

1. Einleitung

1.1 Schwermetalle: Definition, natürliche Vorkommen und Bioverfügbarkeit

Die Definition für Schwermetalle ist in der Literatur nicht einheitlich. Die Gruppe der den Schwermetallen zuzuordnenden chemischen Elemente ist inhomogen und weist nur wenig biochemische Gemeinsamkeiten auf. Als ein Charakteristikum wird im Allgemeinen eine Dichte von größer als 5 g cm^{-3} angegeben, wie z.B. Nickel ($8,7 \text{ g cm}^{-3}$), Zink ($7,1 \text{ g cm}^{-3}$), Kupfer ($8,9 \text{ g cm}^{-3}$) oder Cadmium ($8,6 \text{ g cm}^{-3}$). Obwohl Aluminium mit einer Dichte von nur $2,7 \text{ g cm}^{-3}$ nicht zu den Schwermetallen gezählt wird, spielt es aufgrund seines häufigen Vorkommens eine wichtige Rolle für die Aufnahme und damit für die Toxifikation von lebenden Systemen. Schwermetalle sind mit Ausnahme von Quecksilber und den sehr selten vorkommenden Metallen Cäsium und Gallium unter Normalbedingungen Feststoffe. Natürlich kommen Schwermetalle als freie Ionen, meist aber löslich oder unlöslich an Liganden (Oxide, Sulfate, Sulfide, Carbonate) gebunden im Boden vor.

Zwar beträgt der Anteil an Schwermetallen (u.a. As, Cd, Co, Cu, Cr, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, Zn) weniger als 1 % der Erdkruste, doch sind durch anthropogene Umwelteinflüsse wie den Emissionen aus der Verbrennung fossiler Brennstoffe, dem Bergbau, der Eisen- und Stahlindustrie, der chemischen Industrie oder auch der Ausbringung von Klärschlamm weltweit große Flächen mit bestimmten Schwermetallen um ein Vielfaches gegenüber dem natürlichen Vorkommen angereichert. Diese Anreicherung von Schwermetallen ist aufgrund ihrer Persistenz ein ernstzunehmendes Problem. Da Schwermetalle nicht abgebaut werden können, kommt es unter anderem zu einer starken Belastung in Gliedern von Nahrungsketten-Endverbrauchern.

Für Pflanzen hängt die Verfügbarkeit von Metallen aus dem Boden von drei Faktoren ab. Erstens bestimmt die Bodenbeschaffenheit, inwieweit Schwermetalle im Boden fixiert werden können. Als zweiter Faktor kommt hinzu, in welchem Maße Metalle im Boden frei verfügbar sind, bzw. als lösliche Verbindungen vorkommen und nicht Teil unlöslicher Verbindungen sind (z.B. Kupferoxid) (Norvell 1991). Zum Dritten hängt die Verfügbarkeit stark vom pH-

Wert des Bodens ab. Sie nimmt mit der Erniedrigung des pH-Wertes exponentiell zu (Hartner 1983).

1.2. Schwermetalle als Lebensnotwendigkeit und als Gefahrenpotenzial

Leben bedingt die Fähigkeit, lokal begrenzt, kontrolliert chemische Reaktionen durchführen zu können. In letzter Konsequenz könnte man Leben sogar auf eine fein regulierte Verschiebung von elektrischen Ladungen reduzieren. Daraus lässt sich erkennen, wie essentiell z.B. Redoxreaktionen für lebende Zellen sind. Schwermetalle wie Eisen oder Kupfer sind aufgrund ihrer Redoxeigenschaften in der Regel integrale Bestandteile von Enzymen der Elektronen-Transport-Ketten. Eisen ist entweder zentral in Hämgruppen gebunden (z.B. Cytochrom c) oder in Fe/S Komplexe integriert (z.B. NADH-Q-Reduktase).

Wie Eisen ist auch Kupfer ein essentieller Bestandteil einer Vielzahl von Elektronentransportsystemen, wie beispielsweise zusammen mit Eisen in der mitochondrialen Cytochrom-Oxidase oder als alleiniger Cofaktor im pflanzlichen Plastocyanin. Ungefähr ein Drittel aller Enzyme beinhalten Metalle wie z.B. Zink in RNA-Polymerasen, DNA-Transkriptionsfaktoren oder der cytosolischen Superoxid-Dismutase (SOD1).

Doch neben der essentiellen Funktion von Schwermetallen als Elektronenakzeptoren oder -donatoren, birgt ihre Gegenwart auch ein hohes Risiko. Freie Schwermetallionen besitzen eine enorm hohe Toxizität. Phänotypisch lässt sich eine toxische Schwermetallexposition von Pflanzen an zunehmenden Chlorosen bis hin zu Nekrosen beobachten (siehe dazu Prasad und Strzalka 1999). Außerdem kommt es zu einer Inhibierung der Blattentwicklung und vor allem des Wurzelwachstums (Marschner 1995, Matsumoto 2000).

Auf zellulärer Ebene können freie Metallionen wie Kupfer Thiolbindungen in Proteinen oxidieren und damit deren Sekundärstruktur auflösen (Himmelblau und Amasino 2000).

Durch Substitution der natürlicherweise im aktiven Zentrum bestimmter Enzyme vorkommenden Metalle mit anderen Schwermetallen können Enzymaktivitäten inhibiert bzw. sogar restlos ausgeschaltet werden. Beispielsweise wird Calcium bevorzugt durch Cadmium-

ionen substituiert. Über die Fenton-Reaktion können freie redoxaktive Metalle wie Eisen und Kupfer reaktive Sauerstoffspezies (ROS) generieren. Unter anderen zeigten Halliwell und Gutteridge (1984), dass Hydroxylradikale, für die es keine enzymatischen Entgiftungsmechanismen gibt (Belles-Boix und Inze 2002), erhebliche Schäden an Lipiden, Proteinen sowie der DNA verursachen.

Die Auswirkungen von toxischen Konzentrationen von Kupfer, Nickel, Zink oder nichtessentiellen Metallionen wie Cadmium auf den Chloroplasten sind besonders hoch. Dieses liegt unter anderem an der sehr komplexen, hochregulierten Struktur der Thylakoide, die eine große Menge an metallbindenden Faktoren enthalten (z.B. LHCS, PS II, Plastocyanin [membranassoziiert], Cytochrom b_6/f , OEC [membranassoziiert], PS I). Zum einen führt eine Substitution der in den photosynthetischen Elektronentransport involvierten Metalle (z.B. Cu, Fe, Mn, Mg) durch andere Metalle zu einer Inhibierung der jeweiligen Komponente des Photosyntheseapparates, zum anderen führen Störungen in der Energieweiterleitung immer zu einer potentiellen Bildung von ROS.

Als Beispiele für Schadwirkungen auf den Chloroplasten sollen hier nur die Wirkungen von Cadmium auf Chlorophylle, bei dem es zu einer Substitution des zentral gebundenen Mg-Atoms durch Cadmium kommt (Kupper et al. 1996) und die Inhibierung der RuBisCO (Ribulose-Bisphosphat-Carboxygenase/Oxygenase) durch toxische Schwermetalle (Malik et al. 1992) genannt werden. Eine weiterführende Lektüre bieten dazu Prasad und Strzalka (1999).

Um zum einen eine ausreichende Versorgung mit essentiellen Schwermetallen zu gewährleisten, zum anderen aber toxisch wirkende Metallkonzentrationen zu vermeiden, muss die Metallaufnahme aus der Umwelt, der inter- und intrazelluläre Transport, die Insertion in die Metalloapoproteine und die Chelatierung von metallhaltigen Abbauprodukten äußerst fein reguliert sein. Diese Abläufe werden unter dem Begriff der Metallhomöostase zusammengefasst.

1.3 Vom Boden in die Zelle: Metallaufnahme und Distribution

1.3.1 Aufnahme in die Wurzel

Die Aufnahme von Metallen aus dem Boden erfolgt über die Wurzel. Dabei kann nur die an die Wurzelhaare angrenzende Region (Rhizosphäre) genutzt werden. Doch ist die zur Verfügung stehende Gesamtoberfläche von Wurzelhaaren unglaublich hoch. Für eine einzelne Roggenpflanze (*Secale cereale*) wurde eine Anzahl von $1,4 \times 10^7$ lebenden Wurzeln einschließlich aller Seitenwurzeln und Verzweigungen errechnet. Diese wiederum tragen $1,4 \times 10^{10}$ Wurzelhaare, woraus sich schätzungsweise eine Gesamtoberfläche von über 600m^2 ergibt (Dittmer 1937).

Für die verschiedenen Metalle wie Eisen, Kupfer oder Zink stehen der Pflanze unterschiedliche Aufnahmemechanismen zur Verfügung. Die Aufnahme von Eisen ist bisher am besten untersucht worden. Diese erfolgt, je nach Pflanzengattung, durch zwei unterschiedliche Strategien. Alle Pflanzen mit Ausnahme der Süßgräser (*Poaceae*) verfolgen eine sogenannte Typ I-Strategie: Sie pumpen Protonen mit Hilfe von H^+ -ATPasen über das Plasmalemma der Rhizodermis in die Rhizosphäre, um einen für die Metallaufnahme notwendige elektrische Potentialdifferenz an der Plasmalemmamembran zu erzeugen und durch die Erniedrigung des pH-Wertes Fe(III) -Ionen aus dem Bodenmilieu zu lösen. Fe(III) wird anschließend durch Eisen-Reduktasen (z.B. *FRO2*, *Arabidopsis*, Robinson et al. 1999) zu Fe(II) reduziert und über spezifische Transporter (z.B. *IRT1*, *Arabidopsis*, Korshunova et al. 1999) in die Wurzelzelle aufgenommen.

Pflanzen aus der Familie der *Poaceen* verfolgen die sogenannte Typ II-Strategie der Eisenaufnahme, wie sie auch bei Bakterien zu finden ist. Fe(III) wird über ausgeschiedene Phytosiderophore chelatiert und als Fe(III) -Phytosiderophor-Komplexe über einen spezifischen Transporter in den Symplasten der Wurzelzelle aufgenommen (Marschner und Römheld 1994, Curie et al. 2001).

Die Synthese der Phytosiderophore wurde weitgehend in Gerste untersucht. Ausgehend von drei Molekülen S-Adenosyl-L-Methionin, wird durch die Nicotianamin-Synthase (NAS) Nicotianamin synthetisiert (Kawai et al. 1988, Shojima et al. 1989). Anschließend wird durch die Nicotianamin-Aminotransferase (NAAT) eine Aminogruppe transferiert, wodurch nach

Hydroxylierung am Carboxylende die reduzierte 2'-Deoxymugin-Säure (DMA) gebildet wird, welche durch nachfolgende Hydroxylierung in die Muginsäure (MA) überführt wird (Kawai et al. 1988, Shojima et al. 1989).

Interessanterweise wurden im Zuge der Arbeiten zur Aufklärung der Biosynthese der Muginsäure (MA) mittels substraktiver Hybridisierung nicht nur die Gene *Ids2* (Dioxygenase) und *Ids3* (MA-Synthase) identifiziert, die für die Synthese von Muginsäure verantwortlich sind, sondern auch *Ids1*, das erste für Gerste beschriebene Metallothionein (Okumura et al. 1991, 1994). Die Aufnahme von Fe(III)-Phytosiderophor-Komplexen in den Symplasten der Wurzeln erfolgt über einen spezifischen Transporter (*Ys1*), welcher 2001 von Curie et al. in Mais identifiziert wurde. Die weiteren Transportwege von Eisen oder auch anderen Metallen innerhalb des Wurzelgewebes sind vielfach noch unverstanden. Eine Sequestrierung von Metallen beginnt bereits in der Wurzelzelle, indem z.B. Eisen über einen ABC-Transporter in die Vakuole aufgenommen wird (Yamaguchi et al. 2002).

1.3.2 Xylem-Transport

Für den Weitertransport von Metallen aus dem Symplasten der Wurzelzellen in das Xylem wird eine symplastische Beladung des Xylems diskutiert (Clemens et al. 2003). Die dafür verantwortlichen Transporter bedürfen noch der Identifikation. Bekannt ist bisher nur ein spezifischer Transporter, der Kaliumionen in das Xylem transferiert (Gaymard et al. 1998).

Mit Fe(III) beladene Phytosiderophore wurden von Kawai et al. (2001) im Xylem identifiziert. Die spätere Entladung von Metallen aus dem Xylem ist ebenso wie die Beladung jedoch noch weitgehend unklar.

1.3.3 Aufnahme von Cadmium

Cadmium ist für lebende Systeme ein ausschließlich toxisches Schwermetall. Obwohl es mit großer Wahrscheinlichkeit keine cadmiumspezifischen Aufnahmesysteme gibt, kommt es doch zu einer Aufnahme von Cadmium. Der Grund hierfür liegt in der geringen Spezifität von

Metalltransportern, die oft nicht zwischen verschiedenen divalenten Kationen unterscheiden können. So konnte z.B. gezeigt werden, dass ein in Weizen (*Triticum aestivum*) identifizierter Ca^{2+} -Transporter (*LCT1*, low-affinity calcium transporter), nach Expression in Hefe zu einer Aufnahme von Cadmium führte (Clemens et al. 1998).

Zu den bisher am besten charakterisierten Transportern zur Schwermetall-Aufnahme gehören Proteine der ZIP-Familie, zu denen auch die IRTs (Iron-uptake-Transporter) gehören. Transporter der ZIP-Familie sind in einer Vielzahl von Organismen beschrieben worden, in Arabidopsis wurden bis dato acht ZIP-Transporter identifiziert (u.a. *IRT1*, *ZIP1-ZIP4*). In Hefe exprimiert, vermitteln IRTs nicht nur eine Aufnahme von Eisen, sondern auch von anderen Metallen wie Cadmium (Eide et al. 1996, Fox et al. 1998, Korshunova et al. 1999).

1.3.4 Zelluläre Metallaufnahme und Distribution

Die Aufnahme und Distribution von Metallen innerhalb eukaryontischer Zellen ist bisher ebenfalls nur unvollständig geklärt. Als Modellorganismus für die zelluläre Distribution in Eukaryonten wird Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) verwendet (siehe Abb. 1). Doch auch bei Hefe liegt für die am besten untersuchten Metalle Eisen und Kupfer noch kein vollständiges Bild vor. Literaturdaten belegen, dass intrazellulär mehrere Faktoren an der Bindung, am Transport und an der Entgiftung der Schwermetalle beteiligt sind, die über komplexe Wechselwirkungen miteinander interagieren (siehe dazu Puig und Thiele 2002, Freitas et al. 2003).

Obwohl in Bäckerhefe eine große Anzahl von Eisen- und Eisen-Kupfer-Aufnahmesystemen gut untersucht sind (siehe dazu Freitas et al. 2003), ist die zelluläre Eisendistribution noch weitgehend ungeklärt. Jensen und Culotta (2000) konnten erstmals zwei Eisenchaperone (*ISA1* und *ISA2*) identifizieren, die an der mitochondrialen Eisenversorgung beteiligt sind und im IMS (Inter-Membran-Raum) der Mitochondrien (*Isa2*) bzw. in der mitochondrialen Matrix lokalisiert (*Isa1*) sind. Besser untersucht ist in Hefe die zelluläre Distribution von Kupfer, die hier kurz skizziert werden soll (Abb. 1).

Kupfer wird über Reduktasen (z.B. Fre1, Fre2) von Cu(II) zu Cu(I) an der Außenseite des Plasmalemmas reduziert und über Aufnahmesysteme in die Zelle transportiert. Abhängig von der extracytosolischen Kupferkonzentration stehen entweder „Low-affinity“- (z.B. Fet4) oder „High-affinity“-Transporter (z.B. Ctr1, Ctr3; *Arabidopsis* Copt1 und Copt2, Kampfenkel et al. 1995, Sancenon et al. 2003) zur Verfügung. Der genaue Mechanismus der Weitergabe an zelluläre Chaperone ist unklar, vermutet wird aber eine direkte Beladung von spezifischen Metall-Chaperonen an der Membran-Innenseite (Field et al. 2002). Cytosolische Eisen-chaperone sind derzeit nicht bekannt. Die Lokalisation der bekannten Eisenchaperone Isa1 und Isa2 ist auf die Mitochondrien beschränkt (Jensen und Culotta 2000).

Für *Saccharomyces cerevisiae* wurden bisher drei Kupferchaperone identifiziert, die für die organellspezifische Kupferversorgung zuständig sind (siehe Überblicksartikel von Puig und Thiele 2002): Atx1 ist ein Kupferchaperon (*Arabidopsis* CCH, Himelblau et al. 1998), welches Kupfer an einen ABC-Transporter (Ccc₂) im sekretorischen Apparat (Golgi-Apparat) liefert. CCS, ein weiteres Kupferchaperon, versorgt spezifisch die cytosolische Cu/Zn Superoxid-Dismutase (Sod1) mit Kupfer.

Schließlich wurde mit dem Chaperon Cox17 ein Kupferlieferant für Sco1 identifiziert, ein Protein, welches in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert ist und exklusiv für die Distribution von Kupfer an die Cu_A-Untereinheit (Cox2) der Cytochrom-Oxidase (COX) verantwortlich ist (Punter und Glerum 2003).

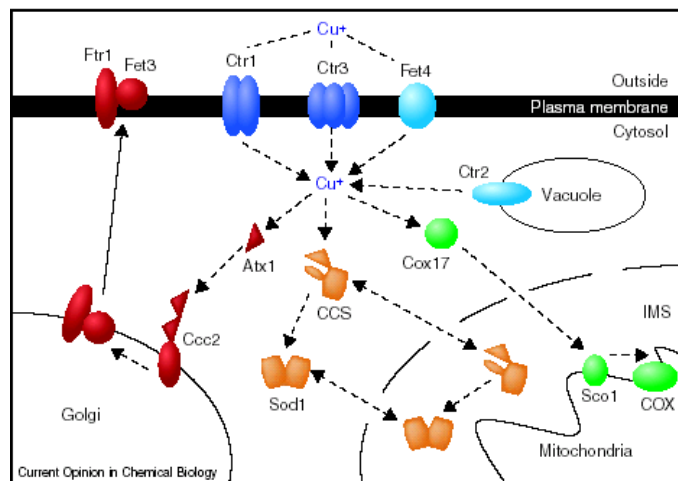


Abb. 1 Modell der zellulären Kupferdistribution in dem eukaryotischen Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (aus Puig und Thiele 2002). Erklärung siehe Text.

1.4 Zelluläre metallbindende Faktoren in Pflanzen

1.4.1 Metallothioneine

Neben den oben beschriebenen hochspezifischen Metallchaperonen gibt es weitere metallbindende Faktoren, zu denen auch die cysteinreichen Metallothioneine und Phytochelatine gehören. Welche Rolle diese Faktoren im Rahmen der Aufrechterhaltung der Metallhomöostase spielen, ist aber noch unklar. Sie könnten neben einer Funktion als Metallchaperone auch als Puffer fungieren, in dem Metalle temporär gespeichert werden. Neben Phytochelatinen und Metallothioneinen sind zudem weitere Metabolite mit niedrigem Molekulargewicht wie beispielsweise Glutathion (GSH), Citrat, Histidin, oder Nicotianamin in die Metallhomöostase involviert.

Metallothioneine (MTs) wurden erstmals 1957 als cadmiumbindende Proteine in Pferdenieren identifiziert (Margoshes und Vallee) und seitdem in einer Vielzahl von Säugetieren (*Mammalia*) nachgewiesen. Diese 60-68 Aminosäure langen Peptide mit einem Molekulargewicht von 6-7 kDa weisen einen Cysteingehalt von bis zu 30 % auf. In den Geweben der Säugetiere (*Mammalia*) kommen vier verschiedene MTs (MT 1-4) vor, die aufgrund nur geringfügiger Substitutionen von Aminosäuren im Peptid nicht in Typen, sondern in Isoformen unterteilt werden. Die Isoformen MT-1 und MT-2 kommen in allen Geweben vor, MT-3 Isoformen vorwiegend im Gehirn, und das Vorkommen der Isoform 4 (MT-4) ist auf bestimmte Epithelzellen beschränkt ist (siehe dazu Vasak und Hasler 2000). Die Isoformen 2-4 von humanen Metallothioneinen werden jeweils durch ein einzelnes Gen repräsentiert, für MT-1 Isoformen ist allerdings ein Gencluster mit dreizehn MT-1 Isoformen bekannt, wobei alle MTs einer differentiellen Genexpression unterliegen (Quaife et al. 1994). Traditionell werden die MTs der Säugetiere als Klasse I MTs bezeichnet. Sie weisen keine aromatischen Aminosäuren auf und besitzen 20 hochkonservierte Cysteine, die auf eine aminoternale Domäne mit neun, bzw. auf eine carboxyterminale Domäne mit elf Cysteinen verteilt sind.

Die Chelatierung von freien Metallionen erfolgt durch die Thiolgruppen der Cysteinreste der MTs. Das metallfreie, in seiner Sekundärstruktur nahezu ungefaltete Apoprotein (Thionein)

erfährt durch die Metallbindung eine charakteristische Faltung der Cysteindomänen in eine hantelähnliche Struktur und wird als Metallothionein bezeichnet (siehe Abb. 2). NMR-Studien von humanen MTs (Faller et al. 1999), MT aus Mäusen (Zangger et al. 1999) oder dem Seeigel *Strongylocentrotus purpuratus* (Riek et al. 1999) konnten diese hantelförmige Struktur belegen und zudem zeigen, dass MTs der Klasse I eine Bindung mit sieben Metallionen ($\text{Me}^{\text{II}}_7\text{-MT}$) eingehen, wobei die essentiellen Metalle Kupfer und Zink sowie die rein toxischen Metalle Cadmium und Quecksilber als Bindungspartner beschrieben sind (Suhy et al. 1999).

Metallbindungsstudien des humanen MT-2 konnten zeigen, dass diese MT-Isoform eine sehr hohe Affinität zu Zink aufweist ($K_{\text{Zn}} = 3,2 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ bei pH 7,4; Jacob et al. 1998). Im Falle von Cadmium ist dieser Wert sogar noch um den Faktor 10.000 ($K_{\text{Cd}} = 3,2 \times 10^{17} \text{ M}^{-1}$ bei pH 7,4; Jacob et al. 1998) erhöht. Dieses führt dazu, dass an Metallothioneine gebundene Zinkionen ($\text{Zn}_7\text{-MT}$) vollständig durch Cadmiumionen ($\text{Cd}_7\text{-MT}$) substituiert werden können (Zangger et al. 1999). Unvollständige Substitutionen führen dagegen zu Mischformen von Metallbeladungen, wie ein beschriebenes $\text{Cd}_5\text{Zn}_2\text{-MT-2}$ aus Kaninchen (Jacob et al. 1998) verdeutlicht.

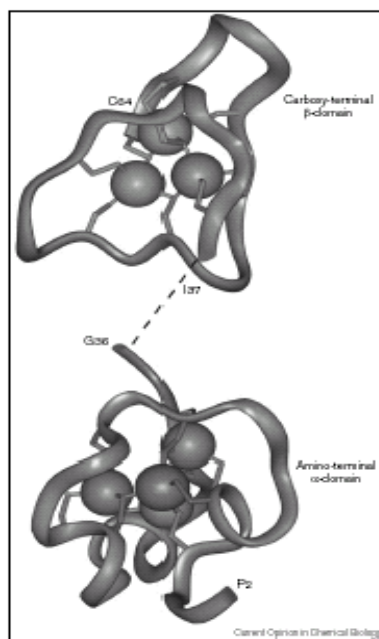


Abb. 2 Dreidimensionale NMR Struktur des $\text{Cd}_7\text{-MTA}$ aus dem Seeigel *Strongylocentrotus purpuratus* (Riek et al. 1999). Die Aminosäuren 2-36 bilden ein aminoterminales $\text{Cd}_4\text{Cys}_{11}$ -Cluster, die Aminosäuren 37-64 das Cd_3Cys_9 Cluster des Carboxyterminus. Die gestrichelte Linie zwischen beiden Domänen resultiert aus fehlenden NMR Informationen über Orientierung der Domänen zueinander (aus: Vasak und Hasler, 2000).

Aufgrund der enorm hohen Bindungsaffinitäten der MTs zu Zink oder Cadmium schien es zunächst undenkbar, dass MTs auch zu einer Abgabe von chelatierten Metallen an Apoproteine von z.B. zinkhaltigen Enzymen in der Lage sind. Daher wurden MTs zunächst nur als reine Komponenten der Metalldetoxifikation betrachtet. Doch MTs vermögen durchaus chelatierte Metallionen wieder freizusetzen. In *in vivo* spielt dabei vermutlich der Redoxstatus der Zelle eine wichtige Rolle, da in *in vitro* zahlreiche Autoren zeigen konnten, dass erhöhte Mengen an Disulfiden im Medium zu einer Freisetzung von gebundenen Metallen aus Metallothioneinen führen. Dabei untersuchten die Autoren auch den Einfluss von dem für den Redoxstatus der Zelle verantwortlichen Verhältnis von Gluthation (GSH) zu seiner oxidierten Form (GSSG) (Jacob et al. 1998, Jiang et al. 1998, Maret und Vallee 1998).

Übereinstimmend zeigte sich dabei, dass MTs sowohl Metalldonator als auch -akzeptor sind und die unterschiedliche Funktion durch das Verhältnis durch GSH/GSSG beeinflusst wird. Daraus ergibt sich folgendes Gleichgewicht:



Die eigentliche Funktion der bisher am besten charakterisierten Metallothioneine der Vertebraten und Invertebraten lassen sich immer noch nicht eindeutig belegen. Eine Vielzahl von Arbeiten zeigen, dass MTs eine herausragende Position in der Aufnahme, Speicherung und Distribution von Zink an zinkhaltige Enzyme besitzen (siehe dazu Vasak und Hasler 2000). Zink und Cadmium stellen für Genexpression von MT-1 und MT-2 in Säugetieren starke Induktoren dar, wobei für die zinkinduzierte Genexpression ein zinkabhängiger Transkriptionsfaktor (MFT1, Auf der Maur et al. 1999), für die cadmiuminduzierte Genexpression ein *upstream stimulator factor* (USF) verantwortlich ist (Li et al. 1998). Obwohl MTs der Säugetiere auch Kupfer chelatieren, ist sowohl die Struktur als auch die Funktion von kupferbindenden MTs unklar. Eine Rolle dieser MTs für die Versorgung von bestimmten kupferabhängigen Faktoren wird diskutiert (Vasak und Hasler 2000).

Darüber hinaus spielen MTs sowohl während der Detoxifikation von Metallen als auch unter Mangelbedingungen an essentiellen Metallen (Suhy et al. 1999, Vasak und Hasler 2000) eine wichtige Rolle.

Neben den Säugetieren kommen MTs auch in anderen Vertebraten, Invertebraten, bei eukaryotischen Mikroorganismen (Hefe), bei Pilzen, einigen Prokaryoten (Cyanobakterien) sowie bei Pflanzen vor. Die Struktur aller MTs ist dabei nicht einheitlich, doch generell lassen sich MTs als Genprodukte mit einem Molekulargewicht unter 8 kDa, hohem Cysteingehalt und geringem Gehalt an aromatischen Aminosäuren definieren, die eine charakteristische Verteilung von Cysteindomänen aufweisen (siehe auch MT Homepage: <http://www.unizh.ch/~mtpage/intro.html>).

Es ist mehrfach versucht worden, die Vielzahl von MTs im Tier- und Pflanzenreich systematisch einzuordnen. Eine Klassifizierung aller bekannten pflanzlichen MTs wurde zunächst von Robinson et al. (1993) vorgenommen, später durch Rauser (1999) erweitert und schließlich von Binz und Kägi (1999) auf das gesamte MT-Reich übertragen.

In aktuellen Publikationen wird für die Systematik der MTs im Reich der höheren Pflanzen aus Gründen der Einfachheit immer noch die von Robinson et al. (1993) eingeführte und inzwischen erweiterte Nomenklatur verwendet (siehe dazu Cobbett und Goldsbrough 2000, 2002). Danach werden die Metallothioneine in drei bzw. zwei Klassen unterteilt:

Klasse I MTs beinhalten die MTs der Vertebraten, welche 20 hochkonservierte Cysteinreste aufweisen.

Klasse II MTs sind solche, die von dieser Struktur abweichen und beinhalten damit alle MTs der Invertebraten, Pflanzen, Pilze und Prokaryoten.

Phytochelatine wurden von Robinson et al. (1993) noch als Klasse III MTs bezeichnet. Dies entspricht nicht mehr dem Stand der heutigen Sicht, da Phytochelatine keine direkten Genprodukte sind, sondern über Glutathioneinheiten durch die Phytochelatin-Synthase zu Phytochelatin synthetisiert werden (s. u.). In der aktuellen Literatur werden Phytochelatine mittlerweile als solche bezeichnet und nicht mehr zu den MTs gezählt (siehe dazu Cobbett und Goldsbrough 2000, 2002).

Das erste pflanzliche Metallothionein wurde 1983 in Weizenkeimlingen identifiziert (wheat *E_c*, Hanley-Bowdin und Lane), welches in weiteren Untersuchungen als zinkbindendes Protein charakterisiert wurde (Lane et al. 1987, Kawashima et al. 1992). Seit der Entdeckung eines pflanzlichen MTs vor nunmehr 20 Jahren, wurden eine Vielzahl von schätzungsweise 100

MTs in mono- und dikotyledonen Pflanzen meist in Form ihrer cDNA publiziert. Alle pflanzlichen MTs besitzen eine Länge von 65-85 Aminosäuren¹. Auffällig ist auch hier der große Anteil von Cysteinen in der Polypeptidkette, welcher bis zu 29 % der im Peptid vorhandenen Aminosäuren ausmachen kann (*Arabidopsis MT1a*, *MT1c*; *Brassica napus LSC 54*).

Diese Vielzahl von pflanzlichen MTs wird in vier Typen unterteilt (Cobett und Goldsbrough 2002). Typ 1 MTs weisen zwei Cysteindomänen mit je sechs Cysteinen (Cys-Xaa-Cys) auf, welche i.d.R. durch einen ungefähr 40 Aminosäure langen cysteinfreien Teil getrennt sind, der als „Spacer“ bezeichnet wird. Wie Typ 1 besitzen auch Typ 2 MTs zwei Cysteindomänen, allerdings mit einer anderen Anzahl von Cysteinresten.

Aminoterminal weisen Typ 2 MTs ein hochkonserviertes aminoterminales Motiv auf (MSCCGGNCGCS) mit einer für Typ 2 charakteristischen Cys-Cys Konformation an aminoterminaler Position 3 und 4 in der Peptidkette. Typ 3 MTs zeigen Ähnlichkeiten mit Typ 1 MTs, besitzen allerdings nur vier Cysteine im Aminoterminal, carboxyterminal jedoch, in der gleichen Konstellation wie Typ 1, weisen Typ 3 MTs sechs Cysteine² auf. Typ 4 MTs unterscheiden sich in ihren Cysteindomänen von den anderen drei MT Typen durch eine zusätzliche, dritte Cysteindomäne zwischen den amino- und carboxyterminalen Domänen. Im Gegensatz zu den anderen drei MT Typen, unterscheiden sich die Typ 4 MTs von di- und monokotyledonen Pflanzen nicht in der Anzahl und Verteilung der Cysteinreste.

Durch die zur Verfügung stehenden Genomsequenzen von *Arabidopsis thaliana* und dem der Gerste phylogenetisch eng verwandten Reis (*Oryza sativa*) sowie von Southern-Analysen von vier MTs aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*, Giritch et al. 1998) zeigt sich, dass die verschiedenen MTs nicht auf einem Chromosom liegen, sondern über mehrere Chromosomen verteilt sind. Damit wird deutlich, dass die pflanzlichen MT-Typen und ihre Isoformen nicht durch posttranskriptionelles Spleißen entstehen.

Ein großes Problem stellt immer noch der Nachweis von MTs auf Proteinebene dar. Bis heute sind lediglich das aus Weizen isolierte *E_c*-MT (Lane et al. 1987, Kawashima et al. 1992) sowie

¹ Eine Ausnahme bilden die bisher identifizierten Typ 1 MTs mit je 45 Aminosäuren *Arabidopsis MT1a* und *MT1c* und *Brassica napus LSC 54* sowie das Typ2 MT *B22E* aus Gerste mit 115 Aminosäuren.

² *Arabidopsis MT3* weist in der carboxyterminalen Domäne nicht sechs, sondern acht Cysteine auf.

MTs aus *Arabidopsis* (*MT1* und *MT2* Murphy et al. 1997) untersucht worden. Die immunochemischen Arbeiten von Murphy et al. (1997) fußen allerdings auf Metallothionein-GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteinen, die nicht zwischen den jeweiligen Isoformen *MT1a* und *MT1b* bzw. *MT2a* und *MT2b* unterschieden können. Immunochemische Untersuchungen mit dem Weizen MT wurden nicht gemacht. Der Grund für die Schwierigkeiten, spezifische Antikörper gegen die verschiedenen MTs zu generieren, scheint unter anderem an deren Instabilität in der Gegenwart von Sauerstoff zu liegen (Cobett und Goldsbrough 2002).

Die Funktionalität der Genprodukte indessen konnte in einer Reihe von Untersuchungen mittels funktioneller Komplementation belegt werden. Dabei wurden MTs entweder in der Kupfer-MT-defizienten Hefemutante *cup1^Δ* (Zhou und Goldsbrough 1994, Ma et al. 2003) oder in der Zink-MT-defizienten Grünalge *Synechococcus* (Robinson et al. 1996) exprimiert.

1.4.2 Phytochelatine

Schon 1921 wurde von Hopkins aus Muskelzellen das Tripeptid Glutathion (GSH: γ -GluCysGly) isoliert. Im Verlauf der weiteren Forschung an Glutathion zeigte sich, dass diese Substanz eine Vielzahl von überaus wichtigen Aufgaben auch in Pflanzen wahrnimmt (siehe dazu Foyer et al. 2001). GSH ist in Pflanzen ein Hauptspeicher an reduziertem Schwefel. Außerdem reguliert es zusammen mit anderen Faktoren wie z.B. Ascorbinsäure als Antioxidant den Redoxstatus der Zelle. Drittens dienen Glutathionkonjugate (GS-X) zur Entgiftung von Schwermetallen und Xenobiotica, welche nach Bindung an GSH über spezifische Transporter in die Vakuole transportiert werden. Und schließlich dienen Glutathione zur Biosynthese von Phytochelatinen, welche als solche von Grill et al. (1985) bezeichnet wurden.

Die Synthese von Phytochelatinen durch eine Transpeptidase wurde von Grill et al. 1989 erstmalig beschrieben, das für die Synthese verantwortliche Enzym Phytochelatin-Synthase (PCS) wurde 1995 von Howden et al. mit Hilfe einer cadmiumsensitiven, Phytochelatin-

defizienten *Arabidopsis*-Mutante (*cad1*) identifiziert. Das Gen der PCS wurde 1999 von drei Arbeitsgruppen unabhängig isoliert (*Arabidopsis*: Ha et al. 1999; Vatamaniuk et al. 1999; Weizen: Clemens et al. 1999). Clemens und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die PCS nicht nur in Pflanzen vorkommt, sondern auch in der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* und der Nematode *Caenorhabditis elegans* eine funktionelle PCS exprimiert wird (Clemens et al. 1999, 2001, Clemens und Simm 2003).

Arabidopsis thaliana besitzt zwei Gene für die PCS, *AtPCS1* und *AtPCS2*. Allerdings wird in Blättern und Wurzeln nur die *AtPCS1* exprimiert. Warum es zu keiner nennenswerten Expression von *AtPCS2* kommt, ist bislang unklar (Cazalé und Clemens 2001).

Wie erwähnt, dient GSH als Substrat für Biosynthese von PCs. Dabei werden γ -Glutamylcysteine (γ -GluCys) mit einem abschließenden Glycin verknüpft [$(\gamma$ -GluCys)_n-Gly], wobei n = 2-11 ist (Cobbett und Goldsbrough 2002). Werden für die Synthese zwei Glutamylcysteine verbraucht, so wird das entstandene PC als PC₂ bezeichnet, bei drei Glutamylcysteinen als PC₃ usw. Zudem kommt es zu einer Synthese von Isoformen, bei denen als abschließende Aminosäure nicht Glutamat, sondern Glycin, Serin, oder β -Alanin kondensiert werden (Zenk 1996).

1.5 Seneszenz und Metallstress

1.5.1 Allgemeine Aspekte zur Seneszenz

Im Lebenszyklus von höheren Pflanzen wird die letzte Entwicklungsphase, welche schließlich zum Tod führt, als Seneszenz (lat.: senex = Greis) bezeichnet. Dabei lassen sich verschiedene Typen der Seneszenz charakterisieren (siehe dazu Noodén und Leopold 1988). Süßgräser (*Poaceen*) sterben nach Ablauf einer Vegetationsperiode gänzlich ab (Ganzpflanzen-Seneszenz), während bei Laucharten (*Allium*) zum Beispiel nur die oberirdischen Pflanzenteile absterben. Buchen (*Fagaceen*) zeigen im Herbst eine simultane Blattseneszenz, während Tabak (*Nicotiana*) ein Beispiel für eine sukzessive Blattseneszenz ist.

Starke morphologische, physiologische und molekulare Veränderungen zeichnen die Seneszenz aus. Dabei stellt dieser letzte Entwicklungsschritt der Zellentwicklung einen hochregulierten Prozess dar. Zeichnen sich junge Blätter durch Aufbauprozesse aus, so ist seneszierendes Blattgewebe durch Abbauprozesse von Makromolekülen wie Proteinen, Lipiden oder auch Ribonukleinsäuren charakterisiert.

Phänotypisch lässt sich der Verlauf der Blattseneszenz durch einen zunehmenden Abbau an Chlorophyllen erkennen. Bei einer Bestimmung des Chlorophyllgehaltes an Primärblättern der Gerste während der natürlichen Blattseneszenz zeigt sich, dass der Gehalt an Chlorophyllen unmittelbar nach Erreichen der Blattrife (maximales Wachstum, maximale Photosyntheseleistung) schon wieder kontinuierlich abnimmt (Miersch et al. 2000). Parallel dazu nimmt auch der Gesamtproteingehalt im seneszierenden Blatt ab, was zum einem an einer verstärkten Proteaseaktivität liegt, zum anderen aber auch in der Abnahme der Proteinbiosynthese begründet ist (Noodén et al. 1997). Dabei verläuft der Abbau an Proteinen, wie beispielsweise der unterschiedliche Abbau von Proteinen der Lichtsammelkomplexe LHC II und LHC I (Humbeck und Krupinska 1999), mit einer fein regulierten Kinetik, um bis zu einem späten Zeitpunkt der Seneszenz die zelluläre Homöostase aufrecht erhalten zu können und weiterhin Photosyntheseleistungen zu erbringen (Humbeck et al. 1996).

Der differentielle Abbau von Proteinen des Photosyntheseapparates führt damit auch zu einer Veränderung im Verhältnis von funktionellem Photosystem I und Photosystem II während der Blattseneszenz (Miersch et al. 2000). Die Blattseneszenz geht mit einem bevorzugten Abbau von Photosystem I Komplexen einher, sodass sich das Verhältnis von Photosystem II zu Photosystem I während der Blattseneszenz bei Gerste von 2:1 auf 3:1 verschiebt (Miersch et al. 2000). Messungen zur Effizienz von Photosystem II Einheiten zeigten zudem, dass die verbleibenden PS II Einheiten auch bis zu einem späten Zeitpunkt ihre Funktionalität wahren und es parallel mit dem Zusammenbruch des Wasserhaushaltes auch zu einem Zusammenbruch der PS II Effizienz kommt (Heise 1999, Miersch et al. 2000).

Seneszenzprozesse können zumindest teilweise auch durch Stresssituationen ausgelöst werden. So kommt es z.B. bei einem Trockenstress zu einer verfrühten Blattseneszenz (Noodén et al. 1997). Auch die Reaktionen der Pflanzen auf Schwermetallstress ähneln in

Teilbereichen dem Seneszenzprozess. Eine Exposition der Pflanzen mit toxischen Konzentrationen an Cadmium führt ebenfalls zu einer Abnahme im Chlorophyllgehalt und zu Beeinträchtigungen der Photosynthesefunktionen, sowie zu seneszenztypischen Veränderungen in der chloroplastidären Ultrastruktur (McCarthy et al. 2001).

Die während der Blattseneszenz aus dem sukzessiven Abbau von Chloroplasten und anderen Zellkomponenten gewonnenen Mengen an Stickstoff, Kohlenstoff, Schwefel oder Phosphor werden remobilisiert und in jüngere, sich entwickelnde Gewebe transportiert. Der aus dem Proteinabbau mobilisierte Stickstoff zum Beispiel wird in Form von Glutamin oder Asparagin über das Phloem der Pflanze von seneszierenden Blatteilen hin zu jüngeren Geweben transportiert (Simpson und Dailing 1981, Kamachi et al. 1992).

Auch Schwermetalle wie Eisen, Kupfer, Mangan oder Zink werden beim Abbau von Metalloproteinen während der Blattseneszenz freigesetzt. Zahlreiche Autoren konnten für Kupfer die Remobilisation aus seneszierenden Pflanzenteilen und den Transfer in andere Teile der Pflanze zeigen (Mauk and Noodén 1992, Drossopoulos et al. 1994, 1996, Hocking 1994). Es ist daher anzunehmen, dass es während der natürlichen Blattseneszenz zu einem entwicklungsbedingten Schwermetallstress kommt.

1.5.2 Regulation der Seneszenz

Die der Seneszenz zugrunde liegenden Regulationsmechanismen sind immer noch weitgehend unklar. Da es sich bei der Seneszenz um einen vielschichtigen, komplexen Prozess handelt, der mit dem Begriff Seneszenzsyndrom beschrieben wird, ist es nicht möglich, die Steuerung der Seneszenz auf nur einen Faktor zu reduzieren. So hängt der Beginn der Blattseneszenz nicht allein vom Alter des Blattes ab, sondern kann, wie oben schon beschrieben, durch Stress wie Dunkelheit, Pathogenbefall oder Trockenheit induziert werden (Smart 1994, Kleber-Janke und Krupinska 1997, Bleecker et al. 1997, Humbeck und Krupinska 2003).

Mittlerweile wurde eine Vielzahl von Genen isoliert, die während der Seneszenz hochreguliert werden (SAG: senescence associated genes). Andere Gene wie z.B. viele Photosynthesegene werden während der Seneszenz herunter reguliert. Allerdings kommt es während der

Seneszenz zu einem massiven Abbau von RNA, sodass es bei Untersuchungen zu Änderungen von Transkriptmengen schwierig ist, zwischen Transkripten zu unterscheiden, welche neu transkribiert wurden und solchen, welche einem verzögerten Abbau unterliegen. *Run-On*-Untersuchungen zeigten jedoch, dass einige der während der Seneszenz beobachteten Veränderungen im Gehalt bestimmter Transkripte tatsächlich auf der Ebene der Transkription reguliert sind (Krause et al. 1998). Zu den bisher identifizierten SAGs gehören eine Vielzahl von katabolen Enzymen wie Proteasen, Lipasen oder RNasen (siehe dazu Quirino et al. 2000), dazu gehören aber auch interessanterweise Metallothioneine als metallbindene Faktoren (Buchanan-Wollaston und Ainsworth 1997, Guo et. al. 2003).