

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Botanik

Funktionale Analyse der Phytochelatinsynthese in *Arabidopsis thaliana*

Ralph Blum

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. K. H. Schneitz

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. E. Grill
2. Univ.-Prof. Dr. R. Hüchelhoven

Die Dissertation wurde am 18.12.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 08.02.2009 angenommen.

Meiner Familie,  
im Gedenken an Konrad Breu (1915-1974)

The History of Life is  
“an amazing tale with enigma piled on secrets stacked on riddles“ (Clive Cussler).

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>	<b>IV</b>
<b>Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen</b>	<b>VI</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Schwermetalle und ihre Entgiftung in Pflanzen</b>	<b>1</b>
1.1.1 Metallothioneine	3
1.1.2 Phytochelatine	3
1.1.3 Phytochelatinsynthase	4
1.1.3.1 Struktur und Funktionsweise des Enzyms	4
1.1.3.2 Bisher beschriebene AtPCS1-Mutanten	7
1.1.3.3 Es gibt zwei Phytochelatinsynthasen in Arabidopsis	8
1.1.3.4 Homologe Proteine in anderen Organismen	10
<b>1.2 Herbizide und ihre Entgiftung in Pflanzen</b>	<b>12</b>
1.2.1 Glutathion	13
1.2.2 Glutathion-Konjugate	17
1.2.3 Abbau von GS-Konjugaten	17
1.2.4 GS-Konjugate im Entgiftungsstoffwechsel	19
1.2.5 GS-Konjugate in endogenen Stoffwechselwegen	21
<b>1.3 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>23</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Chemikalien</b>	<b>25</b>
<b>2.2 Antikörper</b>	<b>25</b>
<b>2.3 Molekularbiologie</b>	<b>26</b>
2.3.1 Oligonukleotide	26
2.3.2 Mikroorganismen und Plasmide	26
2.3.3 Enzyme, Puffer, Marker	26
<b>2.4 Medien, Puffer und Lösungen</b>	<b>27</b>
2.4.1 Medien für Zellkulturen und Bakterien	27
2.4.2 Analyse von DNA und RNA	28
<b>2.5 Anzucht von Pflanzenmaterial</b>	<b>28</b>
2.5.1 Oberflächensterilisierung von Arabidopsis Samen	28
2.5.2 Arabidopsis Zellsuspensionskulturen	29
<b>2.6 Insertionslinien und Kreuzungen</b>	<b>29</b>
2.6.1 Phytochelatinsynthase	29
2.6.2 $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase 4	29
<b>2.7 Wurzelwachstumstests mit Keimlingen</b>	<b>30</b>

---

<b>2.8</b>	<b>Belastungsversuche mit Biman</b>	<b>30</b>
2.8.1	Versuche mit Keimlingen	30
2.8.2	Probenaufschluss und HPLC-Analyse	30
2.8.3	Versuche mit Protoplasten	32
2.8.4	Versuche mit Zellsuspensionskulturen	33
<b>2.9</b>	<b>Detektion von Phytochelatinen in Keimlingen</b>	<b>33</b>
2.9.1	Probenaufschluss und PC-Analyse	33
<b>2.10</b>	<b>Transiente Transformation von Protoplasten</b>	<b>35</b>
2.10.1	Komplementation von $\Delta$ PCS Protoplasten mit 35S:: <i>AtPCS1</i>	35
<b>2.11</b>	<b>Stabile Transformation von Arabidopsis Pflanzen</b>	<b>36</b>
2.11.1	Anzucht von Agrobakterien	36
2.11.2	Agrobakterien-vermittelte Transformation von Arabidopsis	36
2.11.3	Selektion von Transformanden	36
<b>2.12</b>	<b>Proteinanalyse</b>	<b>37</b>
2.12.1	Stressversuche mit <i>AtPCS1</i> :EGFP Linien	37
2.12.2	Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial	37
2.12.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	38
2.12.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
2.12.5	Anfärbung von SDS-Gelen	39
2.12.6	Western Blot	39
2.12.7	Immunfärbung und Detektion	40
<b>2.13</b>	<b>Molekularbiologische Arbeiten</b>	<b>41</b>
2.13.1	Isolation genomischer DNA aus Arabidopsis	41
2.13.2	Isolation von DNA aus Cyanobakterien	41
2.13.3	Polymerase-Kettenreaktion	42
2.13.4	Reverse Transkriptase – PCR	43
2.13.5	Inserts und Vektoren	44
2.13.6	Ligation	44
2.13.7	Transformation und Selektion von Bakterien	45
2.13.8	Plasmid-Minipräparation	45
2.13.9	Kontrolle putativer Klone und Konservierung	46
<b>2.14</b>	<b>Konfokale Mikroskopie</b>	<b>47</b>
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>Funktionale Analyse der <i>AtPCS</i>-Gene</b>	<b>48</b>
3.1.1	Genetische Charakterisierung der PCS knockout Linien	48
3.1.2	Analyse von Phytochelatinen und Cd-Toleranz	52

---

3.1.3	Phänotyp der PCS-defizienten Linien	53
3.1.4	Physiologische Charakterisierung der PCS knockout Linien	54
3.1.4.1	Metabolismus von GS-Biman im Wildtyp	55
3.1.4.2	Metabolismus von GS-Biman in den PCS-defizienten Linien	59
3.1.4.3	Einfluss von Cadmium auf den GS-Konjugat Metabolismus	63
3.1.4.4	Sensitivität gegenüber Xenobiotika	65
3.1.5	Funktionale Komplementation von PCS1-defizienten Linien	67
<b>3.2</b>	<b>Die <math>\gamma</math>-Glutamyltranspeptidase im GS-Konjugat Stoffwechsel</b>	<b>73</b>
3.2.1	Inhibition der $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen durch Acivicin	73
3.2.2	Genetische Charakterisierung der AtGGT4-defizienten Linien	75
3.2.3	Metabolismus von GS-Biman in AtGGT4-defizienten Linien	77
3.2.4	Sensitivität der AtGGT4-defizienten Linien gegenüber Xenobiotika	80
<b>3.3</b>	<b>Lokalisation von AtPCS1 und AtPCS2</b>	<b>83</b>
3.3.1	Funktionale Komplementation durch GFP-Konstrukte	84
3.3.2	Expression von AtPCS1 und AtPCS2 in Keimlingen	87
3.3.3	Intrazelluläre Lokalisation	89
3.3.4	Kompartimentierung der GS-Konjugate	92
<b>3.4</b>	<b>Expression des PCS-Homologs aus <i>Nostoc sp.</i> und carboxyterminal verkürzter Versionen von AtPCS in Arabidopsis</b>	<b>98</b>
3.4.1	Vektoren für die Transformation von Arabidopsis	100
3.4.2	Generierung von stabil transformierten Arabidopsis-Linien	101
3.4.2.1	Charakterisierung von PC-Synthese und Cd-Toleranz	101
3.4.2.2	Charakterisierung des GS-Biman Abbaus	104
3.4.2.3	Molekularbiologische Analyse	105
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>107</b>
4.1	Metabolismus von GS-Konjugaten in Pflanzen	108
4.2	Evolution und Funktionalität der Phytochelatinsynthese	119
4.3	Aspekte der zukünftigen Nutzung von Pflanzen	130
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>135</b>
<b>6.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>137</b>
6.1	Nährmedien	137
6.2	Oligonukleotide	141
6.3	Plasmidkonstrukte in der Stammsammlung	144
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>147</b>

## Abkürzungen

ABA	Abscisinsäure
ABC	ATP <i>binding cassette</i>
Abb.	Abbildung
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxid
AS	Aminosäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BMELV	Bundesministerium f. Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus ( <i>cauliflower mosaic virus</i> )
C-B	Cystein-Biman
cDNA	copy-DNA
CG-B	Cysteinyl-glycin-Biman
Col-0	Arabidopsis Ökotyp Columbia 0
C-Terminus	Carboxyterminus
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EC-B	$\gamma$ -Glutamyl-cystein-Biman
ECG	Glutathion ( $\gamma$ -Glutamyl-cysteinyl-glycin)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Endkonzentration
FG	Frischgewicht
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et alii</i> )
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GGT	$\gamma$ -Glutamyltranspeptidase
GPD	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
GST	Glutathion S-Transferase
GUS	$\beta$ -Glucuronidase
h	Stunde ( <i>hour</i> )
H <sub>2</sub> O(MQ)	Deionisiertes Wasser (Widerstand: 18,2 M $\Omega$ )
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Hyg	Hygromycin
IARC	International Agency for Research on Cancer
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
L	Liter
LB	Luria-Bertani-Bakteriennährlösung
LS	Linsmaier und Skoog Medium
M	Molarität (mol/L)

MBB	Monobromobiman
MCB	Monochlorobiman
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
min	Minute
mind.	Mindestens
miRNA	mikroRNA
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger-RNA</i> )
MS	Murashige und Skoog Medium
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nos	Nopalinsynthase
N-Terminus	Aminoterminus
ORF	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)
ORI	<i>origin of replication</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Phytochelatin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PCS	Phytochelatinsynthase
PCS-N	Aminoterminus der Phytochelatinsynthase
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSM	Pflanzenschutzmittel
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rotations per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s.	siehe
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAGI	<i>The Arabidopsis Genome Initiative</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung ( <i>Tris buffered saline</i> )
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
Ter	Terminator
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Units</i> (Einheit der Enzymaktivität)
UTR	Nicht translatierte Region ( <i>untranslated region</i> )
UV	ultraviolett
VE	vollentsalzt
VF	Verdünnungsfaktor
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein ( <i>yellow fluorescent protein</i> )
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

## Vorsilben von Einheiten:

f	femto 10 <sup>-15</sup>	m	milli 10 <sup>-3</sup>
p	pico 10 <sup>-12</sup>	c	centi 10 <sup>-2</sup>
n	nano 10 <sup>-9</sup>	k	kilo 10 <sup>3</sup>
μ	mikro 10 <sup>-6</sup>	M	mega 10 <sup>6</sup>

# Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

## Abbildungen

Abb. 1.1: Komplexierung von Metallionen durch Phytochelatine	3
Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Gen- und Proteinstruktur von AtPCS1	4
Abb. 1.3: Proteinstruktur des NsPCS-Dimers und Vergleich mit Papain-Proteasen	5
Abb. 1.4: Modellvorstellung zum Ablauf der Phytochelatinsynthese	6
Abb. 1.5: Darstellung der veränderten Genprodukte in AtPCS1-Mutanten	8
Abb. 1.6: Vergleich der beiden Gene für AtPCS1 und AtPCS2	8
Abb. 1.7: Herbizide, die über GS-Konjugation entgiftet werden	13
Abb. 1.8: Strukturformel von Glutathion	14
Abb. 1.9: Glutathion als multifunktionales Molekül im Zellstoffwechsel	14
Abb. 1.10: Postulierte Abbauwege von GS-Konjugaten in Pflanzen	18
Abb. 1.11: Schematische Darstellung einer Pflanzenzelle mit den Stoffwechselwegen des Xenobiotikametabolismus	20
Abb. 3.1: Lage der T-DNA Insertionen innerhalb der Gene für <i>AtPCS1</i> und <i>AtPCS2</i> in den isolierten Linien.	49
Abb. 3.2: PCR-Analyse der PCS-Insertionslinien $\Delta$ PCS1, $\Delta$ PCS2 und $\Delta$ PCS mit genspezifischen und T-DNA spezifischen Primern.	49
Abb. 3.3: RT-PCR Analyse der PCS Insertionslinien	50
Abb. 3.4: Western Blot Analyse der PCS-Insertionslinien	51
Abb. 3.5: Analyse von Phytochelatinen im Wildtyp (Col-0) und in PCS-defizienten Linien	52
Abb. 3.6: Wurzelwachstum von Wildtyp und PCS-defizienten Linien auf Cd-Agarplatten	53
Abb. 3.7: Habitus der beschriebenen PCS-knockout-Linien	54
Abb. 3.8: Molekülstruktur von Monochlorobiman	54
Abb. 3.9: Bestimmung der Toxizität von Monochlorobiman in Keimlingen	55
Abb. 3.10: Metabolismus von GS-Biman in Arabidopsis Wildtyp-Keimlingen	57
Abb. 3.11: Metabolismus von GS-Biman in Arabidopsis-Zellkulturen	59
Abb. 3.12: Bildung von EC-Biman in Arabidopsis-Protoplasten.	60
Abb. 3.13: Metabolismus von GS-Biman in Arabidopsis-Keimlingen vom Wildtyp und den drei PCS-Insertionslinien	62
Abb. 3.14: LC-ESI-MS Analyse der EC-Biman-Fractionen	63
Abb. 3.15: Aktivierung des AtPCS1-katalysierten Umsatzes von GS-Biman durch Cadmium	64
Abb. 3.16: Sensitivität von Wildtyp und $\Delta$ PCS gegenüber Monochlorobiman (MCB) und Monobromobiman (MBB)	65
Abb. 3.17: Empfindlichkeit von Wildtyp und $\Delta$ PCS gegenüber Atrazin	67

---

Abb. 3.18: Funktionale Komplementation von Protoplasten aus PCS1-defizienten Linien	68
Abb. 3.19: Klonierungsschema für die pAtPCS1::cDNA Konstrukte	69
Abb. 3.20: Funktionale Komplementation von $\Delta$ PCS <i>in planta</i> mit <i>AtPCS1</i> und <i>AtPCS2</i>	71
Abb. 3.21: RT-PCR Analyse der mit <i>AtPCS1</i> bzw. <i>AtPCS2</i> transformierten Linien	73
Abb. 3.22: Strukturformel von Acivicin	74
Abb. 3.23: GS-Biman Metabolismus unter dem Einfluss des GGT-Inhibitors Acivicin	74
Abb. 3.24: Beschreibung der Insertionslinie $\Delta$ GGT4	76
Abb. 3.25: Habitus der Dreifach-knockout-Linie $\Delta$ PCSx $\Delta$ GGT4	76
Abb. 3.26: GS-Biman Metabolismus in <i>AtGGT4</i> -defizienten Linien (Keimlinge)	78
Abb. 3.27: Metabolisierung von GS-Biman in <i>AtGGT4</i> -defizienten Protoplasten	79
Abb. 3.28: Sensitivität der <i>AtGGT4</i> -defizienten Linien gegenüber MCB	80
Abb. 3.29: Wachstum der beiden <i>AtGGT4</i> -defizienten Linien auf Agarplatten mit Atrazin	81
Abb. 3.30: Zusätzliche Wiederholung des Toxizitätstests mit 30 $\mu$ M Atrazin	82
Abb. 3.31 EGFP-Fusionskonstrukte von <i>AtPCS1</i> und <i>AtPCS2</i>	84
Abb. 3.32: <i>AtPCS1</i> :EGFP komplementiert Cd-Sensitivität in $\Delta$ PCS1	85
Abb. 3.33: <i>AtPCS1</i> :EGFP komplementiert den Abbau von GS-Biman zu EC-Biman in $\Delta$ PCS1	86
Abb. 3.34: Westernblot-Analyse von Proteinextrakten aus stressexponierten <i>AtPCS1</i> :EGFP Transformationslinien	87
Abb. 3.35: Expression von <i>AtPCS1</i> :EGFP in Arabidopsis-Keimlingen	88
Abb. 3.36: Expression von <i>AtPCS2</i> :EGFP in Arabidopsis-Keimlingen	88
Abb. 3.37: <i>AtPCS1</i> :EGFP Fluoreszenzsignale in Protoplasten	89
Abb. 3.38: <i>AtPCS1</i> :EGFP Fluoreszenz in Stomata der Kotyledonen	90
Abb. 3.39: Subzelluläre Lokalisation von <i>AtPCS1</i> :EGFP	91
Abb. 3.40: <i>AtPCS1</i> :EGFP-Fluoreszenz in der Wurzelspitze	91
Abb. 3.41: Umsatz von GS-Biman in Zellkulturen mit unterschiedlichen Azid-Konzentrationen im Medium	93
Abb. 3.42: Effekt von Azid auf den GS-Biman Metabolismus in WT-Zellsuspensionskulturen	94
Abb. 3.43: Metabolismus von GS-Biman in WT- und $\Delta$ PCS-Zellsuspensionskulturen bei Azidexposition	95
Abb. 3.44: Effekt von Azid auf die Verteilung von Biman-Konjugaten in Arabidopsiszellen	96
Abb. 3.45: GS-Biman Abbau in Keimlingen bei gleichzeitiger Inkubation mit Azid	97
Abb. 3.46: Schematische Darstellung der stabil in $\Delta$ PCS transformierten cDNA Moleküle	98

Abb. 3.47: Alignment der Aminosäuresequenzen von AtPCS1, AtPCS2, NsPCS und BjPCS	99
Abb. 3.48: Klonierungsvektor p426GPD-pAtPCS1::NsPCS	100
Abb. 3.49: PC-Synthese in den $\Delta$ PCS-Transformationslinien	102
Abb. 3.50: Cd-Toleranz der $\Delta$ PCS-Transformationslinien	103
Abb. 3.51: Metabolisierung von GS-Biman in den $\Delta$ PCS-Transformationslinien	104
Abb. 3.52: RT-PCR Analyse der mit verkürzten PCS-Versionen transformierten Linien	105
Abb. 3.53: RT-PCR Analyse der mit NsPCS transformierten Linien	106
Abb. 4.1: Wiederfindungsrate in mit MCB infiltrierten Keimlingen	109
Abb. 4.2: Stoffwechsel- und Transportwege im GS-Biman Metabolismus	110
Abb. 4.3: Kompartimentierung des GS-Biman Abbaus	111
Abb. 4.4: Einfluss von Azid auf den Metabolismus von GS-Biman	114
Abb. 4.5: Der $\gamma$ -Glutamyl-Zyklus, wie er für den Säugerorganismus beschrieben ist	116
Abb. 4.6: Transport- und Stoffwechselwege bei der Mercaptursäuresynthese in der Leber	118
Abb. 4.7: PCS-homologe Proteine aus Prokaryoten	119
Abb. 4.8: Verteilung der 3'-UTR-Länge in pflanzlichen und tierischen mRNA-Molekülen	125
Abb. 4.9: Beispiele für kommerziell hergestellte Herbizidsafener	132
<b>Tabellen</b>	
Tab. 1.1: Schwermetallemissionen (t) in der Bundesrepublik Deutschland	2
Tab. 1.2: Arten mit PCS-homologen Proteinen	11
Tab. 1.3: Inlandsabsatz (t) an Wirkstoffen in Pflanzenschutzmitteln	12
Tab. 2.1: Laufmittelgradient für die Analyse von Biman-Konjugaten	31
Tab. 2.2: Laufmittelgradient für die Analyse von Phytochelatinen	34
Tab. 2.3: Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamidgele	39
Tab. 2.4: Standardmäßig verwendeter PCR-Ansatz	42
Tab. 2.5: Standardmäßig verwendeter PCR-Temperaturzyklus	43
Tab. 2.6: Ansatzschema für die RT-PCR	43
Tab. 2.7: Reaktionsansätze für die Ligation von Inserts und Vektoren	44
Tab. 3.1: Bezeichnungen für die isolierten Transformationslinien	101
Tab. 4.1: Analyse des putativen alr0975-Operons von <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120	122
Tab. 4.2: Molekulargenetischer Vergleich von AtPCS1 und AtPCS2	123
Tab. 4.3: Aktivität exprimierter PCS-Gene in Hefe (heterolog) und Arabidopsis	127
Tab. 6.1: Salze für LS-Medium (1x)	137

---

Tab. 6.2: Salze für B5-Medium (10x)	138
Tab. 6.3: Vitamine für B5-Medium (400x)	138
Tab. 6.4: Zusammensetzung von B5-Medium aus den Stammlösungen	138
Tab. 6.5: Makrosalze für MS-Medium (10x)	139
Tab. 6.6: Mikrosalze für MS-Medium (400x)	139
Tab. 6.7: Zusammensetzung von MS-Medium aus den Stammlösungen	139
Tab. 6.8: Zusammensetzung von BG-11 Medium	140
Tab. 6.9: Zusammensetzung des <i>trace metal mix</i> (1000x)	140
Tab. 6.10: Verzeichnis der verwendeten Oligonukleotide (Primer)	143
Tab. 6.11: In der Stammsammlung hinterlegte Stämme von <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i>	146

# 1. EINLEITUNG

Die Entgiftung von Xenobiotika ist eine wichtige Stoffwechsellleistung lebender Organismen. Da Pflanzen ortsgebunden sind und ein ungünstiges Habitat nicht verlassen können, ist eine effiziente Entgiftung für sie von besonderer Bedeutung (Weiler and Nover, 2008). An Belastungen aus der Umwelt, die als abiotischer Stress bezeichnet werden, stehen bei Pflanzen besonders Belastungen durch Wassermangel, Temperatur-, Strahlungs- und Salzstress im Vordergrund. Mit fortschreitender Industrialisierung und Intensivierung des Ackerbaus nahmen anthropogene abiotische Einflüsse zu, z.B. durch Eintrag von Schwermetallen und anderen toxischen Substanzen in die Umwelt sowie durch Einsatz von Herbiziden in der Landwirtschaft.

## 1.1 Schwermetalle und ihre Entgiftung in Pflanzen

Unter dem Begriff Schwermetalle wird eine Gruppe von Metallen zusammengefasst, deren Dichte größer als  $5 \text{ g/cm}^3$  ist (Elmsley, 2001). Dazu gehören unter anderem die Edelmetalle sowie Chrom, Eisen, Nickel, Kupfer, Zink, Cadmium, Zinn, Quecksilber und Blei. Ein verändertes Umweltbewusstsein und moderne Umwelttechnik ermöglichten eine Reduktion der Schwermetallemissionen von 1990 bis 1994 um rund 30%, seither blieben die Werte annähernd konstant (Umweltbundesamt, 2006). Von den in Tab. 1.1 aufgeführten Schwermetallen ist für Blei der stärkste Rückgang verzeichnet; seit 1997 werden nur noch etwa 5% der Mengen von 1990 freigesetzt. Weitere Beispiele für Bemühungen, die Umweltbelastung durch Schwermetalle zu reduzieren, sind das seit dem Jahr 2000 geltende EU weite Verbot von verbleiten Kraftstoffen und die Herstellung quecksilberfreier Thermometer.

Bereits in geringen Konzentrationen wirken Schwermetalle toxisch im Organismus, und da sie nicht abgebaut und nur langsam ausgeschieden werden, können sie sich in der Nahrungskette anreichern. Besonders kritisch sind die Nicht-Spurenelemente Blei und Cadmium (Lüllmann *et al.*, 2006; Burger, 2008). Blei reichert sich überall dort im Körper an, wo sich Calcium befindet. Deshalb sind über 90% des in den Körper gelangten Bleis in den Knochen zu finden und die Halbwertszeit beträgt 25 Jahre. Cadmium wird nur langsam renal ausgeschieden und hat eine Halbwertszeit im Körper von 10 bis 30 Jahren. Etwa bis zum 50. Lebensjahr steigt der Cadmium-Gehalt in der Nierenrinde an, danach sinkt er. Raucher sind deutlich stärker belastet, da Zigarettenrauch eine bedeutende Quelle für dieses Schwermetall darstellt (Aktories *et al.*, 2005).

<b>Metall</b>	<b>1990</b>	<b>1994</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>
Arsen	78,8	5,0	4,6	4,8	4,7	4,6	4,7
Cadmium	11,9	2,5	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7
Kupfer	1.681,8	1.750,1	2.051,7	2.048,2	2.078,1	2.088,4	2.113,1
Chrom	90,0	24,1	29,9	30,3	30,5	31,0	31,3
Quecksilber	19,2	2,8	2,8	2,9	2,8	2,7	2,8
Nickel	250,4	163,0	95,7	107,2	108,2	110,0	108,5
Blei	1.801,3	404,7	105,9	104,7	105,9	107,2	107,7
Selen	2,1	2,1	3,6	3,7	3,8	3,9	3,9
Zink	1.593,0	1.550,2	1.829,3	1.830,0	1.859,1	1.866,5	1.885,1
<b>Summe</b>	<b>5.528,6</b>	<b>3.904,6</b>	<b>4.126,1</b>	<b>4.134,5</b>	<b>4.195,7</b>	<b>4.217,0</b>	<b>4.259,8</b>

**Tab. 1.1: Schwermetallemissionen (t) in der Bundesrepublik Deutschland**

Die Belastung der Umwelt durch industriellen Schwermetallausstoß blieb in den vergangenen Jahren seit dem Jahr 2000 weitgehend konstant, während die Aufzeichnungen in den ersten Jahren nach der Wiedervereinigung (1990 bis 1994) eine Verringerung der Emissionen um rund 30% dokumentieren. Quelle: Umweltbundesamt (2006).

Gleichzeitig sind einige Schwermetalle als Spurenelemente lebenswichtig, darunter Chrom, Eisen, Cobalt, Kupfer, Mangan, Molybdän, Nickel, Zink und Zinn. Beispiele hierfür sind Enzyme, die Metallionen als Bestandteile im aktiven Zentrum benötigen (z.B. kupferhaltige Oxidasen, zinkhaltige Carboxypeptidasen oder die nickelhaltige Urease), das zentrale Eisenatom im Häm oder das Mangan im Photosystem II für die Photooxidation des Wassers (Grill and Zenk, 1989). Schwermetalle liegen hauptsächlich in tieferen Schichten der Erdkruste und werden natürlicherweise erst durch Verwitterung oder Vulkanismus freigesetzt. Im Zuge der Industrialisierung und später durch steigenden Verkehr nahm die Belastung der Umwelt mit Schwermetallen stark zu (Nriagu and Pacyna, 1988).

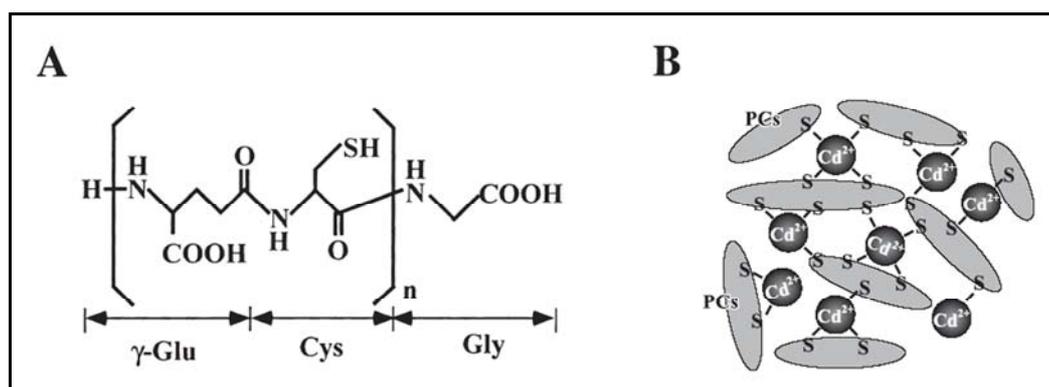
Sowohl Pflanzen als auch Tiere haben Mechanismen entwickelt, um für eine Aufrechterhaltung der Metallhomöostase zu sorgen. Dafür ist es von besonderer Bedeutung, im Überschuss vorhandene Metallionen abzufangen und somit eine Vergiftung des Organismus, speziell durch Inhibierung von Enzymen, zu verhindern. Diese Aufgabe haben die Metall bindenden Peptide mit den Bezeichnungen Metallothioneine und Phytochelatine.

### 1.1.1 Metallothioneine

Als erste Metall bindende Peptide wurden die Metallothioneine aus der Pferdeniere isoliert (Margoshes and Valee, 1957; Kagi and Valee, 1960). Bei diesen handelt es sich um kurze, cysteinreiche Peptide mit Molekulargewichten im Bereich von 4 bis 14 kDa und einem Cystein-Anteil von bis zu 30 Molprozent. Im Gegensatz zu Glutathion (GSH) und den Phytochelatinen (PCs) sind sie gencodiert und werden an Ribosomen synthetisiert. Sie kommen in fast allen Tieren und Pflanzen und in einigen Prokaryoten vor. Nach der Verteilung der Cysteinreste im Molekül und unter Berücksichtigung taxonomischer Merkmale werden sie in verschiedene Metallothionein-Klassen eingeteilt (Fowler *et al.*, 1987; Binz and Kagi, 1999; Cobbett and Goldsbrough, 2002).

### 1.1.2 Phytochelatine

Diese zweite Gruppe Metall bindender Peptide wurde zuerst in der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* entdeckt und als Cadystine bezeichnet (Kondo *et al.*, 1984). Kurz darauf wurden sie in Pflanzen nachgewiesen und unter der heute gängigen Bezeichnung Phytochelatine als wichtige Schwermetall bindende Peptide in Pflanzen beschrieben (Grill *et al.*, 1985). Die Struktur der Phytochelatine (PCs), die im Wesentlichen aus repetitiven  $\gamma$ -Glu-Cys-Einheiten bestehen, legte nahe, dass diese thiolreichen Ketten aus GSH gebildet werden. In der Folge konnte dies bestätigt und auch das für die Synthese der PCs verantwortliche Enzym, die Phytochelatinsynthase (PCS), erstmals aufgereinigt und charakterisiert werden (Grill *et al.*, 1989).



**Abb. 1.1: Komplexbildung von Metallionen durch Phytochelatine**

(A) Allgemeine Strukturformel der Phytochelatine. Sie bestehen aus repetitiven  $\gamma$ -Glu-Cys-Einheiten ( $n = 2-11$ ) mit einem C-terminalen Glycin. (B) Komplexbildung von  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen, die mit einem bis maximal vier Schwefelatomen der Phytochelatine in Wechselwirkung treten können. Dabei entstehen amorphe PC- $\text{Cd}^{2+}$ -Komplexe. Abbildung entnommen aus einem Review-Artikel von Hirata und Mitarbeitern (Hirata *et al.*, 2005).

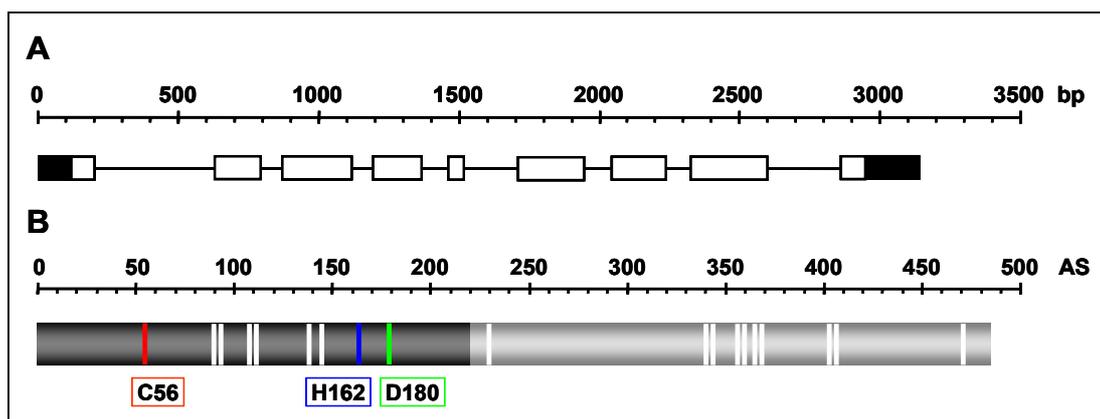
PCs werden aus GSH aufgebaut. Unter Abspaltung des C-terminalen Glycins eines GSH-Moleküls (Donormolekül) katalysiert die PCS die Knüpfung einer Peptidbindung zwischen dem Cystein des Donormoleküls und dem Glutamat des Akzeptormoleküls (GSH oder bereits bestehende PC-Kette) und somit die Polykondensation von  $\gamma$ -Glu-Cys-Einheiten zu PCs (Grill *et al.*, 1989; Vatamaniuk *et al.*, 2004). Diese haben die allgemeine Strukturformel  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ;  $n=2-11$  (Zenk, 1996).

### 1.1.3 Phytochelatinsynthese

Die Phytochelatinsynthese (EC 2.3.2.15) wurde wenige Jahre nach Entdeckung der PCs erstmals isoliert und charakterisiert (Grill *et al.*, 1989). Zehn Jahre später wurde das zugehörige Gen gleichzeitig von drei Arbeitsgruppen kloniert (Clemens *et al.*, 1999; Ha *et al.*, 1999; Vatamaniuk *et al.*, 1999). Die katalysierte Reaktion definiert das Enzym als Dipeptidyltranspeptidase und anhand von Datenbankanalysen und Sequenzvergleichen wurde sie in die Familie der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen eingruppiert.

#### 1.1.3.1 Struktur und Funktionsweise des Enzyms

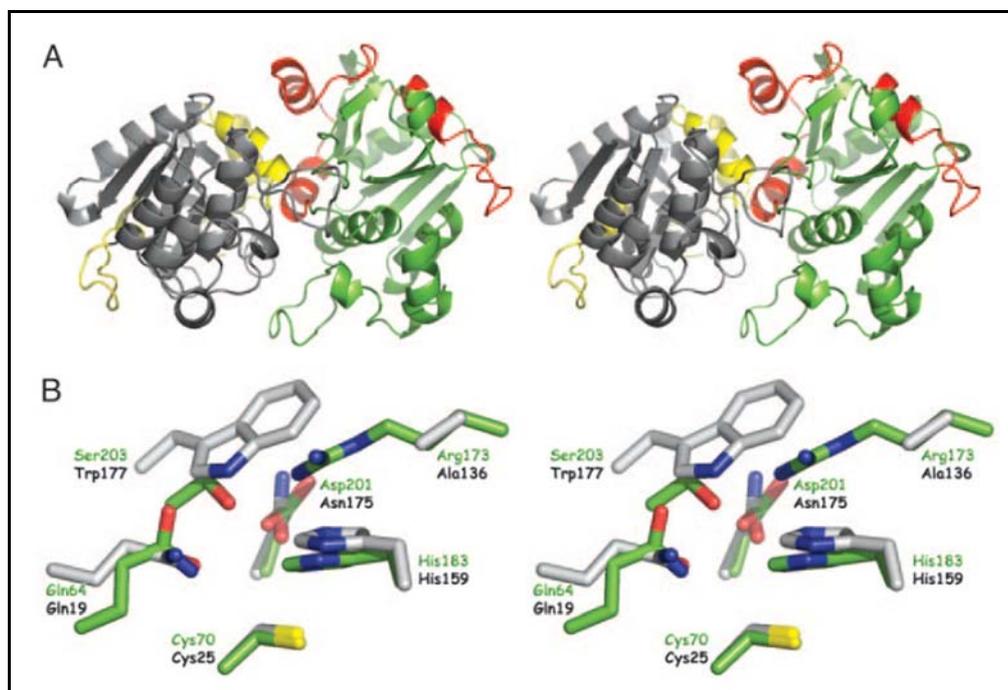
AtPCS1 (At5g44070) besitzt zwei etwa gleich große Domänen (Abb. 1.2 B). Der N-Terminus bildet den Bereich mit katalytischer Aktivität, während die andere Hälfte als cysteinreicher C-Terminus Proteinstabilität zu vermitteln scheint und als Schwermetallsensor und Aktivitätsregulator fungiert (Tsuji *et al.*, 2005; Vestergaard *et al.*, 2008).



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Gen- und Proteinstruktur von AtPCS1**(A) Das Gen von *AtPCS1* besteht aus 9 Exons (weiße Boxen) und 8 Introns (Linien). Die Länge beträgt einschließlich der untranslatierten Bereiche (schwarze Boxen) 3102 bp.

(B) Schematische Darstellung des AtPCS1-Proteins (54,5 kDa). Der N-Terminale Teil (AS 1-221) ist dunkel, der C-Terminale Teil (AS 222-485) ist hell dargestellt. Cysteinreste sind als weiße Balken gekennzeichnet. Die katalytische Triade bestehend aus Cys56, His162 und Asp180 ist farblich markiert.

Von einem PCS-ähnlichen Protein, das Strukturhomologien zur katalytischen Domäne von AtPCS1 aufweist, wurde von einer Arbeitsgruppe aus Frankreich die Proteinstruktur aufgeklärt (Abb. 1.3) (Vivares *et al.*, 2005). Es handelt sich hierbei um das Protein alr0975 aus dem Cyanobakterium *Nostoc sp.* (*Anabaena sp.*) PCC 7120, im Weiteren als NsPCS bezeichnet (Harada *et al.*, 2004; Tsuji *et al.*, 2004). Aufgrund der Ähnlichkeit seiner Proteinstruktur mit der Bleomycin-Hydrolase und Staphopain lässt sich NsPCS in die Superfamilie der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen eingruppierten. Die dreidimensionale Überlagerung der Proteinstrukturen von Papain und NsPCS (Abb. 1.3 B) zeigt eindeutig, dass die für Cysteinproteasen charakteristische katalytische Triade bestehend aus Cystein, Histidin und Aspartat in NsPCS konserviert ist (Vivares *et al.*, 2005). Dem direkten Sequenzvergleich von AtPCS1 mit NsPCS zufolge entspricht die katalytische Triade in AtPCS1 (Abb. 1.2) den Resten Cys56, His162 und Asp180 (Rea, 2006). In Mutagenesestudien konnte gezeigt werden, dass der gezielte Austausch von Aminosäuren an diesen Positionen die Aktivität von AtPCS1 zerstört (Rea 2004, Romanyuk 2006). Diese katalytische Triade ist in allen bisher näher untersuchten homologen PCS-Proteinen konserviert, wie es für funktional wichtige Aminosäuren zu erwarten ist.



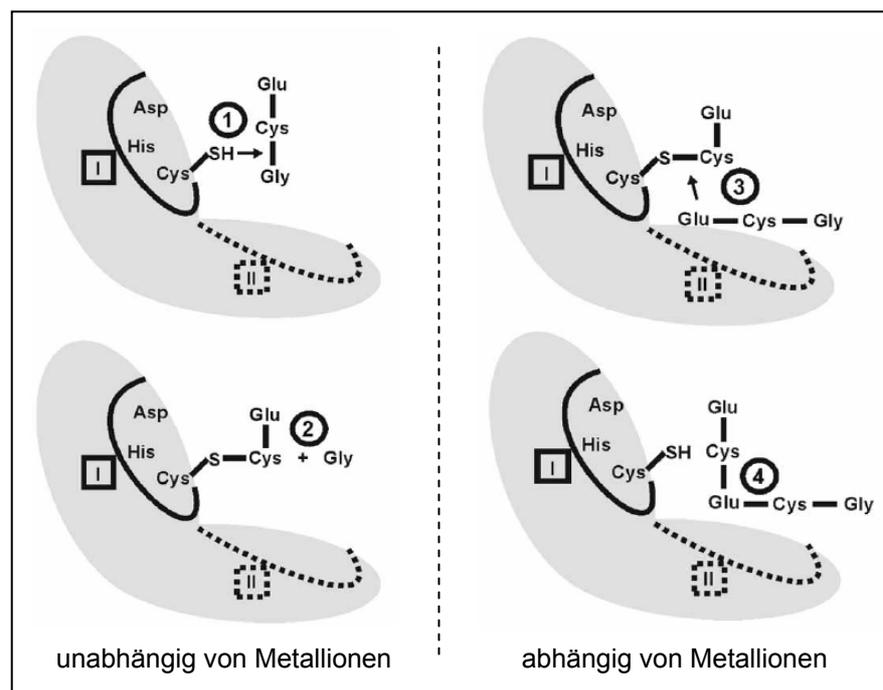
**Abb. 1.3: Proteinstruktur des NsPCS-Dimers und Vergleich mit Papain-Proteasen**

(A) Stereobild eines NsPCS-Dimers, die Monomere sind in grau bzw. grün dargestellt. Zusätzliche Sekundärstrukturen jedes Monomers im Vergleich zur Faltung von papainartigen Proteasen sind gelb bzw. rot eingefärbt.

(B) In diesem zweiten Stereobild sind die für die Proteinaktivität verantwortlichen Reste von NsPCS (grün) und Papain (weiß) räumlich überlagert, dabei ist die große Übereinstimmung deutlich zu erkennen. Die Abbildung wurde aus Vivares *et al.* (2005) entnommen.

AtPCS1 wirkt als Dipeptidyltranspeptidase (Glutathion  $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-Transpeptidase). Das aktuelle Modell für den Ablauf der katalysierten Reaktion ist in Abb. 1.4 dargestellt (Clemens, 2006). An der Bindestelle I im N-Terminus erfolgt die Acylierung des hochkonservierten Cys56. Dies entspricht der Bindung eines Glutathion-Donormoleküls am C1-Atom des Cysteins, wobei das Glycin abgespalten wird. Diese beiden ersten Schritte sind von Metallionen unabhängig.

An einer weiteren Bindestelle im C-Terminus wird das Akzeptormolekül gebunden (GSH oder bereits vorhandenes PC) und das  $\gamma$ -Glu-Cys Dipeptid von Bindestelle I auf das Akzeptormolekül übertragen und eine neue Peptidbindung geknüpft. Die beiden letzten Schritte bedürfen der Aktivierung durch Metallionen oder der Bindung von Glutathion-Metall-Komplexen (Vatamaniuk *et al.*, 2000; Rea *et al.*, 2004; Clemens, 2006; Rea, 2006). Die Bindestelle II wurde noch nicht identifiziert und fehlt wahrscheinlich in prokaryotischen PCS-ähnlichen Proteinen, die nur die Abspaltung des Glycins von GSH katalysieren.



**Abb. 1.4: Modellvorstellung zum Ablauf der Phytochelatinsynthese**

Das Modell geht davon aus, dass Phytochelatinsynthasen zwei Substratbindestellen (I und II) besitzen und die katalysierte Reaktion in vier Schritten abläuft. Das Substrat GSH gelangt im N-Terminus in den Bereich der Substratbindestelle I (1). Es kommt zur Acylierung des Cysteinrests der katalytischen Triade, wobei das Glycin abgespalten und  $\gamma$ -Glu-Cys gebunden wird (2). Das Dipeptid wird auf ein GSH oder auf eine bestehende PC-Kette übertragen (3) und eine Peptidbindung geknüpft (4). Verändert nach Clemens (2006).

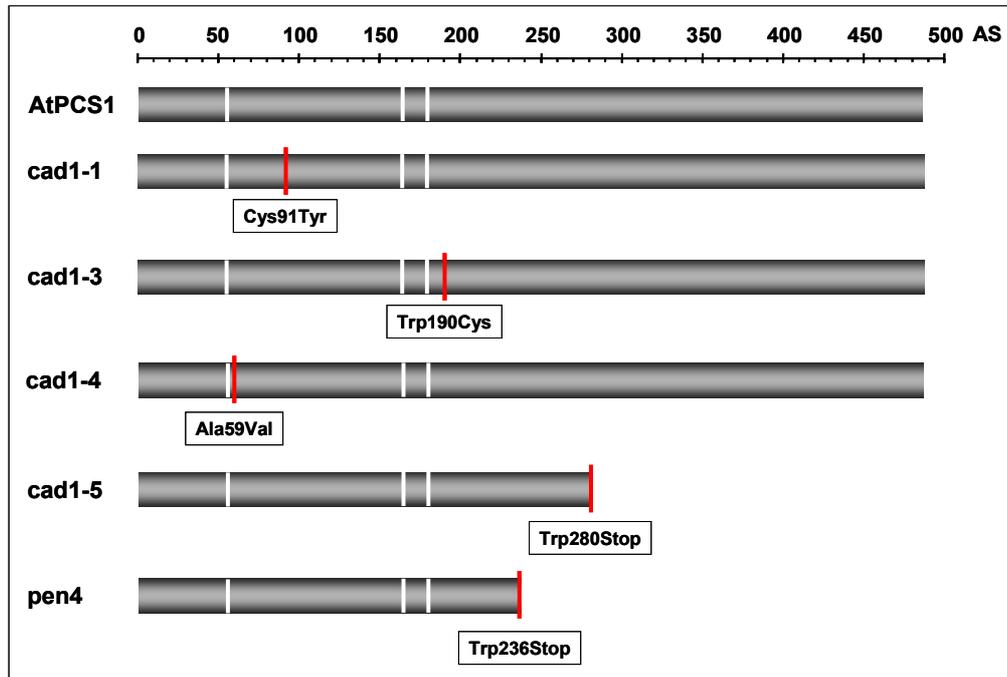
Bestimmte Pflanzen bilden GSH-Isoformen ( $\gamma$ -Glu-Cys)-Xaa, wobei Xaa für  $\beta$ -Alanin, Serin, Glutamat oder Glutamin stehen kann. In diesen Fällen synthetisiert die PCS daraus die entsprechenden PC-Isoformen, z.B. Homophytochelatine in Leguminosen mit einem C-terminalen  $\beta$ -Alanin (Zenk, 1996; Oven *et al.*, 2002; Loscos *et al.*, 2006).

### 1.1.3.2 Bisher beschriebene *AtPCS1*-Mutanten

Die Isolierung des Gens für *AtPCS1* aus *Arabidopsis* erfolgte auf dem klassischen Weg eines *forward genetics* Ansatzes. Untersuchung von EMS-mutagenisierten *Arabidopsis*-Pflanzen hinsichtlich ihrer Cd-Toleranz führte zur Isolierung von Cd-sensitiven Linien, die als *cad1* bezeichnet wurden (Howden and Cobbett, 1992; Howden *et al.*, 1995b). Es wurde postuliert, dass in diesen Pflanzen ein Defekt im Gen der Phytochelatinsynthese (CAD1) vorliegt.

In den *cad1*-Mutanten korrelierte die Sensitivität gegenüber Cadmium mit der Menge an gebildeten PCs. Am sensitivsten sind *cad1-3* und *cad1-4*, wobei in *cad1-3* keine PCs und in *cad1-4* 8% der Wildtypmenge detektiert wurden. In *cad1-1* und *cad1-5* waren 25% bzw. 33% des Wildtyplevels an PCs detektierbar, diese beiden Mutanten waren auch weniger Cd-sensitiv als *cad1-3* und *cad1-4* (Howden *et al.*, 1995b).

Zusätzlich wurde eine weitere Mutante isoliert und als *cad2* bezeichnet (Howden *et al.*, 1995a). Der Phänotyp von *cad2* ist ein erniedrigter GSH-Gehalt und in der Folge kommt es zu eingeschränkter PC-Synthese und verminderter Cd-Toleranz. Im Gegensatz dazu wiesen die *cad1*-Linien einen dem Wildtyp entsprechenden GSH-Gehalt auf, zeigten jedoch verminderte PC-Synthese. Dies ließ bereits vor der Isolierung des Gens für *AtPCS1* auf die Funktion von CAD1 als Phytochelatinsynthese schließen (Howden *et al.*, 1995a). Der Defekt in *cad2* hingegen musste den GSH-Biosyntheseweg betreffen. Drei Jahre später wurde herausgefunden, dass *cad2* eine Deletion von 6bp in Exon 8 des Gens der  $\gamma$ -Glu-Cys-Synthetase (*GSH1*) aufweist (Cobbett *et al.*, 1998) und schließlich gelang es drei Gruppen, unabhängig voneinander das *cad1*-Gen zu klonieren und die Funktion des heterolog exprimierten Genprodukts als Phytochelatinsynthese zu bestätigen (Clemens *et al.*, 1999; Ha *et al.*, 1999; Vatamaniuk *et al.*, 1999). Damit erwiesen sich die Vermutungen als richtig und die Punktmutationen in den *cad1*-Linien konnten identifiziert werden (Abb. 1.5).

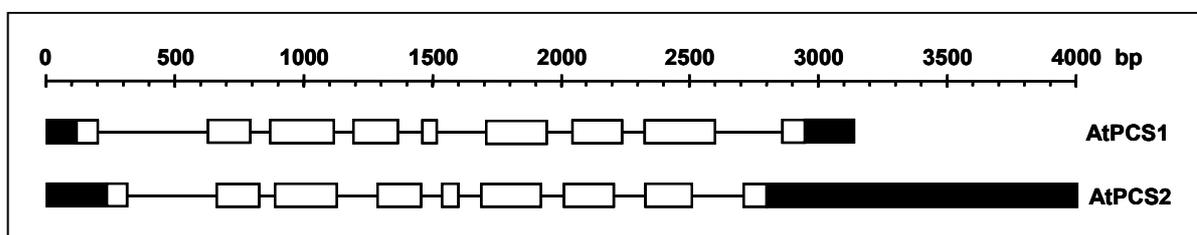


**Abb. 1.5: Darstellung der veränderten Genprodukte in AtPCS1-Mutanten**

Durch Mutagenesescrines wurden die cad1-Mutanten und pen4 isoliert, die alle Punktmutationen (rote Balken) im Gen für *AtPCS1* aufweisen. Bei cad1-5 und pen4 kommt es durch die Punktmutationen zu vorzeitigen Stop-Codons, wodurch C-terminal verkürzte Proteine entstehen. Die Skala gibt die Anzahl der Aminosäuren an (*AtPCS1*: 485 AS). Weiße Balken markieren die katalytische Triade der N-terminalen Domäne (Cys56, His162, Asp180). Die Abbildung wurde nach den Angaben in Ha *et al.* (1999) erstellt.

### 1.1.3.3 Es gibt zwei Phytochelatinsynthasen in Arabidopsis

Bei der Analyse des Genoms von *Arabidopsis thaliana* wurde ein zweites Gen gefunden, das für ein *AtPCS1*-homologes Protein codiert und als *AtPCS2* (At1g03980) bezeichnet wurde (Cazale and Clemens, 2001). Die Exon-/Intron-Struktur der beiden *PCS*-Gene ist in Abb. 1.6 dargestellt.



**Abb. 1.6: Vergleich der beiden Gene für AtPCS1 und AtPCS2**

Die Exon-/Intron-Struktur der beiden Gene ist sehr ähnlich, der auffälligste Unterschied sind die längeren UTR-Bereiche (schwarze Balken) von *AtPCS2*. Exons sind durch weiße Balken, Introns durch Linien gekennzeichnet.

Beide Gene besitzen 9 Exons und folglich 8 Introns. *AtPCS1* besteht aus 485 Aminosäuren (54,5 kDa), bei *AtPCS2* sind es 452 (51,6 kDa), da u.a. im C-Terminus im

Vergleich zu *AtPCS1* 30 Aminosäuren fehlen. Ein weiterer Unterschied besteht in den Längen der untranslatierten Bereiche (UTR), besonders im 3'-Bereich: Der 5'-UTR von *AtPCS1* hat eine Länge von 118 bp und der 3'-UTR 167 bp, bei *AtPCS2* sind es entsprechend 237 bp bzw. 1204 bp. Die geringe Sequenzübereinstimmung in den Introns der beiden Gene von durchschnittlich 32% deutet darauf hin, dass es sich hierbei nicht um das Produkt einer unlängst aufgetretenen Genduplikation handelt, sondern dass die beiden Gene schon länger im Genom von *Arabidopsis* parallel existieren (TAGI, 2000; Cazale and Clemens, 2001). Die Übereinstimmung der Exonsequenzen hingegen beträgt 84%. Versuche mit Hefe konnten zeigen, dass es sich bei *AtPCS2* um eine vollständig funktionsfähige Phytochelatinsynthase handelt (Cazale and Clemens, 2001).

Ein großer Unterschied besteht in den Promotorbereichen der beiden Gene. Bei *AtPCS1* beträgt der Abstand zum vorherigen Gen (*At5g44060*, unbekanntes Protein) 3200 bp, bei *AtPCS2* sind es jedoch nur 550 bp (vorheriges Gen *At1g03982*, unbekanntes Protein). Über eine exakte Promotoranalyse ist nichts bekannt, jedoch lässt sich daraus schließen, dass der Promotor für *AtPCS2* deutlich kürzer ist oder mit dem vorhergehenden offenen Leseraster überlappt. Einer Veröffentlichung über bisher nicht beschriebene kodierende Sequenzen zufolge befindet sich jedoch auch im Promotorbereich von *AtPCS1*, 1165 bp vor dem Startcodon, ein sogenannter *small open reading frame* (Hanada *et al.*, 2007). Die Funktion des möglichen Genprodukts ist jedoch unbekannt. Ein koreanisches Labor untersuchte die Möglichkeit, die durch dysfunktionale *AtPCS1* bedingte verminderte Cd-Toleranz in *cad1-3* durch das Gen für *AtPCS2* zu komplementieren (Lee and Kang, 2005). Das Ergebnis war, dass *AtPCS2* den Mutantenphänotyp nur dann komplementieren konnte, wenn das Gen nicht unter der Kontrolle seines eigenen, offensichtlich zu schwachen Promotors stand, sondern durch ein 2kb langes endogenes Promotorfragment von *AtPCS1* oder den CaMV 35S-Promotor kontrolliert wurde. Somit scheint *AtPCS2* zwar voll funktionsfähig zu sein, aber zu schwach exprimiert, um einen Beitrag zur Schwermetalltoleranz *in planta* zu leisten.

Für weitere PCS-Gene in *Arabidopsis* gibt es keine Hinweise. Bei Datenbankrecherchen in der *conserved domains database* (Marchler-Bauer *et al.*, 2007; Finn *et al.*, 2008) stößt man zwar auf eine 184 AS umfassende Domäne mit der Bezeichnung „pfam04833: Phytochelatin synthetase-like conserved region“ (Leuchter *et al.*, 1998; Al-Lahham *et al.*, 1999), aber dabei handelt es sich um einen Irrtum (Roudier *et al.*, 2002). Besagte Domäne zeichnet eine Familie von Proteinen in *Arabidopsis* mit der Bezeichnung COBRA (COB) bzw. COB-like aus, die durch einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker mit der Zellmembran verbunden sind und bei der postembryonalen Morphogenese eine wichtige Funktion besitzen (Schindelman *et al.*, 2001; Borner *et al.*, 2003; Roudier *et al.*, 2005).

Eine Reihe konservierter Cysteinreste in COB-Proteinen hat entweder die Aufgabe, Disulfidbrücken auszubilden oder Metallionen zu binden (Roudier *et al.*, 2002). Diese Cysteinreste bedingten wohl auch die beobachtete Komplementation einer PCS-defizienten Mutante von *S. pombe* mit einer verkürzten COB-cDNA (Leuchter *et al.*, 1998). Die COB-Proteine haben daher nach bisherigen Erkenntnissen nichts mit der Synthese von Phytochelatinen zu tun.

#### 1.1.3.4 Homologe Proteine in anderen Organismen

Bei der Suche in der bereits erwähnten *conserved domains database* (Marchler-Bauer *et al.*, 2007) mit dem Stichwort *phytochelatin synthase* stößt man auf über 40 Einträge von Spezies mit PCS-ähnlichen Proteinen. Die Homologie bezieht sich auf die Pfam-Domäne 05023 in AtPCS1 (Finn *et al.*, 2008), welche einen Bereich von 133 AS im konservierten N-Terminus umfasst (Harada *et al.*, 2004).

Teilweise wurden die Gene dieser Proteine auch schon kloniert und charakterisiert, beispielsweise aus Weizen (*Triticum aestivum*) (Clemens *et al.*, 1999), dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Clemens *et al.*, 2001; Vatamaniuk *et al.*, 2001), der Spalthefe *S. pombe* (Clemens *et al.*, 1999) und dem Cyanobakterium *Nostoc sp.* PCC 7120 (Harada *et al.*, 2004; Tsuji *et al.*, 2004). Im Gegensatz zur Spalthefe besitzt die Bierhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) kein PCS-homologes Protein; hier sind es die zwei Serin-Carboxypeptidasen CPY und CPC, die für die PC-Synthese verantwortlich sind (Wünschmann *et al.*, 2007).

Wie bereits ausgeführt, ist das cyanobakterielle Protein NsPCS (alr0975) besonders interessant, da von diesem die Proteinstruktur aufgeklärt und damit Position und proteinsystematische Eingruppierung der katalytischen Triade von Phytochelatinsynthasen eindeutig bestätigt werden konnte (Vivares *et al.*, 2005). NsPCS besteht aus 242 Aminosäuren und entspricht somit dem N-terminalen Bereich von AtPCS1. In zwei parallelen Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass NsPCS *in vitro* GSH zu  $\gamma$ -Glu-Cys abbaut, jedoch keine oder nur sehr geringe Mengen an Phytochelatinen synthetisiert (Harada *et al.*, 2004; Tsuji *et al.*, 2004).

Japanische Forscher exprimierten *AtPCS1* in Embryos des Zebrafisches (*Danio rerio*) (Konishi *et al.*, 2006). Das in den Embryonen gebildete Protein war funktional und vermittelte die Synthese von Phytochelatinen und eine erhöhte Cd-Toleranz. Somit besitzen AtPCS1 und Phytochelatine auch in höher organisierten Tieren (Vertebraten) ihre bekannte Funktion und möglicherweise sind außer in *C. elegans* (Vatamaniuk *et al.*, 2001) auch in anderen Tierarten PCS-homologe Proteine und Phytochelatine zu finden.

Spezies	Zusatz	AS	Referenzen
<i>Burkholderia mallei</i>	SAVP1	347	
<i>Burkholderia phytofirmans</i>	PsJN	329	
<b><i>Nostoc sp. (Anabaena sp.)</i></b>	PCC 7120	242	(Harada <i>et al.</i> , 2004; Tsuji <i>et al.</i> , 2004)
<i>Nostoc punctiforme</i>	PCC 73102	183	
<i>Prochlorococcus marinus</i>	str. MIT 9303	249	
<i>Synechococcus sp.</i>	WH 5701	271	
<i>Anabaena variabilis</i>	ATCC 29413	239	
<b><i>Bradyrhizobium japonicum</i></b>	USDA 110	220	(Rea <i>et al.</i> , 2004) J. Wünschmann, persönl. Mitteilung
<i>Sinorhizobium medicae</i>	WSM419	218	
<i>Dechloromonas aromatica</i>	RCB	266	
<i>Saccharophagus degradans</i>	2-40	319	
<b><i>Tetrahymena thermophila</i></b>	SB210	446	(Amaro <i>et al.</i> 2005, EMBL database, unpublished)
<b><i>Schizosaccharomyces pombe</i></b>	972h-	414	(Clemens <i>et al.</i> , 1999)
<b><i>Caenorhabditis elegans</i></b>		371	(Clemens <i>et al.</i> , 2001; Vatamaniuk <i>et al.</i> , 2001)
<i>Athyrium yokoscense</i>		488	
<b><i>Pteris vittata</i></b>		476	(Dong, 2005)
<b><i>Arabidopsis thaliana (AtPCS1)</i></b>	(L.) Heynh.	485	(Clemens <i>et al.</i> , 1999; Ha <i>et al.</i> , 1999; Vatamaniuk <i>et al.</i> , 1999)
<b><i>Arabidopsis thaliana (AtPCS2)</i></b>	(L.) Heynh.	452	(Cazale and Clemens, 2001)
<b><i>Brassica juncea</i></b>		485	(Heiss <i>et al.</i> , 2003)
<b><i>Thlaspi caerulescens</i></b>		485	(Bernard <i>et al.</i> , 2004)
<b><i>Glycine max</i></b>		498	(Oven <i>et al.</i> , 2002)
<b><i>Lotus japonicus</i></b>		477	(Ramos <i>et al.</i> , 2007; Ramos <i>et al.</i> , 2008)
<b><i>Nicotiana tabacum</i></b>		501	(Nakazawa <i>et al.</i> , 2002)
<b><i>Solanum tuberosum</i></b>		503	(Stroinski and Zielezinska, 2001)
<b><i>Lycopersicon esculentum</i></b>		?	(Chen <i>et al.</i> , 1997)
<b><i>Lactuca sativa</i></b>		490	(He <i>et al.</i> , 2005)
<i>Allium sativum</i>		506	
<b><i>Triticum aestivum</i></b>		500	(Clemens <i>et al.</i> , 1999)
<b><i>Oryza sativa</i></b>		473	(Li <i>et al.</i> , 2007)

**Tab. 1.2: Arten mit PCS-homologen Proteinen**

Die Anzahl der Aminosäuren (AS) der homologen Proteine ist angegeben. Die angeführten Referenzen enthalten Arbeiten zur Charakterisierung des jeweiligen Proteins oder Gens. Die Suche nach Arten mit PCS-homologen Proteinen wurde mit der *conserved domains database* (Marchler-Bauer *et al.* 2007) durchgeführt.

## 1.2 Herbizide und ihre Entgiftung in Pflanzen

Seit die Menschen bestimmte Pflanzen für ihre Ernährung oder zu anderweitiger Verwendung anbauen, besteht das Problem des Schutzes solcher Kulturpflanzen vor mikrobiellen oder tierischen Schädlingen (Hock *et al.*, 1995). Doch auch die Konkurrenz zwischen Nutzpflanzen und Unkräutern (Ackerbegleitflora) führt zu Ertragsverlusten. Im integrierten Pflanzenbau gehört neben anbau- und kulturtechnischen, züchterischen, mechanischen und biologischen Maßnahmen auch der Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln (Herbiziden) zum Produktionsablauf (Hock *et al.*, 1995).

Die Anzahl der Pflanzenschutzmittel (PSM), die durch das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) zugelassen sind, hat sich in den Jahren 2000 bis 2006 von 1.130 auf 678 verringert, darunter Herbizide von 352 auf 227 (BMELV, 2007). Der Inlandsabsatz von PSM blieb hingegen in den letzten 10 Jahren weitgehend konstant (Tab. 1.3). In Deutschland wurden im Jahr 2006 rund 38.700 t PSM eingesetzt, davon entfielen allein 17.000 t auf Herbizide. Im Jahr 1998 waren es rund 38.800 t PSM, davon 17.300 t Herbizide.

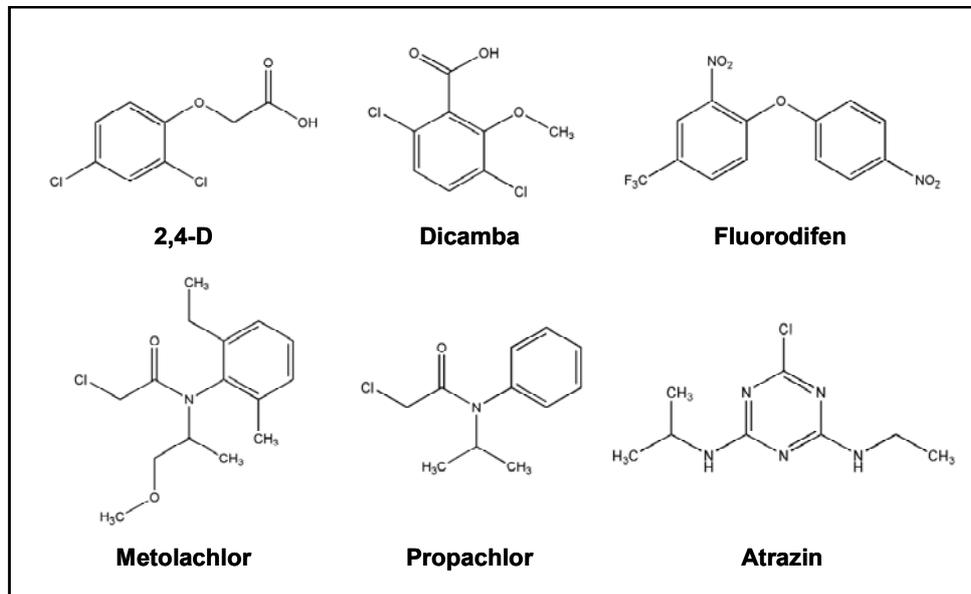
Wirkstoff	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Herbizide	16.610	14.942	14.328	15.350	15.923	14.698	17.015
Insektizide/Akarizide	6.111	6.518	5.889	6.370	7.328	6.809	7.780
davon CO <sub>2</sub> und N <sub>2</sub> <sup>1)</sup>	5.266	5.778	5.147	5.591	6.246	5.982	6.967
Fungizide	9.641	8.246	10.129	10.033	8.176	10.184	10.251
Sonstige	3.232	3.957	4.332	4.002	3.704	3.803	3.740
<b>Summe</b>	<b>35.594</b>	<b>33.663</b>	<b>34.678</b>	<b>35.755</b>	<b>35.131</b>	<b>35.494</b>	<b>38.786</b>

**Tab. 1.3: Inlandsabsatz (t) an Wirkstoffen in Pflanzenschutzmitteln**

Knapp die Hälfte der in den letzten Jahren ausgebrachten Menge an Pflanzenschutzmitteln entfiel auf Herbizide. <sup>1)</sup> Als inerte Gase im Vorratsschutz eingesetzt. Quelle: BMELV (2007).

Viele wirtschaftlich bedeutsame Herbizide werden in Pflanzen über die Konjugation mit Glutathion entgiftet, da sie als Voraussetzung eine sog. *leaving group* besitzen, die durch die Aktivität von Glutathion S-Transferasen durch GSH substituiert wird (Hock *et al.*, 1995). Abb. 1.7 zeigt einige wichtige Herbizide mit ihrer Molekülstruktur. In der Gruppe der Chloracetamide (z.B. Metolachlor und Propachlor) und Chlortriazine (z.B. Atrazin, eines der meistangewendeten Herbizide überhaupt) ist es, wie der Name schon sagt, ein Chloratom, das bei der Konjugation durch GSH ersetzt wird. Aber auch Nitrodiphenylether

(z.B. Fluorodifen) und Herbizide mit Auxinwirkung (z.B. 2,4-D oder Dicamba) besitzen Halogenatome als elektrophile Zentren und werden als GS-Konjugate entgiftet.

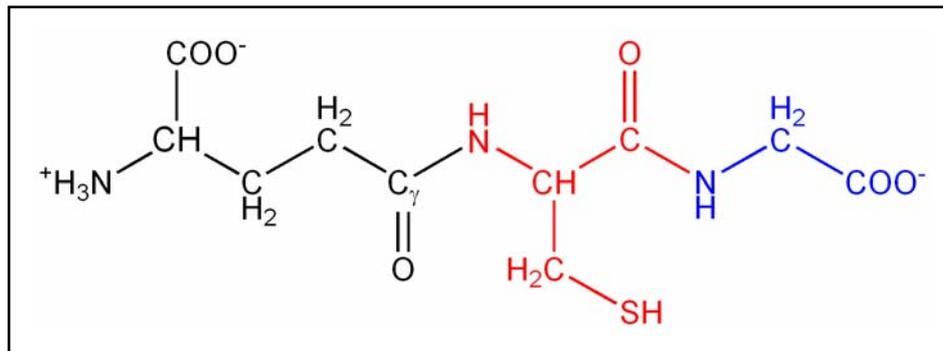


**Abb. 1.7: Herbizide, die über GS-Konjugation entgiftet werden**

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) und Dicamba besitzen Auxinwirkung in Dikotylen. Fluorodifen ist ein Beispiel für einen Nitrodiphenylether; diese Klasse von Herbiziden hemmt bevorzugt in dikotylen Unkräutern die Protoporphyrinogen-Oxidase (PPGO). Metolachlor und Propachlor sind Vertreter der Chloracetamide, die verstärkt in Monokotylen durch Hemmung von Zellwachstum und Zellteilung die Keimlingsentwicklung inhibieren. Atrazin ist das bekannteste Herbizid aus der Gruppe der Chlortriazine, deren Wirkung auf der Blockierung der Plastochinon Q<sub>B</sub>-Bindestelle am D1-Protein im Photosystem II beruht (Hock *et al.*, 1995).

### 1.2.1 Glutathion

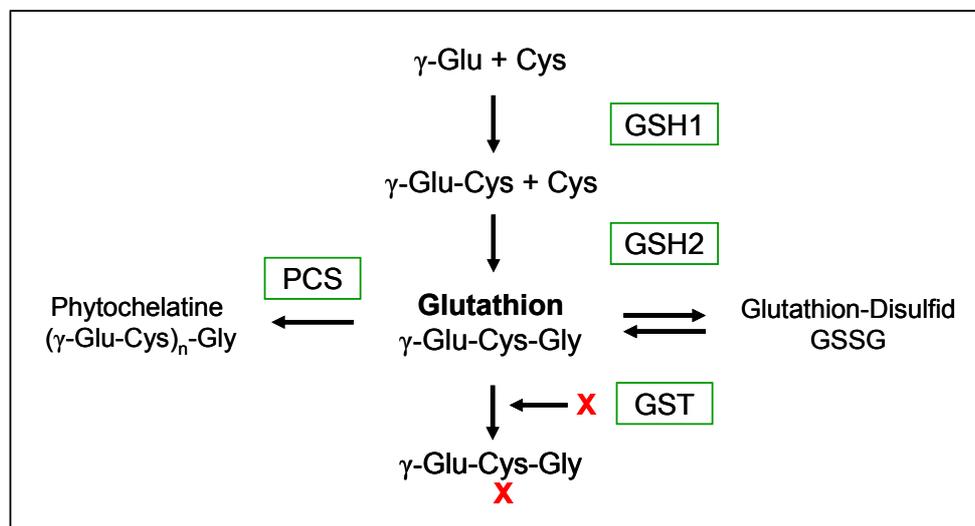
Das Tripeptid Glutathion ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly, ECG, GSH) ist in tierischen, pflanzlichen und Mikroorganismen nahezu ubiquitär vorhanden. Als Besonderheit weist GSH eine atypische Peptidbindung zwischen dem N-terminalen Glutamat und dem Cystein auf, die dem Molekül große Stabilität verleiht (May *et al.*, 1998). Es ist nämlich nicht die  $\alpha$ -, sondern die  $\gamma$ -Carboxygruppe des Glutamats mit der Aminogruppe des Cysteins peptidisch verbunden (Abb. 1.8). Deshalb liegt es in zellulären Konzentrationen von 0,1 bis 10 mM vor und ist damit das häufigste unter den so genannten *low molecular weight thiols* (Thiole mit geringem Molekulargewicht). GSH kann in Zellen bis zu 90% des nicht in Proteinen enthaltenen Schwefels ausmachen (Meister, 1988b; a). GSH wird nicht ribosomal synthetisiert. Vielmehr wird das Tripeptid in zwei ATP-verbrauchenden Schritten von den Enzymen  $\gamma$ -Glu-Cys-Synthetase (GSH1, EC 6.3.2.2) und Glutathion-Synthetase (GSH2, EC 6.3.2.3) aufgebaut (Hell and Bergmann, 1988; 1990), die in Arabidopsis beide von nur jeweils einem Gen codiert werden (Wachter *et al.*, 2005).



**Abb. 1.8: Strukturformel von Glutathion**

Das Tripeptid Glutathion besteht aus den Aminosäuren Glutamat (schwarz), Cystein (rot) und Glycin (blau). Das N-terminale Glutamat ist über seine  $\gamma$ -Carboxygruppe über eine isopeptidische Bindung mit dem Cystein verbunden.

GSH1 ist in Arabidopsis ausschließlich in Plastiden lokalisiert, während GSH2 hauptsächlich im Cytoplasma und nur zu einem geringen Teil in Plastiden zu finden ist (Wachter *et al.*, 2005). Die entscheidende funktionelle Gruppe im GSH-Molekül ist die Thiolgruppe des Cysteins mit stark nukleophilen Eigenschaften. Sie begründet die Eigenschaft von GSH als wichtiges multifunktionales Molekül im Zellstoffwechsel (Abb. 1.9).



**Abb. 1.9: Glutathion als multifunktionales Molekül im Zellstoffwechsel**

Glutathion (GSH) wird in zwei ATP verbrauchenden Schritten synthetisiert. Dargestellt sind drei wichtige Funktionen von GSH: Es dient als Baustein für die Polykondensation zu Phytochelatinketten, stellt ein wichtiges Redoxsystem dar und ist Bestandteil von GS-Konjugaten. GSH1,  $\gamma$ -Glutamylcystein Synthetase; GSH2, Glutathion-Synthetase; PCS, Phytochelatinsynthase; GSSG, oxidiertes Glutathion (Glutathion-Disulfid); X, elektrophiles Molekül; GST, Glutathion S-Transferase.

### **Glutathion ist Teil eines wichtigen Redoxsystems**

Zusammen mit der GSH-Peroxidase (EC 1.11.1.9) und der GSH-Reduktase (EC 1.8.1.7) stellt GSH ein bedeutendes Redoxsystem in der Zelle zum Schutz vor oxidativem Stress dar (Noctor *et al.*, 2002). Über die Thiolgruppen können zwei GSH-Moleküle eine Disulfidbrücke bilden (GSSG, oxidiertes Zustand), während die GSH-Peroxidase gleichzeitig z.B. Lipidperoxide oder oxidierte Alkylketten von Proteinen reduziert. Das Enzym GSH-Reduktase vermag zwei oxidierte GSH-Moleküle (GSSG) unter Verbrauch von NADPH zu reduzieren und die Ausgangssituation wieder herzustellen. Pflanzen besitzen keine selenhaltige GSH-Peroxidase, aber GSH ist ein Substrat für pflanzliche Peroxiredoxine (Rouhier *et al.*, 2002; Dietz, 2003; Iqbal *et al.*, 2006) und GSTs mit Peroxidase-Aktivität, während das wichtigste Substrat für pflanzliche Peroxidasen Ascorbat darstellt (Foyer *et al.*, 2009). Glutaredoxine und Thioredoxine sind weitere Komponenten im zellulären Redox-Regulationssystem (Fernandes and Holmgren, 2004; Rouhier *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2008). Während oxidierte Glutaredoxine nicht-enzymatisch durch GSH reduziert werden, übernimmt diese Funktion bei Thioredoxinen die Thioredoxin-Reduktase (Laloi *et al.*, 2001).

### **Phytochelatine werden aus Glutathion synthetisiert**

Wie in Abschnitt 1.1.2 bereits dargestellt, werden von der Phytochelatinsynthase aus GSH durch Polykondensation von repetitiven  $\gamma$ -Glu-Cys-Einheiten die Phytochelatine zur Schwermetallkomplexierung synthetisiert. Es entstehen thiolhaltige Ketten mit der allgemeinen Formel  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  mit  $n = 2-11$  (Zenk, 1996).

### **Glutathion-Konjugate spielen eine Rolle im Xenobiotikametabolismus, aber auch im endogenen Stoffwechsel**

Elektrophile Moleküle können von Glutathion S-Transferasen (GSTs, EC 2.5.1.18) an die Thiolgruppe des Cysteins gekoppelt werden, man spricht dann von einem GS-Konjugat. Diese Reaktion ist ein wichtiger Schritt im Entgiftungsstoffwechsel, spielt jedoch auch im endogenen Stoffwechsel eine Rolle (Marrs, 1996; Edwards *et al.*, 2000; Bednarek *et al.*, 2009). Für weitere Ausführungen s. S. 17 ff.

### **Weitere Funktionen von Glutathion**

GSH dient als Transport- und Speicherform von reduziertem Schwefel in Form von Cystein und als S-Nitrosoglutathion (GS-NO) ist GSH ein relativ stabiler *carrier* für Nitrosogruppen (-NO). Einige Proteine in Pflanzenzellen bilden gemischte Disulfide mit GSH (S-Glutathionylierung), was als reversible posttranslationale Modifikation und Teil

einer redox-gekoppelten Regulierung von Proteinaktivität diskutiert wird (Dixon *et al.*, 2005; Noctor, 2006). Für GSH-defiziente Pflanzen wurde gezeigt, dass sie anfälliger für Krankheiten oder den Befall von Fraßschädlingen sind, was darauf hindeutet, dass GSH eine Rolle in der Pathogenresistenz spielt, möglicherweise bei der Synthese von an der Pathogenabwehr beteiligten Molekülen wie Glucosinolaten (Schlaepfi *et al.*, 2008). Bei der Phytoalexin-defizienten Mutante *pad2* stellte sich heraus, dass deren erhöhte Pathogenanfälligkeit nicht auf verminderte Camalexinsynthese zurückzuführen war, sondern auf mangelnde GSH-Synthese. Diese wird durch eine Punktmutation im Gen für *GSH1* verursacht (Parisy *et al.*, 2007). Ferner wurde beschrieben, dass das ROOT MERISTEMLESS1 Gen (*RML1*) (Cheng *et al.*, 1995) ein Allel der *GSH1* ist und in diesen Mutanten wegen des Defekts im ersten Schritt der GSH-Synthese nicht ausreichend GSH für die Ausbildung des Wurzelmeristems nach der Keimung gebildet wird (Vernoux *et al.*, 2000). Ein Fehlen des *GSH1*-Gens in *gsh1*-Nullmutanten ist embryolethal, folglich kann ohne endogene GSH-Synthese keine Embryoentwicklung und Samenreifung stattfinden (Cairns *et al.*, 2006). Es wird deshalb angenommen, dass GSH auch eine essentielle Rolle in der Steuerung des Zellzyklus beim Übergang von der G1- zur S-Phase zukommt (Vernoux *et al.*, 2000). Außerdem wurde in Arabidopsis ein direkter Zusammenhang zwischen GSH-Metabolismus und der Expression von Genen, die bei Stress eine Rolle spielen, beschrieben (Ball *et al.*, 2004). NPR1, ein wichtiger Regulator im Zusammenhang mit der systemisch erworbenen Resistenz (*systemic acquired resistance*, SAR), scheint im oxidierten Zustand (als Oligomer) inaktiv zu sein. Die Monomere sind dann über Disulfidbrücken miteinander verbunden. In der reduzierten Form, als Monomer, kann NPR1 in den Zellkern wandern und mit Transkriptionsfaktoren in Wechselwirkung treten (Mou *et al.*, 2003). In der *in vitro* Analyse war das Oligomer/Monomer-Verhältnis abhängig von den GSH- und GSSG-Konzentrationen. Deshalb wird vermutet, dass durch die Interaktion von GSH mit redox-sensitiven Proteinen der Redoxzustand der Zelle integriert wird und somit GSH an Signaltransduktionswegen beteiligt ist, die Veränderungen in der Umwelt verarbeiten, damit z.B. eine passende Stressantwort erfolgen kann (May *et al.*, 1998; Mullineaux and Rausch, 2005; Meyer, 2008). Genauere biophysikalische Untersuchungen zum Redoxpotential von GSH in Zellen von Arabidopsis wurden vor kurzem in zwei Arbeitsgruppen mittels Expression von redox-sensitivem GFP durchgeführt und ergaben Werte unter - 300 mV (Jiang *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2007). Daraus lässt sich ableiten, dass die zelluläre GSSG-Konzentration lediglich im nanomolaren Bereich liegt und der GSH/GSSG-Quotient etwa  $10^6$  beträgt, also der weitaus größte Teil des zellulären GSH reduziert vorliegt (Foyer *et al.*, 2009).

### 1.2.2 Glutathion-Konjugate

Sowohl in tierischen als auch in pflanzlichen Organismen werden Xenobiotika zum Zweck der Entgiftung an endogene Moleküle konjugiert. Die kovalente Bindung an Aminosäuren, Glycosyl- bzw. Glucuronosyl-Reste oder GSH verändert die Moleküleigenschaften so, dass ein Fremdstoff seine schädliche Wirkung nicht mehr entfalten kann. Das Konjugat ist immer hydrophiler als das konjugierte Molekül und kann deshalb besser ausgeschieden werden (Marquardt and Schaefer, 1994).

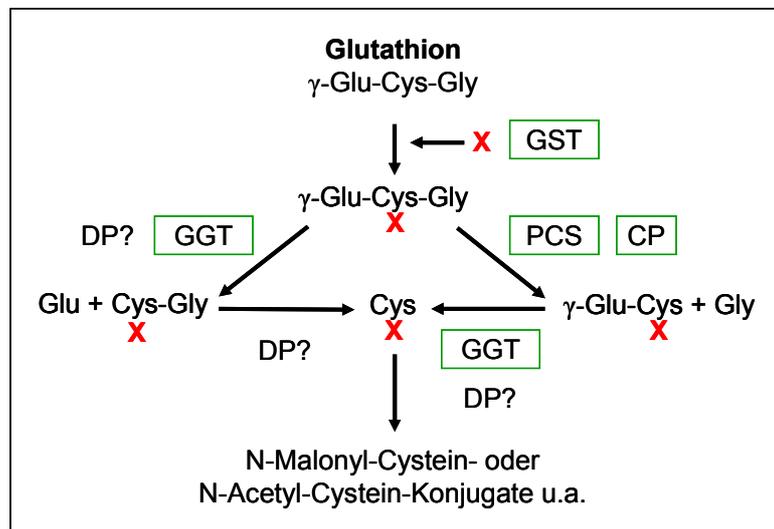
Die Detoxifizierung von Xenobiotika über GS-Konjugation gehört zu den bestuntersuchten Entgiftungswegen in Pflanzen, und die in diesem System beteiligten GSTs und GS-Konjugat-Transporter sind Gegenstand intensiver Forschungsarbeit (Walczak and Dean, 2000). Viele Herbizide besitzen ein elektrophiles Zentrum, an dem auch ohne vorherige Aktivierung die Konjugation an GSH erfolgen kann, so zum Beispiel das Chloratom des Atrazin, von dem als erstes Herbizid gezeigt wurde, dass es über den GS-Konjugat-Weg abgebaut wird (Lamoureux *et al.*, 1970; Lamoureux *et al.*, 1973; Kreuz *et al.*, 1996). GS-Konjugate spielen aber auch im Metabolismus und/oder Transport von endogenen Metaboliten eine Rolle (s. 1.2.5).

### 1.2.3 Abbau von GS-Konjugaten

In Abb. 1.10 sind die beiden möglichen Abbauwege für GS-Konjugate dargestellt. Aus dem Stoffwechsel von Säugetieren ist bekannt, dass die Abspaltung des N-terminalen Glutamats der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Konjugatabbaus ist (Meister, 1995). Diese Reaktion wird von  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen (GGT, EC 2.3.2.2) katalysiert. In Arabidopsis sind vier Gene bekannt, die Homologien zu tierischen GGTs aufweisen (Martin *et al.*, 2007). Sie sind als *AtGGT1* (At4g39640), *AtGGT2* (At4g39650), *AtGGT3* (At1g69820) und *AtGGT4* (At4g29210) annotiert. In Tabak (*Nicotiana tabacum*) exprimierte *AtGGT1* zeigte eine Lokalisierung in der Zellmembran und extrazelluläre Aktivität und damit eine große Ähnlichkeit zu GGTs aus Säugetieren (Storozhenko *et al.*, 2002). Vor kurzem wurden in drei Veröffentlichungen *AtGGT1* und *AtGGT2* zellmembran-assoziiert lokalisiert mit Aktivität im Apoplasten (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007a) und *AtGGT4* als vakuoläres Enzym beschrieben (Grzam *et al.*, 2007; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b). Bei *AtGGT3* handelt es sich um ein Pseudogen, das nicht für ein funktionales Protein codiert.

In Pflanzen werden GS-Konjugate, z.B. GS-Biman, nach der Aufnahme in die Zelle sehr schnell in die Vakuole transportiert (Martinoia *et al.*, 1993; Rea *et al.*, 1998; Martinoia *et al.*, 2000; Rea, 2007). Die Beteiligung der primär aktiven und sehr effizienten ABC-Transporter verdeutlicht die Bedeutung der vakuolären Sequestrierung für eine

schnelle Entgiftung von Xenobiotika (z.B. Herbizide). Dadurch werden gebildete GS-Konjugate dem Reaktionsgleichgewicht der von GSTs katalysierten Konjugationsreaktion entzogen, die sonst durch die Produkte inhibiert würden (Kreuz *et al.*, 1996).



**Abb. 1.10: Postulierte Abbauwege von GS-Konjugaten in Pflanzen**

Der Abbau von GS-Konjugaten kann von zwei Seiten beginnen: Am N-Terminus können  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen das Glutamat abspalten, woraus das Cys-Gly-Konjugat hervorgeht. Am C-Terminus kann durch die Aktivität der Phytochelatinsynthese oder durch Carboxypeptidasen das Glycin abgespalten werden, das Ergebnis ist dann das  $\gamma$ -Glu-Cys-Konjugat als Zwischenprodukt. Beide Dipeptid-Konjugate werden in das Cystein-Konjugat umgewandelt, welches durch N-Acetylierung oder Anhängen eines Malonylrestes weiter metabolisiert werden kann. X, elektrophiles Molekül; GST, Glutathion S-Transferase; DP, Dipeptidase; GGT,  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase; PCS, Phytochelatinsynthese; CP, Carboxypeptidase.

In der Vakuole werden die GS-Konjugate vom N-Terminus her zum entsprechenden Cys-Gly-Konjugat abgebaut (Riechers *et al.*, 1996; Nakano *et al.*, 2006; Grzam *et al.*, 2007; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b). Dies entspricht dem Beginn des Abbaus von GS-Konjugaten mit der Abspaltung des Glutamats, der aus tierischen Organismen bekannt ist (Meister, 1995). Für die Substanz Alachlor wurde jedoch gezeigt, dass sie als GS-Konjugat in die Vakuole transportiert wird und dieses dort von einer vakuolären Carboxypeptidase abgebaut wird, als erster Schritt erfolgt hier also die Abspaltung des C-terminalen Glycins (Wolf *et al.*, 1996). Ein entsprechender Befund liegt für den *herbicide safener* Fenclorim vor; auch hier war das  $\gamma$ -Glu-Cys-Konjugat als erster Metabolit nach der GS-Konjugation zu detektieren (Brazier-Hicks *et al.*, 2008) und im Fall des Herbizids Dimethenamid konnte neben dem Cys-Gly-Konjugat auch das  $\gamma$ -Glu-Cys-Konjugat detektiert werden (Riechers *et al.*, 1996). Die gebildeten Dipeptid-Konjugate werden nachfolgend zu den entsprechenden Cystein-Konjugaten umgesetzt.  $\gamma$ -Glu-Cys-Konjugate werden wegen der besonderen  $\gamma$ -Peptidbindung *in planta* nur von GGTs

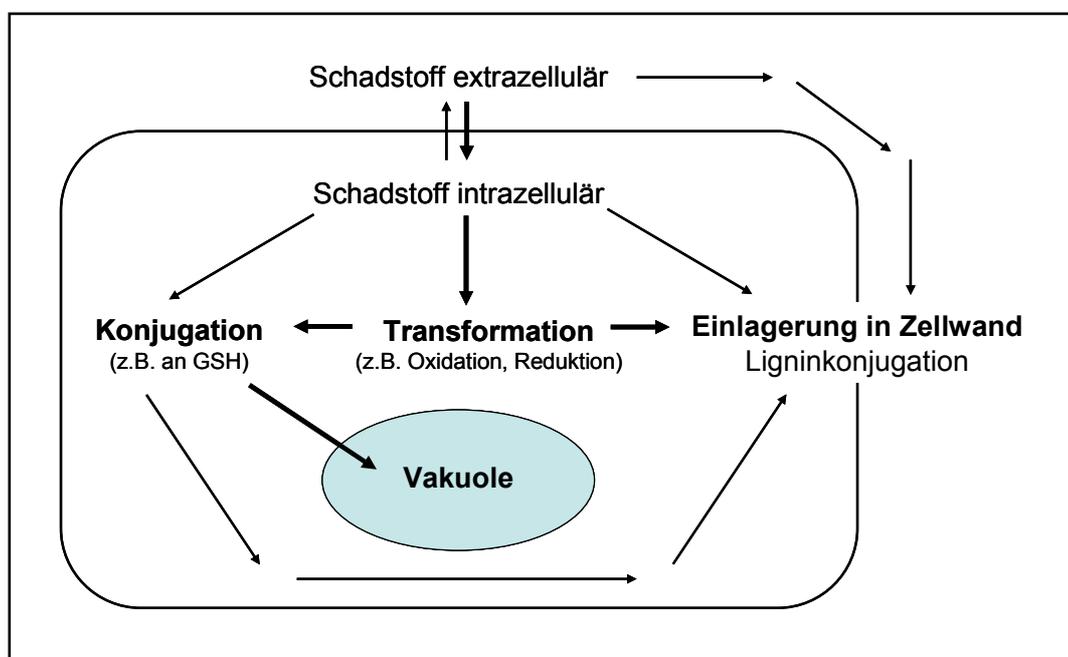
gespalten (Martin *et al.*, 2007). Allerdings wurde mit *in vitro* Versuchen von einer vakuolären Dipeptidase gezeigt, dass auch sie die  $\gamma$ -Peptidbindung in  $\gamma$ -Glu-Cys Dipeptid-Konjugaten und ebenfalls in GS-Konjugaten spalten kann (Scheer, 2003). Allerdings ist nicht ganz sicher, ob die gereinigten Proteinfractionen mit einer GGTs zuzuschreibenden Aktivität kontaminiert waren. Cys-Gly-Konjugate werden vermutlich von Dipeptidasen gespalten, dies konnte in den genannten *in vitro* Versuchen jedoch nicht bewiesen werden.

Mit aus *E. coli* aufgereinigter AtPCS1 wurde gezeigt, dass dieses Enzym auch GS-Konjugate umsetzen kann. Als Substrate für AtPCS1 wurden GS-Konjugate mit Benzyl-, Nitrophenyl-, Phenylbenzyl-, Uracil-, Biman- und Acetamido-Fluorescein-Resten verwendet. In den Ansätzen konnte keine Bildung entsprechender PCs, sondern nur die Bildung der jeweiligen  $\gamma$ -Glu-Cys-Konjugate beobachtet werden (Beck *et al.*, 2003). Jedoch wurde in einer anderen Arbeit gezeigt, dass aus S-alkylierten (methyl-, ethyl-, propyl-) GSH-Molekülen von der PCS effizient S-alkylierte PCs synthetisiert werden (Vatamaniuk *et al.*, 2000). Die aus diesen Ergebnissen abgeleitete Modellvorstellung für den AtPCS1-vermittelten Umsatz von GS-Konjugaten schlägt vor, dass durch die räumliche Hinderung, welche durch das ans Cystein konjugierte Molekül bedingt ist, eine Übertragung des  $\gamma$ -Glu-Cys-Konjugats auf GSH verhindert wird. Stattdessen erfolgt eine Übertragung des  $\gamma$ -Glu-Cys-Restes auf ein Molekül Wasser, d.h. es kommt nur zu einer hydrolytischen Spaltung der Peptidbindung zwischen Cystein und Glycin (Beck *et al.*, 2003). Vatamaniuk *et al.* (2000) schließen aus ihren Ergebnissen, dass die PCS Glutathionmoleküle mit besetzten SH-Gruppen (*blocked thiols*) benötigt. Dabei stören anstelle von komplexierten Metallionen an das Cystein konjugierte Alkylreste nicht die Bildung von PC-Ketten (Vatamaniuk *et al.*, 2000), während z.B. aromatische Reste dies durch größere sterische Hinderung unmöglich machen (Beck *et al.*, 2003).

#### 1.2.4 GS-Konjugate im Entgiftungsstoffwechsel

Das klassische Entgiftungsmodell mit drei Phasen wurde schon 1905 für den Säugetierorganismus entworfen (Knoop, 1904) und liegt toxikologischen und pharmakokinetischen Studien bezüglich des Abbaus von Xenobiotika und Medikamentenwirkstoffen, besonders auch im menschlichen Organismus, zugrunde. Später wurde das Modell auf Pflanzen übertragen (Shimabukuro, 1976) und man spricht auch vom Konzept der „grünen Leber“ (Sandermann, 1994). Dieser Begriff bezieht sich allerdings weniger auf physiologische oder biochemische Gemeinsamkeiten, sondern wurde als Analogie zum Bild der „grünen Lungen“ geprägt (Sandermann, 1992). Die drei Phasen nach der Resorption (Aufnahme) eines Fremdstoffes in den Organismus sind

(I) Transformation, (II) Konjugation und (III) Kompartimentierung (bei Säugetieren: Exkretion). Abb. 1.11 zeigt eine schematische Darstellung des Xenobiotikametabolismus in der Pflanzenzelle. In Phase I, der Transformation, werden durch Cytochrom P450 und andere Monooxygenasen, Peroxidasen oder Reduktasen funktionelle Gruppen erzeugt, um die Xenobiotika zu aktivieren. Dabei können auch Zwischenprodukte entstehen, die toxischer sind als der aufgenommene Schadstoff. Ein bekanntes Beispiel aus dem Säugetiermetabolismus hierfür ist das Schimmelpilzgift Aflatoxin B1. Es wird in Phase I zum Aflatoxin B1-8,9-Epoxid umgewandelt, das in die DNA interkaliert und bei der Replikation Basenaustauschmutationen ( $G \rightarrow T$ ) verursacht (Essigmann *et al.*, 1982). In Pflanzen können z.B. Benz[a]pyren und Pentachlorophenol in ihrer aktivierten Form reaktive Sauerstoffspezies generieren (Sandermann, 1988).



**Abb. 1.11: Schematische Darstellung einer Pflanzenzelle mit den Stoffwechselwegen des Xenobiotikametabolismus**

In die Zelle aufgenommene Xenobiotika werden in Transformationsreaktionen aktiviert und nach Konjugation z.B. an GSH oder Glucuronsäure in die Vakuole transportiert und dort zunächst eingelagert. Lignin-Konjugate können auch in der Zellwand abgelagert werden. Damit wird zwar keine Exkretion im eigentlichen Sinne erreicht, jedoch sind die Schadstoffe dem aktiven Stoffwechselgeschehen entzogen. Dünne Pfeile kennzeichnen Nebenwege. Verändert nach Scheel and Sandermann (1981).

In Phase II werden die Schadstoffe an Glycosyl-Reste (in Pflanzen seltener an Glucuronosyl-Reste), Glutathion oder Aminosäuren konjugiert, so dass sie nicht mehr schädlich wirken können. Gleichzeitig werden die Moleküle leichter zugänglich für weitere Umwandlungen und hydrophiler, wodurch die Ausscheidung erleichtert wird.

Der wesentliche Unterschied zwischen tierischen und pflanzlichen Organismen besteht in Phase III: Während im Tier überwiegend eine echte Ausscheidung der Fremdstoffe aus dem Organismus über Niere und Darm erreicht wird, kommt es in Pflanzen zur Kompartimentierung von Xenobiotika-Konjugaten in der Vakuole oder der Zellwand, was aber ebenfalls den Entzug eines Fremdstoffs aus dem aktiven Stoffwechselgeschehen der Zelle bewirkt. In der Zellwand können Xenobiotika-Derivate dauerhaft dem aktiven Stoffwechsel entzogen werden. Dies wird als Lagerungsausscheidung (*storage excretion*) bezeichnet und man spricht von gebundenen Rückständen (*bound residues*), die möglicherweise kovalent an Zellwandmoleküle gebunden sind (Langebartels and Harms, 1985; Lange *et al.*, 1998; Schulze *et al.*, 2002). Diese sog. nicht-extrahierbaren Rückstände gelangen in die Nahrungskette bzw. in Lebensmittel und sollten daher möglichst gering sein. Konjugate in der Vakuole können dagegen weiter verstoffwechselt werden (Lamoureux and Rusness, 1989; 1993; Wolf *et al.*, 1996). Abweichend vom tierischen Metabolismus werden GS-Konjugate in Pflanzen eher zu N-Malonyl-Cystein-Konjugaten als zu N-Acetyl-Cystein-Konjugaten umgewandelt (Kreuz *et al.*, 1996). Die Abbauprodukte können zur Wurzel transportiert werden, hier wäre dann eine echte Ausscheidung über die Wurzelspitze oder die Wurzelhaare möglich. Dies wurde in Versuchen mit Gerste beobachtet, während eine Aufnahme von GS-Konjugaten aus der Umgebung in die Wurzel nicht erfolgte (Schröder *et al.*, 2007). Als weitere Wege für eine Exkretion bei Pflanzen kommen Guttation (Abscheidung von Tröpfchen an den Blättern) und Abgabe als flüchtige Substanzen in Frage, z.B. als S-Thioanisol Derivate (Lamoureux *et al.*, 1993; Sandermann, 1994).

### 1.2.5 GS-Konjugate in endogenen Stoffwechselwegen

Aus dem Säugetierorganismus sind eine ganze Reihe von endogenen Metaboliten bekannt, die mit GSH konjugiert werden, darunter Leukotriene, Prostaglandine, Dihydroxyphenylalanin (Dopa), Ascorbat und Malat (Wang and Ballatori, 1998). Die Konjugation mit GSH kann zur Bildung von Molekülen mit wichtigen Funktionen im Organismus führen, so ist beispielsweise das Abbauprodukt Cysteinyl-Leukotrien an Entzündungsreaktionen beteiligt.

Die Anzahl bisher bekannter endogener Metabolite, die im pflanzlichen Stoffwechsel an GSH konjugiert werden, beschränkt sich im Vergleich dazu auf einige wenige Kandidaten, ergänzt durch postulierte Funktionen von GSH, die auf den Analysen von GSH- oder PCS-defizienten Arabidopsis-Mutanten beruhen (s.u.).

Anthocyane sind pflanzliche Sekundärmetabolite, die zu den Flavonoiden gehören und für die Färbung von Blüten und Früchten verantwortlich sind. Sie werden durch GSTs an

GSH gekoppelt und von spezifischen GS-Konjugat-Transportern, die zur Gruppe der ABC-Transporter gehören, in die Vakuole transportiert (Marrs *et al.*, 1995; Mueller *et al.*, 2000). Dort werden die Anthocyane wieder von GSH getrennt und in der Vakuole eingelagert. Entsprechend akkumulieren Pflanzen mit fehlender GST-Aktivität oder vermindertem GSH-Gehalt weniger Anthocyane (Alfenito *et al.*, 1998; Xiang *et al.*, 2001). Das Isoflavonoid-Phytoalexin Medicarpin, benannt nach *Medicago sp.* (Luzerne) und spezifisch für Leguminosen, wurde *in vitro* von GSTs aus Mais an GSH konjugiert und als GS-Konjugat effizienter in Membranvesikel aus der Mungbohne (*Vigna radiata*) transportiert als unkonjugiertes Medicarpin (Li *et al.*, 1997). Daher ist die Konjugation und Sequestrierung von antimikrobiellen endogenen Metaboliten wie Phytoalexinen wahrscheinlich ein Schutzmechanismus in Pflanzen, da derartige Moleküle oftmals auch für die produzierende Pflanze toxisch sind (Li *et al.*, 1997). Desweiteren dient die Konjugation und Sequestrierung von Phytoalexin-Vorstufen zur schnellen Antwort der Pflanze bei Pathogenbefall (Naoumkina *et al.*, 2007).

Von Zimtsäure und p-Cumarinsäure ist beschrieben, dass sie an GSH gekoppelt werden. Zimtsäure wird als GS-Konjugat in einem ATP-abhängigen Prozess auch in die Vakuole transportiert (Dean *et al.*, 1995; Walczak and Dean, 2000). Über die weitere Verstoffwechselung dieser Moleküle als GS-Konjugate ist nichts bekannt. Als zwei weitere endogene Metabolite, die an GSH konjugiert werden, werden Caftarinsäure und Gibberthion, ein schwefelhaltiger Metabolit der Gibberelinsäure, genannt (Lamoureux and Rusness, 1993). In einer Arbeit über eine GST aus Mais wird diskutiert, dass die GS-Konjugation von Zwischenstufen der Porphyrinsynthese (Harderoporphyrinogen und Protoporphyrinogen) eine wichtige Funktion im Transport dieser Zwischenstufen in die Mitochondrien oder beim Abbau von Chlorophyll haben könnte (Dixon *et al.*, 2008).

GSH-defiziente Mutanten wie *pad2-1* sind anfälliger für den Befall von Fraßschädlingen, da sie weniger Glucosinolate bilden (Schlaeppli *et al.*, 2008). Im Fall von *pad2-1* korreliert die verminderte GSH-Synthese mit verminderter Bildung der beiden wichtigsten Glucosinolate in Arabidopsis, indol-3-ylmethyl- und 4-methylsulfinylbutyl-Glucosinolat (Schlaeppli *et al.*, 2008). Außerdem synthetisieren *pad2*-Pflanzen weniger Camalexin (Parisy *et al.*, 2007). Aufgrund dieser Befunde wird postuliert, dass GSH eine Funktion als Cystein- bzw. Schwefeldonor bei der Synthese von Camalexin, anderen Phytoalexinen und Glucosinolaten besitzt (Glawischnig, 2007; Bednarek *et al.*, 2009).

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Für die Entgiftung von Schwermetallen haben Pflanzen effiziente Chelatoren, die Phytochelatine, entwickelt, die von der Phytochelatinsynthase (PCS) aus Glutathion (GSH) synthetisiert werden. In mehreren Organismen aus verschiedenen systematischen Gruppen konnten Gene für Phytochelatinsynthasen oder homologe Proteine entdeckt werden. Die Phytochelatinsynthase aus Arabidopsis (AtPCS1) katalysiert neben der PC-Synthese *in vivo* die Abspaltung des Glycins von GS-Konjugaten *in vitro*. Dies wirft die Frage nach einer zusätzlichen Funktion der Phytochelatinsynthase auf.

Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich die Aufgabe, die *in vitro* gezeigte Hydrolaseaktivität von AtPCS1 beim Abbau von GS-Biman *in planta* zu analysieren, wobei auch die Frage des Beitrags von AtPCS2 zu diesem Stoffwechselweg beantwortet werden soll. Zu diesem Zweck sollen PCS-defiziente Linien in Belastungsversuchen mit dem Modellxenobiotikum Monochlorobiman physiologisch charakterisiert werden.

Durch stabile Transformation von Arabidopsis-Pflanzen mit PCS-EGFP-Fusionskonstrukten soll die Frage nach der subzellulären Lokalisation der Phytochelatinsynthasen mittels Fluoreszenzmikroskopie geklärt werden.

Für den ersten Schritt im Abbau von GS-Konjugaten gibt es zwei Möglichkeiten, entweder die Abspaltung des carboxyterminalen Glycins oder die Spaltung der  $\gamma$ -Peptidbindung zwischen Glutamat und Cystein am Aminoterminus. Letztere Reaktion wird ausschließlich durch  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen katalysiert. Um die Beiträge dieser beiden Stoffwechselwege zum GS-Konjugat-Abbau zu charakterisieren, soll die Aktivität relevanter  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen in Arabidopsis ausgeschaltet werden. Dieses Ziel soll durch geeignete Inhibitoren dieser Enzyme und durch knockout-Linien erreicht werden. Da bekannt ist, dass GS-Konjugate von ABC-Transportern in die Vakuole sequestriert werden, soll der Einfluss des Atmungsketten- und F-ATPase-Inhibitors Azid auf Transport und Metabolismus von Glutathion-Biman untersucht werden.

In Versuchen mit unterschiedlich stressexponierten Arabidopsis-Pflanzen (z.B. Kältestress, osmotischer Stress) soll eine Antwort auf die Frage gesucht werden, ob die Phytochelatinsynthase in Arabidopsis Funktionen im Zusammenhang mit abiotischem Stress besitzt. Als weiterer Ansatz ist die Mutagenese von Samen der Linie  $\Delta$ PCS mit Ethylmethansulfonat (EMS) geplant. Eventuell gehäuft auftretende Phänotypen sollen auf einen möglichen Zusammenhang mit der fehlenden Funktionalität der Phytochelatinsynthase untersucht werden.

Unter evolutionären Gesichtspunkten besonders interessant ist das PCS-homologe Protein alr0975 aus dem Cyanobakterium *Nostoc sp.* PCC 7120, das Strukturhomologien zum aminoterminalen Bereich von AtPCS1 aufweist und praktisch nur die Deglycinierung

---

von Glutathion katalysiert. Allerdings wurde noch nicht gezeigt, ob alr0975 auch Glutathion-Biman umsetzen kann. Ebenfalls noch nicht *in planta* untersucht wurden Stabilität und Funktionalität carboxyterminal verkürzter Versionen von AtPCS1 und AtPCS2. Deshalb soll alr0975 zusammen mit verkürzten Versionen von AtPCS1 und AtPCS2 in stabil transformierten Arabidopsis-Pflanzen funktional charakterisiert werden.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Chemikalien**

Soweit nicht anders angegeben, wurden Laborchemikalien in der bestmöglichen Qualität bezogen von Sigma-Aldrich/Fluka/Riedel-de-Haën, Roth oder Baker.

Laufmittel für die HPLC stammten von Baker (Methanol, Essigsäure und Acetonitril) und Fluka (Trichloressigsäure).

Monochlorobiman und Monobromobiman (Calbiochem EMD, La Jolla, USA) wurden in Acetonitril gelöst und als 100 mM Stammlösung bei -20 °C aufbewahrt.

Acivicin (LKT Laboratories, St. Paul, USA) wurde in H<sub>2</sub>O(MQ) gelöst und als 1M Stammlösung bei RT gelagert.

Atrazin (Pestanal ®, Fluka, Deisenhofen, Deutschland) wurde in Methanol gelöst und die 75mM Stammlösung bei RT gelagert.

Cellulase und Mazerozym für die Gewinnung von Protoplasten wurden als Pulver von Yakult Honshu, Tokyo, Japan bezogen.

Silwet L-77 (VAC-IN-Stuff) im Infiltrationsmedium bei der Agrobakterien-vermittelten Transformation von Arabidopsis stammte von Lehle Seeds, Round Rock, USA.

### **2.2 Antikörper**

Rabbit anti-AtPCS1 Antikörper (Picault *et al.*, 2006) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Gilles Peltier und Dr. Stéphan Cuiné, Laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologie des Bactéries et Microalgues, Cadarache, Saint-Paul-lez-Durance, Frankreich zur Verfügung gestellt. Sie wurden 1:2.500 in TBST verdünnt eingesetzt.

Mouse anti-EGFP Antikörper wurden von Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg bezogen und 1:1.000 in TBST verdünnt verwendet.

Sekundärantikörper (Goat anti-Rabbit und Goat anti-Mouse) stammten von Pierce/Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA und wurden 1:10.000 in TBST verdünnt eingesetzt.

## 2.3 Molekularbiologie

### 2.3.1 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von MWG Eurofins, Ebersberg, Deutschland bezogen und nach Erhalt mit autoklaviertem H<sub>2</sub>O(MQ) auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt (Stammlösungen). Als Arbeitslösungen dienten auf 20 µM verdünnte 100 µl Aliquote. Die Lagerung der Oligonukleotide erfolgte bei -20 °C. Die Ziffern hinter den im Text angegebenen Primern verweisen auf den Anhang (6.2), in dem alle verwendeten Primer mit ihren Sequenzen aufgeführt sind.

### 2.3.2 Mikroorganismen und Plasmide

#### Stratogene, Heidelberg

*Escherichia coli* XL-1 Blue mit Tetracyclinresistenz und DH5α ohne Resistenz

#### Dr. Czaba Koncz, MPI für Züchtungsforschung, Köln

*Agrobacterium tumefaciens* Stamm C58 pGV3101 (Van Larebeke *et al.*, 1974).

Als Ti-Plasmid wurde pMP90 mit bakteriellen Resistenzmarkern für Rifampicin und Gentamicin verwendet (Koncz and Schell, 1986; Ferrando *et al.*, 2000).

#### Euroscarf, Frankfurt

Hefeexpressionsvektoren p426GPD (Mumberg *et al.*, 1995) und pSH47 (Güldener *et al.*, 2002).

#### Institutseigene Plasmide

pSKAscl und pBI121Ascl (Hoffmann, 2002); modifizierte Version (Yadav, 2007) des Plasmids pEZT-NL (<http://deepgreen.stanford.edu/index.html>).

### 2.3.3 Enzyme, Puffer, Marker

#### Fermentas, St. Leon-Rot

Restriktionsenzyme, Taq-Polymerase, T4-Ligase, First Strand cDNA Synthesis Kit, 100bp und 1kb DNA-Marker, prestained protein marker

#### New England Biolabs, Frankfurt

Restriktionsenzyme, Antarctic Phosphatase

#### Roche, Penzberg

High Fidelity ® Polymerase

#### TAKARA, über Lonza, Verviers, Belgien

TaKaRa LA Taq™ Polymerase

## 2.4 Medien, Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders erwähnt, wurde für die Herstellung von Medien, Puffern und Lösungen H<sub>2</sub>O(MQ) verwendet. Die Lagerung erfolgte bei RT oder 4 °C. Enzyme, Zusätze für Medien und sterile Stammlösungen wurden bei -20 °C eingefroren.

Lösungen, die nicht in den Abschnitten von 2.4 aufgeführt werden, sind direkt bei der Beschreibung der jeweiligen Methode zu finden.

### 2.4.1 Medien für Zellkulturen und Bakterien

Die Zusammensetzung der verwendeten Medien ist im Anhang (6.1) detailliert aufgeführt.

#### **LS-Medium** (Linsmaier and Skoog, 1965)

Für Arabidopsis Zellkulturen, supplementiert mit 0,1 mg/L Kinetin und 0,5 mg/L Naphthalinessigsäure (Hormon-Stammlösungen in Ethanol hergestellt).

#### **B5-Medium** (Gamborg *et al.*, 1968)

Für Kalluskulturen mit 2 mg/ml 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (Stammlösung in 1M KOH). Ohne Zusatz für Anzucht von Keimlingen, als Flüssigmedium oder mit 1% Agar von Scharlau, für Wurzelwachstumstests (mit 1% Agar von Fluka) oder für Versuche mit MCB.

#### **MS-Medium** (Murashige and Skoog, 1962)

Für Agarplatten (1%) zur Selektion transformierter Arabidopsis Linien mit 30 mg/L Kanamycin und zur Anzucht von Keimlingen. Wurzelwachstumstests mit Atrazin und Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> wurden auf MS-Agarmedium mit der halben Menge Zucker durchgeführt.

#### **BG-11 Medium** (Stanier *et al.*, 1971)

Für die Kultivierung des Cyanobakterienstammes *Nostoc sp.* PCC 7120

#### **LB-Medium (Luria-Bertani)**

Hefeextrakt	5 g
Bactotrypton	10 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O(MQ)	ad 1000 ml; pH 7,0

LB-Agarmedium enthielt 1,5% Agar und wurde für die Herstellung von Selektionsplatten nach Abkühlen des Mediums auf ca. 60 °C mit Antibiotika versetzt:

LB mit 100 mg/l Ampicilin (LB/Amp100); Stammlösung 50 mg/ml in VE-Wasser.

LB mit 50 mg/l Kanamycin (LB/Kan50); Stammlösung 50 mg/ml in VE-Wasser.

LB mit 50 mg/l Rifampicin (LB/Rif50); Stammlösung 50 mg/ml in Methanol oder DMSO.

## 2.4.2 Analyse von DNA und RNA

### Ladepuffer (6x Orange G)

Glycerol	50% (v/v)
Orange G	0,25% (w/v)
EDTA	1 mM

**TAE (50x)** als Laufpuffer und zum Gießen der Agarosegele (0,8 bis 2%)

Tris-Base	2 M
Eisessig	5,7% (v/v)
EDTA	50 mM

Für Plasmid Midipräparationen aus *E. coli* wurde der „Jet Star Kit“ von Genomed, Löhne, Deutschland exakt nach Herstellerangaben verwendet.

Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde mit dem E.Z.N.A.® Gel Extraktion Kit von Peqlab, Erlangen, Deutschland nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Extraktion von RNA aus Pflanzenmaterial erfolgte entweder mit dem Aurum Total RNA Mini Kit von Biorad, München, Deutschland oder mit TRIzol von AppliChem, Darmstadt, Deutschland, jeweils nach den Angaben des Herstellers.

## 2.5 Anzucht von Pflanzenmaterial

Versuchspflanzen von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Ökotyp Columbia 0) wurden in Töpfen mit einer Mischung aus Perlit und Einheitserde (Typ T) unter Langtagbedingungen mit 16h Licht ( $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 22 °C, 65% Luftfeuchtigkeit) und 8h Dunkelheit (17 °C, 75% Luftfeuchtigkeit) in Phytokammern (Conviron, Kanada) angezogen. Diese Pflanzen wurden für Kreuzungen, Gewinnung von Protoplasten und zur Transformation sowie Extraktion von DNA oder RNA verwendet.

### 2.5.1 Oberflächensterilisierung von Arabidopsis Samen

Für die Anzucht von Keimlingen wurde die Oberfläche von Arabidopsis Samen für 20 min mit 80% Ethanol/0,1% Triton X100, danach für 3 min mit 3% NaClO sterilisiert. Die Samen wurden 5x mit sterilem VE-Wasser gewaschen und dann mit einer sterilen Pipettenspitze auf MS- oder B5-Medium mit 1% Agar einzeln ausgebracht. Die Samen auf den Agarplatten wurden für die Brechung der Samenruhe (Dormanz) für 24h bei 4 °C gelagert und erst danach für Keimung und Wachstum bei 23 °C ins Dauerlicht ( $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) gestellt. Zur Anzucht von Arabidopsis Pflanzen wurden 10 Tage alte Keimlinge von den Agarplatten in Erde pikiert.

## 2.5.2 Arabidopsis Zellsuspensionskulturen

Zellsuspensionskulturen von *Arabidopsis thaliana* Heynh. (Ökotyp *Landsberg erecta*) wurden freundlicherweise von Dr. Czaba Koncz, MPI für Züchtungsforschung, Köln zur Verfügung gestellt.

Die Kulturen wurden bei 23 °C und Dauerlicht ( $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) auf einem Rotationsschüttler (100 rpm) kultiviert und die Erhaltungskulturen jede Woche 1:10 in frisches LS-Medium, supplementiert mit 0,1 mg/L Kinetin und 0,5 mg/L Naphthalinessigsäure, umgesetzt.

## 2.6 Insertionslinien und Kreuzungen

### 2.6.1 Phytochelatinsynthase

Die verwendeten Insertionslinien für *AtPCS1* (At5g44070) und *AtPCS2* (At1g03980) stammen aus einer Arabidopsis T-DNA Sammlung, die freundlicherweise von Dr. Czaba Koncz, MPI für Züchtungsforschung, Köln zur Verfügung gestellt wurde (Rios *et al.*, 2002). Zu Beginn dieser Arbeit waren Screening mit den unten genannten Primerkombinationen und Kreuzungen unter Federführung von Dr. Andreas Beck weitgehend abgeschlossen. Folgende Linien wurden verwendet (die Zahlen in Klammern hinter den Primerbezeichnungen beziehen sich auf die Primerliste im Anhang 6.2):

*AtPCS1*-Insertionslinie (T-DNA in Exon 2) aus Pool 37837, im Folgenden als  $\Delta\text{PCS1}$  bezeichnet. Nachweis mit den Primern Fish2 (2), *AtPCS1\_135f* (3), *AtPCS1\_861r* (4b).

*AtPCS2*-Insertionslinie (T-DNA in Exon 3) aus Pool 48045, im Folgenden als  $\Delta\text{PCS2}$  bezeichnet. Nachweis mit den Primern Fish1 (1), *AtPCS2\_627f* (4a), *AtPCS2\_1854r* (11).

Diese homozygoten Insertionslinien wurden dreimal mit dem Wildtyp (Col-0) rückgekreuzt, bevor durch Kreuzung der Einfachmutanten die Doppelmutantenlinie  $\Delta\text{PCS}$  ( $\Delta\text{PCS1} \times \Delta\text{PCS2}$ ) erzeugt wurde.

### 2.6.2 $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase 4

Für weitere Arbeiten am Abbauweg von GS-Konjugaten wurde eine *AtGGT4*-Insertionslinie (Arabidopsis Stock Centre, Nottingham, UK, N161036) mit einem Transposonelement im dritten Exon des Gens der  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase 4 (At4g29210) in die  $\Delta\text{PCS}$  Linie eingekreuzt (Parinov *et al.*, 1999; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b). Folgende Primer wurden für die Genotypanalyse der *AtGGT4*-Insertionslinien verwendet: *ggt4\_for* (16), *ggt4\_rev* (17), *Ds5'-1* (18) (Lin *et al.*, 2004). Es wurden vier

homozygote Linien  $\Delta PCS1x\Delta GGT4$  (#5, 6, 23, 45; Wildtyp für *AtPCS2*) und drei homozygote Linien  $\Delta PCSx\Delta GGT4$  (#2, 4, 31; Dreifach-KO-Linie) isoliert.

## 2.7 Wurzelwachstumstests mit Keimlingen

Keimlinge für Wurzelwachstumstests mit Biman wurden auf B5-Agarplatten steril angezogen und vier Tage nach der Keimung auf die entsprechenden Agarplatten mit MCB umgesetzt. Wurzelwachstumstests mit Atrazin und  $Cd(NO_3)_2$  wurden auf MS-Platten mit halber Menge Sucrose durchgeführt. Das Ende der Wurzeln wurde mit einem waagerechten Strich markiert, ebenso der Zuwachs der Wurzel nach 24, 48 und 72 Stunden. Zur Ermittlung der Wurzellängen wurden die Platten zusammen mit einer Referenzmarkierung bekannter Länge eingescannt und mit der Software ImageJ die Wurzellängen gemessen und in Excel ausgewertet.

## 2.8 Belastungsversuche mit Biman

Der Abbau von GS-Biman in Arabidopsis wurde in Keimlingen, Protoplasten und Zellkulturen untersucht. In einigen Versuchen kamen zur genaueren Analyse der Stoffwechselwege Inhibitoren zum Einsatz.

### 2.8.1 Versuche mit Keimlingen

Für die Belastung von Arabidopsis Keimlingen wurden 30 fünf Tage alte Keimlinge von B5-Agarplatten in 25ml-Erlenmeyerkolben mit 5 ml flüssigem B5-Medium und 5  $\mu M$  MCB transferiert. Die Keimlinge wurden mit passgenauen Gazestücken bedeckt und für 10 min in einem Exsikkator im Vakuum belassen, danach wurde das Vakuum vorsichtig gebrochen, um das MCB in die Keimlinge zu infiltrieren. Anschließend erfolgte die Inkubation der Keimlinge für die jeweiligen Zeitspannen auf einem Rotationsschüttler (100 rpm). Nach Abschluss der Inkubation wurden die Keimlinge mit B5-Medium gewaschen, trocken getupft, in Eppendorf Reaktionsgefäße gefüllt und nach Bestimmung des Frischgewichts in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### 2.8.2 Probenaufschluss und HPLC-Analyse

Das Keimlingsmaterial wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einem Glaspistill zu feinem Pulver zerrieben. Nach Zugabe von 0,6 ml Aufschlusspuffer (80 mM Glycin, 80 mM NaCl, 10 mM EDTA; pH 3,0) auf Eis folgten zwei Homogenisierungsschritte à 30 min mit einer Ultraschall-Sonotrode (Sonopuls, Bandelin, Berlin) bei 95% Leistung, die Bruchstücke wurden anschließend abzentrifugiert

(5 min, 16.000 x g) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgten Inkubation bei 70 °C (10 min) und auf Eis (10 min), bevor denaturierte Proteine abzentrifugiert wurden (10 min, 16.000 x g). Der Überstand wurde in HPLC Gefäße gefüllt, die mit Deckeln und Septen verschlossen wurden.

Die HPLC-Analyse erfolgte mit dem Modell Summit ASI-100 und nachgeschaltetem Fluoreszenzdetektor RF2000 (Dionex, Idstein) unter Verwendung von Prontosil 120-5-C18, 150 x 4 mm Chromatographie-Säulen (Bischoff Chromatography, Leonberg). Der verwendete Laufmittelgradient ist in Tab. 2.1 aufgelistet. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Software Chromeleon, Version 6.5 (Dionex, Idstein).

Laufmittel A: 0,25% (v/v) Essigsäure, pH 3,9; Laufmittel B: 100% Methanol.

<b>Zeit (Minuten)</b>	<b>Laufmittel B (%)</b>
0	14
15	14
18	90
19	90
20	14
25	14 (Ende)

**Tab. 2.1: Laufmittelgradient für die Analyse von Biman-Konjugaten**

Die Biman-Konjugate wurden im Fluoreszenzdetektor detektiert (Anregung 390 nm, Emission 480 nm).

Verwendete Standards: Zur Bestimmung der Retentionszeiten von C-Biman, CG-Biman, EC-Biman und GS-Biman wurde ein Gemisch dieser vier Konjugate injiziert. Als Referenz für die Umrechnung von Peakflächen in Stoffmengen wurden definierte Aliquots eines GS-Biman Standards injiziert, der mittels MS-Analyse überprüft wurde und zu 95% GS-Biman enthielt. Die fehlenden 5% bestanden aus nicht derivatisiertem bzw. oxidiertem GSH (GSSG).

### 2.8.3 Versuche mit Protoplasten

#### Lösungen:

#### **Enzymlösung für Zellwandverdau**

Cellulase	1%
Mazerozym	0,25%
PMSF	0,5 mM
Mannitol	400 mM
CaCl	8 mM
MES	5 mM
BSA (Fluka)	0,1%
pH 5,6 (KOH)	

#### **PEG**

PEG 4000	40% (w/v)
CaCl <sub>2</sub>	300 mM
MES	5 mM
pH 5,6 (KOH)	

#### **WIMK-Lösung**

Mannitol	500 mM
MES	5 mM
pH 5,8-6,0 (Tris)	

#### **Magnesium-Manitol-Lösung**

Mannitol	400 mM
MgCl <sub>2</sub>	15 mM
MES	5 mM
pH 5,8 (KOH)	

#### Durchführung:

Zur Gewinnung von Protoplasten wurden Rosettenblätter von drei Wochen alten Arabidopsispflanzen 3 Stunden in Enzymlösung inkubiert. Anschließend wurden die Protoplasten pelletiert (2 min, 60 x g) und zweimal in 8 ml WIMK gewaschen, bevor sie in WIMK aufgenommen wurden und eine Zelldichte von ca.  $10^5$  Zellen/ml eingestellt wurde.

Die Protoplastensuspension wurde in 500 ml-Aliquots aufgeteilt und mit 5  $\mu$ M MCB auf einem Rotationsschüttler (50 rpm, 23 °C) für verschiedene Zeitspannen inkubiert. In Versuchen mit Acivicin, einem Inhibitor von  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen, erfolgte eine 30minütige Vorinkubation mit dem Inhibitor (1, 10, 100  $\mu$ M), anschließend wurden die Protoplasten für 4 Stunden mit 5  $\mu$ M MCB belastet. Für die Analyse der Biman-Konjugate wurden die Protoplasten abzentrifugiert (1 min, 500 x g) und in 0,4 ml Aufschlusspuffer mit Ultraschall behandelt (10 sek, 95% Leistung). Die folgenden Schritte entsprechen dem Aufschluss von Keimlingen (s. 2.8.2).

Um die Toxizität von Acivicin abzuschätzen, wurden eine Woche alte Arabidopsis Zellkulturen 1:10 mit frischem LS-Medium verdünnt. Nach 24 Stunden wurden 5ml-Aliquots in 25ml-Erlenmeyerkolben gefüllt und die Biomasse (Frischgewicht) vor und 2 Tage nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Acivicin bestimmt.

#### **2.8.4 Versuche mit Zellsuspensionskulturen**

Arabidopsis Zellkulturen wurden 24 Stunden nach Transfer in frisches LS-Medium (1,2 g Zellmaterial in 25 ml Medium) mit 5  $\mu\text{M}$  MCB belastet und nach den jeweiligen Zeitspannen mittels Vakuumfiltration geerntet.

In Zeitreihe-Versuchen mit Azid ( $\text{NaN}_3$ ) wurden 9,6 g Zellmaterial in 100 ml Medium eingewogen und 24 Stunden auf dem Schüttler belassen. Die Zellen wurden für 5 min mit 1 mM Azid vorinkubiert, dann erfolgte die Belastung mit 5  $\mu\text{M}$  MCB für 1 min. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in MCB-freies Medium mit 1 mM Azid überführt. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Zellen mittels Vakuumfiltration geerntet.

Für die HPLC-Analyse der Biman-Konjugate wurden 0,3 g Zellmaterial eingewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der jeweilige Rest wurde für die Ermittlung des Trockengewichts verwendet. Für den Aufschluss wurde das Zellmaterial mit 1 ml Glycinpuffer versetzt und mit einer Ultraschall-Sonotrode (Typ Sonopuls, Bandelin, Berlin) bei 95% Leistung aufgeschlossen (2x 30min). Die weiteren Schritte entsprechen denen beim Aufschluss von Keimlingen (s. 2.8.2).

### **2.9 Detektion von Phytochelatinen in Keimlingen**

Für die Analyse von Phytochelatinen in verschiedenen Arabidopsis Linien wurden in 100ml-Erlenmeyerkolben  $100 \pm 10\%$  oberflächensterilisierte Samen in 20 ml flüssiges B5-Medium ausgebracht. Zur Brechung der Dormanz wurden die Samen in den Kolben für 24h bei 4 °C gelagert und danach auf den Rotationsschüttler gestellt (100 rpm, 23 °C). Fünf Tage nach der Keimung wurden die Keimlinge für 48h mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  belastet.

#### **2.9.1 Probenaufschluss und PC-Analyse**

Für die HPLC Analyse wurden die Keimlinge mit einem Sieb aus dem Medium gefischt und mit einem Papiertuch gleichmäßig trockengetupft. Nach der Ermittlung des Frischgewichts wurden die Keimlinge in Eppendorf Reaktionsgefäße gefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mit einem Glaspistill wurde das Keimlingsmaterial zu feinem Pulver zerrieben und in je 500  $\mu\text{l}$  Aufschlusspuffer (0,1% (w/v)  $\text{NaBH}_4$  in 0,6 M NaOH) aufgenommen. Nach 10minütiger Inkubation bei RT erfolgte der Aufschluss mit der Ultraschall-Sonotrode (2x 30 min, 95% Leistung), danach wurden die Bruchstücke durch Zentrifugation (5min, 16.000 x g) sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der Proteine mit 80  $\mu\text{l}$  0,6 M HCl versetzt. Nach

10 min Inkubation auf Eis wurde wie zuvor beschrieben zentrifugiert und der Überstand für die Analyse in HPLC Gefäße gefüllt, die mit Deckeln und Septen verschlossen wurden. Die HPLC-Analyse von Phytochelatinen unterschiedlicher Kettenlängen erfolgte ebenfalls auf einem Gerät Modell Summit ASI-100, jedoch mit nachgeschaltetem UV-Detektor UVD170U (Dionex, Idstein). Es wurde das gleiche Chromatographiesäulen-Modell wie zur Auftrennung der Biman-Konjugate und die gleiche Software verwendet. Tab. 2.2 enthält den verwendeten Laufmittelgradient.

Laufmittel A: 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure

Laufmittel B: 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure, 20% (v/v) Acetonitril

Ellman-Lösung: 10% Acetonitril, 5% (v/v) Ellman Stammlösung,  
5% (v/v) 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8,0

Ellman Stammlösung: 0,06% (w/v) Ellman-Reagenz (5,5'-bisdithio(2-nitrobenzoesäure)),  
5% (v/v) 1M Kaliumphosphatpuffer pH 8,0

Kaliumphosphatpuffer 1M, pH 8,0: Für 500 ml Puffer wurden 4,08 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 81,86 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  in 500 ml  $\text{H}_2\text{O}$ (MQ) gelöst und anschließend der pH kontrolliert.

Zeit (Minuten)	Laufmittel B (%)
0	1
3	7
4	25
18,5	100
19,5	100
22	1
27	1 (Ende)

**Tab. 2.2: Laufmittelgradient für die Analyse von Phytochelatinen**

Zu den aufgetrennten Phytochelatinen wurde über ein T-Stück Ellman Reagenz (2 ml/min) gepumpt, das in einer direkt nachgeschalteten Reaktionsschleife bei 50 °C mit den Thiolgruppen reagierte. Das dabei entstehende Thiolatanion wurde bei 410 nm photometrisch erfasst. Die Flächen unter den aufgezeichneten Peaks entsprechen der Menge an  $\gamma$ Glu-Cys-Einheiten in den jeweiligen Molekülen. Da mit wachsender PC-Kette die Thiolgruppen nicht mehr mit der gleichen Wahrscheinlichkeit mit dem Ellman-Reagenz

reagieren, wurden Korrekturfaktoren (Schmöger, 2000) in die Berechnungen einbezogen; sie betragen 1,3 für PC<sub>3</sub> und 1,5 für PC<sub>4</sub>.

Verwendete Standards: Für die Bestimmung der Retentionszeiten der PC-Moleküle wurde ein Gemisch von Phytochelatinen verwendet, das *in vitro* mit aufgereinigter AtPCS1 hergestellt worden war (nicht quantitativ). Als Referenz für die Umrechnung von Peakflächen in Stoffmengen wurden 10 nmol GSH in 10 µl injiziert, was reproduzierbar einer Peakfläche von 30 ± 5% entsprach.

## 2.10 Transiente Transformation von Protoplasten

### Polyethylenglykol (PEG)-Lösung

PEG 4000	40% (w/v)
CaCl <sub>2</sub>	300 mM
MES	5 mM
pH 5,6 (KOH)	

Polyethylenglykol-vermittelte Transformation wurde entsprechend (Abel and Theologis, 1994) durchgeführt. Nach der oben beschriebenen Isolation von Protoplasten wurden die in WIMK gewaschenen Zellen in Mg-Mannitol-Lösung aufgenommen und eine Zelldichte von  $5 \times 10^5$  eingestellt, danach die Protoplastensuspension für 30 min bei 4 °C gelagert.

Die Transformationsansätze in 2 ml Reaktionsgefäßen enthielten 100 µl Protoplastensuspension, 10 µl 0,5 M Mannitol, 20 µl DNA (entsprechend 20 µg Plasmid) und 130 µl 40% PEG-Lösung. Nach 5 min bei RT wurden zum Waschen der Zellen 750 µl WIMK hinzugefügt und zentrifugiert (500 x g, 3 min), danach mit 350 µl WIMK der Schritt wiederholt. Die Zellen wurden in 180 µl WIMK resuspendiert und für die phänotypische Expression auf einen Rotationsschüttler gelegt (50 rpm, 23 °C).

### 2.10.1 Komplementation von ΔPCS Protoplasten mit 35S::AtPCS1

Von der Protoplastensuspension wurden 0,1 ml mit 20 µg DNA des Expressionsplasmids 35S::AtPCS1 transformiert. Die phänotypische Expression erfolgte für 2 Stunden auf einem Rotationsschüttler (50 rpm, 23 °C), gefolgt von 2 Stunden Inkubation mit 5 µM MCB und anschließender Analyse der Biman-Konjugate. Als Kontrolle dienten Transformationsansätze mit 20 µg leerem Plasmid pBI221 (Jefferson *et al.*, 1987) und für die Abschätzung der Transformationseffizienz Ansätze mit der Reporter-kassette 35S::LUC (Himmelbach *et al.*, 2002). Für die Herstellung des AtPCS1 Expressionsplasmids wurde in pBI221 das Glucuronidase-Gen durch das Gen für AtPCS1 über die Restriktionsstellen *Bam*HI und *Sac*I ersetzt (Blum *et al.*, 2007).

## 2.11 Stabile Transformation von Arabidopsis Pflanzen

Die stabile Transformation von Arabidopsis Pflanzen erfolgte mit der *floral dip* Methode nach einem etablierten Protokoll (Clough and Bent, 1998; Clough, 2005). Dafür wurden Töpfe mit jeweils etwa 30 Pflanzen mit noch geschlossenen, grünen Infloreszenzen verwendet.

### 2.11.1 Anzucht von Agrobakterien

Agrobakterien, die das gewünschte Konstrukt für die Transformation enthielten, wurden auf LB-Kan50 Agarplatten ausgestrichen und bei 30 °C kultiviert. Eine Einzelkolonie wurde in 5 ml LB/Kan50/Rif50 als Vorkultur angezogen, nach zwei Tagen wurden 400 ml Hauptkultur im gleichen Medium mit 400 µl der Vorkultur angeimpft.

### 2.11.2 Agrobakterien-vermittelte Transformation von Arabidopsis

Die Agrobakterien wurden nach 36h Wachstum durch Zentrifugation (8 min, 5.000 x g) vom Anzuchtmedium getrennt und in 400 ml H<sub>2</sub>O(MQ) mit 5% Sucrose mit 0,05% Silwet resuspendiert. Die zu transformierenden Pflanzen wurden mit den Blütenknospen für 1 min kopfüber in die Agrobakteriensuspension getaucht und danach hochgebunden. Die Knospen wurden nochmals mit einer Pipette mit Agrobakteriensuspension benetzt, bevor sie, für 12h mit Folie abgedeckt, in die Phytokammer gestellt wurden. Um die Transformationsrate zu verbessern, wurde die Prozedur nach drei Tagen wiederholt und dann die Pflanzen 4 Wochen bis zur Samenreife kultiviert.

### 2.11.3 Selektion von Transformanden

Die Samen (als T1 Generation bezeichnet) wurden auf MS-Agarplatten mit 30 mg/L Kanamycin ausgebracht, um auf Kanamycin resistente Transformationslinien zu selektieren. Nach deutlicher Entwicklung des ersten Primärblattpaares wurden die positiv selektierten Pflänzchen in Erde umgesetzt und mittels Extraktion von DNA aus Blattstücken der T1 Pflanzen und PCR Analyse mit einer spezifischen Primerkombination für das eingebrachte Konstrukt (Primer forward genspezifisch, Primer reverse spezifisch für EGFP oder Vektorsequenz) wurde die Integration der eingebrachten DNA in das Pflanzengenom verifiziert. Die reifen Samen (T2 Generation) wurden auf MS/Kan30-Platten ausgebracht und die zu beobachtende Segregation im Verhältnis 1:3 (Kan sensitiv:Kan resistent) als Beweis für eine einzige Integrationsstelle der Fremd-DNA in das Pflanzengenom gewertet. Resistente Keimlinge wurden wiederum in Erde pikiert und die Samen (T3 Generation) aus 8 bis 10 Pflanzen erneut auf MS/Kan30-Platten

untersucht. Ein Anteil von einem Drittel der T3 Generation darf nach den Gesetzen der Mendelschen Genetik keine Segregation mehr zeigen, ist also bezüglich der integrierten DNA homozygot. Für weitere Versuche wurden aus Zeitgründen zumeist Keimlinge und Protoplasten der T2 Generation verwendet, vereinzelt wurden auch solche der T3 Generation herangezogen. Für die Mikroskopanalyse der GFP-Linien wurden T2 Samen auf MS/Kan30-Platten gescreent und resistente Keimlinge analysiert. Um einen Einfluss des Antibiotikums auf das GFP-Signal auszuschließen, wurden zum Vergleich Keimlinge von MS-Platten ohne Antibiotikum betrachtet.

## 2.12 Proteinanalyse

### 2.12.1 Stressversuche mit AtPCS1:EGFP Linien

Für die Untersuchung einer möglichen Hochregulierung des AtPCS1-Proteins als Stressantwort wurden anhand der Microarray-Daten auf <http://www.genevestigator.ethz.ch> (Zimmermann *et al.*, 2004) drei Stressfaktoren ausgewählt, von denen als Antwort eine gesteigerte Transkription von *AtPCS1* beschrieben wurde: 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (3x), AgNO<sub>3</sub> (4x) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5x). Es wurden jeweils 30 Samen in MS-Medium in Erlenmeyerkolben gebracht und fünf Tage alte Keimlinge nach den Angaben in Genevestigator mit 1 mM 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (1h), 10 µM AgNO<sub>3</sub> (3h) und 20mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1h) belastet.

### 2.12.2 Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial

#### Lösungen:

#### **Homogenisierungspuffer**

Tris-Base, pH 8,0	50 mM
DTT	10 mM
AEBSF	1 mM
SDS	2%

#### **Probenpuffer**

Tris-Base, pH 6,8	60 mM
SDS	2%
Glycerol	10%
DTT	100 mM
Bromphenolblau	0,05% (w/v)

#### Durchführung:

Für die Extraktion von Proteinen wurden 30 fünf Tage alte Keimlinge in flüssigem Stickstoff gefroren und in Eppendorf Reaktionsgefäßen mit einem Glaspistill zu feinem Pulver zerrieben. Danach wurde das Material in 400 µl Homogenisierungspuffer (mit oder ohne SDS) resuspendiert und nach 10minütiger Inkubation bei RT wurden Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min, 16.000 x g). Der Überstand wurde einer Acetonfällung (mindestens 1h) unterzogen und die Proteinpellets nach Zentrifugation (10 min, 7.500 x g,

4 °C) mit 80% Aceton gewaschen, bevor sie in 100 µl Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C aufgeköcht wurden.

### 2.12.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration von Proteinlösungen erfolgte mit einer nach Bradford modifizierten Methode (Bradford, 1976) und wurde mit dem Biorad Protein Assay nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurde das Coomassie-Farbstoffkonzentrat 1:5 mit H<sub>2</sub>O(MQ) verdünnt und in einem Endvolumen von 1 ml wurden jeweils 20 µl Probe vermessen. Die Absorption wurde bei 595 nm bestimmt, eine Eichgerade zur Umrechnung der Absorptionswerte in Proteinkonzentrationen wurde mit BSA erstellt.

### 2.12.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

#### Lösungen:

#### **SDS-Polyacrylamidgele**

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	gebrauchsfertig
APS-Lösung	10% (w/v) Ammoniumperoxidsulfat

#### **Elektrophoresepuffer**

Tris-Base	25 mM
Glycin	250 mM
SDS	0,1% (w/v)

#### Durchführung:

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels der diskontinuierlichen Elektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) auf einer Apparatur Modell 45-2010-i der Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen. Es wurden 10- bzw. 12%ige Trenngele mit einem 4%igen Sammelgel verwendet. Die Elektrophorese erfolgte im Sammelgel bei 80 V und im Trenngel bei 100 V. Als Proteinmarker diente die Prestained Protein Ladder SM0671 von Fermentas, St. Leon-Rot.

<b>Komponente</b>	<b>12% Trenngel</b>	<b>10% Trenngel</b>	<b>4% Sammelgel</b>
H <sub>2</sub> O(MQ)	3,35 ml	4,0 ml	2,3 ml
Acrylamidlösung	4,0 ml	3,35 ml	390 µl
1,5M Tris-Cl, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	-
0,5M Tris-Cl, pH 6,8	-	-	255 µl
10% SDS	100 µl	100 µl	30 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl
10% APS	50 µl	50 µl	15 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>10 ml</b>	<b>10 ml</b>	<b>3 ml</b>

Tab. 2.3: Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamidgele

### 2.12.5 Anfärbung von SDS-Gelen

#### Lösungen:

<b>Färbelösung</b>	0,2 g Coomassie R250 0,05 g Coomassie G250 10% Essigsäure 0,8% Ethanol
<b>Entfärber 1</b>	10% Essigsäure, 45% Ethanol
<b>Entfärber 2</b>	7% Essigsäure

#### Durchführung:

Zur Anfärbung von Proteinbanden in SDS-Gelen wurden die Gele auf dem Schüttler für 1h oder über Nacht in der Coomassie-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden sie zur Entfärbung des Hintergrundes für 1 bis 3 h in Entfärber 1 und danach in Entfärber 2 inkubiert, bevor sie auf einem Leuchtschirm abfotografiert wurden.

### 2.12.6 Western Blot

#### Lösungen:

#### **Transferpuffer (Blotting)**

Tris-Base	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20%
pH 8,3	

**Blockierungslösung**

Milchpulver 4% (w/v) in H<sub>2</sub>O(MQ)

**TBS**

Tris-Base 20mM  
NaCl 150 mM

**TBST**

Tween 20 0,05% (v/v) in TBS

Durchführung

Nach der SDS-Page wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland) übertragen. Dazu wurden Whatman-Filterpapier und die Membran auf die jeweilige Gelgröße zugeschnitten und in Transferpuffer äquilibriert. Der Blotsandwich wurde wie folgt luftblasenfrei auf die Anodenplatte der Blotapparatur (Semi dry transfer, Biorad, München) geschichtet: drei Lagen Filterpapier, Membran, Gel, drei Lagen Filterpapier. Nach Aufsetzen der Kathode erfolgte der Transfer für 1h bei 25V.

**2.12.7 Immunfärbung und Detektion**

Zur Vermeidung von Hintergrundsignalen wurden unspezifische Antikörperbindestellen auf der Nitrozellulosemembran mit Blockierungslösung abgesättigt (1h bei RT oder über Nacht bei 4 °C). Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper inkubiert (1h bei RT oder im Falle von anti-AtPCS1 über Nacht bei 4 °C). Nach 3x 5min Waschen in TBS-Puffer mit 0,05% Tween (TBST) erfolgte die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper (1h), gefolgt von dreimaligem Waschen in TBST (jeweils 5 min). Die Detektion erfolgte mit dem Pierce Super Signal West Femto Trial Kit nach Herstellerangaben. Das Signal wurde mit einer CCD-Kamera (ORCAII ERG, Hamamatsu Photonics, Japan) und der Simple PCI Imaging Software Version 5.0.0.1503 (Compix Imaging Systems, USA) dokumentiert und ausgewertet.

Für die Sichtbarmachung der auf die Membran übertragenen Proteine wurden die Membranen nach der Antikörperdetektion für 5 min mit Ponceau S Färbelösung (2% (w/v) Ponceau S in 3% (v/v) Trichloressigsäure) gefärbt und nach kurzem Waschen in H<sub>2</sub>O(MQ) auf einem Durchlicht-Leuchtschirm abfotografiert.

## 2.13 Molekularbiologische Arbeiten

### 2.13.1 Isolation genomischer DNA aus Arabidopsis

#### Extraktionspuffer:

##### **2x CTAB-Puffer**

CTAB (Cetyl-trimethyl-ammonium bromid)	2% (w/v)
NaCl	1,4 M
Tris-HCl pH 8,0	100 mM
EDTA	20 mM

#### Durchführung:

Um Insertionslinien oder transgene Pflanzen auf die jeweils eingebrachten DNA-Sequenzen zu überprüfen, wurde folgendes einfache und schnell durchzuführende Protokoll nach (Murray and Thompson, 1980) angewendet:

Ein Arabidopsis Rosettenblatt oder 10 bis 15 Keimlinge wurden in einem Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einem Pistill zu feinem Pulver zerrieben. Anschließend wurde 300 µl vorgewärmter 2x CTAB-Puffer hinzugegeben und bei 65 °C inkubiert (15 min bis zu mehreren Stunden). Nach Abkühlung der Proben wurden 300 µl Chloroform dazupipettiert und die Ansätze gründlich gemischt. Nach anschließender Zentrifugation (16.000 x g, 5 min) wurde die obere wässrige Phase mit der DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl eiskaltem Isopropanol vermischt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert (16.000 x g, 5 min) und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und der Überstand sorgfältig abgenommen. Die DNA wurde 15 min im Trockenschrank (37 °C) getrocknet und anschließend in 50 µl autoklaviertem H<sub>2</sub>O(MQ) mit 1 mg/ml RNase zum Abbau enthaltener RNA (15 min bei 37 °C) aufgenommen. In anschließenden PCR-Reaktionen wurden 0,5 bis 1 µl DNA als *template* eingesetzt.

### 2.13.2 Isolation von DNA aus Cyanobakterien

#### Extraktionspuffer:

##### **Sucrose-Lysis-Puffer**

Tris-HCl pH 8,3	50 mM
EDTA	40 mM
Sucrose	750 mM
Lysozym	1 mg/ml
Proteinase K	10 mg/ml

Durchführung:

Die Isolation von DNA aus *Nostoc sp.* PCC 7120 erfolgte nach Jungblut und Höger (Jungblut *et al.*, 2006). 1,5 ml Cyanobakterienkultur wurde pelletiert (5.000 x g, 10 min) und in 1 ml Sucrose-Lysis-Puffer mit Proteinase K vollständig resuspendiert. 50 µl 20% SDS wurde hinzugegeben, kräftig gemischt und die Ansätze 1h bei 55 °C inkubiert, bevor Zellbruchstücke abzentrifugiert wurden (3.000 x g, 5 min). Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und gemischt, dann zentrifugiert (3.000 x g, 5 min). Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit zweifachem Volumen eiskaltem Isopropanol versetzt. Die Fällung der DNA erfolgte wie unter 2.13.1 beschrieben.

**2.13.3 Polymerase-Kettenreaktion**

Zur routinemäßigen Analyse von Plasmiden aus Bakterien oder genomischer DNA aus Pflanzen mittels PCR wurde, falls nicht anders angegeben, der von Tab. 2.4 aufgelistete Reaktionsansatz verwendet. Für die Amplifizierung von PCR Produkten, die als Inserts für Klonierungen dienen, wurde der Ansatz verdoppelt oder verdreifacht.

<b>Komponente</b>	<b>Endkonzentration</b>
10x PCR Puffer	1x
MgCl <sub>2</sub>	1,8 mM
dNTPs	2 µM
Primer forward	1 µM
Primer reverse	1 µM
DNA Polymerase	0,2 U
DNA ( <i>template</i> )	1 µl
H <sub>2</sub> O(MQ)	ad 20 µl

**Tab. 2.4: Standardmäßig verwendeter PCR-Ansatz**

In den Reaktionsgefäßen wurde der Mastermix (d.h. alle Komponenten außer der *template*-DNA) vorgelegt, dann die DNA hinzugefügt, vorsichtig gemischt und die Reaktion, falls nicht anders angegeben, nach folgendem Schema gestartet. Die Temperatur für die Anlagerung der Primer ( $T_a$ ) richtet sich nach der spezifischen Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der jeweils verwendeten Oligonukleotide und wurde in der Regel als  $T_a = T_m - 5$  °C gewählt. Für colony PCR, bei der als *template* direkt gepickte

Einzelkolonien von *E. coli* dienen, wurde die initiale Denaturierung auf 10 min verlängert, um die Zellen zu lysieren. In PCR-Analysen von cDNA wurden 32 Zyklen verwendet.

Vorgang	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
28 Zyklen		
Denaturierung	95 °C	45 s
Anlagerung der Primer	variabel	45 s
Elongation	72 °C	1 min pro 1 kb
Finale Elongation	72 °C	5 min
Programmende	20 °C	

**Tab. 2.5: Standardmäßig verwendeter PCR-Temperaturzyklus**

Direkt im Anschluss an die PCR wurden die Ansätze mit 6x Ladebuffer (EK 1x) versetzt und auf 1 bis 2%ige Agarosegele mit Ethidiumbromid (1 µl einer 10 mg/ml Lösung) aufgetragen. Als Referenz dienen 100bp oder 1kb DNA Marker. Die Elektrophorese erfolgte 25 min bei konstant 120 V, nach der Auftrennung wurden die DNA-Banden auf einem UV-Durchlichtgerät (Bachofer, Reutlingen; Aufsatz von LTF Labortechnik, Wasserburg/Bodensee; Kamera von Olympus, Hamburg) fotografiert.

#### 2.13.4 Reverse Transkriptase – PCR

Zur Herstellung von cDNA aus RNA wurden aus den Komponenten des First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) die in Tab. 2.6 enthaltenen Ansätze pipettiert:

Komponente	Endkonzentration
5x Reaktionspuffer	1x
Ribonuklease-Inhibitor	1 µl
dNTPs	1 mM
oligo (dT) <sub>18</sub> Primer (0,5 µg/µl)	0,5 µl
random hexamer Primer (0,5 µg/µl)	0,5 µl
M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/µl)	40 U
RNA ( <i>template</i> )	1 µg
H <sub>2</sub> O(MQ), DEPC behandelt	ad 20 µl

**Tab. 2.6: Ansatzschema für die RT-PCR**

Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 70 °C für 10 min abgestoppt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C. Für nachfolgende PCR-Reaktionen wurde die cDNA 1:5 oder 1:10 verdünnt und davon 1 µl als *template* eingesetzt.

### 2.13.5 Inserts und Vektoren

Für Klonierungen benötigte Inserts wurden entweder mittels PCR von genomischer DNA oder cDNA amplifiziert oder aus bereits vorhandenen Plasmiden über Restriktionsverdau ausgeschnitten. Nach der Gelelektrophorese erfolgte die Extraktion der gewünschten DNA Banden mit dem Peqlab E.Z.N.A. Gelextraktionskit exakt nach Vorschrift. Die mit dem Elutionspuffer von der Säulenmatrix eluierte DNA wurde zur Vorbereitung der Ligationen direkt in Restriktionsverdauen (50 oder 100 µl Gesamtvolumen) eingesetzt.

Benötigte Vektoren wurden mittels Restriktionsverdau für die Ligation vorbereitet und nach der Gelextraktion die DNA Überhänge dephosphoryliert, falls nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten wurde. Die Dephosphorylierungs-Ansätze enthielten 8 µl Vektor-DNA, 1 µl Phosphatase und 1 µl 10x Reaktionspuffer und wurden 1h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte für 5 min bei 65 °C die Hitzeinaktivierung der Phosphatase.

Zur Abschätzung der DNA Konzentrationen wurden die Komponenten für die Ligation zusammen mit *HindIII* geschnittener  $\lambda$ -Phagen DNA (250 ng) auf ein Agarosegel aufgetragen.

### 2.13.6 Ligation

Die Ligationsreaktionen mit T4-Ligase wurden in einem Volumen von 10 µl wie in Tab. 2.7 dargestellt angesetzt und für 1h bei 22 °C oder 16h bei 16 °C inkubiert:

Komponente	Menge/Volumen
Vektor DNA	50 bis 100 ng
Insert DNA	variabel
T4-Ligase Puffer 10x	1x
T4-Ligase (1 Weiss unit/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O(MQ)	ad 10 µl

Tab. 2.7: Reaktionsansätze für die Ligation von Inserts und Vektoren

Die Menge an eingesetztem Insert berechnet sich nach der Formel  $d \cdot a/b = c$ , wobei (a) Größe des Inserts in bp, (b) Größe des Vektors in bp, (c) einzusetzende ng Insert und (d) eingesetzte ng Vektor. Dabei wurde das Insert in dreifachem Überschuss gegenüber dem Vektor eingesetzt.

### 2.13.7 Transformation und Selektion von Bakterien

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen (DH5 $\alpha$ ) wurden mit der Hitzeschock-Methode transformiert. Dafür wurden die kompetenten Zellen (90  $\mu$ l) mit den Ligationsansätzen vermischt und für 30 min auf Eis belassen. Dann erfolgte für die Aufnahme der DNA in die Zellen im Wasserbad ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 s. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden 900  $\mu$ l LB-Medium zu den Zellen gegeben und diese für 1h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, bevor sie auf Selektionsplatten (LB/Amp100 oder LB/Kan50) ausplattiert und bis zum nächsten Tag bei 37 °C im Brutschrank inkubiert wurden.

Für die Transformation von Arabidopsis Pflanzen wurden entsprechende Konstrukte mittels Elektroporation in elektrokompente *A. tumefaciens* Zellen eingebracht. In vorgekühlten Elektroporationsküvetten wurden 80  $\mu$ l aufgetaute Bakteriensuspension und 1  $\mu$ l Plasmid-DNA gemischt. Im Elektroporator (EasyjecT von Wolf Laboratories, York, UK) erfolgte die Transformation mit folgenden Einstellungen: U = 2.500 V; C = 25  $\mu$ F; R = 700  $\Omega$ , t = 17,5 ms; Elektrodenabstand 12 mm. Danach wurden die Zellen zusammen mit 800  $\mu$ l LB-Medium in ein Reaktionsgefäß überführt und für 2h bei 28 °C im Heizblock geschüttelt, bevor sie auf Selektionsplatten ausplattiert und für 2 Tage bei 30 °C inkubiert wurden.

### 2.13.8 Plasmid-Minipräparation

Lösungen:

#### Lösung1

Glucose	50 mM
EDTA	10 mM
Tris-HCl pH 8,0	25 mM

#### Lösung2

NaOH	0,2 M
SDS	1% (w/v)

#### Lösung 3

5 M Kaliumacetat pH 5,2	60 ml
Essigsäure	11,5 ml

### Durchführung:

Putativ positive Klone (Einzelkolonien), die auf den Selektionsplatten gewachsen waren, wurden mit sterilen Zahnstochern gepickt und damit 5 ml LB-Selektionsmedium für die Plasmid-Minipräparation angeimpft. Gleichzeitig wurde jeder Klon auf Masterplatten ausgestrichen. Nach 16h bei 37 °C auf dem Schüttelinkubator wurden die Zellen in 2 ml Reaktionsgefäßen abzentrifugiert (2 min, 12.000 x g) und in 100 µl Lösung 1 vollständig resuspendiert. Für die alkalische Lyse wurden 200 µl Lösung 2 hinzugefügt und 5 min bei RT inkubiert, um die DNA freizusetzen. Zur Neutralisation (Proteinfällung) wurden 150 µl Lösung 3 hinzugegeben und die Ansätze nach einer Inkubation von 10 min auf Eis bei 4 °C zentrifugiert (10 min, 16.000 x g). Die Überstände wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und die DNA mit dem 2,5fachen Volumen eiskaltem Isopropanol gefällt (20 min bei -20 °C). Nach Zentrifugation (10 min, 16.000 x g) wurden die DNA Pellets mit eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen, 10 min bei 37 °C getrocknet und in 50 µl autoklaviertem H<sub>2</sub>O(MQ) aufgenommen. Zur Entfernung von RNA schloss sich ein Verdau mit RNase (1 mg/ml) für 15 min bei 37 °C an.

Für die Plasmidpräparation aus Agrobakterien wurden die Ansätze vor der Isopropanol-Fällung der DNA phenolysiert. Dazu wurde zum Überstand (nach Lösung 3 und Zentrifugation) das gleiche Volumen Phenol/Chloroform (1:1) gegeben, gut gemischt und zentrifugiert (5 min, 16.000 x g). Der Überstand wurde zur Fällung der DNA in einem neuen Reaktionsgefäß mit Isopropanol versetzt (s.o.).

### **2.13.9 Kontrolle putativer Klone und Konservierung**

Zur Identifizierung positiver Klone wurde die in den Minipräparationen gewonnene DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen inkubiert und das erhaltene Bandenmuster mit der parallel erstellten Vektorkarte verglichen. Kontrollverdau wurden in Ansätzen von 20 µl durchgeführt und enthielten 2 µl (*high copy*) bzw. 6 µl (*low copy*) Plasmid-DNA, Reaktionspuffer (1x) und 0,1 bis 0,2 U Restriktionsendonuklease(n).

Positive Klone wurden von der Masterplatte vereinzelt, Übernachtskulturen in Selektionsmedium angeimpft und diese zur Konservierung in Glycerinkulturen überführt (50% (v/v) Glycerin), die bei -80 °C gelagert werden. Gleichzeitig erfolgte die Kontrolle der Klone durch Sequenzanalyse (MWG Eurofins, Ebersberg, Deutschland).

## 2.14 Konfokale Mikroskopie

Zur Analyse von EGFP-exprimierenden Linien und Biman-Konjugaten wurde ein inverses konfokales Laserscanning Mikroskop, Modell Fluoview FV1000 (FV10-ASW) von Olympus, Japan, verwendet.

Zur Anregung des EGFP kam ein Argonlaser mit  $\lambda = 488$  nm zum Einsatz, die Fluoreszenz von EGFP wurde bei  $\lambda = 510$  nm detektiert.

### Objektive

10x	UPFLN 10x/0,3	Arbeitsabstand: 10 mm
20x	UPFLN 20x/0,5	Arbeitsabstand: 2,1 mm
40x	PLABPO 40x/0,8 Wasser	Arbeitsabstand: 0,16 mm
60x	LUMPLFL 60x/1,1 Wasser	Arbeitsabstand: 2 mm

### Probenvorbereitung

Protoplastensuspensionen wurden nach Präparation und Waschen mit WIMK auf Objektträgern mit Deckgläsern oder auf speziellen, mit einer Vertiefung versehenen Deckgläsern mikroskopiert.

Transgene Keimlinge der T2- bzw. T3-Generation wurden drei Tage nach der Keimung mikroskopiert. Dazu wurden entweder komplette Keimlinge oder einzelne Keimblätter und Wurzeln vorsichtig zwischen Objektträger und Deckglas mit MS-Medium platziert.

Zellkulturen wurden aus den Erhaltungskulturen in 25 ml-Erlenmeyerkolben überführt, 1 min mit MCB versetzt, anschließend gewaschen und in Zeitserien unter dem Mikroskop fotografiert.

## 3. ERGEBNISSE

### 3.1 Funktionale Analyse der *AtPCS*-Gene

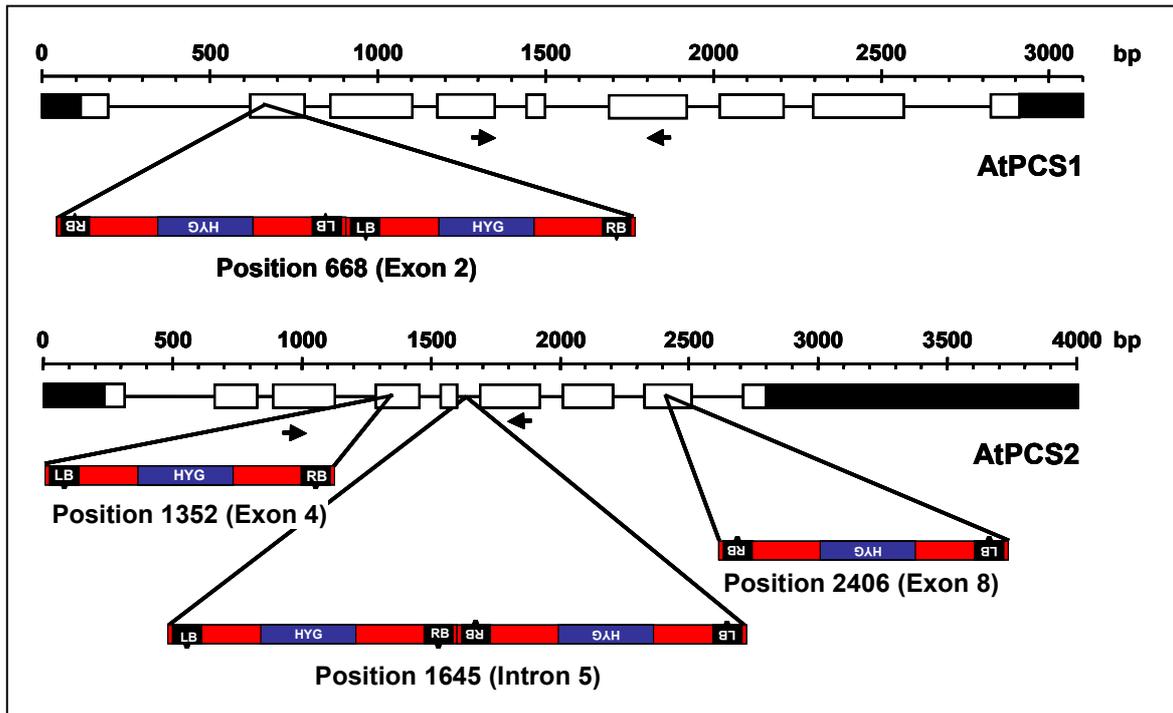
Vorrangiges Ziel der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche war die Untersuchung einer Funktion der Phytochelatinsynthese im Abbau von Glutathion-Biman-Konjugaten (GS-Biman) *in planta*. Zu diesem Zweck wurden unabhängig von den bekannten *cad1*-Linien mit Punktmutationen im Gen für *AtPCS1* (Howden and Cobbett, 1992; Howden *et al.*, 1995b; Ha *et al.*, 1999) neue Linien mit T-DNA Insertionen in den Genen für *AtPCS1* und insbesondere auch für *AtPCS2* gesucht. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde mit der Unterstützung von Dr. Czaba Koncz, MPI für Züchtungsforschung, Köln, eine Sammlung von Arabidopsis T-DNA Insertionslinien des Ökotyps Columbia 0 gescreent (Rios *et al.*, 2002). Diese Arbeiten wurden von Dr. A. Beck initiiert.

#### 3.1.1 Genetische Charakterisierung der PCS knockout Linien

Für *AtPCS1* wurde eine Linie isoliert (#37837) und als  $\Delta$ PCS1 bezeichnet. In dieser Linie sind im Exon 2 an Position 668 (entspricht Aminosäureposition 40) zwei gegenläufige T-DNA Elemente inseriert, die Hygromycin-Resistenz vermitteln. Damit liegt die Insertion vor der katalytischen Triade des Enzyms.

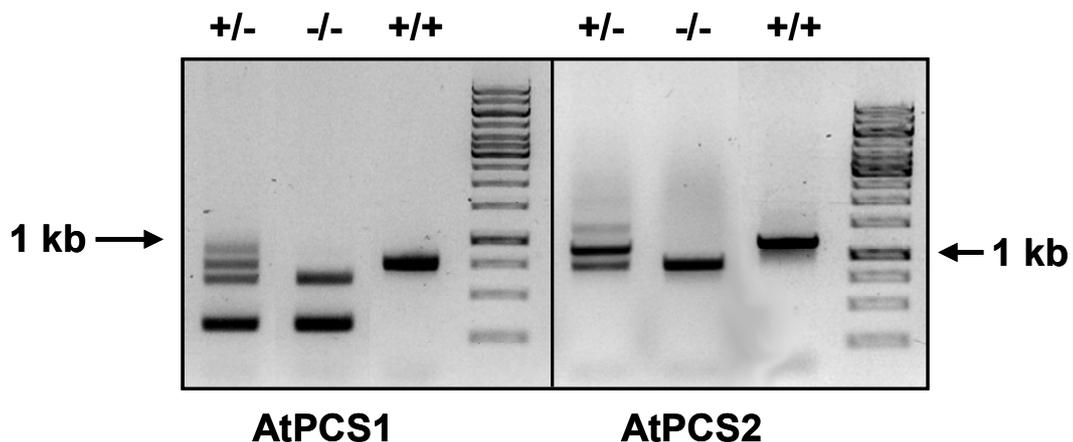
Für *AtPCS2* wurden zunächst 3 T-DNA Linien isoliert, jeweils mit T-DNA Elementen in Exon 4 (#48045), Intron 5 (#61994) und Exon 8 (#84499). Für weitere Arbeiten wurde die Linie #48045 ausgewählt und als  $\Delta$ PCS2 bezeichnet. In dieser Linie liegt das Hygromycinresistenz vermittelnde T-DNA Element an Aminosäureposition 178 und damit im Bereich der katalytischen Triade des Enzyms. Abb. 3.1 veranschaulicht die Positionen der T-DNA Insertionen in den Genen für *AtPCS1* und *AtPCS2*, wie sie durch PCR und Sequenzierung der flankierenden Bereiche ermittelt wurden.

Die Insertionslinien  $\Delta$ PCS1 und  $\Delta$ PCS2 wurden jeweils dreimal mit dem Wildtyp (Col-0) rückgekreuzt, bevor durch Kreuzung der beiden Einzelmutanten die Doppelmutantenlinie  $\Delta$ PCS erzeugt wurde. Die genetische Überprüfung der Linien auf die Insertionsorte #37837 (*AtPCS1*) und #48045 (*AtPCS2*) erfolgte mit genomischer DNA und geeigneten Primerkombinationen aus genspezifischen und T-DNA spezifischen Primern, wobei letztere als Fish1 und Fish2 aus der Arbeit von Rios und Mitarbeitern (Rios *et al.*, 2002) entnommen wurden. Für nähere Informationen siehe Teil Material und Methoden und Primerliste im Anhang. Abb. 3.2 zeigt die Bandenmuster, die bei diesen Analysen erhalten wurden.



**Abb. 3.1:** Lage der T-DNA Insertionen innerhalb der Gene für *AtPCS1* und *AtPCS2* in den isolierten Linien.

Die Skalen geben die Länge der Gene in Basenpaaren an. Schwarze Balken repräsentieren untranslatierte Regionen (UTR), weiße Balken Exons und einfache Linien Introns. Als kleine schwarze Pfeile sind die Positionen der Primer eingezeichnet, die für die RT-PCR Analyse verwendet wurden. HYG, Hygromycin-Resistenzgen; LB, *left border*, RB, *right border*.

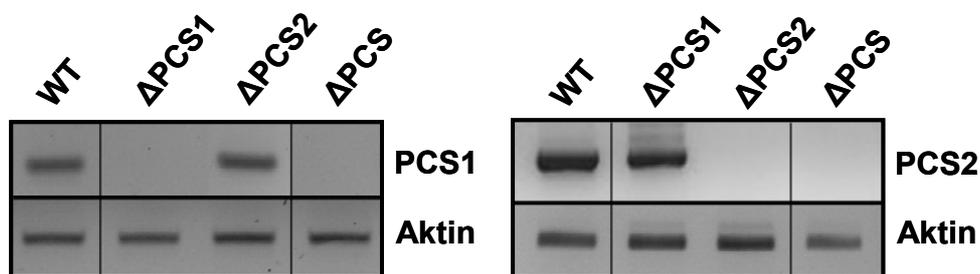


**Abb. 3.2:** PCR-Analyse der PCS-Insertionslinien  $\Delta$ PCS1,  $\Delta$ PCS2 und  $\Delta$ PCS mit genspezifischen und T-DNA spezifischen Primern.

Für die T-DNA Insertionen im Gen für *AtPCS1* und *AtPCS2* sind jeweils von links nach rechts die Bandenmuster für heterozygot und homozygot mutante Individuen und für den Wildtyp gezeigt. Dabei bezeichnet (+) das Wildtypallel und (-) das Mutanten-Allel mit T-DNA Insertion. Aufgrund der doppelten Insertion in locus #37837 entstehen hier durch die verwendete Primerkombination zwei PCR-Produkte.

Im Fall von  $\Delta$ PCS1 (#37837) ergaben sich aufgrund der doppelten, gegenläufigen T-DNA Insertion zwei Banden von etwa 640 bp bzw. 330 bp, im Wildtyp wurde ein Produkt von 750 bp amplifiziert. Für die Insertion in *AtPCS2* (#48045) wurde ein PCR-Produkt von etwa 900 bp amplifiziert, während DNA aus dem Wildtyp eine Bande bei ungefähr 1.200 bp lieferte.

Bei funktionaler Inaktivierung von Genen durch T-DNA Insertion sollte in der RT-PCR Analyse kein Transkript, d.h. keine mRNA mehr nachgewiesen werden können. Um dies in den erhaltenen drei Mutantenlinien zu überprüfen, wurde aus ihnen RNA isoliert, mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese in der nachfolgenden PCR mit genspezifischen Primern eingesetzt. Die verwendeten Primerkombinationen sind in Abb. 3.1 eingezeichnet. Wie in Abb. 3.3 gezeigt, konnte in keiner der beiden Einfachmutanten und folglich auch nicht in der Doppelmutante ein spezifisches PCR-Produkt als Nachweis für das Wildtyp-Allel amplifiziert werden. Die Kontrollbanden, die mit Primern für Aktin (*At2g37620*) amplifiziert wurden, sind in allen Ansätzen vorhanden und bestätigen die Qualität der RNA bzw. cDNA.

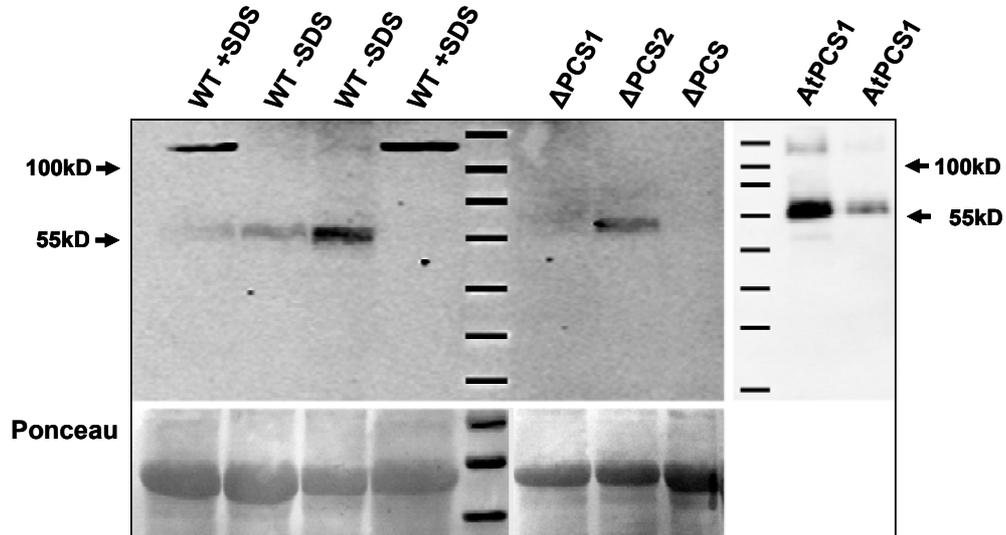


**Abb. 3.3: RT-PCR Analyse der PCS Insertionslinien**

Die cDNA der  $\Delta$ PCS1-,  $\Delta$ PCS2- und  $\Delta$ PCS-Linien wurde mit den in Abb. 3.1 eingezeichneten Primerkombinationen analysiert. Als Kontrolle dienten Primer für Aktin (*At2g37620*). Mit den jeweils für *AtPCS1* und *AtPCS2* spezifischen Primerkombinationen konnten aufgrund der T-DNA Insertionen in den entsprechenden Linien keine PCR-Produkte amplifiziert werden.

Um das Bild der molekularbiologischen Charakterisierung zu vervollständigen, wurden Proteinrohextrakte aus dem Wildtyp und den PCS-Insertionslinien mittels Western Blot Analyse untersucht (Abb. 3.4). Die Immunfärbung der Proteinblots mit dem verwendeten anti-AtPCS1 Antikörper zeigte deutliche Banden bei ca. 55 kDa, dem Molekulargewicht von *AtPCS1*, in den Proben aus Wildtyp und  $\Delta$ PCS2. Kein Protein konnte jedoch in  $\Delta$ PCS1- und  $\Delta$ PCS-Proben detektiert werden. In den Wildtyp-Proben, die mit 2% SDS im Homogenisierungspuffer aufgeschlossen wurden, ergaben sich Signale bei 110-120 kDa, die möglicherweise *AtPCS1*-Dimeren entsprechen. Der rechte Teil von Abb. 3.4 zeigt

rekombinantes AtPCS1-Protein, das als Positivkontrolle aufgetragen wurde und die Banden bei ca. 55 kDa bestätigt.

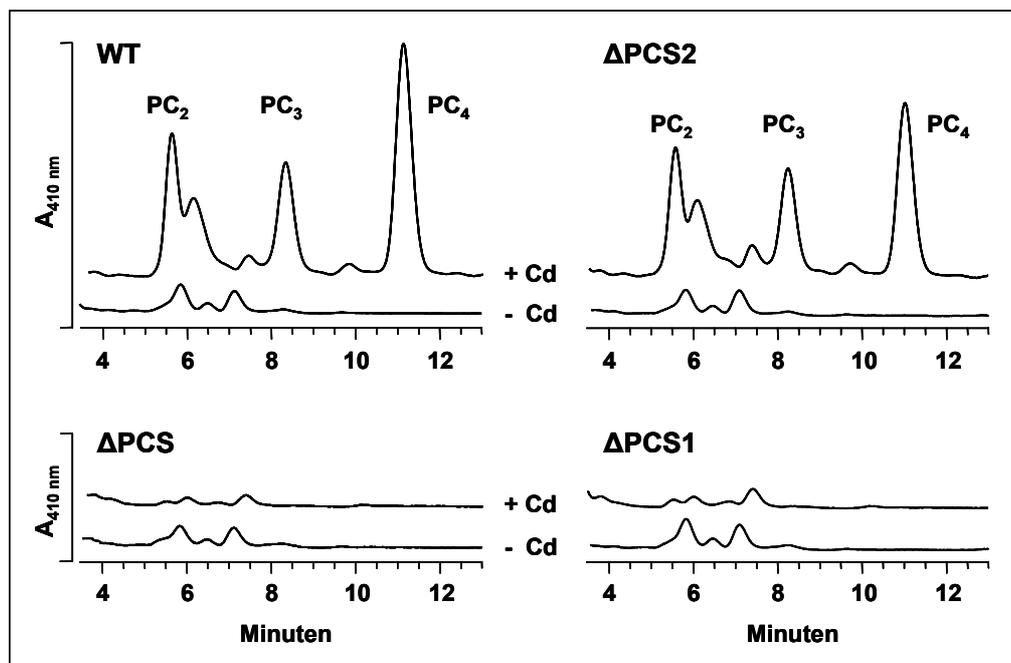


**Abb. 3.4: Western Blot Analyse der PCS-Insertionslinien**

Von Wildtyp und PCS-defizienten Linien wurden Proteinrohextrakte hergestellt und jeweils 20 µg Protein je Gelspur aufgetragen. Zwei Proben des Wildtyps wurden zusätzlich mit 2% SDS im Homogenisierungspuffer aufgeschlossen (+SDS), alle anderen Proben ohne SDS. Nach der Antikörperdetektion (Belichtungszeit 5 min) wurde die Blotmembran mit Ponceau S angefärbt, um die Beladung aller Gelspuren zu dokumentieren. Als Positivkontrolle diente rekombinantes AtPCS1-Protein aus *E. coli*, das nicht quantitativ in zwei Verdünnungen aufgetragen wurde (Belichtungszeit 1 min).

### 3.1.2 Analyse von Phytochelatinen und Cd-Toleranz

Bei fehlender Funktion der Phytochelatinsynthese sollten in Arabidopsis nach Schwermetallbelastung keine PCs synthetisiert werden. Um dies zu überprüfen, wurden Arabidopsis Keimlinge in Flüssigmedium angezogen und für 48h mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  belastet. Jeweils 120 mg Keimlingsmaterial (FG) wurden extrahiert und in der HPLC mittels Nachsäulenderivatisierung analysiert, um Sulfhydrylgruppen spezifisch zu erfassen (Abb. 3.5). In den Linien mit funktionaler AtPCS1 (WT und  $\Delta\text{PCS2}$ ) konnten die Phytochelatinketten  $\text{PC}_2$ ,  $\text{PC}_3$  und  $\text{PC}_4$  detektiert werden, hingegen fehlten die entsprechenden Peaks in den Linien, in denen AtPCS1 inaktiviert war ( $\Delta\text{PCS1}$  und  $\Delta\text{PCS}$ ). Für den Wildtyp ergaben sich 146 nmol GSH /g FG, 34 nmol  $\text{PC}_2$ /g FG, 30 nmol  $\text{PC}_3$ /g FG und 50 nmol  $\text{PC}_4$ /g FG, jeweils  $\pm 20\%$  ( $n=3$ ).

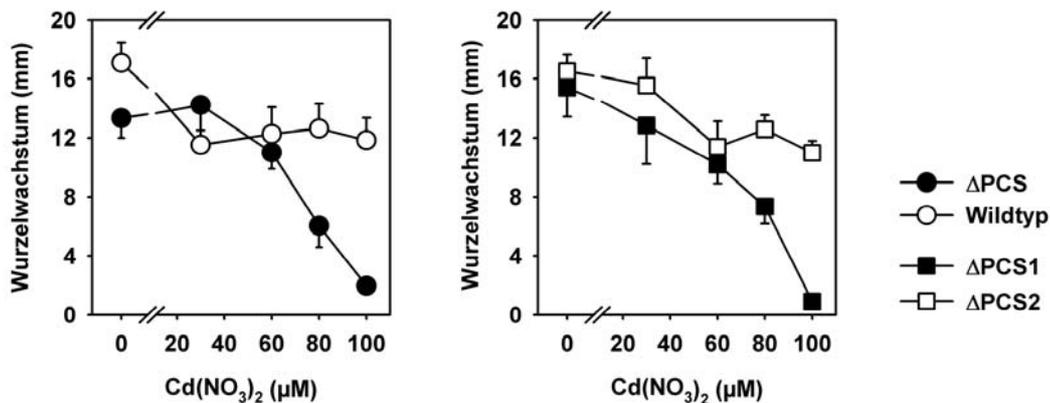


**Abb. 3.5: Analyse von Phytochelatinen im Wildtyp (Col-0) und in PCS-defizienten Linien**

Fünf Tage alte Keimlinge wurden in B5-Medium für 48h ohne oder mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  geschüttelt und anschließend für die PC-Analyse extrahiert (FG 120 mg). Chromatogramme wurden auf GSH des WT normalisiert. Die Peaks für  $\text{PC}_2$ ,  $\text{PC}_3$  und  $\text{PC}_4$  sind in den oberen Chromatogrammen gekennzeichnet. Der sich an  $\text{PC}_2$  anschließende Peak stellt des-Gly- $\text{PC}_2$  dar.

Zusätzlich zur Analyse der PC-Synthese wurde in Wurzelwachstumstests die Cd-Toleranz der Insertionslinien untersucht. Hierfür wurden auf MS-Platten angezogene Keimlinge vier Tage nach der Keimung auf MS/50% Sucrose-Platten mit verschiedenen Cd-Konzentrationen umgesetzt und nach 72h der Wurzelzuwachs ausgewertet. Wie erwartet konnte beobachtet werden, dass analog zu den Ergebnissen der PC-Analyse die

Linien mit nicht funktionaler AtPCS1 verminderte Cd-Toleranz aufwiesen (Abb. 3.6). Dabei zeigte sich der Konzentrationsbereich zwischen 60 und 80  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  als kritisch für die Cd-intoleranten Linien. Bei 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  waren diese fast vollständig in ihrem Wurzelwachstum gehemmt und hatten nach drei Tagen auch chlorotische Keimblätter.  $\Delta\text{PCS}$  zeigte nur noch rund 15% und  $\Delta\text{PCS1}$  rund 8% des Wertes der jeweiligen Nullkontrolle. Der Wildtyp und  $\Delta\text{PCS2}$  hingegen erreichten bei dieser Cd-Konzentration noch rund 70% des Referenzwertes von den entsprechenden Platten ohne Cadmium.



**Abb. 3.6: Wurzelwachstum von Wildtyp und PCS-defizienten Linien auf Cd-Agarplatten**  
 Vier Tage alte Keimlinge wurden von MS-Agarplatten auf MS/50% Sucrose-Platten ohne bzw. mit verschiedenen  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  Konzentrationen umgesetzt und das Wurzelwachstum nach drei Tagen gemessen. Alle Messpunkte zeigen die Mittelwerte von 14 Keimlingen mit SD.

### 3.1.3 Phänotyp der PCS-defizienten Linien

Bei keiner der PCS-defizienten Linien war ein direkt äußerlich erkennbarer Phänotyp zu beobachten (Abb. 3.7). Keimung, Aussehen der Keimlinge, Bildung der Blattrosette und Infloreszenzen und Ansetzen der Schoten unterschieden sich nicht vom Wildtyp (Col-0). Durch Mutagenese von Samen der Doppelmutantenlinie  $\Delta\text{PCS}$  wurde untersucht, ob durch zusätzliche Mutationen die Häufung bestimmter Phänotypen zu beobachten ist. In der Folge sollte durch nähere Analysen ein Zusammenhang zwischen PCS-Dysfunktion und dem zusätzlichen Defekt hergestellt werden und so auf weitere Stoffwechselfunktionen der Phytochelatinsynthese geschlossen werden. In der Analyse von EMS-mutagenisierten M2-Samen wurden jedoch keine auffälligen Beobachtungen gemacht.

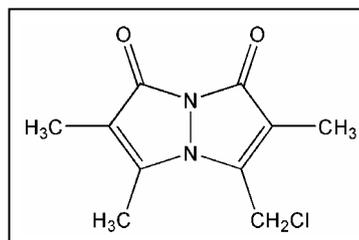


**Abb. 3.7: Habitus der beschriebenen PCS-knockout-Linien**

Die Abbildung zeigt 10 Tage (A), 18 Tage (B) und 24 Tage (C) alte Arabidopsis-Pflanzen, die unter den im Methodenteil beschriebenen Bedingungen in der Phytokammer angezogen wurden. Zu keinem Zeitpunkt war ein vom Wildtyp abweichender, äußerlich erkennbarer Phänotyp der PCS-Insertionslinien zu beobachten. Wildtyp Col-0 (orange),  $\Delta$ PCS1 (weiß),  $\Delta$ PCS2 (grün),  $\Delta$ PCS3 (gelb). Die Balken markieren jeweils eine Länge von 2 cm.

### 3.1.4 Physiologische Charakterisierung der PCS knockout Linien

Die *in vitro* Untersuchungen zum Abbau von GS-Konjugaten durch die Phytochelatinsynthese wurden u.a. mit GS-Biman durchgeführt (Beck *et al.*, 2003). Sie ergaben, dass AtPCS1 GS-Biman effizient zu  $\gamma$ -Glu-Cys-Biman (EC-Biman) umsetzt. Durch physiologische Belastungsversuche mit Biman wurde in verschiedenen pflanzlichen Systemen (Suspensionszellkulturen, Protoplasten und Keimlingen) der Abbau von GS-Biman durch die Phytochelatinsynthese *in planta* analysiert.



**Abb. 3.8: Molekülstruktur von Monochlorobiman**

Die Markierung von Thiolen mit Biman zur weiteren qualitativen und quantitativen Analyse ist eine gut etablierte und vielfach angewandte Methode (Fahey *et al.*, 1980).

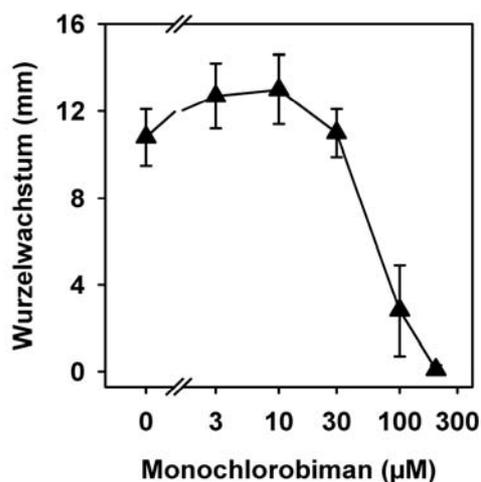
Monobromobiman (MBB) ist wegen des Bromatoms im Molekül reaktiver und deshalb toxischer als Monochlorobiman (MCB). Deshalb wurde für *in vivo* Markierungsexperimente MCB verwendet (Abb. 3.8), das wegen seiner geringeren spontanen Reaktivität mit Thiolgruppen spezifischer durch die Aktivität von GSTs an GSH konjugiert wird (Coleman *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2001).

Durch seine Kopplung an GSH stellt MCB gleichzeitig ein Modell-Xenobiotikum dar, das über den GS-Konjugatweg metabolisiert wird. Bevor die PCS-defizienten Linien zum Einsatz kamen, wurde in Vorversuchen mit Keimlingen und Zellsuspensionskulturen des Wildtyps (Col-0) die generelle Toxizität von MCB bestimmt.

Der zu erwartende Unterschied zwischen Wildtyp und PCS-defizienten Linien würde sich in den gebildeten Mengen des Abbauprodukts EC-Biman äußern. Deshalb wurde im Vorfeld untersucht, welches Metabolitmuster der Biman-Derivate nach Fütterung von Zellen und Keimlingen mit MCB zu detektieren ist, wie sich der zeitliche Verlauf des Abbaus von GS-Biman zu C-Biman darstellt und wie gut die Zwischenprodukte auf dem Weg zum C-Biman in den erhaltenen HPLC-Chromatogrammen sichtbar sind.

#### 3.1.4.1 Metabolismus von GS-Biman im Wildtyp

Um die Toxizität des verwendeten MCB abzuschätzen, wurde ein Wurzelwachstumstest mit Wildtyp (Col-0) Keimlingen durchgeführt (Abb. 3.9).



#### Abb. 3.9: Bestimmung der Toxizität von Monochlorobiman in Keimlingen

Zur Bestimmung der Toxizität von Monochlorobiman (MCB) wurde ein Wurzelwachstumstest mit *Arabidopsis* Keimlingen (Col-0) durchgeführt. Vier Tage alte Keimlinge wurden von Nährmediumsplatten ohne MCB auf Platten mit verschiedenen MCB-Konzentrationen umgesetzt. Der Zuwachs der Wurzeln wurde nach drei Tagen gemessen. Angegeben sind Mittelwerte von 16-20 Keimlingen mit SD.

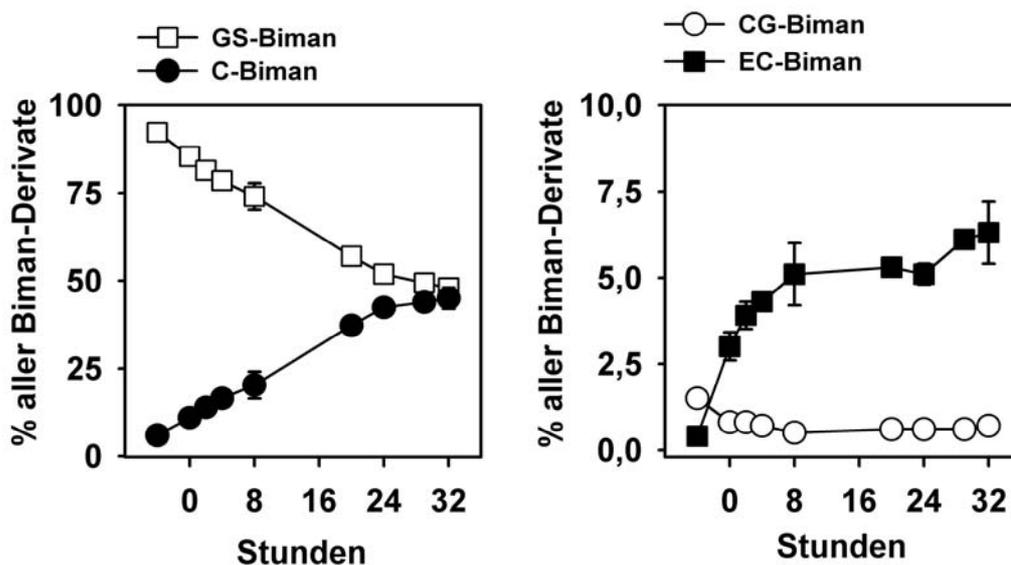
Nach drei Tagen Wachstum auf Medium mit verschiedenen MCB Konzentrationen zeigte sich, dass bei Konzentrationen über 30  $\mu\text{M}$  eine deutliche Hemmung des Wachstums erfolgte. Mit der in allen Versuchen mit Keimlingen, Zellkulturen und Protoplasten verwendeten MCB-Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  wird dieser toxische Schwellenwert deutlich unterschritten. Gleichzeitig zeigte die sich maximal ergebende Konzentration des Lösungsmittels Acetonitril von 0,1% in Belastungsversuchen (0,2% im Wurzelwachstumstest) keinen inhibitorischen Effekt.

### **Zeitreihe der MCB-Metabolisierung in Keimlingen**

Um in Keimlingen eine ausreichende Markierung von Glutathion mit Biman zu erreichen, musste MCB durch Vakuuminfiltration in das Gewebe gebracht werden. In Kombination mit einer Inkubationszeit von 4h zeigte sich dies als geeignete Methode, um etwa 20% des gesamten GSH Pools zu markieren (Abb. 3.10). Direkt nach der Infiltration ( $t = -4 \text{ h}$ ) betrug der Absolutwert an GS-Biman mit 72,5 nmol/g FG lediglich 22% des Wertes nach 4h (326,4 nmol GS-Biman/ g FG). Deshalb kann man davon ausgehen, dass in den ersten Stunden nach Einbringen des MCB ins Gewebe der Keimlinge das Xenobiotikum nach und nach in die Zellen diffundiert und an GSH konjugiert wird.

Es zeigte sich über den Zeitraum des Versuchs, dass das GS-Biman effizient zu C-Biman metabolisiert wurde, wobei zu jedem Zeitpunkt beide möglichen Zwischenprodukte, EC-Biman und CG-Biman, detektiert werden konnten. Nach 32h war der Anteil des GS-Biman durch Umsatz bis auf 48% reduziert, gleichzeitig erreichte C-Biman einen Anteil von etwa 45% an den Gesamtmetaboliten. CG-Biman war stets nur in geringen Mengen messbar, während im Vergleich dazu bereits zu Beginn der Zeitreihe die fast vierfache Menge an EC-Biman detektiert wurde. Nach 32h erreichte EC-Biman das Neunfache des CG-Anteils.

Eine nähere Betrachtung der Anteilsverhältnisse von EC- und C-Biman an den Abbauprodukten von GS-Biman ergibt folgendes: Zu Beginn der Zeitreihe liegen rund 20% EC-Biman und 75% C-Biman vor, nach 32h sind es 12% EC-Biman und 87% C-Biman. Dies deutet auf eine nachfolgende Metabolisierung von EC-Biman zu C-Biman hin.



**Abb. 3.10: Metabolismus von GS-Biman in Arabidopsis Wildtyp-Keimlingen**

Vier Tage alte Keimlinge wurden von Nährmediumsplatten in B5-Medium mit 5  $\mu\text{M}$  MCB überführt und nach Vakuuminfiltration (entspricht Zeitpunkt  $t = -4\text{h}$ ) 4 Stunden im Medium mit MCB inkubiert. Danach wurden sie gewaschen und in Medium ohne MCB transferiert (entspricht Zeitpunkt  $t = 0\text{h}$ ) und in einer Zeitreihe weitere Proben genommen wie angegeben. Bis zur Extraktion der Keimlinge für die HPLC-Analyse am Folgetag wurde das Material bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Gezeigt sind Werte einer repräsentativen Doppelbestimmung mit SD (es wurden fünf unabhängige Zeitreihen durchgeführt).

Eine Bilanzierung der Summe der Biman-Derivate ergibt, dass zu jedem Zeitpunkt in den Proben eine Gesamtmenge an Biman-Derivaten von  $13,3\text{ nmol} \pm 1,5\text{ nmol}$  ( $\pm 11\%$ ) detektiert werden konnte. Die Wahl des FG als Bezugsgröße führte dazu, dass von der zu Beginn gemessenen Menge an Gesamtderivaten von  $382,5\text{ nmol/g FG}$  nach 32h rechnerisch noch  $171\text{ nmol/g FG}$  zu detektieren waren. Berücksichtigt man jedoch die Zunahme an Biomasse um den Faktor 1,8 innerhalb der Zeitspanne des Versuchs, so kommt es durch den Bezug auf das FG zu einem Verdünnungseffekt. Durch den Einbezug dieser Zuwachsraten als Korrekturfaktoren ergeben sich nach 32h rund  $310\text{ nmol Biman-Derivate/g FG}$ . Damit liegt die Abweichung in der Summenbilanz im Rahmen der bei physiologischen Versuchen dieser Art stets zu beobachtenden Abweichung von rund 20% bei Doppel- oder Dreifachbestimmungen. Die Angabe von prozentualen Anteilen der jeweiligen Metabolite umgeht dieses Problem sowie die unterschiedliche Effizienz der Markierung mit Biman und wurde deshalb durchgehend für die Darstellung von Ergebnissen aus derartigen physiologischen Versuchen gewählt.

### Metabolisierung von GS-Biman in Zellkulturen

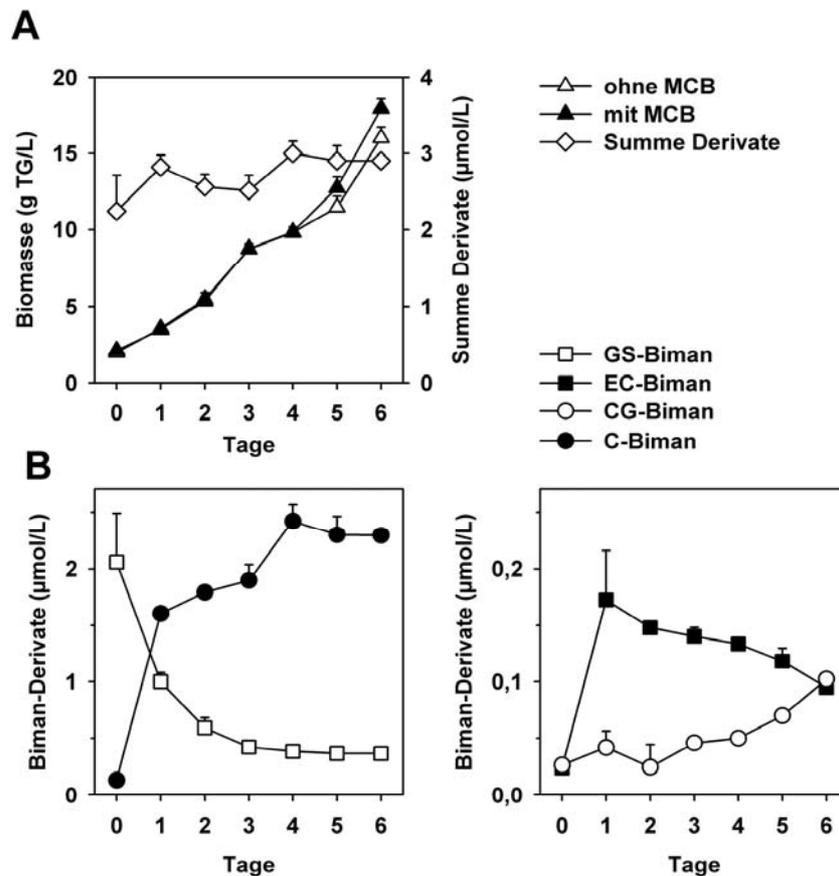
Parallel zu den Versuchen mit Keimlingen wurde eine Belastungszeitreihe mit Arabidopsis Zellsuspensionskulturen (Ökotyp *Landsberg erecta*) durchgeführt (Abb. 3.11).

Wachstumskurven mit und ohne 5 µM MCB im Zellkulturmedium zeigten keinen Einfluss von MCB in dieser Konzentration auf das Wachstum der Zellen (Abb. 3.11 A). Ein Anteil von etwa 25% des gesamten GSH-Gehalts der Zellen wurde unter diesen Bedingungen markiert. In den 20 ml-Ansätzen mit Arabidopsis-Zellen waren nach MCB-Zugabe maximal 0,05% Acetonitril enthalten, was keinerlei wachstumshemmende Effekte hatte.

Das in den Zellen gebildete GS-Biman wurde stetig abgebaut, begleitet von einem kontinuierlichen Anstieg der Menge an C-Biman. Nach drei Tagen waren rund 80% des GS-Biman zu C-Biman metabolisiert. Die Gesamtmenge an detektierten Derivaten (Wiederfindungsrate) blieb über den Zeitraum des Versuchs weitgehend konstant (Abb. 3.11 A), was darauf schließen lässt, dass keine weiteren Abbauprodukte entstanden, die in der HPLC-Analyse nicht erfasst wurden, oder dass Abbauprodukte in größeren Mengen ins Medium sekretiert wurden.

Die Zwischenprodukte des Abbauwegs von GS-Biman zu C-Biman waren auch in den Extrakten aus mit MCB belasteten Zellen zu jedem Zeitpunkt der Verlaufsreihe detektierbar. EC-Biman stellte zunächst die größere Intermediat-Fraktion dar, etwa das Vierfache des CG-Biman Anteils. Bis zum Tag 6 jedoch glichen sich die Mengen an, da der Anteil von EC-Biman durch nachfolgenden Umsatz zu C-Biman ab-, der von CG-Biman jedoch zunahm.

Bei den Zellkulturen war innerhalb von 1,5 Tagen etwa eine Verdopplung der Biomasse zu verzeichnen, nach gut drei Tagen hatten sich die Zellen auf das Vierfache und am Tag 6 auf das 7,5- bzw. 8,5fache vermehrt. Konstant blieb jedoch die Menge an Medium in den einzelnen Kolben. Um diese Veränderung in der Biomasse auszugleichen, erfolgt die Angabe der Werte pro Liter Zellkultur und entspricht weitgehend einer prozentualen Betrachtung.



**Abb. 3.11: Metabolismus von GS-Biman in Arabidopsis-Zellkulturen**

(A) Wachstumskurve (Trockengewicht) einer Arabidopsis-Zellkultur ohne und mit 5 µM MCB im Medium.

(B) Verlauf der Metabolisierung von GS-Biman in einer Arabidopsis-Zellkultur über 6 Tage. Die erste Probenahme erfolgte 10 min nach Zugabe von 5 µM MCB. Die Summe aller Biman-Derivate (Wiederfindung) ist als zusätzliche Kurve in (A) dargestellt. Die Symbole sind neben den Diagrammen erläutert.

Alle gezeigten Daten sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen mit SD.

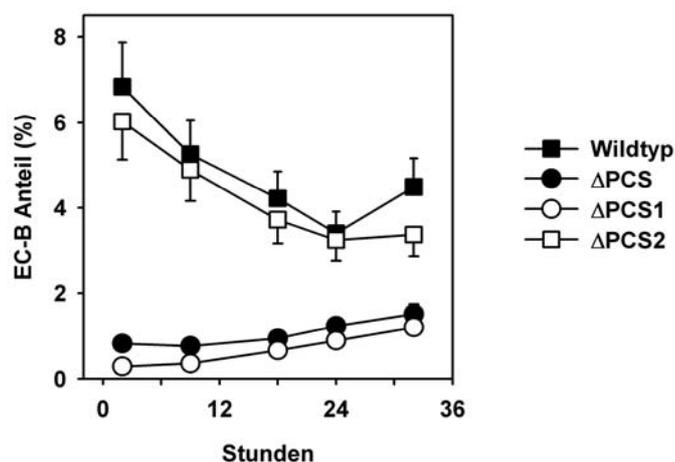
### 3.1.4.2 Metabolismus von GS-Biman in den PCS-defizienten Linien

Neben Keimlingen sollte auch in Versuchen mit den PCS-defizienten Linien ein weniger komplexes System zum Einsatz kommen. Als Ersatz für noch nicht ausreichend gut etablierte Zellkulturen boten sich Protoplasten an. Diese wandlosen, aus Blattmaterial durch enzymatischen Verdau jeweils frisch gewonnen Zellen sind zwar sehr empfindlich und weitaus weniger robust zu handhaben als Zellsuspensionskulturen, bieten jedoch ebenfalls die Vorteile eines homogenen Systems: das angebotene Xenobiotikum (Biman) findet gleichmäßigen Zugang zu allen Zellen und es kann mit einem gleichmäßigeren Umsatz in den Zellen gerechnet werden.

### Metabolisierung von GS-Biman in Protoplasten

Mit Protoplasten von Wildtyp und  $\Delta$ PCS, sowie den Einzelmutanten  $\Delta$ PCS1 und  $\Delta$ PCS2 wurden mehrere unabhängige Zeitreihen in Einzelbestimmung durchgeführt. Eine Abschätzung der Variation der Messpunkte erfolgte separat für ausgewählte Zeitpunkte in Dreifachbestimmung. Der dabei festgestellte Fehler lag maximal bei 15%. Da im Verlauf der Versuche, besonders ab 24h, auch ein Teil der Protoplasten lysierte, bot die Zellzahl keine verlässliche Bezugsgröße. Deshalb wurde hier die prozentuale Darstellung der Anteile der Metaboliten an der Summe aller Biman-Drivate gewählt.

Bei allen Linien war eine Abnahme des GS-Biman Anteils von anfangs 90-95% auf 76-83% zu beobachten. Gleichzeitig nahm der Anteil von C-Biman über die Zeit von rund 3% auf 12-18% zu. CG-Biman konnte in relativ konstanten Mengen detektiert werden, sein Anteil lag bei 0,8-1% in WT und  $\Delta$ PCS2 und bei 1-1,5% in den PCS1-defizienten Linien bzw. der Doppelmutante, war hier also leicht erhöht. Am deutlichsten zu sehen waren die Unterschiede der EC-Biman Anteile in den Protoplastenextrakten der vier Linien (Abb. 3.12). Im Wildtyp und in  $\Delta$ PCS2, beides Linien mit funktionaler AtPCS1, waren zu Beginn der Zeitreihe EC-Biman Anteile von 7 bzw. 6% zu detektieren, die bis zum Zeitpunkt von 24h auf 3,5% zurückgingen, um in der Folge wieder leicht anzusteigen. In  $\Delta$ PCS1 und  $\Delta$ PCS, beides Linien mit fehlender PCS1-Aktivität, war die EC-Biman Menge deutlich reduziert. Zu Beginn der Zeitreihe waren es 0,5 bzw. 1% EC-Biman und am Ende der Inkubation (32h) 1,5% in beiden Linien.



**Abb. 3.12: Bildung von EC-Biman in Arabidopsis-Protoplasten.**

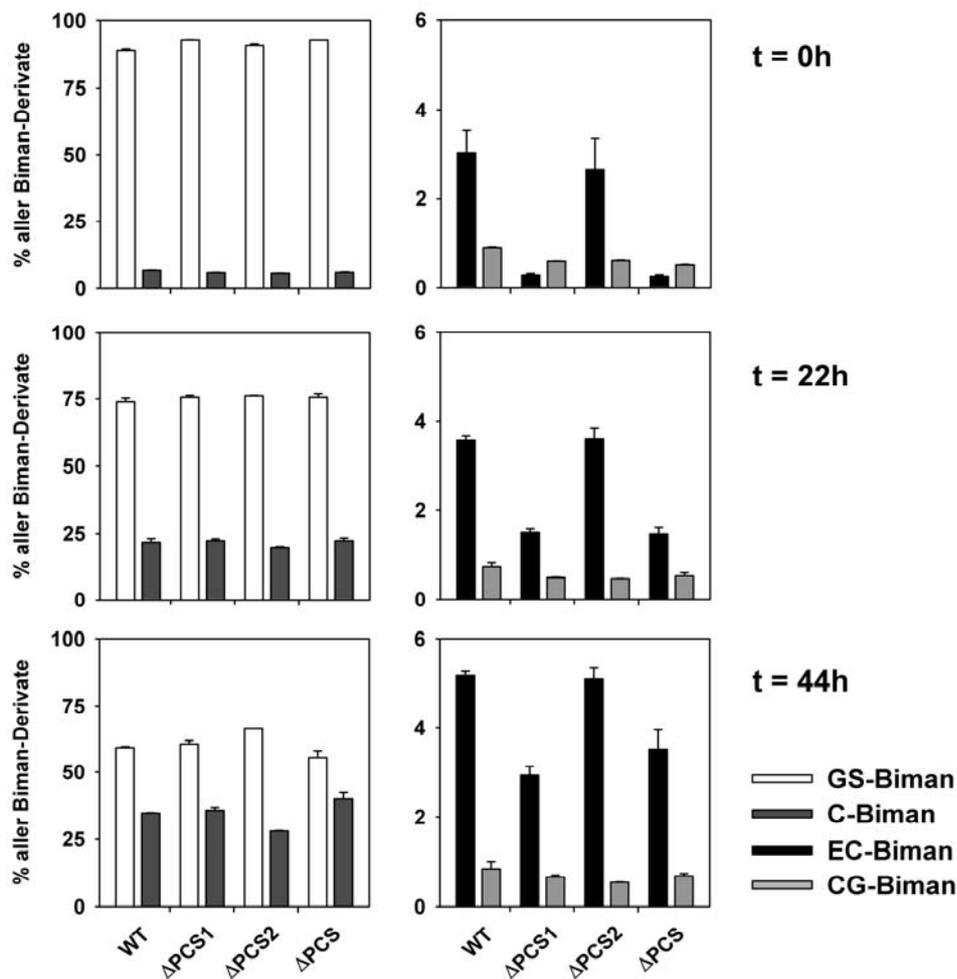
Die Protoplastensuspension ( $1 \times 10^5$  Zellen/ml) wurde in Aliquoten zu 0,5 ml in Reaktionsgefäßen mit 5  $\mu$ M MCB inkubiert. Nach 2 Stunden erfolgte die erste Probenahme, gefolgt von weiteren Zeitpunkten wie angegeben. Die Werte zeigen den prozentualen Anteil von EC-Biman an der Summe aller gebildeten Biman-Konjugate als Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit SD.

### Umsetzung von GS-Biman in PCS-defizienten Arabidopsis-Keimlingen

Von besonderem Interesse war die vergleichende Untersuchung des GS-Biman Metabolismus in ganzen Pflanzen, d.h. Arabidopsis-Keimlingen. Wieder wurden der Wildtyp (Col-0) als Referenz bzw. Positivkontrolle herangezogen und im Vergleich dazu die drei PCS-defizienten Linien getestet. Wie schon erwähnt, sind Keimlinge bereits komplexe Systeme, die nicht die Vorteile von homogenen Modellsystemen wie Zellkulturen oder Protoplastensuspensionen bieten. Mit Wurzel und Kotyledonen sind bereits Organe ausgebildet, die verschiedene Gewebeschichten besitzen. Dies bedingt eine langsame und unregelmäßige Diffusion von MCB zu den Zellen in den Geweben. Eine effiziente Markierung des GSH-Pools in Keimlingen mit Biman konnte nur mittels Vakuuminfiltration erreicht werden.

Der in Abb. 3.10 gezeigte Verlauf des GS-Biman Abbaus in Wildtyp-Keimlingen legte nahe, für die Untersuchung der Unterschiede in den Mutantenlinien auch einen über 1 oder 1,5 Tage hinausgehenden Zeitpunkt zu wählen, um den Abbau von GS-Biman auf unter 50% zu verfolgen. Die Keimlinge wurden nach 10 min Vakuum mit MCB-Medium (5  $\mu$ M) infiltriert und darin für 4h auf dem Schüttler inkubiert. Dann erfolgte die erste Probennahme (t=0), die Langzeitproben wurden gewaschen und in MCB-freies Medium überführt. Da die Markierung von GSH mit Biman zwischen einzelnen Versuchsansätzen variiert, sind auch in Abb. 3.13 die prozentualen Anteile der einzelnen Biman-Konjugate an der Summe aller Konjugate wiedergegeben. Zu Beginn der Zeitreihe war ein in allen Linien gleicher Anteil von 90 bis 95% GS-Biman vorhanden (weiße Balken). Cystein-Biman (C-Biman) stellte mit unter 10% in allen Linien die gegenüber GS-Biman deutlich kleinere Derivatfraktion dar (dunkelgraue Balken). Bereits zu diesem Zeitpunkt war entsprechend der Ergebnisse aus den Versuchen mit Protoplasten ein klarer Unterschied in den Anteilen von EC-Biman zu sehen (schwarze Balken). Wiederum zeigten der Wildtyp und  $\Delta$ PCS2 die größere Bildung von EC-Biman, der Anteil betrug 3%, während  $\Delta$ PCS1 und die Doppelmutante lediglich 0,5% EC-Biman aufwiesen. CG-Biman war in allen Linien mit 1% gleichermaßen zu detektieren (hellgraue Balken).

Bis 44h gingen die Anteile von GS-Biman auf 50-60% zurück, gleichzeitig stiegen die Anteile von C-Biman auf 30-40%. Ein Unterschied in der Umwandlung von GS-Biman zum letzten in der HPLC detektierten Derivat C-Biman war zwischen den Linien nicht zu erkennen. CG-Biman blieb bis zum Schluss mit seinen Anteilen um 1% eine konstante Größe. EC-Biman stieg über die Zeit in allen Linien an, jedoch in den PCS1-defizienten Linien stärker, nämlich um einen Faktor 10 von rund 0,3% auf 3,0 bzw. 3,5%. Im Wildtyp und  $\Delta$ PCS2 war es nur das 1,7 bzw. 2,0fache von 3,0 bzw. 2,6% auf 5,2 bzw. 5,1%.



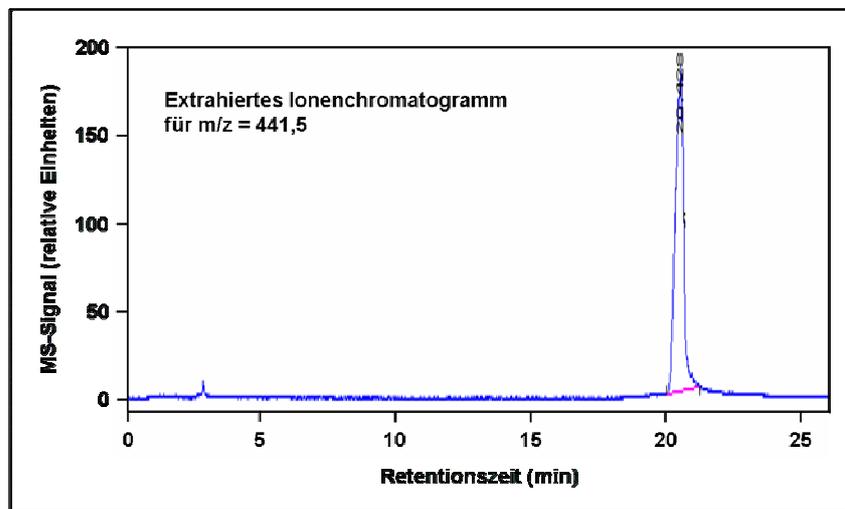
**Abb. 3.13: Metabolismus von GS-Biman in Arabidopsis-Keimlingen vom Wildtyp und den drei PCS-Insertionslinien**

Metabolisierung von GS-Biman in Arabidopsis-Keimlingen 0h, 22h und 44h (Diagramme paarweise von oben nach unten) nach Vakuumfiltration und 4h Inkubation mit 5  $\mu$ M MCB im Wildtyp (Col-0) und den Mutantenlinien  $\Delta$ PCS1,  $\Delta$ PCS2 und  $\Delta$ PCS. Die Werte repräsentieren Doppelbestimmungen mit SD.

In diesem Versuch wurden in den verschiedenen Ansätzen im Mittel 5 nmol Biman-Derivate  $\pm$  1 nmol ( $\pm$  20%) detektiert: Entsprechend 5,6 nmol/Ansatz in Wildtyp und  $\Delta$ PCS1 mit Schwankungen von 19 bzw 12%, in  $\Delta$ PCS2 5 nmol/Ansatz ( $\pm$  13%) und in  $\Delta$ PCS 4 nmol/Ansatz ( $\pm$  15,5%). Als entsprechende Absolutwerte mit Bezugsgröße Frischgewicht wurden beim ersten Zeitpunkt berechnet: 278,3 nmol/g FG (Wildtyp); 421,8 nmol/g FG ( $\Delta$ PCS1); 354,0 nmol/g FG ( $\Delta$ PCS2); 350,6 nmol/g FG ( $\Delta$ PCS).

Die dem EC-Biman über die Retentionszeit in der Fluoreszenzdetektion zugeordneten Peaks wurden mittels LC-ESI-MS Analyse verifiziert. Dazu wurden EC-Biman Fraktionen aufgefangen und für die MS-Analyse eingedampft und in H<sub>2</sub>O(MQ) aufgenommen. Sowohl

für den Wildtyp als auch für  $\Delta$ PCS konnte EC-Biman eindeutig als Signal bei  $m/z = 441,5$   $[M+H]^+$  identifiziert werden (Abb. 3.14).



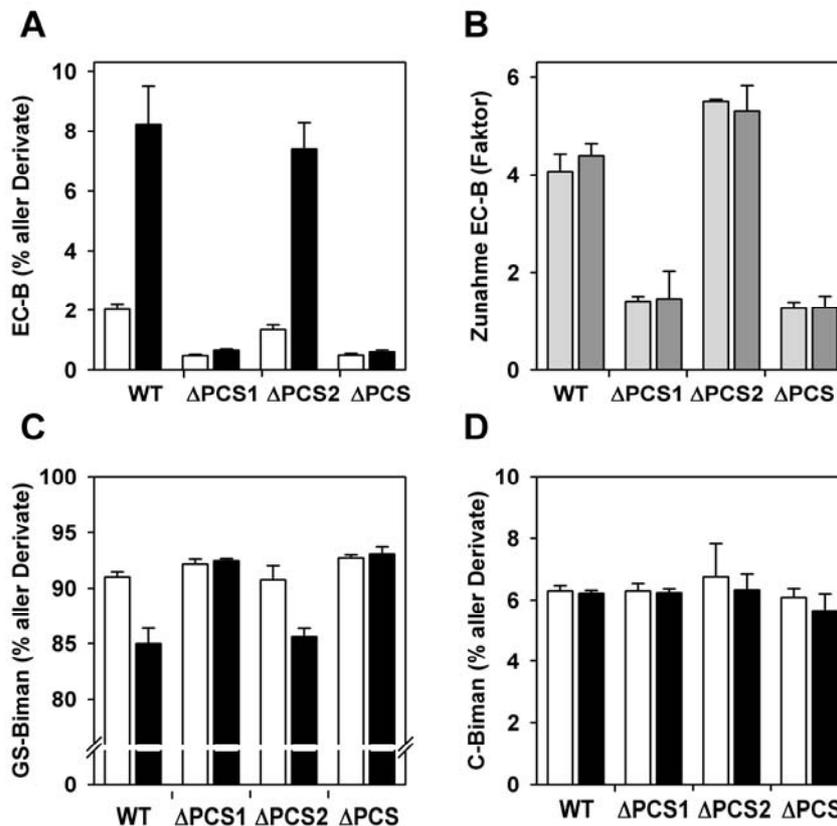
**Abb. 3.14: LC-ESI-MS Analyse der EC-Biman-Fractionen**

Aus einem Scanbereich von  $m/z$  50-500 wurde ein extrahiertes Ionenchromatogramm (EIC, positiver Detektionsmodus) erstellt, welches das spezifische Signal für die gesuchte Masse im Bereich zwischen 440,9 und 441,9 extrahiert. Das erhaltene Signal bei der Retentionszeit 20,6 min entspricht daher exakt der Molekülmasse von EC-Biman mit einem angelagerten Proton  $[M+H]^+ = 441,5$ .

### 3.1.4.3 Einfluss von Cadmium auf den GS-Konjugat Metabolismus

Es ist bekannt, dass die PC-Syntheseaktivität der PCS durch Schwermetallionen, besonders Cd, induzierbar ist. *In vitro* Versuche mit aufgereinigter AtPCS1 zeigten, dass auch die PCS-katalysierte Bildung von EC-Biman aus GS-Biman durch Cd-, Cu- und Zn-Ionen verstärkt werden kann (Beck *et al.*, 2003). Analog dazu sollte untersucht werden, ob auch *in planta* die Hydrolaseaktivität von AtPCS1 durch Cd-Ionen beeinflusst wird. Für diese Versuche wurde der Ansatz des ersten Zeitpunktes der Keimlings-Zeitreihe gewählt (Infiltration plus 4h), da hier nach kurzer Zeit bereits alle Metabolite zu detektieren waren und der Unterschied im Metabolitmuster zwischen den Linien am besten sichtbar war (Abb. 3.13). In den Ansätzen ohne Cd zeigte sich der bereits in der Keimlings-Zeitreihe und in Versuchen mit Protoplasten beobachtete Unterschied im EC-Biman Level. Durch parallele Inkubation von  $Cd(NO_3)_2$  mit MCB wurde in den Linien mit intakter AtPCS1 die Bildung von EC-Biman um das 4 bis 5fache gesteigert, während der Anstieg in den AtPCS1-defizienten Linien maximal einen Faktor von knapp 1,5 aufwies (Abb. 3.15). In Prozentanteilen ausgedrückt, entsprach die Menge an gebildetem EC-Biman im Wildtyp und in  $\Delta$ PCS2 ohne Cd 2,0% bzw 1,3% und in Anwesenheit von Cd 8,2% bzw. 7,4%. In  $\Delta$ PCS1 und  $\Delta$ PCS waren es ohne Cd 0,5% und mit Cd 0,7% bzw.

0,6%. Dies entspricht in WT und  $\Delta$ PCS2 dem 2,6 bis 4fachen (ohne Cd) und dem rund 12fachen (mit Cd) des EC-Biman Anteils der beiden anderen Linien. Das andere Zwischenprodukt, CG-Biman, war in Anteilen von 0,6 bis 1,2% vorhanden, zeigte aber kein erkennbares Muster der Verteilung zwischen den Linien oder den Ansätzen ohne und mit Cd (nicht gezeigt).



**Abb. 3.15: Aktivierung des AtPCS1-katalysierten Umsatzes von GS-Biman durch Cadmium**  
 Arabidopsis-Keimlinge wurden entweder nur mit 5  $\mu$ M MCB (weiße Balken) oder mit 5  $\mu$ M MCB und 10  $\mu$ M Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (schwarze Balken) infiltriert. Nach einer Inkubation von 4h erfolgte die Analyse der Bimanderivate. Die Anteile für EC-Biman sind in (A) dargestellt, die entsprechenden Werte für GS-Biman sind in (C) und für C-Biman in (D) angegeben. (B) Zunahme des Anteils von EC-Biman an der Summe aller Biman-Derivate. Zum Vergleich wurden Prozentwerte aus Berechnungen mit zwei verschiedenen Bezugsgrößen einbezogen: nmol/g FG (helle Balken) und pmol/Keimling (dunkle Balken).

Der berechnete Anteil an C-Biman (in allen Linien etwa 5,7 bis 6,7%) blieb durch die Cd-Ionen unbeeinflusst (Abb. 3.15). Die Anteile für GS-Biman waren in den Ansätzen ohne Cd in allen Linien fast gleich (zwischen 91 und 93%), in Anwesenheit von Cd jedoch fehlten die zusätzlichen Anteile an EC-Biman im Wildtyp und in  $\Delta$ PCS2 an den Werten für GS-Biman (Wildtyp: 85% GS-Biman und 8,2% EC-Biman;  $\Delta$ PCS2: 85,6% GS-Biman und 7,4% EC-Biman;  $\Delta$ PCS1 und  $\Delta$ PCS: 92,5 bzw. 93,1% GS-Biman). Dies deutet auf einen durch die Anwesenheit der Schwermetallionen verstärkten Abbau von GS-Biman hin, gleichzeitig scheint das Zwischenprodukt EC-Biman zu akkumulieren.

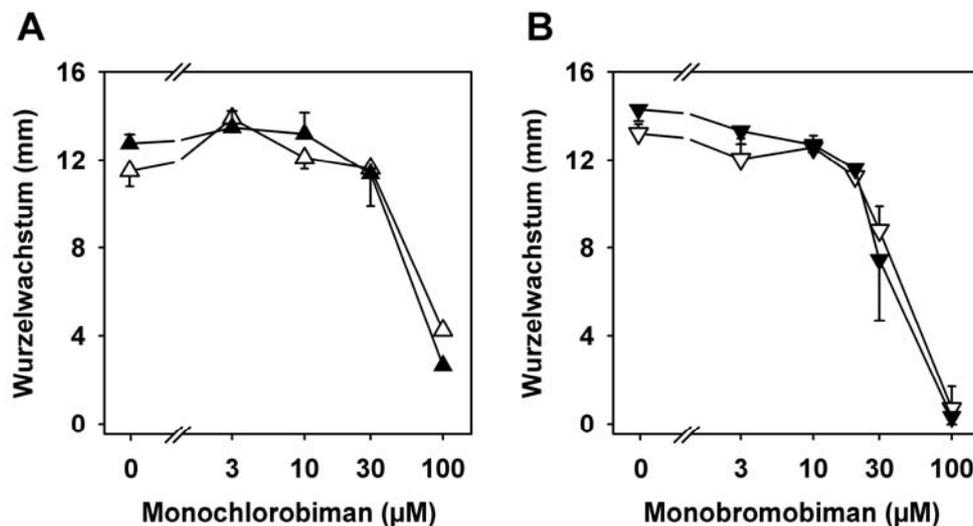
Die Summe aller Biman-Derivate betrug über alle Ansätze gemittelt 418,6 nmol/g FG  $\pm$  22% bzw. 13,7 nmol/Ansatz  $\pm$  15%, woraus wiederum eine sehr gute Vergleichbarkeit der Markierung der verschiedenen Ansätze abgeleitet werden kann.

### 3.1.4.4 Sensitivität gegenüber Xenobiotika

Wie die Ergebnisse des vorangegangenen Abschnitts gezeigt haben, bedingt eine fehlende Aktivität von AtPCS1 eine deutlich verminderte Glycinabspaltung von GS-Biman. Eine verminderte Bildung von C-Biman im weiteren Verlauf des Abbaus war in den Belastungsversuchen jedoch nicht zu beobachten. Folglich wird trotz inaktivierter *AtPCS1* der Abbau von GS-Biman zu C-Biman durch einen oder mehrere alternative Wege gewährleistet. Dennoch wurde in zusätzlichen Versuchen untersucht, ob die PCS-defizienten Linien sensitiver gegenüber Xenobiotika sind als der Wildtyp. Dazu wurden Arabidopsis-Keimlinge von Wildtyp und  $\Delta$ PCS auf Agarplatten MCB, MBB und dem Herbizid Atrazin exponiert und das Wurzelwachstum nach 72 Stunden dokumentiert.

#### Monochlorobiman (MCB) und Monobromobiman (MBB)

Zunächst wurde MCB, das bereits im Toxizitätstest mit Wildtyp-Keimlingen untersucht worden war, im Vergleich zu MBB getestet (Abb. 3.16).



**Abb. 3.16: Sensitivität von Wildtyp und  $\Delta$ PCS gegenüber Monochlorobiman (MCB) und Monobromobiman (MBB)**

Vier Tage alte Arabidopsis Keimlinge von Wildtyp (weiße Symbole) und  $\Delta$ PCS (schwarze Symbole) wurden von B5-Anzuchtplatten auf B5-Platten mit unterschiedlichen Biman-Konzentrationen umgesetzt. Der Wurzelzuwachs wurde 72h nach dem Umsetzen ausgewertet. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 12 Keimlingen mit SD.

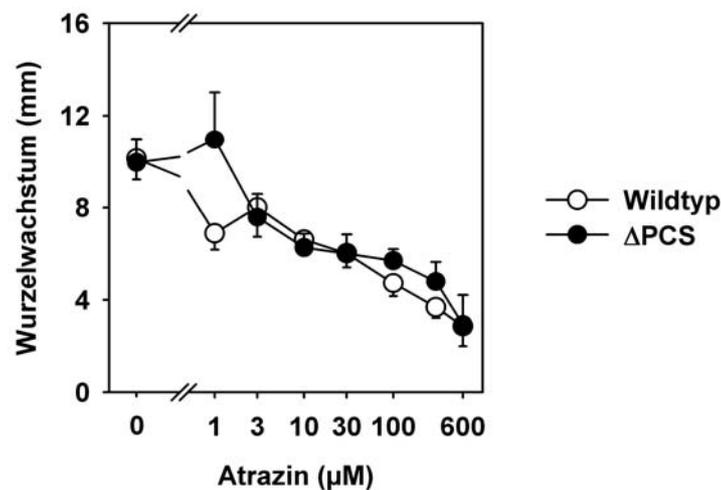
MBB ist wegen seines Brom-Atoms reaktiver und wegen seiner höheren Rate an unspezifischer Bindung an Thiolgruppen in Proteinen toxischer als MCB. Dieser Unterschied zwischen den beiden Bimanmolekülen konnte auch in den Wurzelwachstumstests beobachtet werden. Eine Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  Biman in den Agarplatten führte bei MBB zu einer Reduktion des Wurzelwachstums um rund 40% (beide Linien), während die Keimlinge auf MCB entweder unbeeinflusst blieben (Wildtyp,  $\pm 14,8\%$ ) oder ein um 10% reduziertes Wurzelwachstum aufwiesen ( $\Delta\text{PCS}$ ,  $\pm 1,9\%$ ). 100  $\mu\text{M}$  MBB bewirkte Nullwachstum, hingegen bedingte die gleiche Konzentration an MCB nur eine Reduzierung des Wurzelwachstums um 63% (Wildtyp,  $\pm 1,7\%$ ) bzw. 79% ( $\Delta\text{PCS}$ ,  $\pm 0,3\%$ ). Somit ließe sich eine 1,25fach höhere Empfindlichkeit von  $\Delta\text{PCS}$  ableiten, was aber angesichts der bereits toxischen MCB-Konzentration physiologisch gesehen wenig aussagekräftig ist.

### **Sensitivität gegenüber dem Herbizid Atrazin**

Atrazin (2-Chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazin) ist eines der meistverwendeten und besterforschten Herbizide (IARC, 1991), das zur Gruppe der Chlortriazine gehört und besonders im Maisanbau gegen dikotyle Unkräuter zur Anwendung kommt (Hock *et al.*, 1995). Seine toxische Wirkung auf Pflanzen beruht auf seiner Bindung in der Plastochinon  $\text{Q}_\text{B}$  Bindenische des D1 Proteins im Photosystem II, wodurch der Elektronentransport zum nächsten Glied der Elektronentransportkette, dem Cytochrom  $\text{b}_6/\text{f}$ -Komplex, gehemmt wird (Rutherford and Krieger-Liszkay, 2001) und durch die Übertragung der ankommenden Elektronen auf  $\text{O}_2$  Singulett-Sauerstoff entsteht. Über sein Chloratom als sog. *leaving group* wird Atrazin in der Pflanze an GSH konjugiert und in die Vakuole transportiert, wo es einem umfassenden Metabolismus unterliegt (Lamoureux *et al.*, 1970; Lamoureux *et al.*, 1973; Lamoureux *et al.*, 1998). Besonders für aquatische Organismen ist Atrazin toxisch. In Deutschland ist Atrazin zum Schutz des Trinkwassers seit 1991 verboten (in Österreich seit 1995), wird jedoch z.B. in Indien massiv eingesetzt.

Ebenfalls durch Wurzelwachstumsversuche auf mit Atrazin versetzten Agarplatten wurde der Effekt des Herbizids auf Keimlinge von WT und  $\Delta\text{PCS}$  untersucht. Atrazin wurde in Methanol gelöst. Vorversuche mit Keimlingen auf Methanol-Agarplatten ergaben, dass Konzentrationen bis 0,5% Methanol keine negativen Auswirkungen auf das Wurzelwachstum hatten. Die durch die Zusetzung von Atrazin zu den MS-Platten resultierenden Methanolanteile lagen zwischen 0,02 und 0,13% für 1 bis 100  $\mu\text{M}$  Atrazin. Bei 300  $\mu\text{M}$  Atrazin ergaben sich 0,4% und bei 600  $\mu\text{M}$  Atrazin 0,8% Methanol. Somit

sollten die beiden höchsten Atrazin-Konzentrationen mit Vorsicht betrachtet werden, zumal bei 600  $\mu\text{M}$  das Atrazin im flüssigen Agar bereits ausfiel und sich nicht mehr vollständig homogen im Agar verteilte. Abb. 3.17 lässt erkennen, dass die Keimlinge mit steigender Atrazinkonzentration im Agar zunehmend im Wachstum gehemmt wurden. Der Wildtyp zeigte eine Reduktion des Wurzelwachstums um 21% (3  $\mu\text{M}$ ), 40% (30  $\mu\text{M}$ ) bzw. 53% (100  $\mu\text{M}$ ). Für  $\Delta\text{PCS}$  ergab sich für die gleichen Atrazin-Konzentrationen eine Verminderung um 24%, ebenfalls 40% und schließlich 43%. Somit konnte auch hier kein Unterschied zwischen Wildtyp und  $\Delta\text{PCS}$  festgestellt werden. Das Ergebnis einer zusätzlichen Wiederholung des Toxizitätstests mit 30  $\mu\text{M}$  Atrazin und  $n = 60$  Keimlingen ist zusammen mit den Ergebnissen für die AtGGT4-defizienten Linien in Abb. 3.30 dargestellt.



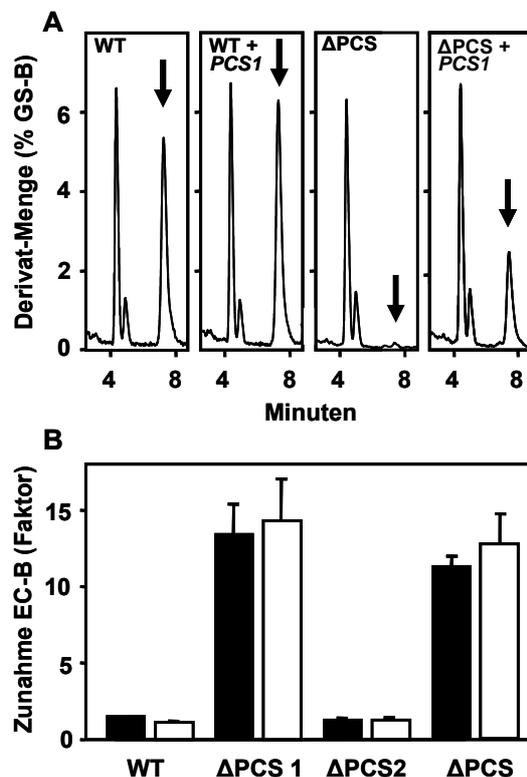
**Abb. 3.17: Empfindlichkeit von Wildtyp und  $\Delta\text{PCS}$  gegenüber Atrazin**

Vier Tage alte Arabidopsis Keimlinge wurden von MS-Platten auf MS/50% Sucrose-Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen von Atrazin umgesetzt. Der Wurzelzuwachs wurde nach dem Umsetzen während drei Tagen markiert und dann für 72h ausgewertet. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 14 Keimlingen mit SD.

### 3.1.5 Funktionale Komplementation von PCS1-defizienten Linien

In einem *reverse genetics* Ansatz wird die Folge der Ausschaltung eines bekannten Gens auf den Phänotyp untersucht. Im vorliegenden Fall konnte bei fehlender Funktion der AtPCS1 eine verminderte Glycinabspaltung von GS-Biman beobachtet werden (Abb. 3.12, Abb. 3.13 und Abb. 3.15). Zur Bestätigung einer solchen Beobachtung wird in die defizienten Linien das zerstörte Gen wieder eingebracht. Dies sollte den ursprünglichen Phänotyp des Wildtyps wieder herstellen, man spricht deshalb von funktionaler Komplementation. Zur Überbrückung der Zeit, bis stabil transformierte Arabidopsis-Linien zur Verfügung standen, wurde auf das transiente Protoplastensystem zurückgegriffen.

Protoplasten aus Rosettenblättern von Wildtyp und  $\Delta$ PCS wurden mit einem 35S::*AtPCS1* Konstrukt transformiert (Blum *et al.*, 2007). Die Ergebnisse sind in Abb. 3.18 dargestellt. Im Vergleich zu Protoplasten, die mit dem leeren Expressionsplasmid transformiert wurden, stieg in den mit 35S::*AtPCS1* transformierten Protoplasten von  $\Delta$ PCS1 und  $\Delta$ PCS die Menge an gebildetem EC-Biman um das bis zu 13fache an. In WT und  $\Delta$ PCS2, den Linien mit funktionaler *AtPCS1*, kam es durch die Überexpression von *AtPCS1* zu einer geringfügig stärkeren Bildung von EC-Biman um einen Faktor von 1,5 bzw. 1,3. Bei der Wahl der Bezugsgröße für die Berechnungen war es unerheblich, ob die Menge an gebildetem EC-Biman auf den Chlorophyllgehalt der Protoplasten im Ansatz (schwarze Balken) oder auf die Summe aller Bimanderivate (weiße Balken) bezogen wurde. Abb. 3.18 A zeigt die erhaltenen Chromatogramme aus den Protoplastenextrakten, die der Berechnung in B zugrunde liegen.

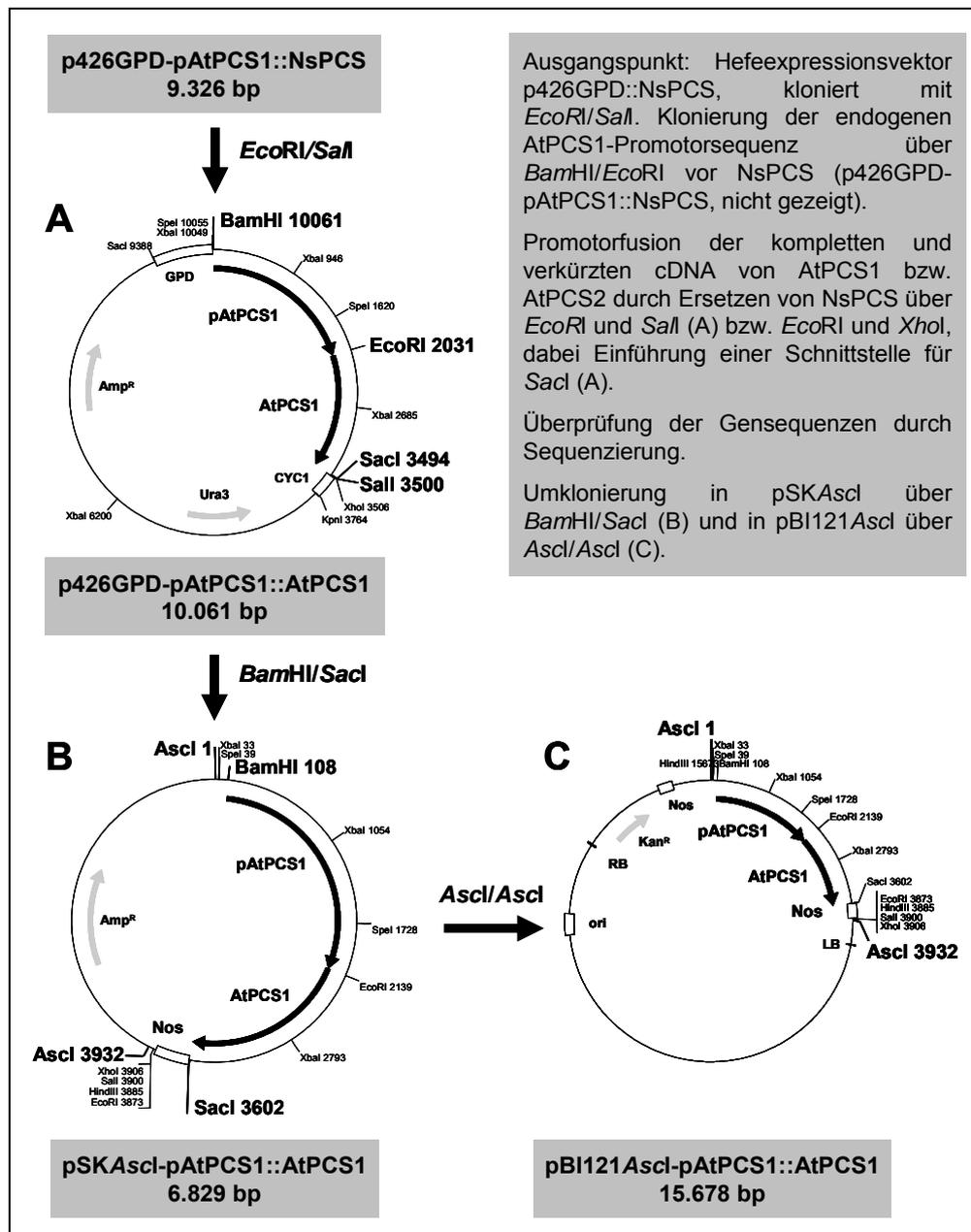


**Abb. 3.18: Funktionale Komplementation von Protoplasten aus PCS1-defizienten Linien**

(A) Detektion von EC-Biman in transient transformierten Protoplasten. Transformierte Protoplasten aus Wildtyp (WT) und  $\Delta$ PCS-Pflanzen exprimieren konstitutiv das eingebrachte *AtPCS1*-Gen. Nach 2h phänotypischer Expression und 2h Inkubation mit 5  $\mu$ M MCB wurden die Biman-Konjugate mittels HPLC analysiert. Die Peaks für EC-Biman sind durch Pfeile markiert.

(B) Zunahme der Menge an gebildetem EC-Biman in mit 35S::*AtPCS1* transformierten WT und Insertionslinien. Als Referenz dienten die Werte aus Protoplasten, die nur mit dem leeren Expressionsplasmid transformiert wurden. Die Werte wurden entweder auf Chlorophyll a (schwarze Balken) oder auf die Gesamtmenge an Biman-Derivaten (weiße Balken) bezogen. Mittelwerte und SD von drei unabhängigen Versuchen sind angegeben.

Für die stabile Transformation von PCS-defizienten Arabidopsis-Pflanzen wurde die cDNA von *AtPCS1* und *AtPCS2* unter der Kontrolle des endogenen Promotors von *AtPCS1* (bis 2.025 bp upstream des Startcodons) kloniert und über Agrobakterien vermittelte Transformation in Arabidopsis eingebracht.



**Abb. 3.19: Klonierungsschema für die pAtPCS1::cDNA Konstrukte**

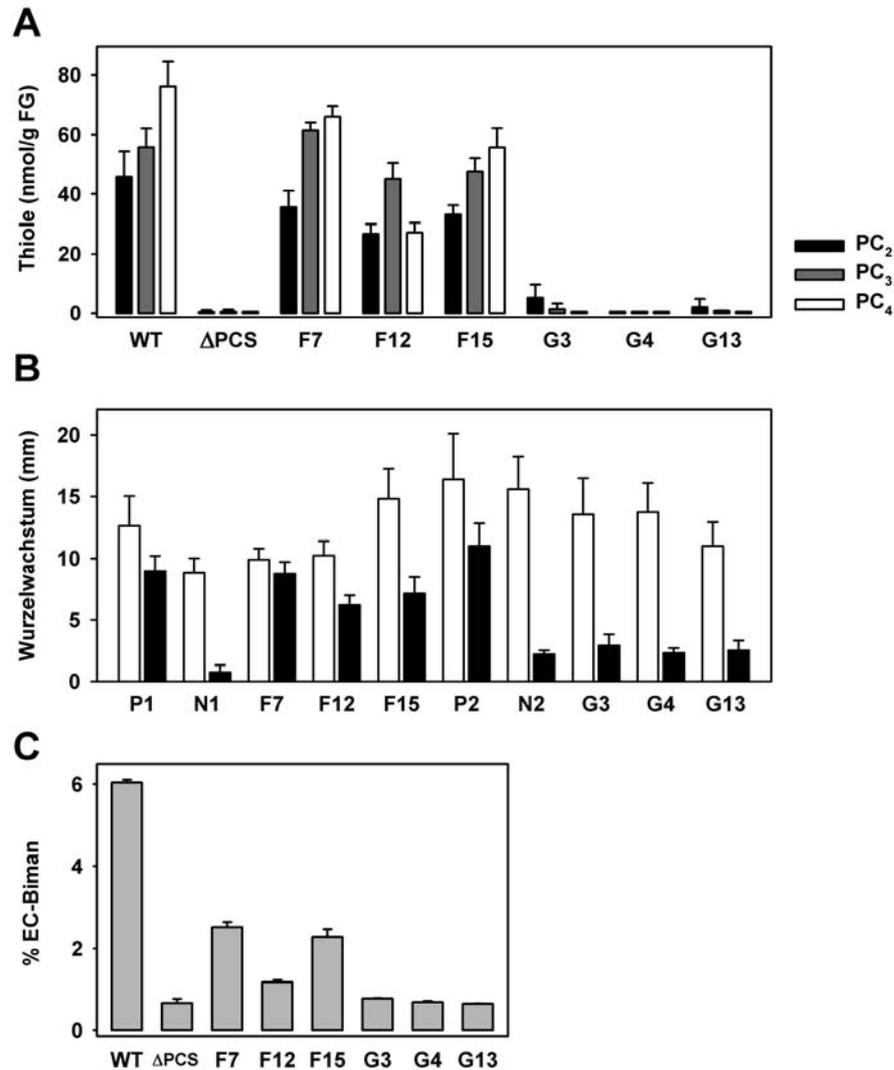
Ausgangspunkt aller cDNA-Konstrukte war p426GPD-NsPCS, der für die Expression von *NsPCS* in Hefe (J. Wünschmann) hergestellt wurde. Über die Schnittstellen für *BamHI* und *EcoRI* wurde eine 2.025 bp lange endogene Promotorsequenz von *AtPCS1* vor *NsPCS* eingefügt (A). Vektor A diente zur Promotorfusion aller klonierten cDNAs, dafür wurde die *NsPCS*-Sequenz unter Verwendung der Schnittstellen für *EcoRI* und *SalI* ersetzt. Umklonierung mit *BamHI* und *SacI* in pSKAscl ergab Vektor B, aus dem mit *Ascl* die Expressionskassetten ausgeschnitten wurden und in pBI121Ascl ligiert wurden (C). Mit dem Plasmid C wurden elektrokompetente Agrobakterien transformiert, die für die stabile Transformation von Arabidopsis ( $\Delta$ PCS) verwendet wurden.

Wegen der Sequenzhomologien zwischen *AtPCS1* und *AtPCS2* wurde die jeweilige cDNA aus RNA-Proben der Einfachmutanten amplifiziert (*AtPCS1* aus  $\Delta$ PCS2 und umgekehrt). In dem Vektor p426GPD-pAtPCS1::NsPCS wurde das Gen für *NsPCS* (*alr0975*) mit *EcoRI* und *Sall* ausgeschnitten und durch die kodierende Sequenz von *AtPCS1* unter Verwendung der Primer *AtPCS1\_EcoRI\_for* (29) und *AtPCS1\_Sall/SacI\_rev* (33) bzw. von *AtPCS2* unter Verwendung von *AtPCS2\_MunI\_for* (39) und *AtPCS2\_XhoI/SacI\_rev* (40) ersetzt. Dabei wurden durch die Antisense-Primer *SacI*-Schnittstellen eingefügt (Abb. 3.19). Die resultierenden Plasmide p426GPD-pAtPCS1::AtPCS1 und p426GPD-pAtPCS1::AtPCS2 wurden nach Überprüfung der Inserts durch Sequenzierung mit *BamHI* und *SacI* geschnitten und die Expressionskassetten in den entsprechend vorbereiteten pSK-*Ascl* umkloniert. Mit Hilfe der *Ascl*-Schnittstellen erfolgte schließlich der Transfer der Expressionskassetten in den binären Vektor pBI121-*Ascl*. Es wurden *E. coli* Klone ausgewählt, die pBI121-pAtPCS1::AtPCS1/2 Plasmide trugen, in denen die codierenden Gensequenzen nicht gegenläufig zum Kanamycin-Resistenzgen auf dem Vektor inseriert waren, um die Möglichkeit eines *gene silencing* bei der Expression *in planta* zu reduzieren. Mit diesen Plasmiden wurden elektrokompetente Agrobakterien transformiert, die dann für die Pflanzentransformation zum Einsatz kamen.

Beim Screening von T1-Samen auf MS-Platten mit 30 mg/L Kanamycin wurden 14 bzw. 10 putative Transformanten isoliert. Von jeweils 4 putativ positiven Linien wurde genomische DNA extrahiert, die in der PCR mit einem cDNA spezifischen (jeweils der Klonierungsprimer ab ATG forward) und einem vektorsequenzspezifischen (*pBI121\_check\_rev*, 59) Primer analysiert wurde. Von jeweils 3 positiv getesteten, unabhängigen Transformationslinien wurden für nachfolgende Versuche Samen (= T2) verwendet. Die Bezeichnungen lauten F7, F12, F15 für die Linien mit dem pAtPCS1::AtPCS1 Konstrukt und G3, G4, G13 für die Linien mit dem pAtPCS1::AtPCS2 Konstrukt.

In den drei F-Linien konnten annähernd dem Wildtyp entsprechende Mengen von PCs nachgewiesen werden (eine Ausnahme bildet die Linie F12, die auffallend weniger PC<sub>4</sub> synthetisierte), während keine der drei G-Linien gegenüber der  $\Delta$ PCS-Kontrolle deutlich erhöhte PC-Mengen bildete (Abb. 3.20 A). Folglich konnte nur durch das eingebrachte pAtPCS1::AtPCS1 Konstrukt eine funktionale Komplementation von  $\Delta$ PCS erreicht werden. Die Werte des Wildtyps (Positivkontrolle) waren in nmol/g FG 45,9 (PC<sub>2</sub>), 55,8 (PC<sub>3</sub>) und 76,1 (PC<sub>4</sub>), jeweils mit SD im Rahmen von 12 bis 19%. Bezüglich PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub> bzw. PC<sub>4</sub> erreichten die Linien mit pAtPCS1::AtPCS1 folgende Anteile der Wildtypwerte: 77,4 bzw. 110,2 bzw. 87% (F7); 58,2 bzw. 81,1 bzw. 35,7% (F12); 72,1 bzw. 85,5 bzw. 73,1% (F15).

Erwartungsgemäß bestätigte sich dieser Befund in Wurzelwachstumstests auf MS-Platten mit 100  $\mu\text{M}$  Cadmium (Abb. 3.20 B). Die mit *AtPCS1* komplementierten Linien wiesen ein deutliches Wurzelwachstum auf den Cd-Platten auf (Wildtyp 70% der Nullkontrolle; F7 87,5%, F12 61%, F15 48% der jeweiligen Nullkontrolle), während die mit *AtPCS2* komplementierten Linien das gleiche Ergebnis wie die Negativkontrolle (Transformationshintergrund  $\Delta\text{PCS}$ ) lieferten.

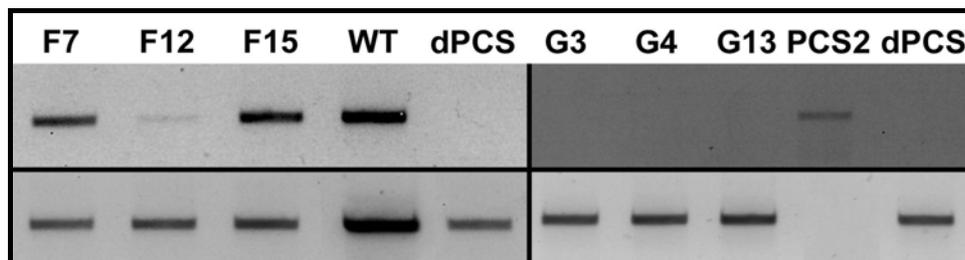


**Abb. 3.20: Funktionale Komplementation von  $\Delta\text{PCS}$  in planta mit *AtPCS1* (F) und *AtPCS2* (G)**  
 (A) Synthese von Phytochelatinen: Samen (T2) von jeweils drei unabhängigen Transformationslinien wurden auf B5-Agarplatten ausgebracht. Fünf Tage alte Keimlinge wurden in B5-Medium für 48h mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  belastet.  
 (B) Cd-Toleranz: Wurzelwachstum der transformierten Linien über 72h auf MS/50% Sucrose-Platten ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ . P, Positivkontrolle Col-0; N, Negativkontrolle  $\Delta\text{PCS}$ .  
 (C) Glycinabspaltung von GS-Biman: Fünf Tage alte Keimlinge (jeweils 30) wurden in kleinen Erlenmeyerkolben, die 5 ml B5-Medium enthielten, mit 5  $\mu\text{M}$  MCB infiltriert und 4h inkubiert, bevor die Extraktion der Biman-Konjugate für die HPLC-Analyse erfolgte.  
 Die Daten zeigen Mittelwerte mit SD von Doppelbestimmungen (A und C) bzw. von jeweils 13 Keimlingen (B).

Entsprechend verhielten sich die sechs Linien bei der Analyse des GS-Biman Abbaus (Abb. 3.20 C). Der Wildtyp hatte einen EC-Biman Anteil von  $6,0 \pm 0,1$  nmol/g FG,  $\Delta$ PCS hingegen nur  $0,6 \pm 0,1$  nmol/g FG. In den F-Linien waren die Mengen an EC-Biman im Vergleich zur Negativkontrolle deutlich erhöht (Faktor 3,8 bzw. 3,4), wenn auch nur maximal 42% des Wildtyp-Niveaus erreicht wurden ( $\Delta$ PCS erreicht 11% des WT-Wertes). Die Linie F12 zeigte beim GS-Biman Abbau wie schon bei der PC-Synthese eine gegenüber den anderen beiden F-Linien reduzierte Komplementation (Faktor 1,8 im Vergleich zur Nullkontrolle). In den G-Linien hingegen konnten nur EC-Biman Mengen detektiert werden, die denen der Negativkontrolle  $\Delta$ PCS entsprachen. Die Summe aller mit Biman markierten Moleküle betrug in diesem Experiment  $67$  nmol/g FG  $\pm 20,7\%$ . Im Mittel wurden in jeder Probe mit 30 Keimlingen  $1,9$  nmol  $\pm 17,5\%$  Bimanderivate detektiert.

Bei der Betrachtung der Werte ist zu beachten, dass Samen der segregierenden T2-Generation verwendet wurden. Jeweils 25% der getesteten Individuen in jedem Ansatz waren reine  $\Delta$ PCS ohne das jeweilige Insert. Bei den Wurzelwachstumstests waren nicht komplementierte  $\Delta$ PCS Keimlinge auf den Platten mit  $100 \mu\text{M Cd}(\text{NO}_3)_2$  eindeutig zu erkennen, hatten aber wegen  $n = 13$  (geringe Stichprobenzahl) nicht immer genau einen Anteil von 25%. Um eine korrekte Auswertung zu gewährleisten, wurden von allen Platten (inklusive Kontrollen) 25% der kleinsten Werte nicht in die Berechnung mit einbezogen. Bei den Analysen von PC-Synthese bzw. GS-Biman Abbau ließen sich die untransformierten Individuen in der Auswertung nicht ausschließen. Man müsste hier für eine ungefähre Korrektur die erhaltenen Werte um 25% nach oben korrigieren.

Die fehlende Komplementation in den mit  $\text{pAtPCS1}::\text{AtPCS2}$  transformierten Linien war Anlass für die Analyse der Transkription der eingebrachten Gene mittels RT-PCR. Aufgrund der Komplementation durch das  $\text{pAtPCS1}::\text{AtPCS1}$  Konstrukt musste das entsprechende Transkript in den Linien F7, F12 und F15 zu amplifizieren sein, was auch der Fall war (Abb. 3.21, linker Teil). In den mit  $\text{AtPCS2}$  transformierten Linien G3, G4 und G13 hingegen konnten mit genspezifischen Primern keine PCR-Produkte amplifiziert werden. Der Kontrollansatz mit dem Ausgangsvektor der Klonierung, pSK mit cDNA von  $\text{AtPCS2}$ , als *template* bestätigt den korrekten Verlauf der PCR (Abb. 3.21, rechter Teil). Dies schließt einen systemischen Fehler in den PCR-Ansätzen als Ursache für die fehlenden  $\text{AtPCS2}$ -spezifischen Amplifikate aus.



**Abb. 3.21: RT-PCR Analyse der mit *AtPCS1* (F) bzw. *AtPCS2* (G) transformierten Linien**

Aus Keimlingen (100 mg FG) der beiden mit *AtPCS1*- und *AtPCS2*-cDNA (kompletter ORF) transformierten Linien wurde Gesamt-RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Mit genspezifischen Primern wurden Bereiche der jeweiligen Transkripte amplifiziert (obere Banden), als Referenz dienten Primer für Aktin (untere Banden).  $\Delta$ PCS (dPCS) stellt die Negativkontrolle dar (Transformationshintergrund). Positivkontrolle war für F (*AtPCS1*) cDNA aus dem Wildtyp (WT) und für G (*AtPCS2*) der Klonierungsvektor pSK mit der cDNA von *AtPCS2* (PCS2).

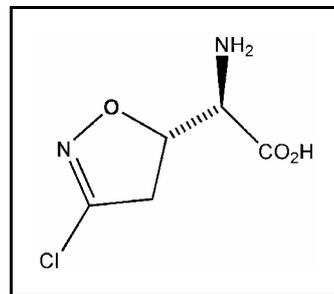
### 3.2 Die $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase im GS-Konjugat Stoffwechsel

Im Metabolismus von GS-Konjugaten spielt die  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase 4 (AtGGT4) eine entscheidende Rolle, da sie in der Vakuole lokalisiert ist und dorthin transportierte GS-Konjugate effizient in die entsprechenden Cys-Gly-Konjugate (CG-Konjugate) umsetzt (Grzam *et al.*, 2007; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b). Im Gegensatz dazu sind die  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen AtGGT1 und AtGGT2 in der Plasmamembran lokalisiert und zeigen extrazelluläre Aktivität (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007a). GS-Konjugate werden jedoch überwiegend in die Vakuole und nur zu einem geringen Teil in den apoplastischen Raum transportiert (Kreuz *et al.*, 1996). Deshalb war es von besonderem Interesse, die Rolle von AtGGT4 im GS-Biman Metabolismus im Vergleich zu AtPCS1 zu charakterisieren. Zunächst kam der GGT-Inhibitor Acivicin bei Protoplasten aus Wildtyp- und  $\Delta$ PCS-Pflanzen zum Einsatz. In der Folge wurde eine AtGGT4-Insertionslinie (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b) in die bereits vorhandene Doppelmutante  $\Delta$ PCS eingekreuzt und die resultierende Dreifachmutante zusammen mit der  $\Delta$ GGT4-Linie im Vergleich zu  $\Delta$ PCS und zum Wildtyp analysiert.

#### 3.2.1 Inhibition der $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen durch Acivicin

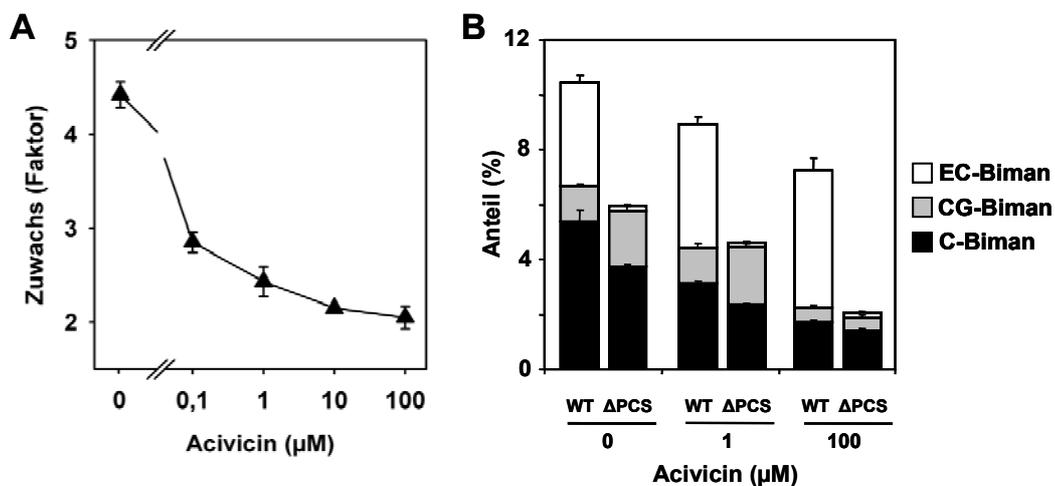
Acivicin ist ein Glutamin-Analogon und hemmt irreversibel die Aktivität von  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen (Griffith and Meister, 1980; Smith *et al.*, 1995; Benlloch *et al.*, 2005; Nakano *et al.*, 2006). Durch Verwendung dieses spezifischen Inhibitors sollte der

GGT-abhängige Pfad des GS-Konjugat Abbauwegs über CG-Biman blockiert werden, um den Beitrag des von der AtPCS1 katalysierten Wegs besser abschätzen zu können.



**Abb. 3.22: Strukturformel von Acivicin**

Beim Einsatz von Inhibitoren sind toxische Nebeneffekte bzw. generelle Toxizität durch unspezifische Wirkungen immer ein Problem. Deshalb wurde zunächst die Toxizität von Acivicin abgeschätzt. Dazu wurden Arabidopsis Zellkulturen für zwei Tage ohne und mit verschiedenen Acivicin-Konzentrationen kultiviert und der Zuwachs an Biomasse in den Ansätzen verglichen (Abb. 3.23 A).



**Abb. 3.23: GS-Biman Metabolismus unter dem Einfluss des GGT-Inhibitors Acivicin**

(A) Wachstumshemmung einer Arabidopsis-Zellkultur durch Acivicin. Nach zwei Tagen Acivicin-Exposition wurde die Zunahme an Biomasse (Frischgewicht) bestimmt.

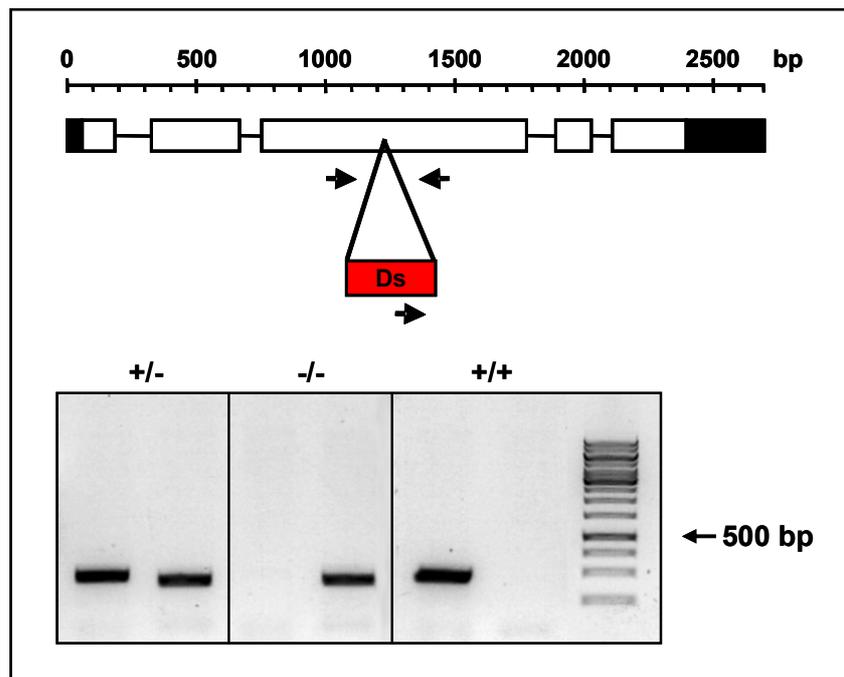
(B) Die Werte von EC-, CG- und C-Biman als Anteile an der Summe aller Biman-Konjugate. Protoplasten von Wildtyp- (WT) und ΔPCS-Pflanzen wurden 30 min mit oder ohne Acivicin inkubiert, bevor sie während 4h mit 5 µM MCB belastet wurden. Die Summen der Biman-Derivate war in allen Ansätzen vergleichbar und betrug 0,15 nmol/µg Chlorophyll a ± 20%. Alle Daten zeigen Mittelwerte und SD von Dreifachbestimmungen.

Es zeigte sich, dass bereits eine Konzentration von 0,1 µM Acivicin zu einer Hemmung des Wachstums von 35% führte. Bei 100 µM Acivicin wurden nur noch etwa 50% des Kontrollwertes ohne Inhibitor erreicht.

In den Versuchen mit Acivicin (Abb. 3.23 B) wies die Doppelmutante  $\Delta$ PCS (ohne Inhibitor) gegenüber dem Wildtyp nicht nur eine stark verminderte (Faktor 18,5) Bildung von EC-Biman auf, sondern auch eine um 30% reduzierte Bildung von C-Biman, wohingegen der CG-Biman Level gegenüber dem Wildtyp um 52% erhöht war. In einer Acivicin-Konzentrationsreihe wurde beobachtet, ob die Generierung von CG-Biman durch den Inhibitor gehemmt werden kann. In den Protoplasten zeigte sich, dass fehlende PCS-Aktivität zu vermindertem Abbau von GS-Biman führt und gleichzeitig das Zwischenprodukt CG-Biman akkumuliert. Bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M Acivicin wurde in beiden untersuchten Linien weniger GS-Biman metabolisiert, während die CG-Biman Mengen unverändert blieben und im Wildtyp der EC-Anteil leicht anstieg (Faktor 1,2). Erst bei Konzentrationen über 10  $\mu$ M konnte eine deutliche Reduktion von CG-Biman beobachtet werden, die von einer starken Verminderung des GS-Biman Umsatzes zu C-Biman begleitet war. Da für 100  $\mu$ M Acivicin zuvor eine 50%ige Wachstumsinhibition in Arabidopsis Zellkulturen ermittelt worden war, konnte aus diesen Experimenten kein sicheres Bild bezüglich des Beitrags der beiden Abbauwege zum Abbau von GS-Biman abgeleitet werden. Es ließe sich jedoch auch argumentieren, dass der inhibitorische den toxischen Effekt überwog, da die Protoplasten Acivicin nur kurzzeitig (maximal 4,5h) ausgesetzt waren. In diesem Fall wäre die Reduktion des Umsatzes von GS-Biman zu C-Biman durch die Hemmung des Abbauwegs über GGTs verursacht. Der auch unter diesen Bedingungen funktionierende Umsatz von GS-Biman zu EC-Biman im Wildtyp setzt ebenfalls vitale Zellen voraus. Die Ergebnisse aus den nachfolgenden Versuchen mit AtGGT4-defizienten Linien (Abb. 3.26) unterstützen diese letztgenannte Sichtweise.

### 3.2.2 Genetische Charakterisierung der AtGGT4-defizienten Linien

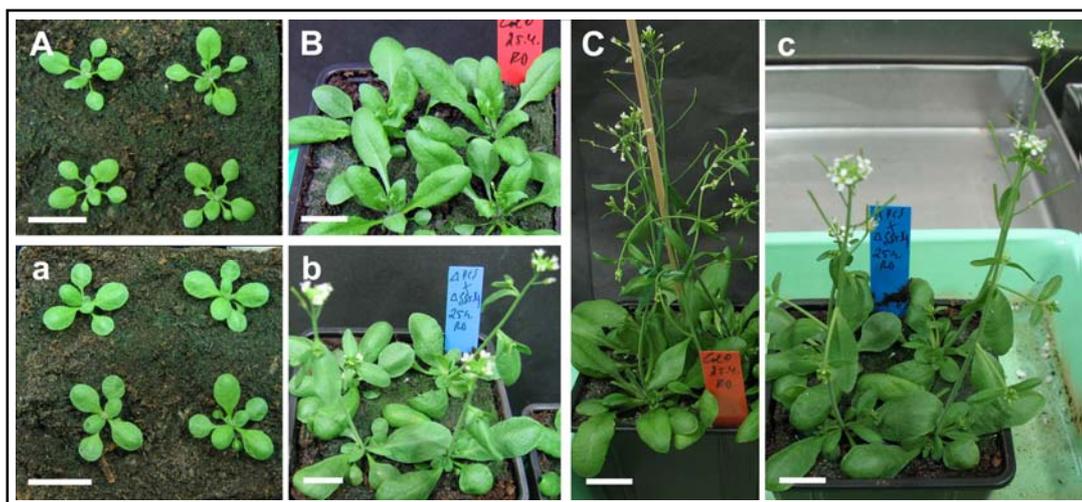
Nachdem die Versuche mit Acivicin aufgrund der hohen Toxizität des Inhibitors keine sichere Interpretation der Ergebnisse zuließen, wurde eine Insertionslinie mit inaktiviertem Gen für die vakuoläre AtGGT4 (At4g29210) aus dem European Arabidopsis Stock Centre, Nottingham UK, bezogen (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b). Zur Erzeugung von Dreifachmutanten wurde die AtGGT4-Insertionslinie (Ökotyp *Landsberg erecta*) mit der oben beschriebenen Doppelmutante  $\Delta$ PCS gekreuzt. Durch Screenen der F2-Generation mittels PCR-Analyse wurden Dreifachmutanten isoliert, die homozygot für Insertionen in *AtPCS1*, *AtPCS2* und *AtGGT4* waren (Abb. 3.24).



**Abb. 3.24: Beschreibung der Insertionslinie  $\Delta$ GGT4**

Das Schema (oben) veranschaulicht die Lage der Transposon-Insertion (Ds) im Gen für *AtGGT4*. Die Skala gibt die Länge in Basenpaaren an. Schwarze Balken repräsentieren untranslatierte Regionen (UTR), weiße Balken Exons und einfache Linien Introns. Als schwarze Pfeile sind die Positionen der Primer eingezeichnet, die für die PCR Analyse verwendet wurden.

Das Gelbild (unten) zeigt das Ergebnis der PCR-Analysen des Insertionslocus in *AtGGT4*. Die beiden Primerpaare wurden in getrennten Ansätzen verwendet, das Genprimerpaar (jeweils linke Spur) amplifizierte etwa 200 bp, die Insertions- und Genprimer-Kombination (jeweils rechte Spur) ergab ein PCR-Produkt von etwa 180 bp. Mit (+) ist das Wildtypallel bezeichnet und mit (-) das Allel mit der Insertion.



**Abb. 3.25: Habitus der Dreifach-knockout-Linie  $\Delta$ PCSx $\Delta$ GGT4**

Die Abbildung zeigt Pflanzen vom Wildtyp (Col-0, A-C) im Vergleich zur Dreifachmutante  $\Delta$ PCSx $\Delta$ GGT4 (Col-0xLaer, a-c) 10 Tage (A, a), 18 Tage (B, b) und 24 Tage (C, c) nach dem Ausbringen der Samen in Erde. Die Kreuzung zeigte hauptsächlich den Phänotyp des Ökotyps *Landsberg erecta*, z.B. rundere Blattform, kräftigerer Wuchs und früheres Ansetzen von Blüten. Die Balken markieren jeweils eine Länge von 2 cm.

Wie schon bei den Pflanzen der PCS-defizienten Linien war auch bei  $\Delta$ GGT4 und der Kreuzung  $\Delta$ PCSx $\Delta$ GGT4 kein äußerlich erkennbarer Phänotyp vorhanden. Der Ökotyp von  $\Delta$ GGT4 ist *Landsberg erecta*. Auch die Kreuzung zeigte deutliche Merkmale dieses Phänotyps (rundere Blattform, kürzere und dickere Schoten, kräftigerer Wuchs und einige Tage früheres Ansetzen der Blüten), ansonsten jedoch keine Auffälligkeiten (Abb. 3.25).

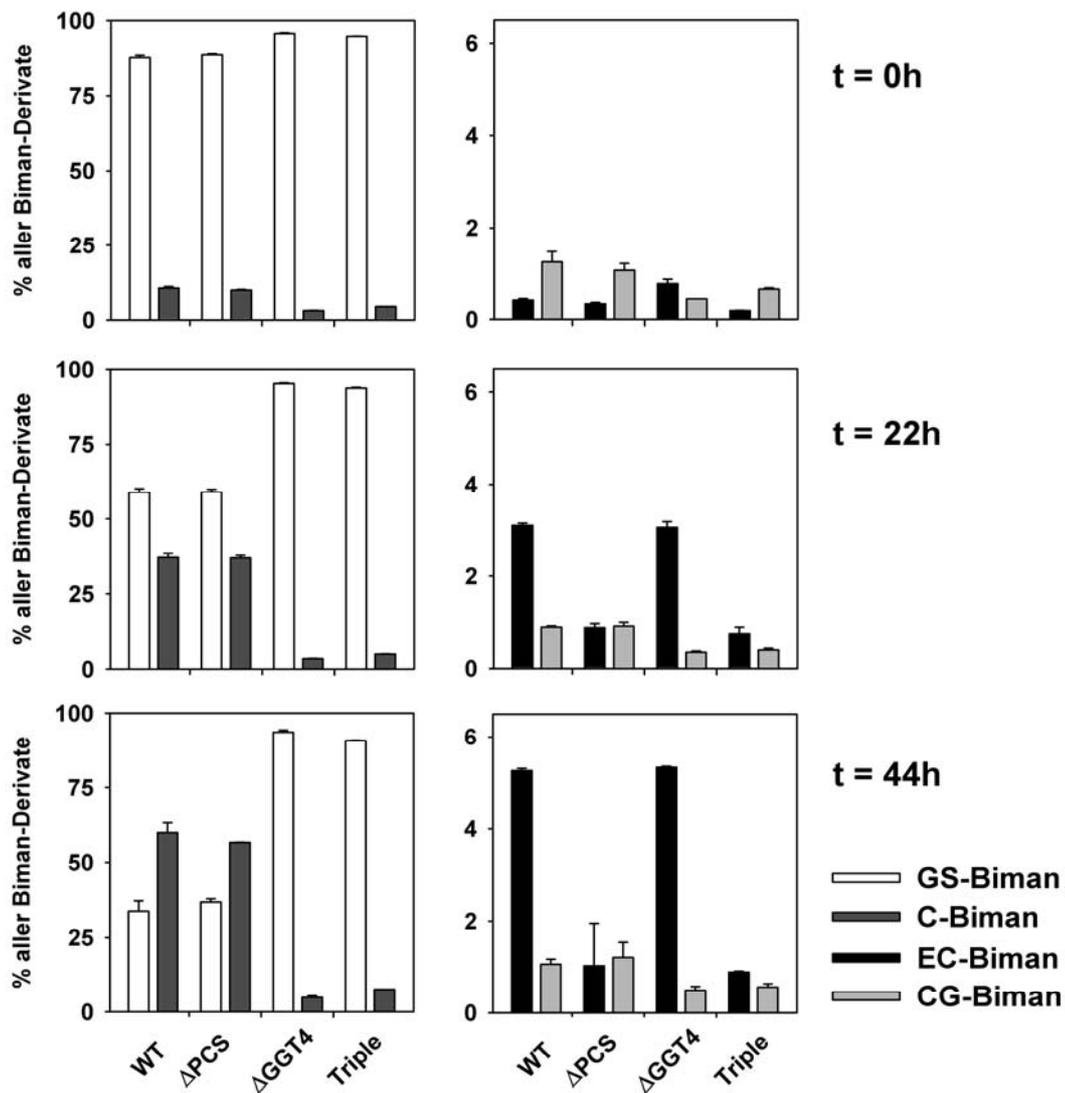
### 3.2.3 Metabolismus von GS-Biman in AtGGT4-defizienten Linien

Zur Charakterisierung des GS-Biman Metabolismus in  $\Delta$ GGT4 und der Dreifachmutante  $\Delta$ PCSx $\Delta$ GGT4 im Vergleich zu Wildtyp und  $\Delta$ PCS wurden entsprechend der zuvor durchgeführten Versuche mit den PCS-defizienten Linien Keimlinge und Protoplasten in Versuchen mit MCB analysiert.

#### Umsatz von GS-Biman in AtGGT4-defizienten Keimlingen

Vier Tage alte Keimlinge der oben bezeichneten vier Linien wurden mit 5  $\mu$ M MCB infiltriert und nach 4h ( $t = 0$ ) die ersten Proben genommen. Die Keimlinge in den Ansätzen für  $t = 22$ h und  $t = 44$ h wurden gewaschen und bis zur Ernte in MCB-freiem Medium weiter inkubiert (Abb. 3.26).

Bereits beim ersten Zeitpunkt zeigte sich ein Unterschied zwischen den Linienpaaren WT und  $\Delta$ PCS zum einen und  $\Delta$ GGT4 und  $\Delta$ PCSx $\Delta$ GGT4 zum anderen. Der Anteil von GS-Biman an der Summe aller Biman-Derivate betrug bei WT und  $\Delta$ PCS 88%, bei den beiden AtGGT4-defizienten Linien waren es 95%. Die Abweichungen innerhalb der Zweiergruppen lagen unter 1%. Bei allen vier Linien waren auch die absoluten Werte vergleichbar: Die Summen aller Biman-Derivate betrugen beim ersten Zeitpunkt der Reihe 89 nmol/g FG  $\pm$  13% und blieben über die Zeit des Versuchs weitgehend konstant. Die Keimlinge zeigten bei 22h einen Zuwachs des FG um den Faktor 1,6 und bei 44h um den Faktor 2,4. Der Bezug auf das FG führt somit zu einem Verdünnungseffekt nach langen Zeitspannen. Bezieht man die Menge an Biman-Derivaten jedoch auf die in jeder Probe gleiche Menge an extrahierten Keimlingen, ergeben sich für Wildtyp,  $\Delta$ PCS,  $\Delta$ GGT4 bzw. die Dreifachmutante: 2,0 nmol/Ansatz  $\pm$  21%; 1,4 nmol/Ansatz  $\pm$  20%; 2,9 nmol/Ansatz  $\pm$  16%; 2,6 nmol/Ansatz  $\pm$  21%. Damit bleiben die Schwankungen in den Derivatsummen im Rahmen der bei Doppel- oder Dreifachbestimmungen in Versuchen mit Keimlingen beobachteten Abweichungen. Die geringere Menge an Biman-Derivaten in  $\Delta$ PCS in diesem Versuch ist auf ein geringeres FG pro 30 Keimlinge zurückzuführen.



**Abb. 3.26: GS-Biman Metabolismus in AtGGT4-defizienten Linien (Keimlinge)**

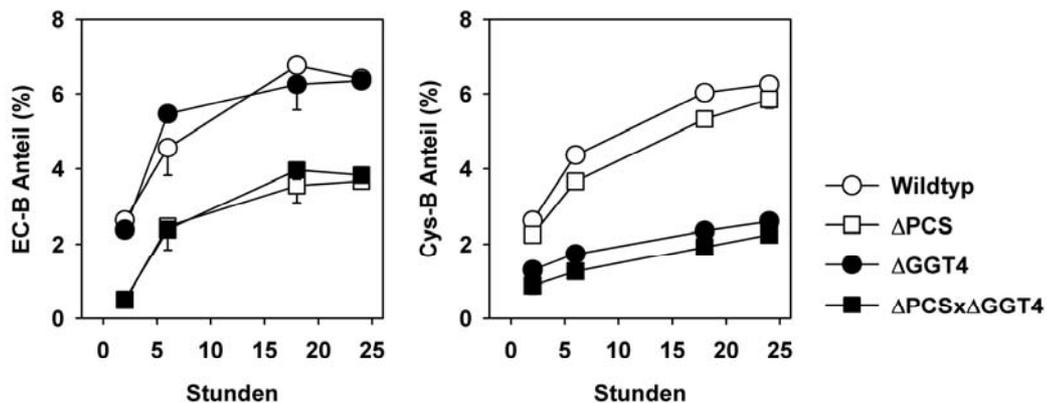
Jeweils 30 auf B5-Agarplatten angezogene, 5 Tage alte Keimlinge von Wildtyp (Col-0),  $\Delta$ PCS,  $\Delta$ GGT4 und Dreifachmutante  $\Delta$ PCSx $\Delta$ GGT4 (Triple) wurden in kleinen Erlenmeyerkolben in 5 ml B5-Medium mit 5  $\mu$ M MCB im Vakuum infiltriert. Nach 4h erfolgte die erste Ernte (t=0), die Langzeitproben wurden gewaschen und in MCB-freiem Medium auf einem Rotationsschüttler weiter inkubiert. Die Werte repräsentieren Dreifachbestimmungen mit SD.

Vier Stunden nach Infiltration waren im Wildtyp und in  $\Delta$ PCS rund 88% GS-Biman und 10% C-Biman zu detektieren, in  $\Delta$ GGT4 und der Dreifachmutante rund 95% GS-Biman und 3% bzw. 4% C-Biman. Dieser Unterschied zwischen den Linien mit bzw. ohne AtGGT4-Aktivität vergrößerte sich über die Zeit, so dass nach 44h im Wildtyp 34% und in  $\Delta$ PCS 37% GS-Biman detektiert wurden, gleichzeitig waren es 60% bzw. 57% C-Biman in diesen Linien. In  $\Delta$ GGT4 bzw. der Dreifachmutante waren die entsprechenden Werte 94% bzw. 91% für GS-Biman und 5% bzw. 8% für C-Biman. Somit war innerhalb von 44h praktisch kein Umsatz von GS-Biman in den AtGGT4-defizienten Linien zu beobachten.

Vergleicht man die Ergebnisse für die Zwischenprodukte mit denen in Abb. 3.13, stellt man fest, dass EC-Biman verzögert gebildet wird, jedoch nach 44h in Wildtyp und  $\Delta$ GGT4 entsprechende Werte erreicht (rund 5%). In den PCS-defizienten Linien bleibt der Anteil mit rund 1% geringer als im genannten Vergleichsversuch. Das Zwischenprodukt des GGT-abhängigen Wegs (CG-Biman) lässt zu allen Zeitpunkten einen leichten Unterschied zwischen Linien mit (etwa 1%) und ohne (etwa 0,5%) AtGGT4-Aktivität erkennen.

### GS-Biman Metabolismus in AtGGT4-defizienten Protoplasten

Da für die beiden Linien  $\Delta$ GGT4 und  $\Delta$ PCS $\Delta$ GGT4 Zellsuspensionskulturen erst in Vorbereitung sind, kamen als zusätzliches Testsystem nur Protoplasten aus Pflanzen dieser Linien in Frage. Analog zu den Versuchen, die Abb. 3.12 zugrunde liegen, wurden Protoplasten der beiden AtGGT4-defizienten Linien zusammen mit Protoplasten aus Wildtyp und  $\Delta$ PCS mit MCB belastet und anschließend die Anteile der Biman-Derivate durch HPLC-Analyse ermittelt. Abb. 3.27 zeigt den Verlauf der Anteile für EC-Biman und C-Biman, die beiden Metabolite, bei denen die auffälligsten Unterschiede festgestellt wurden.



**Abb. 3.27: Metabolisierung von GS-Biman in AtGGT4-defizienten Protoplasten**

Protoplasten aus Rosettenblättern von drei Wochen alten Pflanzen der AtGGT4-defizienten Linien  $\Delta$ GGT4 und  $\Delta$ PCS $\Delta$ GGT4 wurden zum Vergleich mit Protoplasten des Wildtyps (Col-0) und  $\Delta$ PCS mit MCB belastet. Die Protoplasten ( $1 \times 10^5$ /ml) wurden in 500  $\mu$ l Aliquots in 2ml Reaktionsgefäßen mit 5  $\mu$ M MCB über 24h inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse der Biman-Konjugate mittels HPLC-Analyse. Gezeigt sind Doppelbestimmungen mit SD.

GS-Biman war zu Beginn der Zeitreihe in allen Linien mit Anteilen von 95% bis 98% zu detektieren, nach 24h waren es noch 88% bis 93%. Dabei war der Unterschied zwischen den beiden Liniengruppen mit und ohne funktionaler AtGGT4 marginal (1,3%). Ebenso verhielt es sich bei CG-Biman, wo zwar ein minimaler Unterschied zwischen den Mittelwerten beider Gruppen festzustellen war, jedoch große Standardabweichungen

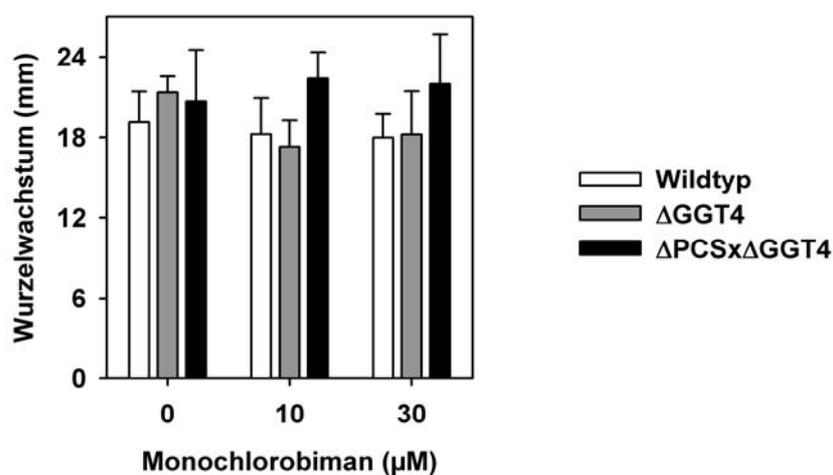
keine Aussage möglich machen. Hierfür wären sicherlich Parallelansätze mit  $n > 3$  erforderlich.

Bei den Anteilen für C-Biman lässt sich jedoch auch in diesem Versuch ein Unterschied feststellen. Bei den beiden Linien mit funktionaler AtGGT4 kommt C-Biman nach 24h auf einen Anteil von rund  $6,1\% \pm 0,3$ . In den anderen zwei Linien mit zerstörtem AtGGT4-Gen ließen sich lediglich  $2,4\% \pm 0,2$  C-Biman detektieren, also weniger als die Hälfte (40%) von Wildtyp und  $\Delta$ PCS.

Wie zu erwarten, lassen sich die vier untersuchten Linien bezüglich der Verteilung der Anteile für EC-Biman folgendermaßen gruppieren: In den Linien mit funktionaler AtPCS1 (Wildtyp und  $\Delta$ GGT4) wurden nach 24h EC-Biman Anteile von  $6,4\% \pm 0,04$  gebildet. Die Linien mit fehlender AtPCS1-Funktion ( $\Delta$ PCS und  $\Delta$ PCSx $\Delta$ GGT4) hatten reduzierte EC-Biman Anteile von  $3,8\% \pm 0,0$  nach 24h. Über die Zeit blieb das Verhältnis der EC-Biman Anteile zwischen den beiden Linienpaaren konstant.

### 3.2.4 Sensitivität der AtGGT4-defizienten Linien gegenüber Xenobiotika

Wie zuvor WT und  $\Delta$ PCS wurden auch die AtGGT4-defizienten Linien auf ihre Sensitivität gegenüber MCB getestet (Abb. 3.28). AtGGT4 ist erwiesenermaßen am Abbau von GS-Konjugaten in der Vakuole beteiligt (Grzam *et al.*, 2007; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b). MCB wird nach Aufnahme in die Zellen an GSH konjugiert und das gebildete GS-Biman im Cytoplasma (s.u.) und in der Vakuole (Grzam *et al.*, 2007; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b) abgebaut.

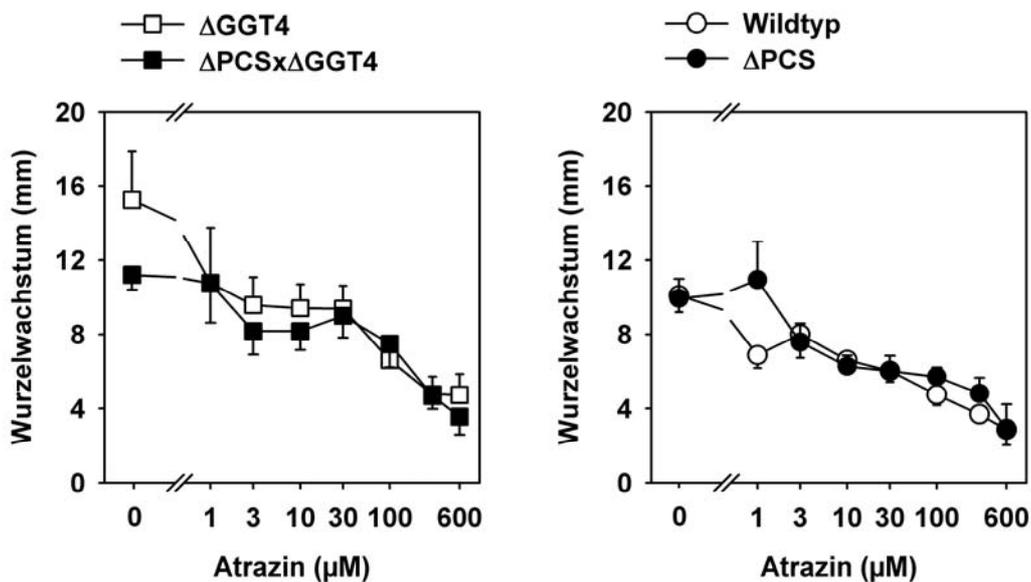


**Abb. 3.28: Sensitivität der AtGGT4-defizienten Linien gegenüber MCB**

Vier Tage alte Keimlinge wurden von B5-Agarplatten auf B5-Stressplatten ohne und mit 10 bzw. 30  $\mu$ M MCB überführt und nach drei Tagen das Wurzelwachstum ausgewertet (Mittelwerte von 12 Keimlingen mit SD).

Um zu untersuchen, ob die Ausschaltung des AtGGT4-vermittelten Abbaus von GS-Konjugaten die Sensitivität der AtGGT4-defizienten Linien gegenüber MCB beeinflusst, wurden zusammen mit dem Wildtyp die Linien  $\Delta$ GGT4 und die Dreifachmutante  $\Delta$ PCSx $\Delta$ GGT4 auf MCB-Agarplatten mit Konzentrationen von 10 und 30  $\mu$ M getestet. Dies war von besonderem Interesse für Belastungsversuche mit 5  $\mu$ M MCB, wie sie auch mit den PCS-defizienten Linien durchgeführt worden waren. Keine der beiden getesteten Linien zeigte jedoch eine Sensitivität, die gegenüber dem Wildtyp verändert wäre (Abb. 3.28).

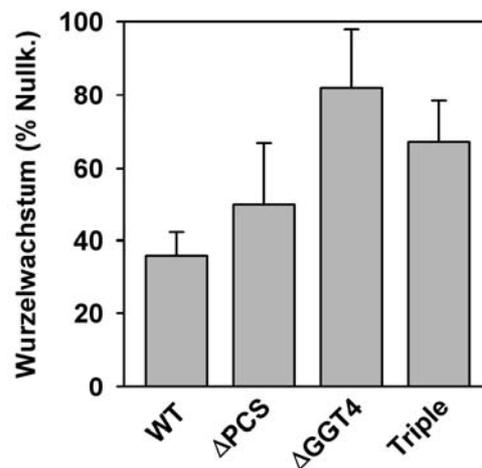
Parallel zu den PCS-defizienten Linien wurden auch die Linien ohne funktionale AtGGT4 auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Atrazin getestet. Wie man Abb. 3.29 entnehmen kann, wurde auch bei  $\Delta$ GGT4 und der Kreuzung  $\Delta$ PCSx $\Delta$ GGT4 keine gegenüber dem Wildtyp veränderte Reaktion auf Atrazinbelastung beobachtet. Die Ergebnisse unterscheiden sich nur unwesentlich von denen des Wildtyps und der PCS-Doppelmutante. Für bessere Übersichtlichkeit sind die Kurven für letztere aus Abb. 3.17 nicht in das Diagramm integriert, sondern daneben in einem zweiten Diagramm abgebildet. Bei 30  $\mu$ M Atrazin kam es zu einer Hemmung auf 62% ( $\Delta$ GGT4) bzw. lediglich 80% (Dreifachmutante), bei 100  $\mu$ M betrug das Restwachstum 43% bzw. 67%.



**Abb. 3.29: Wachstum der beiden AtGGT4-defizienten Linien auf Agarplatten mit Atrazin**

Vier Tage alte Arabidopsis-Keimlinge der Insertionslinie  $\Delta$ GGT4 und der Dreifachmutante  $\Delta$ PCSx $\Delta$ GGT4 wurden von MS-Platten auf MS/50% Sucrose-Platten mit unterschiedlichen Atrazin-Konzentrationen transferiert. Der Wurzelzuwachs wurde dokumentiert und nach drei Tagen ausgewertet. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 14 Keimlingen mit SD. Zum Vergleich sind im rechten Diagramm die Werte für WT und  $\Delta$ PCS aus Abb. 3.17 abgebildet.

Damit schien die Dreifachmutante auf den Atrazinplatten sogar besser zu wachsen als WT und  $\Delta$ PCS. Um dies zuverlässig zu überprüfen, wurde der Wurzelwachstumstest mit 30  $\mu$ M Atrazin mit der vierfachen Anzahl an Keimlingen ( $n = 60$ ) wiederholt (Abb. 3.30). Durch die höhere Anzahl an Individuen (Keimlingen) sollten auch die Standardabweichungen verringert werden.



**Abb. 3.30: Zusätzliche Wiederholung des Toxizitätstests mit 30  $\mu$ M Atrazin**

Vier Tage alte Keimlinge von Wildtyp (WT), PCS-Doppelmutante ( $\Delta$ PCS), GGT4-Mutante ( $\Delta$ GGT4) und der Dreifachmutante  $\Delta$ PCS $\times$  $\Delta$ GGT4 (Triple) wurden von MS-Anzuchtplatten auf MS/50% Sucrose-Platten ohne und mit 30  $\mu$ M Atrazin umgesetzt und nach drei Tagen der Wurzelzuwachs gemessen. Die Werte ( $n = 60$ ) sind dargestellt als % Wachstum auf 30  $\mu$ M Atrazin bezogen auf die jeweilige Nullkontrolle (Absolutwerte = 100% in mm) mit SD.

Auch in diesem Versuch liegen die Mittelwerte des Restwachstums von  $\Delta$ PCS $\times$  $\Delta$ GGT4 ( $67\% \pm 11$ ) und in diesem Falle besonders  $\Delta$ GGT4 ( $82\% \pm 16$ ) über denen von Wildtyp ( $36\% \pm 6$ ) und  $\Delta$ PCS ( $50\% \pm 17$ ). Trotz Vergrößerung der Individuenzahl ( $n = 60$ ) wurde keine Reduzierung der Streuung der Werte erreicht.

Die Herbizidwirkung von Atrazin beruht nicht auf der bloßen Hemmung des Elektronenflusses in der Photosynthese, sondern primär darauf, dass durch den Elektronenstau am Photosystem II reaktive Sauerstoffspezies und dadurch oxidativer Stress entstehen (Rutherford and Krieger-Liszkay, 2001). Deshalb ist die Tatsache interessant, dass die in den Agarplatten verfügbare Sucrose einen Atrazintoleranz vermittelnden Effekt besitzt, wobei der von Sucrose größer ist als der von Glucose. Dies liegt nicht an der direkten Stabilisierung von Membranen oder Proteinen durch die Hydroxylgruppen im Zuckermolekül (Crowe *et al.*, 1984), sondern an der gezielten Hochregulation der Expression einer plastidären Eisen-Superoxid-Dismutase (FSD1) und cytoplasmatischen Glutathion S-Transferase (GST6), die schon bei Sucrose-Konzentrationen von 1 bis 10 mM im MS-Agar zu beobachten ist (Sulmon *et al.*, 2006).

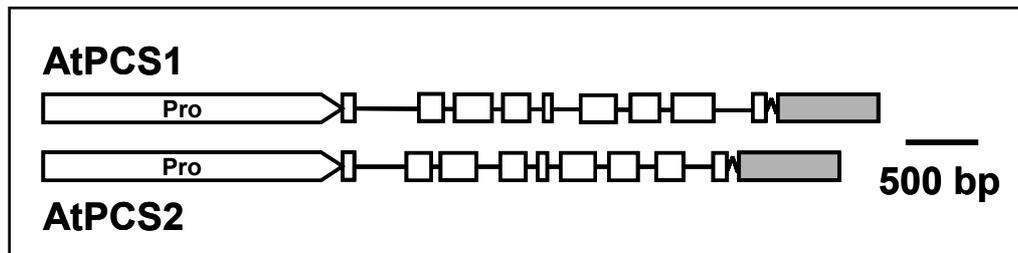
Dadurch wird die Konjugation von Atrazin an GSH und gleichzeitig die Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies am blockierten Photosystem II beschleunigt. Die MS-Platten in den Wurzelwachstumsversuchen mit Atrazin enthielten demnach mit 15 mM Sucrose genügend Zucker für die Induktion einer Atrazintoleranz. Deshalb wurde der Versuch mit sucrosefreien Agarplatten mit 0, 1, 10 und 30  $\mu\text{M}$  Atrazin wiederholt. Auf diesen Platten kam es jedoch bei allen getesteten Linien zu sehr unregelmäßigem Wurzelwachstum mit sehr großer Streuung der Werte, weshalb keine Aussage zu Unterschieden in der Empfindlichkeit gegenüber Atrazin abgeleitet werden konnte. Lediglich der von Sulmon *et al.* (2006) beschriebene schützende Effekt der Sucrose konnte nachvollzogen werden. Während das Wurzelwachstum beim ersten Versuch mit Zucker in Anwesenheit von 30  $\mu\text{M}$  Atrazin nur um 20 bis 40% gehemmt wurde, konnte bei Keimlingen aller Linien auf zuckerfreien Platten mit 30  $\mu\text{M}$  Atrazin kein Wachstum mehr beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.3 Lokalisation von AtPCS1 und AtPCS2

Die zelluläre Lokalisation der Phytochelatinsynthasen in Arabidopsis wurde bisher noch nicht explizit gezeigt. Um diese Lücke zu schließen, wurden Fusionskonstrukte der genomischen DNA beider PCS-Gene einschließlich eines 2025 bp langen endogenen Promotorabschnitts mit EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) hergestellt, wobei das EGFP an die C-Termini fusioniert wurde. Ein *linker* aus 10 Alaninresten zwischen PCS-Gensequenz und EGFP-Gensequenz sollte Funktion und Stabilität der Fusionsproteine verbessern (Doyle and Botstein, 1996). Um möglichst natürliche Mengen der Fusionsproteine beobachten zu können, wurde anstelle der kürzeren und besser handhabbaren cDNA die genomische DNA mit Introns gewählt. In einer Arbeit zur Lokalisation und Expression von AtPCS1 wurde ein Unterschied festgestellt zwischen Pflanzen, die mit genomischer DNA und solchen, die mit cDNA von AtPCS1 transformiert wurden (Lee *et al.*, 2002). Transgene Linien mit FLAG-markierter AtPCS1 unter der Kontrolle eines 2kb endogenen Promotorfragments zeigten fünffach geringere Proteinmengen, wenn statt genomischer DNA von AtPCS1 cDNA verwendet wurde.

Die Fusionierung der PCS-Gene mit dem Gen für EGFP erfolgte in einer modifizierten Version des pEZT-NL Vektors (Yadav, 2007) mit den Primern AtPCS1\_AscI\_for (42), AtPCS1oT\_AatII\_rev (43), AtPCS2\_AscI\_for (44) und AtPCS2oT\_AatII\_rev (45). Die endogenen Promotorsequenzen wurden mit den Primern AtPCS1\_2kbBamHI\_for (47) und AtPCS1\_MluI\_rev (46) bzw. AtPCS2\_2kbBamHI\_for (48) und AtPCS2\_BglII\_rev (48a) amplifiziert und unter Verwendung der endogenen Schnittstellen MluI bzw. BglII übergangslos vor die Gensequenzen kloniert. Die Plasmide wurden mittels

Sequenzanalyse überprüft. Danach wurden die Fusionskonstrukte über die Schnittstellen für *Bam*HI und *Sac*I in den pSK-*Asc*I (Hoffmann, 2002) überführt und von dort unter Ausnutzung der *Asc*I-Schnittstellen in den binären Vektor pBI121-*Asc*I (Hoffmann, 2002) eingefügt. Mit letzterem wurden *Agrobacterien* transformiert, welche dann für die stabile Transformation von *Arabidopsis* verwendet wurden.



**Abb. 3.31 EGFP-Fusionskonstrukte von AtPCS1 und AtPCS2**

Für beide PCS-Gene in *Arabidopsis* wurde jeweils ein 2025 bp langes endogenes Promotorstück (Pro) vor das Gen kloniert und beide Gene mit EGFP fusioniert. Die Symbole stellen dar: Promotor (Pfeil), Exons (weiße Boxen), Introns (einfache Linien), Alanin(10)-Linker (gezackte Linie), EGFP (graue Boxen).

Für pAtPCS1::AtPCS1:EGFP wurden insgesamt 24 unabhängige Transformationslinien auf MS/Kan30-Platten isoliert, davon 7  $\Delta$ PCS1 (#37-1 bis 37-7), 7  $\Delta$ PCS (#66-1 bis 66-7) und 10 WT (#Col1 bis Col10). Für pAtPCS2::AtPCS2:EGFP wurden 13  $\Delta$ PCS (#63-1 bis 63-13) und 10 WT (#Col20-29) isoliert.

### 3.3.1 Funktionale Komplementation durch GFP-Konstrukte

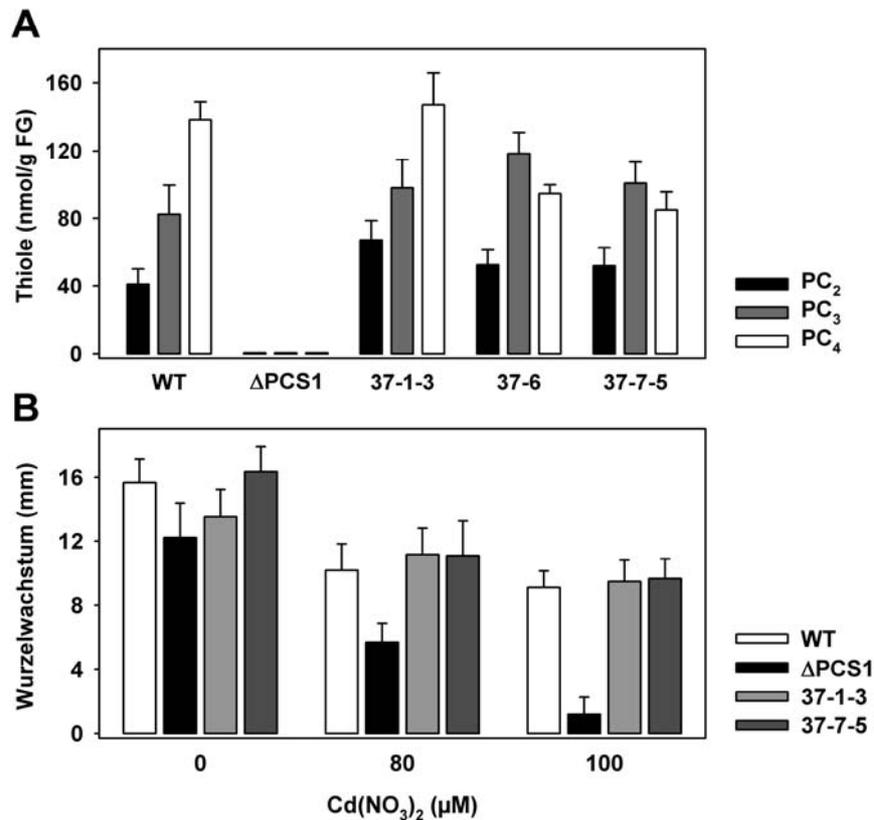
Möchte man Lokalisations- oder Expressionsstudien mit Reporterkonstrukten durchführen, z.B. durch Fusion mit GFP, YFP oder GUS, sollte getestet werden, ob das Fusionsprotein auch funktional ist (Weigel and Glazebrook, 2002). Kann dies bestätigt werden, geht man davon aus, dass das Fusionsprotein sich auch an der natürlichen zellulären Position des endogenen Proteins befindet.

Mit den AtPCS1:EGFP Fusionskonstrukten wurden die  $\Delta$ PCS1 bzw.  $\Delta$ PCS Linien und als Kontrolle auch der Wildtyp (Col-0) stabil transformiert und parallel zur Mikroskopanalyse zur Untersuchung der Komplementation auf PC-Synthese und Cd-Toleranz (Abb. 3.32) und GS-Biman Abbau (Abb. 3.33) getestet.

Nach Belastung von Keimlingen mit 50  $\mu$ M Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> zeigte der Wildtyp als Kontrolle die stets zu beobachtende Verteilung der PC-Anteile von PC<sub>2</sub><PC<sub>3</sub><PC<sub>4</sub> mit den entsprechenden Werten von 41  $\pm$  9, 82  $\pm$  17 bzw. 138  $\pm$  11 nmol/g FG. In  $\Delta$ PCS1 (Transformationshintergrund) waren keine Phytochelatine zu detektieren. Die drei

unabhängigen Transformationslinien 37-1-3 und 37-7-5 (nicht segregierend) und 37-6 (1:3 segregierend auf MS-Platten mit 30 mg/L Kanamycin) zeigten sehr gute Komplementation bezüglich der PC-Synthese. Sie erreichten im Vergleich zu den Werten des WT für PC<sub>2</sub> rund 130 bis 160%, für PC<sub>3</sub> 120 bis 140% und für PC<sub>4</sub> 60 bis 100%.

In den Wurzelwachstumstests zeigten die Transformationslinien die gleiche Cd-Toleranz wie der Wildtyp, wie nach der PC-Analyse zu erwarten war.



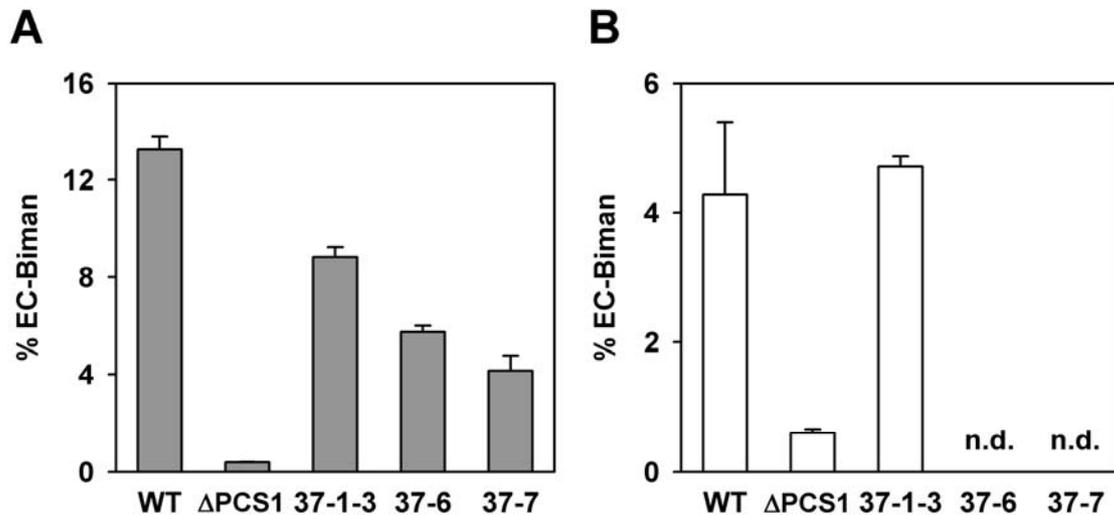
**Abb. 3.32: AtPCS1:EGFP komplementiert Cd-Sensitivität in ΔPCS1**

(A) Analyse der PC-Synthese in drei unabhängigen mit AtPCS1:EGFP transformierten Linien. Fünf Tage alte Keimlinge wurden in B5-Medium für 24h mit 50 μM Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> belastet und anschließend die Phytochelatine extrahiert und in der HPLC analysiert. Die Werte repräsentieren Triplikate mit SD.

(B) Zwei unabhängige mit AtPCS1:GFP transformierte ΔPCS1 Linien wurden auf Cd-Platten hinsichtlich ihrer Schwermetalltoleranz untersucht. Vier Tage alte Keimlinge wurden von Agarplatten ohne Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> auf Platten mit unterschiedlichen Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Konzentrationen umgesetzt und das Wurzelwachstum über 72h dokumentiert. Die einzelnen Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte von 12 bis 14 Keimlingen mit SD.

Zur Untersuchung des GS-Biman Abbaus wurden jeweils 30 Keimlinge von Wildtyp, ΔPCS1 und den genannten drei Transformationslinien mit 10 μM Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> und 5 μM MCB koinfiltriert und die Extrakte mittels HPLC auf Biman-Derivate analysiert (Abb. 3.33 A). Der Referenzwert im Wildtyp war ein Anteil von 13,3% ± 0,5 EC-Biman (ΔPCS1 0,4% ± 0,2). Davon erreichten 37-1-3 67%, 37-6 43% und 37-7 31%, wobei die Samen

letzterer beider Linien noch 25% nicht transformierter Individuen enthielten. Für 37-1-3 wurde zusätzlich die Glycinabspaltung von GS-Biman in Protoplasten getestet und lieferte ebenfalls volle Komplementation bei Vergleich mit dem Wildtyp (Abb. 3.33 B).

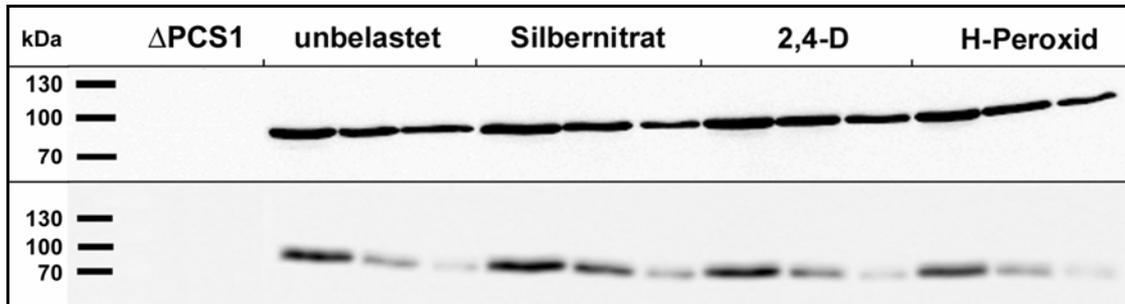


**Abb. 3.33: AtPCS1:EGFP komplementiert den Abbau von GS-Biman zu EC-Biman in ΔPCS1**  
 Mit AtPCS1:EGFP transformierte ΔPCS1-Linien wurden auf GS-Biman Abbau hin untersucht. (A) Jeweils 30 Keimlinge wurden von B5-Agarplatten in B5-Medium transferiert und mit 5 μM MCB infiltriert. Nach 4h Inkubation wurden die Keimlinge für die HPLC-Analyse extrahiert. (B) Rosettenblätter von drei Wochen alten Pflanzen wurden protoplastiert und von der Protoplastensuspension ( $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ ) 500 μl Aliquots in 2 ml Reaktionsgefäßen mit 5 μM MCB während 4h belastet. Alle Werte sind Ergebnisse von Dreifachbestimmungen mit SD. 37-1-3, 37-6, 37-7 bezeichnen drei unabhängige Transformationslinien, von denen 37-1-3 nicht segregiert, die beiden anderen zeigen Segregation im Verhältnis 1:3 bezüglich Kanamycin-Resistenz. Für die zwei letztgenannten Linien wurden keine Komplementationsversuche mit Protoplasten durchgeführt (n.d., nicht durchgeführt).

Durch die Wahl eines endogenen Promotors in den Reportergerkonstrukten bestand auch die Möglichkeit, die Regulation der Proteinsynthese von AtPCS1 zu untersuchen. Dabei bot die Detektion mit anti-EGFP Antikörpern eine sehr gute Alternative zum weniger gut handhabbaren anti-PCS Antikörper. Jedoch zeigte sich, dass das AtPCS1:EGFP Fusionsprotein auch gut mit letzterem nachgewiesen werden konnte, vermutlich aufgrund veränderter Proteinestabilität durch die Fusionierung an EGFP.

Aus der Datenbank mit stressspezifischen Expressionsprofilen (*Response Viewer*) von Genevestigator (Zimmermann *et al.*, 2004) wurden drei Stressfaktoren ausgewählt, durch die in Affymetrix Chip-Analysen die Transkription von AtPCS1 hochreguliert wurde. Durch Inkubation von transgenen Keimlingen mit Silbernitrat, 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und Wasserstoffperoxid entsprechend den Angaben in Genevestigator und anschließender Westernblot-Analyse der Proteinextrakte wurde untersucht, ob die Proteinsynthese von AtPCS1:EGFP mit den Daten für die Transkription von AtPCS1 korreliert. Wie Abb. 3.34

zeigt, war in den beiden unabhängigen Transformationslinien 37-1-3 und 37-7-5 kein Unterschied zwischen Proteinproben aus stressexponierten und unbelasteten Keimlingen zu erkennen. Der als Kontrolle ebenfalls aufgetragene Transformationshintergrund ( $\Delta$ PCS1) schließt eine allfällige Kreuzreaktion des anti-GFP-Antikörpers mit pflanzlichen Proteinen aus.



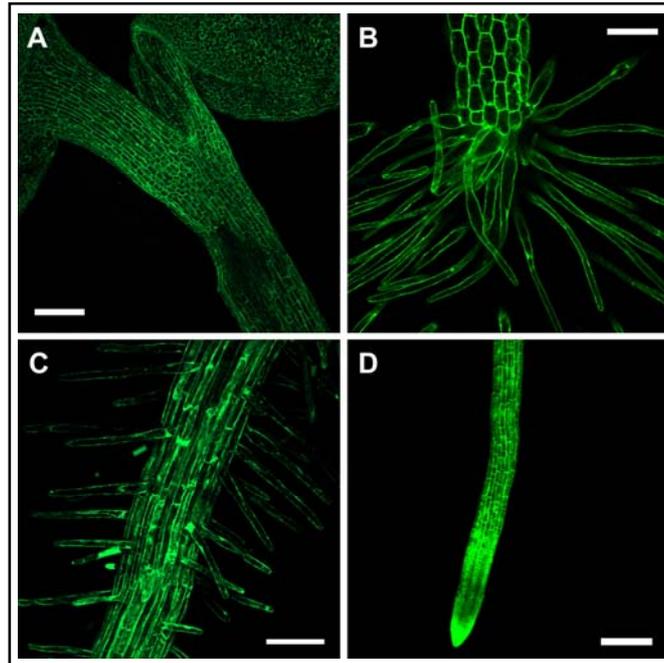
**Abb. 3.34: Westernblot-Analyse von Proteinextrakten aus stressexponierten AtPCS1:EGFP Transformationslinien**

Jeweils 30 Keimlinge (fünf Tage alt) von den beiden unabhängigen Transformationslinien 37-1-3 und 37-7-5 wurden anhand von Daten aus der Genevestigator-Datenbank (*Response Viewer*) drei verschiedenen Stressfaktoren ausgesetzt: 10  $\mu$ M AgNO<sub>3</sub> (3h), 1 mM 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (1h) und 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1h). Als Kontrollen dienten  $\Delta$ PCS1- und unbelastete transformierte Keimlinge. Anschließend wurden jeweils 20, 10 und 4  $\mu$ g Protein auf ein 10%iges SDS-Gel geladen ( $\Delta$ PCS1 nur 20 und 10  $\mu$ g). Die Detektion erfolgte mit einem primären Antikörper gegen GFP.

### 3.3.2 Expression von AtPCS1 und AtPCS2 in Keimlingen

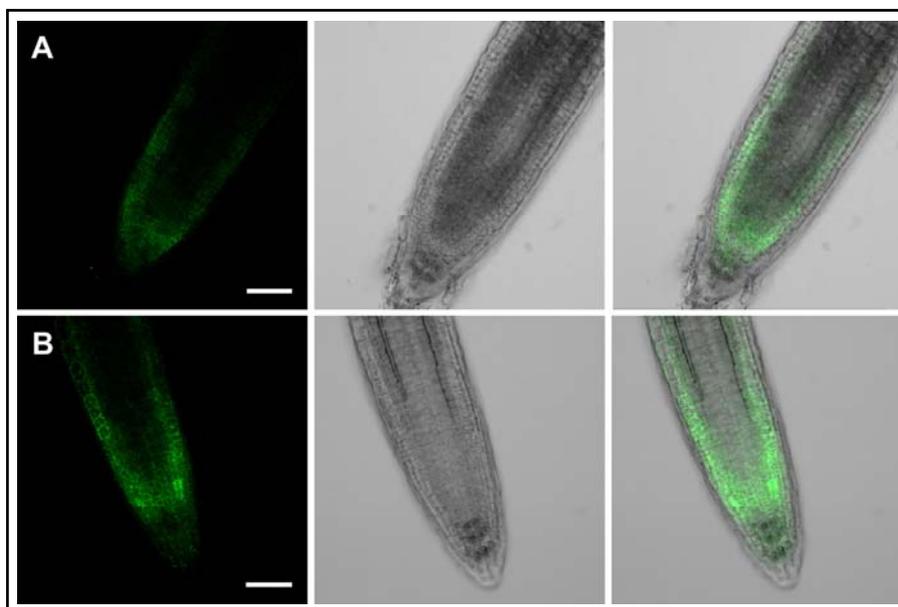
Von den mit AtPCS1:EGFP transformierten Pflanzen wurden ganze Keimlinge, Kotyledonen und Keimlingswurzeln mikroskopiert. Transformanden mit allen drei Transformationshintergründen (WT,  $\Delta$ PCS1 und  $\Delta$ PCS) wurden auf EGFP-Fluoreszenz untersucht. Für die detaillierte Dokumentation der Fluoreszenzsignale wurden drei repräsentative Linien ausgewählt, die auch in den Versuchen zur Komplementation zum Einsatz kamen. Die Anregung erfolgte mit einem Laser, der monochromatisches Licht der Wellenlänge  $\lambda = 488$  nm emittierte. Die Fluoreszenz von EGFP wurde in einem engen Fenster von 505 bis 515 nm detektiert.

Fluoreszenzsignale von AtPCS1:EGFP wurden im gesamten Keimling beobachtet. Abb. 3.35 gibt einen Überblick der Signale in Keimblättern, Hypokotyl, Wurzel mit Wurzelhaaren und Wurzelspitze. In mit AtPCS2:EGFP transformierten Keimlingen war nur ein sehr schwaches und auf die Wurzelspitze beschränktes Fluoreszenzsignal zu beobachten (Abb. 3.36). Es zeigte eine diffuse Verteilung über diesen Bereich und war für eine detaillierte Untersuchung der zellulären Lokalisation nicht geeignet.



**Abb. 3.35: Expression von AtPCS1:EGFP in Arabidopsis-Keimlingen**

Das Fluoreszenzsignal für AtPCS1:EGFP war in allen Teilen der mikroskopierten Keimlinge zu finden: Kotyledonen und Hypokotyl (A), Hypokotyl und Wurzelhaare (B), Wurzelhaarzone (C), Wurzel und Wurzelspitze (D). Balken markieren 200  $\mu\text{m}$  (A und D) bzw. 100  $\mu\text{m}$  (B und C). Die Abbildungen wurden durch Überlagerung einzelner Z-Scans generiert.

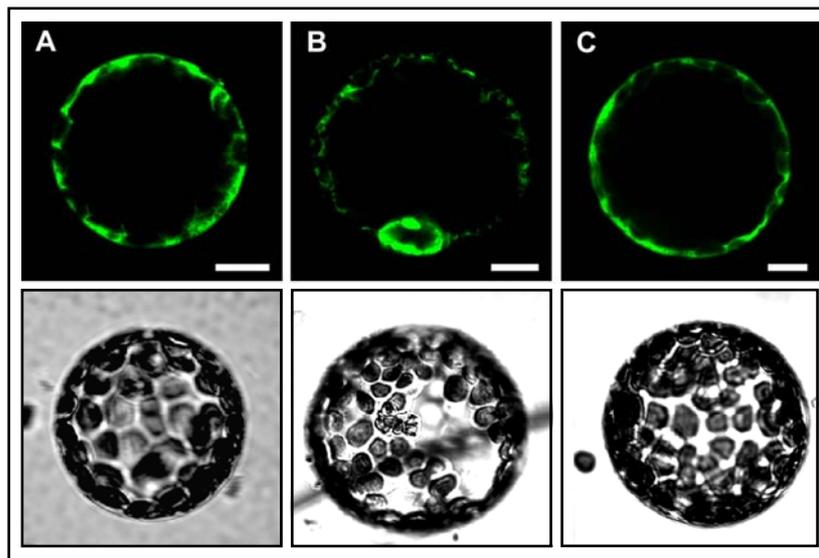


**Abb. 3.36: Expression von AtPCS2:EGFP in Arabidopsis-Keimlingen**

Das Fluoreszenzsignal für AtPCS2:EGFP war nur im Bereich der Wurzelspitze zu beobachten. Abgebildet sind repräsentative Bilder von zwei unabhängigen Transformationslinien (63-3 und 63-13). Die Balken markieren 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.3 Intrazelluläre Lokalisation

Für die Charakterisierung der intrazellulären Lokalisation wurden zunächst Protoplasten mikroskopiert (Abb. 3.37). Sowohl in transient transformierten Zellen (nicht gezeigt), als auch in Protoplasten, die aus Rosettenblättern von Transformationslinien gewonnen wurden (Linie 37-1-3 in Abb. 3.37 C), konnte für AtPCS1:EGFP ein cytoplasmatisches Signal beobachtet werden. Der Vergleich mit Protoplasten aus zwei Kontroll-Linien, in denen GFP konstitutiv exprimiert wurde (35S::GFP) bzw. das Endoplasmatische Retikulum markiert war (ER-GFP) (Cutler *et al.*, 2000), bestätigte diesen Befund. Die Fluoreszenz in der Transformationslinie 37-1-3 zeigte sich im Cytoplasmasaum zwischen den Chloroplasten und entsprach dem der 35S::GFP Kontroll-Linie (ohne Kernlokalisierung). In der ER-GFP Linie dagegen ist das Fluoreszenzsignal netzartig unterbrochen und nicht flächig über das ganze Cytoplasma verteilt, zusätzlich ist die Kernlamina markiert.

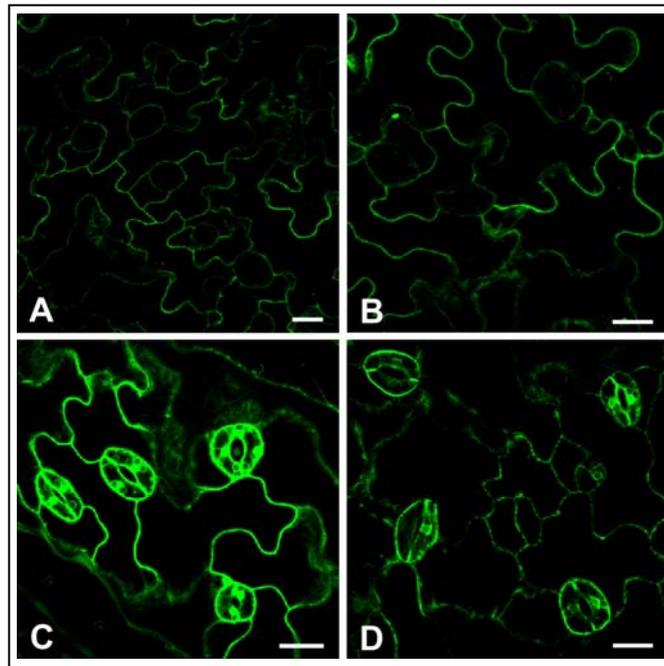


**Abb. 3.37: AtPCS1-EGFP Fluoreszenzsignale in Protoplasten**

(A) 35S::GFP, (B) ER-GFP, (C) Transformationslinie 37-1-3. Die obere Reihe zeigt die Dokumentation der Fluoreszenzsignale von EGFP ( $\lambda = 510 \text{ nm}$ ), in der unteren Reihe sind die parallel aufgezeichneten Durchlicht-Aufnahmen abgebildet. Die Markierungen entsprechen  $10 \mu\text{m}$ .

Anschließend wurden in Keimlingen (AtPCS1:EGFP) verschiedene Gewebe im Detail untersucht. In den Epidermiszellen beschränkte sich das Fluoreszenzsignal auf den Cytoplasmasaum und trat in Cytoplasmasträngen zwischen Vakuolen auf, während in Schließzellen keine Fluoreszenz vorhanden war (Abb. 3.38 und Abb. 3.39). Im Vergleich dazu zeigte die 35S::GFP Linie zusätzlich zu Signalen in den Epidermiszellen auch starke Fluoreszenz in den Schließzellen und auch die charakteristische Anfärbung der Zellkerne.

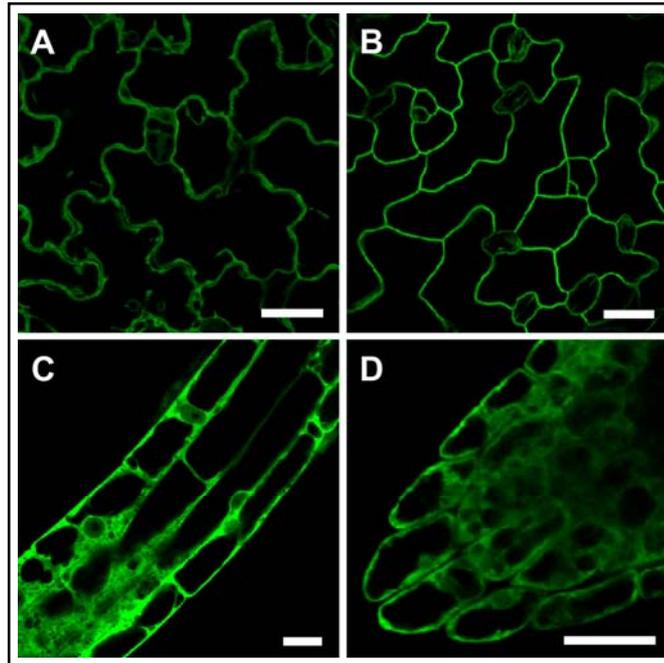
Die ER-GFP Linie zeigte in Epidermiszellen ein unterbrochen-punktartiges Signal im Cytoplasmasaum und je nach Fokussierungsebene netzartige Strukturen im Cytoplasma sowie eine Markierung der Kernlamina. In den Schließzellen war ebenfalls eine Markierung von Cytoplasma und Kernlamina zu beobachten, jedoch wegen der Größe der Zellen nicht so deutlich abzubilden.



**Abb. 3.38: AtPCS1:EGFP Fluoreszenz in Stomata der Kotyledonen**

Vergleichende Betrachtung der Stomata (und Epidermis) von AtPCS1:EGFP (A, B) und den Kontroll-Linien 35S::GFP (C) und ER-GFP (D). Markierung jeweils 20  $\mu\text{m}$ .

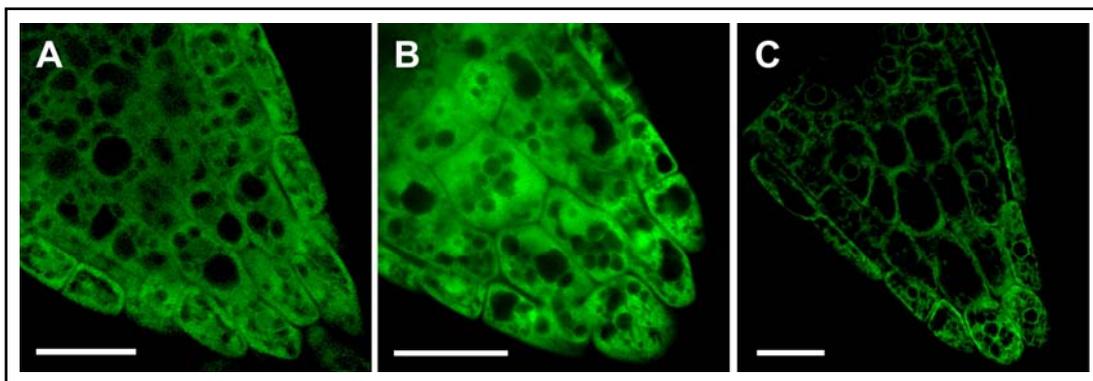
Das Erscheinungsbild der AtPCS1:EGFP-Fluoreszenz im Cytoplasmasaum von Epidermiszellen konnte deutlich von dem Signal einer Plasmalemma-GFP-Linie (Cutler *et al.*, 2000) unterschieden werden, welches als distinkte, schmale Linie entlang der Zellwand auftrat und keine Plasmastränge markierte (Abb. 3.39 B). Wurzelzellen zeigten eine eindeutige Lokalisierung des Fluoreszenzsignals im die jeweils zellausfüllende Vakuole umgebenden Cytoplasma, auch Plasmastränge waren hier zu erkennen. Zellkerne zeigten kein Signal, sondern erschienen als dunkle Struktur im GFP-markierten Cytoplasma (Abb. 3.39 C). Auch in Zellen der Calyptra war das Cytoplasma, nicht aber die Zellkerne oder Vakuolen markiert (Abb. 3.39 D).



**Abb. 3.39: Subzelluläre Lokalisation von AtPCS1:EGFP**

Detaillierte Lokalisation des Fluoreszenzsignals von AtPCS1:EGFP in Epidermiszellen (A), Zellen der Rhizodermis (C) und der Calyptra (D). Zum Vergleich mit (A) zeigt (B) Epidermiszellen einer Plasmalemma-GFP-Linie. Markierung jeweils 20 µm.

In den nicht so stark vakuolisierten Zellen des Bereichs der Wurzelspitze lässt sich eine Markierung des Cytoplasmas besonders gut beobachten (Abb. 3.40). Hier zeigte sich noch einmal deutlich eine Übereinstimmung der flächigen Fluoreszenzsignale in den AtPCS1:EGFP Linien mit denen der 35S::GFP Linie, wobei erstere keine dichten, hellen Bereiche aufwies, die den markierten Zellkernen in 35S::GFP entsprachen. Die netzartige Verteilung der Fluoreszenz in der ER-GFP Linie und besonders die Markierung der Kernlamina stellte sich im Vergleich dazu unterschiedlich dar.



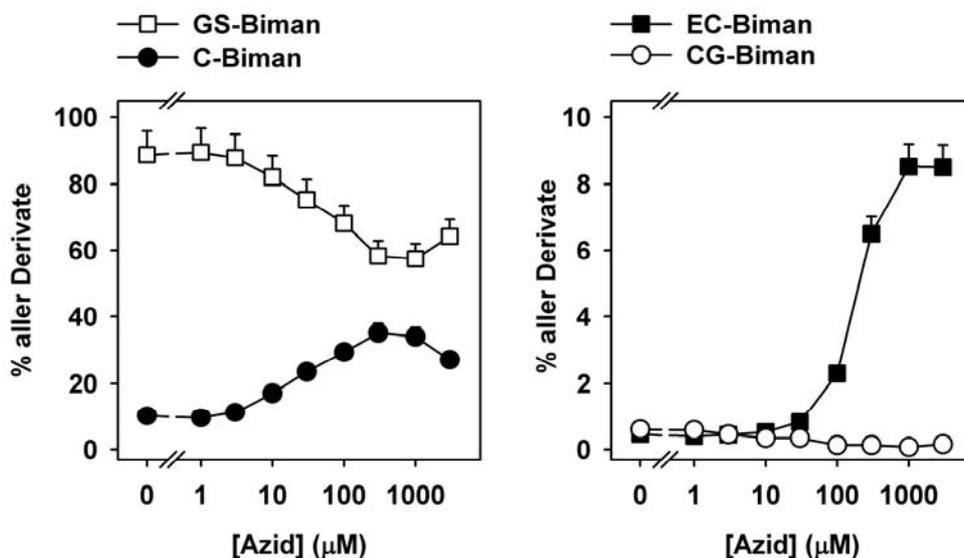
**Abb. 3.40: AtPCS1:EGFP-Fluoreszenz in der Wurzelspitze**

Zum Vergleich wurden Wurzelspitzen von AtPCS1:EGFP (A) und den Markerlinien 35S::GFP (B) und ER-GFP (C) parallel mikroskopiert. Die Balken markieren jeweils 20 µm.

### 3.3.4 Kompartimentierung der GS-Konjugate

Azid, meistens als Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) verwendet, ist ein Inhibitor von Zellatmung und ATP-Hydrolyse. In der mitochondrialen Atmungskette hemmt es die Cytochrom c Oxidase und verhindert so den Aufbau eines Protonengradienten, der von der ATP-Synthase für die Bildung von ATP aus ADP und  $\text{P}_i$  benötigt wird (Yonetani and Ray, 1965; Palmer, 1993; Saraste, 1999). Während die Synthese von ATP nicht betroffen ist (Bald *et al.*, 1998), hemmt Azid die Hydrolyse von ATP durch F-ATPasen (Bowler *et al.*, 2006) und andere ATPasen, darunter auch ecto-ATP-Diphosphohydrolasen und ABC-Transporter (Knowles and Nagy, 1999; Dallas *et al.*, 2003; Jha *et al.*, 2003). Azid inhibiert auch indirekt die Photosynthese, da es die Katalase hemmt und dadurch  $\text{H}_2\text{O}_2$  in den Chloroplasten akkumuliert (Forti and Gerola, 1977). Es kommt also in Anwesenheit von Azid zu einer Verarmung des in der Zelle verfügbaren ATP und in der Folge zu einer indirekten Hemmung ATP-abhängiger Transportprozesse. ABC-Transporter, die GS-Konjugate in die Vakuole befördern, enthalten als Komponente eine ATPase und werden deshalb auch direkt inhibiert (Jha *et al.*, 2003). Es stellt sich die Frage, ob sich etwas am Muster der GS-Biman Abbauprodukte verändert, wenn in Anwesenheit von Azid GS-Biman zu einem Großteil nicht mehr in die Vakuole transportiert werden kann, sondern im Cytoplasma akkumuliert.

Um herauszufinden, ob und bei welchen Azidkonzentrationen im Medium die erwarteten Effekte zu beobachten sind, wurde der GS-Biman Umsatz in Arabidopsis-Suspensionszellen zunächst in einer Versuchsreihe mit ansteigenden Azidkonzentrationen von  $1 \mu\text{M}$  bis  $3 \text{mM}$  im Zellkulturmedium getestet (Abb. 3.41). Im Bereich von  $10 \mu\text{M}$  bis  $1 \text{mM}$  Azid kam es in den Zellen zu einem verstärkten Umsatz von GS-Biman zu C-Biman, der im Bereich von  $0,1$  bis  $1 \text{mM}$  Azid von einem Anstieg des EC-Biman-Anteils begleitet wurde. Bei  $1 \text{mM}$  Azid war der beobachtete Effekt am stärksten und schien sich bei höherer Konzentration wieder abzuschwächen. Entsprechend wurde für nachfolgende Versuche eine Konzentration von  $1 \text{mM}$  Azid verwendet. Der Anteil an EC-Biman stieg von  $0,5\%$  (Nullkontrolle) bis auf  $8,5\%$  an und die Anteile von GS-Biman bzw. C-Biman veränderten sich von  $89\%$  bzw.  $10\%$  (Nullkontrolle) auf  $57\%$  bzw.  $34\%$  bei  $1 \text{mM}$  Azid. CG-Biman war nur zu sehr geringen Anteilen detektierbar, nahm jedoch von  $0,6\%$  (Nullkontrolle) auf  $0,08\%$  ( $1 \text{mM}$  Azid) ab.



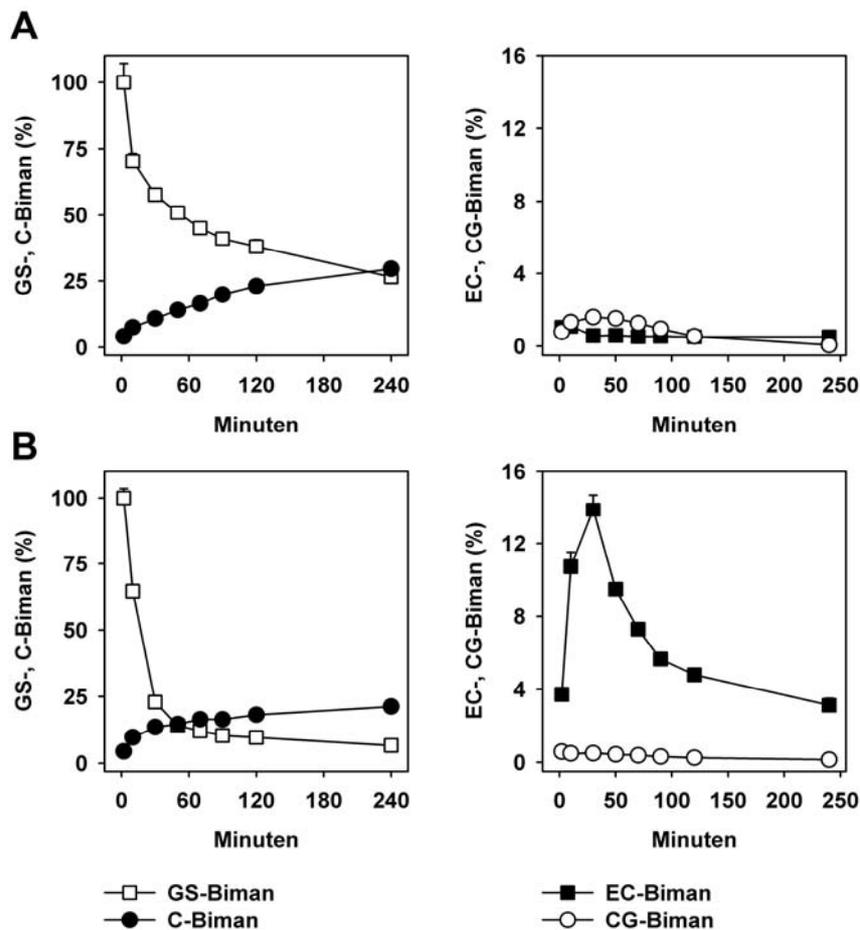
**Abb. 3.41: Umsatz von GS-Biman in Zellkulturen mit unterschiedlichen Azid-Konzentrationen im Medium**

Arabidopsis-Zellkulturen (1 Woche gewachsen) wurden 24h nach dem Umsetzen in frisches Medium unterschiedlichen Azidkonzentrationen ausgesetzt (5 min) und anschließend mit 5 µM MCB markiert (1 min). Nach dem Waschen der Zellen schloss sich eine Inkubation von 30 min in MCB-freiem Medium mit der jeweiligen Azidkonzentration an.

In MCB-Markierungsversuchen mit kurzen Belastungszeiten von 1 min zeigte sich, dass bei paralleler Inkubation der Zellen mit Azid nach 30 min ein gegenüber der Kontrolle ohne Azid 24fach erhöhter EC-Biman Level (0,6% vs. 13,9%) erreicht wird, der sich im Folgenden wieder abbaut (Abb. 3.42).

Nach 2h lag der GS-Biman Anteil in den Ansätzen ohne Azid bei rund 38% gegenüber rund 10% in den Ansätzen mit Azid. Die entsprechenden Anteile für C-Biman waren 23% im Vergleich zu 18%, also in Anwesenheit von Azid erniedrigt. CG-Biman war wiederum nur in sehr geringen Anteilen von entsprechend 0,5% gegenüber 0,25% zu detektieren.

In Ansätzen mit Azid war zu den Zeitpunkten der ersten Probennahme (2 min nach dem Waschen der Zellen) eine um rund 33% reduzierte Menge an GS-Biman zu beobachten (300 nmol GS-Biman/g FG).

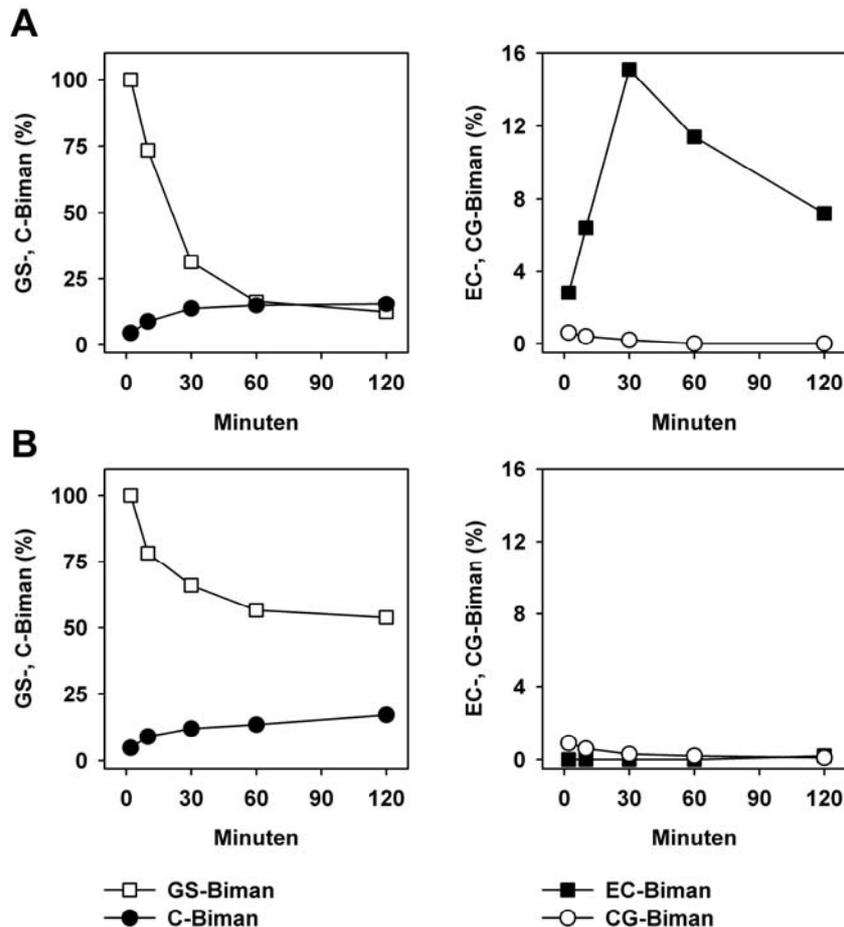


**Abb. 3.42: Effekt von Azid auf den GS-Biman Metabolismus in WT-Zellsuspensionskulturen**  
 Arabidopsis-Zellkulturen vom Wildtyp wurden 24h nach Umsetzen in frisches Medium für 5 min ohne (A) oder mit (B) 1 mM Azid inkubiert, bevor die Zellen für 1 min mit 5 µM MCB markiert wurden. Nachfolgend wurden die Zellen gewaschen und in MCB-freies Medium ohne (A) oder mit (B) 1 mM Azid überführt und die Probenahme erfolgte in Abständen von 20 bzw. 30 min, die letzte Probe wurde nach 6h genommen. Die prozentualen Anteile der Biman-Derivate sind auf den jeweiligen Anfangswert von GS-Biman bezogen. Angegeben sind Werte von Doppelbestimmungen mit SD.

Parallele Zeitreihen zum GS-Biman Metabolismus bei gleichzeitiger Azidbelastung mit Zellkulturen von WT und ΔPCS bis 120 min (Abb. 3.43) zeigten im Wildtyp den gleichen Verlauf der Kurven für die Anteile der Biman-Derivate wie in Abb. 3.42.

Erwartungsgemäß fehlte in ΔPCS der im WT beobachtete Anstieg von EC-Biman in den ersten 30 min (Abb. 3.43). Zusätzlich wurde in ΔPCS eine reduzierte Abnahme von GS-Biman beobachtet. Im WT waren nach 2h noch rund 10% des anfänglichen GS-Biman vorhanden, in ΔPCS hingegen noch rund 50%. Allerdings unterschieden sich die Anteile von C-Biman (WT 15%, ΔPCS 17%) nicht in den beiden Linien. CG-Biman spielte mit minimalen Anteilen keine Rolle, nahm jedoch auch wieder über die Zeit ab. Jedoch müssen diese Ergebnisse mit gewisser Vorsicht bewertet werden, da die

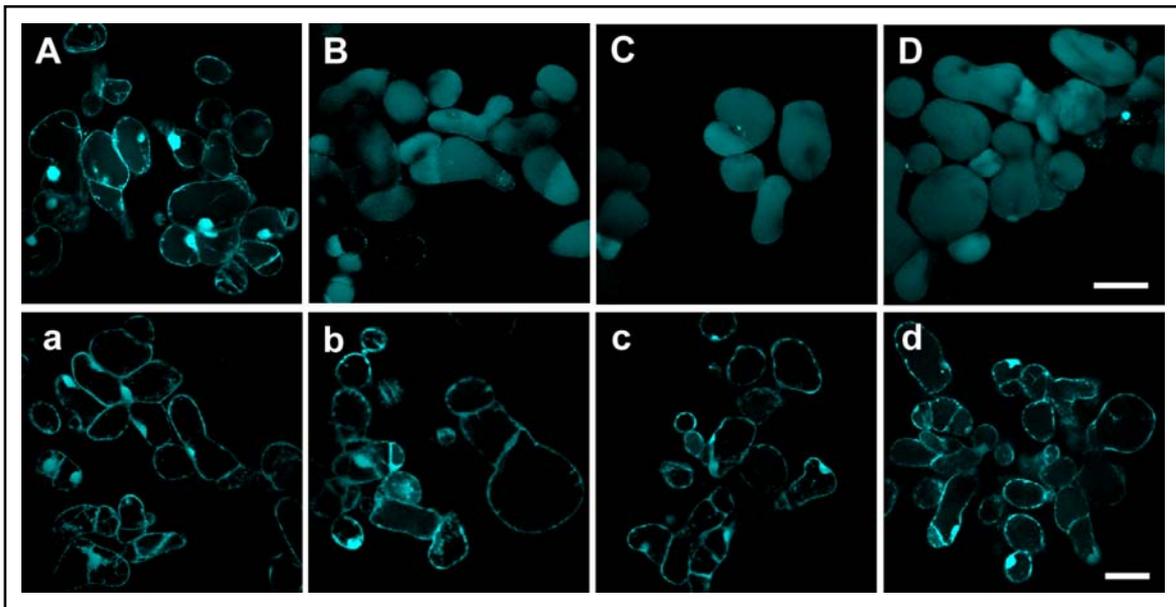
Zellsuspensionskulturen von  $\Delta$ PCS im Vergleich zu den sehr gut etablierten WT-Kulturen (*Landsberg erecta*) noch keine vergleichbare homogene Qualität besaßen.



**Abb. 3.43: Metabolismus von GS-Biman in WT- und  $\Delta$ PCS-Zellsuspensionskulturen bei Azidexposition**

Arabidopsis-Zellkulturen von Wildtyp (A) und  $\Delta$ PCS (B) wurden 24h nach Umsetzen in frisches Medium für 5 min mit 1 mM Azid inkubiert, bevor die Zellen für 1 min mit 5  $\mu$ M MCB markiert wurden. Nachfolgend wurden die Zellen gewaschen und in MCB-freies Medium mit 1 mM Azid überführt. Die prozentualen Anteile der Biman-Derivate sind jeweils auf den Anfangswert von GS-Biman bezogen.

Der Einfluss von 1 mM Azid im Zellkulturmedium auf die Verteilung von Biman-Konjugaten bzw. GS-Biman in Arabidopsis-Suspensionszellen (Grzam *et al.*, 2006) wurde auch unter dem Mikroskop verfolgt. Es war eine deutlich unterschiedliche Verteilung von konjugiertem Biman in den Zellen erkennbar. Ohne Azid kommt es nach Aufnahme und Konjugation von MCB zu einem raschen Transport der Derivate in die Vakuole und das Fluoreszenzsignal erscheint diffus über die ganze Zelle verteilt (Abb. 3.44 A bis D). Durch die Wirkung von Azid hingegen bleibt das Fluoreszenzsignal im Cytoplasma, die Vakuolen der Zellen zeigen keine oder nur sehr schwache Fluoreszenz (Abb. 3.44 a bis d).



**Abb. 3.44: Effekt von Azid auf die Verteilung von Biman-Konjugaten in Arabidopsiszellen**

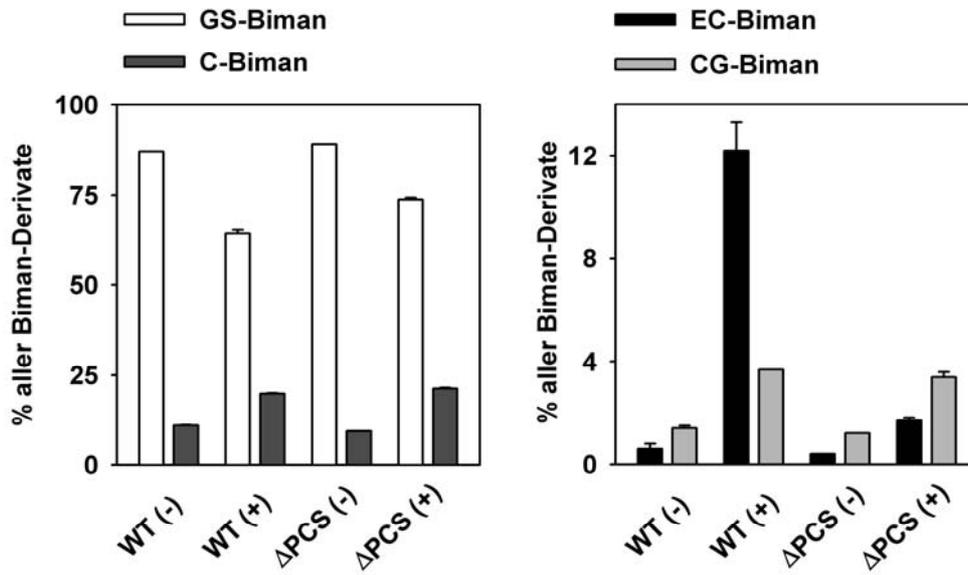
Zellsuspensionskulturen von *Arabidopsis* (*Landsberg erecta*) wurden 5 min ohne (A-D) oder mit (a-d) 1 mM Azid inkubiert und anschließend 1 min mit 5  $\mu$ M MCB markiert, danach gewaschen und in Medium mit Azid weiter geschüttelt. Die Aufnahmen entstanden 2 min (A, a), 15 min (B, b), 60 min (C, c) und 120 min (D, d) nach Überführen in MCB-freies Medium. Markierung 50  $\mu$ m.

Die Befunde aus den Azid-Versuchen mit Zellkulturen ließen sich auch auf Keimlinge übertragen. Ein Vorversuch hatte gezeigt, dass mit 5 mM Azid (17% EC-Biman) gegenüber 1 mM Azid (19,5% EC-Biman) keine Steigerung des EC-Biman Anteils erreicht werden kann.

Nach 60 min war bereits ein fünffach gegenüber der Kontrolle erhöhter Anteil von EC-Biman zu beobachten, jedoch kam der Effekt von Azid nach 2h deutlicher zum Vorschein, weshalb t=2h nach Infiltration von MCB für eine Dreifachbestimmung gewählt wurde (Abb. 3.45). Zu diesem Zeitpunkt war analog zu den Zellkulturen ein rund 20facher Anstieg der Menge an EC-Biman im Wildtyp zu beobachten (Nullkontrolle  $0,6\% \pm 0,2$  und nach 2h  $12,2\% \pm 1,1$  EC-Biman), während der Anstieg in  $\Delta$ PCS-Keimlingen nur etwa dem Faktor 4 entsprach.

Die Anteile an C-Biman nach 2h waren sowohl im Wildtyp als auch in  $\Delta$ PCS in Anwesenheit von Azid deutlich erhöht. Wildtyp: Nullkontrolle  $11\% \pm 0,1$  und mit Azid  $20\% \pm 0,2$ .  $\Delta$ PCS: Nullkontrolle  $9\% \pm 0,0$  und mit Azid  $21\% \pm 0,3$  C-Biman. Die Anteile von GS-Biman waren dagegen in den Ansätzen mit Azid niedriger als in der Nullkontrolle (Wildtyp 87% gegenüber 67% und  $\Delta$ PCS 89% gegenüber 74%, jeweils  $\pm 0,5$ ).

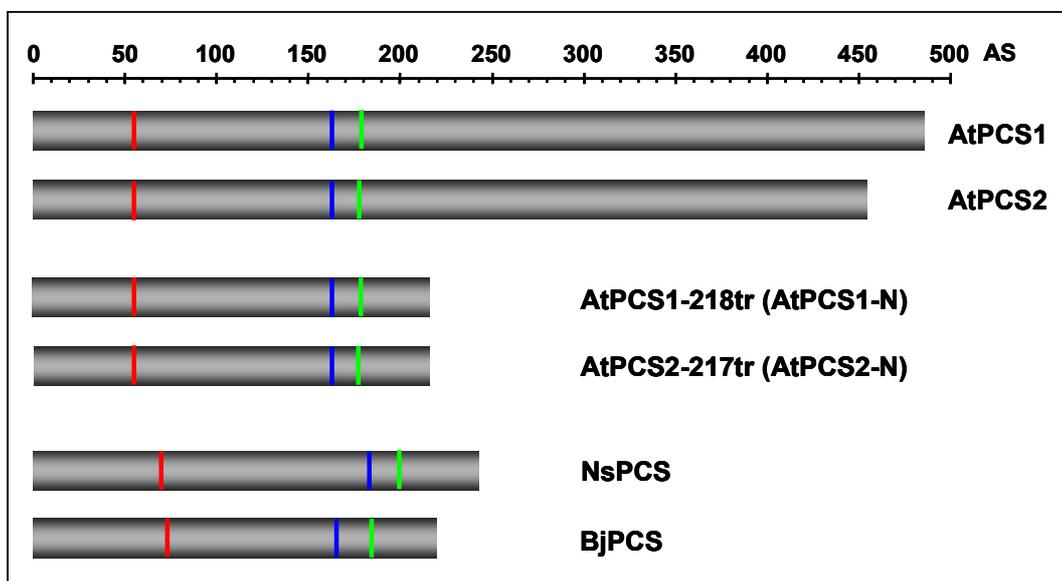
Die Gesamtmengen an Bimanderivaten waren beim Wildtyp ohne Azid  $1,4 \text{ nmol} \pm 12\%$ , in den Proben mit Azid um einen Faktor 2 weniger. Bei  $\Delta$ PCS waren es  $0,8 \text{ nmol}$  ohne Azid und mit Azid um einen Faktor 1,5 weniger.



**Abb. 3.45: GS-Biman Abbau in Keimlingen bei gleichzeitiger Inkubation mit Azid**  
 Jeweils 30 Keimlinge pro Zeitpunkt wurden von Wildtyp (A) und  $\Delta$ PCS (B) für 30 min mit 1 mM Azid vorinkubiert und dann nach Infiltration von 5  $\mu$ M MCB im Azidmedium für die entsprechenden Zeiträume inkubiert. Die Werte stammen von Dreifachbestimmungen mit SD.

### 3.4 Expression des PCS-Homologs aus *Nostoc sp.* und carboxy-terminal verkürzter Versionen von AtPCS in Arabidopsis

Von dem PCS-homologen Protein alr0975 aus dem Cyanobakterium *Nostoc sp.* (*Anabaena sp.*) PCC 7120 (NsPCS) wurde bisher gezeigt, dass es nur minimal PCs bildet, dafür aber effizient die Abspaltung des Glycins von GSH katalysiert (Harada *et al.*, 2004; Tsuji *et al.*, 2004). Von Interesse ist aber ebenfalls, ob von NsPCS auch GS-Konjugate als Substrate akzeptiert werden und ob diese verkürzte PCS-Version den  $\Delta$ PCS-Phänotyp in Arabidopsis funktional komplementieren kann. Parallel zu NsPCS wurden stabile Transformationslinien mit den N-terminalen Bereichen von AtPCS1 und AtPCS2 (Abb. 3.46) generiert und im Vergleich zu den mit NsPCS transformierten Linien analysiert, um mögliche Erkenntnisse über die evolutionären Zusammenhänge zwischen dem verkürzten homologen cyanobakteriellen Protein und den doppelt so langen PCS-Proteinen in Arabidopsis zu gewinnen. Ein weiteres homologes Protein, bll7663 aus *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (BjPCS), wurde in das Klonierungsset zur Expression in Hefe und Arabidopsis mit einbezogen, jedoch nicht in Arabidopsis transformiert.



**Abb. 3.46: Schematische Darstellung der stabil in  $\Delta$ PCS transformierten cDNA Moleküle**

Im Vergleich zu den kürzeren PCS-Homologen NsPCS (alr0975) und BjPCS (bll7663) wurden neben den vollständigen ORFs auch die C-terminal verkürzten Versionen AtPCS1-218tr (AtPCS1-N) und AtPCS2-217tr (AtPCS2-N) von AtPCS1 und AtPCS2 kloniert. Die Wahl der Primer für die Verkürzung der AtPCS Gene orientierte sich am Alignment mit BjPCS, dem kürzeren der beiden prokaryotischen PCS-Homologe. Die Positionen der Aminosäuren der katalytischen Triaden sind farblich markiert (Cystein, rot; Histidin, blau; Aspartat, grün). Auf der Skalierung ist die Anzahl der Aminosäuren abzulesen (AS).

AtPCS1	-----MAMASLYRRSLPSPPAIDFSSAEGKLI FNEALQKGTMEGFFR	42
AtPCS2	-----MSMASLYRRSL-SPPAIDFASFEGKQIFNEALQKGTMEGFFG	41
NsPCS	-MIVMKLFI PVTVIGLCLSSSQVLAQTLTLSPNLIGFNSNEGEKLLLTSRSR---EDFFP	56
BjPCS	MKRWRYSISSTVIAVGLVCAGALVVGQSHVPSDAIASVTRAPELMERAWHLPAATFQ	60
	* * *	
AtPCS1	LISYFQTQSEPAYCGLASLSVVLNALSID-PGRKWKGPWRWFDES-----MLD <u>CCEPLE</u>	95
AtPCS2	LISYFQTQSEPAFCGLASLSMVLNLSID-PGRKWKGPWRWFDES-----MLE <u>CCEPLE</u>	94
NsPCS	LSMQFVITQVNQAYCGVASIIMVLNLSGINAPETAQYSPYRVFTQDNFFSNEKTKAVIAP	116
BjPCS	RHVDWQS--NGSRCGPAAVANAYRSIGEAA RTEGKVLAGTWSCWTG-----	104
	** * *	
AtPCS1	VVKEKGLISFGKVVCLAHCSGAKVEAFRTSQSTIDDFRKFFVVKCTSSENCHMISTYHRGVF	155
AtPCS2	IVKDKGLISFGKVVCLAHSSGAKVEAFRTNQSTIDDFRKYVVKCSTSDNCHMISTYHRQVL	154
NsPCS	VVARQGMTLDELGRLLIASYGVKVKVNHASDTNIEDFRKQVAENLKQDGNFVIVNLYRKEI	176
BjPCS	-VCIMGLTLDELAKVAQTNTSRKVTVLR-DLSENQFLEHLRRANDP-GRRYLVNFDRARI	161
	* * *	
AtPCS1	KQTGTGHFSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRGFML	215
AtPCS2	KQTGTGHFSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWDAMDSIDQSTGRRRGFML	214
NsPCS	GEERGHHISELAAVNEQTDRFLIMVSRVYKYPVWVKTTDLWKAMNTVDSVSQKTRGFV	236
BjPCS	FGAGSCHHSEIGGVFEAEDLVFVLDVN-FNFQVWLVERKRLFDAVNTLDG--DKKRGLLL	218
	** ** * *	
AtPCS1	ISRPHREPGLLYTLSCCKDESWEI LAKYLKEDVPRLVSSQHVDVSEKI IISVVFKSLPSNFN	275
AtPCS2	ISRPHREPGLLYTLSCCKDESWIS LAKYLKEDVPRLVSSQHVDTIERILYVVFKSLPANFN	274
NsPCS	VSKTQD-----	242
BjPCS	IE-----	220
AtPCS1	QFIRWVAEIRITEDSNQNLSAEEKSRCLKLQVLVKEVHETELFKHINKFLSTVGYEDSLT	335
AtPCS2	QFIKWMAEIRRTEDVNQNLSSEEEKSRCLKLQVELLQVQETKLFKHVDKFLSSV-YEDNLP	333
NsPCS	-----	
BjPCS	-----	
AtPCS1	YAAAKACCQGAELLSGSPSKEFCRETCVKCIKGPDDSEGTVV TGVVVRDGNEQKVDLLV	395
AtPCS2	YVAAKVYCDGDEILSGYSEDESCKETCVKCIKGLGEEKVTVV-----	376
NsPCS	-----	
BjPCS	-----	
AtPCS1	PSTQTECECGPEATYPA GNDVFTALLLALPPQTWSGIKDQALMHEMKQLISMASLPTLLQ	455
AtPCS2	-----AYPSGNDVFTALLLALPPQTWSGIKDQSLLOEMKQLISMVSHPTLLQ	423
NsPCS	-----	
BjPCS	-----	
AtPCS1	EEVLHLRRQLQLLKRCQENKEEDDLAAPAY	485
AtPCS2	QEVHLHLRRQLEMLKRCQENKEDEELSAPA-	452
NsPCS	-----	
BjPCS	-----	

**Abb. 3.47: Alignment der Aminosäuresequenzen von AtPCS1, AtPCS2, NsPCS und BjPCS**

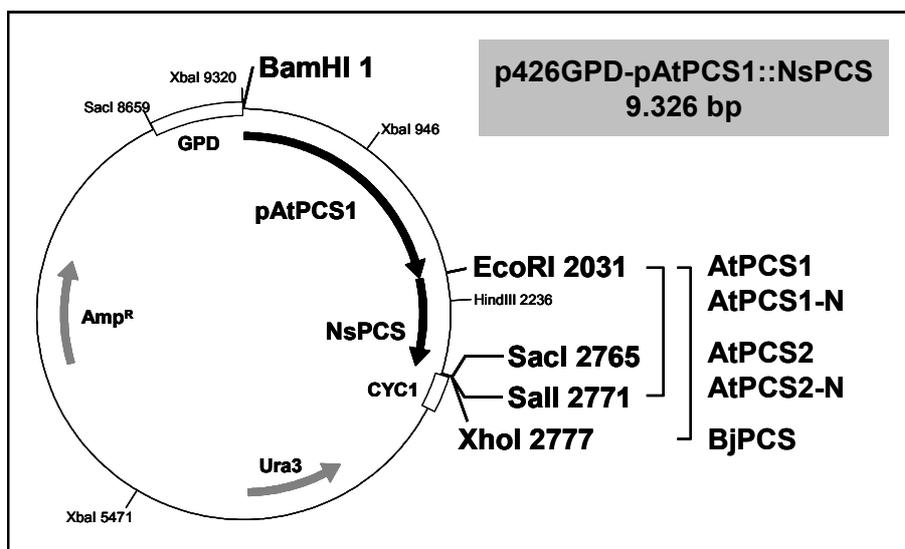
Nicht übereinstimmende Bereiche zwischen AtPCS1 und AtPCS2 sind grau gefärbt, identische AS rot. In allen 4 Proteinen identische AS sind mit einem Stern gekennzeichnet, die katalytische Triade des N-Terminus ist grün hervorgehoben. Cysteinreste in AtPCS1 und AtPCS2 sind fett hervorgehoben und zusätzlich unterstrichen, wenn sie als funktional bedeutsam belegt wurden (Maier *et al.*, 2003; Vestergaard *et al.*, 2008). Das Alignment wurde mit ClustalW2 erstellt (Larkin *et al.*, 2007).

Aus dem Alignment (Abb. 3.47) geht hervor, dass die AS-Sequenzen von AtPCS1 und AtPCS2 zu 78% identisch und zu 87% ähnlich sind. Besonders im N-Terminus gibt es sehr große identische Bereiche (Übereinstimmung etwa 90%). Der C-terminale Bereich dagegen weist größere Unterschiede auf (Übereinstimmung etwa 68%), bei AtPCS2 fehlen hier 30 AS an Position 376 im Vergleich zu AtPCS1. NsPCS bzw. BjPCS sind zu 34% bzw. 19% identisch mit dem N-Terminus von AtPCS1.

Die Aminosäuren der konservierten katalytischen Triade lauten in AtPCS1 (AtPCS2) Cys56 (55), His162 (161) und Asp180 (179). In NsPCS stellen Cys70, His 183 und Asp201 und in BjPCS Cys72, His168 und Asp186 diese Dreiergruppe dar.

### 3.4.1 Vektoren für die Transformation von Arabidopsis

Das Gen für NsPCS wurde mit den Primern NsPCS\_EcoRI\_for (21) und NsPCS\_SalI\_SacI\_rev (25) in den Hefeexpressionsvektor p426GPD (Mumberg *et al.*, 1995) kloniert. In Primer (21) wurde das bakterielle alternative Startcodon GTG in NsPCS gegen das allgemeingültige ATG ausgetauscht. Anschließend wurde unter Verwendung der Schnittstellen für BamHI und EcoRI der 2025 bp endogene Promotor von AtPCS1 vor den ORF von NsPCS kloniert, wobei die Primer AtPCS1\_2kb\_BamHI\_for (48) und AtPCS1\_2kb\_EcoRI\_rev (49) verwendet wurden. Dieses Plasmid diente als Ausgangspunkt für alle weiteren Promotorfusionskonstrukte mit dem endogenen AtPCS1-Promotor (Abb. 3.48).



**Abb. 3.48: Klonierungsvektor p426GPD-pAtPCS1::NsPCS**

Ausgehend von diesem Plasmid wurden die rechts angegebenen cDNA Versionen mit dem endogenen Promotor von AtPCS1 fusioniert und schließlich in den binären Vektor pBI121-Ascl kloniert. NsPCS und AtPCS1-N wurden auch C-terminal mit EGFP fusioniert.

Wie bereits beschrieben (Abb. 3.19), erfolgte dann unter Nutzung der Schnittstellen für *Bam*HI und *Sac*I die Umklonierung in pSK-*Asc*I und anschließend in pBI121-*Asc*I. Für die Fusionierung von NsPCS mit EGFP wurde der *antisense* Primer NsPCS\_*Sal*I\_*Aat*II\_rev (24) verwendet und das Fusionskonstrukt unter Verwendung von *Bam*HI und *Aat*II in den vorhandenen pSK-*Asc*I\_pAtPCS1::AtPCS1:EGFP kloniert und anschließend die Expressionskassette pAtPCS1::NsPCS:EGFP in den binären Vektor pBI121-*Asc*I überführt. Die Fusionierung von AtPCS1-N erfolgte analog mit dem antisense Primer AtPCS1-N\_*Sal*I\_*Aat*II\_rev (32).

### 3.4.2 Generierung von stabil transformierten Arabidopsis-Linien

Im Abschnitt 3.1.5 wurden die Ergebnisse von  $\Delta$ PCS-Transformationslinien vorgestellt, welche die Volllängen-cDNA von AtPCS1 und AtPCS2 unter der Kontrolle des endogenen Promotors von AtPCS1 exprimieren. Die im Folgenden beschriebenen Transformationslinien (Tab. 3.1) wurden parallel mit diesen generiert, auf MS/Kan30-Platten selektiert und bezüglich PC-Synthese, Cd-Toleranz und GS-Biman Abbau charakterisiert. Von jeweils 4 pikierten Pflanzen wurde genomische DNA extrahiert und wie in 3.1.5 beschrieben mittels PCR analysiert, wobei jeweils alle 4 Kandidaten bestätigt wurden. Von jeweils 3 positiv getesteten, unabhängigen Transformationslinien wurden für Versuche die Samen der T2 Generation verwendet.

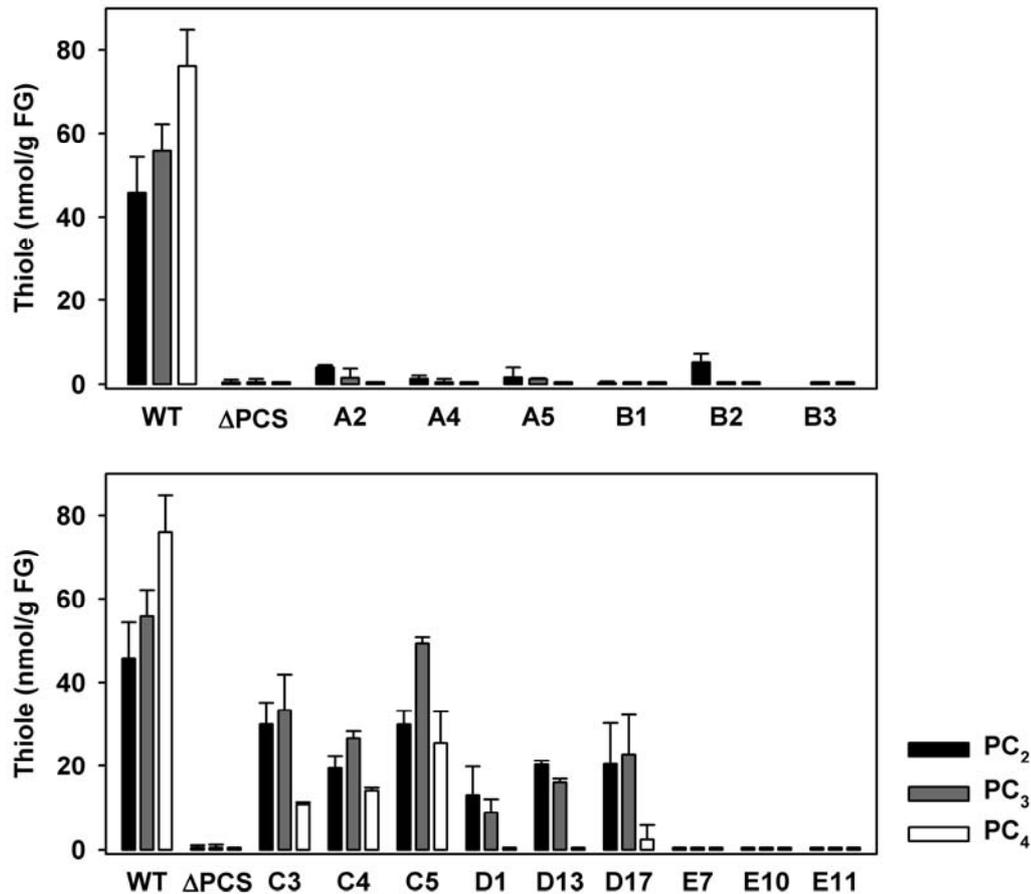
Konstrukt	Code	Putative (T1)	Charakterisiert (T2)
pAtPCS1::NsPCS:EGFP	A	20	A2, A4, A5
pAtPCS1::NsPCS	B	8	B1, B2, B3
pAtPCS1::AtPCS1-N:EGFP	C	9	C3, C4, C5
pAtPCS1::AtPCS1-N	D	20	D1, D13, D17
pAtPCS1::AtPCS2-N	E	7	E7, E10, E11

Tab. 3.1: Bezeichnungen für die isolierten Transformationslinien

#### 3.4.2.1 Charakterisierung von PC-Synthese und Cd-Toleranz

Der Bezug für die Bewertung der Komplementation in den Transformationslinien war zum einen der Transformationshintergrund  $\Delta$ PCS (keine PC-Synthese), zum anderen der Wildtyp, dessen Werte bei  $45,9 \pm 8,5$  nmol PC<sub>2</sub>/g FG,  $55,8 \pm 6,4$  nmol PC<sub>3</sub>/g FG und  $76,1 \pm 8,9$  nmol PC<sub>4</sub>/g FG lagen.

Belastung der Keimlinge, die NsPCS exprimieren sollten, mit Cadmium führte nicht zur Synthese von Phytochelatinen. Für A2 (4 nmol/g FG  $\pm$  0,5) und B2 (5,2 nmol/g FG  $\pm$  2,0) erschienen minimale Peaksignale bei der entsprechenden Retentionszeit für PC<sub>2</sub>. Dies würde etwa 10% des Wildtypwertes entsprechen, müsste jedoch mit n>2 und unter Einbezug von MS-Analysen bestätigt werden.



**Abb. 3.49: PC-Synthese in den ΔPCS-Transformationslinien**

Samen der T2 Generation der Transformationslinien (Konstrukte mit endogenem Promotor von AtPCS1) wurden nach fünf Tagen Wachstum in B5-Medium für 48h mit 50  $\mu$ M Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> belastet und dann für die PC-Analyse extrahiert. NsPCS:EGFP (A), NsPCS (B), AtPCS1-N:EGFP (C), AtPCS1-N (D), AtPCS2-N (E). Gezeigt sind Werte (n = 2-7) mit SD.

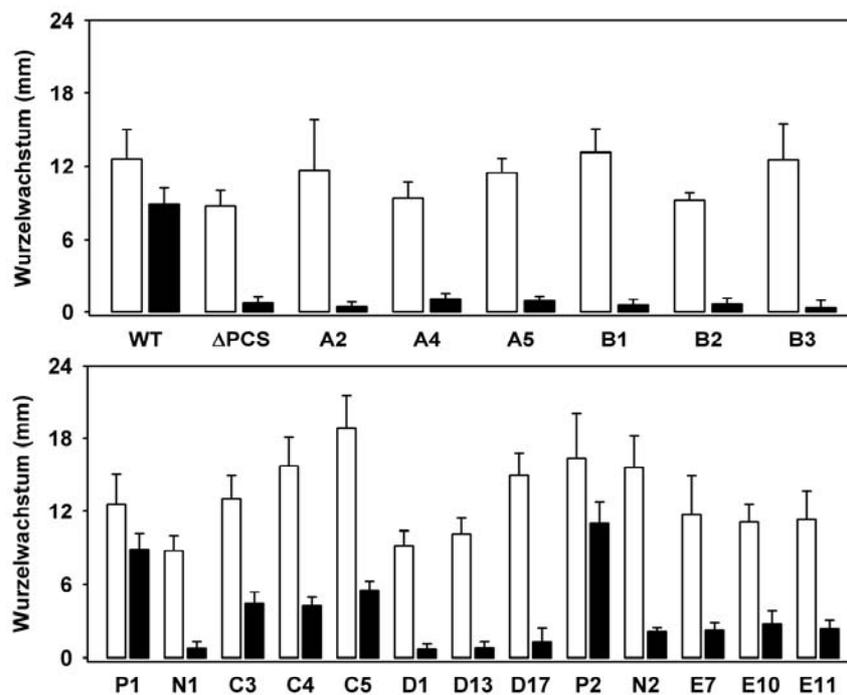
Transformanten der Linien C3, C4 und C5 mit AtPCS1-N:EGFP wiesen deutliche Mengen an PCs auf. Im Vergleich mit den Werten des Wildtyps wurden 42-65% erreicht für PC<sub>2</sub>, 48-88% für PC<sub>3</sub> und 14-34% für PC<sub>4</sub>.

Die Linien D1, D13 und D17 mit AtPCS1-N ohne EGFP zeigten im Vergleich zu C insgesamt schlechtere Komplementation von ΔPCS. Sie erreichten 28 bzw. 44% (PC<sub>2</sub>) und 16 bzw. 29 bzw. 41% (PC<sub>3</sub>) der Werte des Wildtyps, wobei die Werte der Linie D17

starke Schwankungen aufweisen. PC<sub>4</sub> konnte hingegen in keiner der Linien detektiert werden. Die Linien, die mit dem N-Terminus von AtPCS2 transformiert worden waren, synthetisierten keine Phytochelatine.

Die Ergebnisse aus den Wurzelwachstumstests zur Untersuchung der Cd-Toleranz stimmen weitgehend mit den Erwartungen überein, die man aus den PC-Analysen ableiten kann. Die Linien A und B mit dem eingeschleusten NsPCS-Gen können ohne Phytochelatine nicht auf Agar mit Cd wachsen.

Die Linien C3, C4 und C5 mit der höchsten PC-Synthese zeigten auch das beste Wurzelwachstum auf Cd-Platten; sie erreichten 34 bzw. 27 bzw. 29% des Wertes des Wildtyps (Negativkontrolle ΔPCS: 8,5% des WT). Bezogen auf die Linien mit Volllänge-cDNA sind es 45%.



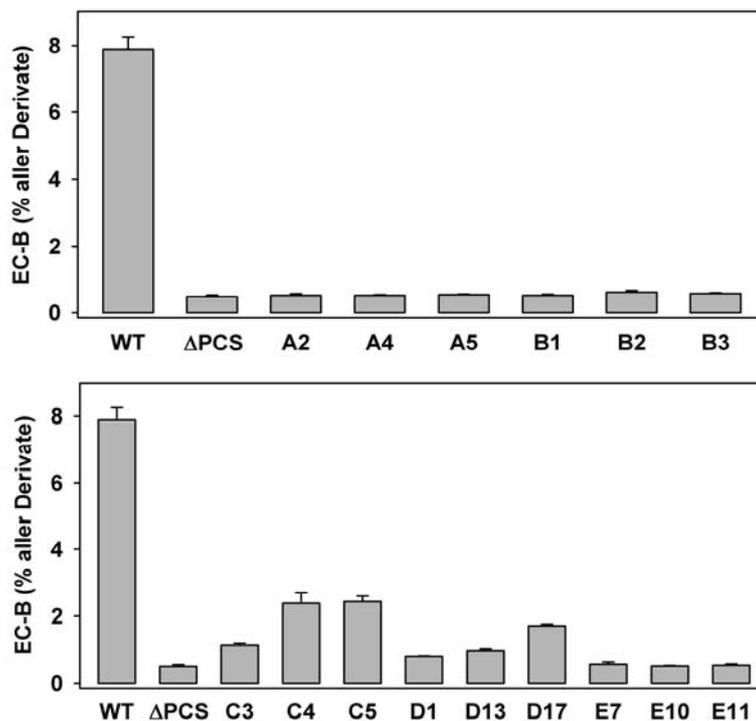
**Abb. 3.50: Cd-Toleranz der ΔPCS-Transformationslinien**

Vier Tage alte Keimlinge (T2) der Transformationslinien A bis E wurden von MS-Anzuchtplatten auf MS/50% Sucrose-Platten mit 0 (weiße Balken) oder 100 μM Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (schwarze Balken) transferiert und nach 72h das Wurzelwachstum gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte von jeweils 14 Keimlingen mit SD. Als Positivkontrolle diente der Wildtyp (P1; P2 für E) und als Negativkontrolle ΔPCS (N1; N2 für E). Die Bezeichnung der Transformationslinien entspricht der von Abb. 3.49.

Im Gegensatz dazu konnten die Linien der Gruppe D (AtPCS1-N ohne EGFP) trotz detektierbarer Mengen an PC<sub>2</sub> und PC<sub>3</sub> auf den Agarplatten mit Cd nicht besser wachsen als ΔPCS.

### 3.4.2.2 Charakterisierung des GS-Biman Abbaus

Komplementation bezüglich der Glycinabspaltung von GS-Biman war ebenfalls nicht in allen Transformationslinien zu beobachten. Der Wildtyp zeigte als Positivkontrolle in dieser Versuchsreihe einen EC-Biman Anteil von  $7,9 \pm 0,4$  nmol/g FG,  $\Delta$ PCS lediglich  $0,5 \pm 0,1$  nmol/g FG. Die Summe der Bimanderivate betrug im Mittel  $91,0$  nmol/g FG  $\pm 19,6\%$  und es wurden in jeder Probe (30 Keimlinge) durchschnittlich  $1,7$  nmol  $\pm 21,5\%$  detektiert.



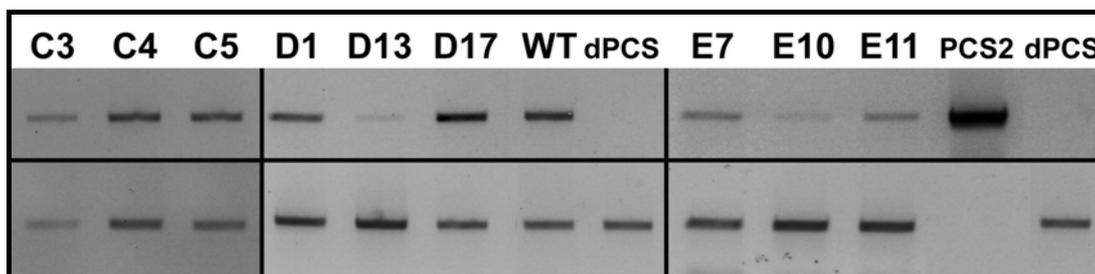
**Abb. 3.51: Metabolisierung von GS-Biman in den  $\Delta$ PCS-Transformationslinien**

Jeweils 30 Keimlinge der T2-Generation der Transformationslinien wurden in 5 ml B5-Medium mit  $10 \mu\text{M Cd}(\text{NO}_3)_2$  und  $5 \mu\text{M MCB}$  infiltriert und nachfolgend für 4h auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das Keimlingsmaterial für die Analyse der Biman-Konjugate extrahiert. Die Bezeichnung der Transformationslinien entspricht der von Abb. 3.49.

Die das cyanobakterielle NsPCS-Protein enthaltenden Linien zeigten keinen Unterschied gegenüber  $\Delta$ PCS bezüglich des GS-Biman Abbaus. Die Linien C4 und C5 (AtPCS1-N:EGFP), welche schon in PC-Synthese und Cd-Toleranz den größten Grad an Komplementation zeigten, wiesen auch in dieser Versuchsreihe mit  $2,4\% \pm 0,2$  die größten Anteile an EC-Biman auf, jedoch entspricht dies nur rund einem Drittel des Wildtypwertes. Die Linien D1, D13 und D17 (AtPCS1-N ohne EGFP) hatten gegenüber der Negativkontrolle nur minimal höhere EC-Biman Anteile, wobei Linie D17 22% des Wildtypwertes erreichte ( $1,7\%$  EC-Biman  $\pm 0,1$ ). Die Linien mit dem N-Terminus von AtPCS2 schließlich zeigten keine erkennbare Aktivität bezüglich des GS-Biman Abbaus.

### 3.4.2.3 Molekularbiologische Analyse

Für die Beurteilung der fehlenden Komplementation in den mit NsPCS bzw. AtPCS2-N (E) transformierten Linien wurde mittels RT-PCR untersucht, ob die ins Genom integrierten Gene transkribiert werden. Zum Vergleich wurden gleichzeitig auch die Linien mit C-terminal verkürzter AtPCS1 (mit und ohne EGFP, C und D) getestet (Abb. 3.52).

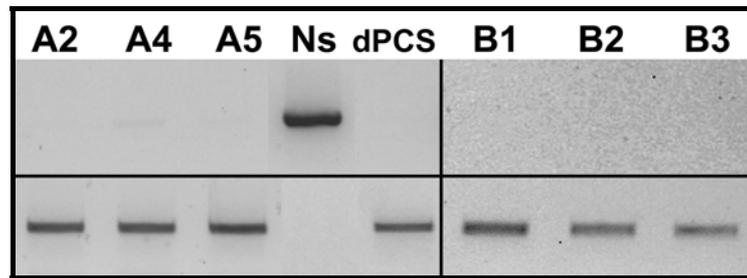


**Abb. 3.52: RT-PCR Analyse der mit verkürzten PCS-Versionen transformierten Linien**

Aus Keimlingen der transformierten Linien (100 mg FG) wurde Gesamt-RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Mit genspezifischen Primern wurden Bereiche der jeweiligen Transkripte amplifiziert (obere Banden), als Referenz dienten Primer für Aktin (untere Banden).  $\Delta$ PCS (dPCS) stellt die Negativkontrolle dar (Transformationshintergrund). Positivkontrolle war für die Linien C (AtPCS1-N:EGFP) und D (AtPCS1-N) cDNA aus dem Wildtyp (WT) und für die Linien E (AtPCS2-N) der Klonierungsvektor pSK mit der cDNA von AtPCS2 (PCS2).

Entsprechend der Daten aus den Komplementationsversuchen konnten in den Linien C und D spezifische Transkript-Banden amplifiziert werden.  $\Delta$ PCS diente als Negativkontrolle (Transformationshintergrund) und der Wildtyp als Positivkontrolle. Gleichzeitig war es jedoch nicht möglich, das AtPCS1-N:EGFP Fusionsprotein mit dem anti-GFP Antikörper zu detektieren. Auch bei Betrachtung der Linien unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte kein GFP-Signal festgestellt werden, dass sich vom Hintergrund in  $\Delta$ PCS unterschied. In den Linien, die mit C-terminal verkürzter AtPCS2 (pAtPCS1::AtPCS2-N, E) transformiert wurden, konnten ebenfalls für das Transkript spezifische Banden erzeugt werden, allerdings waren diese bei gleicher Zyklenzahl stets schwächer als die entsprechenden für AtPCS1.

In den mit pAtPCS1::NsPCS (mit bzw. ohne EGFP-Fusion, A bzw. B) transformierten Linien konnte außer einer sehr schwachen Bande in Linie A4 kein transkriptspezifisches PCR-Produkt amplifiziert werden, gleichzeitig wurde aber eine Bande in der Positivkontrolle (pSK-NsPCS) erhalten und damit die korrekte Zusammensetzung der PCR-Ansätze bestätigt (Abb. 3.53). Auch war es nicht möglich, in Western Blot Analysen mit anti-GFP das NsPCS:EGFP Fusionsprotein zu detektieren (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.53: RT-PCR Analyse der mit NsPCS transformierten Linien**

Aus 100 mg Keimlingsmaterial der mit NsPCS:EGFP (A) und NsPCS (B) transformierten Linien wurde RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Die anschließende PCR wurde mit den Klonierungsprimern für NsPCS durchgeführt (obere Banden), als Referenz dienten Primer für Aktin (untere Banden).  $\Delta$ PCS (dPCS) diente als Negativkontrolle, der Klonierungsvektor pSK-Ascl-NsPCS (Ns) als Positivkontrolle.

## 4. DISKUSSION

Pflanzen haben global betrachtet sowohl ökologisch als auch ökonomisch eine immense Bedeutung. Das Auftreten von Photosynthese betreibenden Organismen schuf die Grundlage für unsere heutige Atmosphäre mit einem Anteil von 21 Vol% Sauerstoff (Munk, 2000). Schlüsselreaktion für den photoautotrophen pflanzlichen Stoffwechsel ist die Fixierung von  $\text{CO}_2$  durch die Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO), das zu den Proteinen mit der mengenmäßig größten Verbreitung gehört (Richter, 1996) oder sogar das häufigste Protein der Erde ist (Heldt, 1999). Die durch den assimilatorischen Stoffwechsel photoautotropher Organismen aufgebaute Biomasse ermöglichte die Entstehung der wirtschaftlich intensiv ausgebeuteten fossilen Brennstofflagerstätten und ist die Lebensgrundlage aller heterotrophen Organismen. Die pflanzliche Agrarproduktion bildet die Basis der menschlichen Ernährung, sei es primär in Form von Getreideprodukten und Feldfrüchten aller Art oder sekundär in Form von Erzeugnissen aus der Tiermast. Darüber hinaus liefern Pflanzen wichtige Rohstoffe, als Beispiele seien Baumwolle, Holz, Stärke und Naturkautschuk genannt, sowie Ausgangsstoffe für die Erzeugung von pharmazeutischen Produkten (Heldt, 1999).

Seit die Menschen bestimmte Pflanzen für ihre Ernährung oder zu anderweitiger Verwendung anbauen, besteht die Notwendigkeit, solche Nutzpflanzenkulturen vor mikrobiellem, pilzlichem oder tierischem Befall zu schützen und Konkurrenz mit Unkräutern zu vermeiden (Hock *et al.*, 1995). Die anhaltende Zunahme der Weltbevölkerung erfordert Maßnahmen zur Vermeidung von Ernteverlusten, die einem drohenden Nahrungsmangel entgegenwirken (Tanksley and McCouch, 1997). Dies verdeutlicht ein beispielhafter Vergleich der Ertragsverluste bei wichtigen Nahrungspflanzen in Deutschland und Indien (Heitefuss, 2000). Die durchschnittliche Verlustrate zweier Vergleichszeiträume, der Jahre 1964-1966 und 1991-1993, beträgt in Deutschland bei Weizen, Gerste und Mais konstant rund 16%, obwohl nahezu eine Verdoppelung der Erträge erzielt wurde. Die „grüne Revolution“ in Indien brachte zwar erhebliche Ertragssteigerungen, aber mangelnder Pflanzenschutz ließ auch die Verlustraten ansteigen (Heitefuss, 2000). Die entsprechenden Werte für Indien (1991-1993) liegen bei rund 40% für Weizen und Gerste, 53% für Mais und 60% für Reis (Oerke *et al.*, 1994). Große wirtschaftliche Bedeutung hat daher die Verringerung von Ernteverlusten durch gentechnisch erzeugten Schutz gegen Pathogen- oder Schädlingsbefall und der Einsatz von umweltverträglichen Herbiziden (Heldt, 1999).

Atrazin, ein Vertreter der Chlortriazine, ist eines der meistverwendeten und besterforschten Herbizide (IARC, 1991). Seit langem ist bekannt, dass es in pflanzlichen

Zellen durch Konjugation an GSH und Transport in die Vakuole entgiftet wird und einem umfassenden Metabolismus unterliegt (Lamoureux *et al.*, 1970; Lamoureux *et al.*, 1973; Lamoureux *et al.*, 1998). Auch andere wichtige Herbizide aus den Klassen der Chloracetamide, Nitrophenylether oder Auxinanaloga (Abb. 1.7, S. 13) werden in der Pflanze als GS-Konjugate abgebaut (Hock *et al.*, 1995).

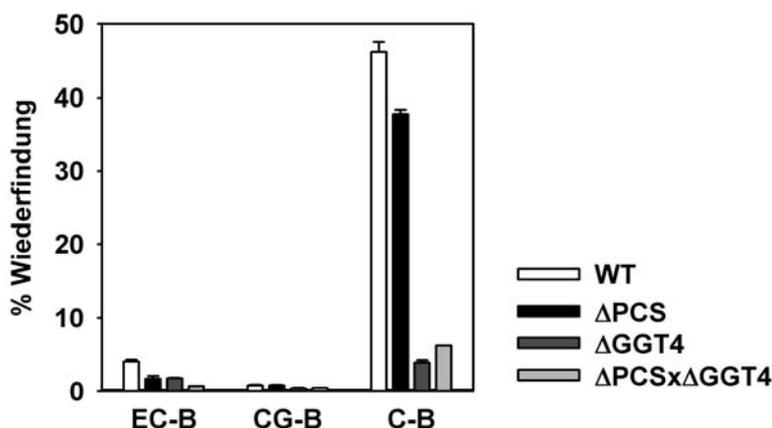
#### 4.1 Metabolismus von GS-Konjugaten in Pflanzen

Vor allem bei Nachauflaufanwendung gelangen Herbizide auch in Nutzpflanzen, die eigentlich nicht Zielobjekte der gegen Unkräuter gerichteten Wirkstoffe sind (Hock *et al.*, 1995). Meist werden Herbizide in der Pflanze nicht vollständig abgebaut, sondern zu einem gewissen Teil als gebundene (nicht extrahierbare) Rückstände gespeichert (Langebartels and Harms, 1985), so dass sie in die Nahrungskette bzw. in landwirtschaftliche Produkte gelangen. Ein effizienter Abbau von Xenobiotika in Nutzpflanzen ist deshalb erwünscht (Hock *et al.*, 1995) und in diesem Zusammenhang die Aufklärung des GS-Konjugat-Metabolismus in Pflanzen (Abb. 4.2) von Interesse.

Im tierischen Stoffwechsel beginnt der Abbau von GS-Konjugaten mit der Abspaltung des Glutamats von GSH (Meister, 1995), die auch aus Pflanzen bekannt ist (Grzam *et al.*, 2007; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b). Zusätzlich wird jedoch im pflanzlichen Stoffwechsel auch der alternative Weg besprochen, GS-Konjugate vom C-Terminus her durch die Abspaltung des Glycins abzubauen (Lamoureux and Rusness, 1986; 1993; Riechers *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 1996; Blum *et al.*, 2007; Brazier-Hicks *et al.*, 2008). AtPCS1 setzt *in vitro* GS-Konjugate mit sterisch hinderlichen Resten effizient in die entsprechenden EC-Konjugate um (Beck *et al.*, 2003). In dieser Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass AtPCS1 diese Aktivität auch *in planta* besitzt und dass das Enzym cytosolisch lokalisiert ist. Damit wird ein neuer pflanzlicher Abbauweg für GS-Konjugate im Cytoplasma beschrieben.

Die Markierung von Thiolen durch Biman ist eine weit verbreitete Methode zum Zweck der weiterführenden qualitativen und quantitativen Analyse (Fahey *et al.*, 1980) und bei Verwendung von MCB *in vivo* beschränkt sich die Markierung auf GSH, da wegen der geringen spontanen Reaktivität von MCB spezifisch GSH durch die Aktivität von GSTs markiert wird (Coleman *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2001). Um eine möglicherweise vorhandene spontane Markierung von Thiolen durch MCB abzuschätzen, wurden Zellkulturen in einem neutralen Tris-Puffer durch Aufkochen (5 min) abgetötet und zusammen mit intakten Zellen entsprechend den Versuchsbedingungen 1 min mit 5 µM

MCB markiert und anschließend mittels HPLC analysiert. In den abgetöteten Zellen wurde ausschließlich GS-Biman detektiert, dessen Menge lediglich 1% von der in intakten Zellen betrug. Somit wird durch Belastung von Zellen oder Keimlingen mit MCB GST-abhängig GS-Biman gebildet (Coleman *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2001), dessen Metabolisierung anschließend durch HPLC-Analyse der gebildeten Metabolite verfolgt werden kann (Coleman *et al.*, 1997; Grzam *et al.*, 2006).



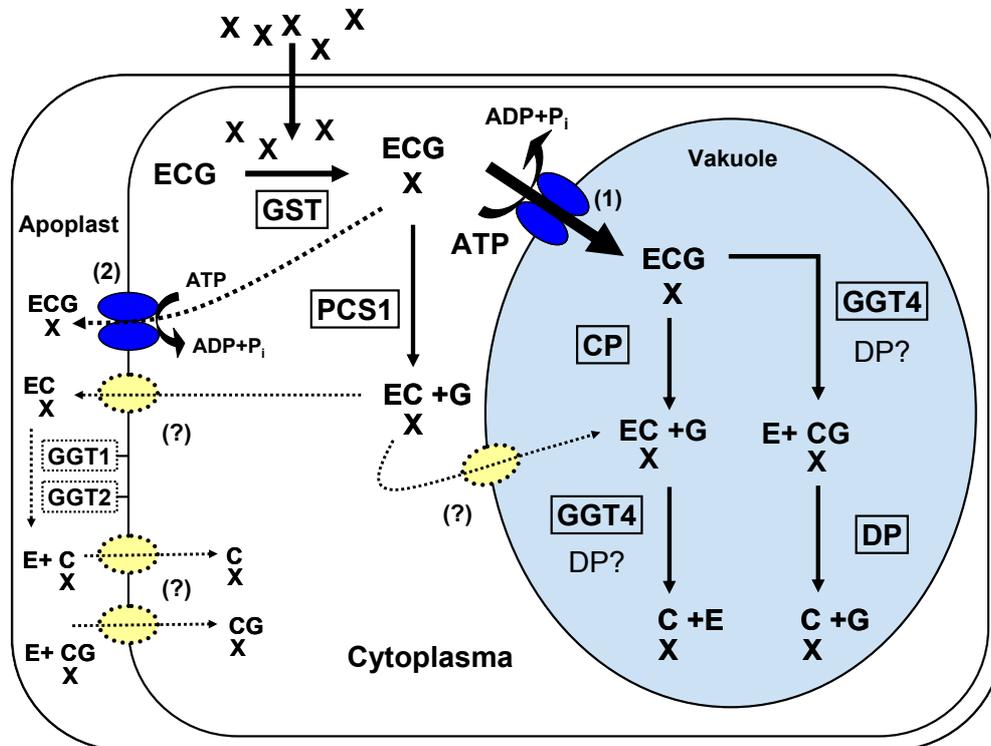
**Abb. 4.1: Wiederfindungsrate in mit MCB infiltrierten Keimlingen**

Die Wiederfindungsrate in Keimlingen, die mit 5 µM MCB infiltriert wurden, betrug nach 44h 80 ± 9%. Im Diagramm sind die Anteile von EC-, CG-, und C-Biman an diesen 80% gezeigt; die fehlende Differenz entspricht dem Anteil für GS-Biman.

In MCB-Belastungsversuchen mit Keimlingen betrug die Wiederfindungsrate 44h nach der Infiltration 80 ± 9% (Abb. 4.1). In Pflanzen werden Cystein-Konjugate u.a. zu N-Malonyl-Cystein-, N-Acetyl-Cystein-, thiolactyl-, thiol- und methylthio-Konjugaten metabolisiert (Rennenberg and Lamoureux, 1990). Es ist anzunehmen, dass der fehlende Anteil an Biman-Derivaten in Höhe von etwa 20% in Form solcher Metabolite vorlag, die nicht mehr in der HPLC-Analyse erfasst wurden. Allerdings werden zu den verschiedenen Zeitpunkten unabhängige Ansätze verglichen und die Markierung von GSH mit Biman zeigte, wie im Ergebnisteil angegeben, Schwankungen von bis zu 20%. Der Großteil (80%) der zu Beginn (t = 0) vorliegenden Biman-Derivate jedoch wird bis 44h nach Infiltration in den HPLC-Analysen detektiert und somit spiegeln die in den Zeitreihen ermittelten Werte den Umsatz von GS-Biman zu C-Biman wider.

Bei der Analyse des GS-Konjugat Metabolismus wird ein stets im Fluss befindliches System mit aufeinanderfolgenden Reaktionen in unterschiedlichen Kompartimenten betrachtet (Abb. 4.2). Durch den effizienten Transport von GS-Konjugaten in die Vakuole (Kreuz *et al.*, 1996), den nach bisherigen Erkenntnissen die *multidrug resistance associated proteins* (MRPs) AtMRP1 (Lu *et al.*, 1997), AtMRP2 (Lu *et al.*, 1998; Liu *et al.*,

2001) und möglicherweise AtMRP3 (Tommasini *et al.*, 1998; Rea, 2007) vermitteln, werden die Konjugate hauptsächlich den Stoffwechselwegen über AtGGT4 (Grzam *et al.*, 2007; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b) und vakuoläre Carboxypeptidasen (Wolf *et al.*, 1996) zugeführt (Abb. 4.2).



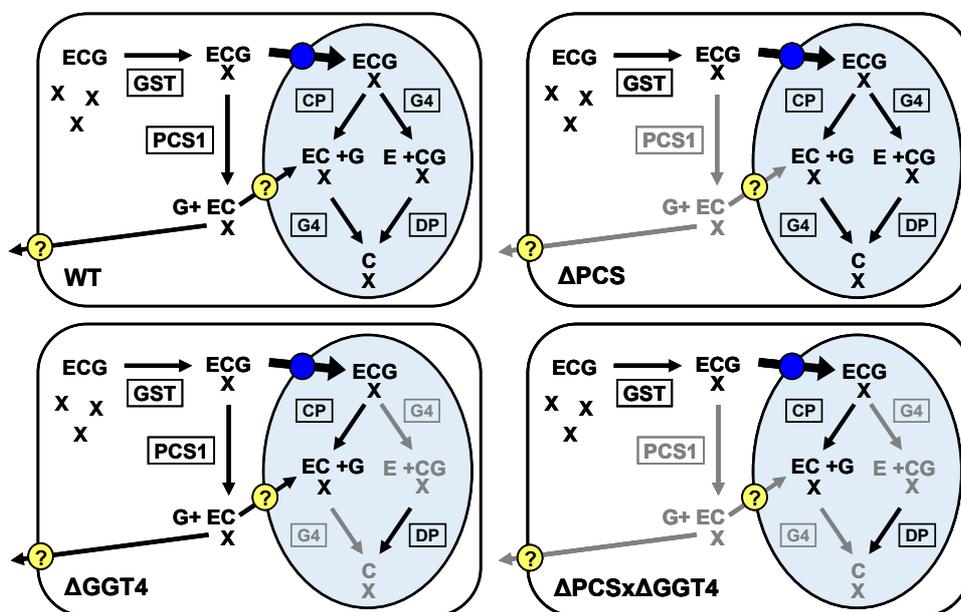
**Abb. 4.2: Stoffwechsel- und Transportwege im GS-Biman Metabolismus**

Schematisierte Pflanzenzelle mit bekannten und hypothetischen Wegen im GS-Biman Metabolismus. Bekannte Pfade sind mit durchgehenden Pfeilen gekennzeichnet. Postulierte oder noch nicht eindeutig gezeigte Zusammenhänge sind durch dünne, unterbrochene Pfeile und Linien dargestellt. Der Abbau des Glutathion in GS-Konjugaten kann in Pflanzen sowohl am N-Terminus als auch am C-Terminus beginnen. Während über die Beteiligung der genannten Enzyme oder Enzymklassen an sich kein Zweifel besteht, ist die genaue zelluläre Lokalisation der katalysierten Reaktionen noch nicht vollständig geklärt. Da immer ein im Metabolitfluss befindliches System untersucht wird, ist es schwer, die Beiträge einzelner Komponenten exakt zu definieren.

E, Glutamat; C, Cystein; G, Glycin; X, elektrophiles Molekül; GST, Glutathion S-Transferase; PCS1, Phytochelatinsynthase 1 aus Arabidopsis; GGT,  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase; CP, Carboxypeptidase; DP, Dipeptidase; (1) GS-Konjugat-Transporter des Tonoplasten (AtMRP1, AtMRP2); (2) GS-Konjugat-Transporter der Zellmembran (AtMRP4, AtMRP5); (?) die durch unterbrochene Linien angedeuteten Transporter in gelb sind hypothetische Dipeptid- und Cystein-Konjugat-Transporter in Plasmamembran und Tonoplast. Weitere Erklärungen und Referenzen im Text.

In MCB-Belastungsversuchen mit Keimlingen zeigte sich kein Unterschied zwischen WT und PCS-defizienten Linien im Gesamtumsatz von GS-Biman zu C-Biman. Bezüglich des Zwischenproduktes EC-Biman war jedoch 4h nach Infiltration von Keimlingen mit MCB ein deutlicher Unterschied zwischen WT bzw.  $\Delta$ PCS2 und den AtPCS1-defizienten Mutanten zu beobachten. Die Linien ohne funktionale AtPCS1 wiesen nur ein Sechstel (0,5%) der

EC-B Menge von WT bzw.  $\Delta$ PCS2 (3%) auf. Beide möglichen Intermediate, EC- und CG-Biman, waren in allen getesteten Systemen, d.h. in Keimlingen, Zellkulturen und Protoplasten, stets zu detektieren. Dagegen beschreiben Grzam *et al.* (2006) zwar einen kompletten Abbau von GS-Biman zu C-Biman in Arabidopsis-Blattstückchen, konnten aber die Intermediate jeweils nur in Spuren nachweisen und stellten deshalb auch keinen Unterschied zwischen WT und AtPCS1-defizienten Linien fest. Ohkama-Ohtsu *et al.* (2007b) wiederum konnten ebenfalls beide Intermediate detektieren; aufgrund der Wahl von MBB zur Markierung von GSH in diesen Studien wird allerdings die Diskussion der Ergebnisse erschwert, da nicht sicher ist, welcher Anteil der Biman-Derivate durch spontane Reaktion des MBB mit Thiolgruppen entstand. Dieses Problem hätte durch die Verwendung von MCB vermieden werden können.



**Abb. 4.3: Kompartimentierung des GS-Biman Abbaus**

In den schematisierten Zellen von Wildtyp (WT) und den drei Insertionslinien  $\Delta$ PCS,  $\Delta$ GGT4 und  $\Delta$ PCSx $\Delta$ GGT4 sind die bisher bekannten intrazellulären Abbauewege für GS-Konjugate dargestellt. Durch Gendisruption ausgeschaltete Wege sind durch graue Färbung symbolisiert. Im Gegensatz zu GS-Konjugat-Transportern (blau) wurden Transportmoleküle für EC-Konjugate (gelb mit Fragezeichen) bisher noch nicht beschrieben. Das hellblau eingefärbte Kompartiment stellt die Vakuole dar.

C, Cystein; G, Glycin, E, Glutamat; X, elektrophiles Molekül; GST, Glutathion S-Transferase; PCS1, Phytochelatinsynthase 1 aus Arabidopsis; CP, Carboxypeptidase; DP, Dipeptidase; G4,  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase 4 aus Arabidopsis.

Der fehlende Unterschied im Umsatz von GS-Biman zu C-Biman zwischen WT bzw.  $\Delta$ PCS2 und AtPCS1-defizienten Linien könnte darin begründet sein, dass der von AtPCS1 vermittelte Abbauschritt im Cytoplasma bei Fehlen dieses Enzyms durch einen vermehrten Transport von GS-Konjugaten in die Vakuole durch AtGGT4 (Ohkama-Ohtsu

*et al.*, 2007b) oder durch erhöhten Transport in den Apoplasten durch AtGGT1 oder AtGGT2 (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007a) kompensiert wird (Abb. 4.3).

Die Ergebnisse vergleichender Analysen von WT,  $\Delta$ PCS und AtGGT4-defizienten Linien ergaben ein anderes Bild und bestätigten die Befunde von Grzam *et al.* (2007) und Ohkama-Ohtsu *et al.* (2007b): In  $\Delta$ GGT4 und  $\Delta$ PCS $\times$  $\Delta$ GGT4 war der Umsatz von GS-Biman zu C-Biman zu 95% inhibiert. Der Vergleich dieser beiden Linien macht nun auch eine Aussage über den Beitrag von AtPCS1 oder Carboxypeptidasen zur Bildung von EC-Biman in Arabidopsis möglich. In  $\Delta$ GGT4 fehlt die vakuoläre GGT-Aktivität zur Spaltung der  $\gamma$ -Peptidbindung zwischen Glutamat und Cystein. Trotzdem waren in  $\Delta$ GGT4 die Anteile von EC-B gegenüber dem WT nicht erhöht (nach 44h in beiden Linien 5%). In der Dreifachmutante hingegen waren die Werte für EC-B gegenüber WT und  $\Delta$ GGT4 um den Faktor fünf erniedrigt und entsprachen den Werten, die in  $\Delta$ PCS beobachtet wurden (1% EC-B nach 4h). Obwohl also der AtGGT4-vermittelte Schritt in der Vakuole ausgeschaltet wurde, bildeten die vakuolären Carboxypeptidasen nicht vermehrt EC-Biman, das wegen der fehlenden Funktion von AtGGT4 akkumulieren müsste (Abb. 4.3). Auch Ohkama-Ohtsu *et al.* (2007b) beschreiben diese Beobachtung in ihren Versuchen. Eine Erklärung könnte sein, dass unter den Versuchsbedingungen der Hauptanteil des detektierten EC-Biman auf die Aktivität von AtPCS1 zurückzuführen ist. Desweiteren ist zu beachten, dass die Versuche zur Aktivität von vakuolären Carboxypeptidasen (Wolf *et al.*, 1996) mit Gerste (*Hordeum vulgare*) durchgeführt wurden. Es könnte sich also um einen Unterschied in der Aktivität von vakuolären Carboxypeptidasen handeln, der zwischen verschiedenen Pflanzenarten oder möglicherweise Monokotylen und Dikotylen besteht. Deshalb sollten Befunde hinsichtlich des Xenobiotikametabolismus in unterschiedlichen Spezies oder systematischen Gruppen nur mit Vorsicht verallgemeinert werden. Beispielsweise bewirken Herbizidsafener (s. 4.3) in monokotylen Pflanzen eine Aktivierung von GSTs, Monooxygenasen und GS-Konjugat-Transportern, während dieser Effekt in dikotylen Pflanzen nicht auftritt.

Während die Ausschaltung von AtPCS1 allein zu keiner Veränderung gegenüber dem WT im Gesamtumsatz von GS-Biman zu C-Biman führte, hatte die funktionale Inaktivierung von AtGGT4 eine Blockierung des GS-Biman Abbaus zu rund 95% zur Folge. Die Veränderungen der Stoffwechselwege in den untersuchten Insertionslinien sind in Abb. 4.3 dargestellt. Es ist zu bedenken, dass die fehlende Aktivität von AtGGT4 zwei Stellen im Metabolismus von GS-Konjugaten betrifft: erstens die Abspaltung des Glutamats von GSH und zweitens die Spaltung des Dipeptids  $\gamma$ -Glu-Cys (EC). Dabei lässt sich nicht mit

letzter Sicherheit sagen, ob auch der fehlende Abbau von cytosolischem EC-Biman zur Blockierung des gesamten Umsatzes von GS-Biman zu C-Biman beiträgt, denn das Dipeptid-Konjugat muss für eine Metabolisierung in Kompartimente mit GGT-Aktivität transportiert werden (Abb. 4.3). Dies sind entweder die Vakuole (AtGGT4) oder der Apoplast (AtGGT1 und AtGGT2) (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007a; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b). Im Gegensatz zu Transportern für GS-Konjugate (Rea, 2007) wurden bisher jedoch noch keine Transporter für Dipeptid-Konjugate beschrieben. In Versuchen mit isolierten Vakuolen aus Gerste (*Hordeum vulgare*) konnte kein primär aktiver Transport von EC-Biman in die Vakuolen festgestellt werden (Diplomarbeit L. Zauner, 2004). Außerdem beobachteten Grzam *et al.* (2006), dass bei Infiltration von Blattstückchen mit MCB und CdCl<sub>2</sub> oder CuCl<sub>2</sub> aufgrund der Aktivierung von AtPCS1 rund acht Mal mehr EC-Biman gebildet wurde. Die Betrachtung der Blattstückchen unter dem Mikroskop ergab, dass im Gegensatz zu den Ansätzen ohne Metallionen ein Teil des Fluoreszenzsignals im Cytoplasma lokalisiert war (Grzam *et al.*, 2006). Eine Störung des Tonoplastentransports durch die Anwesenheit der Metallionen kann ausgeschlossen werden, da die Inkubation einer AtPCS1-defizienten Linie mit Metallionen und MCB die vakuoläre Lokalisation des gesamten Fluoreszenzsignals nicht veränderte (Grzam *et al.*, 2006). Auch in eigenen Versuchen wurde ein verstärkter AtPCS1-vermittelter Abbau von GS-Biman zu EC-Biman durch die Anwesenheit von Cd beobachtet. Dabei ließ sich feststellen, dass der Anteil des vermehrt umgesetzten GS-Biman (rund 6%) genau dem Anteil des zusätzlich detektierten EC-Biman (ebenfalls 6%) entsprach, während die Werte für C-Biman unverändert blieben. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass im Cytoplasma gebildetes EC-Biman tatsächlich nicht aus diesem Kompartiment transportiert wird oder nur sehr langsam, so dass dies in den Zeiträumen der durchgeführten Versuche nicht beobachtet wurde. Folglich wird das EC-Biman, das im Cytoplasma durch die Aktivität von AtPCS1 entsteht, möglicherweise nicht in die Vakuole transportiert. Das bedeutet, dass die funktionale Inaktivierung von *AtGGT4* an dieser Stelle keine zusätzliche Blockierung des GS-Konjugat-Metabolismus im Vergleich zur Situation im WT darstellt. Demnach lässt sich die 95%ige Hemmung des Abbaus von GS-Biman mit der Inaktivierung von *AtGGT4* und damit der Glutamat-Abspaltung begründen. Allerdings müsste das von vakuolären Carboxypeptidasen gebildete EC-Biman akkumulieren, da es nicht von AtGGT4 gespalten werden kann. In den Versuchen mit der Dreifachmutante  $\Delta PCSx\Delta GGT4$  konnte jedoch keine Akkumulierung von EC-Biman beobachtet werden. Möglicherweise ist dies in einer schwachen Aktivität der vakuolären Carboxypeptidasen in *Arabidopsis* begründet (s.o.). In den von Ohkama-Ohtsu *et al.* (2007b) vorgestellten Versuchen mit AtGGT4-defizienten Pflanzen wurde ebenfalls eine annähernd vollständige



In den getesteten *AtGGT4*-knockout-Linien ist zwar der Abbau von GS-Konjugaten in der Vakuole, wahrscheinlich aber nicht der Transport von GS-Biman aus dem Cytoplasma in die Vakuole blockiert. Die Bedeutung dieser sehr effizienten Sequestrierung (Kreuz *et al.*, 1996) für den Umsatz von GS-Biman und speziell für den von AtPCS1 vermittelten Abbau zu EC-Biman wurde in Versuchen mit Azid ( $\text{NaN}_3$ ) untersucht. Die Verwendung von Azid bietet die Möglichkeit, den Transport über die Vakuolenmembran indirekt durch Hemmung der Cytochrom c Oxidase der mitochondrialen Atmungskette (Yonetani and Ray, 1965; Weiler and Nover, 2008) und zusätzlich direkt durch Hemmung der F-ATPase-Aktivität von ABC-Transportern (Jha *et al.*, 2003; Bowler *et al.*, 2006) zu inhibieren (Abb. 4.4). Die Protonenpumpen des Tonoplasten sind V-ATPasen und werden durch Azid nicht direkt gehemmt (Vasilyeva and Forgac, 1998; Hirata *et al.*, 2003), sind aber von der Verringerung des cytoplasmatischen ATP-Pools betroffen. Die Applikation von Azid sollte somit zu einer Anreicherung von GS-Biman im Cytoplasma führen. Das Enzym AtPCS1, von dem nun eindeutig gezeigt wurde, dass es cytoplasmatisch lokalisiert ist, müsste entsprechend der erhöhten Substratmenge eine größere Menge EC-Biman bilden als in der Kontrolle ohne Azid.

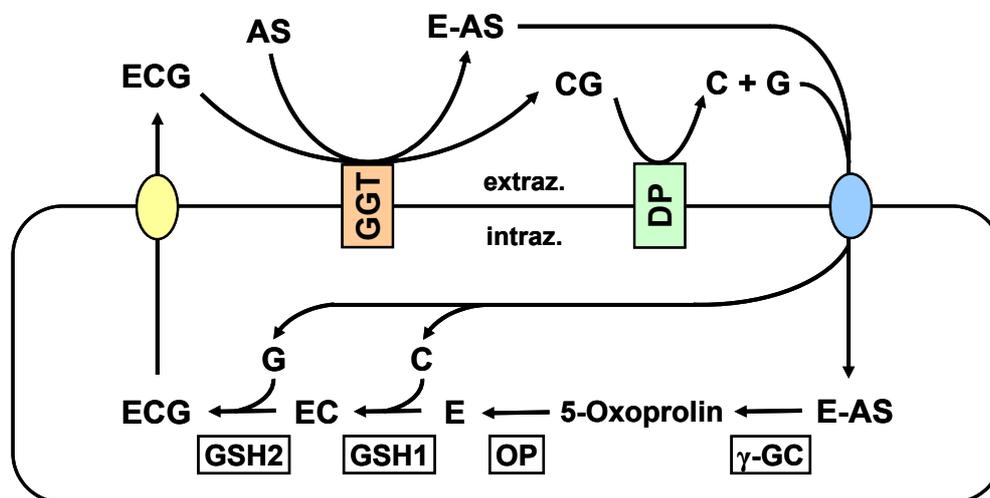
Tatsächlich kam es in Arabidopsis-Zellkulturen in Anwesenheit von 1 mM Azid zur Bildung einer mehr als 20fach gegenüber der Kontrolle erhöhten EC-Biman Menge 30 min nach der Fütterung der Zellen mit MCB. Vergleichende Zeitreihen mit WT- und  $\Delta$ PCS-Zellkulturen bestätigten diese Beobachtung im WT, während in  $\Delta$ PCS praktisch kein EC-Biman (0,2%) zu detektieren war. Die Kulturen von  $\Delta$ PCS enthielten nach 2h fünfmal mehr GS-Biman als die des WT, was die Annahme stützt, dass unter diesen Bedingungen durch den Verbleib des GS-Biman im Cytoplasma der Abbau hauptsächlich über AtPCS1 verläuft und deshalb in  $\Delta$ PCS praktisch blockiert ist. Daraus folgt, dass unter bestimmten Umständen, z.B. schlechte Versorgung der Zellen mit ATP wie im Versuch mit Azid simuliert, AtPCS1 eine wichtigere Funktion im GS-Konjugatabbau übernimmt als unter normalen Bedingungen. Ähnliches könnte für endogene Metabolite, die z.B. intrazellulär lokal begrenzt gebildet und nicht oder nur langsam aus dem Cytoplasma transportiert werden, der Fall sein. Denkbar wäre hier eine Funktion von AtPCS1 bei der Synthese von Glucosinolaten oder der Abbau von GS-Isothiocyanat-Konjugaten zur Bildung von bestimmten Phytoalexinen (Bednarek *et al.*, 2009).

Auch in Keimlingen, die zunächst mit Azid vorinkubiert und anschließend zusammen mit Azid und MCB infiltriert und 2h inkubiert wurden, konnte die um den Faktor 20 erhöhte Bildung von EC-Biman beobachtet werden. In Keimlingen wurde nach 1h bereits ein Anstieg des EC-Biman um etwa den Faktor 8 gemessen. Im Gegensatz dazu konnten Grzam *et al.* (2006) bei Infiltration von Arabidopsis-Blattstückchen mit MCB und Azid nach

60 min keine erhöhten EC-Biman Anteile feststellen, obwohl in den Ansätzen mit Azid (82,6% GS-Biman und 15,1% C-Biman) im Vergleich zur Kontrolle (90,2% GS-Biman und 8,0% C-Biman) ein erhöhter Umsatz von GS-Biman zu C-Biman verzeichnet ist. Die in Grzam *et al.* (2006) dargestellte Mikroskopanalyse der mit MCB und Azid koinfiltrierten und 60 min inkubierten Blattstückchen ergab jedoch die gleiche cytosolische Verteilung der Biman-Konjugate in Anwesenheit von Azid, wie sie in Arabidopsis-Zellkulturen beobachtet wurden (Abb. 3.44, S. 96). Während in den Versuchen dieser Arbeit Keimlinge und Zellsuspensionskulturen zum Einsatz kamen, verwendeten Grzam *et al.* (2006) 2 mm x 2 mm große Blattstückchen für ihre Analysen. EC-Biman kann jedoch als Intermediat sowohl in Wurzeln als auch in Blättern von zwei Wochen alten Arabidopsis-Pflanzen detektiert werden (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b). Somit bleibt die Ursache für den Unterschied in den Befunden bezüglich des Zwischenprodukts EC-Biman unklar.

### Funktionen der pflanzlichen $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen

Im Säugerorganismus ist die Aufgabe der GGTs sehr gut beschrieben. Sie zeigen extrazelluläre Aktivität und katalysieren den ersten Schritt im Abbau von extrazellulärem GSH im  $\gamma$ -Glutamyl-Zyklus (Meister and Anderson, 1983; Meister, 1988a), transferieren dabei das Glutamat auf andere Aminosäuren (AS) und bilden Dipeptide der Form  $\gamma$ -Glu-AS (Abb. 4.5). Das verbleibende Cysteinyl-glycin wird von Dipeptidasen gespalten.



**Abb. 4.5: Der  $\gamma$ -Glutamyl-Zyklus, wie er für den Säugerorganismus beschrieben ist**

Extrazelluläres GSH wird aufeinanderfolgend zu Cystein, Glycin und Dipeptiden ( $\gamma$ -Glutamyl-AS) abgebaut, die in die Zelle zurücktransportiert werden. Die beiden Enzyme  $\gamma$ -Glutamylcyclotransferase und 5-Oxoprolinase regenerieren Glutamat, das wieder für die Synthese von GSH zur Verfügung steht.

C, Cystein; E, Glutamat, G, Glycin; ECG, Glutathion; AS, Aminosäure; E-AS,  $\gamma$ -Glu-AS Dipeptid; GGT,  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase; DP, Dipeptidase;  $\gamma$ -GC,  $\gamma$ -Glutamylcyclotransferase; OP, Oxoprolinase; GSH1,  $\gamma$ -EC-Synthetase; GSH2, Glutathion-Synthetase, extraz., extrazellulär; intraz., intrazellulär. Die Abbildung wurde nach Martin *et al.* (2007) verändert.

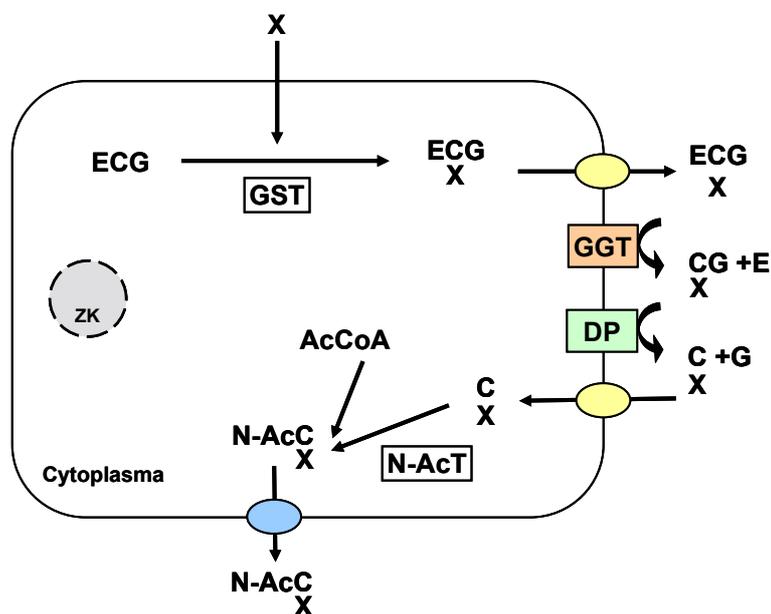
Cystein, Glycin und  $\gamma$ -Glu-AS werden zurück in die Zelle transportiert. Die  $\gamma$ -Glutamylcyclotransferase bildet zunächst unter Abspaltung von AS 5-Oxoprolin, aus dem die Oxoprolinase Glutamat regeneriert.

Die meisten Komponenten des  $\gamma$ -Glutamyl-Zyklus wurden in Tabak (*Nicotiana tabacum*) charakterisiert (Rennenberg *et al.*, 1980; Rennenberg *et al.*, 1981; Steinkamp and Rennenberg, 1985; Steinkamp *et al.*, 1987) und inzwischen im Genom von Arabidopsis identifiziert. Eine membrangebundene Dipeptidase wurde jedoch noch nicht in Arabidopsis gefunden und damit ist auch die Existenz des  $\gamma$ -Glutamyl-Zyklus in Pflanzen nicht gesichert (Martin *et al.*, 2007; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b). Die Ergebnisse in einer aktuell veröffentlichten Arbeit zum GSH-Metabolismus in Arabidopsis zeigen, dass der Abbau von GSH in Pflanzen unabhängig von GGTs abläuft (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2008). Nach dem vorgeschlagenen Modell bildet die  $\gamma$ -Glutamylcyclotransferase aus GSH direkt 5-Oxoprolin, das die 5-Oxoprolinase in Glutamat umwandelt; beide Wege laufen demnach im Cytoplasma ab. Möglicherweise besitzt die pflanzliche  $\gamma$ -Glutamylcyclotransferase eine erweiterte Substratspezifität und kann auch GS- oder EC-Konjugate umsetzen. Dies wäre eine Möglichkeit für einen GGT-unabhängigen Abbau von EC-Konjugaten im Cytoplasma, und auf diese Weise könnten von AtPCS1 gebildete EC-Konjugate metabolisiert werden, ohne dass ein Transport in Kompartimente mit GGT-Aktivität erforderlich wäre. In Keimlingen (sowohl WT als auch  $\Delta$ PCS) wurde in Anwesenheit von Azid neben dem Anstieg von EC-Biman (Faktor 20) auch eine leicht erhöhte Bildung von CG-Biman (Faktor 2,5) beobachtet. Da der aktive Transport von GS-Biman aus dem Cytoplasma durch Azid gehemmt ist, können die GGTs nicht für die Abspaltung des Glutamats verantwortlich sein. Unter Berücksichtigung der Daten von Ohkama-Ohtsu *et al.* (2008) wäre es denkbar, dass unter diesen Bedingungen GS-Biman von der  $\gamma$ -Glutamylcyclotransferase zu CG-Biman umgesetzt wird.

Im Zusammenhang mit dem GS-Konjugat-Stoffwechsel in Pflanzen ist eine Betrachtung des Mercaptursäurewegs, der im Säugetierorganismus bei der Metabolisierung von GS-Konjugaten in Leber und Niere beschritten wird (Abb. 4.6), ebenfalls interessant.

Es ist bekannt, dass GS-Konjugate in Säugern von membranständigen, aber extrazellulär aktiven GGTs und Dipeptidasen (Habib *et al.*, 2003) zu den entsprechenden Cystein-Konjugaten abgebaut und dann wieder zurück in die Zelle transportiert werden, wo sie durch N-Acetylierung in Mercaptursäure-Konjugate umgewandelt und schließlich über die Nieren im Urin ausgeschieden werden (Elfarrar and Anders, 1984; Anders *et al.*, 1988; Hinchman and Ballatori, 1994; Jaeger *et al.*, 1998). Auch bei Pflanzen könnte es zu einem

Transport von Konjugaten in den apoplastischen Raum kommen (Abb. 4.4) (Rea, 2007). Zumindest GS- und EC-Konjugate könnten dort von AtGGT1 oder AtGGT2 als Substrat akzeptiert werden (Storozhenko *et al.*, 2002; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007a). Ein möglicher Beitrag der extrazellulär aktiven GGTs zum Abbau von GS-Konjugaten könnte in Versuchen mit  $\Delta$ GGT4 und zusätzlich auch mit AtGGT1- und AtGGT2-defizienten Pflanzen bzw. GGT-Mehrfachmutanten mit und ohne Azid untersucht werden. Während AtMRP4 und AtMRP5 Kandidaten für den Transport von GS-Konjugaten über die Zellmembran darstellen (Klein *et al.*, 2004; Rea, 2007), müsste der Membrantransport von EC-Konjugaten erst noch gezeigt werden.



**Abb. 4.6: Transport- und Stoffwechselwege bei der Mercaptursäuresynthese in der Leber**

Elektrophile Moleküle (Xenobiotika oder endogenen Ursprungs) werden intrazellulär durch Glutathion S-Transferasen (GST) an Glutathion konjugiert und dann extrazellulär durch membrangebundene  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen (GGT) und Dipeptidasen (DP) in Cystein-Konjugate umgewandelt. Nach Rücktransport ins Cytoplasma erfolgt durch N-Acetyltransferasen (N-AcT) die N-Acetylierung zu Mercaptursäure-Konjugaten, die im Urin ausgeschieden werden. Die Kopplung an Glutathion und N-Acetylierung findet hauptsächlich in der Leber statt, während der Abbau zum Cystein-Konjugat hauptsächlich in der Niere abläuft. Ac, Acetyl; CoA, Coenzym A; C, Cystein; E, Glutamat; G, Glycin; X, elektrophiles Molekül; ZK, Zellkern. Schema verändert nach Wang and Ballatori (1998).

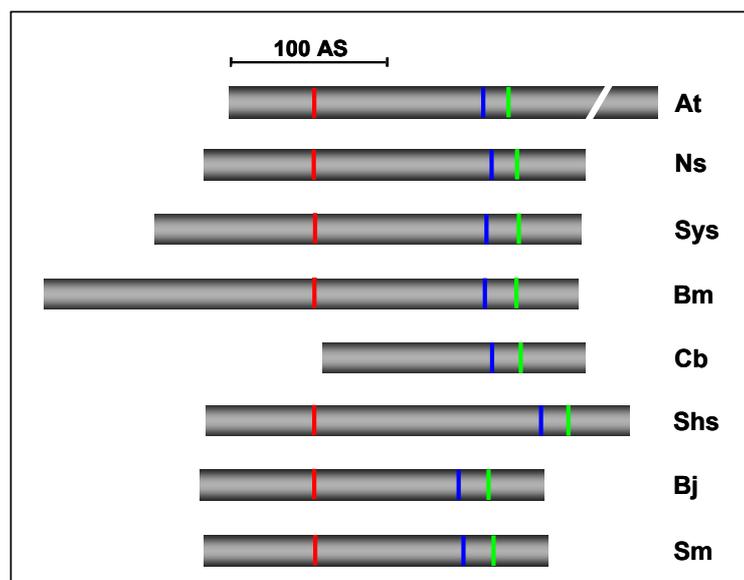
Die Ergebnisse aus den Versuchen mit AtGGT4-defizienten Linien legen den Schluss nahe, dass unter den Versuchsbedingungen die Hauptaktivität bei AtGGT4 liegt, da bei der Inaktivierung dieses Enzyms der Abbau von GS-Biman zu C-Biman zu 95% blockiert ist. Es bleibt jedoch unklar, welcher genaue Anteil an GS-Konjugaten unter normalen Bedingungen (im Wildtyp) über den cytoplasmatischen Weg, d.h. via AtPCS1 metabolisiert wird. Im Gegensatz zu den Studien von Grzam *et al.* (2006) und Ohkama-

Ohtsu *et al.* (2007b), in denen keine cytosolische AtPCS1-Aktivität beim Abbau von GS-Biman gefunden oder diskutiert wurde, konnte in den MCB-Versuchen dieser Arbeit eindeutig EC-Biman nachgewiesen und dessen Bildung auf die Aktivität von AtPCS1 zurückgeführt werden. AtPCS1 wird zwar, wie sich in den Mikroskopanalysen der AtPCS1:EGFP-Pflanzen zeigte, im gesamten Keimling exprimiert; aber dennoch könnte es Aktivitätsunterschiede von AtPCS1 zwischen Wurzel und Blatt geben. In diesem Fall würde es einen Unterschied machen, wenn statt ganzen Keimlingen (diese Arbeit) nur Blattstückchen (Grzam *et al.*, 2006) analysiert werden.

## 4.2 Evolution und Funktionalität der Phytochelatinsynthese

### Prokaryotische und eukaryotische PCS-Proteine

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt (Kap. 1.1.3.4), ergibt die Datenbank-Suche nach Proteinen, die Sequenzhomolgien zum katalytisch aktiven Bereich des N-Terminus von AtPCS1 aufweisen, über 40 Treffer (Marchler-Bauer *et al.*, 2007).



#### Abb. 4.7: PCS-homologe Proteine aus Prokaryoten

Für die Darstellung der homologen PCS-Proteine wurden die Cysteinreste der katalytischen Triade (rot; fehlt in *Coxiella*) untereinander angeordnet. Die beiden anderen Reste der Triade sind in blau (Histidin) und in grün (Aspartat) dargestellt. Der C-Terminus von AtPCS1 (Gesamtlänge des Proteins 485 AS) ist verkürzt abgebildet.

AS, Aminosäure; At, *Arabidopsis thaliana* (AtPCS1); Ns, *Nostoc sp.* PCC 7120; Sys, *Synechococcus sp.* WH 5701; Bm, *Burkholderia mallei* SAVP1; Cb, *Coxiella burnetii* CbuG Q212; Shs, *Shewanella sediminis* HAW-EB3; Bj, *Bradyrhizobium japonicum* USDA 100; Sm, *Sinorhizobium medicae* WSM419.

Unter den Arten, die entsprechende Proteine besitzen (Tab. 1.2, S. 11), sind nicht nur monokotyle und dikotyle Pflanzen, sondern auch Farne und mit *C. elegans* und *S. pombe*

auch jeweils ein Vertreter der Tiere und Pilze. Hinzu kommen über zehn prokaryotische Gattungen, darunter *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 und *Nostoc sp.* (*Anabaena sp.*) PCC 7120.

Vergleicht man die Längen der Aminosäuresequenzen zwischen prokaryotischen und eukaryotischen PCS-Homologen, so fällt auf, dass die prokaryotischen Proteine mit rund 200 bis 350 AS deutlich kürzer sind als die eukaryotischen mit rund 450 bis 500 AS (Rea *et al.*, 2004) (Abb. 4.7), wobei die PCS aus *C. elegans* mit 371 AS (Vatamaniuk *et al.*, 1999) eine Ausnahme darstellt. Am besten untersucht ist das PCS-homologe Protein alr0975 aus *Nostoc* (NsPCS) (Harada *et al.*, 2004; Tsuji *et al.*, 2004). NsPCS ist mit 242 AS halb so lang wie AtPCS1 und weist im Sequenzvergleich Homologien zu den AS 1 bis 221 von AtPCS1 auf (Abb. 3.47, S. 99). Entsprechend wurde als N-terminale Domäne von AtPCS1 dieser Sequenzabschnitt vorgeschlagen (Rea, 2006; Romanyuk *et al.*, 2006).

Von NsPCS wurde *in vitro* gezeigt, dass sie GSH zu  $\gamma$ -Glu-Cys abbaut und keine oder nur sehr geringe Mengen an PC<sub>2</sub> synthetisiert (Harada *et al.*, 2004; Tsuji *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurde NsPCS nach erfolgreicher Transformation von *Arabidopsis* nicht nachweisbar exprimiert. Jedoch konnte durch heterologe Expression des cyanobakteriellen Proteins in *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass es auch sehr effizient GS-Biman zu EC-Biman umsetzt (J. Wünschmann, persönl. Mitteilung). Diese Befunde stützen die Hypothese, es könnte sich bei der Glycinabspaltung von GS-Konjugaten nicht nur um eine Nebenaktivität von AtPCS1 handeln. Vielmehr könnte die Hydrolase-Aktivität von AtPCS1 die evolutionär betrachtet ältere Funktion sein. Aufgrund der Ergänzung des N-Terminus durch den stabilisierenden und regulatorischen C-Terminus (Rea *et al.*, 2004; Ruotolo *et al.*, 2004) gewann die Funktion als Phytochelatinsynthase an Bedeutung. Womöglich durch zusätzliche Mutationen erhielt auch der N-Terminus allein PC-Synthase Aktivität (Romanyuk *et al.*, 2006). Übereinstimmend dazu wurde in den mit pAtPCS1::AtPCS1-N transformierten Linien eine stärkere PC-Synthese (vor allem auch von PC<sub>4</sub>) und GS-Biman Metabolisierung beobachtet, wenn der N-Terminus mit EGFP fusioniert war, was auch auf eine gewisse Instabilität des N-Terminus allein hindeutet. Für NsPCS wurde gezeigt, dass sie funktionale Dimere bildet (Vivares *et al.*, 2005). Gleiches könnte auch für AtPCS1-Moleküle zutreffen, die beim Transpeptidierungsschritt in Wechselwirkung treten. An das Cystein gebundene Reste würden dabei ab einer gewissen Größe wegen der sterischen Behinderung der Dimerwechselwirkung nur zur Glycinabspaltung anstatt zur Transpeptidierung (PC-Synthese) führen (Vatamaniuk *et al.*, 2000; Oven *et al.*, 2002; Beck *et al.*, 2003). Die deutliche, wenn auch *in planta* eingeschränkte Aktivität des N-Terminus von AtPCS1 (volle Aktivität in Hefe,

J. Wünschmann) lässt darauf schließen, dass der C-Terminus *in planta* stabilisierende und regulatorisch-aktivierende Funktion besitzt (Rea *et al.*, 2004; Ruotolo *et al.*, 2004; Romanyuk *et al.*, 2006), aber für eine mögliche Dimerisierung nicht zwingend notwendig ist. Das PCS-homologe Protein bll7663 aus *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (<http://bacteria.kazusa.or.jp/rhizobase>, Genomdatenbank des Kazusa DNA Research Institute, Japan) zeigte bei heterologer Expression in Hefe trotz Sequenzhomologien und Vorhandensein der PCS-typischen katalytischen Triade aus Cystein, Histidin und Aspartat (Vivares *et al.*, 2005) keine Aktivität hinsichtlich des GS-Biman Abbaus (J. Wünschmann, persönliche Mitteilung). Dies macht deutlich, dass für ein umfassendes Verständnis der Funktionalität von Phytochelatinsynthasen und PCS-ähnlichen Proteinen noch weiterführende Analysen erforderlich sind. Die in Abb. 4.7 abgebildeten Beispiele für prokaryotische Proteine mit PCS-Homologie zeigen, dass es in den Primärsequenzen zu Verschiebungen der katalytisch relevanten AS relativ zueinander kommt. Dies könnte eine Beeinträchtigung in der Funktionalität der katalytischen Triade durch eine veränderte räumliche Anordnung der Reste verursachen. In bll7663 ist der Abstand zwischen Cystein und Histidin/Aspartat verringert, was eine Erklärung für die beobachtete fehlende Aktivität des Proteins sein könnte.

Bei der Recherche nach PCS-homologen Proteinen in der *conserved domains database* (Marchler-Bauer *et al.*, 2007) fällt auf, dass hauptsächlich Cyanobakterien und Rhizobien homologe Sequenzen besitzen. Mit den beiden Arten *Coxiella burnetii* (Erreger des Q-Fiebers) und *Burkholderia mallei* (Erreger des Rotz bei Pferden, der aber als Zoonose auch auf den Menschen übertragen werden kann), tauchen jedoch auch zwei tierische Erreger auf, die zu den Betaproteobakterien gehören, während Rhizobien zu den Alphaproteobakterien gruppiert werden. Weiterführende Recherchen in den Genomdatenbanken (<http://genolist.pasteur.fr>) von *Escherichia coli* K-12, *Bacillus subtilis* 168 und einiger humanpathogener Bakterien, darunter *Helicobacter pylori* 26695 J99, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv und *Mycoplasma pulmonis* UAB CTIP, ergaben keine PCS-spezifischen Sequenzhomologien in diesen Spezies. Eine interessante Frage wäre, ob in den Mikroorganismen, die ein PCS-homologes Protein besitzen, dieses eine Funktion in der Pathogen-Wirt-Interaktion besitzt.

#### **Eine weitere Besonderheit von NsPCS (alr0975)**

In den Zellkulturen von  $\Delta$ PCS ist in Anwesenheit von Azid der Abbau von GS-Biman blockiert. Die deutlich sichtbare Akkumulation von GS-Biman lässt darauf schließen, dass nur geringfügig Konjugate ins Medium abgegeben werden. Daher besteht die Möglichkeit für einen Zusammenhang zwischen fehlender Funktionalität von AtPCS1 und reduziertem

Konjugat-Transport vom intra- ins extrazelluläre Kompartiment. Das Protein alr0975 aus *Nostoc sp.* PCC 7120 ist im Genom des Cyanobakteriums mit alr0972, alr0973 und alr0974 als Operon zusammengefasst (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; NCBI Genomdatenbank, und <http://bacteria.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html>; Genomdatenbank des Kazusa DNA Research Institute, Japan). Ein Abgleich der Aminosäuresequenzen dieser drei Proteine mit dem Genom von *Arabidopsis* ergibt, dass sie Sequenzhomologien zu Komponenten von ABC-Transportern aufweisen (Tab. 4.1).

<i>Nostoc sp.</i>	<i>A. thaliana</i>	Funktion in <i>A. thaliana</i>
alr0972	At1g67940	<i>ABC transporter component: ATP binding protein</i>
alr0972	At2g41700	<i>ATPase, coupled to transmembrane movement of substances/amino acid transmembrane transporter</i>
alr0973	At5g19410	<i>ABC transporter family protein</i>
alr0974	At5g19200	<i>ABC transporter binding protein component: short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein</i>
alr0975	At5g44070, At1g03980	Phytochelatinsynthasen (AtPCS1, AtPCS2)

**Tab. 4.1: Analyse des putativen alr0975-Operons von *Nostoc sp.* PCC 7120**

Die Gene für alr0972 bis alr0975 in *Nostoc sp.* PCC 7120 sind vermutlich zu einem Operon zusammengefasst. Die Tabelle enthält die Notationen sequenzhomologer Gene in *Arabidopsis* und die Funktionen bzw. Eingruppierung der entsprechenden Genprodukte.

Dies ist interessant für die Überlegung, ob sich im Lauf der Evolution ein solcher funktionaler Zusammenhang erhalten hat und AtPCS1 eventuell auch direkt mit EC-Konjugat-Transportern assoziiert ist. So könnte von GS-Konjugaten Glycin abgespalten und gleich im Anschluss das EC-Konjugat transportiert werden. Ein Vergleich mit GSTs liegt hier nahe. Von diesen Enzymen wird vermutet, dass sie nicht nur die Konjugation von Anthocyanen an GSH katalysieren, sondern auch den Kontakt mit ABC-Transportern im Tonoplasten vermitteln (Mueller *et al.*, 2000; Rea, 2007).

#### **Die Phytochelatinsynthasen von *Arabidopsis*: Unterschiede im Gen und Protein**

*Arabidopsis* besitzt zwei Phytochelatinsynthase-Gene, AtPCS1 auf Chromosom #5 und AtPCS2 auf Chromosom #1. Im Verlauf der Evolution kam es in *Arabidopsis* zu einer Duplikation des gesamten Genoms, gefolgt von Deletionen und lokalen Genduplikationen (TAGI, 2000). Folglich ging AtPCS2 wahrscheinlich durch Duplikation aus AtPCS1 hervor und im weiteren Verlauf kam es zum Verlust des 30 AS umfassenden Abschnitts im C-terminalen Bereich. Für eine länger zurückliegende Duplikation spricht auch die geringe

Sequenzübereinstimmung von rund 32% in den Introns von AtPCS1 und AtPCS2, während die Exonsequenzen zu mehr als 80% übereinstimmen (Cazale and Clemens, 2001).

Die meisten Arbeiten zum Thema beschäftigen sich mit AtPCS1, da AtPCS2 *in planta* nicht zur bisher bekannten PCS-spezifischen Aktivität beiträgt. Als das zweite AtPCS-Gen entdeckt wurde, konnte AtPCS2 in Hefe als voll funktionsfähige Phytochelatinsynthese bestätigt werden (Cazale and Clemens, 2001; J. Wünschmann, persönl. Mitteilung), zeigt jedoch bezüglich GS-Biman Abbau in Hefe nur etwa 20% der Aktivität von heterolog exprimierter AtPCS1 (J. Wünschmann, persönl. Mitteilung). Für die Tatsache, dass AtPCS2 im Vergleich zu AtPCS1 in Arabidopsis so schwach exprimiert ist und deshalb eine untergeordnete oder sogar keine Rolle bei PC-Synthese, Cd-Toleranz, GS-Biman-Abbau und nach neuesten Befunden Pathogenresistenz spielt, gibt es drei mögliche Erklärungen (Tab. 4.2): der im Vergleich zu AtPCS1 unterschiedliche Promotorbereich, die längere 3'-UTR-Sequenz der mRNA und Unterschiede im C-Terminus der beiden Proteine.

Eigenschaft	AtPCS1	AtPCS2
Abstand zu vorigem Gen	3.200 bp	550 bp
TATA-Box	ja	nein
GC-reicher 5'-Bereich	nein	nein
3'-UTR	167 bp	1204 bp
ATG-Kontext im Vergleich zur Konsensussequenz	2 Austausche	4 Austausche, darunter die erste Base nach ATG
Protein	485 AS	33 AS weniger, davon 30 am Stück im C-Terminus

**Tab. 4.2: Molekulargenetischer Vergleich von AtPCS1 und AtPCS2**

Sechs Unterschiede bezüglich Transkription, Translation und AS-Sequenz könnten die Ursache für den geringen funktionalen Beitrag von AtPCS2 *in planta* sein. Der ungewöhnlich lange 3'-UTR lässt sich durch die Analyse von *expressed sequence tags* (ESTs) belegen. Für weitere Erklärungen und Referenzen siehe Text.

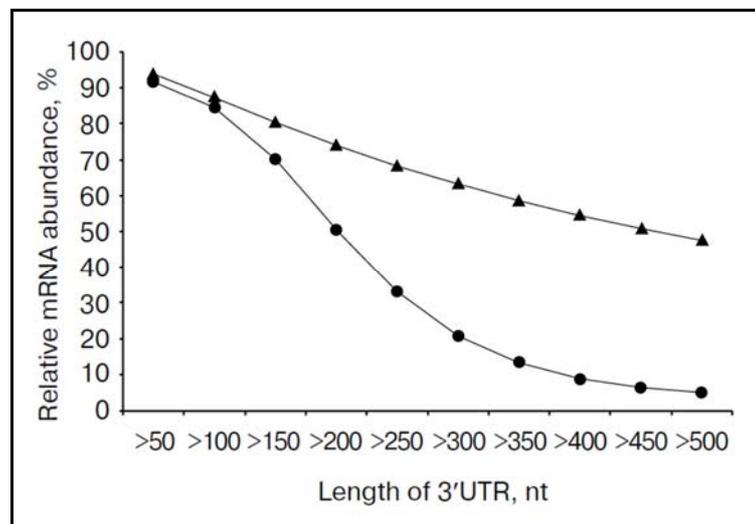
Wie bereits in der Einleitung dargelegt, bestehen Unterschiede in den Abständen der Transkriptionsstartpunkte zum benachbarten (*upstream* liegenden) Gen. Bei AtPCS1 sind es 3.200 bp, bei AtPCS2 nur 550 bp, was jedoch nicht zwingend bedeuten muss, dass der Promotor von AtPCS2 kurz ist. Lee und Kang (2005) haben sich in einer Arbeit der vergleichenden Betrachtung der beiden PCS-Gene und ihrer regulatorischen Bereiche gewidmet. Sie führen an, dass AtPCS1 26 bp vor dem Startcodon eine TATA-Box-

Sequenz aufweist (TCAGTATATATAG; Konsensus: TCACTATATATAG), die in *AtPCS2* komplett fehlt. Interessanterweise war in allen 79 von Joshi (1987) untersuchten Genen eine solche TATA-Box bei Position -40 bis -25 stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts (+1) zu finden und nicht so nah am Startpunkt der Translation (Joshi, 1987). Zusätzlich hat *AtPCS2* auch keine GC-reichen Regionen im 5'-Bereich, wie es für andere Gene ohne TATA-Box gezeigt wurde (Smale, 1997). Desweiteren lässt sich auch ein Unterschied im Kontext der jeweiligen Start-Codons feststellen. Joshi (1987) definierte die Konsensussequenz für den Translationsstart in pflanzlichen Genen aufgrund seiner Sequenzanalysen neu als TAAACAATGGCT und damit abweichend von der, die aus Daten von tierischen Genen abgeleitet wurde (Kozak, 1984). *AtPCS1* besitzt die Sequenz TGAAAAATGGCT, *AtPCS2* hingegen CTGACAATGICT. Damit hat *AtPCS2* die geringere Übereinstimmung mit der Konsensussequenz, und besonders der Purin/Pyrimidin-Tausch an der Position nach dem ATG, wo 81% der untersuchten Gene ein G enthielten, dürfte von Bedeutung sein (Joshi, 1987; Jaiswal and Rangan, 2007). Generell ist betreffend dieses Punktes zu bedenken, dass jede künstliche Promotorfusion mit gentechnischen Methoden wegen der zwangsläufig eingefügten Restriktionsschnittstellen die Basen vor dem ATG der klonierten Gensequenz verändert. Dies ist besonders bei Studien mit endogenen Promotorsequenzen zu bedenken, in denen möglichst die natürliche Situation, d.h. Genregulation, untersucht werden soll. Somit ließe sich also erklären, dass *AtPCS2* sowohl schwach transkribiert als auch die mRNA wenig effizient translatiert wird (Lee and Kang, 2005). In den RT-PCR Analysen zur genetischen Charakterisierung der PCS-defizienten Mutanten (Abb. 3.3, S. 50) war für *AtPCS2* immer nur durch eine zweite, nachgeschaltete PCR ein spezifisches Produkt zu amplifizieren, d.h. nach einem ersten PCR-Lauf, der für cDNA aus *AtPCS1* völlig ausreichend war, wurde 1/50 bis 1/100 dieser Ansätze als *template* für einen zweiten PCR-Lauf mit denselben Bedingungen eingesetzt.

Desweiteren wäre denkbar, dass sowohl mRNA als auch Protein von *AtPCS2* weniger stabil sind als *AtPCS1*. In der Primärstruktur des *AtPCS2*-Proteins fehlen im C-Terminus 30 Aminosäuren (vgl. Abb. 3.47, S. 99), die eine Bedeutung für eine mögliche Dimerbildung haben könnten (s.u.) (Vivares *et al.*, 2005). In diesem C-terminalen Bereich besitzt *AtPCS1* die auffällige AS-Abfolge ECECG (Positionen 401 bis 405). Die enthaltenen Cysteinreste könnten eine Rolle bei Regulation von Aktivität und Stabilität der PCS spielen. Der Befund, dass *AtPCS2* in Hefe bezüglich der PC-Synthese voll funktionsfähig ist (Cazale and Clemens, 2001; J. Wünschmann, persönl. Auskunft), lässt allerdings eher ein Stabilitätsproblem auf mRNA-Ebene vermuten. Jedoch muss besonders hinsichtlich Stabilität und Regulation von Genprodukten immer mit

Unterschieden zwischen heterologem und natürlichem System, in diesem Fall Hefe gegenüber Pflanze, gerechnet werden.

*AtPCS2* hat eine ungewöhnlich lange 3'-UTR, 1204 bp gegenüber 167 bp bei *AtPCS1*, was anhand einer Durchsicht der EST-Sequenzen (*expressed sequence tags*) für *AtPCS2* in der NCBI-Datenbank bestätigt wurde. In Pflanzen gibt es einen direkten Zusammenhang zwischen der Länge des 3' untranslatierten Bereiches von mRNA-Molekülen und deren Stabilität (Schwartz *et al.*, 2006). Ab einer 3'-UTR-Länge von 300 bp nimmt die mRNA-Stabilität massiv ab. Datenbankrecherchen zu über 78.000 pflanzlichen mRNAs und Vergleiche mit über 95.000 mRNAs von Säugetieren ergaben, dass Pflanzen lange 3'-UTRs offensichtlich tatsächlich vermeiden (Abb. 4.8). So befanden sich unter den getesteten pflanzlichen mRNAs z.B. nur 20% mit 3'-UTRs von mehr als 300 bp Länge, während es bei den tierischen mRNAs über 60% waren (Schwartz *et al.*, 2006).



**Abb. 4.8: Verteilung der 3'-UTR-Länge in pflanzlichen und tierischen mRNA-Molekülen**

Anhand von Datenbankrecherchen zu über 78.000 pflanzlichen mRNAs (Kreise, untere Kurve) und über 95.000 mRNAs aus Säugetieren (Dreiecke, obere Kurve) wurde das Verteilungsmuster der 3'-UTR-Längen ermittelt. Im Unterschied zu Säugetieren vermeiden Pflanzen 3'-UTR-Längen ab einem gewissen Wert zunehmend. Abbildung leicht verändert übernommen aus Schwartz *et al.* (2006).

Zwei weitere Faktoren, die die Stabilität von mRNA beeinflussen, sind Bindestellen für mikroRNA-Moleküle (miRNAs) und Destabilisierungssequenzen (AUUUA-Motiv) im 3'-UTR oder auch im ORF von mRNAs (Shaw and Kamen, 1986; Ohme-Takagi *et al.*, 1993; Jones-Rhoades *et al.*, 2006). Kommt es zur Bindung von mikroRNA an ein mRNA-Molekül, entstehen doppelsträngige RNA-Bereiche, die ein Signal für den Abbau der RNA darstellen (Abdel-Ghany and Pilon, 2008). Der Abgleich der Gensequenzen von *AtPCS1* und *AtPCS2* mit der Datenbank des Arabidopsis Small RNA Projekt (ASRP) (Gustafson *et*

*al.*, 2005) ergab jedoch keine miRNA-Bindestellen in den Transkripten der beiden Phytochelatinsynthasen.

Eine Betrachtung der beiden Gene bezüglich destabilisierender Sequenzmotive ergab lediglich für AtPCS2 ein Motiv im 3'-UTR, der ansonsten nicht auffallend häufige Adenin- oder Uracil-reiche Abschnitte enthält und somit auch keine destabilisierenden repetitiven AUUUA- oder AUUAA-Muster (Ohme-Takagi *et al.*, 1993). Die Anzahl derartiger Sequenzmuster in der restlichen mRNA (mit Introns) beträgt 5 für AtPCS1 und 8 für AtPCS2. Diese liegen aber in allen Fällen isoliert und nicht repetitiv-überlappend.

Während sich also die Beobachtungen für AtPCS2 im Wildtyp bzw. in den PCS-defizienten Linien erklären lassen (putativ schwacher Promotorbereich/schwache Translationsregulation und gleichzeitig auf Instabilität hinweisender langer 3'-UTR der mRNA), ist dies für die transgenen  $\Delta$ PCS-Pflanzen nicht eindeutig. In der RT-PCR Analyse der transformierten  $\Delta$ PCS-Linien E (pAtPCS1::AtPCS2-N) und G (pAtPCS1::AtPCS2) konnten mit denselben Primern nur für das verkürzte Transkript spezifische Banden nachgewiesen werden. Keines der Konstrukte bezieht jedoch die jeweiligen 3'-untranslatierten Bereiche mit ein. Da auch noch andere, bisher unbekannte Sequenzbereiche für die Stabilität einer mRNA verantwortlich sind, lässt sich eine endgültige Antwort nicht so ohne Weiteres finden (Knippers, 1997). Schließlich bleibt festzustellen, dass sämtliche Konstrukte vor der Transformation der Agrobakterien sorgfältig auf korrekte DNA-Sequenzen überprüft wurden.

Die fehlende Komplementation von  $\Delta$ PCS durch pAtPCS1::AtPCS2-N lässt sich ebenfalls nicht schlüssig erklären (Tab. 4.3). Der in *S. cerevisiae* heterolog exprimierte N-Terminus von AtPCS2 zeigte wie in Arabidopsis keine Aktivität (J. Wünschmann, persönl. Mitteilung). Die N-terminalen Sequenzen beider Phytochelatinsynthasen sind aber zu 90% identisch und der N-Terminus von AtPCS1 (ohne EGFP-Fusion) vermittelt in Arabidopsis zumindest eine teilweise Komplementation bezüglich PC-Synthese und GS-Biman Abbau und ist in Hefe sogar voll funktionsfähig (vergleichbar mit heterolog exprimierter Vollängen-cDNA von AtPCS1, J. Wünschmann, persönl. Auskunft). Es liegt anscheinend in den restlichen 10% Unterschied der Primärstrukturen, dass AtPCS2-N gar keine Komplementation erkennen lässt. Im Bereich des N-Terminus besitzt AtPCS1 an Position 113 ein Cystein, während sich in AtPCS2 an dieser Stelle ein Serin befindet, was sich möglicherweise auf die Funktionalität von AtPCS2 auswirkt, da Cys113 als kritisch für die Aktivität der PCS beschrieben wurde (Maier *et al.*, 2003). Ferner ist es unwahrscheinlich, dass das vorhandene AtPCS2-N Transkript, das wegen der AtPCS1-Promotorfusion den 5'-UTR von AtPCS1 enthält, in Arabidopsis nicht auch translatiert wird. Es sei denn, das vom Konsensus (Joshi, 1987) abweichende T an der ersten Position nach dem ATG in

AtPCS2 (s.o.) ist wirklich kritisch für die Translation, wofür auch einige Analysen neueren Datums sprechen (Pesole *et al.*, 2000; Jaiswal and Rangan, 2007). Eine wirkliche Antwort ließe sich wohl nur mit Westernblot-Analysen oder Immunpräzipitationen mit Antikörpern spezifisch für AtPCS2 finden. Wegen der großen Sequenzübereinstimmung zwischen den beiden PCS-Genen ist es aber praktisch unmöglich, geeignete Haptene für die Herstellung spezifischer, diskriminierender Antikörper zu definieren. Alternativ könnten *in vitro* Experimente zu Transkription und Translation Aufschluss über die regulatorischen Eigenschaften der Genstrukturen von AtPCS2 liefern (Noller, 1991).

Funktion	NsPCS	AtPCS1		AtPCS2	
		komplett	N-Term.	komplett	N-Term.
PC (Hefe)	marginal	bis PC <sub>4</sub>	bis PC <sub>4</sub>	PC <sub>2</sub> , PC <sub>3</sub>	marginal
GS-B (Hefe)	ja	ja	ja	20% PCS1	nein
PC (Arabidopsis)	k. T.	bis PC <sub>4</sub>	PC <sub>2</sub> , PC <sub>3</sub>	k. T.	nein
Cd (Arabidopsis)	k. T.	ja	nein	k. T.	nein
GS-B (Arabidopsis)	k. T.	ja	< komplett	k. T.	nein

**Tab. 4.3: Aktivität exprimierter PCS-Gene in Hefe (heterolog) und Arabidopsis**

Die Tabelle fasst die Ergebnisse aus der physiologischen Charakterisierung von transgenen Arabidopsis-Linien (diese Arbeit) und Hefen (J. Wünschmann, persönliche Mitteilung) zusammen. Die Angaben für den N-Terminus von AtPCS1 beziehen sich auf die nicht mit EGFP fusionierte Version. Weitere Ausführungen im Text. PC, PC-Synthese; GS-B, GS-Biman Abbau; Cd, Cd-Toleranz; komplett, kompletter ORF (cDNA); N-Term, C-terminal verkürzte cDNA; k. T., kein Transkript detektierbar.

Hingegen lassen sich Unterschiede in den Aktivitäten der Phytochelatinsynthasen oder homologer Proteine, die zwischen *S. cerevisiae* und *A. thaliana* auftreten (Tab. 4.3), am ehesten durch die unterschiedlichen Systeme erklären, in denen die Gene exprimiert werden. Während in Hefe AtPCS2 (komplette cDNA) fast volle PC-Synthese-Aktivität erreicht (J. Wünschmann, persönl. Mitteilung), fehlt diese in Arabidopsis – trotz des in den Konstrukten ausgetauschten Promotors. Lee und Kang (2005) wiederum fanden in ihren transgenen PCS1-Mutanten mit genomischer DNA von AtPCS2 unter der Kontrolle des AtPCS1-Promotors (und gleichermaßen unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors) eine knapp 70%ige Komplementation des Wurzelwachstums auf MS-Platten mit CdCl<sub>2</sub>. Allerdings verwendeten sie die Mutantenlinie cad1-3 und es könnte durch vorhandene Restmengen an cad1-3 zu stabilisierenden Wechselwirkungen zwischen cad1-3 und AtPCS2 gekommen sein. Unwahrscheinlich erscheint aber die Möglichkeit, dass dadurch eine mögliche schlechte Translationseffizienz so ausgeglichen wird, dass es zu den

beobachteten 70% Komplementation im Wurzelwachstum auf Cd-Agar kommt (Lee and Kang, 2005).

Ebenso zeigte die cyanobakterielle NsPCS in der parallelen Analyse in Hefe eine hohe Aktivität im GS-Biman Abbau (J. Wünschmann, persönl. Mitteilung), während in Arabidopsis für das eingebrachte Gen keine spezifische mRNA detektiert werden konnte. In diesem Fall, für die funktionale Charakterisierung von NsPCS *in vivo*, war es von besonderem Vorteil, neben dem System Pflanze gleichzeitig auch das Modellsystem Hefe zur Verfügung zu haben.

Eine Betrachtung unter dem Aspekt der mRNA-Stabilität liefert keine miRNA-Bindestellen für NsPCS, aber in dem 729 bp langen Gen befinden sich vier AUUUA-Motive. Dass diese bei der Expression des prokaryotischen Gens in Arabidopsis einen destabilisierenden Effekt haben, ist jedoch eher unwahrscheinlich, denn sie liegen nicht als repetitiv-überlappende Sequenzabschnitte in einem 3'-UTR-Bereich (Ohme-Takagi *et al.*, 1993).

Für NsPCS käme möglicherweise in Frage, dass das Gen eine für Arabidopsis ungewöhnliche Nutzung von Basentriplets (*codon usage*) für die Rekrutierung von tRNAs bei der Translation aufweist. Wahrscheinlich ist damit ein Regulationsmechanismus in der Pflanze verbunden, der bei einer solchen Abweichung die Proteinsynthese und auch die Transkription stoppt. Ferner sind die Basensequenzen der cDNA von AtPCS1 und AtPCS2 zu 80% identisch; vergleicht man nur die N-terminalen Bereiche ergibt sich sogar ein Wert von 87% Identität. Eine gewisse Variation für eine zwischen den beiden PCS-Genen abweichende *codon usage* wäre allerdings durch Austausch von rund 90 (N-Terminus rund 30) AS gegeben (Morton and Wright, 2007; Hershberg and Petrov, 2008). Aber ein Unterschied zwischen der Transkriptionsregulation von kompletter und verkürzter AtPCS2-cDNA, die in den sorgfältig auf korrekte Sequenzen überprüften Konstrukten beide unter der Kontrolle des endogenen Promotors von AtPCS1 stehen, lässt sich damit nicht wirklich überzeugend erklären. Es sei denn, der erwähnte Effekt wird durch den C-Terminus verursacht.

Eine mögliche Verbesserung könnte durch die Verwendung von 35S::*AtPCS2* bzw. 35S::*NsPCS*-Konstrukten erreicht werden, wodurch eine starke ektopische Expression der Gene erreicht würde. Gerade eine solche artifizielle Regulation der Expression wurde aber mit dem verwendeten Ansatz (endogener Promotor von *AtPCS1*) gezielt vermieden.

### **Biotischer Stress: Welche Funktion hat AtPCS1 in der Pathogenabwehr?**

Äußerlich unterscheiden sich die PCS-Insertionslinien nicht vom Wildtyp und zeigen auch keine Auffälligkeiten in ihrer Entwicklung. Deshalb muss nach physiologischen

Phänotypen gesucht bzw. es muss untersucht werden, unter welchen (Stress-)Bedingungen Unterschiede zum WT beobachtbar sind.

Passend zu den Daten aus den *in vitro* Versuchen mit aufgereinigter AtPCS1 (Beck *et al.*, 2003) konnte *in planta* eine fehlende AtPCS1-Aktivität mit verminderter Glycinabspaltung von GS-Biman korreliert werden. AtPCS2 spielte hierbei keine wesentliche Rolle. Ferner konnte die zuerst in *pen4* und *cad1-3* beobachtete erhöhte Anfälligkeit gegenüber der Infektion durch die Mehltaupilze *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* und *Erysiphe pisi* auch in den hier neu charakterisierten KO-Linien bestätigt werden (M. Lim und S. Somerville, Berkeley, persönl. Mitteilung).  $\Delta$ PCS1 bzw  $\Delta$ PCS zeigten im Infektionsversuch eine mehr als doppelt so große Anzahl an erfolgreichen Penetrationen durch das Pathogen als der Wildtyp und  $\Delta$ PCS2. Auch hier zeigte sich, dass nur die fehlende Funktion von AtPCS1 zu einem Phänotyp führt.

Desweiteren scheinen neben AtPCS1 auch eine oder mehrere GST(s) in Prozesse bei der Pathogenabwehr involviert zu sein (Dudler *et al.*, 1991). Diese Kombination deutet auf einen Stoffwechselfad über GS-Konjugate und Deglycinierung hin. Ergänzt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass die GSH-defiziente Mutante *pad2* anfälliger für den Befall durch die Baumwolleneule (*Spodoptera littoralis*) ist. Von den Autoren der Studie wird daraus eine wichtige Rolle von GSH (und dadurch möglicherweise für GSTs und AtPCS1) als Cystein-Donor in der Glucosinolat-Synthese abgeleitet (Schlaeppli *et al.*, 2008). Die gleiche Funktion könnte GSH bei der Synthese von Camalexin haben (Glawischnig, 2007).

Um langfristig Ernteverluste durch Pflanzenpathogene zu verringern und geeignete Strategien in der Nutzpflanzenforschung anzuwenden, ist es erforderlich, die molekularen Prozesse aufzuklären, die den Infektionen von Pflanzen durch Pilze, Bakterien oder Viren zugrunde liegen (Scholthof, 2001; Ebbolle, 2007). In diesem Kontext scheint der genannte phytopathologische Befund, dass AtPCS1-Defizienz mit herabgesetzter Pathogenresistenz korreliert, ein aussichtsreicher Ansatzpunkt zu sein. Die Frage nach den physiologischen Zusammenhängen, die hinter dieser Beobachtung stecken, sollte durch vergleichende Metabolomanalysen von Wildtyp und AtPCS1-Mutanten intensiv bearbeitet werden.

#### **Abiotischer Stress: Bisher keine Anzeichen für eine Funktion von AtPCS1**

Weitere phänotypische Erscheinungen der PCS-defizienten Linien unter Bedingungen mit abiotischem Stress konnten nicht festgestellt werden. MCB-Markierung von Keimlingen, die bei 12 °C inkubiert wurden (Kältestress), ergab einen insgesamt reduzierten Metabolismus, d.h. geringere Konjugation von Biman an GSH und herabgesetzter Umsatz

zu C-Biman, jedoch keinen Unterschied zwischen Wildtyp und  $\Delta$ PCS. Ebenfalls kein Effekt war in ersten Versuchen mit Suspensionszellkulturen, die durch Zugabe von Mannitol ins Medium osmotischem Stress ausgesetzt wurden, zu erkennen.

In Keimlingen von Reis (*Oryza sativa*) führte Cd-Belastung zu einem Anstieg des Phytohormons Abscisinsäure (ABA) (Hsu and Kao, 2003). In transgenen Arabidopsis-Linien, die das Gen für die Luciferase unter der Kontrolle eines ABA-sensitiven Promotors enthielten, konnte jedoch bei Wachstum von Keimlingen auf Agarplatten mit Cd keine durch Bildung endogener ABA induzierte Luciferaseaktivität festgestellt werden. Die Untersuchung von  $\Delta$ PCS-Linien, in die ein ABA-sensitiver Reporter eingekreuzt worden war, im Vergleich zum WT ließ keine reproduzierbare Luciferaseaktivität erkennen. Somit konnte in Arabidopsis auch kein möglicher Zusammenhang zwischen PCS-Aktivität und ABA-Synthese bei Schwermetallstress gefunden werden.

### 4.3 Aspekte der zukünftigen Nutzung von Pflanzen

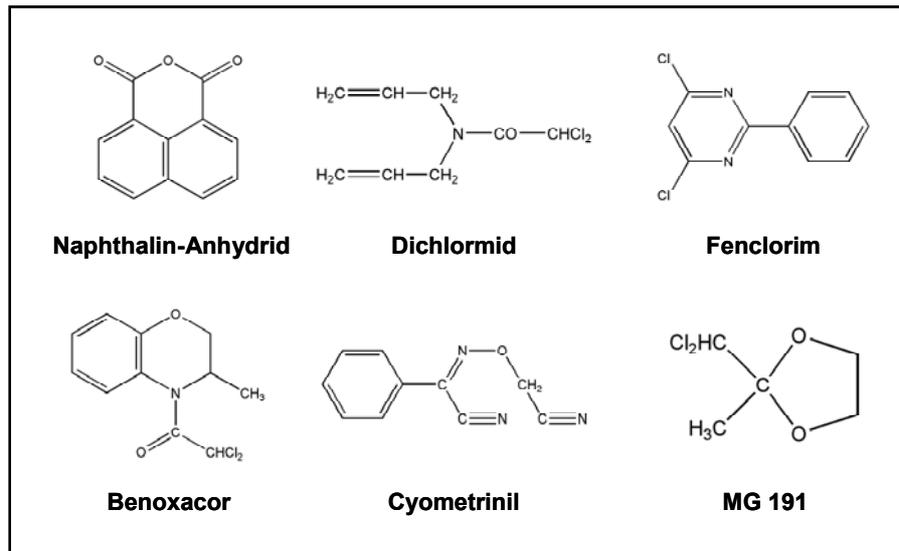
Der GSH- und GS-Konjugat Stoffwechsel ist für den Säugetierorganismus sehr gut beschrieben (Meister and Anderson, 1983; Meister, 1988a; Wang and Ballatori, 1998), während der Ablauf des pflanzlichen GSH-Metabolismus noch nicht vollständig geklärt ist (Martin *et al.*, 2007). Auch Pflanzen besitzen einen umfassenden GS-Konjugat Metabolismus, der allerdings ebenfalls noch nicht im Detail verstanden ist. Für den intrazellulären Abbau von GS-Konjugaten bestehen in Arabidopsis zwei alternative Wege: AtPCS1 vermittelt im Cytoplasma die Abspaltung des carboxyterminalen Glycins von GS-Konjugaten und es entstehen EC-Konjugate (Blum *et al.*, 2007), während in der Vakuole AtGGT4 unter Abspaltung des aminoterminalen Glutamats CG-Konjugate bildet (Grzam *et al.*, 2007; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b). Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit und von Ohkama-Ohtsu *et al.* (2007b) zeigen, dass sich die Inhibierung der Abbauewege für GS-Konjugate durch Ausschaltung von AtPCS1 und AtGGT4 nicht auf die Sensitivität gegenüber Herbiziden, die über Konjugation an GSH entgiftet werden (z.B. Atrazin, 2,4-D, Metolachlor), auswirkt. Wichtiger für eine Verringerung der Sensitivität gegenüber Herbiziden ist die Induktion von Enzymen der Phase I, z.B. Monooxygenasen (Davies, 2001; Behrens *et al.*, 2007), und Phase II, z.B. Glycosyltransferasen und GSTs (Marrs, 1996); darüber hinaus eine Aktivierung der ABC-Transporter vermittelten Sequestrierung von GS-Konjugaten in die Vakuole (Phase III) (Gaillard *et al.*, 1994) und die Induktion von Enzymen, die durch ihre Aktivität toxischen Effekten von Herbiziden wie z.B. oxidativem Stress entgegenwirken. Im Fall von Atrazin wurde dies für die Katalase gezeigt (Sulmon *et al.*, 2006). Für die zukünftige Nutzpflanzenforschung stellen diese Befunde wichtige Aspekte dar.

### **Anwendung von Herbiziden**

Ein massiver Ausbau der Produktion und Anwendung von Atrazin soll in Indien den Pflanzenschutz verbessern. Die schlechten Umwelteigenschaften dieses Herbizids (Toxizität für aquatische Organismen, Persistenz im Boden und Auftreten im Grundwasser) führten jedoch schon vor Jahren zu einem Verbot in Deutschland (1991) und Österreich (1995) (Hock *et al.*, 1995). Dies sollte zu einer sorgfältigen Abwägung von Strategien im Herbizideinsatz Anlass geben. Ein weiteres großes Problem im Zusammenhang mit der Anwendung von Herbiziden ist das Auftreten von herbizidresistenten Unkräutern. Die intensive Anwendung von Triazinen über mehrere Jahre auf den gleichen Flächen führte nicht nur zum Auftreten des Wirkstoffs im Grundwasser, sondern auch zur Selektion von triazinresistenten Unkräutern mit Mutationen im Bereich der  $Q_B$ -Bindestelle (Hock *et al.*, 1995). Zwar bewirken die Mutationen eine verringerte Photosyntheseleistung, sind aber in Anwesenheit des Herbizids ein Selektionsvorteil. Anders verhält es sich mit Auxin-Herbiziden, deren Vertreter Dicamba einen kostengünstigen und weit verbreiteten Wirkstoff mit guten Umwelteigenschaften darstellt (Behrens *et al.*, 2007). Obwohl Dicamba seit mehr als 40 Jahren angewendet wird, sind keine ökonomisch bedeutsamen Resistenzen bekannt geworden. Dies liegt wahrscheinlich an der universellen Bedeutung der Kontrolle von Wachstum und Entwicklung durch Auxin (Indol-3-Essigsäure, IAA). Besonders durch die abwechselnde Anwendung von Dicamba mit anderen Herbiziden, z.B. dem Totalherbizid Glyphosat (N-Phosphonomethylglycin), können nach Meinung der Autoren mögliche aufkommende Resistenzen wirkungsvoll unterdrückt werden (Behrens *et al.*, 2007). Gleichzeitig schlagen sie die Entwicklung von Dicamba-resistenten Nutzpflanzen vor, die das bakterielle Gen für die Dicamba-Monooxygenase (DMO) tragen. Dieses Enzym wandelt das aktive Molekül in 3,6-Dichlorsalicylsäure um, die keine Auxinwirkung mehr besitzt. Die von Behrens *et al.* (2007) in den Modellversuchen vorgestellte transgene Nutzpflanze ist Soja (*Glycine max*). Folglich bietet dieser Ansatz eine Möglichkeit, das bisherige Fehlen von Herbizidsafenern, die auch in dikotylen Pflanzen wirken, zu umgehen.

### **Herbizidsafener (*herbicide safener*)**

Agrochemikalien, die als Herbizidsafener bezeichnet werden (Abb. 4.9), sind ein Beispiel dafür, wie der Entgiftungsstoffwechsel in monokotylen Nutzpflanzen erfolgreich beeinflusst werden kann, ohne dass gentechnische Methoden erforderlich sind (Davies, 2001).



**Abb. 4.9: Beispiele für kommerziell hergestellte Herbizidsafener**

Naphthalin-Anhydrid (Naphthalin-1,8-dicarbonsäureanhydrid, NA) war der erste kommerziell vertriebene Herbizidsafener (Patent 1971) zum Schutz vor den Thiocarbamat-Herbiziden EPTC, Butylat und Vernolat, der nach kurzer Zeit von Dichlormid verdrängt wurde (Hatzios, 1983; Davies, 2001). Fenclorim schützt vor Pretilachlor, Benoxacor und Cyometrinil vor Metolachlor, beides Chloracetamid-Herbizide. Zum Schutz vor Thiocarbamat-Herbiziden wurde auch MG 191 entwickelt.

Ein bestimmter Herbizidsafener schützt monokotyle Nutzpflanzen vor einem bestimmten Herbizid oder einer Herbizidklasse, wobei entweder die Samen der Nutzpflanzen vorbehandelt werden oder der Safener zusammen mit dem Herbizid ausgebracht wird (Davies, 2001). Der Effekt von Herbizidsafenern besteht darin, dass sie die Aktivität von Enzymen des Entgiftungsstoffwechsels, darunter Cytochrom P450 Oxidasen, Glutathion S-Transferasen und Glycosyltransferasen, und von ABC-Transportern erhöhen (Gaillard *et al.*, 1994; Davies, 2001; Loutre *et al.*, 2003). Bei dem Herbizidsafener Fenclorim (Abb. 4.9) kommt es im Verlauf seiner Metabolisierung zur Bildung eines Zwischenprodukts, das zusätzlich zum Ausgangsmolekül eine stark induzierende Wirkung auf entgiftungsrelevante Enzyme besitzt (Brazier-Hicks *et al.*, 2008). Aber die selektive Wirkweise von Herbizidsafener-Substanzen auf bestimmte monokotyle Nutzpflanzen wie Mais, Hirse, Reis, Weizen und Gerste, während Unkräuter als Ziele der Herbizidbehandlung praktischerweise nicht geschützt werden, ist ungeklärt. Es wurde gezeigt, dass Promotoren von safener-induzierbaren Genen aus Mais auch in Arabidopsis durch diese Wirkstoffe aktiviert werden (De Veylder *et al.*, 1997). Dies könnte ein Ansatzpunkt sein, auch dikotyle Nutzpflanzen zu generieren, bei denen die Behandlung mit Herbizidsafenern eine effizientere Entgiftung von Herbiziden bewirkt (Davies, 2001).

### **Nutzung von Pflanzenarten mit extremen Eigenschaften**

Unter dem Begriff Phytoremediation versteht man die Nutzung von Pflanzen zur Sanierung von Böden, die z. B. mit Schwermetallen belastet sind (Salt *et al.*, 1998). Hierfür verwendete Arten sollten im Idealfall folgende Eigenschaften besitzen: (1) effiziente Aufnahme von Metallionen über die Wurzel und Transport der Phytochelatin-Metall-Komplexe in oberirdische Pflanzenteile, (2) Toleranz gegenüber den erreichten Metallkonzentrationen, (3) schnelles Wachstum und hohe Produktion von Biomasse, (4) weit verzweigtes Wurzelsystem für intensiven Kontakt mit dem Boden, (5) einfache Möglichkeit zur Ernte und Entsorgung (Eapen and D'Souza, 2005).

Ein bedeutender Hinweis für mögliche gentechnische Ansätze zur Herstellung von phytoremediationstauglichen Pflanzen gibt die Arbeit einer Gruppe von der Universität Heidelberg (Hanikenne *et al.*, 2008). In *Arabidopsis* ist das Protein HMA4 (HEAVY METAL ATPASE 4) verantwortlich für die Beladung des Xylems mit Metallionen für den Transport in den Spross (Axelsen and Palmgren, 2001; Talke *et al.*, 2006). Zusammen mit anderen Genen wird *HMA4* in *A. halleri*, einer metall-hyperakkumulierenden Art der Gattung *Arabidopsis*, stärker exprimiert als in *A. thaliana* (Becher *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2004). Es wurde nun gezeigt, dass die stärkere Expression von *HMA4* in *A. halleri* durch eine Verdreifachung des Gens und Mutationen in den jeweiligen cis-regulatorischen Bereichen erreicht wird (Hanikenne *et al.*, 2008). Dadurch kommt es zu einer verstärkten Beladung des Xylems mit Metallionen für den Transport in den Spross. Gleichzeitig werden Gene für Transportproteine zur Aufnahme von Metallionen aus dem Boden stärker exprimiert. Pflanzen von *A. thaliana*, die mit *AhHMA4*-cDNA unter der Kontrolle eines der *AhHMA4*-Promotoren transformiert wurden, zeigten einen verstärkten Transport von Metallionen aus der Wurzel in die Blätter, jedoch ist die Toleranz des Sprosses der natürlicherweise nicht-akkumulierenden Art für die dadurch erreichten Metallkonzentrationen ungenügend (Hanikenne *et al.*, 2008). Möglicherweise werden in *A. halleri* auch verstärkt Gene für Metallothioneine und Gene für Transporter im Tonoplasten zur Sequestrierung von Phytochelatin-Metall-Komplexen exprimiert. Die Synthese von PCs ist in hyperakkumulierenden Arten nicht erhöht (Ebbs *et al.*, 2002; Schat *et al.*, 2002) und die Beschränkung der PCS-Aktivität auf die Blätter, indem das Gen für AtPCS1 hinter einen konstitutiven blattspezifischen Promotor kloniert und in AtPCS1-defiziente *Arabidopsis*-Pflanzen eingebracht wurde, sorgte zwar für eine ausreichende Metalltoleranz der transgenen Pflanzen, aber führte nicht zu einer verstärkten Akkumulierung von Metallionen in den Blättern (Peterson and Oliver, 2006). Ein denkbarer Ansatz für die Entwicklung von Pflanzen für Zwecke der Phytoremediation ist somit, Arten, die mehr Biomasse produzieren als *Arabidopsis* (z.B. *Populus spec.*),

entsprechend der Befunde von Hanikenne *et al.* (2008) genetisch zu modifizieren, wie es in *A. halleri* von Natur aus geschehen ist. Allerdings hätte ein Transfer von künstlich eingebrachten Genen, die Metall-Hyperakkumulation vermitteln, auf Nahrungs- und Futtermittelpflanzen fatale Folgen. Deshalb muss sichergestellt sein, dass dies unterbunden wird.

Desweiteren sind wegen des sich abzeichnenden Klimawandels die genetischen Hintergründe für die Toleranz von Trocken- und Salzstress interessant. Gehäuft auftretende Überflutung von Ackerland mit Salzwasser oder die Versalzung von Böden in großflächig bewässerten Anbaugebieten gefährden eine nachhaltige landwirtschaftliche Nutzung (Zhu, 2001). Eine nahe Verwandte der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* ist *Thellungiella halophila* (Salzkresse), die im Gegensatz zu *Arabidopsis* eine hohe Toleranz gegenüber Trocken- und Salzstress besitzt (Inan *et al.*, 2004; Amtmann *et al.*, 2005). In vergleichenden Genomanalysen und Versuchen mit mutagenisierten Samen von *Thellungiella* (Inan *et al.*, 2004; Taji *et al.*, 2004) werden die genetischen Grundlagen für die unterschiedlichen Toleranzeigenschaften untersucht. Desweiteren ist die Entwicklung effizienter Methoden für die Suche nach den genetischen Grundlagen für bestimmte physiologische Eigenschaften (Salztoleranz, erhöhter Zuckergehalt oder Akkumulierung bestimmter Sekundärmetabolite) eine wichtige Voraussetzung für die gezielte Generierung von Nutzpflanzen mit spezifischen Eigenschaften (Tanksley and McCouch, 1997; Fridman *et al.*, 2004). Der Auswahl- und Züchtungsprozess, der zu unseren modernen Kulturvarietäten führte, verlief auf Kosten der ursprünglichen genetischen Variation in den Wildformen (Tanksley and McCouch, 1997). Verloren gegangene Allele können nur aus den Wildformen der heutigen Kulturpflanzen zurückgewonnen werden. Deshalb sollte neben der umweltverträglichen Weiterentwicklung von Maßnahmen für einen verlustarmen Anbau von Nutzpflanzen das genetische Potenzial von Wildformen, das in Samenbanken gespeichert ist, ausgeschöpft werden (Tanksley and McCouch, 1997). Es ist nicht auszuschließen, dass dabei auch Allele gefunden werden, die im Zusammenhang mit einer Verbesserung der Herbizidresistenz oder der Metabolisierung von Fremdstoff-Konjugaten genutzt werden können. Besonders der Abbau von Xenobiotika in Nutzpflanzen ist zur Reduzierung von Herbizidrückständen in Nahrungs- und Futtermitteln von Interesse (Hock *et al.*, 1995). Mit der Beschreibung des AtPCS1-vermittelten cytosolischen Abbauwegs für GS-Biman wurde ein wichtiger Beitrag zur Aufklärung des Metabolismus von GS-Konjugaten in Pflanzen geleistet.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Entgiftung von Xenobiotika ist für alle Organismen von zentraler Bedeutung. In Pflanzen werden Schwermetallionen von Phytochelatinen komplexiert und elektrophile Fremdstoffmoleküle an Aminosäuren, Glycosylreste oder Glutathion konjugiert. Sowohl Phytochelatin-Metall-Komplexe als auch Glutathion-Konjugate werden in die Vakuole der Pflanze transportiert, um sie dem aktiven Stoffwechselgeschehen zu entziehen. Xenobiotika-Konjugate durchlaufen nachfolgend eine umfassende Metabolisierung.

In Versuchen mit dem Modellxenobiotikum Monochlorobiman wurde in dieser Arbeit eindeutig gezeigt, dass die Phytochelatinsynthese mit der Abspaltung des Glycins *in planta* den Abbau von Glutathion-Konjugaten initiiert. Dabei kamen mit Protoplasten, Zellsuspensionskulturen und Keimlingen drei verschiedene pflanzliche Systeme zum Einsatz. In Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation mittels GFP-Fusionskonstrukten wurde AtPCS1 im Cytosol lokalisiert. Somit wurde erstmalig ein Phytochelatinsynthese (AtPCS1)-vermittelter cytosolischer Abbauweg für Glutathion-Konjugate in der Pflanze nachgewiesen. Die zweite Phytochelatinsynthese in Arabidopsis, AtPCS2, trug in allen Versuchen nicht wesentlich zu PCS-spezifischen Funktionen bei.

Für  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen sind in Arabidopsis vier Gene bekannt. Von diesen Enzymen sind zwei extrazellulär und eines vakuolär lokalisiert. Der Einbezug der vakuolären  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase in die Versuche mit Monochlorobiman bestätigte einen zweiten Abbauweg für Glutathion-Konjugate in der Vakuole.

Ergänzende Befunde sprechen dafür, dass AtPCS1 eine Funktion in der Regulation der Infektionsanfälligkeit von Arabidopsis gegenüber Pathogenen besitzt. Der von AtPCS1 katalysierte Abbau von Glutathion-Konjugaten bildet die Basis für weiterführende Analysen zur Bestimmung möglicher Metabolite, die an einem AtPCS1-vermittelten Stoffwechselweg im Zusammenhang mit der Antwort auf Pathogenbefall beteiligt sind.

## SUMMARY

Detoxification of xenobiotic compounds is a pivotal capacity of organisms. In plants, heavy metal ions are complexed by phytochelatins and electrophilic compounds are conjugated to amino acids, glycosyl residues or glutathione. Both phytochelatin metal complexes and glutathione conjugates are transported to the vacuolar compartment and thus removed from active metabolic processes in the cell. Following sequestration, xenobiotic conjugates undergo a complex turnover.

Feeding experiments with the model xenobiotic monochlorobimane unequivocally demonstrated in this contribution the initiation of glutathione conjugate degradation from the carboxyterminus by phytochelatin synthase (AtPCS1) *in planta*. Three different plant systems, protoplasts, cell suspension cultures and seedlings, have been used in the analyses. Confocal fluorescence microscopy of stably transformed Arabidopsis carrying phytochelatin synthase GFP fusion genes revealed the localisation of AtPCS1 in the cytosol. Thus, a novel cytosolic degradation pathway for glutathione conjugates mediated by AtPCS1 has been described for plants. The second phytochelatin synthase of Arabidopsis, AtPCS2, showed no considerable contribution to PCS specific functions in all experiments.

In Arabidopsis, four genes for  $\gamma$ -glutamyl transpeptidases are annotated. Two of these enzymes are located extracellularly and one has been ascribed to the vacuole. The latter was included in the feeding experiments with monochlorobimane and the results confirmed a second glutathione conjugate degradation pathway in the vacuole of the plant.

Additional findings indicate a function of AtPCS1 in the regulation of pathogen attack response. The AtPCS1 catalysed breakdown of glutathione conjugates presents a basis for further analyses to determine an AtPCS1 mediated metabolic pathway that is involved in pathogen attack responses.

## 6. ANHANG

### 6.1 Nährmedien

#### LS-Medium

Dieses nach Linsmaier und Skoog (Linsmaier and Skoog, 1965) modifizierte Medium wurde für Arabidopsis Zellsuspensionskulturen verwendet. Tab. 6.1 listet die Mengen der enthaltenen Salze auf. Mit NaOH oder HCl wurde der pH-Wert auf 6,0 eingestellt. Vor Einsatz in Zellkulturen wurde das Medium mit 0,1 mg/L Kinetin und 0,5 mg/L Naphthalinessigsäure versetzt.

Komponente	g/Liter	Komponente	mg/Liter
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,65	Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	37,300
KNO <sub>3</sub>	1,90	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	27,800
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,37	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,17	MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	22,300
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,44	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	10,59
Meso-Inosit	0,10	KJ	0,830
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,250
		CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,025
		CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,025
		Thiaminiumdichlorid	0,400

Tab. 6.1: Salze für LS-Medium (1x)

**B5-Medium**

Das verwendete B5-Medium orientiert sich an den Angaben von Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968).

Komponente	g/Liter	Komponente	mg/Liter
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,726	KJ	7,50
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,500	MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	100,00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,340	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30,00
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,500	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	30,00
KNO <sub>3</sub>	25,000	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	2,50
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,256	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	3,91
Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	0,380	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	2,50

Tab. 6.2: Salze für B5-Medium (10x)

Komponente	g/Liter
Nikotinsäure	0,4
Pyridoxin-HCl	0,4
Thiamin-HCl	4,0
Myo-Inositol	40,0

Tab. 6.3: Vitamine für B5-Medium (400x)

Komponente	Vorgabe
B5-Salze	1x
B5-Vitamine	1x
Sucrose	20 g/Liter
pH-Wert	5,5 mit NaOH einstellen

Tab. 6.4: Zusammensetzung von B5-Medium aus den Stammlösungen

**MS-Medium**

Für Anzuchtplatten und Wurzelwachstumstests wurde das weit verbreitete Medium nach Murashige und Skoog verwendet (Murashige and Skoog, 1962).

<b>Komponente</b>	<b>g/Liter</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16,50
KNO <sub>3</sub>	19,00
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	3,32
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,70
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	3,70

**Tab. 6.5: Makrosalze für MS-Medium (10x)**

<b>Komponente</b>	<b>g/Liter</b>
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,01
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,01
Na <sub>2</sub> EDTA	14,60
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,20
KJ	0,30
MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	4,00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,10
ZnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,80
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	11,20

**Tab. 6.6: Mikrosalze für MS-Medium (400x)**

<b>Komponente</b>	<b>Vorgabe</b>
MS-Makrosalze	1x
MS-Mikrosalze	1x
B5-Vitamine	1x
Sucrose	10 g/Liter
MES	1 g/Liter
pH-Wert	5,6 mit KOH einstellen

**Tab. 6.7: Zusammensetzung von MS-Medium aus den Stammlösungen**

**BG-11 Medium für Cyanobakterien**

Modifiziert nach (Stanier *et al.*, 1971).

Die Salze sollten getrennt gelöst und autoklaviert werden und erst unmittelbar vor Gebrauch zusammen mit dem *trace metal mix* zum BG-11 Medium (alle Komponenten 1x) gemischt werden.

Für Stickstoff fixierende Cyanobakterien kann  $\text{NaNO}_3$  durch  $\text{NaHCO}_3$  ersetzt werden (BG-11<sub>0</sub> Medium).

Komponente	g/Liter	Stammlsg.-Konzentration
$\text{NaNO}_3$	150	100x
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	30,5	1000x
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	75	1000x
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	36	1000x
Citrat	6	1000x
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	6	1000x
EDTA	1	1000x
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	20	1000x

**Tab. 6.8: Zusammensetzung von BG-11 Medium**

Komponente	g/Liter
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2,860
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	1,810
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,222
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,390
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,079
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,050

**Tab. 6.9: Zusammensetzung des *trace metal mix* (1000x)**

Die Spurenelemente (Mikrosalze) sind dem Medium gesondert zuzusetzen (EK 1x).

## 6.2 Oligonukleotide

Die folgende Auflistung enthält alle Oligonukleotide (Primer), die in dieser Arbeit für Klonierungen und Sequenzierungen verwendet wurden. Enthaltene Restriktionsschnittstellen sind durch Fettdruck hervorgehoben. Abkürzungen: for, Sense-Primer; rev, Antisense-Primer; oT, ohne STOP-Codon.

<b>Nr.</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5' → 3'</b>
01	Fish1	5'-CTGGGAATGGCGAAATCAAGGCATC-3'
02	Fish2	5'-CAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCA-3'
03	AtPCS1_135f	5'-TTTATATCGGCGATCTCTTCCTTCTCCTCC-3'
04	AtPCS1_635rev	5'-GTTCCCTTTCTGAAGCGCTTC-3'
04a	AtPCS1_627f	5'-AATCTTCAATGAAGCGCTTCAGAAAG-3'
04b	AtPCS1_861r	5'-GATTCATCAAACCACCTCCAAGGCC-3'
05	AtPCS1_1282for	5'-GGAAGCCATGGACAGTATTG-3'
06	AtPCS1_1880rev	5'-TTCTCCTCTGCGCTGAGATT-3'
07	AtPCS1_5'UTR_rev	5'-TGAATTCTTTTCACTGCTTGTTTTGG-3'
07a	AtPCS2_1294r	5'-CCAATAGGTGAAAAGTGGCCAGTCC-3'
08	AtPCS2_2712rev	5'-GTAACCCACCAAAGGAAAACG-3'
09	AtPCS2_2369rev	5'-GATGGGTAAGCTACCACTGT-3'
10	AtPCS2_922for	5'-AATGTTGCGAGCCGCTTGAA-3'
11	AtPCS2_1854rev	5'-TGATTTACATCCTCTGTTCTTCGAATCTC-3'
12	AtPCS2_2740rev	5'-TCAAGTTGGCGTCGTAGATG-3'
13	AtPCS2_2801rev	5'-TGATTAGGCAGGAGCAGAGA-3'
14	AtPCS2_1566for	5'-CCACAGAGAACCAGGATTG-3'
15	AtPCS2_2102rev	5'-GGCAGATTGTCTTCGTACAC-3'
16	GGT4_for	5'-CGGACAGGTTTTGAAAACCG-3'
17	GGT4_rev	5'-AGTACTCAGGTGGGAATGTCGTGT-3'
18	Ds5'-1	5'-ACGGTCGGGAAACTAGCTCTAC-3'
19	Aktin_for	5'-TGGGATGACATGGAGAAGAT-3'
20	Aktin_rev	5'-ATACCAATCATAGATGGCTGG-3'
21	NsPCS_EcoRI_for	5'-TATATAG <b>AATTC</b> ATGATAGTTATGAAACTCTTTATC-3'

<b>Nr.</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5' → 3'</b>
24	NsPCS_Sal_Aat_rev	5'-TATAG <b>T<b>CGACG</b>TC</b> GCATCTTGTGTTTTACTTACG-3'
25	NsPCS_Sal_Sac_rev	5'-TATAG <b>T<b>CGACGAG</b>CT</b> CTAATCTTGTGTTTTACTTACG-3'
26	BjPCS_EcoRI_for	5'-TATATAG <b>AATTC</b> ATGAAGCGATGGCGCTAC-3'
27	BjPCS_Sal_rev	5'-TATATAG <b>T<b>CGACT</b></b> TACTCTATCAACAGCAGCCC-3'
28	AtPCS1BamH_for	5'-TATATATAG <b>GATCC</b> ATGGCTATGGCGAGTTTA-3'
29	AtPCS1_EcoRI_for	5'-TATATATAG <b>AATTC</b> ATGGCTATGGCGAGTTTA-3'
30	AtPCS1oT_Xho_rev	5'-TATATATA <b>CT<b>CGAG</b></b> ATAGCAGGAGCAGCGAG-3'
31	AtPCS1-N-Sal-Sac-rev	5'-TAG <b>T<b>CGACGAG</b>CT</b> CTATCTAGATATGAGCATGAACC-3'
32	AtPCS1-N-Sal-Aat-rev	5'-TATAG <b>T<b>CGACG</b>TC</b> GCTCTAGATATGAGCATGAACC-3'
33	AtPCS1-SacSal-R full CDS	5'-TATAG <b>T<b>CGACGAG</b>CT</b> CTAATAGGCAGGAGCAGCG-3'
34	AtPCS2oT_Xho_rev	5'-TATATATA <b>CT<b>CGAG</b></b> GGCAGGAGCAGAGAGTTC-3'
35	AtPCS2-for_BamHI	5'-TATATATAG <b>GATCC</b> ATGTCTATGGCGAGTTTGTA-3'
36	AtPCS2-rev_Xho	5'-TATATATA <b>CT<b>CGAG</b></b> TTAGGCAGGAGCAGAGAGTT-3'
37	AtPCS2-Mitte-for_BamHI	5'-TATATATAG <b>GATCC</b> ATGCACAGAGAACCAGGATT-3'
38	AtPCS2mirev_XhoI	5'-TATATATA <b>CT<b>CGAG</b></b> TTATCTTGATATAAGCATGAACC-3'
39	AtPCS2-MunI-F	5'-TAT <b>CAATTG</b> ATGTCTATGGCGAGTTTGTA-3'
40	AtPCS2SacXhoR full CDS	5'-TAT <b>CT<b>CGAG</b>CT</b> TTAGGCAGGAGCAGAGAGTT-3'
41	AtPCS2SacXho218tr rev	5'-TAT <b>CT<b>CGAG</b>CT</b> TTATCTTGATATAAGCATGAACC-3'
42	AtPCS1_Asc_for	5'-TATATATAG <b>GC<b>CGCC</b></b> ATGGCTATGGCGAGTTTA-3'
43	AtPCS1oT_Aat_rev	5'-TATATATAG <b>AC<b>GT</b>CG</b> CATAGGCAGGAGCAGCG-3'
44	AtPCS2_Asc_for	5'-TATATATAG <b>GC<b>CGCC</b></b> ATGTCTATGGCGAGTTTG-3'
45	AtPCS2oT_Aat_rev	5'-TATATATAG <b>AC<b>GT</b>CG</b> CAGGAGCAGAGAGTTCT-3'
46	AtPCS1_Mlu_rev	5'-TATATA <b>AC<b>CG</b>GT</b> AGAAAGAGCATTCAACACC-3'
47	AtPCS1_2kbBam_for	5'-TATATAG <b>GATCC</b> ATGTAGGGAATCTGAGAACC-3'
48	AtPCS2_2kbBam_for	5'-TATATAG <b>GATCC</b> TGGCCAATATGTTGTTTCC-3'
48a	AtPCS2_BglII_rev	5'-TATATA <b>A<b>GA</b>TCT</b> CTCACCAACAACAACTTAACTTG-3'
49	AtPCS1-2kbP_EcoRI_rev	5'- <b>T<b>GAATTC</b></b> TTTTCACTGCTTGTGTTTGG-3'
50	AtPCS1eP_Hind_fo	5'-TATATATA <b>A<b>AG</b>CT</b> TCTCAGAACAAGGCTACTGTT-3'
51	CYC_rev	TTCGGTTAGAGCGGATGTGG
52	GPD_for	CCAGAACTTAGTTTTCGACGG

<b>Nr.</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'→ 3'</b>
53	GAL_for	CCCGGATTCTAGAACTAGTGGA
55	EGFP_rev	ACTTGTGGCCGTTTACGTCG
56	T3_for	AATTAACCCTCACTAAAGGG
57	NOS_rev	GATCTAGTAACATAG
58	pBI121_check_for	CCAGGCTTTACACTTTATGCTTCC
59	pBI121_check_rev	GGGCCTCTTCGCTATTACGCCAG
60	pBI121_Kan_for	GGATCTCCTGTCATCT
61	pBI121_Kan_rev	GATCATCCTGATCGAC

**Tab. 6.10: Verzeichnis der verwendeten Oligonukleotide (Primer)**

### 6.3 Plasmidkonstrukte in der Stammsammlung

Tab. 6.11 enthält die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren mit Name des Konstrukts und zugehöriger Registrierungsnummer in der Stammsammlung des Lehrstuhls. Die Stämme sind als Glycerolstocks bei -80 °C gelagert. Abkürzungen: EC, *E. coli*; AT, *A. tumefaciens*; 2kbProm, 2025 bp langes endogenes Promotorstück von AtPCS1.

Nr.	Organismus	Konstrukt
62	EC, DH5 $\alpha$	-
812	EC, DH5 $\alpha$	pBI121
813	EC, DH5 $\alpha$	pBI221
1253	EC, DH5 $\alpha$	pBI221-35S::AtPCS1
1499	EC, DH5 $\alpha$	p426GPD-Nostoc alr0975 clone 2
1500	EC, DH5 $\alpha$	p426GPD-Nostoc alr0975 clone 3
1501	EC, DH5 $\alpha$	p426GPD-Bradyrhizobium bll7663 clone 2
1502	EC, DH5 $\alpha$	p426GPD-Bradyrhizobium bll7663 clone3
1589	EC, DH5 $\alpha$	pBI121-2kbPromAtPCS1-alr0975-EGFP-ocs3-nos
1590	EC, DH5 $\alpha$	pBI121-2kbPromAtPCS1-alr0975-EGFP-ocs3-nos
1596	EC, DH5 $\alpha$	pBI121-2kbPromAtPCS1-AtPCS1-218tr-EGFP-ocs3-nos
1597	EC, DH5 $\alpha$	pBI121-2kbPromAtPCS1-AtPCS1-218tr-EGFP-ocs3-nos
1598	EC, DH5 $\alpha$	pBI121-2kbPromAtPCS1-AtPCS1-218tr-nos
1599	EC, DH5 $\alpha$	pBI121-2kbPromAtPCS1-AtPCS1-218tr-nos
1611	EC, DH5 $\alpha$	pBI121-2kbPromAtPCS1-AtPCS1FULLcDNA-nos
1612	EC, DH5 $\alpha$	pBI121-2kbPromAtPCS1-AtPCS1FULLcDNA-nos
1613	EC, DH5 $\alpha$	pBI121-2kbPromAtPCS1-AtPCS2FULLcDNA-nos
1614	EC, DH5 $\alpha$	pBI121-2kbPromAtPCS1-AtPCS2FULLcDNA-nos
1615	EC, DH5 $\alpha$	pBI121-2kbPromAtPCS1-AtPCS2-218tr-nos
1616	EC, DH5 $\alpha$	pBI121-2kbPromAtPCS1-AtPCS2-218tr-nos
1617	EC, DH5 $\alpha$	pBI121-2kbPromAtPCS1-alr0975-nos
1618	EC, DH5 $\alpha$	pBI121-2kbPromAtPCS1-alr0975-nos
1619	EC, DH5 $\alpha$	pSK(Ascl)-2kbPromAtPCS1-alr0975-nos

<b>Nr.</b>	<b>Organismus</b>	<b>Konstrukt</b>
1620	EC, DH5 $\alpha$	pSK(Ascl)-2kbPromAtPCS1-alr0975-nos
1621	EC, DH5 $\alpha$	pSK(Ascl)-2kbPromAtPCS1-alr0975-EGFP-ocs3-nos
1622	EC, DH5 $\alpha$	pSK(Ascl)-2kbPromAtPCS1-alr0975-EGFP-ocs3-nos
1623	EC, DH5 $\alpha$	pSK(Ascl)-2kbPromAtPCS1-AtPCS1-218tr-EGFP-ocs3-nos
1624	EC, DH5 $\alpha$	pSK(Ascl)-2kbPromAtPCS1-AtPCS1-218tr-EGFP-ocs3-nos
1625	EC, DH5 $\alpha$	pSK(Ascl)-2kbPromAtPCS1-AtPCS1-218tr-nos
1626	EC, DH5 $\alpha$	pSK(Ascl)-2kbPromAtPCS1-AtPCS1-218tr-nos
1627	EC, DH5 $\alpha$	pSK(Ascl)-2kbPromAtPCS1-AtPCS2-218tr-nos
1628	EC, DH5 $\alpha$	pSK(Ascl)-2kbPromAtPCS1-AtPCS2-218tr-nos
1629	EC, DH5 $\alpha$	pSK(Ascl)-2kbPromAtPCS1-AtPCS1-FULLcDNA-nos
1630	EC, DH5 $\alpha$	pSK(Ascl)-2kbPromAtPCS1-AtPCS1-FULLcDNA-nos
1631	EC, DH5 $\alpha$	pSK(Ascl)-2kbPromAtPCS1-AtPCS2-FULLcDNA-nos
1632	EC, DH5 $\alpha$	pSK(Ascl)-2kbPromAtPCS1-AtPCS2-FULLcDNA-nos
1633	AT	pBI121-2kbPromAtPCS1-alr0975-EGFP-ocs3-nos
1634	AT	pBI121-2kbPromAtPCS1-alr0975-EGFP-ocs3-nos
1635	AT	pBI121-2kbPromAtPCS1-alr0975-nos
1636	AT	pBI121-2kbPromAtPCS1-alr0975-nos
1637	AT	pBI121-2kbPromAtPCS1-PCS1tr-EGFP
1638	AT	pBI121-2kbPromAtPCS1-PCS1tr-EGFP
1639	AT	pBI121-2kbPromAtPCS1-PCS1tr-nos
1640	AT	pBI121-2kbPromAtPCS1-PCS1tr-nos
1641	AT	pBI121-2kbPromAtPCS1-PCS2tr-nos
1642	AT	pBI121-2kbPromAtPCS1-PCS2tr-nos
1643	AT	pBI121-2kbPromAtPCS1-PCS1-full-nos
1644	AT	pBI121-2kbPromAtPCS1-PCS1-full-nos
1645	AT	pBI121-2kbPromAtPCS1-PCS2-full-nos
1646	AT	pBI121-2kbPromAtPCS1-PCS2-full-nos
1650	EC, DH5 $\alpha$	pSH-AtPCS1-218tr-SacSal
1651	EC, DH5 $\alpha$	pSH-AtPCS1-218tr-SacSal
1652	EC, DH5 $\alpha$	pSH-alr0975-SacSal

<b>Nr.</b>	<b>Organismus</b>	<b>Konstrukt</b>
<b>1653</b>	EC, DH5 $\alpha$	pSH-ahr0975-SacSal
<b>1654</b>	EC, DH5 $\alpha$	p426GPD-2kbPromAtPCS1-AtPCS1-218tr-AatSal
<b>1655</b>	EC, DH5 $\alpha$	p426GPD-2kbPromAtPCS1-AtPCS1-218tr-AatSal
<b>1656</b>	EC, DH5 $\alpha$	p426GPD-2kbPromAtPCS1-AtPCS1-218tr-SacSal
<b>1657</b>	EC, DH5 $\alpha$	p426GPD-2kbPromAtPCS1-AtPCS1-218tr-SacSal
<b>1658</b>	EC, DH5 $\alpha$	p426GPD-2kbPromAtPCS1-AtPCS1-FULLcDNA-SacSal
<b>1659</b>	EC, DH5 $\alpha$	p426GPD-2kbPromAtPCS1-AtPCS2-FULLcDNA-SacSal
<b>1841</b>	AT	pBI121-pAtPCS2::AtPCS2::EGFP::ocs3::nos (#63RB; with #1844)
<b>1842</b>	AT	pBI121-pAtPCS1::AtPCS1::EGFP::ocs3::nos (#66RB; with 1843)
<b>1843</b>	EC, DH5 $\alpha$	pSK(Ascl)-pAtPCS1::AtPCS1::EGFP::ocs3::nos (#42RB; clone 1)
<b>1844</b>	EC, DH5 $\alpha$	pSK(Ascl)-pAtPCS2::AtPCS2::EGFP::ocs3::nos (#54RB; clone 3)
<b>1845</b>	EC, DH5 $\alpha$	pSK(Ascl)-pAtPCS2::AtPCS2::EGFP::ocs3::nos (#55RB; clone 7)
<b>1846</b>	EC, DH5 $\alpha$	pSK(Ascl)-pAtPCS2::AtPCS2::EGFP::ocs3::nos (#56RB; clone 8)

**Tab. 6.11:** In der Stammsammlung hinterlegte Stämme von *E. coli* und *A. tumefaciens*

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abdel-Ghany, S. E. and Pilon, M.** (2008). MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in Arabidopsis. *J Biol Chem* 283: 15932-15945.
- Abel, S. and Theologis, A.** (1994). Transient transformation of Arabidopsis leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression. *Plant J* 5: 421-427.
- Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, B. and Starke, K., Eds.** (2005). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Elsevier Urban und Fischer, München.
- Alfenito, M. R., Souer, E., Goodman, C. D., Buell, R., Mol, J., Koes, R. and Walbot, V.** (1998). Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *Plant Cell* 10: 1135-1149.
- 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: 385-396.
- Amtmann, A., Bohnert, H. J. and Bressan, R. A.** (2005). Abiotic stress and plant genome evolution. Search for new models. *Plant Physiol* 138: 127-130.
- Anders, M. W., Lash, L., Dekant, W., Elfarrar, A. A. and Dohn, D. R.** (1988). Biosynthesis and biotransformation of glutathione S-conjugates to toxic metabolites. *Crit Rev Toxicol* 18: 311-341.
- Axelsen, K. B. and Palmgren, M. G.** (2001). Inventory of the superfamily of P-Type ion pumps in Arabidopsis. *Plant Physiol* 126: 696-706.
- Bald, D., Amano, T., Muneyuki, E., Pitard, B., Rigaud, J. L., Kruij, J., Hisabori, T., Yoshida, M. and Shibata, M.** (1998). ATP synthesis by F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase independent of noncatalytic nucleotide binding sites and insensitive to azide inhibition. *J Biol Chem* 273: 865-870.
- Ball, L., Accotto, G. P., Bechtold, U., Creissen, G., Funck, D., Jimenez, A., Kular, B., Leyland, N., Mejia-Carranza, J., Reynolds, H., Karpinski, S. and Mullineaux, P. M.** (2004). Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 2448-2462.
- Becher, M., Talke, I. N., Krall, L. and Kramer, U.** (2004). Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator Arabidopsis halleri. *Plant J* 37: 251-268.
- Beck, A., Lendzian, K., Oven, M., Christmann, A. and Grill, E.** (2003). Phytochelatin synthase catalyzes key step in turnover of glutathione conjugates. *Phytochemistry* 62: 423-431.
- Bednarek, P., Pislewska-Bednarek, M., Svatos, A., Schneider, B., Doubek, J., Mansurova, M., Humphry, M., Consonni, C., Panstruga, R., Sanchez-Vallet, A., Molina, A. and Schulze-Lefert, P.** (2009). A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science* 323: 101-106.

**Behrens, M. R., Mutlu, N., Chakraborty, S., Dumitru, R., Jiang, W. Z., LaVallee, B. J., Herman, P. L., Clemente, T. E. and Weeks, D. P.** (2007). Dicamba Resistance: Enlarging and Preserving Biotechnology-Based Weed Management Strategies. *Science* 316: 1185-1188.

**Benloch, M., Ortega, A., Ferrer, P., Segarra, R., Obrador, E., Asensi, M., Carretero, J. and Estrela, J. M.** (2005). Acceleration of glutathione efflux and inhibition of gamma-glutamyltranspeptidase sensitize metastatic B16 melanoma cells to endothelium-induced cytotoxicity. *J Biol Chem* 280: 6950-6959.

**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: 140-148.

**Binz, P.-A. and Kagi, J. H. R.** (1999). Metallothionein: molecular evolution and classification. In: Metallothionein IV. C. Klaassen, Eds., Birkhauser Verlag, Basel. pp. 7-13.

**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: 740-749.

**BMELV** (2007). Statistisches Jahrbuch über Ernährung, Landwirtschaft und Forsten der Bundesrepublik Deutschland. Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster-Hiltrup.

**Borner, G. H., Lilley, K. S., Stevens, T. J. and Dupree, P.** (2003). Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Arabidopsis*. A proteomic and genomic analysis. *Plant Physiol* 132: 568-577.

**Bowler, M. W., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. and Walker, J. E.** (2006). How azide inhibits ATP hydrolysis by the F-ATPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 8646-8649.

**Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

**Brazier-Hicks, M., Evans, K. M., Cunningham, O. D., Hodgson, D. R., Steel, P. G. and Edwards, R.** (2008). Catabolism of Glutathione Conjugates in *Arabidopsis thaliana*: ROLE IN METABOLIC REACTIVATION OF THE HERBICIDE SAFENER FENCLORIM. *J Biol Chem* 283: 21102-21112.

**Burger, J.** (2008). Assessment and management of risk to wildlife from cadmium. *Sci Total Environ* 389: 37-45.

**Cairns, N. G., Pasternak, M., Wachter, A., Cobbett, C. S. and Meyer, A. J.** (2006). Maturation of *Arabidopsis* seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. *Plant Physiol* 141: 446-455.

**Cazale, A. C. and Clemens, S.** (2001). *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase. *FEBS Lett* 507: 215-219.

**Chen, J., Zhou, J. and Goldsbrough, P.** (1997). Characterization of phytochelatin synthase from tomato. *Physiol plant* 101: 165-172.

**Cheng, J. C., Seeley, K. A. and Sung, Z. R.** (1995). RML1 and RML2, Arabidopsis genes required for cell proliferation at the root tip. *Plant Physiol* 107: 365-376.

**Clemens, S.** (2006). Evolution and function of phytochelatin synthases. *J Plant Physiol* 163: 319-332.

**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: 3325-3333.

**Clemens, S., Schroeder, J. I. and Degenkolb, T.** (2001). *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. *Eur J Biochem* 268: 3640-3643.

**Clough, S. J.** (2005). Floral dip: agrobacterium-mediated germ line transformation. *Methods Mol Biol* 286: 91-102.

**Clough, S. J. and Bent, A. F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735-743.

**Cobbett, C. and Goldsbrough, P.** (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53: 159-182.

**Cobbett, C. S., May, M. J., Howden, R. and Rolls, B.** (1998). The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in gamma-glutamylcysteine synthetase. *Plant J* 16: 73-78.

**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 and Environment* 20: 449-460.

**Crowe, J. H., Crowe, L. M. and Chapman, D.** (1984). Preservation of membranes in anhydrophobic organisms: the role of trehalose. *Science* 223: 701-703.

**Cutler, S. R., Ehrhardt, D. W., Griffiths, J. S. and Somerville, C. R.** (2000). Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3718-3723.

**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: 282-290.

**Davies, J.** (2001). Herbicide safeners - commercial products and tools for agrochemical research. *Pesticide Outlook* 12: 10-15.

**De Veylder, L., Van Montagu, M. and Inze, D.** (1997). Herbicide safener-inducible gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 38: 568-577.

**Dean, J. V., Devarenne, T. P., Lee, I. S. and Orlofsky, L. E.** (1995). Properties of a Maize Glutathione S-Transferase That Conjugates Coumaric Acid and Other Phenylpropanoids. *Plant Physiol* 108: 985-994.

**Dietz, K. J.** (2003). Plant peroxiredoxins. *Annu Rev Plant Biol* 54: 93-107.

- Dixon, D. P., Laphorn, A., Madesis, P., Mudd, E. A., Day, A. and Edwards, R.** (2008). Binding and Glutathione Conjugation of Porphyrinogens by Plant Glutathione Transferases. *J Biol Chem* 283: 20268-20276.
- Dixon, D. P., Skipsey, M., Grundy, N. M. and Edwards, R.** (2005). Stress-induced protein S-glutathionylation in Arabidopsis. *Plant Physiol* 138: 2233-2244.
- Dong, R.** (2005). Molecular cloning and characterization of a phytochelatin synthase gene, PvPCS1, from *Pteris vittata* L. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32: 527-533.
- Doyle, T. and Botstein, D.** (1996). Movement of yeast cortical actin cytoskeleton visualized in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3886-3891.
- Dudler, R., Hertig, C., Rebmann, G., Bull, J. and Mauch, F.** (1991). A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione-S-transferases. *Mol Plant Microbe Interact* 4: 14-18.
- Eapen, S. and D'Souza, S. F.** (2005). Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnol Adv* 23: 97-114.
- Ebbole, D. J.** (2007). Magnaporthe as a model for understanding host-pathogen interactions. *Annu Rev Phytopathol* 45: 437-456.
- Ebbs, S., Lau, I., Ahner, B. and Kochian, L.** (2002). Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (J. & C. Presl). *Planta* 214: 635-640.
- Edwards, R., Dixon, D. P. and Walbot, V.** (2000). Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci* 5: 193-198.
- Elfarra, A. A. and Anders, M. W.** (1984). Renal processing of glutathione conjugates. Role in nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* 33: 3729-3732.
- Elmsley, J.** (2001). Nature's Building Blocks. An A-Z Guide to the Elements. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Essigmann, J. M., Croy, R. G., Bennett, R. A. and Wogan, G. N.** (1982). Metabolic activation of aflatoxin B1: patterns of DNA adduct formation, removal, and excretion in relation to carcinogenesis. *Drug Metab Rev* 13: 581-602.
- 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. *Analytical Biochemistry* 107: 1-10.
- Fernandes, A. P. and Holmgren, A.** (2004). Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid Redox Signal* 6: 63-74.
- Ferrando, A., Farras, R., Jasik, J., Schell, J. and Koncz, C.** (2000). Intron-tagged epitope: a tool for facile detection and purification of proteins expressed in *Agrobacterium*-transformed plant cells. *Plant J* 22: 553-560.

**Finn, R. D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P. C., Sammut, J. S., Hotz, H. R., Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S. R., Sonnhammer, E. L. and Bateman, A.** (2008). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*: D281-D288.

**Forti, G. and Gerola, P.** (1977). Inhibition of Photosynthesis by Azide and Cyanide and the Role of Oxygen in Photosynthesis. *Plant Physiol* 59: 859-862.

**Fowler, B. A., Hildebrand, C. E., Kojima, Y. and Webb, M.** (1987). Nomenclature of metallothionein. *Experientia Suppl.* 21.

**Foyer, C. H., Noctor, G., Buchanan, B., Dietz, K. J. and Pfannschmidt, T.** (2009). Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications. *Antioxid Redox Signal* 11: 861-905.

**Foyer, C. H., Theodoulou, F. L. and Delrot, S.** (2001). The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends Plant Sci* 6: 486-492.

**Fridman, E., Carrari, F., Liu, Y. S., Fernie, A. R. and Zamir, D.** (2004). Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science* 305: 1786-1789.

**Gaillard, C., Dufaud, A., Tommasini, R., Kreuz, K., Amrhein, N. and Martinoia, E.** (1994). A herbicide antidote (safener) induces the activity of both the herbicide detoxifying enzyme and of a vacuolar transporter for the detoxified herbicide. *FEBS Lett* 352: 219-221.

**Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K.** (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-158.

**Glawischnig, E.** (2007). Camalexin. *Phytochemistry* 68: 401-406.

**Griffith, O. W. and Meister, A.** (1980). Excretion of cysteine and gamma-glutamylcysteine moieties in human and experimental animal gamma-glutamyl transpeptidase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 3384-3387.

**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: 6838-6842.

**Grill, E., Winnacker, E. L. and Zenk, M. H.** (1985). Phytochelatins: The Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher Plants. *Science* 230: 674-676.

**Grill, E. and Zenk, M. H.** (1989). Wie schützen sich Pflanzen vor toxischen Schwermetallen? *Chemie in unserer Zeit* 23: 193-199.

**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: 3131-3138.

**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: 6384-6390.

**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: e23.

**Gustafson, A. M., Allen, E., Givan, S., Smith, D., Carrington, J. C. and Kasschau, K. D.** (2005). ASRP: the *Arabidopsis* Small RNA Project Database. *Nucleic Acids Res* 33: D637-D640.

**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: 1153-1164.

**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: 1313-1315.

**Hanada, K., Zhang, X., Borevitz, J. O., Li, W. H. and Shiu, S. H.** (2007). A large number of novel coding small open reading frames in the intergenic regions of the *Arabidopsis thaliana* genome are transcribed and/or under purifying selection. *Genome Res* 17: 632-640.

**Hanikenne, M., Talke, I. N., Haydon, M. J., Lanz, C., Nolte, A., Motte, P., Kroymann, J., Weigel, D. and Kramer, U.** (2008). Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. *Nature* 453: 391-395.

**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: 3179-3185.

**Hatzios, K. K.** (1983). Herbicide antidotes: Development, chemistry and mode of action. *Advances in Agronomy* 36: 265-316.

**He, Z., Li, J., Zhang, H. and Ma, M.** (2005). Different effects of calcium and lanthanum on the expression of phytochelatin synthase gene and cadmium absorption in *Lactuca sativa*. *Plant Science* 168: 309-318.

**Heiss, S., Wachter, A., Bogs, J., Cobbett, C. and Rausch, T.** (2003). Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure. *J Exp Bot* 54: 1833-1839.

**Heitefuss, R.** (2000). Pflanzenschutz: Grundlagen der praktischen Phytomedizin. Thieme, Stuttgart.

**Heldt, H. W.** (1999). Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

**Hell, R. and Bergmann, L.** (1988). Glutathione synthetase in tobacco suspension cultures: catalytic properties and localization. *Physiologia Plantarum* 72: 70-76.

**Hell, R. and Bergmann, L.** (1990).  $\gamma$ -Glutamylcysteine synthetase in higher plants: catalytic properties and subcellular localization. *Planta* 180: 603-612.

**Hershberg, R. and Petrov, D. A.** (2008). Selection on Codon Bias. *Annu Rev Genet* 42: 287-299.

- 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: 3029-3038.
- Hinchman, C. A. and Ballatori, N.** (1994). Glutathione conjugation and conversion to mercapturic acids can occur as an intrahepatic process. *J Toxicol Environ Health* 41: 387-409.
- Hirata, K., Tsuji, N. and Miyamoto, K.** (2005). Biosynthetic regulation of phytochelatin, heavy metal-binding peptides. *J Biosci Bioeng* 100: 593-599.
- Hirata, T., Iwamoto-Kihara, A., Sun-Wada, G. H., Okajima, T., Wada, Y. and Futai, M.** (2003). Subunit rotation of vacuolar-type proton pumping ATPase: relative rotation of the G and C subunits. *J Biol Chem* 278: 23714-23719.
- Hock, B., Fedtke, C. and Schmidt, R. R.** (1995). Herbizide. Thieme, Stuttgart.
- Hoffmann, T.** (2002). Signaltransduktion von Abscisinsäure in *Arabidopsis thaliana*: Transiente Expression in Protoplasten als Modellsystem. Dissertation, Technische Universität München.
- 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: 1067-1073.
- Howden, R. and Cobbett, C. S.** (1992). Cadmium-Sensitive Mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 100: 100-107.
- 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: 1059-1066.
- Hsu, Y. T. and Kao, C. H.** (2003). Role of abscisic acid in cadmium tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Cell Environ* 26: 867-874.
- International Agency for Research on Cancer** (1991). Atrazine. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Occupational Exposures in Insecticide Application and Some Pesticides. *World Health Organization, New York*: 441-466.
- Inan, G., Zhang, Q., Li, P., Wang, Z., Cao, Z., Zhang, H., Zhang, C., Quist, T. M., Goodwin, S. M., Zhu, J., Shi, H., Damsz, B., Charbaji, T., Gong, Q., Ma, S., Fredricksen, M., Galbraith, D. W., Jenks, M. A., Rhodes, D., Hasegawa, P. M., Bohnert, H. J., Joly, R. J., Bressan, R. A. and Zhu, J. K.** (2004). Salt cress. A halophyte and cryophyte *Arabidopsis* relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles. *Plant Physiol* 135: 1718-1737.
- Iqbal, A., Yabuta, Y., Takeda, T., Nakano, Y. and Shigeoka, S.** (2006). Hydroperoxide reduction by thioredoxin-specific glutathione peroxidase isoenzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Febs J* 273: 5589-5597.
- Jaeger, L. L., Jones, A. D. and Hammock, B. D.** (1998). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for atrazine mercapturic acid in human urine. *Chem Res Toxicol* 11: 342-352.

**Jaiswal, M. and Rangan, L.** (2007). Context sequence for transcription factors surrounding start codon in model crops. *Current Science* 93.

**Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W.** (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo J* 6: 3901-3907.

**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: 10822-10832.

**Jiang, K., Schwarzer, C., Lally, E., Zhang, S. B., Ruzin, S., Machen, T., Remington, S. J. and Feldman, L.** (2006). Expression and characterization of a redox-sensing green fluorescent protein (reduction-oxidation-sensitive green fluorescent protein) in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 141: 397-403.

**Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. and Bartel, B.** (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol* 57: 19-53.

**Joshi, C. P.** (1987). An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucleic Acids Res* 15: 6643-6653.

**Jungblut, A. D., Hoeger, S. J., Mountfort, D., Hitzfeld, B. C., Dietrich, D. R. and Neilan, B. A.** (2006). Characterization of microcystin production in an Antarctic cyanobacterial mat community. *Toxicon* 47: 271-278.

**Kagi, J. H. and Valee, B. L.** (1960). Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J Biol Chem* 235: 3460-3465.

**Klein, M., Geisler, M., Suh, S. J., Kolukisaoglu, H. U., Azevedo, L., Plaza, S., Curtis, M. D., Richter, A., Weder, B., Schulz, B. and Martinoia, E.** (2004). Disruption of AtMRP4, a guard cell plasma membrane ABCC-type ABC transporter, leads to deregulation of stomatal opening and increased drought susceptibility. *Plant J* 39: 219-236.

**Knippers, R.** (1997). *Molekulare Genetik*. Thieme, Stuttgart.

**Knoop, F.** (1904). *Beitr Chem Physiol Path* 6: 150.

**Knowles, A. F. and Nagy, A. K.** (1999). Inhibition of an ecto-ATP-diphosphohydrolase by azide. *Eur J Biochem* 262: 349-357.

**Koncz, C. and Schell, J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular Genetics and Genomics* 204: 383-396.

**Kondo, N., Imai, K., Isobe, M., Goto, T., Murasugi, A. and Wada-Nakagawa, C.** (1984). Cadystin A and B, major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced in a fission yeast-separation, revision of structure and synthesis. *Tetrahed Lett* 25: 3869-3872.

**Konishi, T., Matsumoto, S., Tsuruwaka, Y., Shiraki, K., Hirata, K., Tamaru, Y. and Takagi, M.** (2006). Enhancing the tolerance of zebrafish (*Danio rerio*) to heavy metal toxicity by the expression of plant phytochelatin synthase. *J Biotechnol* 122: 316-325.

**Kozak, M.** (1984). Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 12: 857-872.

**Kreuz, K., Tommasini, R. and Martinoia, E.** (1996). Old Enzymes for a New Job (Herbicide Detoxification in Plants). *Plant Physiol* 111: 349-353.

**Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

**Laloi, C., Rayapuram, N., Chartier, Y., Grienenberger, J. M., Bonnard, G. and Meyer, Y.** (2001). Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14144-14149.

**Lamoureux, G. L. and Rusness, D. G.** (1986). Xenobiotic conjugation in higher plants. In: Xenobiotic Conjugation Chemistry. G. H. Paulson, J. Caldwell, D. H. Hutson and J. J. Menn, Eds., American Chemical Society, Washington DC. 299 pp. 62-105.

**Lamoureux, G. L. and Rusness, D. G.** (1989). Propachlor metabolism in soybean plants, excised soybean tissues and soil. *Pestic Biochem Physiol* 34: 187-204.

**Lamoureux, G. L. and Rusness, D. G.** (1993). Glutathione In The Metabolism And Detoxification Of Xenobiotics In Plants. In: Sulfur Nutrition And Assimilation In Higher Plants - Regulatory Agricultural And Environmental aspects. L. J. De Kok, I. Stulen, H. Rennenberg, C. Brunold and W. E. Rauser, Eds., SPB Academic Publishing, The Hague. pp. 221-237.

**Lamoureux, G. L., Rusness, D. G. and Schroder, P.** (1993). Metabolism of a diphenylether herbicide to a volatile thioanisole derivative and a polar sulfonic acid metabolite in spruce (*Picea*). *Pestic Biochem Physiol* 47: 8-20.

**Lamoureux, G. L., Shimabukuro, R. H., Swanson, H. R. and Frear, D. S.** (1970). Metabolism of 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine (atrazine) in excised sorghum leaf sections. *J Agric Food Chem* 18: 81-86.

**Lamoureux, G. L., Simoneaux, B. and Larson, J.** (1998). The metabolism of atrazine and related 2-chloro-4,5-bis(alkylamino)-S-triazines in plants. In: Triazine Herbicides: Risk Assessment. L. G. Ballantine, J. E. McFarland and D. S. Hackett, Eds., American Chemical Society, Washington DC. pp. 60-81.

**Lamoureux, G. L., Stafford, L. E., Shimabukuro, R. H. and Zaylskie, R. G.** (1973). Atrazine metabolism in sorghum: catabolism of the glutathione conjugate of atrazine. *J Agric Food Chem* 21: 1020-1030.

**Lange, M. B., Hertkorn, N. and Sandermann, H., Jr.** (1998). Chloroaniline/Lignin Conjugates as Model System for Nonextractable Pesticide Residues in Crop Plants. *Environ Sci Technol* 32: 2113-2118.

**Langebartels, C. and Harms, H.** (1985). Analysis for non extractable bound residues of pentachlorophenole in plant cells using a cell wall fractionation procedure. *Ecotox Environ Safety* 10: 268-279.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.

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: 81-87.

Lee, S., Moon, J. S., Domier, L. L. and Korban, S. S. (2002). Molecular characterization of phytochelatin synthase expression in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 40: 727-733.

Leuchter, R., Wolf, K. and Zimmermann, M. (1998). Isolation of an Arabidopsis cDNA Complementing a *Schizosaccharomyces pombe* Mutant Deficient in Phytochelatin Synthesis. *Plant Physiol* 117: 1526.

Li, J. C., Guo, J. B., Xu, W. Z. and Ma, M. (2007). RNA Interference-mediated Silencing of Phytochelatin Synthase Gene Reduce Cadmium Accumulation in Rice Seeds. *Journal of Integrative Plant Biology* 49: 1032-1037.

Li, Z. S., Alfenito, M., Rea, P. A., Walbot, V. and Dixon, R. A. (1997). Vacuolar uptake of the phytoalexin medicarpin by the glutathione conjugate pump. *Phytochemistry* 45: 689-693.

Lin, M., Behal, R. H. and Oliver, D. J. (2004). Characterization of a mutation in the IDH-II subunit of the NAD<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 166: 983-988.

Linsmaier, E. M. and Skoog, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol plant* 18: 100-127.

Liu, G., Sanchez-Fernandez, R., Li, Z. S. and Rea, P. A. (2001). Enhanced multispecificity of arabidopsis vacuolar multidrug resistance-associated protein-type ATP-binding cassette transporter, AtMRP2. *J Biol Chem* 276: 8648-8656.

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: 1213-1221.

Loutre, C., Dixon, D. P., Brazier, M., Slater, M., Cole, D. J. and Edwards, R. (2003). Isolation of a glucosyltransferase from Arabidopsis thaliana active in the metabolism of the persistent pollutant 3,4-dichloroaniline. *Plant J* 34: 485-493.

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: 267-282.

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: 8243-8248.

Lüllmann, H., Mohr, K. and Hein, L. (2006). Pharmakologie und Toxikologie. Thieme, Stuttgart.

Maier, T., Yu, C., Kullertz, G. and Clemens, S. (2003). Localization and functional characterization of metal-binding sites in phytochelatin synthases. *Planta* 218: 300-308.

Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hao, L., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Krylov, D., Lanczycki, C. J., Liebert, C. A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yin, J. J., Zhang, D. and Bryant, S. H. (2007). CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res* 35: D237-240.

Margoshes, M. and Valee, B. L. (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc* 79: 4813-4814.

Marquardt, H. and Schaefer, S. G., Eds. (1994). Lehrbuch der Toxikologie. BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim.

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: 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: 1715-1732.

Martinoia, E., Grill, E., Tommasini, R., Kreuz, K. and Amrhein, N. (1993). An ATP-dependent glutathione S-conjugate "export" pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364: 247-249.

Martinoia, E., Massonneau, A. and Frangne, N. (2000). Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants. *Plant Cell Physiol* 41: 1175-1186.

May, M., Vernoux, T., Leaver, C. and Van Montagu, M. (1998). Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J Exp Bot* 49: 649-667.

Meister, A. (1988a). Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 263: 17205-17208.

Meister, A. (1988b). On the discovery of glutathione. *Trends Biochem Sci* 13: 185-188.

Meister, A. (1995). Glutathione metabolism. *Methods Enzymol* 251: 3-7.

Meister, A. and Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52: 711-760.

Meyer, A. J. (2008). The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *J Plant Physiol* 165: 1390-1403.

- Meyer, A. J., Brach, T., Marty, L., Kreye, S., Rouhier, N., Jacquot, J. P. and Hell, R.** (2007). Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant J* 52: 973-986.
- Meyer, A. J., May, M. J. and Fricker, M.** (2001). Quantitative in vivo measurement of glutathione in *Arabidopsis* cells. *Plant J* 27: 67-78.
- Meyer, Y., Siala, W., Bashandy, T., Riondet, C., Vignols, F. and Reichheld, J. P.** (2008). Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochim Biophys Acta* 1783: 589-600.
- Morton, B. R. and Wright, S. I.** (2007). Selective Constraints on Codon Usage of Nuclear Genes from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Biol Evol* 24: 122-129.
- Mou, Z., Fan, W. and Dong, X.** (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113: 935-944.
- Mueller, L. A., Goodman, C. D., Silady, R. A. and Walbot, V.** (2000). AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiol* 123: 1561-1570.
- Mullineaux, P. M. and Rausch, T.** (2005). Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynth Res* 86: 459-474.
- Mumberg, D., Muller, R. and Funk, M.** (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156: 119-122.
- Munk, K., Eds.** (2000). Grundstudium Biologie: Biochemie, Zellbiologie, Ökologie, Evolution. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol plant* 15: 473-497.
- Murray, M. G. and Thompson, W. F.** (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8: 4321-4325.
- Nakano, Y., Okawa, S., Prieto, R. and Sekiya, J.** (2006). Subcellular localization and possible functions of gamma-glutamyltransferase in the radish (*Raphanus sativus* L.) plant. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 1790-1793.
- Nakazawa, R., Kato, H., Kameda, Y. and Takenaga, H.** (2002). Optimum assay conditions of the activity of phytochelatin synthase from tobacco cells. *Biologia Plantarum* 45: 311-313.
- Naoumkina, M., Farag, M. A., Sumner, L. W., Tang, Y., Liu, C. J. and Dixon, R. A.** (2007). Inaugural Article: Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17909-17915.
- Noctor, G.** (2006). Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell Environ* 29: 409-425.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H. and Foyer, C. H.** (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J Exp Bot* 53: 1283-1304.
- Noller, H. F.** (1991). Ribosomal RNA and translation. *Annu Rev Biochem* 60: 191-227.

- Nriagu, J. O. and Pacyna, J. M.** (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333: 134-139.
- Oerke, E.-C., Dehne, H. W., Schönbeck, F. and Weber, A.** (1994). Crop Production and Crop Protection - Estimated losses in major food and cash crops. Elsevier, Amsterdam.
- 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* 148: 1603-1613.
- 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: 865-877.
- 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: 878-888.
- Ohme-Takagi, M., Taylor, C. B., Newman, T. C. and Green, P. J.** (1993). The effect of sequences with high AU content on mRNA stability in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 11811-11815.
- 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: 4747-4754.
- Palmer, G.** (1993). Current issues in the chemistry of cytochrome c oxidase. *J Bioenerg Biomembr* 25: 145-151.
- Parinov, S., Sevugan, M., Ye, D., Yang, W. C., Kumaran, M. and Sundaresan, V.** (1999). Analysis of flanking sequences from dissociation insertion lines: a database for reverse genetics in Arabidopsis. *Plant Cell* 11: 2263-2270.
- Parisy, V., Poinssot, B., Owsianowski, L., Buchala, A., Glazebrook, J. and Mauch, F.** (2007). Identification of PAD2 as a gamma-glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of Arabidopsis. *Plant J* 49: 159-172.
- Pesole, G., Gissi, C., Grillo, G., Licciulli, F., Liuni, S. and Saccone, C.** (2000). Analysis of oligonucleotide AUG start codon context in eukaryotic mRNAs. *Gene* 261: 85-91.
- Peterson, A. G. and Oliver, D. J.** (2006). Leaf-targeted phytochelatin synthase in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol Biochem* 44: 885-892.
- Picault, N., Cazale, A. C., Beyly, A., Cuine, S., Carrier, P., Luu, D. T., Forestier, C. and Peltier, G.** (2006). Chloroplast targeting of phytochelatin synthase in Arabidopsis: effects on heavy metal tolerance and accumulation. *Biochimie* 88: 1743-1750.
- Ramos, J., Clemente, M. R., Naya, L., Loscos, J., Perez-Rontome, C., Sato, S., Tabata, S. and Becana, M.** (2007). Phytochelatin synthases of the model legume Lotus japonicus. A small multigene family with differential response to cadmium and alternatively spliced variants. *Plant Physiol* 143: 1110-1118.

- 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: 536-545.
- Rea, P. A.** (2006). Phytochelatin synthase, papain's cousin, in stereo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 507-508.
- Rea, P. A.** (2007). Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu Rev Plant Biol* 58: 347-375.
- Rea, P. A., Li, Z. S., Lu, Y. P., Drozdowicz, Y. M. and Martinoia, E.** (1998). From Vacuolar GS-X Pumps to Multispecific ABC Transporters. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 727-760.
- 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: 2463-2474.
- Rennenberg, H. and Lamoureux, G. L.** (1990). Physiological processes that modulate the concentration of glutathione in plant cells. In: Sulphur Nutrition and Sulphur Assimilation in Higher Plants. H. Rennenberg, C. Brunold, L. J. De Kok and I. Stulen, Eds., SPB Academic Publishing, The Hague. pp. 53-65.
- Rennenberg, H., Steinkamp, R. and Kesselmeier, J.** (1981). 5-Oxo-prolinase in *Nicotiana tabacum*: catalytic properties and subcellular localization. *Physiol plant* 62: 211-216.
- Rennenberg, H., Steinkamp, R. and Polle, A.** (1980). Evidence for the participation of a 5-oxo-prolinase in degradation of glutathione in *Nicotiana tabacum*. *Z Naturforsch [C]* 35: 708-711.
- Richter, G.** (1996). Biochemie der Pflanzen. Thieme, Stuttgart.
- Riechers, D. E., Fuerst, E. P. and Miller, K. D.** (1996). Initial metabolism of dimethenamid in safened and unsafened wheat shoots. *J Agric Food Chem* 44: 1558-1564.
- Rios, G., Lossow, A., Hertel, B., Breuer, F., Schaefer, S., Broich, M., Kleinow, T., Jasik, J., Winter, J., Ferrando, A., Farras, R., Panicot, M., Henriques, R., Mariaux, J. B., Oberschall, A., Molnar, G., Berendzen, K., Shukla, V., Lafos, M., Koncz, Z., Redei, G. P., Schell, J. and Koncz, C.** (2002). Rapid identification of Arabidopsis insertion mutants by non-radioactive detection of T-DNA tagged genes. *Plant J* 32: 243-253.
- 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: 858-869.
- Roudier, F., Fernandez, A. G., Fujita, M., Himmelspach, R., Borner, G. H., Schindelman, G., Song, S., Baskin, T. I., Dupree, P., Wasteneys, G. O. and Benfey, P. N.** (2005). COBRA, an Arabidopsis extracellular glycosyl-phosphatidyl inositol-anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibril orientation. *Plant Cell* 17: 1749-1763.

- Roudier, F., Schindelman, G., DeSalle, R. and Benfey, P. N.** (2002). The COBRA family of putative GPI-anchored proteins in Arabidopsis. A new fellowship in expansion. *Plant Physiol* 130: 538-548.
- Rouhier, N., Gelhaye, E. and Jacquot, J. P.** (2002). Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin from poplar: protein-protein interaction and catalytic mechanism. *J Biol Chem* 277: 13609-13614.
- Rouhier, N., Gelhaye, E. and Jacquot, J. P.** (2004). Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems. *Cell Mol Life Sci* 61: 1266-1277.
- 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: 14686-14693.
- Rutherford, A. W. and Krieger-Liszkay, A.** (2001). Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends Biochem Sci* 26: 648-653.
- Salt, D. E., Smith, R. D. and Raskin, I.** (1998). Phytoremediation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 643-668.
- Sandermann, H., Jr.** (1988). Mutagenic activation of xenobiotics by plant enzymes. *Mutat Res* 197: 183-194.
- Sandermann, H., Jr.** (1992). Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem Sci* 17: 82-84.
- Sandermann, H., Jr.** (1994). Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept. *Pharmacogenetics* 4: 225-241.
- Saraste, M.** (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283: 1488-1493.
- Schat, H., Llugany, M., Vooijs, R., Hartley-Whitaker, J. and Bleeker, P. M.** (2002). The role of phytochelatin in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *J Exp Bot* 53: 2381-2392.
- Scheel, D. and Sandermann, H., Jr.** (1981). Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in cell suspension cultures of soybean (*Glycine max* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). II: Evidence for incorporation into lignin. *Planta* 152: 253-258.
- Scheer, C. E.** (2003). Transport, Kompartimentierung und Abbau von glutathionhaltigen Fremdstoffmetaboliten in Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Dissertation, Technische Universität München.
- Schindelman, G., Morikami, A., Jung, J., Baskin, T. I., Carpita, N. C., Derbyshire, P., McCann, M. C. and Benfey, P. N.** (2001). COBRA encodes a putative GPI-anchored protein, which is polarly localized and necessary for oriented cell expansion in Arabidopsis. *Genes Dev* 15: 1115-1127.
- Schlaeppli, K., Bodenhausen, N., Buchala, A., Mauch, F. and Reymond, P.** (2008). The glutathione-deficient mutant pad2-1 accumulates lower amounts of glucosinolates and is more susceptible to the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *Plant J* 55: 774-786.

**Schmöger, M. E.** (2000). Phytochelatine, Komplexierung von Metallen und Metalloiden, Untersuchungen zur Phytochelatinsynthese. Dissertation, Technische Universität München.

**Scholthof, H. B.** (2001). Molecular plant-microbe interactions that cut the mustard. *Plant Physiol* 127: 1476-1483.

**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: 114-122.

**Schulze, E. D., Beck, E. and Müller-Hohenstein, K.** (2002). Pflanzenökologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

**Schwartz, A. M., Komarova, T. V., Skulachev, M. V., Zvereva, A. S., Dorokhov, Y. L. and Atabekov, J. G.** (2006). Stability of Plant mRNAs Depends on the Length of the 3' Untranslated Region. *Biochemistry (Moscow)* 71: 1377-1384.

**Shaw, G. and Kamen, R.** (1986). A conserved AU sequence from the 3'-untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46: 659-667.

**Shimabukuro, R. H.** (1976). Glutathione conjugation of herbicides in plants and animals and its role in herbicidal selectivity. *The Asian-Pacific Weed Science Society*: 183-186.

**Smale, S. T.** (1997). Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim Biophys Acta* 1351: 73-88.

**Smith, T. K., Ikeda, Y., Fujii, J., Taniguchi, N. and Meister, A.** (1995). Different sites of acivicin binding and inactivation of gamma-glutamyl transpeptidases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2360-2364.

**Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. and Cohen-Bazire, G.** (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol Rev* 35: 171-205.

**Steinkamp, R. and Rennenberg, H.** (1985). Degradation of Glutathione in Plant Cells: Evidence against the Participation of a  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase. *Z Naturforsch [C]* 40: 29-33.

**Steinkamp, R., Schweihofen, B. and Rennenberg, H.** (1987).  $\gamma$ -Glutamylcyclotransferase in tobacco suspension cultures: catalytic properties and subcellular localisation. *Physiol plant* 69: 499-503.

**Storozhenko, S., Belles-Boix, E., Babiychuk, E., Herouart, D., Davey, M. W., Slooten, L., Van Montagu, M., Inze, D. and Kushnir, S.** (2002). Gamma-glutamyl transpeptidase in transgenic tobacco plants. Cellular localization, processing, and biochemical properties. *Plant Physiol* 128: 1109-1119.

**Stroinski, A. and Zielezinska, M.** (2001). Cadmium and oxidative stress influence on phytochelatin synthase activity in potato tuber. *Acta Physiologiae Plantarum* 23: 157-160.

**Sulmon, C., Gouesbet, G., Amrani, A. E. and Couee, I.** (2006). Sugar-induced tolerance to the herbicide atrazine in *Arabidopsis* seedlings involves activation of oxidative and xenobiotic stress responses. *Plant Cell Rep* 25: 489-498.

**The Arabidopsis Genome Initiative** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.

**Taji, T., Seki, M., Satou, M., Sakurai, T., Kobayashi, M., Ishiyama, K., Narusaka, Y., Narusaka, M., Zhu, J. K. and Shinozaki, K.** (2004). Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and a *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. *Plant Physiol* **135**: 1697-1709.

**Talke, I. N., Hanikenne, M. and Kramer, U.** (2006). Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiol* **142**: 148-167.

**Tanksley, S. D. and McCouch, S. R.** (1997). Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science* **277**: 1063-1066.

**Tommasini, R., Vogt, E., Fromenteau, M., Hortensteiner, S., Matile, P., Amrhein, N. and Martinoia, E.** (1998). An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J* **13**: 773-780.

**Tsuji, N., Nishikori, S., Iwabe, O., 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**: 181-191.

**Tsuji, N., Nishikori, S., Iwabe, O., Shiraki, K., Miyasaka, H., Takagi, M., Hirata, K. and Miyamoto, K.** (2004). Characterization of phytochelatin synthase-like protein encoded by *alr0975* from a prokaryote, *Nostoc* sp. PCC 7120. *Biochem Biophys Res Commun* **315**: 751-755.

**Umweltbundesamt** (2006). Nationale Trendtabellen für die deutsche Berichterstattung atmosphärischer Emissionen (Schwermetalle). <http://www.umweltbundesamt.de>, Dessau.

**Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R. A. and Schell, J.** (1974). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* **252**: 169-170.

**Vasilyeva, E. and Forgac, M.** (1998). Interaction of the clathrin-coated vesicle V-ATPase with ADP and sodium azide. *J Biol Chem* **273**: 23823-23829.

**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**: 20817-20820.

**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**: 22449-22460.

**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**: 7110-7115.

**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: 31451-31459.

**Vernoux, T., Wilson, R. C., Seeley, K. A., Reichheld, J. P., Muroy, S., Brown, S., Maughan, S. C., Cobbett, C. S., Van Montagu, M., Inze, D., May, M. J. and Sung, Z. R.** (2000). The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell* 12: 97-110.

**Vestergaard, M., Matsumoto, S., Nishikori, S., Shiraki, K., Hirata, K. and Takagi, M.** (2008). Chelation of Cadmium Ions by Phytochelatin Synthase: Role of the Cystein-rich C-Terminal. *Analytical Sciences* 24: 277-281.

**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: 18848-18853.

**Wachter, A., Wolf, S., Steininger, H., Bogs, J. and Rausch, T.** (2005). Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae. *Plant J* 41: 15-30.

**Walczak, H. A. and Dean, J. V.** (2000). Vacuolar transport of the glutathione conjugate of trans-cinnamic acid. *Phytochemistry* 53: 441-446.

**Wang, W. and Ballatori, N.** (1998). Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol Rev* 50: 335-356.

**Weber, M., Harada, E., Vess, C., Roepenack-Lahaye, E. and Clemens, S.** (2004). Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *Plant J* 37: 269-281.

**Weigel, D. and Glazebrook, J.,** Eds. (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

**Weiler, E. and Nover, L.** (2008). *Allgemeine und molekulare Botanik*. Thieme, Stuttgart.

**Wolf, A. E., Dietz, K. J. and Schroder, P.** (1996). Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. *FEBS Lett* 384: 31-34.

**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: 1681-1687.

**Xiang, C., Werner, B. L., Christensen, E. M. and Oliver, D. J.** (2001). The biological functions of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiol* 126: 564-574.

**Yadav, R. K.** (2007). Strukturelle und Funktionelle Charakterisierung der Rezeptorkinase STRUBBELIG in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Technische Universität München.

- Yonetani, T. and Ray, G. S.** (1965). Studies on Cytochrome Oxidase. Vi. Kinetics of the Aerobic Oxidation of Ferrocycytochrome C by Cytochrome Oxidase. *J Biol Chem* 240: 3392-3398.
- Zenk, M. H.** (1996). Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene* 179: 21-30.
- Zhu, J. K.** (2001). Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* 6: 66-71.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. and Gruissem, W.** (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* 136: 2621-2632.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

---

Name: Ralph Blum  
Adresse: Egilbertstraße 41  
85354 Freising  
Geburtsdatum: 03.03.1978  
Geburtsort: Scherzingen TG (Schweiz)  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

## Ausbildung

---

1984 – 1988 Grundschole im Wallgut, Konstanz  
1988 – 1997 Ellenrieder-Gymnasium, Konstanz  
Juni 1997 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)  
1997 – 1998 Zivildienst bei der Evangelischen Sozialstation Konstanz  
1998 – 2004 Studium der Biologie an der Universität Konstanz  
Diplomarbeit in der AG Umwelttoxikologie bei Prof. Dr. D. Dietrich; Thema der Arbeit: „Charakterisierung des OTA-Transports in menschlichen Nierenzellen“  
Februar 2004 Abschluss als Diplom-Biologe  
Okt. 2004 bis Dez. 2008 Doktorarbeit am Lehrstuhl für Botanik der Technischen Universität München bei Prof. Dr. E. Grill

## Publikationen

---

**Blum, R., O'Brien, E., Heussner, A.H. and Dietrich, D.R.** (2004). Detection of Organic Anion Transporters (OAT) in human kidney homogenate and primary human kidney cells (HKC). *Tox. Sci.* 78(1-S): no. 434.

**Blum, R., Beck, A., Korte, A., Stengel, A., Letzel, T., Lenzian, K., Grill, E.** (2007). Function of phytochelatin synthase in catabolism of glutathione-conjugates. *Plant J* 49: 740-749.

## Danksagung

Zu allererst geht mein Dank an Prof. Dr. Erwin Grill für die Möglichkeit, diese Arbeit am Lehrstuhl für Botanik anzufertigen. Sein entgegengebrachtes Vertrauen und seine Begeisterungsfähigkeit waren immer wieder aufs Neue ein Ansporn für mich.

Bei Prof. Dr. Ralph Hückelhoven bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Klaus Lenzian danke ich für seine stete Bereitschaft, seinen PC-Leuten als „Zwischenchef“ zur Seite zu stehen. Fragen, Probleme oder diskussionswürdige Ergebnisse fanden bei ihm jederzeit ein offenes Ohr. Sehr willkommen waren die Kostproben der Ernten aus dem Lenzian'schen Garten.

An Dr. Thomas Letzel und Sylvia Große vom Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere geht mein Dank für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei der LC-MS-Analyse der Biman-Derivate. Über die Einladung zum „Fest der 100 Weine“ habe ich mich sehr gefreut!

Allen Mitarbeitern am Lehrstuhl für Botanik der TU München gebührt mein Dank für Hilfe und Unterstützung in vielfältiger Art und Weise.

Jana Wünschmann und Dr. Danièle Moes danke ich herzlich für ihre freundschaftliche Kollegialität. Mit ihrer Übersicht und Kompetenz trugen sie wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei. Ganz besonderer Dank geht an Jana für viele wertvolle Diskussionen, die Einarbeitung in molekularbiologische Methoden und dass sich deutlich mehr komplementäre Wasserstoffbrücken als Mismatches ausbildeten. Danièle sei besonders gedankt für ihre stete Hilfsbereitschaft, die Einarbeitung in die Welt der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie und die Entwicklung erheiternd-heilsamer karikativer Sichtweisen, wie sie nur mit ihr möglich waren. Für die Gallermania und Côte d'Oritis war sie außerdem eindeutig verantwortlich.

Johanna Berger hat mit der ihr eigenen Art, das Regime im PC-Labor zu führen, sehr zur erfolgreichen Laborarbeit beigetragen. Danke für die gute Zusammenarbeit bei den Zellkulturversuchen und für manch abgenommene Samenernte oder CTAB- und PCR-Arbeit, vor allem aber auch für CDs, Noten und Knackersemmel aus Regensburg und für die Gelegenheiten, sich mal wieder so richtig über die Deutsche Bahn aufzuregen.

Arthur Korte danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Protoplastentransformation und für viele interessante Anregungen, speziell aus der wirren Welt der Molekularbiologie.

Dr. Alexander Christmann, Member of Schwabentrio, war immer für ein Schwätzle gut und hatte bei Fragen rund ums Mikroskop oder zu anderem stets ein offenes Ohr. Außerdem sorgte er oftmals dafür, dass ich zu manch später Stunde doch nicht der letzte im Labor war.

Dr. Farhah Assaad danke ich für die GFP-Markerlinien, hilfreiche Hinweise für die Arbeit am Mikroskop und die Durchsicht des Paper-Manuskripts.

Caroline Klaus, Member of Schwabentrio, und Lisa Held danke ich für die fürsorgliche Pflege meiner Pflanzen in Phytokammern und Gewächshaus und für viele hilfreiche Tipps zur Arbeit mit Arabidopsis. Dank geht an Caroline außerdem für viele entspannende Schwätzle und manch erfrischende Runde durch den Kranzberger Forst, auch wenn der Trainingseffekt eher gering ausfiel.

Beate Seeliger war vom ersten Tag an eine stets hilfsbereite Ansprechpartnerin im Sekretariat rund um Fragen des Unialltags. Josef Reischenbeck war stets zur Stelle, wenn es galt, technische Probleme aller Art zu lösen.

Dank geht auch an die ehemaligen Mitarbeiter Dr. Andreas Beck und Julia Grottenthaler. Andreas hat die Isolierung der T-DNA Linien auf den Weg gebracht und zusammen mit Julia in unzähligen CTABs und PCR-Analysen vorangetrieben. An dieser Stelle geht auch ein Dankeschön an Dr. Czaba Koncz am MPI Köln für die Bereitstellung der Landsberg erecta Zellsuspensionskulturen und der T-DNA Sammlung und für die Unterstützung bei der Suche nach den Insertionslinien.

Bei Prof. Dr. Shauna Somerville und Dr. Melisa Lim, Berkeley, bedanke ich mich für die Analysen zur Pathogenresistenz unserer KO-Linien und für interessante Diskussionen zu den cad1-Linien und pen4.

Bei Prof. Dr. Gilles Peltier und Dr. Stéphan Cuiné, Saint-Paul-lez-Durance, bedanke ich mich für die Bereitstellung der anti-PCS Antikörper. Daniela Schmid, Jena, sei gedankt für die Übersendung der Nostoc-Kulturen und Tipps für die Extraktion von DNA aus Cyanobakterien.

Allen Freunden und Bekannten danke ich für eine schöne und abwechslungsreiche Zeit abseits von Labor, Sterilbank und Pflanzraum. So auch dem Weihenstephaner Unichor, allen voran den Leuten vom Stammtisch und den Veronafahrern, besonders Christine, Isi, Regina und Familie Albrecht, und dem alten Konstanzer Viergestirn. Christian, Freund, Weggefährte und Leidensgenosse, danke ich für die wertvolle Zusammenarbeit und Unterstützung während des Studiums und ganz besonders für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts.

Familie Breu in Lohhof danke ich herzlich für die bahnbrechend-legendäre „Kosmos-Bibel“ und für die Möglichkeit zur Überbrückung in den ersten zwei Wochen im Oktober 2004.

Auch möchte ich die nicht aussparen, die bei der Schreibe im Hintergrund mitwirkten: Camille, Wolfgang, Ludwig (per aspera ad astra!) und Franz aus sphärischer Ferne sowie Donnie, Bruce, Rory, Calum, Iain, Peter und Brian aus dem schönen Schottland.

An meine Schwester Astrid geht ein ganz besonders herzlicher Dank dafür, dass sie auch an meinem bisher größten Tiefpunkt nicht an meinen Fähigkeiten zweifelte und im richtigen Moment für die Wende zurück nach oben sorgte.

Abschließend geht ein großes Dankeschön an meine Eltern und Tanti™ für immerwährende Unterstützung und die Möglichkeit, jederzeit am geliebten Bodensee vorbeizuschauen. Blau und golden, grün und silbern: leuchtend, schillernd, wunderbar!