abb. 9, S. 47). Die komplette Blockierung der PC-Synthese konnte erst durch den kombinierten Verlust mit einer zweiten Carboxypeptidase, der CPC, erreicht werden (Abb. 13, S. 52 und Abb. 14, S. 53). Demnach sind beide Carboxypeptidasen CPY und CPC an der Biosynthese des PC_2 -Pools in *S. cerevisiae* beteiligt.

CPY und CPC gehören zur Klasse der Serin-Carboxypeptidasen und weisen eine vakuoläre Lokalisation auf (Nasr et al., 1994; Jung et al., 1999; Huh et al., 2003). Serin-Carboxypeptidasen sind Exopeptidasen, die durch Hydrolyse von Peptidestern besonders effizient C-terminale Aminosäuren von Peptiden oder Proteinen abspalten (Endrizzi et al., 1994). Sie können aber auch Transpeptidierungsreaktionen katalysieren (Remington und Breddam, 1994). Beide hier betrachteten Carboxypeptidasen weisen eine katalytische Triade aus Serin, Aspartat und Histidin auf, die untereinander konserviert ist (Abb. 11, S. 50). Für die enzymatische Reaktion erfolgt nach der Substratbindung ein nukleophiler Angriff der Hydroxylgruppe des Serins auf den Carbonylkohlenstoff des Substrates, wodurch ein Acyl-Enzym-Intermediat mit tetraedrischer Struktur entsteht (Jung et al., 1999). Der Komplex wird stabilisiert, indem das Proton der Hydroxylgruppe des Serins auf die Imidazol-Gruppe

des Histidins übertragen wird. Je nach Substratkonzentration wird das Acyl-gebundene Substrat entweder auf Wasser (Hydrolyse) oder auf ein weiteres Peptid (Transpeptidierung) übertragen. Für die beobachtete PC₂-Synthese durch CPY und CPC stellt GSH das Substrat der Reaktion dar und γ -EC das enzym-gebundene Intermediat, welches auf den Aminoterminus eines weiteren GSH-Moleküls übertragen wird. Diese Art der Reaktion ähnelt der Peptid-Biosynthese durch AtPCS1 (Beck et al., 2003). AtPCS1 gehört zu der Superfamilie der Papaine und ist eine Cystein-Protease (Vivares et al., 2005; Rea, 2006). Für den Enzymmechanismus ist die katalytische Triade aus Cystein, Histidin und Aspartat entscheidend, die für die Bildung eines γ EC-Acyl-Intermediats verantwortlich ist (Rea et al., 2004; Rea, 2006). Der nukleophile Angriff auf die Dipeptidbindung des Substrates erfolgt durch das Cystein, dessen Nucleophilität durch die Nähe des Histidin- und Aspartatrestes verstärkt wird. Ähnlich wie bei den Serin-Carboxypeptidasen wird das Proton der Sulfhydrylgruppe auf die Imidazol-Gruppe des Histidins übertragen, wodurch dessen Elektrophilität durch den Aspartatrest gesteigert wird. Das Acyl-gebundene γ EC-Substrat kann entweder auf ein weiteres Substrat übertragen oder hydrolysiert werden (Grill et al., 1989; Blum et al., 2007).

Die Aktivität der AtPCS1 ist abhängig von Schwermetall-Ionen (Oven et al., 2001). Obwohl die *in vitro* Analysen der CPY keine Abhängigkeit der PC-Synthese von der Cd²⁺-Konzentration zeigten (Abb. 8, S. 46), war *in vivo* eine deutliche Zunahme der nachweisbaren PC₂-Menge mit steigender Cd²⁺-Konzentration zu beobachten (Abb. 10, S. 48). Im Gegensatz zu den *in vitro* Versuchen variierte der GSH-Gehalt der Zellen mit steigender Schwermetall-Konzentration. Möglicherweise stand, durch den verstärkten Import von GSH in die Vakuole, eine erhöhte Substrat-Konzentration für die Biosynthese von PCs zur Verfügung. Denkbar wäre ebenfalls, dass die Bindung der Schwermetall-Ionen zu einer Stabilisierung der PC-Moleküle führte (Zenk, 1996).

Da die Blockierung der PC-Synthese in *S. cerevisiae* in keiner erhöhten Cadmium-Intoleranz resultierte, bleibt die physiologische Relevanz der Peptide fraglich. Auch die Inkubation mit verschiedenen Kupfer- und Zink-Konzentrationen ließ keine signifikanten Wachstumsunterschiede zum Wildtyp erkennen (Abb. 14, S. 53). Wie bereits von Winge und Mitarbeitern postuliert wird vielmehr deutlich, dass die durch das *CUP1* Gen kodierten MTs nicht nur an der Entgiftung von Cu²⁺-Ionen, sondern auch an der von Cd²⁺-Ionen beteiligt sind (Winge et al., 1985). Allerdings kann eine stamm-spezifische Cd²⁺-Intoleranz des Δ *cup1*-Stammes nicht ausgeschlossen werden (Inouhe et al., 1996), da der Ausgangsstamm für diese Analysen nicht zur Verfügung

stand. Versuche, im $\Delta cup1$ Hintergrund die Gene für die *CPY* bzw. *CPC* auszuschalten, misslingen. Allerdings kann nicht von der Letalität der Doppelmutanten ausgegangen werden, da auch die Deletion von Genen, die nicht an der Entgiftung von Metall-Ionen beteiligt sind (z.B. *GTT1*), fehlschlug (Daten nicht gezeigt).

Vakuoläre ABC-Transporter besitzen keinen Einfluss auf Phytochelatin-Biosynthese.

Die Komplexierung der freien Schwermetall-Ionen durch GSH oder PCs und der anschließende Transport der gebildeten Komplexe in die Vakuole repräsentieren in fast allen eukaryotischen Organismen die wichtigsten Mechanismen für die Entgiftung von Metall-Ionen. In *S. cerevisiae* ist der membranständige Transporter Ycf1p hauptsächlich für die Sequestrierung von GSH-Komplexen mit toxischen Metall-Ionen wie Cadmium, Arsen und Quecksilber und mit Xenobiotika in der Vakuole verantwortlich (Tommasini et al., 1996; Li et al., 1997; Ghosh et al., 1999; Gueldry et al., 2003). Ycf1 gehört zu der Klasse der ABC-Transporter und weist starke Sequenzähnlichkeiten zu dem humanen *cystic fibrosis transmembrane conductance* Regulator (CFTR) und den *multidrug*-assoziierten Proteinen MRP1 und MRP2 auf (Szczycka et al., 1994). Die Regulationsmechanismen für den Transporter konnten bisher noch nicht vollständig geklärt werden. Transkriptionell wird die Expression in Hefe durch den Transkriptionsfaktor Yap1p induziert (Wemmie et al., 1994). Allerdings war nach Cadmium-Belastung nur eine zweifache Erhöhung der *YCF1* mRNA zu beobachten (Li et al., 1997; Sharma et al., 2002). Vermutlich genügt die vorhandene Menge an Ycf1-Transportern, um eine ausreichende Metall-Toleranz zu vermitteln. Die Aktivierung des Transporters erfolgt post-translational durch Phosphorylierungen. Dabei führt eine duale Phosphorylierung des ABC-Kerns zur Aktivierung und die Phosphorylierung des extremen N-Terminus zur Inaktivierung des Proteins (Szczycka et al., 1994; Eraso et al., 2004; Paumi et al., 2008). Ob dabei Schwermetalle eine Rolle spielen, konnte bisher nicht geklärt werden. Die $\Delta ycf1$ Mutante wies nach Cd^{2+} -Belastung ein reduziertes Wachstum und einen stark erhöhten GSH-Spiegel auf (Abb. 15, S. 54). Durch den fehlenden Transporter werden die gebildeten Cd-Bisglutathion-Komplexe im Cytoplasma akkumuliert. Dadurch kommt es zwar zu einer verringerten Adsorption von Cd^{2+} -Ionen aus dem Medium (Gomes et al., 2002), denkbar ist aber eine erhöhte toxische Wirkung der cytosolischen Komplexe. Erst kürzlich war durch die Anreicherung der GSH-Metall-Komplexe eine erhöhte Mutationsrate im mitochondrialen Genom festgestellt worden (Adamis et al., 2007). Die höchste Sequenzähnlichkeit mit Ycf1p weist Bpt1p mit 49% identischen und 65% ähnlichen Aminosäuren auf. Anhand von *in vitro* und *in vivo* Analysen war sowohl der

Transport von unkonjugiertem Bilirubin, GS-Konjugaten und GSH als auch die Beteiligung an der Cd^{2+} -Entgiftung von Bpt1p nachweisbar (Petrovic et al., 2000; Klein et al., 2002; Sharma et al., 2002; Eraso et al., 2004). Übereinstimmend mit den Studien von Sharma und Mitarbeitern ließ sich bei der $\Delta bpt1$ Mutante eine vergleichbare Cadmium-Toleranz, aber ein leicht erhöhter GSH-Spiegel im Vergleich zum Wildtyp belegen (Sharma et al., 2002). Erst der Verlust beider ABC-Transporter resultierte in einer deutlichen Cadmium-Hypersensitivität, die sich auch in einem deutlich erhöhten GSH-Gehalt widerspiegelte (Abb. 16, S. 56). In allen drei Mutanten ließ sich nach Belastung mit $30 \mu\text{M Cd}^{2+}$ eine höhere PC-Konzentration als beim Wildtyp beobachten. Vermutlich liegt für die PC-Synthese aufgrund der stärkeren GSH-Produktion eine höhere Substratkonzentration in der Vakuole vor. Höhere Cd^{2+} -Konzentrationen führten jedoch bei $\Delta ycf1$ und der Doppelmutante zu einer Reduktion der PC-Synthese, vermutlich bedingt durch die hohe Toxizität der Metall-Ionen. Aufgrund dieser Befunde kann davon ausgegangen werden, dass die durch Ycf1p und Bpt1p importierten Cd-Bisglutathion-Komplexe und GSH-Mengen keinen Einfluss auf die PC-Synthese nehmen. Die Rolle von CPY und CPC muss in diesem Falle noch genauer untersucht werden. Für GSH sind keine weiteren Transporter in der Vakuolenmembran annotiert. Der Import von Cd^{2+} -Ionen aus dem Cytoplasma in die Vakuole könnte über weitere vakuoläre Metall-Ionen-Transporter erfolgen. Dazu könnten beispielsweise die Zink-Transporter Cot1p und Zrc1p (Li und Kaplan, 1998), die Ca^{2+} -abhängige ATPase Pmc1p (Cunningham und Fink, 1994), der $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter Vcx1p (Miseta et al., 1999) oder der $\text{Fe}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -Transporter Ccc1p gehören (Lapinskas et al., 1996).

Existieren CdS Kristalle in S. cerevisiae?

Interessanterweise wiesen alle in dieser Arbeit getesteten und konstruierten Hefestämme nach Cd^{2+} -Belastung eine gelbe Färbung auf. Nur die Hefestämme, deren Gen für den Ycf1-Transporter deletiert worden war, zeigten diesen Phänotyp nicht (Abb. 52). Die Gelbfärbung von Hefezellen wurde erstmals von Vande Weghe und Ow bei einer Mutante für die mitochondriale Sulfidoxidation ($\Delta hmt1$) in *S. pombe* beschrieben (Vande Weghe und Ow, 1999). Sie konnten zeigen, dass die Farbänderung der Zellen mit der Akkumulation von Sulfid in der Zelle korrelierte, vermutlich unter der Bildung von CdS (Vande Weghe und Ow, 1999).

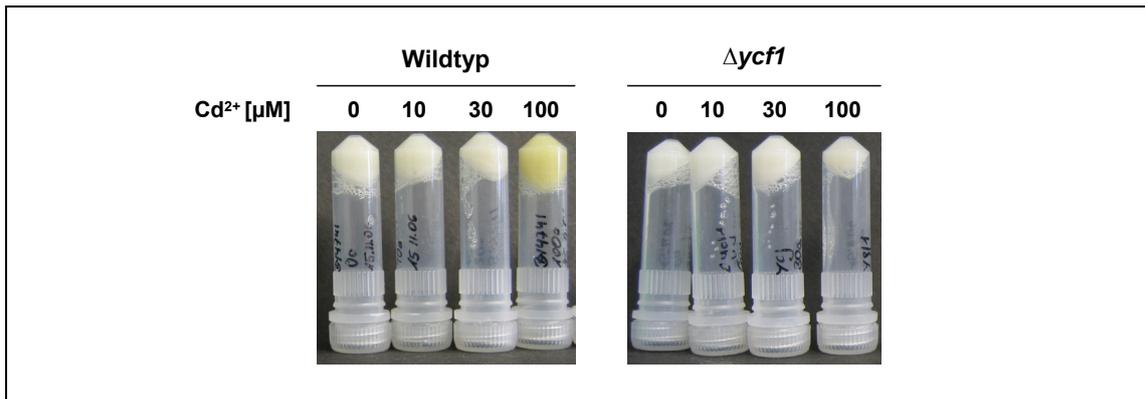


Abb. 52 CdS-Bildung in Wildtyp- und $\Delta ycf1$ -Zellen

Die Zellen des Wildtyp und der $\Delta ycf1$ -Mutante wurden für 18 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen an Cd^{2+} inkubiert und anschließend durch Zentrifugation pelletiert.

Wie bereits in Kapitel 1.2.2 erwähnt, erfolgt nach der Sequestrierung der Cd^{2+} -PC-Komplexe in der Vakuole in *S. pombe*, *C. glabrata* und Pflanzen der Einbau von Sulfiden, für die Bildung der stabileren HMW-Komplexe. Detaillierte Analysen zeigten die Anordnung der PCs um einen Kern aus CdS, den sogenannten CdS Nanokristallen, die bis zu 20 Å und 85 CdS-Moleküle umfassen können (Dameron et al., 1989a). In *C. glabrata* ließen sich je nach Kultivierungsmedium CdS Kristalle entweder umhüllt von PCs oder von einer Mischung aus GSH und γ EC-Peptiden nachweisen (Dameron et al., 1989b). Der Grund für diesen Unterschied ist bis heute nicht bekannt. Zwar sind die γ EC/GSH-umhüllten Partikel instabiler als die PC-assemblierten (Dameron et al., 1989b), sie weisen aber keine strukturellen Unterschiede im CdS-Kern auf (Barbas et al., 1992). Die Bildung von CdS-Kristallen konnte mittlerweile in mehreren Pilzen, Pflanzen und sogar in *E. coli* nachgewiesen werden (Reese und Winge, 1988; Reese et al., 1992; Speiser et al., 1992; Mehra et al., 1994; Vande Weghe und Ow, 2001; Sweeney et al., 2004). Hinweise auf eine Existenz in *S. cerevisiae* liegen bisher nicht vor. Allerdings kann dies aufgrund der intensiven Färbung der Hefezellen nach Cadmium-Belastung vermutet werden. Unterstützend wirken die Tatsachen, dass Cd-GSH-Komplexe *in vitro* als Matrix für die Bildung von CdS-Kristallen fungieren können (Dameron und Winge, 1990) und die Zellen des $\Delta ycf1$ -Stammes keine Gelbfärbung aufwiesen. Denkbar wäre die Einlagerung von Sulfiden in die durch Ycf1p importierten Cd-Bisglutathion-Komplexe, wobei die gebildeten CdS-Kerne entweder nur durch GSH oder wie in *C. glabrata* von einer Mischung aus γ EC-Dipeptiden und GSH umhüllt werden. Um die Existenz und den Aufbau der CdS Nanokristalle in *S. cerevisiae* genauer zu bestimmen, sind weitere Analysen notwendig.

Ist MCB als Modellsubstrat für den GS-Konjugat-Abbau in Hefe geeignet?

GSH ist das am häufigsten vorkommende nicht-proteinogene Thiol der Zelle. Es ist ubiquitär verbreitet und weist eine Vielzahl an Funktionen auf. Dazu gehören nicht nur die Inaktivierung reaktiver Sauerstoffspezies und die Aufrechterhaltung der Membranfunktionen und des Redoxgleichgewichts, sondern auch die Komplexbildung von Schwermetallen und die Konjugation von exo- und endogenen elektrophilen Substanzen. Für die Bildung der GS-Konjugate ist zunächst die enzymatische Aktivität von GSTs notwendig, die den nukleophilen Angriff des unpolaren GSH auf Substanzen mit einem elektrophilen Kohlenstoff-, Schwefel- oder Stickstoffatom, katalysieren. In Pflanzen sorgen GSTs unter anderem für die Entgiftung von Herbiziden mit einem S-Triazin- (z.B. Atrazin), Chloracetanilid- (z.B. Alachlor) und Thiocarbamat-Grundgerüst (z.B. EPTC) (Lamoureaux und Rusness, 1987; 1993; Marrs, 1996; Rossini et al., 1996). In tierischen Zellen werden Pestizide wie DDT und Lindan bzw. Karzinogene und Drogen an GSH konjugiert und dadurch detoxifiziert (Hayes und Pulford, 1995; Hayes et al., 2005). Weitere Substrate für die GSTs stellen endogene Verbindungen dar. So konnte die Beteiligung von GSTs an der Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies, am Abbau von aromatischen Aminosäuren sowie an der Biosynthese und Transport von intrazellulären Metaboliten wie dem Hormon Prostaglandin und den Leukotrienen nachgewiesen werden (Hayes et al., 2005). In Pflanzen werden beispielsweise Anthocyane im Cytoplasma synthetisiert und erst nach ihrer Konjugation mit GSH (Marrs et al., 1995) über vakuoläre MRP-Transporter in die Vakuole transportiert (Goodman et al., 2004). Die GSTs werden durch eine große Genfamilie mit etwa 50 Mitgliedern in Arabidopsis und Reis kodiert (Smith et al., 2003; Sappl et al., 2004; Soranzo et al., 2004). Dabei lassen sich starke Variationen hinsichtlich der Aminosäuresequenz, der Regulation und der Substratspezifität der einzelnen Isoenzyme beobachten. In *S. cerevisiae* ließen sich bisher bis zu sieben Gene mit GST- oder GST-ähnlicher Aktivität identifizieren (Choi et al., 1998; Collinson et al., 2002; Garcera et al., 2006). Allerdings ist vergleichsweise wenig über die Funktion von GST und GS-Konjugaten in Hefe bekannt.

Im Gegensatz zum tierischen System gibt es bisher wenige Daten über eine direkte Sekretion von GS-Konjugaten in Pflanzen. Die ersten Hinweise auf eine Sezernierung von GS-Konjugaten aus der Wurzel-Spitze wurden erst kürzlich gefunden (Schröder et al., 2007). Intrazellulär ließ sich ein vergleichbarer Abbau der Konjugate wie in tierischen Zellen nachweisen. Ein Großteil der Erkenntnisse wurde durch Kopplung des GSH an das Modellsubstrat MCB erhalten (Grzam et al., 2006; Blum et al., 2007;

Grzam et al., 2007; Ohkama-Ohtsu et al., 2007b). MCB ist membrangängig und bildet erst nach Konjugation an GSH einen stark fluoreszierenden Komplex (GS-Biman), der mit Hilfe der HPLC auch bis in den picomolaren Bereich nachweisbar ist (Fahey et al., 1980; Fricker et al., 2000). Die Nachweismethoden für GS-Biman und die entsprechenden Abbau-Derivate mit Hilfe der HPLC sind etabliert und können anhand von *in vitro* generierten Referenzsubstanzen überprüft werden (Beck et al., 2003; Blum et al., 2007). Bisherige Analysen von GS-Biman in *S. cerevisiae* waren qualitativ und quantitativ nicht ausreichend (Zadzinski et al., 1996; Ubiyvovk et al., 2006), um einen vollständigen Überblick über die Prozessierung von GS-Konjugaten in Hefe zu liefern. Anhand von Vorversuchen konnten die optimalen *pulse* Bedingungen für die Markierung von GSH in Hefe ermittelt werden (Abb. 18, S. 60). Vergleichbar zu den zahlreichen Analysen in Pflanzen (Meyer et al., 2001; Meyer und Fricker, 2002; Hartmann et al., 2003; Blum et al., 2007) war auch in *S. cerevisiae* eine zeitabhängige, spezifische Markierung des GSH durch MCB möglich. Da bereits bei Inkubationszeiten von über 10 Minuten erste Abbauprodukte nachweisbar waren, konnte von einem sehr effizienten Katabolismus ausgegangen werden. Innerhalb von 10 Minuten reagierten etwa 1% des zugegebenen MCB mit GSH, wodurch etwa 0,6% des gesamten GSH-Pools markiert wurden. Ähnlich wie im pflanzlichen System, wo Blattstückchen von *A. thaliana* für 15 Minuten mit 500 μ M MCB infiltriert wurden (Grzam et al., 2006), wiesen auch in Hefe kurze Inkubationszeiten mit hohen MCB-Konzentrationen keinen toxischen Effekt auf die Zellen auf (Abb. 18, S. 60). Dagegen war bei der Langzeitbelastung von *A. thaliana* Keimlingen eine deutliche Reduktion des Wurzelwachstums ab einer MCB-Konzentration von 30 μ M zu beobachten (Blum et al., 2007).

Somit konnte auch in *S. cerevisiae* eine effiziente und spezifische Markierung des GSH durch MCB erreicht werden. Da die verwendeten Konzentrationen keine toxischen Effekte auf die Zellen aufwiesen und der Abbau der gebildeten GS-Konjugate in die jeweiligen γ EC-, CG- und C-Biman Derivate nachgewiesen werden konnte, scheint MCB auch in diesem Organismus als Modellsubstrat für den Abbau von GS-Konjugaten geeignet zu sein.

Die γ -Glutamyltranspeptidase und zwei Carboxypeptidasen sind am GS-Biman Abbau in Hefe beteiligt.

Nach der Bildung der GS-Konjugate im Cytosol erfolgt die Sequestrierung über ATP-abhängige Transporter der MRP- (*multidrug resistance*) Familie in die Vakuole. MRP-

ähnliche Proteine konnten sowohl in Tieren, Pflanzen und Hefezellen identifiziert werden (Ishikawa, 1992; Martinoia et al., 1993; Li et al., 1997). In der Vakuolenmembran von *S. cerevisiae* gibt es drei beschriebene Transporter, die am Import von GS-Konjugaten in die Vakuole beteiligt sind (Li et al., 1996; Ortiz et al., 1997; Petrovic et al., 2000; Sharma et al., 2002; Sharma et al., 2003). Außerdem kann ein Einfluss von vakuolären H⁺-ATPasen nicht ausgeschlossen werden (Sharma et al., 2003). In der pflanzlichen Zellen erfolgt die Prozessierung der GS-Konjugate entweder durch Spaltung des C-terminalen Glycins oder des N-terminalen Glutamats bis zum Cystein-Derivat, welches in der Vakuole akkumuliert (Lamoureaux und Rusness, 1993; Blum et al., 2007; Grzam et al., 2007; Ohkama-Ohtsu et al., 2007b). In *S. cerevisiae* war ebenfalls der Abbau des konjugierten GSH bis zum C-Biman nachweisbar, allerdings ließ sich keine Akkumulation des Derivates beobachten (Abb. 20, S. 63). Aufgrund der Anwesenheit der γ EC- und CG-Biman Zwischenprodukte existieren in *S. cerevisiae* vermutlich ähnliche Mechanismen für die GS-Konjugat Degradation wie in pflanzlichen Zellen. Erst kürzlich konnte die C-terminale Abspaltung des Cysteins, unter Bildung des γ EC-Derivates der Carboxypeptidase-Aktivität der PCS aus *A. thaliana* zugeordnet werden (Blum et al., 2007). Die Vermutung, dass die Carboxypeptidasen CPY und CPC auch in diesem Fall eine Analogie zu AtPCS1 aufweisen, ließ sich zweifelsfrei bestätigen (Abb. 21, S. 65 und Abb. 22, S. 66). Der Verlust beider Carboxypeptidasen resultierte in einer kompletten Inhibierung der γ EC-Biman Bildung, die im Wildtyp durchschnittlich 10% der markierten GS-Biman Menge betrug. Interessant sind dabei die unterschiedlichen Substratspezifitäten von CPY und CPC. Während die CPY hauptsächlich die Transpeptidierungsreaktion zur Biosynthese von PC₂ katalysierte, wies die CPC eine höhere enzymatische Aktivität für die Hydrolyse von GS-Konjugaten auf (Abb. 53). Denkbar wäre, ähnlich wie für AtPCS1 postuliert (Beck et al., 2003), dass die räumliche Konformation des an GSH konjugierten Substrates für die Enzymaktivität verantwortlich ist. Während Schwermetall-Ionen die Transpeptidierung von γ EC-Einheiten auf GSH durch die CPY induzieren, aktivieren komplexere Strukturen, wie das zyklische Xenobiotikum, die Hydrolyse durch die CPC. Da beide Proteine in allen wesentlichen strukturgebenden und katalytischen Aminosäuren übereinstimmen (Endrizzi et al., 1994), ist die Ursache für die variable Substratspezifität wahrscheinlich in den restlichen 30% zu suchen. Da bisher keine Kristallstrukturanalysen für die CPC vorliegen, könnten erste Erkenntnisse mit Hilfe von *in vitro* Versuchen gewonnen werden, welche die Substratspezifitäten bestätigen und genauer charakterisieren.

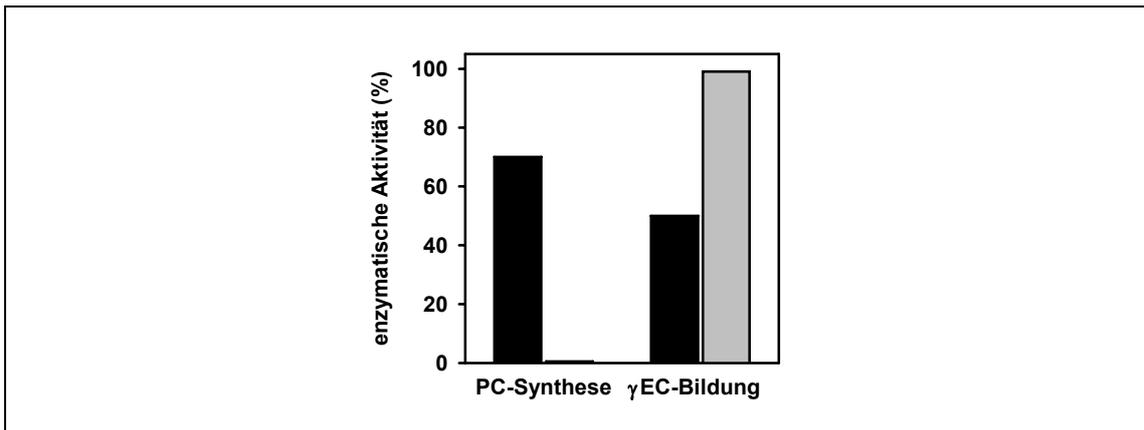


Abb. 53 Enzymatische Aktivität von CPY und CPC für die PC-Biosynthese und die γEC-Biman Bildung

Die enzymatische Aktivität von CPY (schwarz) und CPC (hellgrau) wurde durch die Analyse der entsprechenden Deletionsmutanten (Δcpy und Δcpc) für die Biosynthese von PCs und die Spaltung von GS-Konjugaten zum γ EC-Konjugat im Vergleich zum Wildtyp (100%) bestimmt. Der Verlust beider Carboxypeptidasen ($\Delta cpy\Delta cpc$) führte zu einer kompletten Blockierung beider Stoffwechselwege.

Vergleichbar wie in tierischen Organismen erfolgt auch in Pflanzen der Abbau von GS-Konjugaten über die Aktivität von γ -GTs, indem das N-terminale Glutamat abgespalten und ein Cysteinylglycin- (CG-) Dipeptid gebildet wird (Grzam et al., 2007; Ohkama-Ohtsu et al., 2007b). In *S. cerevisiae* ließ sich nur ein homologes Gen zu den tierischen γ -GTs identifizieren. *CIS2* kodiert für ein membranständiges Protein, welches sowohl in der Plasma- als auch in der Vakuolenmembran integriert vorliegt (Jaspers und Penninckx, 1984; Payne und Payne, 1984). Für das Enzym ließ sich nicht nur die Beteiligung am Abbau von GSH, sondern auch am Abbau von GS-Konjugaten nachweisen (Mehdi et al., 2001; Ubiyvovk et al., 2006). Auch unter den hier getesteten Bedingungen konnte die N-terminale Abspaltung des Glutamats vom GS-Konjugat eindeutig der *Cis2p* Aktivität zugeordnet werden (Abb. 24, S. 68). Genau wie zuvor von Ubiyvovk und Mitarbeitern gezeigt, wiesen die $\Delta cis2$ Zellen auch nach längeren *chase* Zeiten ein konstantes Fluoreszenzsignal in der Vakuole auf (Ubiyvovk et al., 2006), während im Wildtyp nur noch ein diffuses Signal beobachtet werden konnte (Abb. 27, S. 72). Sie schlussfolgerten, dass durch den Verlust der *Cis2p* kein weiterer Abbau der GS-Konjugate erfolgte und sie somit in der Vakuole akkumulierten. Allerdings belegen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten HPLC-Analysen der $\Delta cis2$ Zellen keine Akkumulation von GS-Biman, sondern von γ EC-Biman (Abb. 24, S. 68). Dessen Bildung eindeutig der enzymatischen Aktivität von CPC und CPY zugeordnet werden konnte (Abb. 25, S. 69 und Abb. 26, S. 71). Des Weiteren kann aufgrund der starken Akkumulation von γ EC-Biman auch die Beteiligung von *Cis2p* an der Spaltung des γ EC-Biman Dipeptids nachgewiesen werden. Dies ließ sich auch *in vitro* mit Hilfe von

Zellrohextrakten der entsprechenden Hefestämme bestätigen (Wünschmann et al., 2009).

Da beide Carboxypeptidasen und auch Cis2p eine vakuoläre Lokalisation aufweisen (Jaspers und Penninckx, 1984; Nasr et al., 1994; Huh et al., 2003), scheint dieses Kompartiment hauptsächlich für die Entgiftung von GS-Konjugaten in *S. cerevisiae* verantwortlich zu sein. In tierischen Organismen sind hingegen mehrere Organe am Abbau von Xenobiotika beteiligt (Abb. 54A).

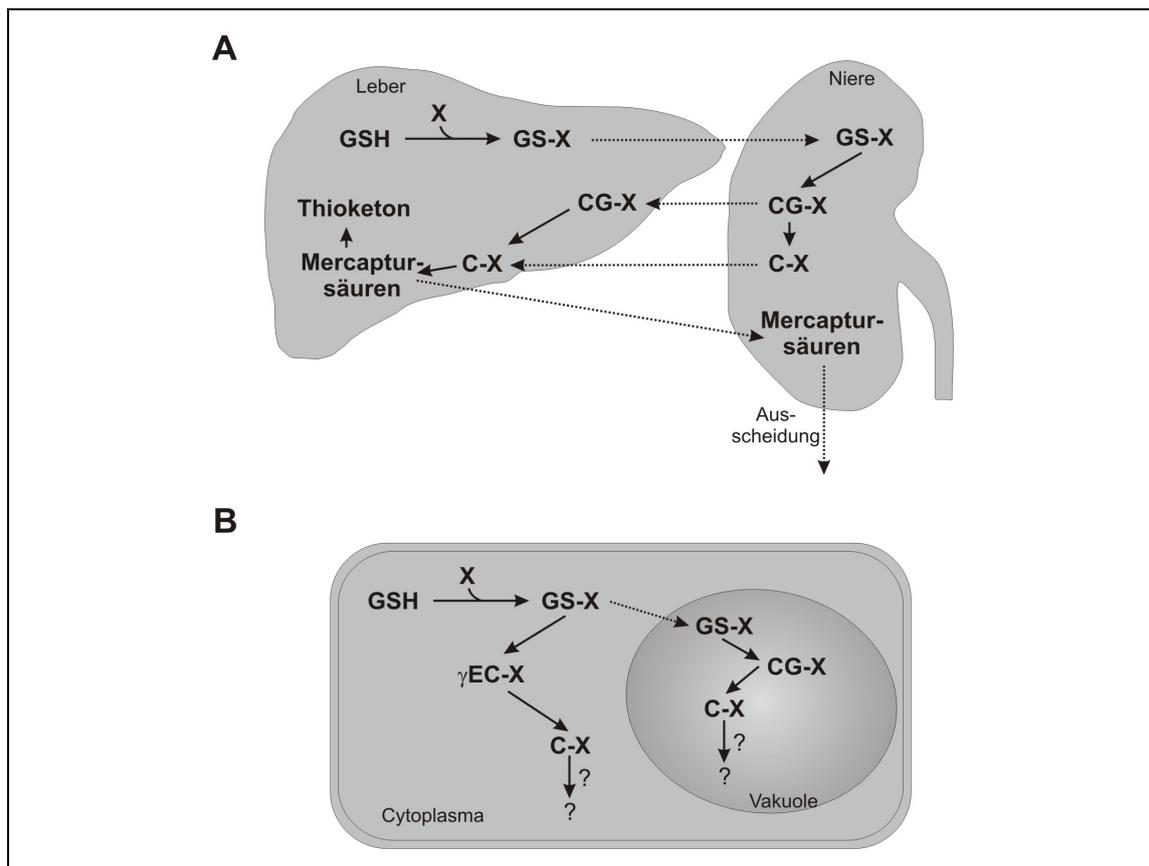


Abb. 54 Schematische Darstellung des GS-Konjugat Abbaus in tierischen und pflanzlichen Organismen

Nach der Kopplung der elektrophilen Xenobiotika (X) an GSH werden die gebildeten GS-Konjugate (GS-X) in tierischen Organismen (A) über mehrere Zwischenschritte bis zu Mercaptursäuren abgebaut und ausgeschieden. In pflanzlichen Zellen (B) sind die Abbauprozesse bisher nur bis zum Cystein-Konjugat (C-X) aufgeklärt. Detaillierte Erklärungen siehe Text. Die durchgezogenen Linien verdeutlichen enzymatische Prozesse, während die gepunkteten Linien Transportprozesse darstellen.

Nach der Konjugation an GSH in der Leber werden die gebildeten GS-Konjugate zwar teilweise in die Galle oder ins Blut abgesondert, der Großteil aber wird in die Niere transportiert, wo die Transpeptidation und Dipeptid-Hydrolyse erfolgen (Inoue et al., 1982). Katalysiert werden die Reaktionen durch membranständige γ -GTs und CGasen bzw. durch die Aminopeptidase M (Hughey et al., 1978; Kozak und Tate, 1982). Des

Weiteren ließ sich zeigen, dass die S-konjugierten CG-Dipeptide auch durch cytosolische Dipeptidasen in der Leber prozessiert werden können (Jösch et al., 1998). Die dadurch gebildeten C-Konjugate werden zusammen mit den reimportierten C-Konjugaten aus der Niere mit Hilfe von N-Acetyltransferasen der Leber zu Mercaptursäuren abgebaut und schließlich über die Niere ausgeschieden. In Pflanzen erfolgt der Abbau von Xenobiotika vermutlich sowohl in der Vakuole als auch im Cytoplasma (Abb. 54B). In der Vakuole kommt es zur N-terminalen Abspaltung des Glutamats durch die membranständige γ -GT GGT4 (Ohkama-Ohtsu et al., 2007b) und zum weiteren Abbau bis zum Cystein-Konjugat (Grzam et al., 2006; Grzam et al., 2007; Ohkama-Ohtsu et al., 2007b). Die dafür benötigten CGasen bzw. Aminopeptidasen konnten bisher noch nicht identifiziert werden. Der alternative Abbauweg über die PCS findet vermutlich im Cytoplasma statt (Blum et al., 2007). Die synthetisierten γ EC-Konjugate werden mit aller Wahrscheinlichkeit durch eine in der Plasmamembran lokalisierten γ -GT zu den Cystein-Konjugaten abgebaut (Ohkama-Ohtsu et al., 2007b; Brazier-Hicks et al., 2008a). Über die für den Abbau der Cystein-Konjugate benötigten Enzyme liegen ebenfalls nur wenige Informationen vor. Während es in Pflanzen keine Hinweise auf eine N-Acetylierung der Konjugate gibt, kommt es vermutlich eher zu einer N-Malonylierung (Lamoureux und Rusness, 1993). Allerdings konnte bisher keinem Protein eine entsprechende Enzymaktivität zugeordnet werden. Ähnlich verhält es sich mit den Enzymaktivitäten für entsprechende β -Lysen und S-Methyltransferasen, obwohl Hinweise auf deren Funktion bei der Bioaktivierung und Detoxifizierung von GS-Konjugaten, sowie dem Metabolismus von endogenen Sekundärmetaboliten vorliegen (Kiddle et al., 1999; Coiner et al., 2006; Brazier-Hicks et al., 2008b).

Ähnlich wie im pflanzlichen System fehlen auch in *S. cerevisiae* die Nachweise für die Aktivität von CG- oder Aminopeptidasen, N-Acetyltransferasen und β -Lysen, die am Abbau von Xenobiotika beteiligt sind. Interessanterweise war bei der Doppelmutante für beide Carboxypeptidasen ($\Delta cpy\Delta cpc$) ein Anstieg der CG-Biman Konzentration um ca. 100% im Vergleich zum Wildtyp festzustellen (Abb. 23, S. 67), wodurch eine Beteiligung der beiden Enzyme am Abbau von CG-Konjugaten vermutet werden kann. Anhand von Sequenzvergleichen und Datenbankrecherchen lassen sich noch zahlreiche weitere offene Leserahmen für putative Carboxy- und Aminopeptidasen identifizieren. Von einigen ausgewählten Kandidaten wurden die Deletionsmutanten hinsichtlich eines erhöhten CG-Biman Gehaltes im Vergleich zum Wildtyp analysiert (Daten nicht gezeigt). Dazu gehörten die vakuoläre Aminopeptidase Lap4p, für die erst kürzlich die Beteiligung am Abbau von GSH nach Cadmium-Belastung diskutiert wurde

(Cueva et al., 1989; Adamis et al., 2008), die vakuolären Amino- bzw. Carboxypeptidasen Ape3p (Yasuhara et al., 1994), Cps1p (Bordallo et al., 1991) und das membranständige Dap2p (Roberts et al., 1989). Ebenso in die Analysen mit eingeschlossen wurden die im Golgi lokalisierte Carboxypeptidase Kex1p (Cooper und Bussey, 1989), welche die höchste Sequenzhomologie zur CPY aufwies und zwei Proteine des am Abbau von GSH beteiligten DUG-Komplexes (Dug1p, Dug2p) (Ganguli et al., 2007). Keine der untersuchten Einfachmutanten zeigte signifikante Unterschiede der CG-Biman Konzentration im Vergleich zum Wildtyp. Wahrscheinlich kann die enzymatische Aktivität für die Spaltung der S-konjugierten Dipeptide keinem einzelnen Enzym zugesprochen werden. Durch Deletion der jeweiligen Kandidatengene im $\Delta cpy\Delta cpc$ Stamm wäre es eventuell möglich, die entsprechende Kombination an Genen zu ermitteln, die zum Verlust der Dipeptidase-Aktivität führt.

Wie werden GS-Biman Derivate aus der Zelle sekretiert?

Bei den Analysen des GS-Konjugat Abbaus mit fluoreszierenden Substraten fiel in den Wildtyp-Zellen von *S. cerevisiae* stets eine starke Reduktion des Fluoreszenzsignals im Laufe der Zeit auf (Zadzinski et al., 1996; Ubiyvovk et al., 2006). Dieser Verlust (80% innerhalb von vier Stunden) ließ sich auch in dieser Arbeit sowohl phänotypisch mit Hilfe von mikroskopischen Analysen als auch analytisch anhand von HPLC-Analysen nachweisen (Abb. 20, S. 63 und Abb. 27, S. 72). Interessanterweise wiesen die Zellen der Deletionsmutante für die γ -GT ($\Delta cis2$) keinen Verlust des Fluoreszenzsignals auf (Abb. 27; S. 72; Ubiyvovk et al., 2006). Der Intensitätsausgleich erfolgte durch die starke Akkumulation des γ EC-Bimans in der Vakuole (Abb. 24, S. 68). Somit kann der Export von γ EC-Derivaten aus den Zellen vermutlich ausgeschlossen werden. Da in den Wildtyp-Zellen keines der nachweisbaren Abbauprodukte signifikant in der Zelle akkumulierte, konnte entweder von einem vollständigen Abbau des GS-Biman zu nicht-fluoreszierenden Produkten oder von einer direkten Sekretion der GS-Konjugate aus der Zelle ausgegangen werden. Da, wie bereits erwähnt, bisher keine Enzyme für die weitere Prozessierung von Cystein-Konjugaten in der Hefe bekannt sind, wurde der direkte Export von Konjugaten in den Mittelpunkt der Untersuchungen gestellt. Die Resistenz von eukaryotischen Zellen gegenüber einer Vielzahl an strukturell- und funktionell-variablen Verbindungen, wie Herbiziden, Pestiziden, Karzinogenen oder Drogen, wird *multidrug resistance* (MDR) genannt. In *S. cerevisiae* wird die MDR vor allem durch die erhöhte Expression von ABC-Transporter der PDR- (*pleiotropic drug resistance*) Familie induziert. Zu denen zählen beispielsweise die in der Plasmamembran integrierten Pdr5, Snq2 und Yor1 Proteine (Ernst et al., 2005). Über

die Regulation der Expression war bisher wenig bekannt. Jüngste Analysen von *S. cerevisiae* und *C. glabrata* zeigten die direkte Bindung von diversen Xenobiotika an Transkriptionsfaktoren der Zink-cluster orthologen Pdr1p Familie, wodurch die Expression der Efflux-Transporter stimuliert wurde (Thakur et al., 2008). Dieser Mechanismus weist hohe Ähnlichkeiten zu dem Xenobiotika-Rezeptor X (PXR) in Säugetierzellen auf, welcher die Transkription von ABC-Transportern und Enzymen der P450 Cytochrome hochreguliert (Kliwer et al., 2002; Willson und Kliwer, 2002). Des Weiteren können eukaryotische ABC-Transporter in sogenannten *lipid rafts* assoziiert vorliegen (Pohl et al., 2005). *Lipid rafts* sind dynamische hochspezialisierte Lipid-Domänen innerhalb von biologischen Membranen (Simons und Ikonen, 1997), die an einer Vielzahl von physiologischen Transportvorgängen beteiligt sind (Simons und Vaz, 2004). Es ließ sich zeigen, dass die Integration von ABC-Transportern der MDR von der Zusammensetzung der Membran abhängt und bevorzugt in *raft*-ähnlichen Domänen erfolgt (Panwar et al., 2008). Allerdings ist über die transportierten Substrate und die Vorteile dieser Strukturen bisher nur wenig bekannt. Eine weitere Möglichkeit, wie die GS-Konjugate aus den Zellen gelangen könnten, wären sekretorische Vesikel. St-Pierre und Mitarbeiter bestätigten den ATP-abhängigen Import von GS-Konjugaten in entsprechende Vesikel (St-Pierre et al., 1994).

Um die Sekretion von GS-Konjugaten belegen zu können, wurde das Medium der Wildtyp-Zellen mit Hilfe der HPLC analysiert (Abb. 28, S. 73). Wie erwartet ließ sich kein γ EC-Biman, aber überraschenderweise auch kein GS-Biman im Medium nachweisen. CG- und C-Biman waren hingegen eindeutig auffindbar. Aufgrund der vergleichbaren Konzentrationen der Biman-Derivate im Zellrohextrakt konnte von keiner signifikanten Kontamination des Mediums mit Zellrohextrakt ausgegangen werden. Durchgeführte Proteinbestimmungen bestätigten diesen Befund (Daten nicht gezeigt). Durch Kombination der intrazellulär- und extrazellulär-nachweisbaren Derivate konnten schließlich etwa 85% des ursprünglichen Fluoreszenzsignals wiedergefunden werden. Da keine direkte Sekretion von GS-Biman ins Medium erfolgte und die exportierten CG- und C-Biman Derivate erst in der Vakuole gebildet werden, war eine „klassische“ MDR über PDR-Transporter der Plasmamembran unwahrscheinlich. Ebenso führte die Inkubation mit Brefeldin A (BFA) zu keiner veränderten Sekretion im Vergleich zu den unbelasteten Zellen (Abb. 32, S. 79). BFA inhibiert den vesikulären Transport über COPI-Vesikel, in dem es die Aktivität der Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF, *guanine nucleotide exchange factor*) hemmt, welche wiederum für die Aktivierung von ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARF) benötigt werden (Donaldson et al., 1992; Helms und Rothman, 1992). Allerdings kann

eine BFA-unabhängige Sekretion der Konjugate nicht ausgeschlossen werden. Die Behandlung mit Azid resultierte in einer kompletten Inhibierung der Sekretion von CG- und C-Biman (Abb. 32, S. 79). Azid ist ein starker Inhibitor der mitochondrialen Respiration, indem es an die Häm-a₃-Bindungsstelle der Cytochrom c Oxidase bindet und sie somit blockiert (Palmer, 1993). Allerdings ließen sich auch toxische Effekte auf weitere ATPasen nachweisen. Dazu gehören ABC-Transporter (Dallas et al., 2003; Jha et al., 2003), die Präprotein-Translokase SecA (Oliver et al., 1990; Miller et al., 2002) und die DNA-Topoisomerase II α (Ju et al., 2001). Die hohe Toxizität des Azids spiegelte sich in dem stark reduzierten Wachstum der Hefezellen wider. Allerdings zeigten die Analysen für den GS-Biman Abbau in den Zellrohextrakten, dass die Stoffwechselaktivität der Zellen gewährleistet war. Interessanterweise ließ sich in den Azid-behandelten Zellen ein vergleichbarer GS-Konjugat Katabolismus wie in den Zellen der Deletionsmutante für die γ -GT ($\Delta cis2$) beobachten. Somit scheint die Aktivität der γ -GT für die N-terminale Spaltung des Glutamats zumindest indirekt von ATP abhängig zu sein.

Über die Struktur von Cis2p kann nur anhand von Sequenz- und Motivvergleichen mit homologen γ -GTs aus *E. coli*, Ratte und *Homo sapiens* eine Aussage getroffen werden (Mehdi et al., 2001). Experimentelle Analysen liegen nicht vor. Demnach weist Cis2p die Topologie von Typ-II integrierten vakuolären Membranproteinen auf (Mehdi et al., 2001), bei denen sich ein kurzer hydrophiler Schwanz im Cytoplasma und der C-Terminus mit dem aktiven Zentrum im vakuolären Lumen befindet (Tate und Meister, 1981). Für die Sekretion von CG- und C-Konjugaten aus der Vakuole in das Cytoplasma wird entweder eine spezielle Orientierung der γ -GT benötigt, sodass ein transmembraner Exportkanal entsteht, oder es erfolgt eine Interaktion mit speziellen Transportern für den Export von beispielsweise Aminosäuren. Bis heute konnten keine Mechanismen für den Export von entsprechenden Aminosäuren aus der Vakuole in das Cytoplasma der Hefe identifiziert werden (Messenguy et al., 1980; Kitamoto et al., 1988). Mehdi und Mitarbeiter zeigten allerdings für den Transport und Metabolismus von GSH eine Interaktion von Cis2p mit dem vakuolären ABC-Transporter Ycf1p und der V-ATPase (Mehdi et al., 2001). Dabei handelte sich aber lediglich um Untersuchungen für den Import von Substanzen wie GSH in die Vakuole. Für mögliche Exportprozesse liegen keine Daten vor. Zudem zeigten Analysen der Sekretion von GS-Biman Derivaten in den Mutanten für Ycf1p, Bpt1p und der entsprechenden Doppelmutante keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Somit kann ein Einfluss der beiden ABC-Transporter auf den Export der S-konjugierten Derivate vermutlich vernachlässigt werden. Auch der Verlust der Proteine Yol137wp

(Ito et al., 2001) und Ydr155cp (Krogan et al., 2006), die mögliche Interaktionspartner von Cis2p darstellen, ließ keinen Einfluss auf die Sekretion oder Metabolisierung der GS-Biman Derivate erkennen (Daten nicht gezeigt). Um nähere Informationen über die Regulation und den Mechanismus des Exportes zu erhalten, sind weitere Analysen mit Cis2p notwendig. Allerdings führte der initiale Versuch, das Protein C-terminal mit dem Fluoreszenzmarker eGFP zu versehen, zu einer Beeinträchtigung der Funktionalität des Proteins (Abb. 34, S. 82). Denkbar wäre eine Blockierung der funktionalen Domänen von Cis2p durch die Tertiärstruktur des 26 kDa großen, zur Dimerisierung neigenden eGFP-*tags* (Yokoe und Meyer, 1996; Palm et al., 1997). Da aber weder durch Fluoreszenzmikroskopie noch mit Hilfe des immunologischen Nachweises ein Signal für das eGFP erhalten werden konnte, kann eher von einer Degradation des Proteins ausgegangen werden. Vermutlich führte der C-terminale *tag* zu einer Missfaltung des Proteins, wodurch bereits im Golgi die Kaskade für den Abbau des Proteins in der Vakuole eingeleitet wurde (Hong et al., 1996; Jorgensen et al., 1999). Ebenso denkbar wäre ein Einfluss des Fusions-*tags* auf den korrekten Transport des Proteins über den post-Golgi Translokationsweg zur Vakuole (Cowles et al., 1997), da beispielsweise auch bei der Inkubation von isolierten Vakuolen keine Integration von aufgereinigter γ -GT in die Membran beobachtet werden konnte (Mehdi et al., 2001).

Abbau von GS-Konjugaten in S. cerevisiae

Aufgrund der neuen Erkenntnisse hinsichtlich der Metabolisierung und des Transportes von GS-Konjugaten kann ein Modell für die Entgiftung von Xenobiotika in *S. cerevisiae* erstellt werden (Abb. 55). Die elektrophilen Xenobiotika werden nach dem Transport in die Zelle durch die Aktivität von GSTs an GSH gekoppelt. Die gebildeten GS-Konjugate gelangen unter anderem über die ABC-Transporter Ycf1p und Bpt1p in die Vakuole, wo sie entweder durch die γ -GT oder die Carboxypeptidasen CPC und CPC zu dem entsprechenden S-substituierten CG- bzw. γ EC-Dipeptiden hydrolysiert werden. Die membranständige γ -GT ist ebenfalls für die Spaltung des γ EC-Derivates zum S-substituierten Cystein zuständig. Die katalytische Aktivität für die Hydrolyse des CG-Konjugates ist noch unbekannt. Vermutlich sind daran mehrere CGasen beteiligt, die sowohl in der Membran als auch im Lumen der Vakuole lokalisiert sein können. Im Gegensatz zu tierischen Zellen, in denen das Cystein-Derivat weiter prozessiert wird, erfolgt in *S. cerevisiae* ein Export von CG- und C-Konjugaten. Wie die Konjugate ausgeschieden werden, ist bisher noch nicht geklärt. Möglicherweise erfolgt die Sekretion direkt über die γ -GT bzw. assoziierte Transporter. Aber auch γ -GT unabhängige Mechanismen sind möglich. Analysen mit dem Modellsubstrat MCB

haben bewiesen, dass durch diese enzymatischen und sekretorischen Mechanismen ein schneller und effizienter Abbau von Xenobiotika in *S. cerevisiae* realisiert wird.

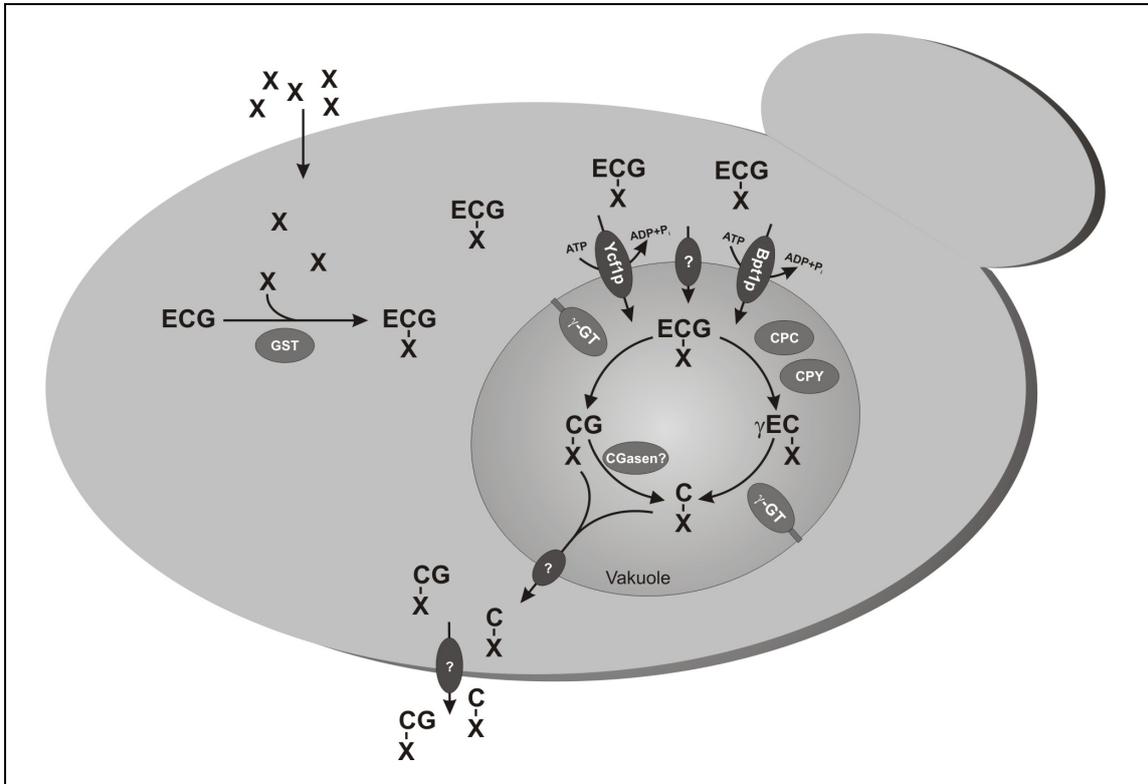


Abb. 55 Modell für die Detoxifizierung von Xenobiotika in *S. cerevisiae*
 Dargestellt ist die Bildung von GS-Konjugaten aus GSH (ECG) und elektrophilen Xenobiotika (X) und ihr vakuolärer Abbau in der Hefe *S. cerevisiae*. Detaillierte Erläuterungen siehe Text.

4.2 Funktionelle Divergenz von homologen Phytochelatin-Synthasen

PCS-Gene sind in der Natur weiter verbreitet als anfänglich angenommen (Abb. 56). Aufgrund der Sequenzdaten der ersten identifizierten PCS-Gene aus Weizen, *S. pombe* und *A. thaliana* (Clemens et al., 1999; Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999) konnten mit Hilfe von EST- und Sequenzdatenbanken weitere homologe Gene in fast allen höheren Pflanzen (Clemens, 2006), aber auch in Schleimpilzen wie *Dictyostelium discoideum* (E. Grill, 1987; nicht veröffentlichte Ergebnisse) und Tieren wie *Caenorhabditis (C.) elegans* (GenBank Acc.No. 266513) identifiziert werden (Vatamaniuk et al., 2001). Nicht zuletzt finden sich PCS-ähnliche Gene auch in zahlreichen Prokaryoten. Trotz der hohen Anzahl von homologen PCS-Genen sind nur wenige der kodierten Proteine funktionell charakterisiert. Zudem scheinen nicht alle PCS-homologen Proteine für die Biosynthese von PCs verantwortlich zu sein. Somit stellt sich die Frage nach der Funktion der PCS in diesen Organismen.

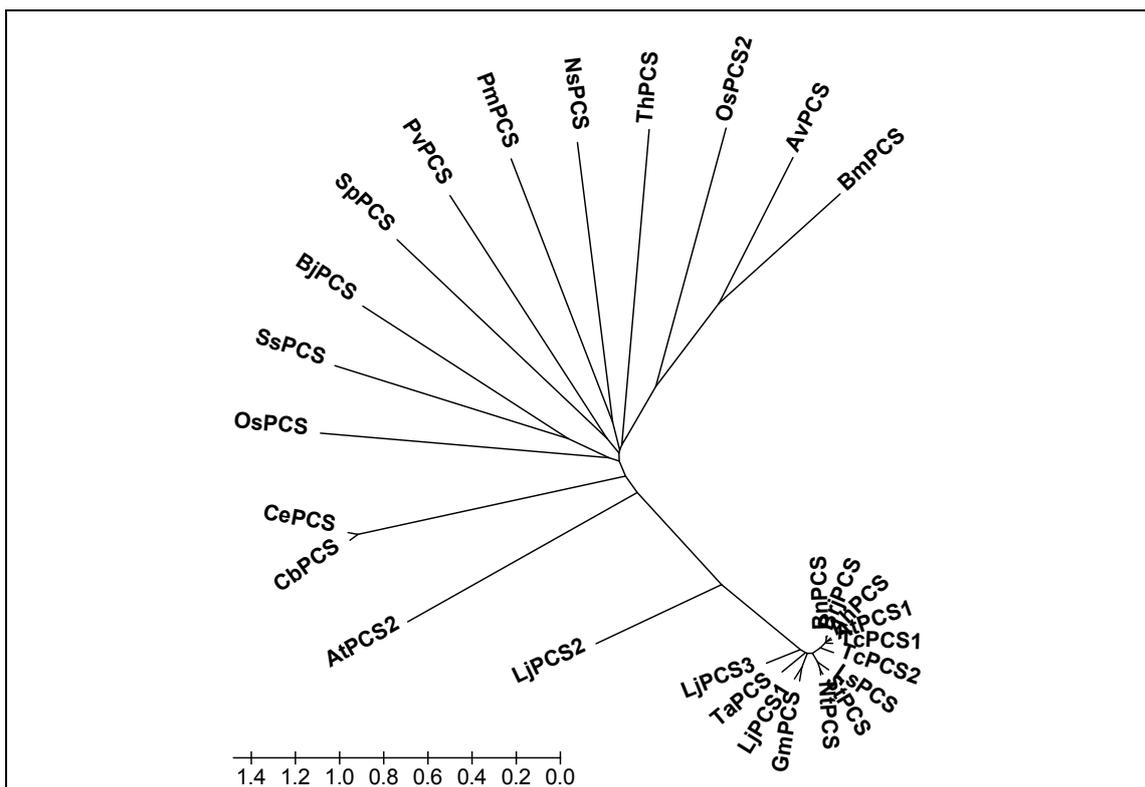


Abb. 56 Evolutionäre Beziehungen von homologen Phytochelatin-Synthasen

Von 28 putativen PCS wurden die Proteinsequenzen mit Hilfe von ClustalW verglichen und anschließend durch MEGA4 phylogenetisch analysiert (Tamura et al., 2007). Da der Baum maßstabsgerecht erstellt wurde, können aufgrund der unterschiedlichen Astlängen Rückschlüsse auf die Phylogenie gezogen werden. Insgesamt beträgt die Summe der Astlängen=19,4. Die analysierten Spezies sind folgendermaßen abgekürzt: Ce = *Caenorhabditis elegans*, Cb = *Caenorhabditis briggsae*, Th = *Tetrahymena thermophila*, Ta = *Triticum aestivum*, Sp = *Schizosaccharomyces pombe*, Tc = *Thlaspi caerulescens*, Os = *Oryza sativa*, Bn = *Brassica napus*, Ah = *Arabidopsis halleri*, Brj = *Brassica juncea*, At = *Arabidopsis*

thaliana, Gm = *Glycine max*, Lj = *Lotus japonicus*, LS = *Lactuca sativa*, St = *Solanum tuberosum*, Nt = *Nicotiana tabacum*, Pv = *Pteris vittata*, Av = *Anabaena variabilis*, Pm = *Prochlorococcus marinus*, Ns = *Nostoc spec.*, Ss = *Synechococcus spec.*, Bj = *Bradyrhizobium japonicum*, Bm = *Burkholderia mallei*.

AtPCS2 – die zweite funktionale PCS in *Arabidopsis*?

A. thaliana weist wie *Lotus japonicus* und Reis mehrere PCS Gene im Genom auf (Clemens, 2006; Loscos et al., 2006; Ramos et al., 2008). Die beiden identifizierten PCS aus *Arabidopsis* besitzen eine 78%ige Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenz (Abb. 47, S. 101). Dabei findet sich die höchste Homologie im N-terminalen Bereich wieder (90%ige Identität), während der C-Terminus stärker divergiert (68%ige Identität). RT-PCR Analysen lassen die konstitutive Expression beider Gene sowohl in der Wurzel als auch im Spross der Pflanze vermuten, wobei *AtPCS2* ein wesentlich geringeres Expressionslevel als *AtPCS1* aufweist (Cazale und Clemens, 2001; Lee und Korban, 2002; Lee und Kang, 2005). Für die entsprechenden Proteine kann eine cytoplasmatische Lokalisation angenommen werden (R. Blum, persönliche Mitteilung). Dabei ist *AtPCS1* in der gesamten Pflanze, vor allem in der Wurzel und in den Blättern, zu finden, während *AtPCS2* hauptsächlich in der Wurzelspitze lokalisiert ist. Anhand von Punktmutationen bzw. T-DNA Insertionen im *AtPCS1* Gen ließ sich die Rolle des Enzyms an der Cd²⁺-Toleranz durch die Biosynthese von PCs *in planta* bestätigen (Howden et al., 1995a; Howden et al., 1995b; Blum et al., 2007). Der Verlust von *AtPCS2* hatte hingegen weder einen Einfluss auf die Cd²⁺-Toleranz noch auf die nachweisbare PC-Konzentration (Blum et al., 2007). Auch die entsprechende Doppelmutante für beide Gene zeigte keine zusätzlichen Effekte (Blum et al., 2007). Vergleichbares konnte für den Abbau von GS-Konjugaten *in planta* beobachtet werden (Blum et al., 2007). Durch Deletion der *AtPCS1* ließ sich die Bildung von γEC-Konjugaten zwar deutlich reduzieren, aber nicht komplett blockieren. Allerdings führte auch die Doppelmutante zu keiner weiteren Minderung der γEC-Konjugat Konzentration. Somit kann zwar die vermutete Rolle der *AtPCS1* beim Abbau von GS-Konjugaten *in planta* bestätigt werden, die physiologische Relevanz von *AtPCS2* bleibt jedoch ungeklärt. Der geringe Einfluss von *AtPCS2* wird mit der niedrigen Expressionsrate erklärt, die vermutlich durch eine schwache Promotoraktivität und eine geringe Translationseffizienz der *AtPCS2* mRNA verursacht wird (Cazale und Clemens, 2001; Lee und Kang, 2005). Dass *AtPCS2* eine vergleichbare katalytische Aktivität für die Biosynthese von PCs nach Cd²⁺-Belastung besitzt wie *AtPCS1* (Cazale und Clemens, 2001), konnte auch in dieser Arbeit nach heterologer Expression in Hefe belegt werden (Abb. 40, S. 91). Der einzige Unterschied nach Expression beider PCS Gene in dem PC-defizienten *S. cerevisiae*-

Stamm war die Kettenlänge der nachweisbaren PCs. Während AtPCS2 hauptsächlich die Bildung von kurzkettigen PCs wie PC₂ vor PC₃ und PC₄ katalysierte, wiesen die Zellen mit AtPCS1 nach Cd²⁺-Belastung eher langkettige PCs wie PC₃ und PC₄ auf. Zusätzlich konnte neben PC₂ auch desGly(PC₂) nachgewiesen werden (Abb. 39, S. 90). Obwohl die desGly-Varianten der PCs bereits in einigen Hefen (Mehra et al., 1988; Hayashi et al., 1991b; Barbas et al., 1992) und höheren Pflanzen (Klapheck et al., 1994; Maitani et al., 1996; Ramos et al., 2008) nach Schwermetall-Belastung beobachtet werden konnten, ist ihr Ursprung immer noch unklar. Denkbar wäre eine Spaltung des C-terminalen Glycins durch endogene Peptidasen oder die PCS-abhängige Bildung aus γEC und GSH wie in *S. pombe* beobachtet (Hayashi et al., 1991b). Die Aktivität von endogenen Peptidasen kann ausgeschlossen werden, da AtPCS1 und AtPCS2 den gleichen Expressionsbedingungen ausgesetzt waren. Beide Gene wurden in dem gleichen Hefestamm exprimiert und die induzierte Expression durch den GAL1-Promotor resultierte in vergleichbaren Proteinkonzentrationen. Die geringen Abweichungen in Abb. 35 (S. 84) sind durch die höhere Spezifität des anti-PCS-Antikörpers für AtPCS1 zu erklären. Des Weiteren wiesen beide Proteine eine cytoplasmatische Lokalisation auf (Abb. 37, S. 87). Zusammengefasst scheint die Bildung von desGly(PC₂) spezifisch durch AtPCS1 katalysiert zu werden. Um die genaue Funktion der gebildeten desGly-PCs bei der Entgiftung von Schwermetall-Ionen zu charakterisieren, sind weitere Analysen notwendig. Die Fähigkeit von AtPCS2, in *S. cerevisiae* die gleiche Cd²⁺-Toleranz und PC-Bildung hervorzurufen wie AtPCS1, überrascht, da auch nach Expression des Gens unter dem 35S-Promotor oder dem endogenen AtPCS1-Promotor keine komplette Komplementation des ΔPCS1-Phänotyps in *A. thaliana* erreicht werden konnte (Lee und Kang, 2005). Fraglich ist, ob die beiden Proteine auch *in planta* unterschiedliche PC-Moleküle synthetisieren und damit die unvollständige Komplementation erklärt werden kann.

PCS sind spezifische γEC-Dipeptidyl-Transpeptidasen, die zur Superfamilie der Papaine gehören (Rea et al., 2004; Vivares et al., 2005). Für die Biosynthese von PCs wird die Cys-Gly-Bindung von GSH gespalten und ein γEC-Acyl-Intermediat gebildet (Vatamaniuk et al., 2004). Das Glycin des GSH-Moleküls dissoziiert ab und wird durch das Akzeptor-Substrat ersetzt. Im einfachsten Fall stellt das zweite Substrat GSH dar, wodurch PC₂ synthetisiert wird. Über denselben Mechanismus kann auch die Bildung der längerkettigen PCs erklärt werden, statt GSH stellt PC_n den Akzeptor für das γEC-Dipeptid dar (Rea et al., 2004). Somit kann vermutet werden, dass AtPCS1 und AtPCS2 unterschiedliche Affinitäten zu den Akzeptor-Molekülen aufweisen. Während

AtPCS2 das γ EC-Dipeptid bevorzugt auf GSH überträgt, erfolgt bei AtPCS1 der Transfer eher auf PC₂- und PC₃-Moleküle.

Nachdem eine vergleichbare Aktivität von AtPCS1 und AtPCS2 für die Biosynthese von PCs gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob dies auch auf den Abbau von GS-Konjugaten zutrifft. Nachdem die Mechanismen für den Abbau in Hefe aufgeklärt werden konnten, stellt dieser Organismus ein geeignetes Modellsystem für die Charakterisierung von heterologen Proteinen dar. Die Expression von AtPCS1 führte in der Dreifachmutante zu einer schwermetall-abhängigen Induktion der γ EC-Konjugat Bildung (Abb. 42, S. 94). Ähnlich wie in den *in vitro* Versuchen führte die Inkubation mit Cd²⁺-Ionen zu einer fünffachen Steigung der γ EC-Biman Konzentration (Beck et al., 2003; Grzam et al., 2006). Die Aktivität der PCS kann durch Schwermetalle induziert werden. Bei den Untersuchungen für die Substratbindung konnte eine zweite, schwermetall-abhängige Acylierung von AtPCS1 beobachtet werden (Vatamaniuk et al., 2004). An welcher Aminosäure von AtPCS1 sich diese zweite Bindungsstelle für GSH befindet, ist noch nicht bekannt. Voneinander unabhängige *in vitro* Analysen bestätigten die Aktivierung von AtPCS1 durch Metall- und Metalloid-Ionen wie beispielsweise Cd²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Sb²⁺, Ag⁺, Hg²⁺ und AsO₄³⁻ (Vatamaniuk et al., 2000; Oven et al., 2002). Interessanterweise stellen die Metall-Ionen nicht nur die Voraussetzung für die Biosynthese von PCs, sondern auch für den Abbau von GS-Konjugaten dar (Beck et al., 2003). Bis jetzt ist der genaue Mechanismus für die Aktivierung noch nicht komplett aufgeklärt. Nach Vatamaniuk und Mitarbeiter reicht die Bindung von freien Cd²⁺-Ionen an das Protein nicht für eine Aktivierung aus. Vielmehr fungieren die GSH-Cd²⁺- und PC-Cd²⁺-Komplexe als Substrat und Aktivator (Vatamaniuk et al., 2000). Auch *in vivo* ließ sich der GS-Konjugat Abbau durch AtPCS1 mit Cd²⁺, Cu²⁺ und Zn²⁺ induzieren (Abb. 43, S. 95). Dabei war im Vergleich zu den *in vitro* Versuchen eine geringere Konzentration an Cd²⁺ (10 μ M im Vergleich zu 30 μ M) für den maximalen Umsatz nötig (Beck et al., 2003). Durch die hier verwendeten Cu²⁺- und Zn²⁺-Konzentrationen ließ sich noch keine maximale Aktivierung der AtPCS1 erreichen (Abb. 43, S. 95), obwohl *in vitro* nur Konzentrationen von 40 μ M Cu²⁺ bzw. 100 μ M Zn²⁺ nötig waren. Vermutlich unterstützen die in der Hefe gebildeten Cd-Bisglutathion-Komplexe die Aktivierung von AtPCS1, wohingegen durch die endogenen Entgiftungsmechanismen für Cu²⁺- und Zn²⁺ die freien Metall-Ionen entweder an MTs gebunden oder direkt in die Vakuole sequestriert werden (Winge et al., 1985; Gaither und Eide, 2001). Somit waren höhere Konzentrationen für die Aktivierung von AtPCS1 notwendig. Über die Aktivierung von AtPCS2 liegen nur wenige Daten vor. Einzig Cd²⁺ und AsO₄³⁻ bewirken eine

nachweisbare Induktion der PC-Synthese durch AtPCS2 in *S. pombe* (Cazale und Clemens, 2001). Unter den hier getesteten Bedingungen war auch nach Cu^{2+} - und Zn^{2+} -Belastung die Biosynthese von PCs zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Eine Aussage über die Beteiligung von AtPCS2 am *in vivo* Abbau von GS-Konjugaten in Pflanzen, konnte aufgrund der geringen Expression des Gens jedoch noch nicht getroffen werden (Cazale und Clemens, 2001; Lee und Kang, 2005). Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen weisen auf eine geringe Affinität von AtPCS2 für die Hydrolyse von GS-Konjugaten hin (Abb. 44, S. 96). Gegenüber AtPCS1 konnte zwar eine vergleichbare γEC -Biman Bildung in Abwesenheit von Metall-Ionen beobachtet werden, allerdings war die Aktivität von AtPCS2 durch Inkubation mit Cd^{2+} , Cu^{2+} und Zn^{2+} maximal um einen Faktor 2 induzierbar. Insgesamt zeigte AtPCS2 nur 20% der Aktivität von AtPCS1. Gründe dafür sind vermutlich in unterschiedlichen Substratspezifitäten und divergenten Aktivierungsmechanismen zu suchen, die eventuell durch eine abweichende Tertiärstruktur der C-Termini hervorgerufen werden.

Aufgrund der vergleichbaren PC-Synthese von AtPCS1 und AtPCS2 nach Cadmium-Belastung kann AtPCS2 als die zweite funktionelle PCS in Arabidopsis charakterisiert werden. Zusätzlich zu der Biosynthese von PCs weist AtPCS1 auch eine katalytische Aktivität für die Abspaltung des C-terminalen Glycins von GS-Konjugaten auf. Diese Bifunktionalität konnte bei AtPCS2 nicht beobachtet werden. Möglicherweise erwies sich dieser Unterschied im pflanzlichen Metabolismus als vorteilhaft, wodurch AtPCS1 gegenüber AtPCS2 einem geringeren Selektionsdruck unterlag und somit im evolutionären Entwicklungsprozess bevorzugt wurde.

Beitrag von N- und C-Terminus zur funktionellen Divergenz.

Die Relevanz des C-terminalen Bereiches auf die Funktionalität der eukaryotischen PCS wird innerhalb der letzten Jahre stark diskutiert. Nicht zuletzt kann dafür die Identifizierung von prokaryotischen PCS-ähnlichen Genen verantwortlich gemacht werden. Die annotierten Gene von Cyanobakterien wie *Nostoc* sp. und Proteobakterien wie *Burkholderia mallei* oder *B. japonicum* sind nur etwa halb so groß wie die eukaryotischen Verwandten, da ihnen der C-terminale Bereich fehlt. Trotz der relativ geringen Sequenzübereinstimmung von 22-36% ist beispielsweise die für die enzymatische Aktivität notwendige katalytische Triade zwischen den Organismen konserviert (Abb. 47, S. 101). Untersuchungen des Proteins alr0975 aus *Nostoc* sp. PCC7120 (NsPCS) ergaben eine stark favorisierte Hydrolyse von GSH zu dem γEC -Dipeptid, während die Transpeptidierung zu PC_2 nur mit einer sehr geringen

Effizienz stattfand (Harada et al., 2004; Tsuji et al., 2005). Die mäßige Biosynthese von PC₂-Molekülen konnte auch nach Expression in *S. cerevisiae* reproduziert werden (Abb. 48, S. 102). Im Gegensatz zu den Befunden von Tsuji und Mitarbeitern waren die PCs allerdings nicht in Abwesenheit, sondern nur in Anwesenheit von Cd²⁺-Ionen nachweisbar (Tsuji et al., 2005). Vermutlich führte erst die Cadmium-abhängige Steigerung der GSH-Konzentration zur Initialisierung der PC-Biosynthese durch NsPCS. Interessanterweise ergaben die Analysen zum Abbau von GS-Konjugaten in *S. cerevisiae* eine sehr schnelle und effiziente Hydrolyse durch NsPCS, vor allem in Abwesenheit von Schwermetall-Ionen (Abb. 50, S. 104). Die Inkubation mit Schwermetallen resultierte hingegen in einer erhöhten Cd²⁺-Intoleranz und einer Verzögerung der Umwandlung von GS-Konjugaten zu den entsprechenden γEC-Derivaten (Abb. 51, S. 105). Leider zeigten die Analysen der PCS aus *B. japonicum* (BjPCS) weder eine Beteiligung des Proteins an der PC-Biosynthese noch am Abbau von GS-Konjugaten (Abb. 50, S. 104 und Abb. 51, S. 105). Dabei konnten Fehler in der Nukleotidsequenz des Gens ausgeschlossen werden. Allerdings erfolgte bislang auch keine hinreichende Expressionsanalyse des Gens, da der verwendete PCS-Antikörper keine Kreuzreaktionen zu den N-Termini der PCS-Proteine aufwies. Erst nach mRNA-Analysen oder der Fusion des Proteins mit einem Epitop-*tag* können endgültige Aussagen über die Funktionalität des Proteins getroffen werden. Die hohe Spezifität von NsPCS für die Hydrolyse von GSH oder GS-Konjugaten bekräftigt die Annahme, dass die prokaryotischen PCS eher eine Peptidase-ähnliche als eine Transpeptidase Aktivität aufweisen (Romanyuk et al., 2006). Zudem benötigen sie für ihre Enzymaktivität *in vivo* keine Induktion durch exogene Schwermetall-Ionen. Demnach werden vermutlich die Transpeptidierung und die Schwermetall-Abhängigkeit in den eukaryotischen PCS durch den C-Terminus hervorgerufen. Die ersten Analysen von C-terminal verkürzten AtPCS1-Varianten wurden von Ruotolo und Mitarbeitern durchgeführt, die nach proteolytischen Verdau ein Protein mit 372 bzw. 283 Aminosäuren erhielten. Der verkürzte C-Terminus führte zu einer thermischen Instabilität des Proteins und zu einer verringerten PC-Synthese nach Zn²⁺- und Hg²⁺-, aber nicht nach Cd²⁺- und Cu²⁺-Belastung (Ruotolo et al., 2004). Auch die funktionellen Analysen mit einem noch weiter verkürzten C-Terminus (221 Aminosäuren) durch eine andere Arbeitsgruppe bestätigten, dass der N-terminale Bereich von AtPCS1 für die Cd²⁺-abhängige PC-Synthese ausreicht (Romanyuk et al., 2006). Interessanterweise ließ sich auch in diesen Versuchen eine reduzierte PCS-Aktivität für AtPCS1 feststellen. Mit den Untersuchungen in dieser Arbeit sollte ein direkter Vergleich von NsPCS und BjPCS mit den eukaryotischen PCS ermöglicht werden. Mit Hilfe eines Sequenzvergleiches wurden die homologen Bereiche von

AtPCS1 und AtPCS2 gegenüber der Aminosäuresequenz von NsPCS und BjPCS ermittelt (Abb. 47, S. 101). Entsprechend der Übereinstimmungen konnte für AtPCS1 ein Bereich von 218 Aminosäuren und für AtPCS2 ein Bereich von 217 Aminosäuren bestimmt werden. Die Expression von AtPCS1 Δ C in der PC-defizienten Hefe resultierte in einer vergleichbaren PC-Synthese gegenüber dem vollständigen Protein (Abb. 45, S. 98 Vgl. Abb. 40, S. 91). Demnach konnte in unseren Händen keine Reduktion der PCS-Aktivität durch den Verlust des C-Terminus beobachtet werden. Allerdings zeigte die Analyse des GS-Konjugat Abbaus eine veränderte Induktion der Aktivität von AtPCS1 Δ C durch Cd²⁺- und Zn²⁺-Ionen (Abb. 46, S. 99). Während der Verlust der C-terminalen Region keinen Einfluss auf die Aktivierung des Enzyms durch Cu²⁺ nahm, war für die maximale Umsetzung des GS-Bimans eine höhere Konzentration an Cd²⁺ als bei dem Vollängen-Protein notwendig. Der deutlichste Effekt ließ sich bei den Zn²⁺-Ionen erkennen, da die Aktivität des Proteins bei der maximalen Zn²⁺-Konzentration um das Fünffache reduziert war. Die abweichenden Befunde hinsichtlich der PCS-Aktivität zwischen dieser Arbeit und den beiden anderen Arbeitsgruppen sind vermutlich durch die Verwendung von unterschiedlichen Expressionssystemen zu erklären. Da Ruotolo und Mitarbeiter bzw. Romanyuk und Mitarbeiter die verkürzten AtPCS1-Varianten in Cadmium-hypersensitiven Hefemutanten ($\Delta yap1$ bzw. $\Delta ycf1$) mit Hilfe eines *multicopy* Plasmids unter einem konstitutiven Promotor exprimierten (Ruotolo et al., 2004; Romanyuk et al., 2006), können negativ beeinflussende Sekundäreffekte nicht ausgeschlossen werden. Beispielsweise führte die Überexpression von AtPCS1:eGFP nach 24-stündiger Cadmium-Belastung zu einer Akkumulation des Fluoreszenzsignals in der Vakuole. Bei der induzierten Expression jedoch konnte dies zu keiner Zeit beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Vermutlich führt der hohe Proteingehalt zusammen mit der durch die Cadmium-Belastung ausgelösten Stressantwort zu einem Abbau des rekombinanten Proteins. Überraschenderweise ergab der Verlust der C-terminalen Region von AtPCS2 ein ganz anderes Ergebnis. Trotz der hohen Homologie von ca. 90% reichte der N-terminale Bereich von AtPCS2 anscheinend nicht für die Katalyse der PC-Synthese nach Schwermetall-Belastung aus (Abb. 45, S. 98). Die nachweisbaren PC-Konzentrationen waren mit denen von NsPCS vergleichbar (Abb. 57). Auch beim Abbau von GS-Konjugaten war nur noch eine marginale Umsetzung zu den γ EC-Konjugaten zu beobachten (Abb. 46, S. 99). Warum es zwischen AtPCS1 und AtPCS2 zu derart extremen Abweichungen durch den Verlust des C-Terminus kommt, ist unklar. Mit Hilfe von immunologischen Nachweisen müsste zuerst die Stabilität der beiden verkürzten Proteine überprüft werden, um einen vorzeitigen Abbau und somit eine verringerte Proteinkonzentration von AtPCS2 Δ C ausschließen zu können. Da für keines der beiden Proteine eine Kristallstruktur

vorliegt, kann nur durch Vergleiche mit der Tertiärstruktur von NsPCS eine Vorstellung über die räumliche Struktur der N-Termini gewonnen werden (Vivares et al., 2005). In den von SWISS MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php>; Basel) erstellten Modellen für AtPCS1 Δ C und AtPCS2 Δ C ließen sich jedenfalls keine Unterschiede erkennen. Bevor die Strukturen und mögliche Acylierungen von AtPCS1 und AtPCS2 nicht vollends aufgeklärt sind, können funktionelle Analysen nur Hinweise für abweichende Aktivierungs- und/oder Regulationsmechanismen liefern.

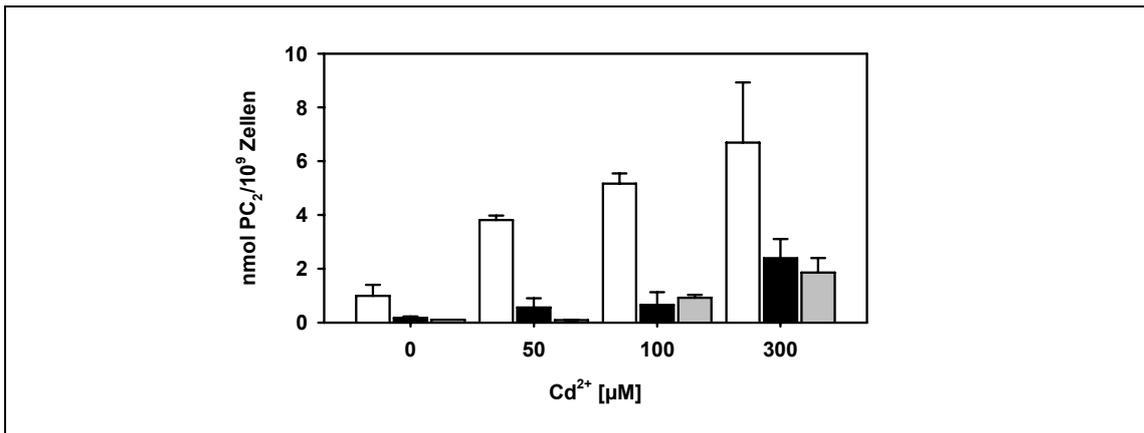


Abb. 57 Vergleich der PC₂-Synthese von AtPCS1 Δ C, AtPCS2 Δ C und NsPCS

Die Zellen der Doppelmutante $\Delta cpy\Delta cpc$ mit den Konstrukten pGAL1::AtPCS1 Δ C (weiß), pGAL1::AtPCS2 Δ C (schwarz) und pGAL1::NsPCS (hellgrau) wurden in sucrosehaltigen Medium angezogen und anschließend in galaktosehaltigem Medium mit einer OD₆₀₀=0,1 inokuliert. Nach drei Stunden Inkubation erfolgte die Zugabe der angegebenen Cd²⁺-Konzentrationen. Nach weiteren 12 Stunden wurden die Zellen geerntet und die Zellrohextrakte isoliert. Mit Hilfe der HPLC konnten die gebildeten PCs bestimmt werden. Bei AtPCS1 Δ C waren neben PC₂ auch desGly(PC₂), PC₃ und PC₄ nachweisbar.

Der entscheidende Unterschied zwischen den prokaryotischen (NsPCS) und eukaryotischen PCS liegt in ihrer Enzymatik. Während die eukaryotischen PCS eher den nukleophilen Angriff auf das γ EC-Intermediat durch ein zweites Thiol-Derivat katalysieren, favorisiert NsPCS die Übertragung auf Wasser. Die Ursache für diese Varianz muss innerhalb der ersten 218 Aminosäuren von AtPCS1 zu suchen sein. Folglich bieten sich weitere funktionelle und strukturelle Analysen von eukaryotischen PCS an, um die Substratbindung und Produktbildung genauer zu charakterisieren.

ZUSAMMENFASSUNG

Der steigende anthropogene Eintrag von organischen und anorganischen Substanzen wie beispielsweise Schwermetalle und Herbizide (Xenobiotika) in unsere Böden stellt zunehmend eine Gefährdung dar. Für die Abwehr derartiger Substanzen haben Pflanzen eine Vielzahl an komplexen Mechanismen entwickelt. Im Rahmen dieser Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Charakterisierung der pflanzlichen Entgiftungsprozesse von Schwermetallen und Xenobiotika durch Phytochelatine bzw. Glutathion-S-Konjugate in dem Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae*.

Anhand der funktionalen Analysen von Deletionsmutanten konnte die Biosynthese der zelleigenen Phytochelatine in *S. cerevisiae* erstmals mit der enzymatischen Aktivität von zwei vakuolären Serin-Carboxypeptidasen (CPY und CPC) in Verbindung gebracht werden, wobei die CPY den maßgeblichen Anteil hatte. Der Verlust beider Enzyme bewirkte eine vollständige Inhibierung der Phytochelatin-Synthese, hatte aber keinen Einfluss auf die Schwermetall-Toleranz der Zellen. Für die Glutathion-S-Konjugate belegten die Analysen einen alternativen Abbauweg gegenüber der bekannten N-terminalen Spaltung durch die γ -Glutamyltranspeptidase. Die Untersuchungen zeigten, dass beide vakuoläre Serin-Carboxypeptidasen für die C-terminale Spaltung des Glycins zuständig sind. Dabei übernahm im Gegensatz zu der Phytochelatin-Synthese die CPC die entscheidende Funktion. Die Deletion der beiden Carboxypeptidasen führte mit dem kombinierten Verlust der γ -Glutamyltranspeptidase zu einer kompletten Blockierung des Glutathion-S-Konjugat Abbaus in *S. cerevisiae*. Diese Arbeiten belegten erstmals, dass *S. cerevisiae* einen vergleichbaren Abbau von Glutathion-S-Konjugaten aufweist wie pflanzliche Organismen.

Nach dem Nachweis einer Analogie zwischen Carboxypeptidasen und Phytochelatin-Synthasen ermöglichten die konstruierten Deletionsstämme erstmals auch die funktionelle Charakterisierung von PCS1 und PCS2 aus *Arabidopsis thaliana* hinsichtlich der Komplexierung von Schwermetall-Ionen und der Entgiftung von Xenobiotika unter vergleichbaren Bedingungen. Die schwermetallabhängige Aktivierung beider Proteine bestätigte sich, wobei eine vergleichbare Phytochelatin-Synthese, aber nur bei AtPCS1 auch eine Hydrolyse von Glutathion-S-Konjugaten zu beobachten war. Der direkte Vergleich von C-terminal verkürzten AtPCS-Varianten mit zwei prokaryotischen PCS-ähnlichen Proteinen lieferte zusätzliche Informationen über die evolutionär-konservierte Funktion der Phytochelatin-Synthase.

Unter Verwendung des hier etablierten Modellsystems können heterologe Proteine des Glutathion-S-Konjugat Abbaus hinsichtlich ihrer zellulären Funktion überprüft werden. Die Expression von Proteinen wie beispielsweise der γ -Glutamyltranspeptidasen aus *A. thaliana* erlaubt damit eine sukzessive Rekonstruktion des pflanzlichen Glutathion-S-Konjugat Abbaus in Hefe. Dies ermöglicht es in Zukunft auch pflanzliche Regulationsmechanismen zu analysieren.

SUMMARY

The increase in soil pollution is caused by diffusive and direct contribution of anthropogenic activities and constitutes a menace to organisms. To deal with the rising soil contamination plants have developed a variety of defence mechanisms to resist for example heavy metal and herbicide (xenobiotica) exposure. The work presented here focused on the characterization of plant detoxification mechanisms of heavy metals and xenobiotica involving phytochelatin synthesis and degradation of glutathione-S-conjugates in the model organism *Saccharomyces cerevisiae*.

While *Saccharomyces cerevisiae* synthesizes phytochelatins upon exposure to heavy metal ions, the yeast genome does not encode a phytochelatin synthase homologue to plants and the enzymatic activities for the biosynthesis of phytochelatins in yeast were largely unknown. This study showed that the vacuolar serine carboxypeptidases CPY and CPC are responsible for phytochelatin synthesis in yeast. Additionally the data revealed a second role of CPY and CPC in the catabolism of glutathione-S-conjugates in yeast. Due to their lack of the unique γ -glutamyl transpeptidase and both carboxypeptidases CPY and CPC, yeast cells were not able to catabolize glutathione-S-conjugates. In contrast to the phytochelatin synthesis, the CPC was the major player for the degradation of the glutathione-S-conjugates. The results revealed that *Saccharomyces cerevisiae* has a glutathione-S-conjugate catabolism similar to the plant system.

The heterologous expression of the *PCS1* and *PCS2* gene of *Arabidopsis thaliana* in the generated yeast deletion mutants allowed a functional analysis of these proteins with respect to the phytochelatin synthesis and the glutathione-S-conjugate degradation under comparable conditions. The direct comparison of C-terminal truncated versions of AtPCS1 and AtPCS2 with two procaryotic PCS-like proteins provided additional information on the evolutionary conserved function of the phytochelatin synthase. The established model system provides the possibility for a reconstruction of the plant glutathione-S-conjugate catabolism in yeast.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adamis, P. D., Mannarino, S. C., Riger, C. J., Duarte, G., Cruz, A., Pereira, M. D. and Eleutherio, E. C.** (2008). Lap4, a vacuolar aminopeptidase I, is involved in cadmium-glutathione metabolism. *Biometals*.
- Adamis, P. D., Panek, A. D. and Eleutherio, E. C.** (2007). Vacuolar compartmentation of the cadmium-glutathione complex protects *Saccharomyces cerevisiae* from mutagenesis. *Toxicol Lett* **173** (1): 1-7.
- Ade, D. J., Sinani, D., Kim, H. and Lee, J.** (2007). A cadmium-transporting P1B-type ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **282** (2): 947-55.
- Ahner, B. A., Price, N. M. and Morel, F. M.** (1994). Phytochelatin production by marine phytoplankton at low free metal ion concentrations: laboratory studies and field data from Massachusetts Bay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (18): 8433-6.
- Al-Lahham, A., Rohde, V., Heim, P., Leuchter, R., Veeck, J., Wunderlich, C., Wolf, K. and Zimmermann, M.** (1999). Biosynthesis of phytochelatins in the fission yeast. Phytochelatin synthesis: a second role for the glutathione synthetase gene of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **15** (5): 385-96.
- Axelsen, K. B. and Palmgren, M. G.** (2001). Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in Arabidopsis. *Plant Physiol* **126** (2): 696-706.
- Azevedo, D., Nascimento, L., Labarre, J., Toledano, M. B. and Rodrigues-Pousada, C.** (2007). The *S. cerevisiae* Yap1 and Yap2 transcription factors share a common cadmium-sensing domain. *FEBS Lett* **581** (2): 187-95.
- Azevedo, D., Tacnet, F., Delaunay, A., Rodrigues-Pousada, C. and Toledano, M. B.** (2003). Two redox centers within Yap1 for H₂O₂ and thiol-reactive chemicals signaling. *Free Radic Biol Med* **35** (8): 889-900.
- Barbas, J., Santhanagopalan, V., Blaszczyński, M., Ellis, W. R., Jr. and Winge, D. R.** (1992). Conversion in the peptides coating cadmium:sulfide crystallites in *Candida glabrata*. *J Inorg Biochem* **48** (2): 95-105.
- Baudouin-Cornu, P. and Labarre, J.** (2006). Regulation of the cadmium stress response through SCF-like ubiquitin ligases: comparison between *Saccharomyces*

- cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and mammalian cells. *Biochimie* **88** (11): 1673-85.
- Beck, A., Lenzian, K., Oven, M., Christmann, A. and Grill, E.** (2003). Phytochelatin synthase catalyzes key step in turnover of glutathione conjugates. *Phytochemistry* **62** (3): 423-31.
- Bernard, C., Roosens, N., Czernic, P., Lebrun, M. and Verbruggen, N.** (2004). A novel CPx-ATPase from the cadmium hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *FEBS Lett* **569** (1-3): 140-8.
- Bernhard, W. R. and Kägi, J. H.** (1987). Purification and characterization of atypical cadmium-binding polypeptides from *Zea mays*. *Experientia Suppl* **52**: 309-15.
- Bertin, G. and Averbeck, D.** (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* **88** (11): 1549-59.
- Blum, R., Beck, A., Korte, A., Stengel, A., Letzel, T., Lenzian, K. and Grill, E.** (2007). Function of phytochelatin synthase in catabolism of glutathione-conjugates. *Plant J* **49** (4): 740-9.
- Bordallo, J., Bordallo, C., Gascon, S. and Suarez-Rendueles, P.** (1991). Molecular cloning and sequencing of genomic DNA encoding yeast vacuolar carboxypeptidase yscS. *FEBS Lett* **283** (1): 27-32.
- Brazier-Hicks, M., Evans, K. M., Cunningham, O. D., Hodgson, D. R., Steel, P. G. and Edwards, R.** (2008a). Catabolism of glutathione conjugates in *Arabidopsis thaliana*. Role in metabolic reactivation of the herbicide safener fenclorim. *J Biol Chem* **283** (30): 21102-12.
- Brazier-Hicks, M., Evans, K. M., Cunningham, O. D., Hodgson, D. R., Steel, P. G. and Edwards, R.** (2008b). Catabolism of glutathione conjugates in *Arabidopsis thaliana*; role in metabolic reactivation of the herbicide safener fenclorim. *J Biol Chem*.
- Brzywczy, J., Sienko, M., Kucharska, A. and Paszewski, A.** (2002). Sulphur amino acid synthesis in *Schizosaccharomyces pombe* represents a specific variant of sulphur metabolism in fungi. *Yeast* **19** (1): 29-35.

- Bun-ya, M., Shikata, K., Nakade, S., Yompakdee, C., Harashima, S. and Oshima, Y.** (1996). Two new genes, PHO86 and PHO87, involved in inorganic phosphate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **29** (4): 344-51.
- Butt, T. R. and Ecker, D. J.** (1987). Yeast metallothionein and applications in biotechnology. *Microbiol Rev* **51** (3): 351-64.
- Byrd, J., Berger, R. M., McMillin, D. R., Wright, C. F., Hamer, D. and Winge, D. R.** (1988). Characterization of the copper-thiolate cluster in yeast metallothionein and two truncated mutants. *J Biol Chem* **263** (14): 6688-94.
- Cazale, A. C. and Clemens, S.** (2001). *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase. *FEBS Lett* **507** (2): 215-9.
- Chen, J., Zhou, J. and Goldsbrough, P. B.** (1997). Characterization of phytochelatin synthase from tomato. *Physiologia Plantarum* **101** (1): 165-172.
- Choi, J. H., Lou, W. and Vancura, A.** (1998). A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273** (45): 29915-22.
- Clemens, S.** (2006). Evolution and function of phytochelatin synthases. *J Plant Physiol* **163** (3): 319-32.
- Clemens, S., Kim, E. J., Neumann, D. and Schroeder, J. I.** (1999). Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *Embo J* **18** (12): 3325-33.
- Clemens, S., Schroeder, J. I. and Degenkolb, T.** (2001). *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. *Eur J Biochem* **268** (13): 3640-3.
- Cobbett, C. and Goldsbrough, P.** (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 159-82.
- Coiner, H., Schroder, G., Wehinger, E., Liu, C. J., Noel, J. P., Schwab, W. and Schroder, J.** (2006). Methylation of sulfhydryl groups: a new function for a family of small molecule plant O-methyltransferases. *Plant J* **46** (2): 193-205.
- Coleman, J. O. D., Randall, R. and Blake-Kalff, M. M. A.** (1997). Detoxification of xenobiotics in plant cells by glutathione conjugation and vacuolar

compartmentalization: a fluorescent assay using monochlorobimane. *Plant, Cell & Environment* **20** (4): 449-460.

Collinson, E. J., Wheeler, G. L., Garrido, E. O., Avery, A. M., Avery, S. V. and Grant, C. M. (2002). The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J Biol Chem* **277** (19): 16712-7.

Cooper, A. and Bussey, H. (1989). Characterization of the yeast KEX1 gene product: a carboxypeptidase involved in processing secreted precursor proteins. *Mol Cell Biol* **9** (6): 2706-14.

Cooper, A. J. (1983). Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *Annu Rev Biochem* **52**: 187-222.

Cooper, A. J. and Pinto, J. T. (2006). Cysteine S-conjugate beta-lyases. *Amino Acids* **30** (1): 1-15.

Cowles, C. R., Snyder, W. B., Burd, C. G. and Emr, S. D. (1997). Novel Golgi to vacuole delivery pathway in yeast: identification of a sorting determinant and required transport component. *Embo J* **16** (10): 2769-82.

Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C. and Rofe, A. M. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci* **59** (4): 627-47.

Cueva, R., Garcia-Alvarez, N. and Suarez-Rendueles, P. (1989). Yeast vacuolar aminopeptidase ysc1. Isolation and regulation of the APE1 (LAP4) structural gene. *FEBS Lett* **259** (1): 125-9.

Culotta, V. C., Howard, W. R. and Liu, X. F. (1994). CRS5 encodes a metallothionein-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269** (41): 25295-302.

Cunningham, K. W. and Fink, G. R. (1994). Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking PMC1, a homolog of plasma membrane Ca²⁺ ATPases. *J Cell Biol* **124** (3): 351-63.

Dallas, S., Zhu, X., Baruchel, S., Schlichter, L. and Bendayan, R. (2003). Functional expression of the multidrug resistance protein 1 in microglia. *J Pharmacol Exp Ther* **307** (1): 282-90.

Dameron, C. T., Reese, R. N., Mehra, R. K., Kortan, A. R., Carroll, P. J., Steigerwald, M. L., Brus, L. E. and Winge, D. R. (1989a). Biosynthesis of

- cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites. *Nature* **338** (6216): 596-597.
- Dameron, C. T., Smith, B. R. and Winge, D. R.** (1989b). Glutathione-coated cadmium-sulfide crystallites in *Candida glabrata*. *J Biol Chem* **264** (29): 17355-60.
- Dameron, C. T. and Winge, D. R.** (1990). Peptide-mediated formation of quantum semiconductors. *Trends Biotechnol* **8** (1): 3-6.
- Domènech, J., Mir, G., Huguet, G., Capdevila, M., Molinas, M. and Atrian, S.** (2006). Plant metallothionein domains: functional insight into physiological metal binding and protein folding. *Biochimie* **88** (6): 583-93.
- Domènech, J., Orihuela, R., Mir, G., Molinas, M., Atrian, S. and Capdevila, M.** (2007). The Cd(II)-binding abilities of recombinant *Quercus suber* metallothionein: bridging the gap between phytochelatins and metallothioneins. *J Biol Inorg Chem* **12** (6): 867-82.
- Donaldson, J. G., Finazzi, D. and Klausner, R. D.** (1992). Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* **360** (6402): 350-2.
- Dormer, U. H., Westwater, J., McLaren, N. F., Kent, N. A., Mellor, J. and Jamieson, D. J.** (2000). Cadmium-inducible expression of the yeast GSH1 gene requires a functional sulfur-amino acid regulatory network. *J Biol Chem* **275** (42): 32611-6.
- Endrizzi, J. A., Breddam, K. and Remington, S. J.** (1994). 2.8-A structure of yeast serine carboxypeptidase. *Biochemistry* **33** (37): 11106-20.
- Eraso, P., Martinez-Burgos, M., Falcon-Perez, J. M., Portillo, F. and Mazon, M. J.** (2004). Ycf1-dependent cadmium detoxification by yeast requires phosphorylation of residues Ser908 and Thr911. *FEBS Lett* **577** (3): 322-6.
- Ernst, R., Klemm, R., Schmitt, L. and Kuchler, K.** (2005). Yeast ATP-binding cassette transporters: cellular cleaning pumps. *Methods Enzymol* **400**: 460-84.
- Fahey, R. C., Newton, G. L., Dorian, R. and Kosower, E. M.** (1980). Analysis of biological thiols: derivatization with monobromotrimethylammoniumbimane and characterization by electrophoresis and chromatography. *Anal Biochem* **107** (1): 1-10.

- Fauchon, M., Lagniel, G., Aude, J. C., Lombardia, L., Soularue, P., Petat, C., Marguerie, G., Sentenac, A., Werner, M. and Labarre, J.** (2002). Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. *Mol Cell* **9** (4): 713-23.
- Finney, L. A. and O'Halloran, T. V.** (2003). Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* **300** (5621): 931-6.
- Fogel, S. and Welch, J. W.** (1982). Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79** (17): 5342-6.
- Forbes, J. R. and Gros, P.** (2001). Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol* **9** (8): 397-403.
- Fricker, M. D., May, M., Meyer, A. J., Sheard, N. and White, N. S.** (2000). Measurement of glutathione levels in intact roots of Arabidopsis. *J Microsc* **198** (Pt 3): 162-73.
- Gaillard, S., Jacquet, H., Vavasseur, A., Leonhardt, N. and Forestier, C.** (2008). AtMRP6/AtABCC6, an ATP-binding cassette transporter gene expressed during early steps of seedling development and up-regulated by cadmium in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biol* **8**: 22.
- Gaither, L. A. and Eide, D. J.** (2001). Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals* **14** (3-4): 251-70.
- Ganguli, D., Kumar, C. and Bachhawat, A. K.** (2007). The alternative pathway of glutathione degradation is mediated by a novel protein complex involving three new genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **175** (3): 1137-51.
- Garcera, A., Barreto, L., Piedrafita, L., Tamarit, J. and Herrero, E.** (2006). *Saccharomyces cerevisiae* cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases. *Biochem J* **398** (2): 187-96.
- Garcia, O., Bouige, P., Forestier, C. and Dassa, E.** (2004). Inventory and comparative analysis of rice and Arabidopsis ATP-binding cassette (ABC) systems. *J Mol Biol* **343** (1): 249-65.
- Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E.-L. and Zenk, M.** (1988). Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Archives of Microbiology* **150** (2): 197-202.

- Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E.-L. and Zenk, M.** (1989). Survey of the plant kingdom for the ability to bind heavy metals through phytochelatins. *Zeitschrift für Naturforschung Sektion B* **44**: 361-369.
- Ghosh, M., Shen, J. and Rosen, B. P.** (1999). Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (9): 5001-6.
- Gietz, R. D. and Woods, R. A.** (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* **350**: 87-96.
- Gomes, D. S., Fragoso, L. C., Riger, C. J., Panek, A. D. and Eleutherio, E. C.** (2002). Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1573** (1): 21-5.
- Goodman, C. D., Casati, P. and Walbot, V.** (2004). A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. *Plant Cell* **16** (7): 1812-26.
- Grill, E., Gekeler, W., Winnacker, E.-L. and Zenk, M.** (1986). Homo-phytochelatins are heavy metalbinding peptides of homo-glutathione containing Fabales. *FEBS Letters* **205** (1): 47-50.
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E. L. and Zenk, M. H.** (1989). Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci U S A* **86** (18): 6838-6842.
- Grill, E., Winnacker, E. L. and Zenk, M. H.** (1985). Phytochelatins: The Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher Plants. *Science* **230** (4726): 674-676.
- Grill, E., Winnacker, E. L. and Zenk, M. H.** (1987). Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (2): 439-443.
- Grzam, A., Martin, M. N., Hell, R. and Meyer, A. J.** (2007). gamma-Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* **581** (17): 3131-8.

- Grzam, A., Tennstedt, P., Clemens, S., Hell, R. and Meyer, A. J.** (2006). Vacuolar sequestration of glutathione S-conjugates outcompetes a possible degradation of the glutathione moiety by phytochelatin synthase. *FEBS Lett* **580** (27): 6384-90.
- Gueldry, O., Lazard, M., Delort, F., Dauplais, M., Grigoras, I., Blanquet, S. and Plateau, P.** (2003). Ycf1p-dependent Hg(II) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **270** (11): 2486-96.
- Guerinot, M. L.** (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta* **1465** (1-2): 190-8.
- Güldener, U., Heinisch, J., Koehler, G. J., Voss, D. and Hegemann, J. H.** (2002). A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **30** (6): e23.
- Guo, W. J., Bundithya, W. and Goldsbrough, P. B.** (2003). Characterization of the Arabidopsis metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytologist* **159** (2): 369-381.
- Guo, W. J., Meetam, M. and Goldsbrough, P. B.** (2008). Examining the specific contributions of individual Arabidopsis metallothioneins to copper distribution and metal tolerance. *Plant Physiol* **146** (4): 1697-706.
- Ha, S. B., Smith, A. P., Howden, R., Dietrich, W. M., Bugg, S., O'Connell, M. J., Goldsbrough, P. B. and Cobbett, C. S.** (1999). Phytochelatin synthase genes from Arabidopsis and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* **11** (6): 1153-64.
- Habib, G. M., Barrios, R., Shi, Z. Z. and Lieberman, M. W.** (1996). Four distinct membrane-bound dipeptidase RNAs are differentially expressed and show discordant regulation with gamma-glutamyl transpeptidase. *J Biol Chem* **271** (27): 16273-80.
- Habib, G. M., Shi, Z. Z., Cuevas, A. A. and Lieberman, M. W.** (2003). Identification of two additional members of the membrane-bound dipeptidase family. *Faseb J* **17** (10): 1313-5.
- Hamer, D. H.** (1986). Metallothionein. *Annu Rev Biochem* **55**: 913-51.

- Hamer, D. H., Thiele, D. J. and Lemontt, J. E.** (1985). Function and autoregulation of yeast copperthionein. *Science* **228** (4700): 685-90.
- Harada, E., von Roepenack-Lahaye, E. and Clemens, S.** (2004). A cyanobacterial protein with similarity to phytochelatin synthases catalyzes the conversion of glutathione to gamma-glutamylcysteine and lacks phytochelatin synthase activity. *Phytochemistry* **65** (24): 3179-85.
- Hartmann, T. N., Fricker, M. D., Rennenberg, H. and Meyer, A. J.** (2003). Cell-specific measurement of cytosolic glutathione in poplar leaves. *Plant Cell Environ* **26** (6): 965-975.
- Haugen, A. C., Kelley, R., Collins, J. B., Tucker, C. J., Deng, C., Afshari, C. A., Brown, J. M., Ideker, T. and Van Houten, B.** (2004). Integrating phenotypic and expression profiles to map arsenic-response networks. *Genome Biol* **5** (12): R95.
- Hayashi, Y., Isobe, M., Mutoh, N., Nakagawa, C. W. and Kawabata, M.** (1991a). Cadystins: small metal-binding peptides. *Methods Enzymol* **205**: 348-58.
- Hayashi, Y., Morikawa, S., Kawabata, M. and Hotta, Y.** (1992). The synthesis of cadystins, heavy metal chelating peptides, is induced in the fission yeast by wounds of the cell wall or by incubation with chitosan. *Biochem Biophys Res Commun* **188** (1): 388-94.
- Hayashi, Y., Nakagawa, C. W., Mutoh, N., Isobe, M. and Goto, T.** (1991b). Two pathways in the biosynthesis of cadystins (gamma EC)_nG in the cell-free system of the fission yeast. *Biochem Cell Biol* **69** (2-3): 115-21.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U. and Jowsey, I. R.** (2005). Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 51-88.
- Hayes, J. D. and Pulford, D. J.** (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **30** (6): 445-600.
- Hell, R., Jost, R., Berkowitz, O. and Wirtz, M.** (2002). Molecular and biochemical analysis of the enzymes of cysteine biosynthesis in the plant *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids* **22** (3): 245-57.

- Helms, J. B. and Rothman, J. E.** (1992). Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* **360** (6402): 352-4.
- Henriksson, E., Olsson, A. S., Johannesson, H., Johansson, H., Hanson, J., Engstrom, P. and Soderman, E.** (2005). Homeodomain leucine zipper class I genes in Arabidopsis. Expression patterns and phylogenetic relationships. *Plant Physiol* **139** (1): 509-18.
- Himmelbach, A., Hoffmann, T., Leube, M., Hohener, B. and Grill, E.** (2002). Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis. *Embo J* **21** (12): 3029-38.
- Hinchman, C. A. and Ballatori, N.** (1990). Glutathione-degrading capacities of liver and kidney in different species. *Biochem Pharmacol* **40** (5): 1131-5.
- Hirata, K., Tsuji, N. and Miyamoto, K.** (2005). Biosynthetic regulation of phytochelatin, heavy metal-binding peptides. *J Biosci Bioeng* **100** (6): 593-9.
- Höfgen, R., Kreft, O., Willmitzer, L. and Hesse, H.** (2001). Manipulation of thiol contents in plants. *Amino Acids* **20** (3): 291-9.
- Hong, E., Davidson, A. R. and Kaiser, C. A.** (1996). A pathway for targeting soluble misfolded proteins to the yeast vacuole. *J Cell Biol* **135** (3): 623-33.
- Howden, R., Andersen, C. R., Goldsbrough, P. B. and Cobbett, C. S.** (1995a). A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **107** (4): 1067-73.
- Howden, R., Goldsbrough, P. B., Andersen, C. R. and Cobbett, C. S.** (1995b). Cadmium-sensitive, cad1 mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol* **107** (4): 1059-66.
- Howlett, N. G. and Avery, S. V.** (1997). Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Appl Environ Microbiol* **63** (8): 2971-6.
- Hsieh, H. M., Liu, W. K., Chang, A. and Huang, P. C.** (1996). RNA expression patterns of a type 2 metallothionein-like gene from rice. *Plant Mol Biol* **32** (3): 525-9.

- Hsieh, H. M., Liu, W. K. and Huang, P. C.** (1995). A novel stress-inducible metallothionein-like gene from rice. *Plant Mol Biol* **28** (3): 381-9.
- Hughey, R. P., Rankin, B. B., Elce, J. S. and Curthoys, N. P.** (1978). Specificity of a particulate rat renal peptidase and its localization along with other enzymes of mercapturic acid synthesis. *Arch Biochem Biophys* **186** (2): 211-7.
- Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S. and O'Shea, E. K.** (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425** (6959): 686-91.
- Imai, K., Obata, H., Shimizu, K. and Komiya, T.** (1996). Conversion of glutathione into cadystins and their analogs catalyzed by carboxypeptidase Y. *Biosci Biotechnol Biochem* **60** (7): 1193-4.
- Inoue, M., Okajima, K. and Morino, Y.** (1981). Renal transtubular transport of mercapturic acid in vivo. *Biochim Biophys Acta* **641** (1): 122-8.
- Inoue, M., Okajima, K. and Morino, Y.** (1982). Metabolic coordination of liver and kidney in mercapturic acid biosynthesis in vivo. *Hepatology* **2** (3): 311-6.
- Inouhe, M., Ito, R., Ito, S., Sasada, N., Tohoyama, H. and Joho, M.** (2000). Azuki bean cells are hypersensitive to cadmium and do not synthesize phytochelatins. *Plant Physiol* **123** (3): 1029-36.
- Inouhe, M., Sumiyoshi, M., Tohoyama, H. and Joho, M.** (1996). Resistance to cadmium ions and formation of a cadmium-binding complex in various wild-type yeasts. *Plant Cell Physiol* **37** (3): 341-6.
- Ishikawa, T.** (1992). The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci* **17** (11): 463-8.
- Ishikawa, T., Li, Z. S., Lu, Y. P. and Rea, P. A.** (1997). The GS-X pump in plant, yeast, and animal cells: structure, function, and gene expression. *Biosci Rep* **17** (2): 189-207.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M. and Sakaki, Y.** (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (8): 4569-74.

- Janke, C., Magiera, M. M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E. and Knop, M.** (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21** (11): 947-62.
- Jaspers, C. J., Gigot, D. and Penninckx, M. J.** (1985). Pathways of glutathione degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry* **24** (4): 703-707.
- Jaspers, C. J. and Penninckx, M. J.** (1984). Glutathione metabolism in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence that gamma-glutamyltranspeptidase is a vacuolar enzyme. *Biochimie* **66** (1): 71-4.
- Jensen, L. T., Howard, W. R., Strain, J. J., Winge, D. R. and Culotta, V. C.** (1996). Enhanced effectiveness of copper ion buffering by CUP1 metallothionein compared with CRS5 metallothionein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271** (31): 18514-9.
- Jha, S., Karnani, N., Dhar, S. K., Mukhopadhyay, K., Shukla, S., Saini, P., Mukhopadhyay, G. and Prasad, R.** (2003). Purification and characterization of the N-terminal nucleotide binding domain of an ABC drug transporter of *Candida albicans*: uncommon cysteine 193 of Walker A is critical for ATP hydrolysis. *Biochemistry* **42** (36): 10822-32.
- Johnston, M.** (1987). A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **51** (4): 458-76.
- Jorgensen, M. U., Emr, S. D. and Winther, J. R.** (1999). Ligand recognition and domain structure of Vps10p, a vacuolar protein sorting receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **260** (2): 461-9.
- Jösch, C., Sies, H. and Akerboom, T. P.** (1998). Hepatic mercapturic acid formation: involvement of cytosolic cysteinylglycine S-conjugate dipeptidase activity. *Biochem Pharmacol* **56** (6): 763-71.
- Ju, R., Mao, Y., Glick, M. J., Muller, M. T. and Snyder, R. D.** (2001). Catalytic inhibition of DNA topoisomerase IIalpha by sodium azide. *Toxicol Lett* **121** (2): 119-26.

- Jung, G., Ueno, H. and Hayashi, R.** (1999). Carboxypeptidase Y: structural basis for protein sorting and catalytic triad. *J Biochem (Tokyo)* **126** (1): 1-6.
- Kägi, J., Coombs, T. L., Overnell, J. and Webb, M.** (1981). Synthesis and function of metallothioneins. *Nature* **292** (5823): 495-6.
- Kägi, J. H.** (1991). Overview of metallothionein. *Methods Enzymol* **205**: 613-26.
- Kiddle, G. A., Bennett, R. N., Hick, A. J. and Wallsgrave, R. M.** (1999). C-S lyase activities in leaves of crucifers and non-crucifers, and the characterization of three classes of C-S lyase activities from oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant, Cell & Environment* **22** (5): 433-445.
- Kitamoto, K., Yoshizawa, K., Ohsumi, Y. and Anraku, Y.** (1988). Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **170** (6): 2683-6.
- Klapheck, S., Fliegner, W. and Zimmer, I.** (1994). Hydroxymethyl-phytochelatin [(gamma-glutamylcysteine)_n-serine] are metal-induced peptides of the Poaceae. *Plant Physiol* **104** (4): 1325-32.
- Klapheck, S., Schlunz, S. and Bergmann, L.** (1995). Synthesis of Phytochelatin and Homo-Phytochelatin in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol* **107** (2): 515-521.
- Klausner, R. D., Donaldson, J. G. and Lippincott-Schwartz, J.** (1992). Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* **116** (5): 1071-80.
- Klein, M., Mamnun, Y. M., Eggmann, T., Schuller, C., Wolfger, H., Martinoia, E. and Kuchler, K.** (2002). The ATP-binding cassette (ABC) transporter Bpt1p mediates vacuolar sequestration of glutathione conjugates in yeast. *FEBS Lett* **520** (1-3): 63-7.
- Kliwer, S. A., Goodwin, B. and Willson, T. M.** (2002). The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev* **23** (5): 687-702.
- Kneer, R., Kutchan, T. M., Hochberger, A. and Zenk, M. H.** (1992). *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin. *Arch Microbiol* **157** (4): 305-10.

- Kneer, R. and Zenk, M. H.** (1992). Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochemistry* **31** (8): 2663-2667.
- Kondo, N., Imai, K., Isobe, M., Goto, T., Murasugi, A., Wada-Nakagawa, C. and 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** (35): 3869-3872.
- Korenkov, V., Hirschi, K., Crutchfield, J. D. and Wagner, G. J.** (2007a). Enhancing tonoplast Cd/H antiport activity increases Cd, Zn, and Mn tolerance, and impacts root/shoot Cd partitioning in *Nicotiana tabacum* L. *Planta* **226** (6): 1379-87.
- Korenkov, V., Park, S., Cheng, N., Sreevidya, C., Lachmansingh, J., Morris, J., Hirschi, K. and Wagner, G.** (2007b). Enhanced Cd-selective root-tonoplast-transport in tobaccos expressing Arabidopsis cation exchangers. *Planta* **225**: 403–411.
- Kozak, E. M. and Tate, S. S.** (1982). Glutathione-degrading enzymes of microvillus membranes. *J Biol Chem* **257** (11): 6322-7.
- Krogan, N. J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A. P., Punna, T., Peregrin-Alvarez, J. M., Shales, M., Zhang, X., Davey, M., Robinson, M. D., Paccanaro, A., Bray, J. E., Sheung, A., Beattie, B., Richards, D. P., Canadien, V., Lalev, A., Mena, F., Wong, P., Starostine, A., Canete, M. M., Vlasblom, J., Wu, S., Orsi, C., Collins, S. R., Chandran, S., Haw, R., Rilstone, J. J., Gandi, K., Thompson, N. J., Musso, G., St Onge, P., Ghanny, S., Lam, M. H., Butland, G., Altaf-Ul, A. M., Kanaya, S., Shilatifard, A., O'Shea, E., Weissman, J. S., Ingles, C. J., Hughes, T. R., Parkinson, J., Gerstein, M., Wodak, S. J., Emili, A. and Greenblatt, J. F.** (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440** (7084): 637-43.
- Kubota, H., Sato, K., Yamada, T. and Maitani, T.** (2000). Phytochelatin homologs induced in hairy roots of horseradish. *Phytochemistry* **53** (2): 239-45.
- Kumar, C., Sharma, R. and Bachhawat, A. K.** (2003). Utilization of glutathione as an exogenous sulfur source is independent of gamma-glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for an alternative glutathione degradation pathway. *FEMS Microbiol Lett* **219** (2): 187-94.

- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259): 680-5.
- Lafaye, A., Junot, C., Pereira, Y., Lagniel, G., Tabet, J. C., Ezan, E. and Labarre, J.** (2005a). Combined proteome and metabolite-profiling analyses reveal surprising insights into yeast sulfur metabolism. *J Biol Chem* **280** (26): 24723-30.
- Lafaye, A., Labarre, J., Tabet, J. C., Ezan, E. and Junot, C.** (2005b). Liquid chromatography-mass spectrometry and ¹⁵N metabolic labeling for quantitative metabolic profiling. *Anal Chem* **77** (7): 2026-33.
- Lamoureaux, G. L. and Rusness, D. G.** (1987). EPTC Metabolism in Corn, Cotton, and Soybean: Identification of a Novel Metabolite Derived from the Metabolism of a Glutathione Conjugate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **35** (1).
- Lamoureaux, G. L. and Rusness, D. G.** (1993). Glutathione in the metabolism and detoxification of xenobiotics in plants. *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants*. de Kok, L. J., Stulen, I., Rennenberg, H., Brunhold, C. and Rauser, W. E. The Hague, SPB Academic Publishing: 221–237.
- Lapinskas, P. J., Lin, S. J. and Culotta, V. C.** (1996). The role of the *Saccharomyces cerevisiae* CCC1 gene in the homeostasis of manganese ions. *Mol Microbiol* **21** (3): 519-28.
- Lee, S. and Kang, B. S.** (2005). Expression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase 2 is too low to complement an AtPCS1-defective Cad1-3 mutant. *Mol Cells* **19** (1): 81-7.
- Lee, S. and Korban, S. S.** (2002). Transcriptional regulation of *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase (AtPCS1) by cadmium during early stages of plant development. *Planta* **215** (4): 689-93.
- Li, L. and Kaplan, J.** (1998). Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity. *J Biol Chem* **273** (35): 22181-7.
- Li, Z. S., Lu, Y. P., Zhen, R. G., Szczypka, M., Thiele, D. J. and Rea, P. A.** (1997). A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*:

YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. Proc Natl Acad Sci U S A **94** (1): 42-7.

Li, Z.-S., Szczypka, M., Lu, Y.-P., Thiele, D. J. and Rea, P. A. (1996). The Yeast Cadmium Factor Protein (YCF1) Is a Vacuolar Glutathione S-Conjugate Pump. J. Biol. Chem. **271** (11): 6509-6517.

Lieberman, M. W., Barrios, R., Carter, B. Z., Habib, G. M., Lebovitz, R. M., Rajagopalan, S., Sepulveda, A. R., Shi, Z. Z. and Wan, D. F. (1995). gamma-Glutamyl transpeptidase. What does the organization and expression of a multipromoter gene tell us about its functions? Am J Pathol **147** (5): 1175-85.

Lieberman, M. W., Wiseman, A. L., Shi, Z. Z., Carter, B. Z., Barrios, R., Ou, C. N., Chevez-Barrios, P., Wang, Y., Habib, G. M., Goodman, J. C., Huang, S. L., Lebovitz, R. M. and Matzuk, M. M. (1996). Growth retardation and cysteine deficiency in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A **93** (15): 7923-6.

Liu, X. F., Supek, F., Nelson, N. and Culotta, V. C. (1997). Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 gene. J Biol Chem **272** (18): 11763-9.

Lock, E. A., Odum, J. and Ormond, P. (1986). Transport of N-acetyl-S-pentachloro-1,3-butadienylcysteine by rat renal cortex. Arch Toxicol **59** (1): 12-5.

Loscos, J., Naya, L., Ramos, J., Clemente, M. R., Matamoros, M. A. and Becana, M. (2006). A reassessment of substrate specificity and activation of phytochelatin synthases from model plants by physiologically relevant metals. Plant Physiol **140** (4): 1213-21.

Lu, Y. P., Li, Z. S., Drozdowicz, Y. M., Hortensteiner, S., Martinoia, E. and Rea, P. A. (1998). AtMRP2, an Arabidopsis ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with Atmrp1. Plant Cell **10** (2): 267-82.

Lu, Y. P., Li, Z. S. and Rea, P. A. (1997). AtMRP1 gene of Arabidopsis encodes a glutathione S-conjugate pump: isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. Proc Natl Acad Sci U S A **94** (15): 8243-8.

- MacDiarmid, C. W., Gaither, L. A. and Eide, D.** (2000). Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **19** (12): 2845-55.
- Maitani, T., Kubota, H., Sato, K. and Yamada, T.** (1996). The Composition of Metals Bound to Class III Metallothionein (Phytochelatin and Its Desglycyl Peptide) Induced by Various Metals in Root Cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol* **110** (4): 1145-1150.
- Margoshes, M. and Vallee, B. L.** (1957). A Cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* **79** (17): 4813-4814.
- Marrs, K. A.** (1996). The Functions and Regulation of Glutathione S-Transferases in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 127-158.
- Marrs, K. A., Alfenito, M. R., Lloyd, A. M. and Walbot, V.** (1995). A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature* **375** (6530): 397-400.
- Martin, M. N., Saladores, P. H., Lambert, E., Hudson, A. O. and Leustek, T.** (2007). Localization of members of the gamma-glutamyl transpeptidase family identifies sites of glutathione and glutathione S-conjugate hydrolysis. *Plant Physiol* **144** (4): 1715-32.
- Martinoia, E., Grill, E., Tommasini, R., Kreuz, K. and Amrhein, N.** (1993). ATP-dependent glutathione S-conjugate 'export' pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* **364** (6434): 247-249.
- Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, U., Muller-Rober, B. and Schulz, B.** (2002). Multifunctionality of plant ABC transporters--more than just detoxifiers. *Planta* **214** (3): 345-55.
- Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J. I., Ward, J. M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I. N., Amtmann, A., Maathuis, F. J., Sanders, D., Harper, J. F., Tchieu, J., Gribskov, M., Persans, M. W., Salt, D. E., Kim, S. A. and Guerinot, M. L.** (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **126** (4): 1646-67.
- Mehdi, K., Thierie, J. and Penninckx, M. J.** (2001). gamma-Glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its role in the vacuolar transport and metabolism of glutathione. *Biochem J* **359** (Pt 3): 631-7.

- Mehra, R. K., Mulchandani, P. and Hunter, T. C.** (1994). Role of CdS quantum crystallites in cadmium resistance in *Candida glabrata*. *Biochem Biophys Res Commun* **200** (3): 1193-200.
- Mehra, R. K., Tarbet, E. B., Gray, W. R. and Winge, D. R.** (1988). Metal-specific synthesis of two metallothioneins and gamma-glutamyl peptides in *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85** (23): 8815-9.
- Meister, A.** (1974). The gamma-glutamyl cycle. Diseases associated with specific enzyme deficiencies. *Ann Intern Med* **81** (2): 247-53.
- Meister, A.** (1988). On the discovery of glutathione. *Trends Biochem Sci* **13** (5): 185-8.
- Meister, A. and Anderson, M. E.** (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem* **52**: 711-60.
- Mendoza-Cozatl, D., Loza-Tavera, H., Hernandez-Navarro, A. and Moreno-Sanchez, R.** (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol Rev* **29** (4): 653-71.
- Messenguy, F., Colin, D. and ten Have, J. P.** (1980). Regulation of compartmentation of amino acid pools in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on metabolic control. *Eur J Biochem* **108** (2): 439-47.
- Meuwly, P., Thibault, P. and Rauser, W. E.** (1993). gamma-Glutamylcysteinylglutamic acid--a new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium. *FEBS Lett* **336** (3): 472-6.
- Meyer, A. J. and Fricker, M. D.** (2002). Control of demand-driven biosynthesis of glutathione in green *Arabidopsis* suspension culture cells. *Plant Physiol* **130** (4): 1927-37.
- Meyer, A. J., May, M. J. and Fricker, M.** (2001). Quantitative in vivo measurement of glutathione in *Arabidopsis* cells. *Plant J* **27** (1): 67-78.
- Miller, A., Wang, L. and Kendall, D. A.** (2002). SecB modulates the nucleotide-bound state of SecA and stimulates ATPase activity. *Biochemistry* **41** (16): 5325-32.
- Mills, R. F., Krijger, G. C., Baccarini, P. J., Hall, J. L. and Williams, L. E.** (2003). Functional expression of AthMA4, a P1B-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass. *Plant J* **35** (2): 164-76.

- Miseta, A., Kellermayer, R., Aiello, D. P., Fu, L. and Bedwell, D. M.** (1999). The vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchanger Vcx1p/Hum1p tightly controls cytosolic Ca²⁺ levels in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett* **451** (2): 132-6.
- Momose, Y. and Iwahashi, H.** (2001). Bioassay of cadmium using a DNA microarray: genome-wide expression patterns of *Saccharomyces cerevisiae* response to cadmium. *Environ Toxicol Chem* **20** (10): 2353-60.
- Mumberg, D., Muller, R. and Funk, M.** (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156** (1): 119-22.
- Murasugi, A., Wada, C. and Hayashi, Y.** (1981). Cadmium-binding peptide induced in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biochem* **90** (5): 1561-4.
- Nasr, F., Becam, A. M., Grzybowska, E., Zagulski, M., Slonimski, P. P. and Herbert, C. J.** (1994). An analysis of the sequence of part of the right arm of chromosome II of *S. cerevisiae* reveals new genes encoding an amino-acid permease and a carboxypeptidase. *Curr Genet* **26** (1): 1-7.
- Ohkama-Ohtsu, N., Oikawa, A., Zhao, P., Xiang, C., Saito, K. and Oliver, D. J.** (2008). A {gamma}-Glutamyl Transpeptidase-Independent Pathway of Glutathione Catabolism to Glutamate via 5-Oxoproline in Arabidopsis. *Plant Physiol.*
- Ohkama-Ohtsu, N., Radwan, S., Peterson, A., Zhao, P., Badr, A. F., Xiang, C. and Oliver, D. J.** (2007a). Characterization of the extracellular gamma-glutamyl transpeptidases, GGT1 and GGT2, in Arabidopsis. *Plant J* **49** (5): 865-77.
- Ohkama-Ohtsu, N., Zhao, P., Xiang, C. and Oliver, D. J.** (2007b). Glutathione conjugates in the vacuole are degraded by gamma-glutamyl transpeptidase GGT3 in Arabidopsis. *Plant J* **49** (5): 878-88.
- Oliver, D. B., Cabelli, R. J., Dolan, K. M. and Jarosik, G. P.** (1990). Azide-resistant mutants of *Escherichia coli* alter the SecA protein, an azide-sensitive component of the protein export machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87** (21): 8227-31.
- Onisko, B. C., Barnes, J. P., Staub, R. E., Walker, F. H. and Kerlinger, N.** (1994). Metabolism of cycloate in radish leaf: metabolite identification by packed capillary flow fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom* **23** (10): 626-36.

- Ortiz, D. F., Kreppel, L., Speiser, D. M., Scheel, G., McDonald, G. and Ow, D. W.** (1992). Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *Embo J* **11** (10): 3491-9.
- Ortiz, D. F., Ruscitti, T., McCue, K. F. and Ow, D. W.** (1995). Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J Biol Chem* **270** (9): 4721-8.
- Ortiz, D. F., St Pierre, M. V., Abdulmessih, A. and Arias, I. M.** (1997). A yeast ATP-binding cassette-type protein mediating ATP-dependent bile acid transport. *J Biol Chem* **272** (24): 15358-65.
- Oven, M., Page, J. E., Zenk, M. H. and Kutchan, T. M.** (2002). Molecular characterization of the homo-phytochelatin synthase of soybean *Glycine max*: relation to phytochelatin synthase. *J Biol Chem* **277** (7): 4747-54.
- Oven, M., Raith, K., Neubert, R. H., Kutchan, T. M. and Zenk, M. H.** (2001). Homo-phytochelatin synthase is induced in response to cadmium in azuki beans. *Plant Physiol* **126** (3): 1275-80.
- Pagani, A., Villarreal, L., Capdevila, M. and Atrian, S.** (2007). The *Saccharomyces cerevisiae* Crs5 Metallothionein metal-binding abilities and its role in the response to zinc overload. *Mol Microbiol* **63** (1): 256-69.
- Palm, G. J., Zdanov, A., Gaitanaris, G. A., Stauber, R., Pavlakis, G. N. and Wlodawer, A.** (1997). The structural basis for spectral variations in green fluorescent protein. *Nat Struct Biol* **4** (5): 361-5.
- Palmer, G.** (1993). Current issues in the chemistry of cytochrome c oxidase. *J Bioenerg Biomembr* **25** (2): 145-51.
- Palmiter, R. D.** (1998). The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (15): 8428-30.
- Panwar, S. L., Pasrija, R. and Prasad, R.** (2008). Membrane homeostasis and multidrug resistance in yeast. *Biosci Rep* **28** (4): 217-28.
- Paumi, C. M., Chuk, M., Chevelev, I., Stagljar, I. and Michaelis, S.** (2008). Negative Regulation of the Yeast ABC Transporter Ycf1p by Phosphorylation within Its N-terminal Extension. *J Biol Chem* **283** (40): 27079-88.

- Payne, G. M. and Payne, J. W.** (1984). gamma-Glutamyltransferase is not involved in the bulk uptake of amino acids, peptides or gamma-glutamyl-amino acids in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Biochem J* **218** (1): 147-55.
- Petrovic, S., Pascolo, L., Gallo, R., Cupelli, F., Ostrow, J. D., Goffeau, A., Tiribelli, C. and Bruschi, C. V.** (2000). The products of YCF1 and YLL015w (BPT1) cooperate for the ATP-dependent vacuolar transport of unconjugated bilirubin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16** (6): 561-71.
- Pohl, A., Devaux, P. F. and Herrmann, A.** (2005). Function of prokaryotic and eukaryotic ABC proteins in lipid transport. *Biochim Biophys Acta* **1733** (1): 29-52.
- Ramos, J., Naya, L., Gay, M., Abian, J. and Becana, M.** (2008). Functional Characterization of an Unusual Phytochelatin Synthase, LjPCS3, of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **148** (1): 536-45.
- Rausser, W. E.** (1999). Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys* **31** (1): 19-48.
- Rea, P. A.** (2006). Phytochelatin synthase, papain's cousin, in stereo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (3): 507-8.
- Rea, P. A., Vatamaniuk, O. K. and Rigden, D. J.** (2004). Weeds, worms, and more. Papain's long-lost cousin, phytochelatin synthase. *Plant Physiol* **136** (1): 2463-74.
- Reese, R. N., White, C. A. and Winge, D. R.** (1992). Cadmium-Sulfide Crystallites in Cd-(gammaEC)(n)G Peptide Complexes from Tomato. *Plant Physiol* **98** (1): 225-229.
- Reese, R. N. and Winge, D. R.** (1988). Sulfide stabilization of the cadmium-gamma-glutamyl peptide complex of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **263** (26): 12832-5.
- Remington, S. J. and Breddam, K.** (1994). Carboxypeptidases C and D. *Methods Enzymol* **244**: 231-48.
- Rice, G. C., Bump, E. A., Shrieve, D. C., Lee, W. and Kovacs, M.** (1986). Quantitative analysis of cellular glutathione by flow cytometry utilizing

monochlorobimane: some applications to radiation and drug resistance in vitro and in vivo. *Cancer Res* **46** (12 Pt 1): 6105-10.

Roberts, C. J., Pohlig, G., Rothman, J. H. and Stevens, T. H. (1989). Structure, biosynthesis, and localization of dipeptidyl aminopeptidase B, an integral membrane glycoprotein of the yeast vacuole. *J Cell Biol* **108** (4): 1363-73.

Romanyuk, N. D., Rigden, D. J., Vatamaniuk, O. K., Lang, A., Cahoon, R. E., Jez, J. M. and Rea, P. A. (2006). Mutagenic definition of a papain-like catalytic triad, sufficiency of the N-terminal domain for single-site core catalytic enzyme acylation, and C-terminal domain for augmentative metal activation of a eukaryotic phytochelatin synthase. *Plant Physiol* **141** (3): 858-69.

Rossini, L., Jepson, I., Greenland, A. J. and Gorla, M. S. (1996). Characterization of Glutathione S-Transferase Isoforms in Three Maize Inbred Lines Exhibiting Differential Sensitivity to Alachlor. *Plant Physiol* **112** (4): 1595-1600.

Ruotolo, R., Peracchi, A., Bolchi, A., Infusini, G., Amoresano, A. and Ottonello, S. (2004). Domain organization of phytochelatin synthase: functional properties of truncated enzyme species identified by limited proteolysis. *J Biol Chem* **279** (15): 14686-93.

Saito, K. (2000). Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids. *Curr Opin Plant Biol* **3** (3): 188-95.

Salt, D. E. and Rauser, W. E. (1995). MgATP-Dependent Transport of Phytochelatins Across the Tonoplast of Oat Roots. *Plant Physiol* **107** (4): 1293-1301.

Sandermann, H., Jr. (1992). Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem Sci* **17** (2): 82-4.

Sandermann, H., Jr. (1994). Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept. *Pharmacogenetics* **4** (5): 225-41.

Sappl, P. G., Onate-Sanchez, L., Singh, K. B. and Millar, A. H. (2004). Proteomic analysis of glutathione S-transferases of *Arabidopsis thaliana* reveals differential salicylic acid-induced expression of the plant-specific phi and tau classes. *Plant Mol Biol* **54** (2): 205-19.

- Schmöger, M. E., Oven, M. and Grill, E.** (2000). Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiol* **122** (3): 793-801.
- Schröder, P., Scheer, C. E., Diekmann, F. and Stampfl, A.** (2007). How plants cope with foreign compounds. Translocation of xenobiotic glutathione conjugates in roots of barley (*Hordeum vulgare*). *Environ Sci Pollut Res Int* **14** (2): 114-22.
- Schützendübel, A. and Polle, A.** (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* **53** (372): 1351-65.
- Sharma, K. G., Kaur, R. and Bachhawat, A. K.** (2003). The glutathione-mediated detoxification pathway in yeast: an analysis using the red pigment that accumulates in certain adenine biosynthetic mutants of yeasts reveals the involvement of novel genes. *Arch Microbiol* **180** (2): 108-17.
- Sharma, K. G., Mason, D. L., Liu, G., Rea, P. A., Bachhawat, A. K. and Michaelis, S.** (2002). Localization, regulation, and substrate transport properties of Bpt1p, a *Saccharomyces cerevisiae* MRP-type ABC transporter. *Eukaryot Cell* **1** (3): 391-400.
- Silver, S.** (1996). Bacterial resistances to toxic metal ions--a review. *Gene* **179** (1): 9-19.
- Simons, K. and Ikonen, E.** (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387** (6633): 569-72.
- Simons, K. and Vaz, W. L.** (2004). Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33**: 269-95.
- Smith, A. P., Nourizadeh, S. D., Peer, W. A., Xu, J., Bandyopadhyay, A., Murphy, A. S. and Goldsbrough, P. B.** (2003). Arabidopsis AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. *Plant J* **36** (4): 433-42.
- Soda, K.** (1987). Microbial sulfur amino acids: an overview. *Methods Enzymol* **143**: 453-9.
- Solioz, M. and Vulpe, C.** (1996). CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends Biochem Sci* **21** (7): 237-41.

- Soranzo, N., Sari Gorla, M., Mizzi, L., De Toma, G. and Frova, C.** (2004). Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. *Mol Genet Genomics* **271** (5): 511-21.
- Speiser, D. M., Abrahamson, S. L., Banuelos, G. and Ow, D. W.** (1992). *Brassica juncea* Produces a Phytochelatin-Cadmium-Sulfide Complex. *Plant Physiol* **99** (3): 817-821.
- St-Pierre, M. V., Ruetz, S., Epstein, L. F., Gros, P. and Arias, I. M.** (1994). ATP-dependent transport of organic anions in secretory vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (20): 9476-9.
- Suhy, D. A., Simon, K. D., Linzer, D. I. and O'Halloran, T. V.** (1999). Metallothionein is part of a zinc-scavenging mechanism for cell survival under conditions of extreme zinc deprivation. *J Biol Chem* **274** (14): 9183-92.
- Sweeney, R. Y., Mao, C., Gao, X., Burt, J. L., Belcher, A. M., Georgiou, G. and Iverson, B. L.** (2004). Bacterial biosynthesis of cadmium sulfide nanocrystals. *Chem Biol* **11** (11): 1553-9.
- Szczyпка, M. S., Wemmie, J. A., Moye-Rowley, W. S. and Thiele, D. J.** (1994). A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem* **269** (36): 22853-7.
- Tamai, K. T., Gralla, E. B., Ellerby, L. M., Valentine, J. S. and Thiele, D. J.** (1993). Yeast and mammalian metallothioneins functionally substitute for yeast copper-zinc superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (17): 8013-7.
- Tamás, M. J., Labarre, J., Toledano, M. B. and Wysocki, R.** (2006). Mechanisms of toxic metal tolerance in yeast. *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification*. Tamás, M. J. and Martinoia, E. Heidelberg, Springer-Verlag Berlin. **14**: 395-454.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S.** (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24** (8): 1596-9.
- Tate, S. S. and Meister, A.** (1981). gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. *Mol Cell Biochem* **39**: 357-68.

- Thakur, J. K., Arthanari, H., Yang, F., Pan, S. J., Fan, X., Breger, J., Frueh, D. P., Gulshan, K., Li, D. K., Mylonakis, E., Struhl, K., Moye-Rowley, W. S., Cormack, B. P., Wagner, G. and Naar, A. M.** (2008). A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. *Nature* **452** (7187): 604-9.
- Thomas, D. and Surdin-Kerjan, Y.** (1997). Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **61** (4): 503-32.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J. M., Crawford, N. M. and Schroeder, J. I.** (2000). Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (9): 4991-6.
- Thorsen, M., Lagniel, G., Kristiansson, E., Junot, C., Nerman, O., Labarre, J. and Tamas, M. J.** (2007). Quantitative transcriptome, proteome, and sulfur metabolite profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* response to arsenite. *Physiol Genomics* **30** (1): 35-43.
- Tommasini, R., Evers, R., Vogt, E., Mornet, C., Zaman, G. J., Schinkel, A. H., Borst, P. and Martinoia, E.** (1996). The human multidrug resistance-associated protein functionally complements the yeast cadmium resistance factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** (13): 6743-8.
- Tsuji, N., Nishikori, S., Iwabe, O., Matsumoto, S., Shiraki, K., Miyasaka, H., Takagi, M., Miyamoto, K. and Hirata, K.** (2005). Comparative analysis of the two-step reaction catalyzed by prokaryotic and eukaryotic phytochelatin synthase by an ion-pair liquid chromatography assay. *Planta* **222** (1): 181-91.
- Ubiyvovk, V. M., Blazhenko, O. V., Gigot, D., Penninckx, M. and Sibirny, A. A.** (2006). Role of gamma-glutamyltranspeptidase in detoxification of xenobiotics in the yeasts *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol Int* **30** (8): 665-71.
- Vande Weghe, J. G. and Ow, D. W.** (1999). A fission yeast gene for mitochondrial sulfide oxidation. *J Biol Chem* **274** (19): 13250-7.
- Vande Weghe, J. G. and Ow, D. W.** (2001). Accumulation of metal-binding peptides in fission yeast requires hmt2+. *Mol Microbiol* **42** (1): 29-36.

- Vatamaniuk, O. K., Bucher, E. A., Ward, J. T. and Rea, P. A.** (2001). A new pathway for heavy metal detoxification in animals. Phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **276** (24): 20817-20.
- Vatamaniuk, O. K., Mari, S., Lang, A., Chalasani, S., Demkiv, L. O. and Rea, P. A.** (2004). Phytochelatin synthase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with gamma-glutamylcysteine during catalysis: stoichiometric and site-directed mutagenic analysis of arabidopsis thaliana PCS1-catalyzed phytochelatin synthesis. *J Biol Chem* **279** (21): 22449-60.
- Vatamaniuk, O. K., Mari, S., Lu, Y. P. and Rea, P. A.** (1999). AtPCS1, a phytochelatin synthase from Arabidopsis: isolation and in vitro reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (12): 7110-5.
- Vatamaniuk, O. K., Mari, S., Lu, Y. P. and Rea, P. A.** (2000). Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase: blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *J Biol Chem* **275** (40): 31451-9.
- Vida, T. A. and Emr, S. D.** (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* **128** (5): 779-92.
- Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M. B. and Labarre, J.** (2001). A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276** (11): 8469-74.
- Vivares, D., Arnoux, P. and Pignol, D.** (2005). A papain-like enzyme at work: native and acyl-enzyme intermediate structures in phytochelatin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (52): 18848-53.
- Wemmie, J. A., Szczypka, M. S., Thiele, D. J. and Moye-Rowley, W. S.** (1994). Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, YCF1. *J Biol Chem* **269** (51): 32592-7.
- Willson, T. M. and Kliewer, S. A.** (2002). PXR, CAR and drug metabolism. *Nat Rev Drug Discov* **1** (4): 259-66.

- Winge, D. R., Nielson, K. B., Gray, W. R. and Hamer, D. H.** (1985). Yeast metallothionein. Sequence and metal-binding properties. *J Biol Chem* **260** (27): 14464-70.
- Wünschmann, J., Beck, A., Meyer, L., Letzel, T., Grill, E. and Lendzian, K. J.** (2007). Phytochelatins are synthesized by two vacuolar serine carboxypeptidases in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **581** (8): 1681-7.
- Wünschmann, J., Krajewski, M., Letzel, T., Lendzian, K. J. and Grill, E.** (2009). Dissection of glutathione conjugate turnover in yeast. In Bearbeitung.
- Wysocki, R., Clemens, S., Augustyniak, D., Golik, P., Maciaszczyk, E., Tamas, M. J. and Dziadkowiec, D.** (2003). Metalloid tolerance based on phytochelatins is not functionally equivalent to the arsenite transporter Acr3p. *Biochem Biophys Res Commun* **304** (2): 293-300.
- Yasuhara, T., Nakai, T. and Ohashi, A.** (1994). Aminopeptidase Y, a new aminopeptidase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, properties, localization, and processing by protease B. *J Biol Chem* **269** (18): 13644-50.
- Yen, J. L., Su, N. Y. and Kaiser, P.** (2005). The yeast ubiquitin ligase SCFMet30 regulates heavy metal response. *Mol Biol Cell* **16** (4): 1872-82.
- Yokoe, H. and Meyer, T.** (1996). Spatial dynamics of GFP-tagged proteins investigated by local fluorescence enhancement. *Nat Biotechnol* **14** (10): 1252-6.
- Zadzinski, R., Maszewski, J. and Bartosz, G.** (1996). Transport of glutathione S-conjugates in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol Int* **20** (5): 325-30.
- Zenk, M. H.** (1996). Heavy metal detoxification in higher plants--a review. *Gene* **179** (1): 21-30.
- Zhou, J. and Goldsbrough, P. B.** (1994). Functional homologs of fungal metallothionein genes from Arabidopsis. *Plant Cell* **6** (6): 875-84.
- Zhou, J. and Goldsbrough, P. B.** (1995). Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in Arabidopsis. *Mol Gen Genet* **248** (3): 318-28.

ANHANG

1. Plasmide und ihre Registrierung in der Stammsammlung

Plasmid	Selektionskassette	Nr. in Stammsammlung
p424gpd	Amp, LEU2	1454
p425gpd	Amp, TRP1	1455
p426gpd	Amp, URA3	1456
p426gpd-EGFP	Amp, URA3	1457
pUG6	Amp	2028
pUG27	Amp	2029
pUG66	Amp	2030
pUG72	Amp	2031
pUG73	Amp	2032
pSH47	Amp, URA3	2025
pSH62	Amp, HIS3	2026
pSH63	Amp, TRP1	1486
pSH65	Amp, Phleomycin	2027
p426gpd-PCS1	Amp, URA3	1458
p426gpd-PCS2_EGFP	Amp, URA3	1538, 1539
p426gpd-HB6_EGFP	Amp, URA3	1540, 1541
p426gpd-NsPCS	Amp, URA3	1499, 1500
p426gpd-BjPCS	Amp, URA3	1501, 1502
pGAL1	Amp, URA3	1660, 1661
pGAL1_eGFP	Amp, URA3	1662, 1663
pGAL1-PCS1	Amp, URA3	1579, 1580
pGAL1-PCS2	Amp, URA3	1489, 1490
pGAL1-PCS2-N	Amp, URA3	1583, 1584
pGAL1-PCS1-N	Amp, URA3	1650, 1651
pGAL1-PCS2-C	Amp, URA3	1585, 1586
pGAL1-PCS2x48	Amp, URA3	1587, 1588
pGAL1-PCS1_eGFP	Amp, URA3	1665, 1666
pGAL1-PCS2_eGFP	Amp, URA3	1667, 1668
pGAL1-HB6_eGFP	Amp, URA3	1669, 1670
pYM28	Amp	1847
pSK-PCS2	Amp	1475
pGAL1-PCS2	Amp, URA3	1489, 1490
pGAL1-PCS1-N	Amp, URA3	1650, 1651
pGAL1-NsPCS	Amp, URA3	1652, 1653
pGAL1-BjPCS	Amp, URA3	2117, 2118

2. Hefestämme und ihre Registrierung in der Stammsammlung

Stamm	Bezeichnung	Plasmid	Selektionskassette	Genotyp	Nr. in Stammsammlung
BY4741	Wildtyp			MATa, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0	1505
BY4742	Wildtyp			MAT α , his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0	1506
BY4741	Δ cpy		HIS3	BY4741; YMR297w::his3	2033
BY4742	Δ cpy		kanMX	BY4741; YMR297::kanMX	2037
BY4741	Δ cpc		kanMX	BY4741; YBR139w::kanMX	1507
BY4741	Δ cpc		URA3	BY4741; YBR139w::ura3	1991
BY4741	Δ cpc		LEU2	BY4741, YBR139w::loxP:leu 2::loxP	1495, 1496
BY4741	Δ cpc		kanMX	BY4741; YBR139w::loxP	1534, 1535
BY4742	Δ cpc		kanMX	BY4742; YBR139w::kanMX	2038
BY4741	Δ cpy Δ cpc		HIS3	BY4741; YBR139w::kanMX; YMR297w::his3	2034
BY4741	Δ cpy Δ cpc		HIS3, URA3	BY4741; YBR139w::Ura3; YMR297w::his3	1992
BY4741	Δ cis2		kanMX	BY4741; YLR299w::kanMX	1508
BY4742	Δ cis2		kanMX	BY4742; YLR299w::kanMX	1993
BY4741	Δ cis2 Δ cpc		URA3	BY4741; YLL299w::kanMX; YBR139w::ura3	2035
BY4741	Δ cis2 Δ cpy		HIS3	BY4741; YLL299w::kanMX; YMR297w::his3	2036
BY4741	Δ cis2 Δ cpy Δ cpc		HIS3, LEU2	BY4741; YMR297w::his3; YBR139w::loxP- Leu2-loxP	1497, 1498
BY4741	Δ cis2 Δ cpy Δ cpc		HIS3	BY4741; YMR297w::his3; YBR139w::loxP	1536, 1537
BY4741	Δ ycf1		kanMX	BY4741; YDR135c::kanMX	1509
BY4741	Δ bpt1		kanMX	BY4741; YLL015w::loxP	1510, 1511
BY4741	Δ ycf1 Δ bpt1		kanMX	BY4741; YDR135c::kanMX;; YLL015w::loxP	1512, 1513
BY4741	Δ cup1		URA3	ABDE1; arg4-8; leu2-112; his7-2; trp1-289; ade5; cup1 Δ	1504, 81
BY4741	CIS2:eGFP		HIS3	BY4741; YLR299w:eGFP (HIS3)	1989, 1990

BY4741	Wildtyp	pGAL1::eGFP	URA3	MATa, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0	1935, 1936
BY4741	Wildtyp	pGAL1::AtPCS1: eGFP	URA3	MATa, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0	1937, 1938
BY4741	Wildtyp	pGAL1::AtPCS2: eGFP	URA3	MATa, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0	1939, 1940
BY4741	Wildtyp	pGAL1::AtHB6:e GFP	URA3	MATa, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0	1941, 1942
BY4741	Wildtyp	pGAL1	URA3	MATa, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0	1983, 1984
BY4741	Wildtyp	pGAL1::AtPCS1	URA3	MATa, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0	1979, 1980
BY4741	Wildtyp	pGAL1::AtPCS2	URA3	MATa, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0	1981, 1982
BY4741	Wildtyp	pGAL1::AtPCS1 Δ C	URA3	MATa, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0	2054, 2055
BY4741	Wildtyp	pGAL1::AtPCS2 Δ C	URA3	MATa, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0	2056, 2057
BY4741	Wildtyp	pGAL1::NsPCS	URA3	MATa, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0	1985, 1986
BY4741	Wildtyp	pGAL1::BjPCS	URA3	MATa, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0	1987, 1988
BY4741	Δ cpy Δ cpc	pGAL1::eGFP	HIS3, URA3	BY4741; YBR139w::kanMX; YMR297w::his3	1943, 1944
BY4741	Δ cpy Δ cpc	pGAL1::AtPCS1: eGFP	HIS3, URA3	BY4741; YBR139w::kanMX; YMR297w::his3	1945, 1946
BY4741	Δ cpy Δ cpc	pGAL1::AtPCS2: eGFP	HIS3, URA3	BY4741; YBR139w::kanMX; YMR297w::his3	1947, 1948
BY4741	Δ cpy Δ cpc	pGAL1::AtHB6:e GFP	HIS3, URA3	BY4741; YBR139w::kanMX; YMR297w::his3	1949, 1950
BY4741	Δ cpy Δ cpc	pGAL1	HIS3, URA3	BY4741; YBR139w::kanMX; YMR297w::his3	1973, 1974
BY4741	Δ cpy Δ cpc	pGAL1::AtPCS1	HIS3, URA3	BY4741; YBR139w::kanMX; YMR297w::his3	1969, 1970
BY4741	Δ cpy Δ cpc	pGAL1::AtPCS2	HIS3, URA3	BY4741; YBR139w::kanMX; YMR297w::his3	1971, 1972
BY4741	Δ cpy Δ cpc	pGAL1::AtPCS1 Δ C	HIS3, URA3	BY4741; YBR139w::kanMX; YMR297w::his3	2058, 2059
BY4741	Δ cpy Δ cpc	pGAL1::AtPCS2 Δ C	HIS3, URA3	BY4741; YBR139w::kanMX; YMR297w::his3	2060, 2061
BY4741	Δ cpy Δ cpc	pGAL1::NsPCS	HIS3, URA3	BY4741; YBR139w::kanMX; YMR297w::his3	1975, 1976
BY4741	Δ cpy Δ cpc	pGAL1::BjPCS	HIS3, URA3	BY4741; YBR139w::kanMX; YMR297w::his3	1977, 1978

BY4741	Δ cis2 Δ cpy Δ cpc	pGAL1::eGFP	HIS3, URA3	BY4741; YMR297w::his3; YBR139w::loxP	1951, 1952
BY4741	Δ cis2 Δ cpy Δ cpc	pGAL1::AtPCS1: eGFP	HIS3, URA3	BY4741; YMR297w::his3; YBR139w::loxP	1953, 1954
BY4741	Δ cis2 Δ cpy Δ cpc	pGAL1::AtPCS2: eGFP	HIS3, URA3	BY4741; YMR297w::his3; YBR139w::loxP	1955, 1956
BY4741	Δ cis2 Δ cpy Δ cpc	pGAL1::AtHB6:e GFP	HIS3, URA3	BY4741; YMR297w::his3; YBR139w::loxP	1957
BY4741	Δ cis2 Δ cpy Δ cpc	pGAL1	HIS3, URA3	BY4741; YMR297w::his3; YBR139w::loxP	1961, 1962
BY4741	Δ cis2 Δ cpy Δ cpc	pGAL1::AtPCS1	HIS3, URA3	BY4741; YMR297w::his3; YBR139w::loxP	1959, 1960
BY4741	Δ cis2 Δ cpy Δ cpc	pGAL1::AtPCS2	HIS3, URA3	BY4741; YMR297w::his3; YBR139w::loxP	1965, 1966
BY4741	Δ cis2 Δ cpy Δ cpc	pGAL1::AtPCS1 Δ C	HIS3, URA3	BY4741; YMR297w::his3; YBR139w::loxP	2062, 2063
BY4741	Δ cis2 Δ cpy Δ cpc	pGAL1::AtPCS2 Δ C	HIS3, URA3	BY4741; YMR297w::his3; YBR139w::loxP	2064, 2065
BY4741	Δ cis2 Δ cpy Δ cpc	pGAL1::NsPCS	HIS3, URA3	BY4741; YMR297w::his3; YBR139w::loxP	1963, 1964
BY4741	Δ cis2 Δ cpy Δ cpc	pGAL1::BjPCS	HIS3, URA3	BY4741; YMR297w::his3; YBR139w::loxP	1967, 1968
BY4742	Δ yal012w		kanMX	BY4742; YAL012w::kanMX	1881
BY4742	Δ yml082w		kanMX	BY4742; YML082w::kanMX	1882
BY4742	Δ ylr303w		kanMX	BY4742; YLR303w::kanMX	1883
BY4742	Δ ygl184c		kanMX	BY4742; YGL184c::kanMX	1884
BY4742	Δ yfr055w		kanMX	BY4742; YFR055w::kanMX	1885
BY4742	Δ yhr112c		kanMX	BY4742; YHR112c::kanMX	1886
BY4742	Δ yjr130c		kanMX	BY4742; YJR130c::kanMX	1887
BY4742	Δ yll058w		kanMX	BY4742; YLL058w::kanMX	1888
BY4742	Δ ygl203w (Δ kex1)		kanMX	BY4742; YGL203w::kanMX	1893
BY4742	Δ yjl172w (Δ cps1)		kanMX	BY4742; YJL172w::kanMX	1894
BY4742	Δ yol153c		kanMX	BY4742; YOL153c::kanMX	1895
BY4742	Δ ybr286w (Δ ape3)		kanMX	BY4742; YBR286w::kanMX	1896
BY4742	Δ ydr415c		kanMX	BY4742; YDR415c::kanMX	1897
BY4742	Δ ybr074w		kanMX	BY4742; YBR074w::kanMX	1898
BY4742	Δ yol137w		kanMX	BY4742; YOL137w::kanMX	1899
BY4742	Δ ydr155c		kanMX	BY4742; YDR155c::kanMX	1900

BY4742	Δ yfr044c (Δ dug1)		kanMX	BY4742; YFR044::kanMX	1994
BY4742	Δ ybr281c (Δ dug2)		kanMX	BY4742; YBR281::kanMX	1995
BY4742	Δ ynl191w (Δ dug3)		kanMX	BY4742; YNL191::kanMX	1996
BY4742	Δ ylj060w (Δ bna3)		kanMX	BY4742; YLJ060::kanMX	1997
BY4742	Δ yor153w (Δ pdr5)		kanMX	BY4742; YOR153w::kanMX	2039
BY4742	Δ yhr028c (Δ dap2)		kanMX	BY4742; YHR028c::kanMX	2078
BY4742	Δ ykl103c (Δ lap4)		kanMX	BY4742; YKL103::kanMX	2079
BY4742	Δ yor219c (Δ ste13)		kanMX	BY4742; YOR219c::kanMX	2080
BY4742	Δ yhr113w		kanMX	BY4742; YHR113w::kanMX	2081
S. <i>pombe</i>				S. <i>pombe</i> wildtype 972h-	1503

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jana Wünschmann
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum: 08.07.1980
Geburtsort: Dresden

Ausbildung

1987 – 1992 126. Polytechnische Oberschule, Dresden
1992 – 1999 Gymnasium Dresden-Plauen
Juli 1999 Abitur
1999 – 2004 Studium der Biologie an der Technischen Universität Dresden
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Allgemeine Genetik der
TU Dresden (Prof. Dr. G. Rödel)
Thema: „Untersuchungen zur Phosphorylierung mitochondrialer
Proteine in *Saccharomyces cerevisiae*“
Nov 2004 Abschluss als Diplom-Biologin
Dez 2004 – heute Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Botanik der
Technischen Universität München (Prof. Dr. E. Grill)

Publikationen

Krause-Buchholz, U., Gey, U., Wünschmann, J., Becker, S. and Rödel, G. (2006). YIL042c and YOR090c encode the kinase and phosphatase of the *Saccharomyces cerevisiae* pyruvate dehydrogenase complex. FEBS Lett 580 (11): 2553-60.

Wünschmann, J., Beck, A., Meyer, L., Letzel, T., Grill, E. and Lenzian, K. J. (2007). Phytochelatins are synthesized by two vacuolar serine carboxypeptidases in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett 581 (8): 1681-7.

Wünschmann, J., Krajewski, M., Letzel, T., Lenzian, K. J. and Grill, E. (2009). Dissection of glutathione conjugate turnover in yeast. In Bearbeitung.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Erwin Grill. Er hat mir gezeigt, was es bedeutet, ein Wissenschaftler zu sein. Sein fortwährendes Interesse an diesem Projekt und seine ständige Diskussionsbereitschaft haben diese Arbeit und meinen Lebensweg maßgeblich beeinflusst. Ausgesprochen dankbar bin ich zudem Herrn PD Dr. Erich Glawischnig und Herrn Prof. Dr. Klaus Lenzian für die Erstellung der Gutachten für meine Dissertation.

Entscheidend für das Gelingen dieser Arbeit war des Weiteren die gute Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern am Lehrstuhl für Botanik der Technischen Universität München. Ganz besonderer Dank gebührt in diesem Zusammenhang den Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Phytochelatine“, insbesondere Herrn Prof. Dr. Klaus Lenzian, Ralph Blum und Johanna Berger. Die gemeinsam erlebten Höhen und Tiefen des Laboralltags haben eine vertraute, freundschaftliche Arbeitsatmosphäre geschaffen. Es war und ist schön, in einem solchen Team zu arbeiten. Außerdem danke ich Eva Huber, die mein Projekt durch ihre Bachelorarbeit hervorragend unterstützte. Des Weiteren möchte ich Frau Dr. Danièle Moes nicht nur für ihren umfangreichen Schokoladenvorrat danken, sondern auch besonders für ihre unzählbaren hilfreichen, motivierenden und freundschaftlichen Worte. Sehr dankbar bin ich ebenso Arthur Korte, Georg Hierl, Sebastian (Wastl) Grünwald, Jakob Prestele und Christian Kornbauer. Die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und praktischen Hinweise waren immer eine große Hilfe für mich. Zudem schafften sie es immer, mich durch etliche Videoabende, unvergessliche Spanferkelaktionen und Ausflüge in den Sushi-Tempel vom Arbeitsalltag abzulenken. Beate Seeliger und Josef Reischenbeck danke ich für die unkomplizierte, schnelle und kompetente Beseitigung aller bürokratischen bzw. technischen Probleme und Fragestellungen.

Danken möchte ich ebenso Anne Biesold und Matthias Seifert. Ihre Freundschaft und ihre motivierenden Worte haben mir vor allem während der vergangenen Monate sehr geholfen. Martin Prestele danke ich für seine Liebe, sein Verständnis und für das Glück in meinem Leben.

Den wohl größten Halt hatte ich, wie schon davor, so auch in den Promotionsjahren in meiner Familie. Mein ganz besonderer Dank gebührt daher meinen Eltern für das in mich gesetzte Vertrauen, das fast grenzenlose Verständnis und die anhaltende Unterstützung sowie meinem Bruder, denn ohne ihn wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin.