

Das Metallothionein Zym1 aus *Schizosaccharomyces pombe*
*Untersuchungen zur Funktion des Metallothioneins in einem
phytochelatin-bildenden Organismus*

Dissertation



zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Claudia Simm,
geboren am 11. Januar 1977 in Wernigerode

Gutachter:

1. PD Dr. habil. S. Clemens
2. Prof. Dr. G.-J. Krauß
3. Prof. Dr. K. Wolf

urn:nbn:de:gbv:3-000007997

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007997>]

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis.....	iii
1. Einleitung	1
1.1. Vorkommen und Bedeutung von Schwermetallen.....	1
1.2. Metallaufnahme.....	3
1.3. Glutathion.....	6
1.4. Phytochelatine.....	7
1.5. Metallothioneine.....	11
1.6. Metallochaperone.....	16
1.7. Kompartimentierung.....	17
1.8. Zielstellung der Arbeit.....	18
2. Material und Methoden	21
2.1. Chemikalien und Enzyme.....	21
2.2. Organismen und Plasmide.....	22
2.3. Nährmedien	23
2.4. Molekularbiologische Methoden.....	25
2.4.1. Standardmethoden.....	25
2.4.2. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	25
2.4.3. Transformation von <i>S. pombe</i>	26
2.4.4. Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	26
2.4.5. Isolierung genomischer DNA aus <i>S. pombe</i>	27
2.4.6. Generierung von <i>knock-out</i> Mutanten in <i>S. pombe</i>	28
2.4.7. Southern-Blot.....	28
2.4.8. Isolierung von RNA.....	29
2.4.9. Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR).....	30
2.4.10. RNA-Extraktion für Microarrays.....	30
2.4.11. Northern-Blot.....	31
2.4.12. Macroarray.....	31
2.5. Proteinchemische Methoden.....	32
2.5.1. Zellaufschluß und Membranpräparation.....	32
2.5.2. Quantifizierung von Proteinen.....	32
2.5.3. SDS Polyacrylamidgelelektrophorese.....	33
2.5.4. 2D Gele.....	33
2.5.5. Silberfärbung.....	34
2.5.6. Western- und Dot-Blot.....	35
2.5.7. <i>in vivo</i> Phytochelatinassay.....	36
2.5.8. Monobrombiman-Derivatisierung.....	36
2.5.9. Umkehrphasen-HPLC.....	36
2.5.10. Azetonfällung kleiner Proteine.....	37
2.5.11. Gelfiltration.....	37
2.5.12. Anzucht und Aufbereitung der Kulturen für die Metallbestimmung.....	37
2.5.13. Atomabsorptions- und Atomemissions-spektroskopische Messungen.....	38
2.5.14. Bestimmung der Atmungsaktivität.....	39
3. Ergebnisse.....	40
3.1. Generierung von Metallothionein <i>knock-out</i> Stämmen in <i>S. pombe</i>	41
3.2. Wachstumsuntersuchungen nach Zugabe verschiedener Metalle.....	43
3.2.1. Wachstum nach Cadmiumbehandlung.....	44
3.2.2. Wachstum nach Kupferbehandlung.....	46

3.2.3.	Wachstum nach Zinkbehandlung	47
3.2.4.	Wachstum nach Kobalt- und Nickelbehandlung	48
3.2.5.	Bestimmung der IC ₅₀ -Werte	50
3.3.	Wachstum unter Normalbedingungen	51
3.4.	Wachstum unter Kupferdefizienzbedingungen	52
3.5.	Untersuchungen zur Metallaufnahme der verschiedenen <i>S. pombe</i> Stämme	54
3.5.1.	Bestimmung der mediumunabhängigen Metallaufnahme	54
3.5.2.	Bestimmung der medienabhängigen Metallaufnahme	56
3.6.	Untersuchungen zur Elementzusammensetzung in Wildtyp und $\Delta zym1$	60
3.7.	Einfluß von Glutathion auf das Wachstum	64
3.8.	Bestimmung der Phytochelatingehalte	65
3.8.1.	Phytochelatinsynthese im EMM-Medium	68
3.8.2.	Phytochelatinsynthese im YE-Medium	69
3.9.	Lokalisierung von Zym1	70
3.10.	Metallbindung des Zym1	71
3.10.1.	Cadmiumbindungsstudien	72
3.10.2.	Zinkbindungsstudien	74
3.10.3.	Kupferbindungsstudien	75
3.10.4.	Metallbindungsstudien am rekombinanten Zym1	76
3.11.	Untersuchungen zur Stabilität von Zym1	78
3.12.	Komplementation des $\Delta cup1$ und $\Delta zym1$ durch Zym1	79
3.13.	Vergleich der Atmung von Wildtyp und $\Delta zym1$	81
3.14.	Untersuchungen zur Transkriptakkumulation von <i>zym1</i>	83
3.15.	Wachstum unter oxidativem Streß	85
3.16.	Macroarray	86
3.17.	Microarray	88
3.18.	Überprüfung der Macro- und Microarrayresultate durch RT-PCR	89
3.19.	Vergleich der Proteinexpression	90
4.	Diskussion	92
4.1.	Wachstumsuntersuchungen	93
4.1.1.	Das Inaktivieren des Zym1 hat keine Erhöhung der Metallsensitivität zur Folge	93
4.1.2.	Glutathion als extrazellulärer Chelator hat keinen Einfluß auf das Wachstums- und Toleranzverhalten	96
4.1.3.	Die MT <i>knock-out</i> Mutanten zeigen ein reduziertes Wachstum unter Normalbedingungen nur im Minimalmedium	97
4.1.4.	Zym1 ist nicht an der Kupferhomöostase unter Kupferdefizienzbedingungen beteiligt	99
4.2.	$\Delta zym1$ Mutanten nehmen weniger Zink auf	100
4.3.	Wildtyp und $\Delta zym1$ zeigen unterschiedliche Kalziumakkumulation nach Kupferzugabe	103
4.4.	Es gibt keine Interaktionen zwischen Metallothioneinen und Phytochelatinen in <i>S. pombe</i>	106
4.5.	Ist Zym1 ein zinkbindendes Metallothionein?	107
4.6.	Zym1 ist hauptsächlich zytosolisch lokalisiert	110
4.7.	Die Atmungsaktivität des MT <i>knock-out</i> ist nur leicht reduziert	111
4.8.	Die stärkste Transkriptakkumulation des <i>zym1</i> erfolgt nach oxidativem Streß	113
4.9.	$\Delta zym1$ ist nicht sensitiver gegenüber oxidativem Streß	114
4.10.	Weiterführende Experimente und Ausblick	116
5.	Zusammenfassung	119
6.	Literaturverzeichnis	123

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensionale Gelelektrophorese
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ABC-Transporter	<i>ATP-binding cassette transporter</i>
ADH	Alkoholdehydrogenase
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Abb.	Abbildung
AE	Absorptionseinheiten
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriophosphat
ATPase	Adenosintriophosphatase
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
BSO	Buthioninsulfoximin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CDF	<i>Cation Diffusion Facilitator</i> (Proteinfamilie)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C-Terminus	Carboxyterminus, carboxylendständiger AS-Rest
Cy3, Cy5	Fluoreszenzmarkierung
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d. h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol

γ -EC	γ -Glutamylcystein
γ -ECS	γ -Glutamylcysteinsynthetase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
GSH	Glutathion (reduziert), γ -Glu-Cys-Gly
GSH-S	Glutathionsynthetase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPPS	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-3-propansulfonsäure
HMW	<i>high molecular weight</i>
IC ₅₀	halbmaximale Inhibitorkonzentration
ICP-AES	induktiv gekoppelte Plasma-Atomemissionsspektroskopie
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LiAc	Lithiumacetat
LMW	<i>low molecular weight</i>
M	Molarität
MES	N-Morpholinoethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MRE	<i>metal response elements</i>
mRNA	<i>messengerRNA</i>
MTF1	<i>metal transcription factor1</i>
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MSA	Methansulfonsäure
MT	Metallothionein
NBT	Nitroblautetrazolium
N-Terminus	Aminoterminus, aminoendständiger AS-Rest
NaAc	Natriumacetat

OD _x	optische Dichte bei x nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Phytochelatin
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PCS	Phytochelatinsynthase
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Photosystem
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	<i>Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse Transcription</i> - Polymerase-Ketten-Reaktion
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
SSC	Natriumzitat-Salzlösung
ssDNA	<i>single strand DNA</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-HCl/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Trockengewicht
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp

x g	-fache Erdbeschleunigung
z. B.	zum Beispiel
ZIP	<i>zinc/iron regulated transporter protein</i> (Proteinfamilie)

Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

1. Einleitung

1.1. Vorkommen und Bedeutung von Schwermetallen

Die Chemie des Lebens ist die Chemie der leichten Elemente, der Metalle sowie Nichtmetalle. Einige dieser Elemente zählen zu den Schwermetallen. Diese Metalle sind durch eine Dichte, die größer als 5 g/cm^3 ist, definiert (Holleman & Wiberg, 1985). Zu ihnen zählen Metalle wie beispielsweise Chrom (Cr), Mangan (Mn), Eisen (Fe), Kobalt (Co), Nickel (Ni), Kupfer (Cu) und Zink (Zn). Diese Übergangsmetalle spielen in vielen Organismen eine große Rolle für den Stoffwechsel und das Wachstum. Neben diesen als essentiell beschriebenen Schwermetallen gibt es einige, die meist keine biologische Funktion in den Organismen haben. Zu diesen zählen Silber (Ag), Cadmium (Cd), Quecksilber (Hg) und Blei (Pb) sowie das Metalloid Arsen.

Schwermetalle zeichnen sich durch eine hohe Reaktivität aus, die sich anhand ihres Atombaus erklären lässt. So gehören die meisten Schwermetalle zu den Nebengruppen- oder d-Elementen. Durch die voluminöse Form der d-Orbitale und die dadurch verursachte geringe Kernanziehung weisen sie eine niedrige Ionisierungsenergie auf (Wolff & Glaum, 1985). Die Tendenz, leicht Elektronen abzugeben oder aufzunehmen, erklärt ihre Präsenz in Elektronentransportketten, aber auch ihre Funktion als Metall-Kofaktoren in vielen Enzymen. So sind Schwermetalle an Redoxreaktionen beteiligt, sie wechselwirken mit den verschiedensten Substraten und sorgen für Ladungsstabilisierung und Ladungsabschirmung sowie Wasserionisierung in den Katalysen (Schellenberger, 1989). Hierbei spielen vor allem Zink, Kupfer, Eisen und Mangan eine wichtige Rolle.

Zink ist der am häufigsten vorkommende Metall-Kofaktor. Es ist in der Katalyse der Alkoholdehydrogenase (ADH) und weiterer Dehydrogenasen beteiligt (Drewke & Ciriacy, 1988); (Keleti, 1966). Weiterhin ist es in Metallenzymen wie Aldolasen, Isomerasen, Carboanhydrasen, Proteasen, Nukleasen, Lipasen, Phosphatasen und Superoxiddismutasen (SOD) enthalten (Coleman, 1998); (Lee *et al.*, 2002).

Der größte Teil des Zinks ist in Zinkfinger-Proteinen, die schätzungsweise etwa 1 % aller Proteine ausmachen, zu finden (Rhodes & Klug, 1993). Zinkfinger-Motive gewährleisten die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA und ermöglichen die Genexpression und damit die Biosynthese der Proteine. Ein Mangel an Zink geht daher auch mit einer verringerten Proteinbiosynthese einher (Obata *et al.*, 1996).

Kupfer ist Bestandteil sowohl mehrerer Oxidasen, wie Aminoxidasen und Cytochrom-c Oxidasen als auch der SOD (Galiazzo *et al.*, 1988). In photosynthetisch aktiven Organismen

ist Kupfer für den lichtabhängigen Elektronenfluß zwischen Photosystem I und Photosystem II im Plastocyanin verantwortlich.

Ebenfalls essentiell für die Photosynthese ist das Element Mangan. Es ist im Wasserspaltungsapparat des Photosystems II enthalten, wo es die Hill-Reaktion katalysiert (Nugent *et al.*, 2001). Eine Mangandefizienz ist daher ähnlich dem Zinkmangel durch Chlorosen gekennzeichnet (Ozturk *et al.*, 2003). Katalytisch aktiv ist Mangan auch in Enzymen wie der ADH und der SOD (Coleman & Weiner, 1973); (Jung *et al.*, 2002). Mangan fungiert außerdem als Kofaktor der Phenylalaninammoniumlyase (PAL), die für die Synthese von Zimtsäure und phenolischen Verbindungen und damit antifungalen Substanzen verantwortlich ist.

Eisen spielt eine wichtige Rolle in Enzymen, die reaktive Sauerstoffspezies reduzieren, wie Peroxidasen und Katalasen. Es ist auch in den Elektronentransfer der Cytochrome involviert und wird für die Synthese des Porphyrinringes des Chlorophylls benötigt. Ein Mangel an Eisen verursacht neben Wachstumsstörung daher auch Chlorosen (Briat *et al.*, 1995).

Für die Stickstofffixierung in Mikroorganismen sind Eisen und Nickel wichtige Kofaktoren der Nitrogenase beziehungsweise der Hydrogenase (Mulrooney & Hausinger, 2003). In Pflanzen ist Nickel bisher nur in einem einzigen Enzym, der Urease, gefunden worden (Sirko & Brodzik, 2000).

Selbst für das als nicht-essentiell beschriebene Cadmium konnte eine Funktion als Kofaktor einer Carboanhydrase der marinen Diatomee *Thalassiosira weissflogii* nachgewiesen werden (Lane & Morel, 2000).

Die eingangs beschriebene hohe Reaktivität und die hohe Affinität zu Carboxyl- (COOH), Amino- (NH₂) und Sulfhydrylgruppen (SH) in Proteinen machen Schwermetalle allerdings auch zu Zellgiften. Unter den fünf toxischsten Substanzen befinden sich daher auch Cadmium, Blei und Quecksilber (Johnson & DeRosa, 1995). Durch anthropogene Einflüsse, wie der galvanisierenden und elektrotechnischen Industrie, aber auch durch Landwirtschaft, z. B. im Weinanbau, wurde der Eintrag von Schwermetallen in die Biosphäre drastisch erhöht. Erschwerend kommt hinzu, daß diese Metalle persistent sind und sich im Boden, Wasser und Sediment anreichern (Nriagu & Pacyna, 1988). Als eine Konsequenz daraus erhöht sich die biologische Resorption von Schwermetallen, vor allem in Mikroorganismen und Pflanzen.

Übergangsmetalle können aufgrund ihrer großen Affinität zu funktionellen Gruppen in Proteinen die Inhibierung einzelner Enzyme und in der Folge dessen die Unterbrechung gesamter Stoffwechselwege bewirken (Van Assche & Clijster, 1990). Des weiteren kommt es zur Konkurrenz mit essentiellen Metallionen in den Enzymen. Vor allem Cadmium und

Kupfer können Kofaktoren, wie Zink und Mangan, leicht aus den aktiven Zentren von Enzymen verdrängen, welches zu einer Inaktivierung dieser Enzyme und damit von gesamten Stoffwechselwegen führen kann.

Metalle, wie Kupfer, Eisen und Chrom, sind zudem in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies, wie Hydroxyl- (OH^\bullet) oder Superoxidradikale ($\text{O}_2^{\bullet-}$), über die Haber-Weiss- oder Fenton-Reaktion zu bilden (Halliwell & Gutteridge, 1984). Diese hochreaktiven Radikale können mit der DNA reagieren, was zu Modifikationen der Basen und Depurinierungen führen kann. Außerdem kann es zur Oxidation von Lipiden und Proteinen kommen. Letzteres hat oftmals eine Änderung der Konformation mit anschließender Inaktivierung der Proteine und Enzyme zur Folge (Avery, 2001).

Auch nicht-redoxaktive Metalle wie Cadmium, Quecksilber, Nickel und Blei können indirekt reaktive Sauerstoffspezies generieren. Zum einen verdrängen sie redoxaktive Metalle aus ihren Bindungszentren oder sie verringern den Gehalt des reduzierten Glutathions, eines wichtigen Antioxidanz für die Zelle (Avery, 2001).

Übergangsmetalle erlangten auch Bedeutung in Verbindung mit einigen humanen Krankheiten. So werden besonders Kupfer, aber auch Eisen, Zink und Mangan mit neurodegenerativen Krankheiten wie Parkinson's, Alzheimer und *prion diseases* in Zusammenhang gebracht (Bush, 2000); (Lehmann, 2002).

Dennoch sind die Organismen den Schwermetallen nicht schutzlos ausgeliefert. Prokaryoten wie auch Eukaryoten haben Mechanismen entwickelt, die auf der einen Seite den toxischen Eigenschaften von Schwermetallen entgegenwirken, andererseits aber auch eine Versorgung bestimmter Stoffwechselwege und Kompartimente mit diesen Metallen zulassen. So ist es nicht überraschend, daß es Überlappungen einiger detoxifizierender Prozesse mit Mechanismen der Metallhomöostase gibt. Prinzipiell werden zu den Mechanismen, die die Metallkonzentrationen innerhalb einer Zelle modulieren können, die Aufnahmeregulierung bzw. der Ausschluß von Metallen aus der Zelle, die Chelatierung, die Kompartimentierung, die Biotransformation und die Zellreparatur gezählt. In den nächsten Kapiteln soll auf einige dieser Mechanismen näher eingegangen werden.

1.2. Metallaufnahme

Zink, Kupfer, Eisen und Mangan sind essentielle Nährelemente. Im Überschuß können sie allerdings toxisch wirken. Daher ist eine Regulierung der Metallaufnahmesysteme unabdingbar. Eine Voraussetzung des Metalltransports über biologische Membranen ist die Existenz transportierender Membranproteine. Der diffusionsgetriebene passive Transport von

Metallionen wird dabei durch Kanäle oder Poren gewährleistet (Frausto da Silva & Williams, 2001). Als Antriebskraft für diese Art des Transports ist ein Konzentrationsunterschied zwischen Außen- und Innenmilieu ausreichend. Aktive Transporter hingegen werden durch Energiekopplung angetrieben. Dabei unterscheidet man Transportprozesse, die durch ATP-Hydrolyse mittels ATPasen energetisiert oder durch die protonenmotorische Kraft (PMF) bewirkt werden. Letzteres treibt den Metalltransport durch die Existenz eines elektrochemischen Protonengradientens, der über der gesamten Membran aufgebaut wird, an. Einige dieser passiven und aktiven Transporter sollen in den nächsten Abschnitten näher beschrieben werden.

Die Aufnahme einzelner Metalle erfolgt über zwei oder mehrere Transportsysteme. Meist wird hierbei zwischen *high affinity* und *low affinity* Systemen unterschieden. Das *high affinity* System wird dabei unter Mangelbedingungen aktiviert, während das *low affinity* System im Überschuß von Metallionen den Transport dieser Ionen ermöglicht. Diese invers zur Metallkonzentration regulierte Aktivierung der Aufnahmesysteme stellt eine erste Kontrollstufe dar. Obwohl Eisen das zweithäufigste Element der Geosphäre ist, wird seine Aufnahme stark eingeschränkt, da es als unlösliches Fe^{3+} vorliegt. Die meisten Mikroorganismen und einige Pflanzen sind in der Lage, Siderophore zu sekretieren. Über diese *low molecular weight* Chelatoren wird Eisen gebunden und dann mittels spezifischer Transporter in die Zelle aufgenommen (Neilands, 1995). Obwohl die Hefen *Schizosaccharomyces pombe* und *Saccharomyces cerevisiae* selbst keine Siderophore bilden, können sie Siderophore anderer Organismen nutzen und Eisen über spezifische Transportsysteme aufnehmen (Lesuisse *et al.*, 2001).

Neben diesem nicht-reduktiven Transport besteht die Möglichkeit, Eisen nach vorheriger Reduktion zu Fe^{2+} aufzunehmen. In *S. pombe* geschieht dieses über ein Drei-Komponentensystem. Nachdem Fe^{3+} durch die Reduktase Frp1 zu Fe^{2+} reduziert wurde, erfolgt die Aufnahme über den Permease/Oxidase Komplex Fip1/Fio1 (Roman *et al.*, 1993); (Askwith & Kaplan, 1997). Für *S. cerevisiae* wurde zuvor ein analoges System, bestehend aus den Reduktasen Fre1 und Fre2 sowie dem Permease/Oxidase Komplex Fet3/Ftr1, beschrieben (Eide, 1998).

Unter Überschußbedingungen wird Eisen wie schon beim *high affinity* System über Fre1 und Fre2 reduziert und über den *low affinity* Eisentransporter Fet4 aufgenommen (Dix *et al.*, 1994).

Analog zum Eisenaufnahmesystem kann Kupfer je nach Verfügbarkeit über ein *high affinity* oder *low affinity* System aufgenommen werden. In *S. cerevisiae* wird Cu^{2+} dabei durch die

bereits erwähnten Reduktasen Fre1 und Fre2 zu Cu^+ reduziert (Hassett & Kosman, 1995). Die Aufnahme erfolgt im *high affinity* System über die plasmamembranständigen Transporter Ctr1 und Ctr3 (Dancis *et al.*, 1994); (Pena *et al.*, 2000). Die Regulation der Expression von Fre1, Ctr1 und Ctr3 wird dabei über den kupferresponsiven Transkriptionsfaktor Mac1 vermittelt (Labbe *et al.*, 1997). Eine zweite, posttranslationelle Regulationsmöglichkeit ist für Ctr1 bekannt. Bei zu hohen Kupferkonzentrationen wird das Protein degradiert und so eine erhöhte Akkumulation von Kupfer verhindert (Ooi *et al.*, 1996). Bei hohen Kupferkonzentrationen werden außerdem *low affinity* Systeme aktiviert. Zu diesen zählen die zur Smf-Familie gehörenden Transporter und Ctr2 (Cohen *et al.*, 2000); (Kampfenkel *et al.*, 1995).

Kürzlich wurde für *S. pombe* ein *high affinity* Kupfertransportkomplex identifiziert. Nur eine Koexpression der beiden Transporter Ctr4 und Ctr5 führt zu einer Lokalisierung in der Plasmamembran und gewährleistet die Kupferaufnahme. Die Transkription beider Gene wird durch den metallregulatorischen Transkriptionsfaktor Cuf1 reguliert (Zhou & Thiele, 2001).

Die Aufnahme von Zink in *S. cerevisiae* wird über den *high affinity* Zinktransporter Zrt1 bzw. den *low affinity* Transporter Zrt2 vermittelt (Zhao & Eide, 1996a); (Zhao & Eide, 1996b). Die Regulation dieser Gene in Abhängigkeit von der Zinkkonzentration erfolgt durch den Transkriptionsfaktor Zap1 (Zhao *et al.*, 1998). Eine posttranslationelle Regulation ist nur für Zrt1 bekannt. Bei hohen Zinkkonzentrationen wird das Protein ubiquitinyliert und über Endozytose in die Vakuole transportiert, wo es degradiert wird (Gitan *et al.*, 1998). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß diese Form der Aufnahmeregulation die Toleranz gegenüber Cadmium unter zinklimitierenden Bedingungen erhöhen kann (Gitan *et al.*, 2003). Zrt1 wird nicht nur unter Zinküberschuß, sondern auch bei Zinkmangel abgebaut. Da Zrt1 die Aufnahme von Cadmiumionen gerade unter Zinkmangel bewirkt, verhindert die Inaktivierung des Zrt1 durch Endozytose den Transport dieser toxischen Ionen in die Hefezelle.

In *S. pombe* sind drei zur ZIP-Familie (*ZRT-like*, *IRT-like Proteins*) gehörende putative Zinktransporter in der Datenbank (<http://www.genedb.org/genedb/pombe/index.jsp>) annotiert. Diese wurden bisher noch nicht genauer charakterisiert.

Die Aufnahme der als nicht-essentiell beschriebenen Schwermetallionen erfolgt über Transporter der essentiellen Übergangsmetalle. Generell weisen die *low affinity* Transporter eine geringere Substratspezifität auf. So wird beispielsweise neben Eisen auch Kupfer, Mangan, Zink und Kobalt durch Fet4 in die Hefezelle transportiert (Dix *et al.*, 1997). Cadmium kann wie bereits erwähnt durch Zrt1 oder aber durch Kalzium-Kanäle aufgenommen werden. Dieses konnte für den pflanzlichen Kalzium-Transporter LCT1 in

S. cerevisiae gezeigt werden (Clemens *et al.*, 1998). Der Eisentransporter IRT1 aus *Arabidopsis thaliana* weist ebenfalls eine geringe Substratspezifität auf. In *S. cerevisiae* exprimiert, zeigt er Aufnahme von Mangan und Zink (Korshunova *et al.*, 1999). Außerdem verursacht er einen cadmiumsensitiven Phänotyp (Rogers *et al.*, 2000). Eine verstärkte Cadmiumaufnahme und eine erhöhte Cadmiumsensitivität könnte für 35S-IRT1 *A. thaliana* Pflanzen unter Eisendefizienzbedingungen nachgewiesen werden und bestätigt die Aufnahme dieses Metalls durch IRT1 (Connolly *et al.*, 2002).

Prinzipiell wird die Metallaufnahme durch viele weitere Faktoren beeinflusst, so z. B. pH und Redoxkraft des umgebenden Mediums. Aber auch das Vorhandensein von Bindungspartnern und Kompartimenten innerhalb der Zelle scheint von großer Bedeutung zu sein.

Passive Transportprozesse würden nur so lange aufrechterhalten werden, bis die Konzentration der Metallionen auf beiden Seiten der Diffusionsbarriere ausgeglichen wäre. Durch die Bindungen der Metallionen an intrazelluläre Bindungspartner werden diese aus dem Gleichgewicht genommen und der diffusionsgetriebene Transport findet weiter statt (Frausto da Silva & Williams, 2001). Auch Bindungsplätze innerhalb der aktiven Transporter werden durch die Chelatierung an intrazelluläre Moleküle für weitere Ionen zugänglich. Wichtig ist außerdem, daß die verschiedenen Metallionen unterschiedliche Affinität zu intrazellulären Bindungspartnern aufweisen. Daher kann ein Metall, das beispielweise im Überschuß vorliegt, nicht die gesamten intrazellulären Bindungsplätze absättigen und die Aufnahme anderer Ionen in die Zelle verhindern. Des weiteren stellt auch die Menge eines bestimmten intrazellulären Chelators einen Kontrollmechanismus für die Aufnahme eines Metallions dar. Darüber hinaus können die an Chelatoren gebundenen Ionen in Kompartimente transportiert und gespeichert werden. Damit wären wieder intrazelluläre Bindungsstellen für die Aufnahme weiterer Metallionen frei.

Sowohl auf die Kompartimentierung als auch auf einige intrazelluläre Chelatoren für Metalle soll in den nächsten Kapiteln näher eingegangen werden.

1.3. Glutathion

Mit einer Konzentration von mehr als 10 mM in der Hefezelle ist Glutathion (GSH) prädestiniert als einer der initialen Bindungspartner von Schwermetallionen. Neben seiner Funktion als Chelator ist es außerdem essentiell für die Entgiftung von Xenobiotika, wirkt als Antioxidanz und stellt den größten reduzierten nicht-proteinogenen Schwefelspeicher dar (Noctor *et al.*, 2002). Außerdem ist es in die Protein- und DNA-Synthese involviert und wird

für die Aufrechterhaltung der Membranintegrität benötigt. Darüberhinaus ist es für die Regulation der Aktivität einiger Enzyme verantwortlich (Meister & Anderson, 1983).

Glutathion ist aus den Aminosäuren Glutamat (Glu), Cystein (Cys) und Glycin (Gly) aufgebaut. Die Synthese erfolgt über zwei ATP-abhängige Reaktionen. Die γ -Glutamylcysteinsynthetase (γ -ECS E.C. 6.3.2.2) katalysiert die Ligation von Glutamat und Cystein über eine γ -Peptidbindung. Dieses Dipeptid wird dann mit Glycin durch die Glutathionsynthetase (GSH-S E.C. 6.3.2.3) verknüpft (Meister & Anderson, 1983).

Die Synthese von γ -Glutamylcystein ist der limitierende Schritt in der GSH-Synthese. Sie ist nicht nur durch die Verfügbarkeit von Cystein beeinflusst, sondern wird auch durch eine *feed back* Hemmung des Glutathions auf die γ -ECS reguliert (Hell & Bergmann, 1990).

Durch die Inhibierung der γ -ECS durch Buthioninsulfoximin (BSO) kann die Synthese von γ -Glutamylcystein stark herabgesetzt und in Folge dessen die Synthese von Glutathion nahezu unterbunden werden (Griffith & Meister, 1979).

Sowohl *gsh1* als auch *gsh2*, die die Strukturgene der γ -ECS bzw. GSH-S darstellen, unterliegen einer strikten Regulierung. In *A. thaliana* konnte für diese beiden Gene eine erhöhte Transkriptakkumulation eine Stunde nach Cadmium- bzw. Kupferbehandlung gezeigt werden (Xiang & Oliver, 1998). Für alle anderen Schwermetalle konnte keine Induktion von *gsh1* und *gsh2* nachgewiesen werden.

Auch in der Spaltheife *S. pombe* konnte eine erhöhte Expression der GSH-S nach Cadmium-, aber auch nach oxidativem Streß gezeigt werden (Kim *et al.*, 2003). Eine Überexpression dieses Enzyms hatte neben einem erhöhten GSH-Gehalt auch eine gesteigerte γ -ECS-Aktivität zur Folge. Außerdem zeigten diese Transformanden eine erhöhte Toleranz gegenüber Cadmium und Quecksilber. Glutathion-defiziente Mutanten hingegen wiesen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Cadmium und in geringerem Maße auch gegenüber Kupfer auf (Coblenz & Wolf, 1994).

1.4. Phytochelatine

Die erhöhte Cadmiumsensitivität der GSH-defizienten Mutanten ist nicht allein durch den stark verminderten Gehalt des Glutathions zu erklären. Vielmehr sind diese Mutanten durch das Fehlen von Phytochelatinen (PC) gekennzeichnet.

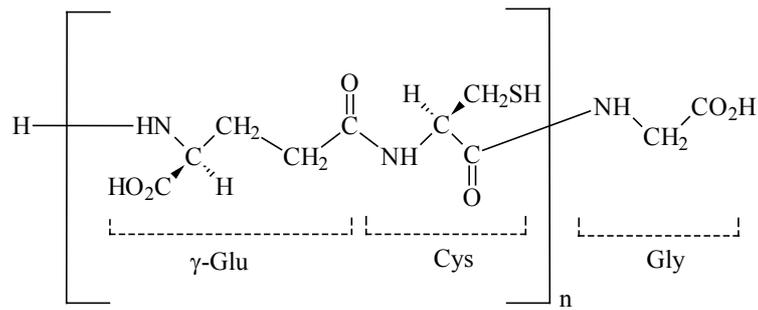


Abb. 1.4-1 Struktur der Phytochelatine (PC_n): Der Index n gibt die Anzahl der repetitiven γ-Glutamylcystein-einheiten an.

Phytochelatine sind niedermolekulare cysteinreiche Peptide, die aus zwei bis maximal 11 Glutathioneinheiten aufgebaut sind (siehe Abb. 1.4-1).

Sie wurden erstmals 1981 als Cd-bindende Peptide in *S. pombe* charakterisiert und als Cadystine bezeichnet (Murasugi *et al.*, 1981). Sie setzen sich aus den drei Aminosäuren L-Glutamat, L-Cystein und Glycin zusammen (Murasugi *et al.*, 1983). Kurze Zeit später wurden diese Verbindungen auch in Pflanzen nachgewiesen. Die Extrakte cadmium-behandelter *Rauwolfia serpentina* Kulturen zeigten ebenfalls streßinduzierte Verbindungen der gleichen Aminosäurezusammensetzung (Grill *et al.*, 1985). Untersuchungen von mehr als 200 Pflanzenspezies ergaben, daß diese Peptide weit verbreitet zu finden sind, so z. B. in Blütenpflanzen, Farnen, Algen und einigen Moosen (Gerkeler *et al.*, 1989). Auf Grund der Annahme, daß diese Peptidchelatoren nur in Pflanzen und Hefen, nicht aber in tierischen Organismen vorkommen, wurden sie als *Phytochelatine* bezeichnet.

Neben der strukturellen Ähnlichkeit von Glutathion und Phytochelatinen wiesen auch wechselseitige Abhängigkeiten ihrer Konzentrationen auf eine Verknüpfung dieser beiden Stoffwechselwege hin. So konnte während der Phytochelatinbildung eine Abnahme des Glutathiongehaltes beobachtet werden (Rauser, 1995). Eine Induktion der Phytochelatinbiosynthese über Transkription und Translation wurde zum einen wegen der γ-Peptidverknüpfung und zum anderen wegen der schnellen Streßantwort ausgeschlossen. Die ersten Phytochelatine konnten bereits 15 Minuten nach Streßapplikation nachgewiesen werden (Grill *et al.*, 1987). Dieses deutete daraufhin, daß das katalytisch aktive Enzym konstitutiv exprimiert sein muß und die Synthese von PC unabhängig von einer Proteinneusynthese vonstatten gehen muß. Letzteres wurde durch das Einsetzen des Proteinbiosyntheseinhibitors Cycloheximid nachgewiesen (Scheller *et al.*, 1987).

Grill und Mitarbeitern gelang es letztendlich, das für die Synthese verantwortliche Enzym zu charakterisieren (Grill *et al.*, 1989). Die Phytochelatinsynthase (PCS E.C. 2.3.2.15) wirkt als

Transpeptidase und verknüpft γ -Glutamylcystein mit Glutathion oder einem Phytochelatinpeptid unter Freisetzung von Glycin ohne ATP-Verbrauch. Die Synthese von Phytochelatinen erfolgt erst nach Aktivierung des Enzyms mit Schwermetallionen. Neben Cd^{2+} als stärkstem Aktivator sind auch Pb^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Hg^{2+} und Arsenat bzw. Arsenit zur Aktivierung befähigt. Alkali- und Erdalkalielemente sowie Chrom, Kobalt und Eisen induzieren hingegen keine Phytochelatinsynthese (Grill *et al.*, 1987). Trotz der Vielzahl von Schwermetallen, die die Synthese von Phytochelatinen induzieren, konnten *in vivo* nur Komplexe mit Cadmium, Kupfer und Arsen nachgewiesen werden (Maitani *et al.*, 1996); (Schmöger *et al.*, 2000).

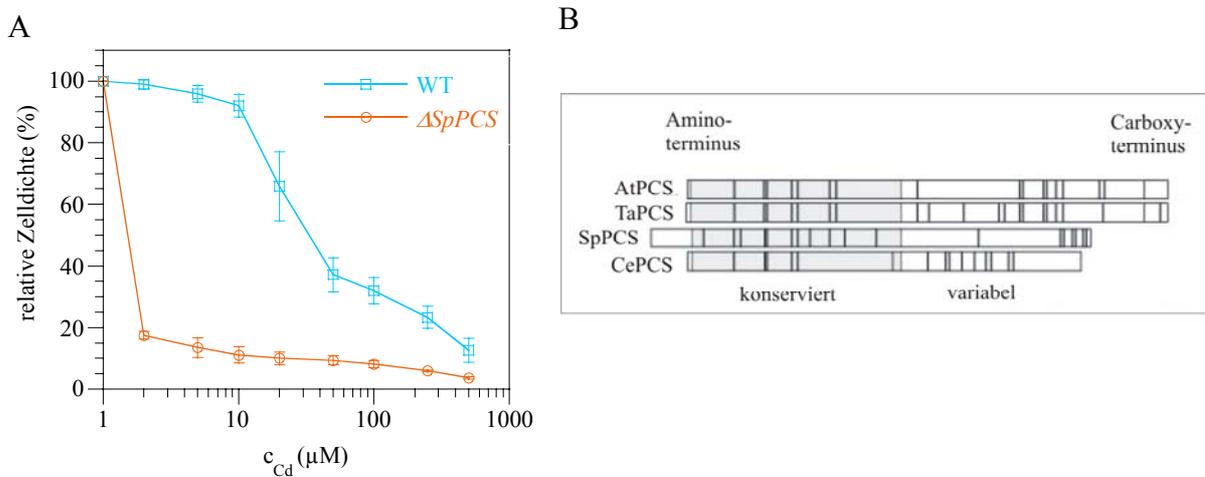


Abb. 1.4-2 Wachstum der PCS *knock-out* Mutante nach Cadmiumbehandlung und die Struktur verschiedener Phytochelatinsynthesen: Der *S. pombe* Wildtyp und der PCS *knock-out* wurden auf eine Start-OD von 0,1 im EMM-Medium eingestellt und in den entsprechenden Cadmiumkonzentrationen für 18 – 20 Stunden bei 30 °C und 150 rpm wachsen gelassen (A). Schematische Darstellung der verschiedenen Phytochelatinsynthesen (B) aus *A. thaliana* (AtPCS), Weizen (*TaPCS*), *S. pombe* (SpPCS) und *C. elegans* (CePCS) modifiziert nach (Cobbett, 2000). Die senkrechten Striche markieren die Positionen der Cysteine.

Erst zehn Jahre nach den ersten enzymatischen Untersuchungen konnten die PCS-Gene verschiedener Organismen identifiziert und kloniert werden (Clemens *et al.*, 1999); (Ha *et al.*, 1999); (Vatamaniuk *et al.*, 1999). Neben den Phytochelatinsynthasegenen von *A. thaliana* (*AtPCS*) und Weizen (*TaPCS*) wurde durch Sequenzvergleiche ein homologes Gen in *S. pombe* gefunden und *SpPCS* benannt. Die Gene wurden in *S. cerevisiae* bzw. *Escherichia coli* transformiert. Beide Mikroorganismen besitzen keine Phytochelatinsynthase und sind daher auch nicht in der Lage, Phytochelatine zu synthetisieren. Nach Cadmiumbehandlung konnten in den Proteinextrakten der Transformanden Phytochelatine nachgewiesen werden (Clemens *et al.*, 1999); (Ha *et al.*, 1999); (Vatamaniuk *et al.*, 1999). Außerdem zeigten die Transformanden gegenüber Kontrollzellen eine erhöhte Cadmiumtoleranz. Die katalytische Funktion der PCS-Genprodukte für die Phytochelatinsynthese und ihre Bedeutung für die Cadmiumtoleranz konnte damit belegt werden.

In *S. pombe* wurde außerdem ein PCS *knock-out* ($\Delta SpPCS$) generiert. Dieser ist nicht mehr in der Lage, Phytochelatine zu synthetisieren und zeigt Hypersensitivität gegenüber Cadmium (siehe Abb. 1.4-2A) (Clemens *et al.*, 1999); (Ha *et al.*, 1999). Durch die Transformation von pSGP72/*SpPCS* in $\Delta SpPCS$ erlangte dieser seine Fähigkeit zur Phytochelatinsynthese und seine Cadmiumtoleranz wieder.

Sequenzhomologiestudien der verschiedenen Phytochelatinsynthasen zeigen einen hochkonservierten N-Terminus und einen nicht-konservierten C-Terminus (Abb. 1.4-2B). Es wurde daher postuliert, daß der N-Terminus die katalytisch aktive Domäne der PCS darstellt, während der C-Terminus eher als Metallsensor gilt (Cobbett, 1999). Letzterer bindet Metalle in noch unbestimmter Form und bringt sie näher mit der katalytischen Domäne in Kontakt. Daraufhin wird das Enzym katalytisch aktiviert. Hierbei werden sowohl Metall-Bisglutathionatkomplexe als auch freie Metallionen als Aktivatoren der PCS diskutiert (Vatamaniuk *et al.*, 2000); (Oven *et al.*, 2002). Die Synthese von Phytochelatinen erfolgt bis alle Schwermetallionen physiologisch inaktiviert sind. Die neu synthetisierten Phytochelatine kompetitieren mit den im Enzym gebundenen Ionen und inaktivieren somit die PC-Synthase. Diese Form der Autoregulierung wurde von Löffler und Ko-Autoren nachgewiesen (Löffler *et al.*, 1989). Auch der Einsatz von künstlichen Chelatoren wie EDTA führt zu einer Inaktivierung des Enzyms.

Interessanterweise zeigen auch Sequenzen tierischer Organismen, wie *Caenorhabditis elegans*, *C. briggsae*, *Dictyostelium discoideum* und *Cionia intestinalis*, Homologien zu Phytochelatinsynthasen (Clemens *et al.*, 2001; Cobbett & Goldsbrough, 2002); (Dehal *et al.*, 2002). Damit wurde die Hypothese, daß sich das Vorkommen von Phytochelatinen auf pflanzliche und pilzliche Organismen beschränkt und tierische Organismen eher Metallothioneine (MT) als detoxifizierendes Protein nutzen, widerlegt.

Die Expression der PCS aus *C. elegans* in *S. cerevisiae* und der *S. pombe* $\Delta SpPCS$ Mutante vermittelte eine erhöhte Resistenz gegenüber Cadmium (Vatamaniuk *et al.*, 2001); (Clemens *et al.*, 2001). Die Funktionalität der CePCS wurde zusätzlich durch den Nachweis von Phytochelatinen in beiden Hefen bestätigt. Für die Metallothioneine der Invertebraten und Vertebraten wurde hauptsächlich Cadmiumbindung und -detoxifizierung nachgewiesen. Allerdings ist es unumstritten, daß Phytochelatine die Entgiftung von Cadmiumionen bewirken. Das Vorkommen von Phytochelatinen und Metallothioneinen in einem Organismus wirft Fragen über die Funktion des jeweiligen Chelators auf. Sind Metallothioneine solcher Organismen wirklich an der Detoxifizierung nicht-essentieller Schwermetalle beteiligt oder gewährleisten sie die Homöostase essentieller Metallionen? Bisher jedoch wurde den

Metallothioneinen einen größeren Beitrag an der Detoxifizierung in Organismen, die sowohl über MT als auch PC verfügen, beigemessen (Yu *et al.*, 1994).

1.5. Metallothioneine

Metallothioneine wurden 1957 als cadmiumbindendes Protein aus Pferdeniere isoliert (Margoshes & Vallee, 1957). Seitdem wurden diese Proteine in weiteren tierischen Organismen wie auch in Hefen, Pilzen, Pflanzen und einigen Prokaryoten nachgewiesen (Hamer, 1986).

1976 wurde die erste Aminosäuresequenz eines MT publiziert (Kojima *et al.*, 1976). Metallothioneine haben eine ungewöhnliche Aminosäurezusammensetzung. Diese kleinen Proteine besitzen meist keine aromatischen und nur wenige hydrophobe Aminosäuren. Ihr Cysteingehalt beträgt bis zu 33 %, wobei die Cysteine in Cys-X-Cys oder Cys-X-X-Cys Clustern angeordnet sind (Kägi & Schaffer, 1988).

Auf Grund des hohen Cysteinanteils im Protein nahm man an, daß Metallothioneine für die Bindung und Detoxifizierung von Schwermetallen verantwortlich sein könnten. In weiteren Untersuchungen fand man tatsächlich einen hohen Metallgehalt innerhalb der MT. Vier bis zu 12 Mol Metallatome pro Mol Protein werden über Thiolate an die Cysteine gebunden (Hamer, 1986). Dabei fand man in tierischen MT hauptsächlich Zink chelatiert. Dieses kann allerdings leicht durch Kupfer und Cadmium verdrängt werden (Shaw *et al.*, 1991). Kupfer hingegen wird bevorzugt durch pflanzliche, pilzliche und Hefe-MT komplexiert.

Auf Grund der zunehmenden Anzahl an MT-Sequenzen mußte die von Kägi und Ko-Autoren vorgeschlagene Nomenklatur der Metallothioneine erweitert werden (Kägi & Kojima, 1979). So wurde die Einteilung in drei Klassen eingeführt (Fowler *et al.*, 1987). In die Klasse I wurden alle dem ursprünglich identifizierten Pferdenieren-MT ähnlichen Metallothioneine zugeordnet. Zur Klasse II gehören jene MT, die keine Sequenzhomologie zu diesem MT zeigen. Als MT der Klasse III werden die Phytochelatine (siehe 1.4) bezeichnet.

Aber auch diese Nomenklatur war bald nicht mehr ausreichend, so daß eine Unterteilung in MT-Familien, Unterfamilien und Untergruppen vorgeschlagen wurde (Kojima *et al.*, 1999). Diese Nomenklatur erfolgte aufgrund von Sequenzvergleichen und taxonomischer Einordnung (siehe auch <http://www.unizh.ch/~mtpage/classif.html>).

Neben der frühen Aufklärung der Aminosäurestruktur gehören Metallothioneine auch zu den ersten Proteinen, deren Struktur über NMR und Röntgenkleinwinkelstreuung ermittelt wurde (Otvos & Armitage, 1980); (Furey *et al.*, 1986).

humanes MT-2A
MDPNCSCAAGDSCTCAGSCKCKECKCTSCCKSCCSCPVGCAKCAQGCICKGASDKCSCCA

***A. thaliana* MT-2b**
MSCCGGSCGCGSACKCGNGCGGCKRYPDLENTATETLVLGVAPAMNSQYEASGETFVAENDA
CKCGSDCKCNPCTCK

***N. crassa* MT**
MGDCGCSGASSCNCGSGCSCSNCGSK

***C. elegans* MTII**
MVCKCDCKNQNCSCNTGTKDCDCSDAKCCEQYCCPTASEKKCKKSGCAGGCKACECAQAA
H

***S. cerevisiae* Cup1**
MFSELINFQNEGHECQCQCQCGSCKNNEQCQKSCSCPTGCNSDDKCPCGKNSEETKKSCCSGK

***S. cerevisiae* Crs5**
MTVKICDCGECCKDSCHCGSTCLPSCSGGEKCKCDHSTGSPQCKSCGEKCKCETTCTCEKSK
CNCEKC

***S. pombe* Zym1**
MEHTTQCKSKQGKPCDCQSKCGCQDCKESCGCKSSAVDNCKCSSCKCASK

Abb. 1.5-1 Aminosäuresequenz einiger Metallothioneine verschiedener Organismenklassen.

Trotz der teilweise recht unterschiedlichen Primärsequenzen (siehe Abb. 1.5-1) und der ungleichen Cysteinverteilung zeigen die dreidimensionalen Strukturen der verschiedenen Metallothioneine untereinander wenig Unterschiede (Vasak & Hasler, 2000).

Säuger-MT haben ein Molekulargewicht von 6000 – 7000. Sie besitzen zwei Domänen, die durch einen Linker von zwei bis etwa 20 Aminosäuren verbunden sind. Die carboxyterminale oder α -Domäne enthält 11 Cysteine, während die aminoternale oder β -Domäne nur neun Cysteine aufweist (Hamer, 1986). Beide Domänen verfügen über Metallbindungsstellen, die sich aber durch eine unterschiedliche Affinität zu den verschiedenen Metallen auszeichnen. So wurden Cadmium und Zink hauptsächlich in der C-terminalen und Kupfer in der N-terminalen Domäne nachgewiesen (Nielson & Winge, 1983); (Nielson & Winge, 1984). Die Bindung von Cadmium und Zink erfolgt tetrahedral über jeweils vier Cysteine, während Kupfer trigonal pyramidal oder digonal gebunden wird (Stillman, 1995). Es können in der α -Domäne vier Zink- oder Cadmiumatome bzw. sechs Kupferatome und in der β -Domäne sechs Kupferatome bzw. drei Zink- oder Cadmiumatome gebunden werden (siehe Abb. 1.5-2A u. B). Die Rekonstitution der einzelnen Domänen mit den Metallen erfolgt dabei unabhängig voneinander (Nielson & Winge, 1985).

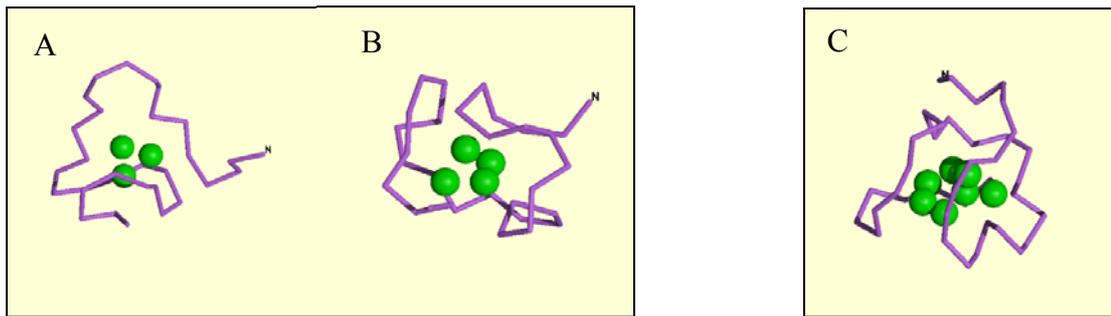


Abb. 1.5-2 Metallbindung in den Metallothioneinen: Schematische Darstellung der β - und α -Domäne des Maus [Cd7]-MT-1 (A bzw. B); (Zangger *et al.*, 1999). Die grünen Kugeln markieren die Cadmiumatome. Struktur des silbersubstituierten Cup1 aus *S. cerevisiae* (C); (Peterson *et al.*, 1996). Die grünen Kugeln markieren die Silberatome. Die Abbildungen wurden der RCSB Proteindatenbank entnommen (<http://www.rcsb.org/pdb/>).

Neben Säuger-MT wurde auch das Metallothionein Cup1 aus *S. cerevisiae* genauer untersucht. Im Unterschied zu seinem zweiten MT Crs5, das für die Metalldetoxifizierung nur eine untergeordnete Rolle spielt, besteht Cup1 nur aus einer Domäne (Abb. 1.5-2C) (Jensen *et al.*, 1996). Diese ist in der Lage, sieben Kupferatome zu binden.

Auch die Gene, die für Cup1 und Crs5 kodieren, zeigen unerwartet große Unterschiede. So sind sie auf zwei verschiedenen Chromosomen lokalisiert und zeigen große strukturelle Variabilität. Derartige Unterschiede sind bisher in den kodierenden Sequenzen von MT höherer Eukaryoten noch nicht gefunden worden. Diese besitzen mindestens zwei strukturell miteinander verwandte Gene, die zu einer Multigenfamilie gehören. In *A. thaliana* sind sechs, in Mäusen vier und im Menschen derzeit 17 Metallothioneinsequenzen bekannt.

MT-Gene werden durch eine Vielzahl von Stimuli, so z. B. durch Hormone, Wachstumsfaktoren, Metallionen, Hitzeschock und viele weitere Stressbedingungen oder Wirkstoffe, induziert (Kägi, 1991). In die Regulierung sind dabei *cis*- und *trans-acting elements* involviert (Hamer, 1986).

Die Biosynthese von Metallothioneinen, aber auch anderer Metallhomöostaseproteine, wird transkriptionell durch metallregulatorische Transkriptionsfaktoren (MRTF) induziert. Dabei sind in tierischen Organismen nur *MT-I* und *MT-II* induzierbar (Palmiter, 1987). Der Transkriptionsfaktor MTF1 (*metal transcription factor 1*) bindet in Gegenwart von Zink an *cis-acting* MRE (*metal response elements*). Diese liegen innerhalb der 5' Promotorregion des jeweiligen Gens (Andrews, 2000).

In *S. cerevisiae* wurde der kupferresponsive Transkriptionsfaktor Ace1, auch als Cup2 bezeichnet, entdeckt (Thiele, 1988); (Buchman *et al.*, 1989). Ace1 wirkt als Kupfersensor und weist eine ähnlich Struktur wie Cup1 auf. Seine N-terminale Domäne besitzt 11 für die Kupferbindung essentielle Cysteine, die ebenfalls in Cys-X-Cys Clustern angeordnet sind

(Fürst *et al.*, 1988). Durch die Kupferbindung wird die Konformation von Ace1 verändert und die Bindung an die DNA stabilisiert (Dameron *et al.*, 1991). Ace1 interagiert mit dem *cis-acting* Promotorelement des *CUP1* Gens nur in Anwesenheit von Kupfer oder Silber. Da Ace1 im Zellkern lokalisiert ist, muß Kupfer in den Nukleus transportiert werden. Kupfer wird hauptsächlich über Chaperone in andere Organelle transportiert. Bisher konnte aber noch kein Protein identifiziert werden, das für einen Transport in den Kern verantwortlich ist (Winge, 2002). Ebenfalls ungeklärt ist, ob das redoxaktive Kupfer über Apothioneine, die metallfreie Form der MT, gebunden oder durch Effluxpumpen aus dem Zellkern entfernt wird (Wright *et al.*, 1988).

Die bereits erwähnte Induzierbarkeit der MT-Gene durch eine Vielzahl von Stressfaktoren und chemischen Substanzen macht es nahezu unmöglich, eine spezifische Funktion für diese Proteine zu definieren. Selbst Jahrzehnte nach der Entdeckung dieser Proteine ist es noch nicht gelungen, die Metallothioneine funktionell zu charakterisieren (Palmiter, 1998). Durch das Vorhandensein von Multigenfamilien in den meisten Organismen ist das Generieren von *knock-out* Mutanten und somit die Untersuchung möglicher Funktionen erschwert. Auf der anderen Seite läßt das Vorkommen verschiedener, gewebsspezifischer und unterschiedlich regulierter MT Isoformen auf komplexe Funktionen schließen. So konnte neben den metallresponsiven und an der Metalldetoxifizierung beteiligten MT-I und MT-II aus Mäusen ein weiteres Metallothionein nachgewiesen werden. Dieses als MT-III bezeichnete MT wird nicht durch Metalle induziert und trägt nicht zu einer Toleranzsteigerung in *MT-I* und *MT-II* Null Mäusen bei (Palmiter *et al.*, 1992).

Dennoch ist die Hypothese, daß Metallothioneine hauptsächlich an der Detoxifizierung von Schwermetallen beteiligt sind, favorisiert. Gestützt wird diese Aussage durch Untersuchungen an MT *knock-out* Organismen. Sowohl $\Delta cup1$ als auch *MT-I* und *MT-II* Null Mäuse zeigen ein unverändertes Wachstum und eine störungsfreie Entwicklung unter Normalbedingungen. Nach Kupfer- bzw. Cadmiumzugabe zeigen jedoch beide Mutanten eine erhöhte Sensitivität gegenüber diesen Metallen (Hamer *et al.*, 1985); (Masters *et al.*, 1994). Eine Überexpression des MT geht entsprechend mit einer Toleranzsteigerung einher (Liu *et al.*, 1995). Dennoch scheint die Detoxifizierung von Cadmiumionen in den tierischen Organismen nicht die evolutionäre Funktion der Metallothioneine zu sein (Palmiter, 1998). Das ubiquitäre Vorkommen und die starke Konservierung des Proteins in allen Organismenklassen bei geringen „natürlichen“ Cadmiumkonzentrationen spricht gegen diese These. Erst im letzten Jahrhundert nahm der Anteil des Cadmiums in der Biosphäre, verursacht durch anthropogene Einflüsse, zu. Eine Funktion für Metallothioneine würde demnach erst seit etwa 100 Jahren

bestehen. Dieses ist nach evolutionären Aspekten, so z. B. der Selektion, ausgeschlossen. Vielmehr fanden sich Hinweise, daß MT als Zinkspeicherproteine dienen und somit die Versorgung von Apometallenzymen mit Zink gewährleisten können (Udom & Brady, 1980). Daß Metallothioneine Zink an Apoenzyme mit weitaus geringeren Zinkbindungskonstanten abgeben können, festigt diese Hypothese (Jacob *et al.*, 1998). Allerdings konnte *in vivo* noch nicht nachgewiesen werden, daß MT für die Zinkbereitstellung während der Neusynthese von Metallenzymen essentiell sind. Andererseits existieren in einigen Enzymen, so z. B. in der Carboxypeptidase A, neben katalytischen auch inhibierende Zinkbindungsstellen (Larsen & Auld, 1991). Apothioneine sind in der Lage, durch gezielte Komplexierung dieser Zinkatome, solche Enzyme zu aktivieren (Maret *et al.*, 1999).

Weiterhin wird die Modulierung der Transkription verschiedener Gene als mögliche Funktion der Metallothioneine diskutiert. So wurden die Interaktionen von MT sowohl mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 als auch NF- κ B nachgewiesen (Zeng *et al.*, 1991); (Abdel-Mageed & Agrawal, 1998). Da die Aktivierung von NF- κ B anti-apoptotisch wirkt, scheinen MT auch in den programmierten Zelltod involviert zu sein. Eine verminderte Expression von Metallothioneinen geht mit einem verlangsamten Wachstum und beschleunigtem Zelltod einher (Abdel-Mageed & Agrawal, 1997). Eine Translokation der mit Zink gebundenen Metallothioneine vom Zytosol in den Kern während der frühen S-Phase des Zellzyklus spricht ebenfalls für eine Beteiligung an der Transkription (Tsujikawa *et al.*, 1991).

Auch die Regulation der Atmung scheint eine mögliche Funktion der Metallothioneine darzustellen, da Zink die Inhibierung aller vier Komplexe der Atmungskette bewirken kann (Skulachev *et al.*, 1967). So konnte nach Import von Zn-MT in Mitochondrien tatsächlich eine Verringerung der Atmungsaktivität nachgewiesen werden (Ye *et al.*, 2001).

Auf Grund des hohen Cysteingehaltes könnten Metallothioneine auch als Antioxidanz wirken. Erstaunlicherweise zeigen MT eine 300fach höhere Affinität zu Hydroxylradikalen als Glutathion, das als Hauptantioxidanz innerhalb der Zelle beschrieben wurde (Thornalley & Vasak, 1985).

Ob diese Aspekte wirklich die Funktionen der Metallothioneine darstellen, muß allerdings weiterhin untersucht werden. So gibt es für alle beschriebenen Funktionen von MT keine allgemeingültigen Beweise. Besonders die Existenz verschiedener Isoformen, die entwicklungsabhängige bzw. gewebsspezifische Expression und das universelle Vorkommen sind Indizien für eine weitere Funktion außerhalb der Chelatierung und Detoxifizierung von Schwermetallen. Darüber hinaus könnte die ubiquitäre Verbreitung und die starke Konservierung von Metallothioneinen auch eine ubiquitäre und einheitliche Funktion

vermuten lassen. Der Nachweis für eine solche Funktion in allen MT exprimierenden Organismen konnte ebenfalls nicht erbracht werden.

1.6. Metallochaperone

Schutz vor den toxischen Eigenschaften von Schwermetallen kann durch die in den letzten Kapiteln beschriebenen Chelatoren erreicht werden. Auf der anderen Seite ist es wichtig, essentielle Übergangsmetalle gezielt an Apoenzyme abzugeben, um diese zu aktivieren. Kürzlich wurden Proteine, die am Transport von Kupfer aus dem Zytosol zu bestimmten Kompartimenten und entsprechenden Enzymen beteiligt sind, entdeckt (Pufahl *et al.*, 1997). Diese Kupfertransportproteine wurden als Metallochaperone bezeichnet. Dabei ist ein Chaperon für ein Zielprotein spezifisch. Zu den in *S. cerevisiae* beschriebenen Chaperonen zählt beispielsweise Atx1. Das in die Zelle aufgenommene Kupfer kann durch das zytosolisch vorkommende Atx1 gebunden und an die Cu-ATPase Ccc2 abgegeben werden (Lin *et al.*, 1997). Ccc2 selbst ist als Chaperon beschrieben, das große Ähnlichkeit mit Menkes- und Wilson-ATPasen aufweist. Es ist für den Transport von Kupfer in trans-Golgi Vesikel mit anschließender Rekonstitution des Fet3 Eisentransporters mit Kupfer verantwortlich (Yuan *et al.*, 1995). Eine Deletion des *ATX1* wie auch des *CCC2* resultiert daher im Verlust der Fähigkeit, auf eisendefizientem Medium zu wachsen (Lin *et al.*, 1997). Weitere Stoffwechselwege sind durch diese Mutationen nicht beeinflusst. Wie spezifisch die Chaperone für ein Enzym sind, konnte auch anhand von Lys7 gezeigt werden. Dieses Protein liefert Kupfer zur Aktivierung der Superoxiddismutase (SOD) (Culotta *et al.*, 1997). Ein *LYS7* Deletionsstamm ist wie eine SOD defiziente Mutante durch erhöhte Sensitivität gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies gekennzeichnet, obwohl die Expression der SOD der des Wildtyps entspricht. Eine Überexpression von Atx1 ermöglicht es nicht, diesen Phänotyp zu komplementieren.

Auch die Cytochrom-c Oxidase benötigt Kupfer für ihre Katalyse. Dieses wird mittels Cox17 durch die äußere Membran der Mitochondrien transportiert (Glerum *et al.*, 1996).

In *S. pombe* wurden bisher noch keine genauen Untersuchungen zu Metallochaperonen durchgeführt. Es ist aber sowohl ein Ccc2 als auch ein Cox 17 homologes Protein in der Datenbank annotiert. Über die Existenz von Zn- und Fe-Chaperone gibt es bislang noch keine Informationen (O'Halloran & Culotta, 2000). Jedoch lassen Untersuchungen an *E. coli* und eukaryotischen Zellen, in denen weniger als ein freies Atom bzw. Ion Zink pro Zelle nachgewiesen werden konnte, die Vermutungen über eine Existenz zumindest von Zinkchaperonen zu (Outten & O'Halloran, 2001); (Sensi *et al.*, 1997).

1.7. Kompartimentierung

Neben der zytosolischen Chelatierung der Schwermetalle stellen der Transport, die Verteilung und Speicherung dieser Ionen bzw. Metall-Chelator-Komplexe in Kompartimente ebenfalls wichtige Mechanismen der Detoxifizierung und Homöostase dar. Einige Transporter, die den intrazellulären Metalltransport gewährleisten, gehören zur Familie der CDF (*cation diffusion facilitator*) (Nies & Silver, 1995). In Bakterien und Hefe transportieren sie Zink, Cadmium und Kobalt vom Zytosol in die Kompartimente der Zelle.

Ein Vertreter dieser Klasse ist der Zinktransporter *Zhf* aus *S. pombe* (Clemens *et al.*, 2002). Durch das Inaktivieren des *zhf* Gens wird die Toleranz gegenüber Zink und Kobalt herabgesetzt, während sie für Cadmium und Nickel erhöht wird. *Zhf* wurde in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert. Es wird angenommen, daß *Zhf* Zink ins ER transportiert, um Apo-Zinkenzyme mit diesem Metall zu versorgen. *Zhf* scheint allerdings nicht spezifisch für den Transport von Zinkionen zu sein. Bei Überschuß von Cadmium und Nickel werden wahrscheinlich auch diese Ionen ins ER transportiert. Das ER spielt eine Rolle in der Proteinbiosynthese. Der Transport von Nickel und Cadmium in dieses Kompartiment könnte inhibierend auf diesen Prozeß wirken. Die Toxizität dieser beiden Metalle im ER könnte die der zytosolisch vorliegenden Cd^{2+} und Ni^{2+} möglicherweise noch übertreffen.

Einen der Δzhf Mutante vergleichbaren Phänotyp konnte für die *zrc1 knock-out* Mutante aus *S. cerevisiae* gezeigt werden. Eine Überexpression des ZRC1 Zinktransporters führt zu einer gesteigerten Zinktoleranz (Kamizono *et al.*, 1989). Auf ähnliche Weise wurde COT1 entdeckt. Dieses Protein wurde als Suppressor der Kobalttoxizität beschrieben (Conklin *et al.*, 1992). Aber auch hier konnte eine verstärkte Expression des ZRC1 eine erhöhten Zinktoleranz bewirken (Conklin *et al.*, 1994). Sowohl die Δzrc1 als auch die Δcot1 Mutante weisen eine verstärkte Zinksensitivität auf und bestätigen die Wichtigkeit dieser Proteine für die Kompartimentierung. Die Lokalisierung der beiden Proteine im Tonoplasten läßt auf einen Transport von Zink in die Vakuole schließen (Li & Kaplan, 1998).

Ein weiterer CDF ist der in der Kernhülle lokalisierte MSC2. Es wird postuliert, daß dieser Transporter Zink in den Intermembranraum des Zellkerns transportiert (Li & Kaplan, 2001). Neben CDF können aber auch ABC-Transporter an der Kompartimentierung beteiligt sein. Ihre Funktion innerhalb der Schwermetalltoleranz wurde besonders am Beispiel des Hmt1 Transporters aus *S. pombe* gezeigt. In der Spaltheife sind zwei Cadmium-Phytochelatin-Komplexe bekannt. Der LMW-Komplex (*low molecular weight*), der im Zytosol nachgewiesen wurde und der HMW-Komplex (*high molecular weight*) (Murasugi *et al.*, 1983). Letzterer hat zusätzliches Sulfid und Cadmium in den Komplex eingelagert und ist in

der Vakuole lokalisiert. In der *hmt1 knock-out* Mutante konnte der HMW-Komplex nicht mehr nachgewiesen werden (Ortiz *et al.*, 1992). Diese Mutante ist extrem cadmiumsensitiv, zeigt aber Wildtyp-Phytochelatingehalte. Nähere Untersuchungen ergaben, daß Hmt1 ein in der Vakuolenmembran lokalisierter ABC-Transporter ist, der den Transport von Cd-PC-Komplexen als auch Apo-Phytochelatinen ermöglicht (Ortiz *et al.*, 1995).

Wie wichtig der Transport und die Speicherung von Cadmium in die Vakuole ist, konnte auch durch den ABC-Transporter YCF1 aus *S. cerevisiae* gezeigt werden. Dieser vermittelt den Transport von Cd-Bisglutathionat in die Vakuole (Li *et al.*, 1997).

Auch Kupfer existiert nicht als freies Ion in einer Hefezelle (Rae *et al.*, 1999). Sofort nach dem Transport in die Zelle wird es an Chelatoren oder Chaperone gebunden. Diese gewährleisten die Translokation in die verschiedenen Zellkompartimente (siehe 1.6). Allerdings gilt die Vakuole auch im Falle des Kupfers als wichtiger Speicherort. Die Mutation einer vakuolären H⁺-ATPase zeigte verstärkte Sensitivität sowohl gegenüber Kupfer als auch gegenüber Zink, Mangan und Kalzium (Eide *et al.*, 1993).

Die Vakuole stellt aber keinen endgültigen Speicherort für Übergangsmetalle dar. Unter Mangelbedingungen wird die Expression von Metalltransportern verstärkt, die Metallionen aus der Vakuole heraustransportieren. In *S. pombe* ist Ctr6 für die Mobilisierung von Kupfer beschrieben (Bellemare *et al.*, 2002). Ztr3 ermöglicht den Transport von Zink aus der Vakuole unter zinklimitierten Bedingungen in *S. cerevisiae* (MacDiarmid *et al.*, 2000).

1.8. Zielstellung der Arbeit

Alle Organismen stehen vor dem Problem, daß es zu schnellen und großen Veränderungen ihres umgebenden Milieus kommen kann. Diese dürfen aber keinen Einfluß auf die intrazelluläre Zusammensetzung der Elemente haben. Eine regulierte Aufnahme, eine Chelatierung innerhalb der Zelle, die Kompartimentierung in Organellen wie auch die Biotransformation und die Zellreparatur werden als Mechanismen der Schwermetalltoleranz und -homöostase gewertet. In manchen Organismen, so z. B. den Prokaryoten, konnte ein zusätzlicher Metallefflux aus der Zelle heraus nachgewiesen werden (Nies & Silver, 1995).

Wichtige Chelatoren von Schwermetallen sind die Phytochelatine. Sie wurden in der Spaltheefe *S. pombe* und in Pflanzen erstmals entdeckt und charakterisiert (Murasugi *et al.*, 1981); (Grill *et al.*, 1985). Für diese durch die Phytochelatinsynthese synthetisierten Peptide konnte eine Entgiftung von Schwermetallen, besonders des Cadmiums, gezeigt werden. Neben der Bindung von Cadmium wurden PC auch mit Kupfer und Arsen assoziiert nachgewiesen (Maitani *et al.*, 1996); (Schmöger *et al.*, 2000). Von der Entgiftungsfunktion

nicht völlig zu trennen, ist die Beteiligung an der Homöostase von essentiellen Schwermetallen. Phytochelatine werden auch als zelluläre Zwischenspeicher für Metallionen gebildet. Enzyme, die Metalle als Ko-Faktoren benötigen, können beispielsweise durch Cu-PC-Komplexe aktiviert werden (Thumann *et al.*, 1991).

Da Phytochelatine bis vor kurzem nur in Pflanzen und Hefen nachgewiesen werden konnten, wurden Metallothioneine als das in tierischen Organismen vorkommende Analoge betrachtet. Mittlerweile sind MT sowohl in Pflanzen als auch Phytochelatinsynthesen in Tieren detektiert worden (Rauser, 1999); (Clemens *et al.*, 2001); (Cobbett & Goldsbrough, 2002).

Das gemeinsame Vorkommen wirft allerdings Fragen über die Funktion zweier potentieller Chelatoren innerhalb eines Organismus' auf. Das Metallothionein wurden ähnlich wie die Phytochelatine als cadmiumbindendes Protein entdeckt, das stark in die Detoxifizierung von Metallen involviert ist (Margoshes & Vallee, 1957). Es gibt auch hier Hinweise auf eine Beteiligung der MT an Prozessen der Metallhomöostase, wie z. B. die Aufrechterhaltung intrazellulärer Metallkonzentrationen unter Mangelbedingungen (Suhy *et al.*, 1999); (Suzuki *et al.*, 2002). Trotzdem scheint es unwahrscheinlich, daß zwei peptidische Chelatoren mit den gleichen Fähigkeit zur Metallbindung und Detoxifizierung parallel in einem Organismus exprimiert vorliegen und die gleiche Funktion haben. Für die Hefe *C. glabrata* konnte das Vorkommen von MT und PC gezeigt werden (Mehra *et al.*, 1988). Dabei wurde Kupfer durch die Metallothioneine und Cadmium durch Phytochelatine komplexiert. Beide Mechanismen sind voneinander separiert. Selbst bei einer Inaktivierung des Metallothioneins in *C. glabrata* können Kupferionen nicht durch PC gebunden und detoxifiziert werden (Mehra *et al.*, 1992). Auch in der phytochelatin-bildenden Spaltheife *S. pombe* ist ein Metallothionein in der Gendatenbank annotiert. Dieses MT wurde später von einer anderen Arbeitsgruppe als Zym1 (*zinc yeast metallothionein*) bezeichnet (Borrelly *et al.*, 2002). Die Spaltheife ist ein gut charakterisierter und leicht zu handhabender Modellorganismus. Seit 2002 ist die komplette Genomsequenz bekannt (Wood *et al.*, 2002). Darüber hinaus sind viele weitere nützliche Informationen über *S. pombe* zugänglich (Wood & Bähler, 2002). Ein wichtiger Aspekt, der *S. pombe* zu einem Modellorganismus macht, ist, daß etwa 90 % der Gene keine zweite Kopie oder ein homologes Gen besitzen (Wood *et al.*, 2002). Die Generierung von *knock-out* Mutanten ist daher relativ einfach durchzuführen. Des weiteren lassen sich viele der für *S. cerevisiae* entwickelten Techniken einfach auf *S. pombe* übertragen. Obwohl beide Hefen zu den Ascomyceten gehören, sind sie doch nur wenig miteinander verwandt. Dieses zeigt sich z. B. in der Schwermetalldetoxifizierung. Während *S. cerevisiae* auf einen Überschuß an Metallionen mit der Expression des Metallothioneins Cup1 antwortet, synthetisiert *S. pombe*

Phytochelatine. Letztere reagiert in der Schwermetallantwort eher wie eine Pflanze. Allerdings konnte gezeigt werden, daß *S. pombe* näher mit tierischen Organismen verwandt ist, als *S. cerevisiae* (Moreno *et al.*, 1991). Sollte daher auch das Metallothionein in die Schwermetalldetoxifizierung involviert sein? Diese Frage scheint berechtigt, wenn man den Phänotyp des PCS *knock-out* Stamm $\Delta SpPCS$ betrachtet. Diese Mutante ist nicht mehr in der Lage, Phytochelatine zu synthetisieren und ist durch einen stark cadmiumsensitiven Phänotyp charakterisiert. Wegen der drastisch erhöhten Cadmiumsensitivität stellt sich nun die Frage, ob Zym1 an der Schwermetalldetoxifizierung generell beteiligt ist. Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die von Yu und Ko-Autoren vorgenommenen Untersuchungen (Yu *et al.*, 1994). Hier wurde das Cup1 in den PC-bildenden Hefen *S. pombe* und *C. glabrata* konstitutiv exprimiert, was mit einem Verlust der Akkumulation von Metall-PC-Komplexen einherging. Das MT scheint demnach das größere Potential für die Metalldetoxifizierung in PC-synthetisierenden Organismen zu besitzen. Dieses sollte auch in *S. pombe* untersucht werden.

Auf Grund der bekannten Sequenz des MT-Gens konnten *zym1 knock-out* Stämme generiert werden. Diese sollten hinsichtlich ihrer Toleranz gegenüber verschiedenen Schwermetallen untersucht werden. Neben diesen Untersuchungen sollte das Zusammenspiel von PC und MT, so z. B. in Hinblick auf Metallspezifität und der PC-Syntheserate in den $\Delta zym1$ Mutanten analysiert werden. Außerdem sollten komplexe Charakterisierungen, wie Metallaufnahme, Ionenverteilung durchgeführt werden.

Zym1 besitzt wie das kupferbindende Cup1 eine ungewöhnliche Vielzahl von Glutamat- bzw. Glutaminmolekülen sowie ein Histidin (siehe Abb. 1.5-1). Trotz der ähnlichen Primärsequenz wurde das MT aus *S. pombe* als zinkbindendes MT charakterisiert (Borrelly *et al.*, 2002). Da eine Zinkbindung für Hefe-MT bisher noch nicht beschrieben wurde, sollten weiterführende Untersuchungen zur Metallbindung vorgenommen werden, die Rückschlüsse auf die Funktion zulassen könnten. Letztendlich wurden globale Untersuchungen durch Arraytechnik und 2D-Gelanalyse vorgenommen, um die Funktion des Zym1 weiter konkretisieren zu können.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Enzyme

Alle nicht in Tabelle 2.1-1 vermerkten Feinchemikalien wurden von **Merck**, Darmstadt, **Roth**, Karlsruhe oder **Sigma-Aldrich**, Steinheim bezogen und haben analytischen Grad.

Tabelle 2.1-1 Verwendete Materialien

Amersham Pharmacia Biotech , Upsalla, Schweden	Acrylamid, Bisacrylamid
BAbCO , Richmond, USA	Monoklonaler Antikörper HA.11
BIO 101, Inc. , Carlsbad, USA	YNB, Drop-out Supplement Mix
Cambrex Bio Science , Rockland, USA	SeaKem [®] LE Agarose
DIFCO , Detroit, USA	Agar, Bacto-Pepton, Bacto-Trypton, Yeast Extract
Fluka , Buchs, Schweiz	Adenin, Aminosäuren, Uracil,
J. T. Baker , Phillipsburg, USA	Acetonitril, Trifluoressigsäure
Genomic Solutions , Ann Arbor, USA	Duracryl
MBI Fermentas , Vilnius, Litauen	dNTP, Restriktionsendonucleasen, Alkalische Phosphatase (CIP),
Merck , Darmstadt	Salpetersäure (Suprapur)
Molecular Probes , Berlin	Monobrombiman
Promega , Madison, USA	Anti Mouse IgG, T4-DNA-Ligase, <i>Pfu</i> - und <i>Taq</i> -DNA-Polymerase,
Roth , Karlsruhe	Aqua-Roti-Phenol, Roti-Phenol/C/I
Sigma-ARK , Darmstadt	Oligonukleotidprimer

2.2. Organismen und Plasmide

Tabelle 2.2-1 Verwendete Hefe- u. Bakterienstämme

Stamm	Charakteristika	Referenz/Herkunft
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		
FY261	h^+ <i>ade6-M216 leu1-32</i> <i>ura4-Δ18 can 1-1</i>	Susan Forsburg, Salk Institute, La Jolla, USA
Sp254	h^- <i>ade6-M210 leu1-32</i> <i>ura4-Δ18 can 1-1 URA4</i>	(Clemens <i>et al.</i> , 1999)
ΔSpPCS	h^- <i>ade6-M210 leu1-32</i> <i>ura4-Δ18 can 1-1</i> ΔSpPCS:: <i>URA4</i>	(Clemens <i>et al.</i> , 1999)
Sp254 Δ <i>zym1</i>	h^- <i>ade6-M210 leu1-32</i> <i>ura4-Δ18 can 1-1 URA4</i> Δ <i>zym1</i> :: <i>LEU2</i>	
FY261 Δ <i>zym1</i>	h^+ <i>ade6-M216 leu1-32</i> <i>ura4-Δ18 can 1-1</i> Δ <i>zym1</i> :: <i>LEU2</i>	
Δ <i>zhf</i>	h^+ <i>ade6-M216 leu1-32</i> <i>ura4-Δ18 can 1-1</i> Δ <i>zhf</i> :: <i>URA4</i>	(Clemens <i>et al.</i> , 2002)
ΔSpPCS Δ <i>zym1</i>	h^- <i>ade6-M210 leu1-32</i> <i>ura4-Δ18 can 1-1</i> ΔSpPCS:: <i>URA4</i> Δ <i>zym1</i> :: <i>LEU2</i>	
Δ <i>zhf</i> Δ <i>zym1</i>	h^+ <i>ade6-M216 leu1-32</i> <i>ura4-Δ18 can 1-1</i> Δ <i>zhf</i> :: <i>URA4</i> Δ <i>zym1</i> :: <i>LEU2</i>	

Saccharomyces cerevisiae

DTY3 *MATa trp1-1 leu2-3 leu2-112* (Hamer, 1986)

gal1 ura3-50 His- cup1s (single copy)

DTY4 *MATa trp1-1 leu2-3 leu2-112* (Hamer, 1986)

His- Δcup1::URA3+

Escherischia coli

DH5α *supE44 lacZΔM15 hsdR17* (Hanahan, 1983)

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1

Tabelle 2.2-2 Verwendete Plasmide

Plasmid	Charakteristika	Referenz/Herkunft
pGEM-T	pUC- Derivat T7 und SP6 RNA Polymerase Promotor, <i>lacZ</i> , Amp ^r	Promega, Madison, USA
pSLF172	pUC119-Derivat, nmt Promotor, Amp ^r , <i>URA4</i> , C-term. triple HA-Tag	Susan Forsburg, Salk Institute, La Jolla, USA
pX132	TPI Promotor, C-term. triple HA-Tag TRP, Amp ^r	

2.3. Nährmedien

<u>Luria-Bertani (LB)-Medium</u>	5 g/l Hefeextrakt
	10 g/l Bacto-Trypton
	10 g/l NaCl
	(15 g/l Agar)

LB-Medium dient zur Kultivierung von *E. coli*-Stämmen. Dem autoklavierten Medium wurde nach Abkühlung auf 55 °C Ampicillin (50 µg/ml) zugegeben.

<u>Edinburgh's Minimal Medium (EMM)</u>	3 g/l Kaliumhydrogenphthalat 2,2 g/l Na ₂ HPO ₄ 5 g/l NH ₄ Cl 20 g/l Glukose 20 ml/l aus 50 x Salzlösung 1 ml/l aus 1000 x Vitaminlösung 100 µl/l aus 10000 x Mineralienlösung 250 mg/l Adenin und entsprechende Aminosäuren (Uracil und/oder Leucin) (20 g/l Agar)
50 x Stock Salzlösung:	52,5 g/l MgCl ₂ 0,735 g/l CaCl ₂ 50 g/l KCl 2 g/l Na ₂ SO ₄
Vitamine aus 1000 x Stock	1 g/l Pantothensäure 10 g/ Nicotinsäure 10 g/l Inositol 10 mg/l Biotin
10000 x Stock Mineralienlösung:	5 g/l Borsäure 4 g/l MnSO ₄ 4 g/l ZnSO ₄ 2 g/l FeCl ₂ 0,4g/l Molybdänsäure 1 g/l KI 0,4 g/l CuSO ₄ 10 g/l Citrat

S. pombe wurde im Minimalmedium EMM (Mitchinson, 1970) modifiziert nach (Nurse, 1975) kultiviert und aufbewahrt.

Für die Untersuchungen der Kupferdefizienz wurde eine Mineralienlösung ohne CuSO₄ verwendet.

<u>Yeast Extract (YE5S)</u>	5 g/l Hefeextrakt 30 g/l Glukose je 100 mg/l Adenin, Uracil, Leucin, Histidin und Lysin (20 g/l Agar)
<u>Yeast Nitrogen Base (YNB)</u>	1,7 g/l YNB ohne Aminosäuren und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 g/l Glukose 0,8 g/l Drop-out Supplement Mix je 20 mg/l Leucin, Histidin, Tryptophan und Uracil (20 g Agar)

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. Standardmethoden

Kompetente *DH5 α* -Zellen, Plasmid-Miniprep (Boiling Prep), Restriktionsspaltungen, Agarosegelelektrophorese, Dephosphorylierung des Vektors mit Alkalischer Phosphatase, Ligation und Transformation von *DH5 α* wurden nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt.

Spin-Miniprep, Plasmid-Midiprep und Elution von PCR-Produkten aus Agarosegelen erfolgten durch QIAGEN-Kits gemäß der Hersteller-Protokolle.

2.4.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde für die Amplifizierung des MT Gens aus *S. pombe* sowohl für die Herstellung der HA-getaggten Konstrukte für *S. pombe* als auch der Konstrukte für die Komplementierung des $\Delta cup1$ in *S. cerevisiae* verwendet. In beiden Fällen wurde mit *Pfu*-Polymerase gearbeitet. Die Reaktionsansätze und der –verlauf erfolgte wie in Standardprotokollen beschrieben. Als *Annealing* Temperatur wurde in beiden Fällen 53 °C gewählt.

Die Amplifizierung von *zym1* und seinen 5' und 3' untranslatierten Bereichen für die *one step gene disruption* (2.4.3) erfolgte ebenfalls über PCR. Hierbei wurde mit *Taq*-Polymerase und einer *Annealing* Temperatur von 53 °C gearbeitet.

Tabelle 2.4-1 Verwendete Oligonukleotide^{*)}

Primer	Oligonukleotidsequenz
SpMT-HA5'	CGC <u>GCT CGA GAT</u> GGA ACA CAC TAC CCA AT
SpMT-HA3b'	CGC <u>GGC GGC CGC</u> CCT TCG AAG CAC ATT TGC A
SpMTcod5'	CGC <u>GGA ATT CAT</u> GGA ACA CAC TAC CCA ATG
SpMTcod3'	CGC <u>GGA ATT</u> CCT TCG AAG CAC ATT TGC AAG
SpMT5b'	CAG TTG GAA GGC ATA GCT AGT C
SpMT3b'	GAA GAT GAT GCC CTT ACT CTA CG

^{*)} Alle Oligonukleotide sind in 5' nach 3' Orientierung dargestellt. Die unterstrichenen Sequenzbereiche markieren die eingefügten Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen.

Sämtliche Gene des Macroarrays (2.4.12) wurden mittels PCR unter Verwendung von *Taq*-Polymerase amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang I aufgelistet.

2.4.3. Transformation von *S. pombe*

Diese Methode wurde nach dem Protokoll von Bähler durchgeführt (Bähler *et al.*, 1998). 20 ml Hefekultur wurden im EMM-Medium unter Schütteln bei 30 °C (Unitron, Infors Schüttler) bis zu einer OD₆₀₀ = 0,2 – 0,5 wachsen gelassen. Eine optische Dichte von 0,5 entspricht hierbei einer Zellzahl von 1·10⁷ Zellen/ml. Die Zellen wurden bei 1500 x g für 5 min zentrifugiert (Eppendorffzentrifuge 5403), mit 20 ml sterilem Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert und in ein 2 ml-Eppendorffgefäß überführt. Nach einminütiger Zentrifugation (Eppendorffzentrifuge 5415C) bei 1000 x g wurde das Pellet in LiAc/TE (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 100 mM LiAc, 1 mM EDTA) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen auf eine Zelldichte von 1·10⁹ Zellen/ml mit LiAc/TE eingestellt. Zu den 100 µl-Aliquots wurden je 5 µg Plasmid- bzw. linearisierte DNA und ssDNA pipettiert. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde 260 µl PEG (40 % (w/v) PEG 4000 in LiAc/TE) dazugegeben. Nachdem der Transformationsansatz eine Stunde bei 30 °C inkubiert wurde, erfolgte die Zugabe von 43 µl DMSO mit anschließendem Hitzeschock für 5 min bei 42 °C. Die Zellen wurden danach 1 min bei 1000 x g zentrifugiert (Eppendorffzentrifuge 5415C) und vorsichtig in 500 µl sterilem Wasser resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 100 µl sterilem Wasser aufgenommen und auf entsprechende Medien ausplattiert.

2.4.4. Transformation von *S. cerevisiae*

Kulturen des *S. cerevisiae* Wildtyps bzw. *Acup1 knock-out* Stammes wurden in YPD bzw. YNB-ura unter Schütteln bei 30 °C (Unitron, Infors Schüttler) bis zu einer OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6

wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 1500 x g für 5 min (Eppendorffzentrifuge 5403) pelletiert. Das Pellet wurde in 20 ml Lösung A (10 mM BICINE, pH 8,3, 1 M Sorbitol, 3 % (v/v) Ethylenglykol) gewaschen und erneut zentrifugiert. Nachdem das Pellet in 2 ml Lösung A resuspendiert wurde, wurde diese Suspension in 200 µl-Aliquots mindestens für 30 min bei -70 °C inkubiert.

1 – 2 µg Plasmid-DNA und 20 µg ssDNA wurden zu den gefrorenen kompetenten Hefezellen gegeben und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Lösung B (200 mM BICINE, pH 8,3, 40 % (v/v) PEG 1000) vorsichtig in die Suspension pipettiert und eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation (Eppendorffzentrifuge 5415C) bei 1000 x g wurde das Pellet zweimal mit Lösung C (10 mM BICINE, pH 8,3, 150 mM NaCl) gewaschen und auf entsprechendem Medium ausplattiert.

2.4.5. Isolierung genomischer DNA aus *S. pombe*

Dieses Protokoll wurde modifiziert nach Hoffmann und Winston (Hoffman & Winston, 1987). Eine 20 ml-Kultur wurde über Nacht bis in die späte logarithmische Phase wachsen gelassen (Unitron, Infors Schüttler) und bei 1500 x g für 5 min zentrifugiert (Eppendorffzentrifuge 5403). Das Pellet wurde in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert und in ein 2 ml-Eppendorffgefäß überführt. Nach einer einminütigen Zentrifugation (Eppendorffzentrifuge 5415C) bei 1000 x g wurde das Pellet in 300 µl Prep-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 2 % (v/v) TritonX-100, 1 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA) resuspendiert. Zur Suspension wurden 0,3 g Glasbeats (425 – 600 µm, säurebehandelt, Sigma-Aldrich, Steinheim) und 300 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben und für 3 – 4 min auf dem Vortexer gemischt. Anschließend wurden 200 µl TE (10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) dazupipettiert. Nach kurzem Mischen erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation (Eppendorffzentrifuge 5403) bei 10000 x g. Die aquatische Phase wurde in ein sauberes Eppendorffgefäß überführt und mit 1 ml 96 % (v/v) Ethanol gemischt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 400 µl TE und 3 µl RNaseA (10 mg/ml) aufgenommen und 5 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 10 µl 4 M Ammoniumacetat und 1 ml 96 % (v/v) Ethanol dazugegeben, invertiert und 2 min bei 10000 x g zentrifugiert (Eppendorffzentrifuge 5403). Der Überstand wurde daraufhin quantitativ abgenommen. Das Pellet wurde getrocknet und anschließend in 50 – 100 µl sterilem Wasser aufgenommen. Die Konzentration wurde über die Absorption bei 260 nm bestimmt. Hierbei entsprach eine OD₂₆₀ von eins einer Konzentration von 45 µg/µl.

2.4.6. Generierung von *knock-out* Mutanten in *S. pombe*

Die *knock-out* Mutanten in *S. pombe* wurden durch *one step gene disruption* generiert. Hierfür wurde das Zielgen mittels PCR von genomischer DNA amplifiziert und in den Vektor pGEM-T kloniert. Das geklonte DNA-Fragment wurde innerhalb der kodierenden Sequenz des Gens mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und der Selektionsmarker (*LEU2*) inseriert.

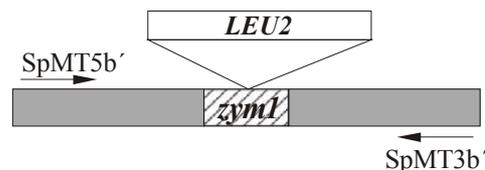


Abb. 2.4-1 Skizze des *zym1* knock-out Konstruktes: Die Oligonukleotide SpMT5b' und 3b' wurden für die Amplifikation des *zym1* und dessen 5' und 3' untranslatierten Bereiche verwendet. In die kodierende Sequenz des *zym1* wurde der Selektionsmarker *LEU2* inseriert.

Das so erzeugte *knock-out* DNA-Fragment wurde aus dem Vektor pGEM-T mit geeigneten Restriktionsendonukleasen herausgeschnitten. Die linearisierte DNA wurde, wie unter 2.4.3 beschrieben, in die verschiedenen *S. pombe* Stämme transformiert. Die *knock-out* Mutanten wurden auf Leucinprototrophie selektiert.

Durch Southern-Blotanalyse (siehe 2.4.7) wurden die *knock-out* Mutanten identifiziert.

2.4.7. Southern-Blot

10 µg genomische DNA (siehe 2.4.5) wurden mit geeigneten Restriktionsendonukleasen über Nacht verdaut und anschließend auf einem 0,8 %igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Danach wurde das Gel kurz in destilliertem Wasser gewaschen, um dann für 30 min in 0,25 M HCl inkubiert zu werden. Nachdem es erneut in destilliertem Wasser gespült wurde, erfolgten zwei zwanzigminütige Inkubationen in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH). Anschließend wurde das Gel solange in Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl, pH 7,0) gewaschen bis der pH-Wert der Lösung unter 9 pH-Einheiten lag. Das Blotting des Gels auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Biosciences, Freiburg) erfolgte über Nacht mit 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0). Nach dem Backen der Membran für zwei Stunden bei 80 °C erfolgte die Prähybridisierung bei 65 °C für mindestens zwei Stunden oder über Nacht mit Churchpuffer (0,5 M NaH₂PO₄, pH 7,2, 1 % (w/v) BSA, 1 mM EDTA, 7 % (w/v) SDS).

Die Sonde wurde mittels PCR (2.4.2) amplifiziert und über einen Gelextraktionskit (QIAGEN) gereinigt. Circa 50 ng Sonde wurden für die Hybridisierung eingesetzt. Die

radioaktive Markierung der Sonde erfolgte mittels Megaprime DNA Labelling System (Amersham Biosciences, Freiburg) nach dem Herstellerprotokoll, wobei mit 50 μCi $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (ICN, Eschwege) gearbeitet wurde. Die nicht eingebauten Nukleotide wurden unter Verwendung von ProbeQuantTM G-50 Micro Columns (Amersham Biosciences, Freiburg) entfernt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C in Churchpuffer. Am nächsten Morgen wurde die Membran mit Waschlösung (0,2 x SSC/ 0,1 % (w/v) SDS) jeweils 15 min bei 65 °C gewaschen und die Radioaktivität gemessen. Anschließend wurde die Membran für mindestens einen Tag auf einen Phosphorscreen (Amersham Bioscience, Freiburg) gelegt. Die Entwicklung erfolgte mit dem Phosphorimager (StormTM, Amersham Biosciences, Freiburg).

2.4.8. Isolierung von RNA

Dieses Protokoll wurde verändert nach (Borrelly *et al.*, 2002).

20 ml-Kulturen wurden bis zu einer optischen Dichte OD_{600} von 0,6 wachsen gelassen (Unitron, Infors Schüttler). Anschließend erfolgte die Zugabe der verschiedenen Metallionen bzw. anderer Stressoren. Die Kulturen wurden für weitere zwei Stunden bei 30 °C wachsen gelassen. Danach wurde die Kultur bei 1500 x g für 5 min zentrifugiert (Eppendorffzentrifuge 5403). Das Pellet wurde mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen und in 2 ml-Eppendorffgefäße überführt. Nach einer Zentrifugation bei 1000 x g für 1 min wurden die Zellen in 200 μl RNA-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 50 mM EDTA, 0,25 % (w/v) SDS) resuspendiert. Dazu wurden anschließend 200 μl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und 0,3 g Glasbeats (425 – 600 μm , säurebehandelt, Sigma-Aldrich, Steinheim) gegeben. Die Zellen wurden auf einem Vortexer durch dreimaliges kräftiges Schütteln für eine Minute und zwischenzeitlicher Inkubation auf Eis aufgeschlossen. Weitere 500 μl RNA-Puffer wurden zum Zellysat gegeben, das nach kurzer Behandlung auf dem Vortexer für 5 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert wurde (Eppendorffzentrifuge 5403). Die wäßrige Phase wurde anschließend in ein neues 2 ml-Eppendorffgefäß überführt und mit gleichem Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) erneut extrahiert. Die RNA wurde durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M NaAc, pH 5,2 und 0,6 Vol. Isopropanol präzipitiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das RNA Pellet mit 500 μl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in 50 – 100 μl sterilem Wasser resuspendiert. Die Konzentration wurde über die Absorption bei 260 nm bestimmt. Hierbei entsprach eine OD_{260} von eins einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

2.4.9. Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Für die RT-PCR wurde die gemäß Kapitel 2.4.8 isolierte RNA auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt. Je 20 µl-RT-PCR-Ansatz wurden 3 µl RNA eingesetzt. Die Synthese des Erst- und Zweitstranges erfolgte durch den RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) nach Herstellerangabe.

Für die anschließende PCR wurde 1 µl cDNA eingesetzt. Der Reaktionsverlauf erfolgte wie in Standardprotokollen beschrieben. Als *Annealing* Temperatur wurde für alle Oligonukleotidpaare 53 °C gewählt. Es wurden jeweils 30 Zyklen durchlaufen, da hier noch keine Sättigung der PCR-Produkte eingetreten war. Die für die PCR verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.4-2 aufgelistet.

Tabelle 2.4-2 Verwendete Oligonukleotide^{*)}

Primer	Oligonukleotidsequenz 5'	Oligonukleotidsequenz 3'
SpActin	GTA TGT GCA AAG CCG GTT	GAG TCA TCT TCT CAC GGT
Spscd	GCA GCG GGC AAA TAT CAT	GCA CGT TTC CAA TCC TCT
cuf1	TAT GCT GGC AGA TGG	TTG GAA TCA TG TCG
zfzym	GCT CTA GAT TCT TCG	TTG GAA TCA TGG TCG
ZRT1/2	ACA GTC ATA GTC ACG	TCG GTC TAT CGA ACC
ZRT3	CTT CTC CAG TTT TCC	CAA GAC GTA AAC TGC
ZRC-RT	GCA GTA TTG AAC AAG ATG CAC	CTT ATC ATC AGG AAG TGT AAC
nic1	CCT GTT GGA ATG TGC	TGC TAG AAC AAA GGC
HCaP	GAT TGC AAT GCT TGC	TTG GTC TAT CGA ACC
pgak2	CGT AAA CGA TGC ACC	ACT GAC TCT ACT CCG
cdc23	CCA AGG ATA CTT TGC	GAG CAT GGG ATT ACC

^{*)} Alle Oligonukleotide sind in 5' nach 3' Orientierung dargestellt.

2.4.10. RNA-Extraktion für Microarrays

Jeweils 400 ml-Kulturen des Wildtyps und des Metallothionein *knock-out* Stammes wurden sowohl in EMM- als auch YE-Medium bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,6 wachsen gelassen (Unitron, Infors Schüttler). Die Zellen wurden bei 1500 x g für 5 min zentrifugiert (Eppendorffzentrifuge 5403). Das Pellet wurde mit 20 ml sterilem Wasser gewaschen. Nachdem die Zellen in 4 ml TES (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA, 0,5 % (w/v) SDS, 0,1 % (v/v) DEPC) resuspendiert wurden, wurden 4 ml saures Phenol, pH 4,5 – 5 zugegeben. Nach kurzem Mischen auf dem Vortexer erfolgte eine einstündige Inkubation bei 65 °C, wobei die Proben aller 10 min erneut gemischt wurden. Die Proben wurden anschließend 5 min auf Eis inkubiert und bei 1500 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert (Eppendorffzentrifuge 5403, Rotor 16 F6 –38). Die obere wäßrige Phase wurde in ein sauberes Zentrifugenröhrchen transferiert und 4 ml Chloroform zugegeben. Es wurde erneut

zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde mit 350 µl 3 M NaAc, pH 5,2 und 4 ml eiskaltem 96 % (v/v) Ethanol gemischt. Zum Fällen der RNA wurde das Gemisch über Nacht bei -70 °C inkubiert. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei 1500 x g wurde das Pellet mit 1,5 ml eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Anschließend wurde es in 500 µl DEPC-Wasser gelöst und die Konzentration der RNA, wie in 2.4.8 beschrieben, bestimmt und ihre Reinheit durch Agarosegelelektrophorese abgeschätzt.

Alle weiteren Schritte wurden durch Eurogentec (Seraing, Belgien) durchgeführt.

2.4.11. Northern-Blot

Für die Northern-Blotanalyse wurden 10 µg Gesamt-RNA (siehe 2.4.8) in RNA-Probenpuffer (5 µl N,N-Dimethylformamid, 2 µl 37 % (v/v) Formaldehyd, 1 µl 10 x MEN, (200 mM MOPS, pH 7,0, 50 mM NaAc, 10 mM EDTA) und 0,5 µl Ethidiumbromid) für 5 min bei 65 °C denaturiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden die Proben auf ein 2 %iges (w/v) RNA-Agarosegel (10 ml 10 x MEN und 16 ml 37 % (v/v) Formaldehyd pro 100 ml Endvolumen) aufgetragen. Nach der Auftrennung der RNA im elektrischen Feld wurde das Gel zweimal 20 min in sterilem Wasser und einmal 20 min in 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0) gewaschen. Der anschließende Transfer auf die Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Biosciences, Freiburg) und alle weiteren Schritte wurden analog zu Kapitel 2.4.7 durchgeführt. Es wurden 20 ng einer $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (ICN, Eschwege) radioaktiv markierten Sonde für die Northern-Blot Hybridisierung eingesetzt.

Die Membran konnte mit Striplösung (40 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 % (w/v) SDS, 0,1 x SSC) gestrippt und für weitere Sonden wiederverwendet werden.

2.4.12. Macroarray

Die DNA-Fragmente für den Macroarray wurden mittels PCR (2.4.2) unter Verwendung genespezifischer Oligonukleotide (siehe Anhang I) amplifiziert und in den Vektor pGEM-T kloniert. Die DNA-Sequenzen wurden durch Sequenzierung bestätigt. Die Genfragmente wurden darauf mit vektorspezifischen Oligonukleotide (siehe Anhang I) amplifiziert, über eine Multiscreen₉₆-PCR Filter Platte (Millipore, Eschborn) nach Herstellerangaben gereinigt und in 50 µl Tridest eluiert. Die Konzentration der einzelnen Fragmente wurde durch Beladung auf ein 1 %iges (w/v) Agarosegel abgeschätzt. Es wurden Konzentrationen von circa 100 ng/µl ermittelt. Das Aufbringen der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran

(Biodyne B, Pall, England) erfolgte durch einen Mikro GridII – DNA-Spotter (BioRobotics, GeneScan, Freiburg). Die durchschnittliche Größe eines Punktes betrug 400 μm .

Nach dem Spotten wurde die Nylonmembran je zweimal für 5 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), Neutralisierungslösung (1 M Tris/HCl, pH 7,5, 1,5 M NaCl) und einmal in 2 x SSC gewaschen. Anschließend wurden die Membranen getrocknet und die DNA-Fragmente durch UV-Licht (StratalinkerTM 1800, Stratagene, Heidelberg) auf dem Filter fixiert.

Für die Sonde wurden 10 μg Gesamt-RNA (2.4.8) mit RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) nach Herstellerangabe in cDNA umgeschrieben. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mittels ProbeQuantTM G-50 Micro Columns (Amersham Bioscience, Freiburg) entfernt. Die radioaktive Markierung erfolgte wie unter 2.4.7 beschrieben mit 50 μCi $\alpha^{33}\text{P}$ -dATP (ICN, Eschwege). Prähybridisierung und Hybridisierung wurden ebenfalls gemäß Kapitel 2.4.7 durchgeführt. Nach der Hybridisierung wurde der Filter zweimal für 15 min mit 2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS bei 65 °C gewaschen und analog zu 2.4.7 entwickelt.

2.5. Proteinchemische Methoden

2.5.1. Zellaufschluß und Membranpräparation

Die Hefekultur wurde durch Zentrifugation 1500 x g für 5 min (Eppendorffzentrifuge 5403) in 50 ml-Falcon-Röhrchen sedimentiert und mit 20 ml sterilem Wasser gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das gefrorene Pellet wurde aus dem Falcon-Röhrchen entfernt und mit Quarzsand und einem geringen Volumen eisgekühltem Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,8, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) gemörsert. Der Überstand wurde darauf in Eppendorffgefäße gegeben und bei 10000 x g und 4 °C für 15 min (Eppendorffzentrifuge 5403) zentrifugiert. Der klare Überstand (Rohextrakt) wurde bei 4 °C und 100000 x g (Beckman TL-100 Ultrazentrifuge, TL-100.3-Rotor) zentrifugiert, um die zytosolischen Proteine von der mikrosomalen Fraktion zu trennen. Das Membranpellet wurde in 50 μl Aufschlußpuffer resuspendiert.

2.5.2. Quantifizierung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mittels der BCA Methode (BCA Protein Assay, Pierce, Rockford, USA). Verdünnungen der Proteinextrakte wurden in das BCA-Reagenz gegeben. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 60 °C erfolgte die Absorptions-

messung bei 562 nm. Für die Kalibrierung wurden verschiedene BSA-Verdünnungen analog behandelt.

2.5.3. SDS Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Auftrennung des Metallothioneins wurde nach dem Tricin SDS-PAGE Protokoll gearbeitet (Schagger & von Jagow, 1987). Für die Acrylamid/Bisacrylamidlösung wurde 48 g Acrylamid und 1,5 g Bisacrylamid eingewogen und in 100 ml Tridest gelöst. Für das Trenngel eines Minigels wurden 4,2 ml Acrylamid/Bisacrylamidlösung, 2 ml Tridest, 5 ml Gelpuffer (3 M Tris/HCl, pH 8,45, 0,3 % (w/v) SDS), 3,35 ml 50 % (v/v) Glycerin, 50 µl 10 % (w/v) APS und 12,5 µl TEMED verwendet. Für das Sammelgel wurden 0,33 ml Acrylamid/Bisacrylamidlösung, 2,32 ml Tridest, 1,33 ml Gelpuffer, 15 µl 10 % (w/v) APS und 3 µl TEMED eingesetzt.

Die nach 2.5.1 erhaltenen Proteinproben wurden nach der Zugabe von 5mal Probenpuffer (0,4 mM Tris/HCl, pH 6,8, 10 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerin, 1 M Mercaptoethanol, 1 % (w/v) Bromphenolblau) 5 min gekocht und anschließend auf ein 14 %iges Proteingel geladen. Als Molekulargewichtsmarker diente Prestained Protein Ladder, 10 – 160 kDa (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen). Die elektrophoretische Trennung erfolgte in einem vertikalen Minigel (Mighty Small II, Amersham Bioscience, Freiburg) der Dicke 1 mm mit einem Stromfluß von 30 mA in Elektrophoresepuffer (100 mM Tris, 100 mM Tricin, 1 % (w/v) SDS).

2.5.4. 2D Gele

Die Proteinextraktion für die zweidimensionale Proteingelelektrophorese erfolgte wie unter 2.5.1 beschrieben. 100 µg Rohextrakt wurden für die Isoelektrische Fokussierung unter Verwendung von 24 cm IEF-Streifen, (Immobiline DryStrip pH 6 – 9, Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden) eingesetzt. Die Proteinaliquots wurden mit Rehydrationspuffer (8 M Harnstoff, 2 % (w/v) CHAPS, 0,3 % (w/v) DTT, 0,5 % (v/v) IPG Puffer, 0,002 % (w/v) Bromphenolblau) auf 450 µl aufgefüllt. Die Proben wurden gleichmäßig in den Streifenhaltern verteilt und mit den IEF-Streifen (Gelseite nach unten) bedeckt und mit *cover fluid* (DryStrip Cover Fluid, Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden) beschichtet. Die Streifenhalter wurden mit einem Deckel verschlossen und die Fokussierung im IPGphor (Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden) erfolgte. Dabei wurde nach folgendem Protokoll verfahren.

Tabelle 2.5-1 Programm der isoelektrischen Fokussierung für 24 cm IEF-Streifen pH 6 – 9

Schritt	Zeit	Stromfluß
1	12 h	50 V
2	1 h	200 V
3	1 h	500 V
4	1 h	1000 V
5	1,5 h	Im Gradient auf 8000 V
Endfokussierung	7 h	56000 V

Nach Beendigung der Fokussierung wurden die Streifen kurz in ein Wasserbad getaucht und entweder bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder direkt für die zweite Dimension verwendet. Dabei wurden die IEF-Streifen mit der Gelseite nach oben in die gereinigten Streifenhalter gelegt und erst 15 min in Lösung A (50 mM Tris/HCl, pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, 1 % (w/v) DTT) und anschließend 15 min in Lösung B (50 mM Tris/HCl, pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, 2,5 % (w/v) Jodoacetamid) inkubiert.

Für das Gießen eines SDS-Gels wurden 38 ml Duracryl (30 % (w/v) Acrylamid, 0,65 % (w/v) Bisacrylamid), 28 ml Tridest, 22 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 1 ml 10 % (w/v) SDS, 30 μl TEMED, 450 μl 10 % (w/v) APS eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisierung ließ man die IEF-Streifen mit Hilfe von Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) auf die Geloberfläche gleiten. Für eine ausreichende Befestigung werden sie mit heißer Agarose (0,5 % (w/v) Agarose, 0,002 % (w/v) Bromphenolblau) überschichtet und so fixiert.

Die Gele wurden dann in die Elektrophoresekammer (Ettan DALT II System, Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden) eingesetzt, das obere Pufferreservoir mit Elektrophoresepuffer gefüllt und die Elektrophorese mit einer Leistung von 3 Watt pro Gel gestartet (Phase I). Nach 30 min wurde die Leistung auf 10 Watt pro Gel erhöht (Phase II). Kurz bevor die blaue Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt und die Gele fixiert (siehe 2.5.5).

2.5.5. Silberfärbung

Für die Silberfärbung wurden die SDS-Gele über Nacht in Fixierlösung (40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure) inkubiert. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen in 30 % (v/v) Ethanol für jeweils 20 min. Nach 20minütigem Waschen in Tridest erfolgte eine exakt einminütige Inkubation in 0,2 g/l Natriumthiosulfat. Die Gele wurden dann dreimal für

20 s in Tridest gespült und anschließend 20 min in Silberlösung (2 g/l AgNO₃, 750 µl/l 37 % (v/v) Formaldehyd) inkubiert. Nach dreimaligem Spülen für 20 s in Tridest erfolgte die Entwicklung in 30 g/l Na₂CO₃, 4 mg/l Natriumthiosulfat, 500 µl/l 37 % (v/v) Formaldehyd. Nach abgeschlossener Entwicklung wurden die Gele für mindestens 10 min in Stopplösung (5 % (v/v) Essigsäure) inkubiert. Nachdem die Gele in Tridest gewaschen wurden, wurden sie bis zur Trocknung in Konservierungslösung (20 % (v/v) Ethanol, 3 % (v/v) Glycerin) aufbewahrt.

2.5.6. Western- und Dot-Blot

Die Durchführung des Western-Blots erfolgte im *semi-dry*-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984). Nach der SDS-PAGE erfolgte der Transfer der Proteine von Polyacrylamid auf eine Nitrozellulosemembran (Protean 0,45 µm, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel). Nachdem Gel und Membran zwischen drei Lagen in mit Transferpuffer (25 mM Tris, 180 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol) angefeuchtetem Filterpapier gelegt wurden, erfolgte der Elektrottransfer für eine Stunde bei 0,8 mA/cm².

Alle anschließenden Schritte erfolgten unter Schütteln bei Raumtemperatur. Die Membran wurde zweimal 10 min in TBS-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) gewaschen und über Nacht in Blockierlösung (3 % (w/v) BSA in TBS-Puffer) inkubiert. Danach erfolgten zwei Waschschrte je 10 min in TBS-Tween/Triton (20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20, 0,2 % (v/v) TritonX-100) und einmal 10 min in TBS-Puffer. Darauf wurde die Membran für eine Stunde in Antikörperlösung (HA-Antikörper in Blockierlösung) inkubiert. Die Verdünnung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Danach wurde die Nitrozellulosemembran zweimal 10 min in TBS-Tween/Triton und einmal 10 min in TBS-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Alkalische Phosphatase-konjugierte Anti-Maus IgG) erfolgte anschließend für eine Stunde. Die Membran wurde daraufhin viermal 10 min in TBS-Tween/Triton gewaschen. Für die Färbung wurde die Nitrozellulosemembran in AP-Färbelösung (100 mM Tris/HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) überführt. Nach der Zugabe von 6,6 µl/ml NBT (5 % (w/v) NBT in 70 % (v/v) Dimethylformamid) und 3,3 µl/ml BCIP (5 % (w/v) BCIP in 100 % Dimethylformamid) wurde die Membran so lange im Dunkeln inkubiert bis erste Banden sichtbar wurden. Anschließend wurde sie gründlich mit Wasser gespült und getrocknet.

Für den Dot-Blot wurden 1-2 µl Proteinlösung auf die Nitrozellulosemembran gespottet und trocknen gelassen. Anschließend erfolgten alle Wasch- und Inkubationsschritte wie beim Western-Blot.

2.5.7. *in vivo* Phytochelatinassay

S. pombe-Kulturen wurden in EMM- bzw. YE5S-Medium wachsen gelassen (Unitron, Infors Schüttler) und nach Erreichen der gewünschten Zelldichte $OD_{600} = 1,8$ mit Cadmium oder Kupfer behandelt. Die Kulturen wurde 8 Stunden nach der Metallapplikation durch fünfminütiges Zentrifugieren (Eppendorfszentrifuge 5403) bei $1500 \times g$ geerntet und anschließend lyophilisiert. Danach wurde 1 mg des lyophilisierten Materials in $100 \mu\text{l}$ 0,1% (v/v) TFA aufgenommen und 15 min bei 4°C und $10000 \times g$ zentrifugiert (Eppendorfszentrifuge 5403). $50 \mu\text{l}$ des Überstandes wurden direkt für die Monobrombiman-Derivatisierung eingesetzt.

2.5.8. Monobrombiman-Derivatisierung

Die Derivatisierung von Verbindungen mit freien SH-Gruppen durch Monobrombiman erfolgte modifiziert nach (Fahey & Newton, 1987). $50 \mu\text{l}$ des Überstand erhalten aus 2.5.7 wurden in braune Eppendorfsreaktionsgefäße überführt und $5 \mu\text{l}$ 20 mM MBrB und $90 \mu\text{l}$ Puffer (200 mM HEPPS, 6,3 mM DTPA, pH 8,2) dazupipettiert. Nach 30minütiger Inkubation bei 45°C im Dunkeln wurde $60 \mu\text{l}$ 1 M MSA zur Neutralisierung dazugegeben und der Ansatz im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt oder sofort für die HPLC-Analyse genutzt.

2.5.9. Umkehrphasen-HPLC

Die derivatisierten Extrakte wurden mittels Umkehrphasen-HPLC auf einer Nucleosil[®] C18-Säule (4 mm, 150 mm, $3 \mu\text{m}$ -Partikel, Macherey-Nagel AG, Düren) analysiert. Als Lösungsmittel wurden A) 0,05 % (v/v) TFA in H_2O und B) 0,05 % (v/v) TFA in Acetonitril verwendet. Die Trennung erfolgte durch einen steigenden linearen Acetonitril-Gradienten mit einer Flußrate von 1ml/min.

Zeit [min]	Acetonitril [%]
0	10
13	21
33	35
40	100
50	10
65	10

Die SH-Gruppen enthaltenen Verbindungen wurden bei 480 nm über Fluoreszenz detektiert. Die Anregung erfolgte bei 380 nm. Für die Identifizierung der einzelnen Phytochelatine wurden Standards mit einem Economy Peptide Synthesizer EPS 211 (Abimed, Langenfeld)

unter Benutzung von N- α -Fmoc-L-glutaminsäure- α -butylester (Novabiochem, Läufelfingen, Schweiz) synthetisiert (Elster & Nürnberger).

2.5.10. Azetonfällung kleiner Proteine

Der Proteinrohextrakt wurde gemäß 2.5.1 erhalten. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (Beckman TL-100 Ultrazentrifuge, TL-100.3-Rotor) bei 30000 x g und 4 °C für 40 min. Danach wurde das Volumen des Überstandes bestimmt und für die erste Azetonfällung (45 % (v/v)) eingesetzt. Hierbei wurde das auf -20 °C vorgekühlte Azeton tropfenweise zum Proteinextrakt gegeben. Nach einer 20minütigen Zentrifugation (Eppendorffzentrifuge 5403) bei 10000 x g und 4 °C erfolgte die zweite Azetonfällung. Hier wurde Azeton solange tropfenweise zum Proteinextrakt gegeben bis die Endkonzentration 80 % (v/v) Azeton betrug. Nach einer einstündigen Präzipitation bei -20 °C wurde erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und anschließend in Aufschlußpuffer (siehe 2.5.1) aufgenommen, wobei eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml eingestellt wurde.

2.5.11. Gelfiltration

Für die Gelfiltration wurden 50 μ l des unter 2.5.10 erhaltenen Proteinextraktes auf eine Superdex 75 (30/10 H/R, Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden) gegeben. Die Elution der Proteine von der Säule erfolgte mit 50 mM NH_4HCO_3 , pH 8 mit einer Flußrate von 0,4 ml/min.

Die Säule war zuvor mit 300 μ g Proteinstandardgemisch (Humanes Serumalbumin (HSA) 69 kDa, Ovalbumin 43 kDa, Myoglobin 17 kDa, Cytochrom-c 12.3 kDa, Aprotinin 6.5 kDa, Insulin B 3.5 kDa) kalibriert worden.

Das Eluat wurde in 1,2 ml Fraktionen gesammelt. Demnach entspricht eine Fraktion einem Zeitintervall von 3 min. Die einzelnen Gelfiltrationsfraktionen wurden anschließend für die Dot-Blot und atomabsorptionsspektroskopischen Untersuchungen eingesetzt.

2.5.12. Anzucht und Aufbereitung der Kulturen für die Metallbestimmung

Kulturen der einzelnen *S. pombe* Stämme wurden in EMM- bzw. YE-Medium bis zu einer optischen Dichte von 0,6 – 0,8 wachsen gelassen (Unitron, Infors Schüttler). Anschließend erfolgte die Metallbehandlung unter Berücksichtigung der ermittelten IC_{50} -Werte (Tabelle 3.2-1). Nach zwei Stunden wurden die Kulturen durch eine fünfminütige Zentrifugation (Eppendorffzentrifuge 5403) bei 1000 x g pelletiert. Das Zellpellet wurde mit 20 ml Tridest

gewaschen und 10 min geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation wurde es zweimal mit 10 mM NiCl₂ gewaschen und ebenfalls für 10 min auf einem Schüttler behandelt. Abschließend wurde das Pellet nochmals in Tridest gewaschen und die Suspension in 15 ml-Falcons überführt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet schockgefroren und lyophilisiert. Nachdem das Trockengewicht des Zellpellets bestimmt worden war, wurde es in 2 ml 35 % (v/v) H₂O₂ aufgenommen und auf einem Vortexer resuspendiert. Zur milchigen Suspension wurden 3 ml 65 % (v/v) HNO₃ dazupipettiert und vorsichtig geschüttelt. Auf Grund der starken Gasbildung wurden die Falcons halb geschlossen für mindestens zwei Stunden stehengelassen, ehe mit den atomabsorptionsspektroskopischen bzw. atomemissionspektroskopischen Messungen begonnen wurde.

Für die medienunabhängige Metallbestimmung wurden die Zellen in EMM-Medium bis in die frühe logarithmische Wachstumsphase wachsen gelassen. Anschließend wurden sie im MES-Aufnahmepuffer (0,2 M MES, pH 6,0, 2 % (w/v) Glukose) auf eine Zelldichte von 0,6 eingestellt und eine Stunde bei 4 °C bzw. 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Metalle. Nach zwei Stunden wurden die Zellen geerntet und wie oben beschrieben aufbereitet und für die entsprechenden Messungen eingesetzt.

2.5.13. Atomabsorptions- und Atomemissionsspektroskopische Messungen

Für die atomabsorptionsspektroskopischen Messungen wurde mit einem AAnalyst 800 (Perkin Elmer, Überlingen) im Flammenmodus (Acetylen/Luftgemisch) gearbeitet. Nach dem Erstellen einer Eichkurve wurden die Proben direkt in der Flamme verdampft und die Konzentration des Metalls bestimmt. Für die Konzentrationsbestimmungen der einzelnen Metalle wurden folgende charakteristische Wellenlängen gewählt. Die Messungen des Zinks erfolgten bei 213,9 nm, Kupfer wurde bei 324,8 nm und Cadmium bei 228,8 nm gemessen.

Die Metallgehalte der Gelfiltrationsfraktionen wurden bei den gleichen Wellenlängen im Graphitrohrmodus vermessen. Nach vorherigem Erstellen einer Eichkurve wurden 20 µl der Probe in die Meßzelle pipettiert.

Für die atomemissionsspektroskopischen Untersuchungen wurden die Proben wie beschrieben aufgearbeitet. Die Messungen wurden im ICP-AES des Typs IRIS Advantarge HX Duo (Thermoelectron GmbH, Dreieich) durchgeführt. Nach der Kalibrierung des Gerätes wurden die Zellaufschlüsse (siehe 2.5.12) vermessen. Dabei wurden für die Quantifizierung der Elemente die in Tabelle 2.5-2 angegebenen Wellenlängen genutzt.

Tabelle 2.5-2 Charakteristische Wellenlängen der einzelnen Elemente

Element	Ca	Cd	Cu	Fe	K	Mg	Mn	P	S	Zn
λ (nm)	318,128	226,502	324,754	238,204	769,896	279,074	257,610	178,287	182,034	213,856

2.5.14. Bestimmung der Atmungsaktivität

Für die Bestimmung der Atmungsaktivität wurde *S. pombe* Wildtyp und $\Delta zym1$ in beiden Medien bis in die logarithmische Wachstumsphase wachsen gelassen (Unitron, Infors Schüttler). Währenddessen erfolgte die Kalibrierung der Medien mit der *Clark-type* Sauerstoffmeßelektrode (Hansatech, Ltd., King's Lynn, Großbritannien). Für die wäßrigen Medien wurde eine Sauerstoffsättigung von 12,65 nmol O₂/ml bestimmt.

Anschließend wurden die Kulturen abzentrifugiert und mit den für die Kalibrierung verwendeten Medien auf eine Zelldichte von $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml eingestellt.

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte in einer 1-ml thermostatisch kontrollierten Meßzelle. Die Meßtemperatur betrug 30 °C. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von circa 10 min, wobei die Zellsuspension ununterbrochen gerührt wurde. Für die Berechnung des Sauerstoffverbrauchs wurden die durch den Schreiber aufgezeichneten Anstiege herangezogen.

3. Ergebnisse

Die Chelatierung von Schwermetallen innerhalb der Zelle ist einer von vielen Mechanismen, um sich gegen die toxische Wirkung von Schwermetallen zu schützen. In der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* wurde die Bindung dieser Metalle an Phytochelatine (PC) genauer untersucht (Kondo *et al.*, 1983). Für Cadmium und Kupfer neben Arsenit und Arsenat stellt diese Form der Chelatierung einen Hauptentgiftungsmechanismus dar (Clemens *et al.*, 1999); (Wysocki *et al.*, 2003). Das Inaktivieren des für die Synthese von Phytochelatinen verantwortlichen Enzyms, der Phytochelatinsynthase (PCS), geht daher auch mit einer Steigerung der Sensitivität gegenüber diesen Metallen einher (Clemens *et al.*, 1999). In *Saccharomyces cerevisiae* wurde jedoch die Bindung von Schwermetallen an Metallothioneine (MT) als ein dominanter Prozeß der Toleranz beschrieben (Yu *et al.*, 1994). Die Generierung des MT *knock-out* $\Delta cup1$ Stammes in *S. cerevisiae* hat daher eine erhöhte Kupfersensitivität zur Folge (Hamer *et al.*, 1985). Untersuchungen der Hefe *Candida glabrata* zeigten ebenfalls, daß Kupfer durch Metallothioneine komplexiert und somit detoxifiziert wird. Cadmium jedoch wurde an Phytochelatine gebunden nachgewiesen.

Wie auch *C. glabrata* besitzt *S. pombe* sowohl Phytochelatine als auch ein Metallothionein Zym1. Da der PCS *knock-out* einen stark cadmium- und, wenn auch in schwächerem Maße, kupfersensitiven Phänotyp aufweist, sollte die Rolle des MT für die Schwermetalltoleranz und -homöostase untersucht werden. Außerdem legt die Induzierbarkeit der MT nicht nur durch Cd, Cu und Zn, sondern auch durch andere Metallionen (Hg, Au, Ag, Co, Ni, Bi) und viele andere Faktoren (z. B. Hormone, Wachstumsfaktoren, Vitamine und verschiedene Streßbedingungen) nahe, daß Metallothioneine nicht nur einfach Metalle binden und damit entgiften bzw. ihre Konzentration regulieren (Kägi, 1991). Vieles deutet daraufhin, daß sie Bestandteil eines ausbalancierten regulatorischen Netzwerks sind. Die Funktion der MT ist bis heute nur ansatzweise verstanden. Um die Funktion des Zym1 und mögliche Wechselwirkungen mit den Phytochelatinen zu untersuchen, wurden Metallothionein *knock-out* Stämme in *S. pombe* generiert und für die physiologischen, biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen eingesetzt.

hier bei 3,2 kb detektiert. Diese Größe ergibt sich aus der Wildtypbande und dem insertierten *LEU2*-Marker. Die für alle Stämme zu erwartende 0,2 kb-Bande konnte nicht nachgewiesen werden. Es wird angenommen, daß dieses kleine DNA-Fragment auf Grund der Verwendung eines 0,8 %igen (w/v) Agarosegels aus dem Gel diffundierte und daher nicht nachgewiesen werden konnte.

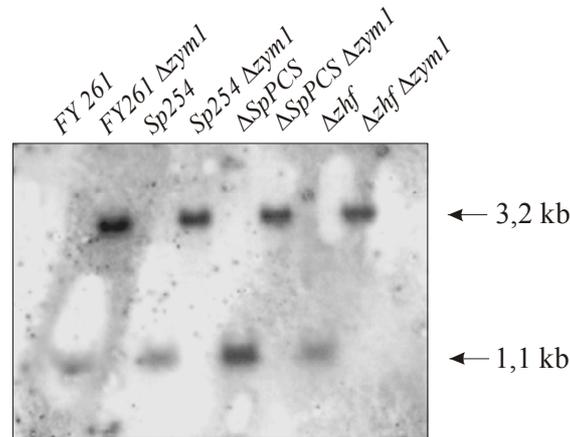


Abb. 3.1-2 Southern-Blot für die Identifizierung der MT *knock-out* Mutanten: Jeweils 10 µg genomische DNA wurden mit der Restriktionsendonuklease *Bgl*II verdaut und über ein 0,8 % (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion der 1,1 kb Wildtyp- bzw. der 3,2 kb großen MT *knock-out* Bande erfolgte mittels einer $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP markierten 980 Basen großen Sonde (siehe Abb. 3.1-1).

Trotz des Fehlens der 0,2 kb-Bande konnten alle Transformanten eindeutig als MT *knock-out* Mutanten verifiziert werden.

Im folgenden sollen der als *Sp254* benannte Stamm vereinfacht als Wildtyp (WT) und *Sp254* $\Delta zym1$ als $\Delta zym1$ bezeichnet werden.

Der Wildtyp *Sp254* enthält einen in das Genom insertierte *URA4*-Marker (siehe Tabelle 2.2-1). Diese Markerinsertion ermöglichte eine vergleichbare Anzucht von *Sp254* und allen anderen verwendeten *knock-out* Stämmen. Da *S. pombe* nur über zwei Auxotrophiemarker (*LEU2* und *URA4*) verfügt und diese beide in *Sp254* $\Delta zym1$ enthalten sind, war die Generierung einer zweiten *zym1* *knock-out* Mutante im Wildtyp *FY261* für die Komplementationsuntersuchungen (3.12) nötig.

Das in die Zellmorphogenese involvierte bzw. den Zellzyklus regulierende Gen *scd2* ist benachbart zum *zym1* (Chang *et al.*, 1994). Auf Grund des unter 3.3 dargestellten Phänotyps sollte ausgeschlossen werden, daß die Generierung der MT *knock-out* Stämme durch homologe Rekombination eine strukturelle Veränderung des *scd2* beispielsweise in der Promotorregion des Gens verursacht hat. Daher wurde die Expression des *scd2* im Wildtyp und im $\Delta zym1$ mittels RT-PCR untersucht (Abb. 3.1-3).

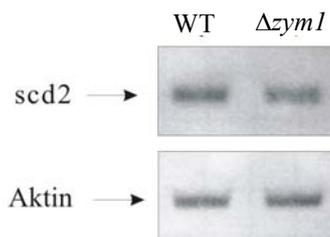


Abb. 3.1-3 Untersuchungen zur Transkriptakkumulation des *scd2*: Für die Synthese der cDNA wurden jeweils 1 µg RNA des WT und der $\Delta zym1$ Mutante eingesetzt. Die cDNA wurde darauf für die PCR nach Standardbedingungen unter Verwendung der Oligonukleotide SpActin5' u. 3' bzw. Spscd5' u. 3' (siehe Tabelle 2.4-2) eingesetzt. Das konstitutiv exprimierte Aktin gen stellt die Kontrolle für die cDNA-Synthese, die PCR und die Beladung auf das Agarosegel dar. (n = 3)

Die Generierung der *zym1 knock-out* Mutante hat keinen Einfluß auf die Expression des benachbarten Gens *scd2*. Die Transkriptakkumulation des *scd2* ist in beiden Stämmen gleich. Unterschiede in der Effizienz der cDNA-Synthese bzw. der PCR oder der Beladung auf das Agarosegel können unter Berücksichtigung des konstitutiv exprimierten Aktin gens als Kontrolle ausgeschlossen werden.

3.2. Wachstumsuntersuchungen nach Zugabe verschiedener Metalle

Metallothioneine wurden in vielen Organismen als Chelatoren für Schwermetalle beschrieben und sind daher in der Lage, detoxifizierend zu wirken (siehe 1.5). So führte das Inaktivieren von Cup1 in *S. cerevisiae* zu einer verminderten Toleranz gegenüber Kupfer.

Die unter 3.1 identifizierten MT *knock-out* Stämme sollten daher hinsichtlich ihrer Toleranz gegenüber verschiedenen Schwermetallen untersucht werden. Die Untersuchungen dazu wurden anfänglich in dem von uns standardmäßig verwendeten Minimalmedium EMM durchgeführt. Nur in diesem Medium ist es, aufgrund der Erzeugung eines Selektionsdruckes möglich, Wachstumsuntersuchungen von Transformanten durchzuführen. Das EMM-Medium ist auch in der Literatur als das für physiologische Untersuchungen geeignetere Medium beschrieben (Moreno *et al.*, 1991). Um Vergleiche mit der parallel zu meinen Untersuchungen erschienenen Arbeit von Borrelly *et al.* ziehen zu können, wurden die Wachstumsuntersuchungen auch im Komplexmedium durchgeführt (Borrelly *et al.*, 2002). Hier sind Untersuchungen der mit *zym1/pSLF172* transformierten Stämme nicht möglich.

Die Kulturen der verschiedenen *S. pombe* Stämme wurden auf eine gleiche optische Dichte (OD_{600}) in einem Endvolumen von 2 ml eingestellt, wobei die Start-OD im EMM-Medium 0,1 und im YE-Medium 0,02 betrug. Die Verwendung der unterschiedlichen Start-OD ist durch die unterschiedliche Verdopplungszeit der *S. pombe* Stämme in den beiden Medien zu

erklären. Während der Wildtyp im EMM-Medium eine Verdopplungszeit von etwa drei bis vier Stunden aufweist, ist diese im YE-Medium auf zwei Stunden verkürzt (Moreno *et al.*, 1991). Für eine optimale Durchführung der Experimente, den Vergleich mit den von Borrelly *et al.* erhaltenen Daten und wegen einer analogen Exposition der Kulturen mit den Metallen wurden die erwähnten optischen Dichten für die Wachstumsuntersuchungen ausgewählt. Die Kulturen wurden mit verschiedenen Metallionen unterschiedlicher Konzentrationen behandelt und für 18–20 h bei 30 °C und 150 rpm wachsen gelassen. Es wurden ausschließlich Metallchloride für die Wachstumsassays verwendet. Anschließend erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm.

3.2.1. Wachstum nach Cadmiumbehandlung

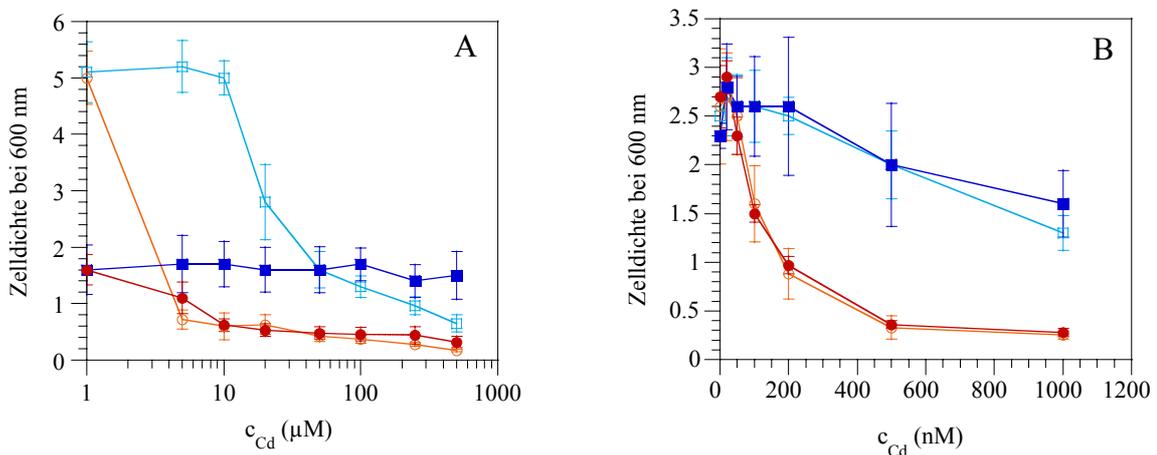
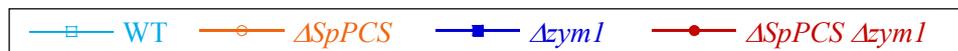


Abb. 3.2-1 Wachstum nach Cadmiumbehandlung (Absolutwerte): Die verschiedenen *S. pombe* Stämme (siehe Legende) wurden auf eine Start-OD von 0,1 im EMM-Medium (A) bzw. 0,02 im YE-Medium (B) eingestellt und in den entsprechenden Cadmiumkonzentrationen für 18–20 Stunden bei 30 °C und 150 rpm wachsen gelassen. Anschließend wurde die Zelldichte bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. (n = 5–7)



Die Wachstumsuntersuchungen nach Cadmiumbehandlung im EMM-Medium zeigten, daß beide MT *knock-out* Stämme wesentlich weniger durch die Zugabe von Cadmium in ihrem Wachstum inhibiert wurden als die beiden MT-Wildtypstämme (Abb. 3.2-1A). Durch die Darstellung der erhaltenen Ergebnisse als Absolutwerte zeigen jedoch alle MT *knock-out* Stämme ein generell schlechteres Wachstum. Die gemessenen OD der *knock-out* Mutanten in den unbehandelten Kulturen waren deutlich geringer als die des Wildtyps oder des $\Delta SpPCS$ Stammes. Auf diese Wachstumsunterschiede wird in Kapitel 3.3 genauer eingegangen. Um die Unterschiede des Wachstums nach Metallbehandlung besser darzustellen, wird im folgenden die Auftragung von relativen Zelldichten gezeigt. Hierbei wurde die OD der

unbehandelten Kontrollkulturen jeweils als 100 % gesetzt. Die optische Dichten der metallbehandelten Kulturen wurden als Prozentanteil dieser Kontrolle angegeben.

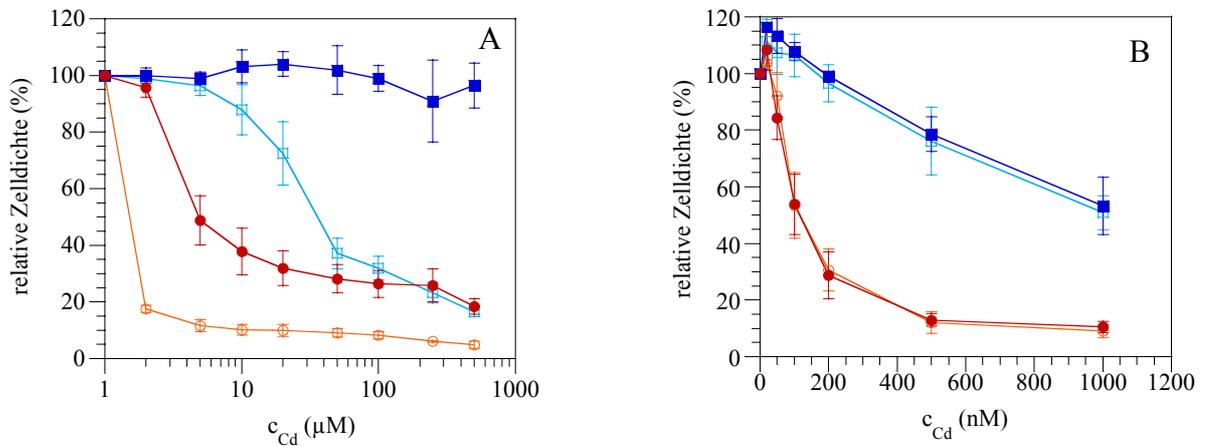
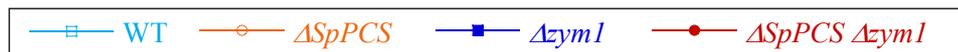


Abb. 3.2-2 Wachstum nach Cadmiumbehandlung (Relativwerte): Die verschiedenen *S. pombe* Stämme (siehe Legende) wurden auf eine Start-OD von 0,1 im EMM-Medium (A) bzw. 0,02 im YE-Medium (B) eingestellt und in den entsprechenden Cadmiumkonzentrationen für 18 – 20 Stunden bei 30 °C und 150 rpm wachsen gelassen. Anschließend wurde die Zelldichte bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. (n = 5 – 7)



Wie aus Abb. 3.2-2A deutlich ersichtlich ist, zeigen sowohl $\Delta zym1$ also auch der Doppel-*knock-out* $\Delta SpPCS \Delta zym1$ eine deutliche Toleranzsteigerung gegenüber dem Wildtyp bzw. dem Phytochelatinsynthese *knock-out* im EMM-Medium. Während der Wildtyp eine 50 %ige Wachstumsinhibierung bei einer Cadmiumkonzentration von 30 μM zeigt, konnte eine solche für $\Delta zym1$ selbst bei Konzentrationen, die höher als 500 μM $CdCl_2$ waren, nicht beobachtet werden.

Der Phytochelatinsynthese *knock-out* ist, wie unter 1.4 beschrieben, nicht mehr in der Lage, Phytochelatine zu synthetisieren und daher stark cadmiumsensitiv (siehe Abb. 1.4-2). Ein zusätzliches Inaktivieren des Metallothioneins *Zym1* im $\Delta SpPCS$ Stamm hatte allerdings eine mehr als fünffache Toleranzsteigerung zur Folge. Während $\Delta SpPCS$ einen IC_{50} -Wert bei ca. 1 μM $CdCl_2$ aufweist, liegt dieser für $\Delta SpPCS \Delta zym1$ bei 5 μM $CdCl_2$. Bei höheren Cadmiumkonzentrationen erreicht der Doppel-*knock-out* sogar Werte, die bei gleichen Konzentrationen für den Wildtyp gemessen wurden, während $\Delta SpPCS$ nahezu kein Wachstum mehr zeigt.

Die Untersuchungen des Wachstums nach Cadmiumbehandlung im YE-Medium zeigten keinen Phänotyp der Metallothionein *knock-out* Stämme. Sowohl unter Berücksichtigung der Absolut- und auch der Relativwerte wiesen Wildtyp und $\Delta zym1$ keinerlei Unterschiede im

Wachstum in Gegenwart von Cadmium auf (Abb. 3.2-1 u. Abb. 3.2-2B). Eine im gleichen Maße erhöhte Cadmiumsensitivität wurde sowohl für $\Delta SpPCS$ als auch $\Delta SpPCS \Delta zym1$ beobachtet.

Generell wurde ein besseres Wachstum aller Stämme im EMM-Medium nach Cadmiumbehandlung verzeichnet. Während im YE-Medium eine Inhibierung des Wachstums der einzelnen Stämme schon im nanomolaren Konzentrationsbereich ersichtlich wurde, war den Kulturen im EMM-Medium ein Wachstum bis in den mikromolaren Bereich möglich. Allerdings muß hier berücksichtigt werden, daß wie bereits erläutert, mit unterschiedlichen Start-OD gearbeitet wurde. Die Kulturen im EMM-Medium wurden auf eine fünffach höhere Start-OD eingestellt. Die größere Zellzahl und eine erhöhte Biosorption könnten zu einer geringeren effektiven Cadmiumkonzentration führen und die Toleranzunterschiede erklären.

3.2.2. Wachstum nach Kupferbehandlung

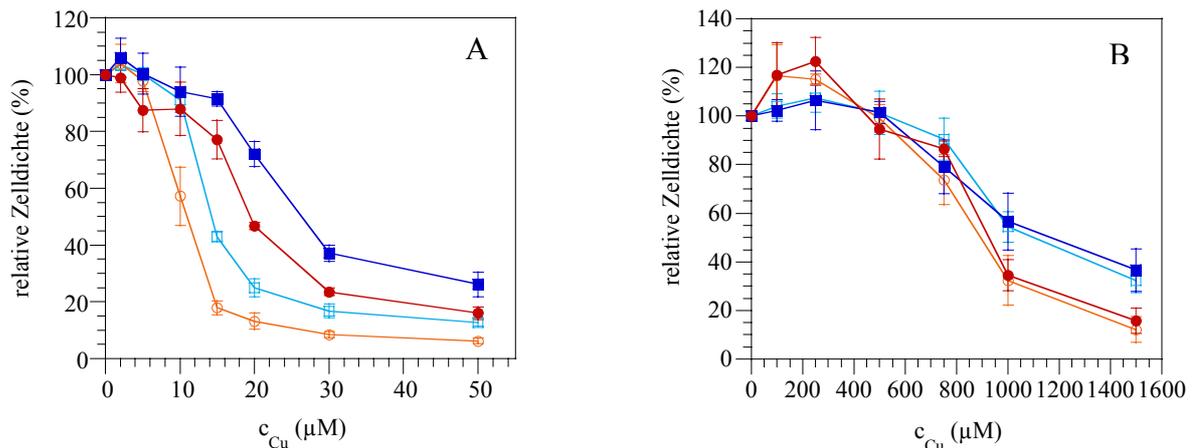
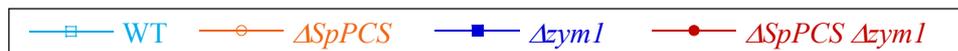


Abb. 3.2-3 Wachstum nach Kupferbehandlung (Relativwerte): Die verschiedenen *S. pombe* Stämme (siehe Legende) wurden auf eine Start-OD von 0,1 im EMM-Medium (A) bzw. 0,02 im YE-Medium (B) eingestellt und in den entsprechenden Kupferkonzentrationen für 18 – 20 Stunden bei 30 °C und 150 rpm wachsen gelassen. Anschließend wurde die Zelldichte bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. (n = 5)

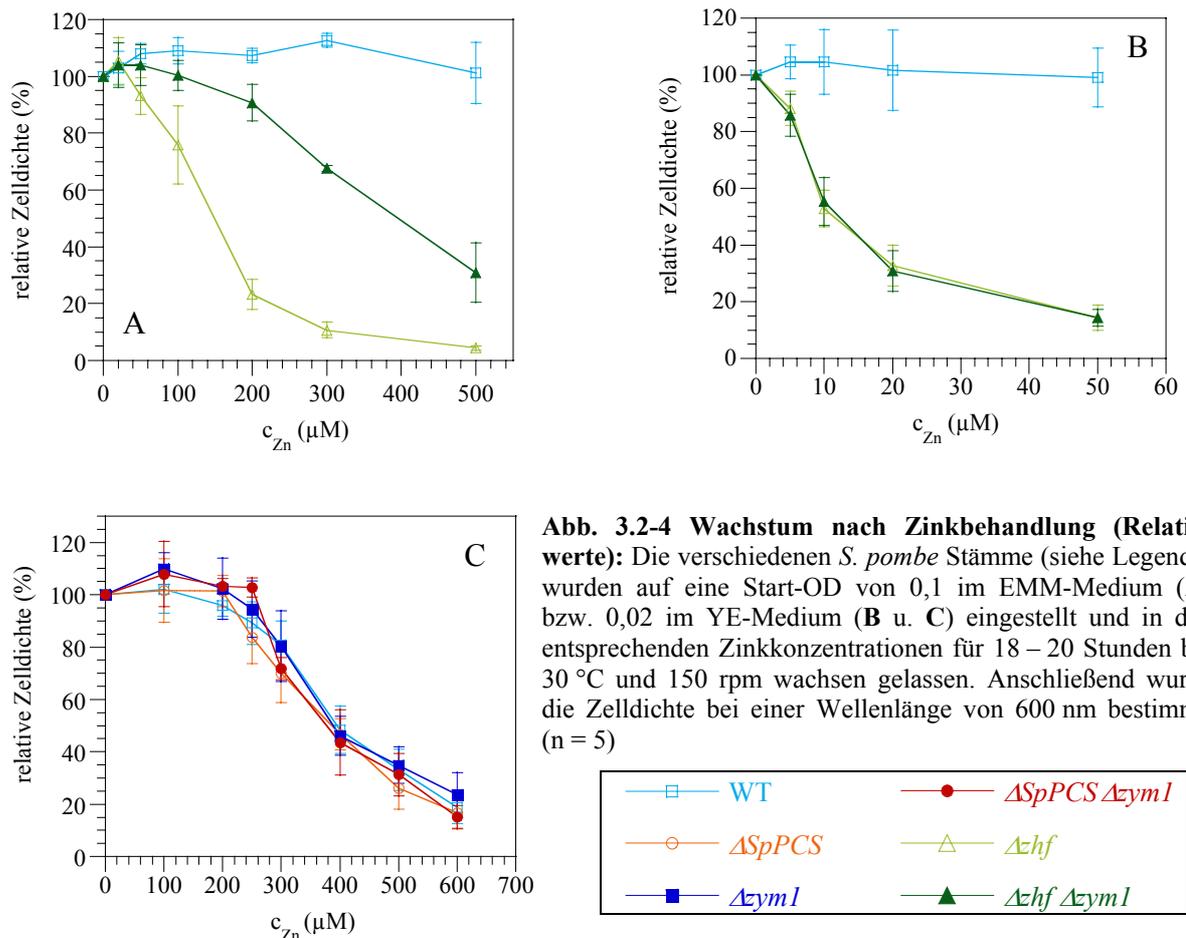


Auch nach Kupferbehandlung wurde eine erhöhte Toleranz der beiden Metallothionein *knock-out* Stämme im EMM-Medium verzeichnet (Abb. 3.2-3A). Die IC_{50} -Werte für $\Delta zym1$ und $\Delta SpPCS \Delta zym1$ liegen bei 25 μM bzw. 20 μM $CuCl_2$. Der Doppel-*knock-out* wächst in diesem Fall sogar besser als der Wildtyp, dessen IC_{50} -Wert bei 15 μM $CuCl_2$ liegt. Prinzipiell konnte aber eine Inhibierung des Wachstums aller Stämme ab Kupferkonzentrationen von 20 μM beobachtet werden. Bei diesen Konzentrationen konnte noch kein Einfluß auf das

Wachstum im YE-Medium gezeigt werden (Abb. 3.2-3B). Eine Inhibierung des Wachstums konnte erst durch das Einsetzen von mehr als 10mal höheren Kupferkonzentrationen erreicht werden. Hierbei konnte, wie schon nach Cadmiumbehandlung, ein analoges Wachstum von Wildtyp und $\Delta zym1$ bzw. $\Delta SpPCS$ und $\Delta SpPCS \Delta zym1$ beobachtet werden. Während im Konzentrationsbereich von 0 bis 400 μM CuCl_2 ein besseres Wachstum beider Phytochelatin-synthase *knock-out* Stämme gemessen wurde, zeigten diese bei Kupferkonzentrationen, die größer als 800 μM CuCl_2 waren, eine leicht erhöhte Kupfersensitivität.

Die unter 3.2.1 erwähnte unterschiedliche Zellzahl bzw. Biosorption kann im Fall des Kupfers nicht als Ursache für die sich stark unterscheidenden Kupferkonzentrationen in den beiden Medien gelten. Obwohl die Kulturen in YE-Medium mit einer fünffach geringeren Zellzahl angeimpft wurden, tolerierten sie etwa 10mal mehr Kupferionen.

3.2.3. Wachstum nach Zinkbehandlung



Auf Grund der geringen toxischen Wirkung des Zinks konnten die bisher verwendeten

Stämme für die Untersuchungen der Zinktoleranz im EMM-Medium nicht verwendet werden. Ab einer Konzentration von 600 μM ZnCl_2 fiel dieses im EMM-Medium aus. Da bei diesen Konzentrationen noch keine Wachstumsinhibierung der verschiedenen Stämme zu verzeichnen war, wurde mit dem zinksensitiven *S. pombe* Stamm Δzhf (siehe auch 1.7) gearbeitet. Von dieser Mutante wurde ebenfalls ein Metallothionein *knock-out* Stamm $\Delta zhf \Delta zym1$ generiert.

Eine Wachstumsinhibierung des Wildtyps im EMM-Medium (Abb. 3.2-4A) war aus bereits beschriebenen Gründen nicht nachzuweisen. Der zinksensitive *zhf knock-out* Stamm zeigte jedoch ein vermindertes Wachstum schon bei Konzentrationen kleiner als 100 μM ZnCl_2 . Der IC_{50} -Wert dieses Stammes liegt bei 150 μM ZnCl_2 . Ein zusätzliches Inaktivieren des Metallothioneins in der Δzhf Mutante führte auch in diesem Fall zu einer deutlichen Toleranzsteigerung. So ist die Resistenz des Doppel-*knock-out* $\Delta zhf \Delta zym1$ gegenüber Zink etwa dreifach erhöht. Sein IC_{50} -Wert liegt bei ca. 400 μM ZnCl_2 . Die gesteigerte Toleranz des Doppel-*knock-out* wird auch unter Betrachtung höherer Zinkkonzentrationen deutlich. Während bei Konzentrationen von 500 μM ZnCl_2 praktisch kein Wachstum für den *zhf knock-out* Stamm ermittelt werden konnte, zeigte $\Delta zhf \Delta zym1$ 30 % des Wachstums der Kontrollkultur. Im YE-Medium gibt es keinen Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen Δzhf und $\Delta zhf \Delta zym1$ (siehe Abb. 3.2-4B). Beide Stämme zeigten eine 50 %ige Wachstumsinhibierung bei etwa 10 μM ZnCl_2 . Zusätzlich konnte eine generelle Erhöhung der Sensitivität dieser Stämme im Vergleich zum EMM-Medium um etwa eine Größenordnung beobachtet werden. Auch hier sei wieder angemerkt, daß mit unterschiedlichen Start-OD in den beiden Medien gearbeitet wurde.

Bei höheren Zinkkonzentrationen gelang es, das Wachstum des Wildtyps im YE-Medium zu vermindern (siehe Abb. 3.2-4C). Dieses war dem des $\Delta zym1$ vergleichbar. Auch für $\Delta SpPCS$ und $\Delta SpPCS \Delta zym1$ konnte eine dem Wildtyp analoge Toleranz ermittelt werden. So wurden für diese Stämme Wachstumsinhibierungen um 50 % bei ca. 400 μM ZnCl_2 beobachtet.

3.2.4. Wachstum nach Kobalt- und Nickelbehandlung

Metallbindungsstudien zeigten, daß die Metallothioneine tierischer Organismen bevorzugt Cadmium und Zink binden, während Hefe-MT Kupfer komplexierten. Diese Spezifität der Metallbindung spiegelte sich auch in dem Toleranzverhalten der verschiedenen Organismen wider. So ging z. B. der Verlust des MT-I und des MT-II aus Mäusen mit einer erhöhten

Sensitivität gegenüber Cadmium einher. Die Inaktivierung des Cup1 aus *S. cerevisiae* zeigte eine reduzierte Kupfertoleranz. Die in den vorangegangenen Kapiteln dargelegten Wachstumsuntersuchungen im EMM-Medium zeigten jedoch ein verändertes Wachstum der MT *knock-out* Stämme nach Cadmium-, Kupfer- und Zinkbehandlung. Es sollte daher das Wachstumsverhalten auch in Gegenwart von Kobalt und Nickel untersucht werden. Für diese beiden Metalle konnte *in vivo* bisher noch keine Bindung an Metallothioneine gezeigt werden. Ein Phänotyp nach Kobalt- bzw. Nickelbehandlung wäre demnach wahrscheinlich unabhängig von einer Metallbindung an Zym1.

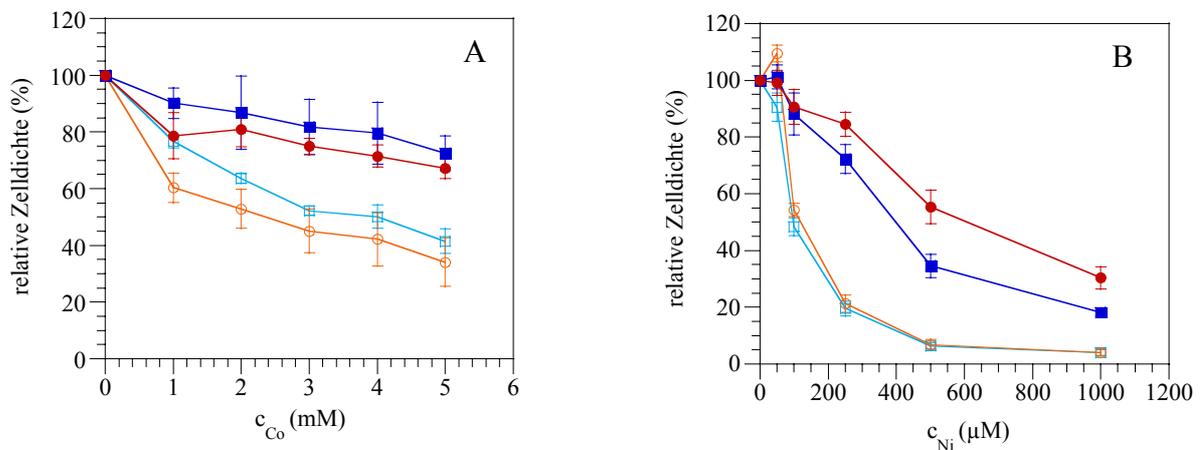
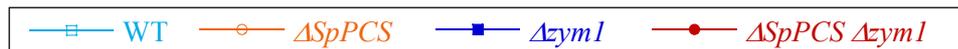


Abb. 3.2-5 Wachstum nach Kobalt- und Nickelbehandlung (Relativwerte): Die verschiedenen *S. pombe* Stämme (siehe Legende) wurden auf eine Start-OD von 0,1 im EMM-Medium eingestellt und nach Kobalt- (A) bzw. Nickelzugabe (B) für 18 – 20 Stunden bei 30 °C und 150 rpm wachsen gelassen. Anschließend wurde die Zelldichte bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. (n = 5)



Trotz des fehlenden Nachweises für eine Kobalt- und Nickelbindung an Metallothioneine hatte das Inaktivieren von Zym1 Einfluß auf die Sensitivität gegenüber diesen beiden Metallen. So konnte eine erhöhte Toleranz der beiden MT *knock-out* Stämme im Vergleich zu MT-Wildtypstämmen im EMM-Medium nachgewiesen werden. Während der Wildtyp und ΔSpPCS IC₅₀-Werte von 4 mM bzw. 2,5 mM CoCl₂ aufwiesen, zeigten Δzym1 und ΔSpPCS Δzym1 nur eine leichte Wachstumsinhibierung ab Kobaltkonzentrationen über 4 mM (Abb. 3.2-5A). Da bei höheren Konzentrationen das Kobalt im Medium präzipitierte, konnten keine IC₅₀-Werte bestimmt werden.

Für Nickel konnte eine vierfache Steigerung der Toleranz des Δzym1 in Bezug zum Wildtyp bzw. ΔSpPCS gemessen werden (Abb. 3.2-5B). Eine 50 %ige Wachstumsinhibierung für die MT-Wildtypstämme bzw. der Δzym1 Mutante konnte bei 100 μM und 400 μM NiCl₂ ermittelt

werden. Der Doppel-*knock-out* $\Delta SpPCS \Delta zym1$ zeigte mit einem IC_{50} -Wert von 600 μM $NiCl_2$ eine sogar noch höhere Toleranz.

3.2.5. Bestimmung der IC_{50} -Werte

Die für die untersuchten Metalle ermittelten IC_{50} -Werte der einzelnen *S. pombe* Stämme sowohl im EMM- als auch im YE-Medium sollen hier noch einmal tabellarisch gegenübergestellt werden.

Stamm	Medium	Cd	Cu	Zn	Co	Ni
WT	EMM	30 μM	15 μM	n.b. ^{1,3)}	4 mM	100 μM
	YE	1 μM	1 mM	400 μM	— ²⁾	—
$\Delta zym1$	EMM	n.b. ⁴⁾	25 μM	— ³⁾	n.b.	400 μM
	YE	1 μM	1 mM	400 μM	—	—
$\Delta SpPCS$	EMM	< 1 μM	10 μM	— ³⁾	2,5 mM	100 μM
	YE	100 nM	900 μM	400 μM	—	—
$\Delta SpPCS \Delta zym1$	EMM	5 μM	20 μM	— ³⁾	n.b.	600 μM
	YE	100 nM	900 μM	400 μM	—	—
Δzhf	EMM	—	—	150 μM	—	—
	YE	—	—	10 μM	—	—
$\Delta zhf \Delta zym1$	EMM	—	—	400 μM	—	—
	YE	—	—	10 μM	—	—

Tabelle 3.2-1 Ermittelte IC_{50} -Werte der Metalle: Die IC_{50} -Werte sind für das EMM-Medium grau und für das YE-Medium weiß unterlegt. ¹⁾ Eine Inhibierung des Wachstums auf 50 % konnte nicht bestimmt werden. ²⁾ Die Messungen zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes wurden nicht vorgenommen. ³⁾ Für alle nachfolgenden Untersuchungen im EMM-Medium wurden die Kulturen mit 500 μM $ZnCl_2$ bzw. ⁴⁾ $\Delta zym1$ mit 500 μM $CdCl_2$ behandelt.

Wie aus Tabelle 3.2-1 ersichtlich wird, weisen Wildtyp und $\Delta zym1$ bzw. $\Delta SpPCS$ und $\Delta SpPCS \Delta zym1$ im YE-Medium ein analoges Wachstum sowohl nach Cadmium- als auch nach Kupfer- und Zinkbehandlung auf. Im EMM-Medium zeigen beide MT *knock-out* Stämme eine zum Teil deutlich erhöhte Toleranz im Vergleich zu den MT-Wildtypstämmen. Generell tolerieren alle Stämme mehr Cadmium und Zink im EMM-Medien. Eine Ausnahme macht das Kupfer. Während es im YE-Medium in millimolaren Konzentrationen eingesetzt werden kann, ist den Kulturen im EMM-Medium das Wachstum nur in etwa einem hundertstel dieser Konzentration möglich. Auch das Einsetzen von Metallen, für die keine Bindung an MT *in vivo* nachgewiesen werden konnte, resultiert in einer Steigerung der Toleranz der MT *knock-out* Stämme im EMM-Medium.

3.3. Wachstum unter Normalbedingungen

Untersuchungen MT defizienter Organismen zeigten häufig eine reduzierte Toleranz gegenüber Cadmium und Kupfer. Allerdings wiesen diese Mutanten keinen Phänotyp ohne Metallzugabe auf. Sowohl der *S. cerevisiae* $\Delta cup1$ als auch MT *knock-out* Mäuse waren durch ein den Wildtyporganismen analoges Wachstum gekennzeichnet und zeigten eine normale Entwicklung und Fortpflanzung (Thiele *et al.*, 1987); (Masters *et al.*, 1994).

Allerdings zeigen die in der Abb. 3.2-1A dargestellten Ergebnisse eine deutlich geringere optische Dichte der MT *knock-out* Mutanten im Vergleich zu den MT-Wildtypstämmen unter Kontrollbedingungen im EMM-Medium. Daher sollte das Wachstum unter Normalbedingungen genauer charakterisiert werden. Die auf die gleiche optische Dichte eingestellten Kulturen wurden für 18 – 20 Stunden bei 30 °C und 150 rpm ohne die Zugabe zusätzlicher Metallionen wachsen gelassen und ihre Zelldichte ermittelt.

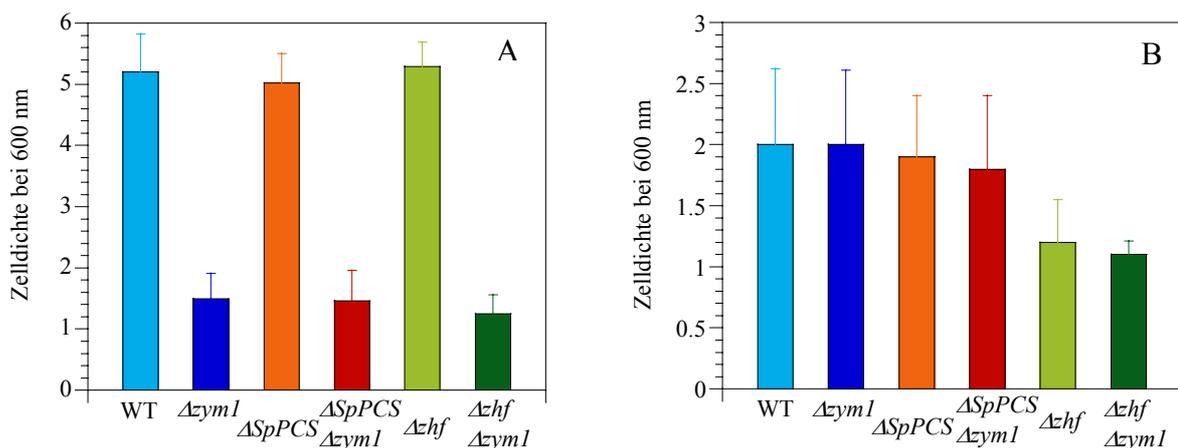


Abb. 3.3-1 Wachstum unter Normalbedingungen (Absolutwerte): Die verschiedenen *S. pombe* Stämme wurden auf eine Start-OD von 0,1 im EMM-Medium (A) bzw. 0,02 im YE-Medium (B) eingestellt und ohne Zugabe von Metallionen für 18 – 20 Stunden bei 30 °C und 150 rpm wachsen gelassen. Anschließend wurde die Zelldichte bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. (n = 15 – 25)

Die Wachstumsuntersuchungen unter Normalbedingungen ergaben für alle Metallothionein *knock-out* Stämme ein erheblich vermindertes Wachstum im EMM-Medium (Abb. 3.3-1A). Diese Mutanten erreichten nur ein Drittel des Wachstums, das für alle MT-Wildtypstämme beobachtet wurde.

Die selben Untersuchungen im YE-Medium ergaben allerdings ein vergleichbares Wachstum der Stämme mit funktionellem Metallothionein *Zym1* und den dazugehörigen MT *knock-out* Stämmen (Abb. 3.3-1B). Ein reduziertes Wachstum konnte nur für Δzhf und $\Delta zhf \Delta zym1$ festgestellt werden. Hierbei ist das verringerte Wachstum jedoch nicht auf das inaktivierte MT, sondern vielmehr auf den nicht-funktionellen *Zhf* Transporter zurückzuführen.

3.4. Wachstum unter Kupferdefizienzbedingungen

Wie bereits erwähnt sind aus der Literatur Phänotypen der MT defizienten Organismen nach Metallüberschuß, aber nicht unter Normalbedingungen bekannt. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß die Expression von Metallothioneinen unter Zink- und Kupferdefizienzbedingungen einen Wachstumsvorteil gegenüber MT *knock-out* Mutanten darstellt (Suhy *et al.*, 1999); (Suzuki *et al.*, 2002). Daher sollte auch das Wachstum unter Defizienzbedingungen untersucht werden. Auf Grund eines fehlenden spezifischen Zinkchelators für Hefemedien, der Sekundäreffekte, die durch Zinkmangel ausgelöst werden, und der hohen basalen Zinkkonzentration ergaben sich Schwierigkeiten für die Herstellung von Zinkdefizienzbedingungen (siehe hierfür auch 4.1.4). Es wurde sich daher auf die Untersuchungen des Wachstums unter Kupfermangel beschränkt. Hierfür wurden die Zellen in modifiziertem EMM-Medium (siehe 2.3) bzw. YE-Medium mit 400 µM Bathocuproindisulfonsäure (BCS), einem Kupferchelator, für zwei Tage vorinkubiert. Dabei wurden die Zellen täglich in frisches Medium mit BCS überimpft. Am dritten Tag waren die Kulturen in ihrem Wachstum stark eingeschränkt, was auf eine Kupferdefizienz zurückgeführt wurde. Die unter Kupfermangel kultivierten Hefekulturen wurden dann im EMM- bzw. YE-Medium ohne BCS auf die Zelldichten von 0,1 bzw. 0,02 eingestellt und für 18 bis 20 Stunden bei 30 °C und 150 rpm wachsen gelassen. Die ermittelten Zelldichten wurden mit denen der Kontrollkulturen, die nicht mit BCS behandelt wurden, verglichen.

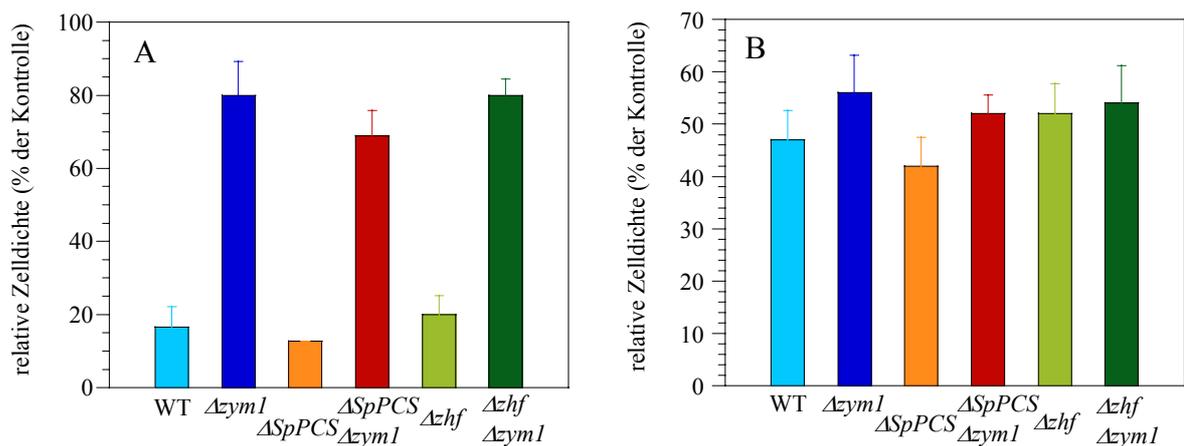


Abb. 3.4-1 Wachstum unter Kupfermangel (Relativwerte): Die verschiedenen *S. pombe* Stämme wurden zwei Tage im modifizierten EMM- (A) bzw. YE-Medium (B) mit 400 µM BCS vorinkubiert. Anschließend wurden diese kupferdefizienten Kulturen im EMM- bzw. YE-Medium ohne BCS auf eine Zelldichte von 0,1 bzw. 0,02 eingestellt und für 18 – 20 Stunden bei 30 °C und 150 rpm wachsen gelassen. Das Wachstum der kupferdefizienten Kulturen wurde mit dem der Kontrollkulturen, die nicht mit BCS behandelt wurden, verglichen. (n = 3)

Das Wachstumsverhalten unter Kupferdefizienzbedingungen verhält sich invers zum Wachstum unter Normalbedingungen (3.3). In diesem Fall zeigen alle MT-Wildtypstämme, die im EMM-Medium angezogen wurden, ein stark reduziertes Wachstum. Sie zeigten nur noch etwa ein Viertel des Wachstums der MT *knock-out* Stämme (Abb. 3.4-1A).

Das Wachstum im YE-Medium verhält sich wie bereits unter 3.3 beschrieben. Hier konnten keine Unterschiede zwischen MT-Wildtyp- und MT *knock-out* Stämmen ermittelt werden (Abb. 3.4-1B). Alle kupferdefizienten Stämme erreichen etwa 45 bis 60 % des Wachstums der Kontrollstämme.

Grundsätzlich ist zu beachten, daß die ermittelten Zelldichten der kupferdefizienten mit denen von nicht-kupferdefizienten Kulturen verglichen wurden. Im Falle des EMM-Mediums sind die Kontrollwerte zwischen MT-Wildtypstämmen und MT *knock-out* Mutanten sehr unterschiedlich (siehe Abb. 3.3-1A). D. h. ein generell langsames Wachstum könnte die ermittelten Resultate für das Wachstum unter Mangelbedingungen verzerren. Die Effekte der Kupferdefizienz bei langsam wachsenden Kulturen könnten weniger drastisch erscheinen. Daher wurde das Wachstum auch unter Verwendung der absoluten Zelldichten betrachtet.

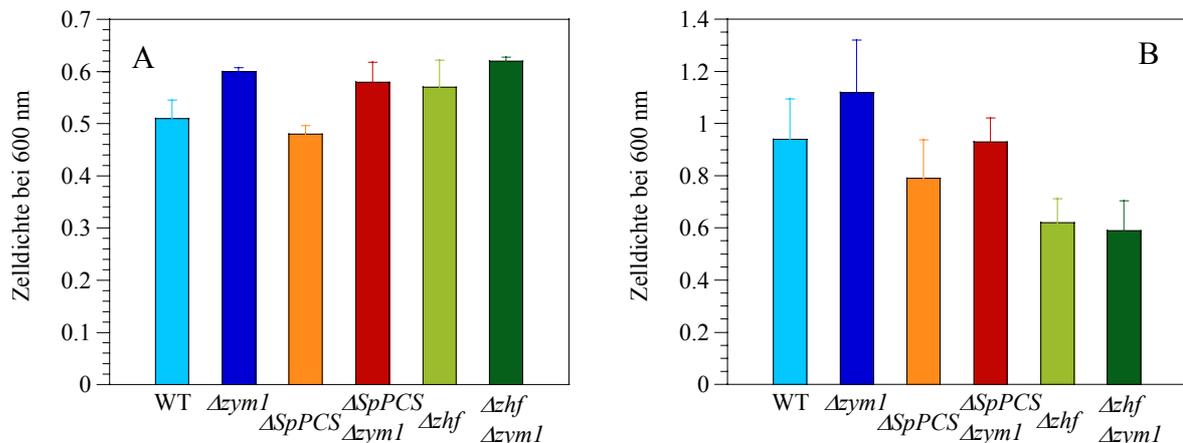


Abb. 3.4-2 Wachstum unter Kupfermangel (Absolutwerte): Die verschiedenen *S. pombe* Stämme wurden zwei Tage im modifizierten EMM- (A) bzw. YE-Medium (B) mit 400 μ M BCS vorinkubiert. Anschließend wurden diese kupferdefizienten Kulturen in EMM- bzw. YE-Medium ohne BCS auf eine Zelldichte von 0,1 bzw. 0,02 eingestellt und für 18 – 20 Stunden bei 30 °C und 150 rpm wachsen gelassen. (n = 3)

Legt man die Absolutwerte der Zelldichten der verschiedenen Kulturen als Basis für die Auswertung zugrunde, ergibt sich für das EMM-Medium ein vollkommen anderes Bild (Abb. 3.4-2A). Alle Stämme zeigen Zelldichten zwischen 0,5 bis 0,6 Absorptionseinheiten. Das Wachstum der MT *knock-out* Mutanten ist gegenüber den MT-Wildtypstämmen nur noch minimal erhöht. Die Auftragung der absoluten Zelldichten der in YE-Medium angezogenen Kulturen zeigt ein zur Abb. 3.4-2B nahezu identisches Bild. Auch hier sind keine

Unterschiede zwischen den *S. pombe* Stämmen mit oder ohne Zym1 festzustellen. Die vermeintliche Wachstumsinhibierung der beiden *zhf knock-out* Stämme ist durch das generell schlechtere Wachstum auch unter Normalbedingungen zu erklären (Abb. 3.3-1B).

3.5. Untersuchungen zur Metallaufnahme der verschiedenen *S. pombe* Stämme

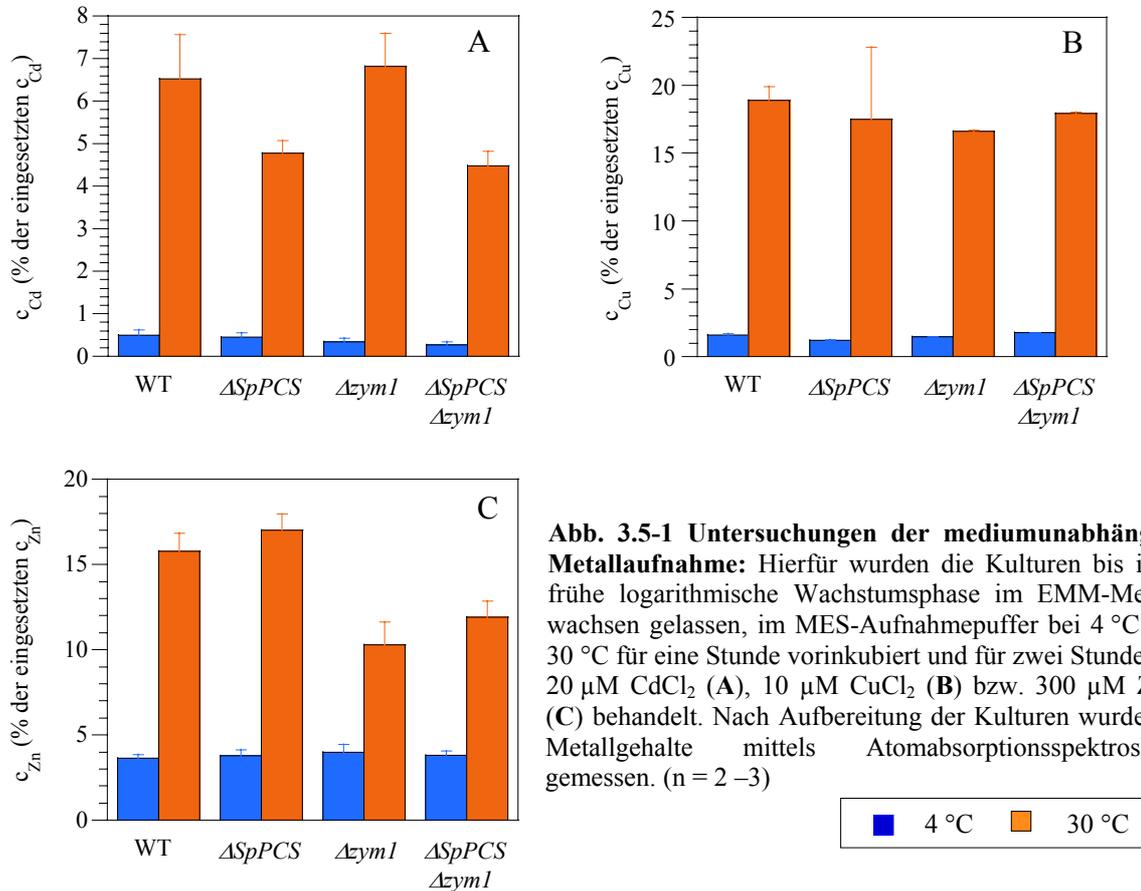
Die Aufnahme von essentiellen Metallionen stellt einen wichtigen Prozeß für die Stoffwechsellistung einer Zelle dar. So sind viele Zink- und Kupferenzyme an wichtigen Reaktionen katalytisch beteiligt. Die Aufnahme von Metallionen wird durch Transporter oder Kanäle gewährleistet. Dabei ist für die Transporter eine Regulation in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration beschrieben (siehe 1.2). Dennoch sind diese Transportproteine nicht allein für die regulierte Aufnahme zuständig. Vielmehr konnte gezeigt werden, daß die Existenz von intrazellulären Chelatoren essentiell für die Metallionenaufnahme ist. Diese These wird vor allem dadurch gestützt, daß Kupfer wie auch Zink nicht in freier Form in Hefe- bzw. *Escherichia coli*-Zellen vorkommen, sondern direkt nach der Aufnahme in die Zelle chelatiert werden (Rae *et al.*, 1999); (Outten & O'Halloran, 2001). Außerdem konnte gezeigt werden, daß *S. cerevisiae* Transformanden, die die Phytochelatinsynthase aus Weizen exprimieren, 30 bis 50 % mehr Cadmium aufnehmen als Kontrollzellen. Die Synthese von Phytochelatinen kann zu einer gesteigerten Aufnahme von Metallionen führen (Clemens *et al.*, 1999). Auch für Metallothioneine wurde gezeigt, daß sie die Effizienz des Metallionentransportes in die Zelle positiv modulieren können (Suhy *et al.*, 1999).

Da eine verminderte Aufnahme essentieller Metalle Einfluß auf den Stoffwechsel und letztendlich auf das Wachstum haben kann, sollte die Aufnahme von Cadmium, Kupfer und Zink in den Wildtyp und den MT *knock-out* Stamm bestimmt werden. Nimmt man an, daß die Verfügbarkeit der Metallionen im EMM-Medium im Vergleich zum YE-Medium herabgesetzt ist, so könnte eine ineffizientere Metallaufnahme der Mutanten die Ursache für das unterschiedliche Wachstum im EMM-Medium darstellen

3.5.1. Bestimmung der mediumunabhängigen Metallaufnahme

Da die Anzucht in Komplex- oder Minimalmedium entscheidenden Einfluß auf das Wachstum und möglicherweise auf die Aufnahme von Metallen hat, sollte die Aufnahme der Metallionen mediumunabhängig in MES-Aufnahmepuffer, wie in Lin & Kosman beschriebenen, ermittelt werden (Lin & Kosman, 1990). Neben dem unterschiedlichen Wachstum wurden auch unterschiedliche IC₅₀-Werte für die Metalle im EMM- und YE-Medium bzw. unter den Stämmen ermittelt. Für die medienunabhängigen Untersuchungen

können diese Faktoren vernachlässigt werden. Alle Stämme wurden hier mit den gleichen subletalen Metallkonzentrationen behandelt. Die Aufbereitung der Kulturen und Metallmessungen erfolgten wie unter 2.5.12 und 2.5.13 beschrieben.



Es konnten keine Unterschiede in der Cadmiumaufnahme zwischen Wildtyp und Δzym1 ermittelt werden (Abb. 3.5-1A). Ein um etwa ein Drittel geringerer Cadmiumgehalt wurde in ΔSpPCS und $\Delta\text{SpPCS } \Delta\text{zym1}$ gemessen. Dieses ist allerdings nicht durch das inaktive *Zym1* zu erklären, sondern darauf zurückzuführen, daß der ΔSpPCS die Fähigkeit zur Phytochelatin-synthese verloren hat. Die Aufnahme des Cadmiums in die Zelle ist bei 4 °C nahezu vollständig inhibiert. Dieses konnte auch für Zink und Kupfer beobachtet werden.

Die Kupferaufnahme (Abb. 3.5-1B) ist für alle *S. pombe* Stämme gleich. Sie liegt bei etwa 20 % der eingesetzten Kupferkonzentration.

Unterschiede in der medienunabhängigen Metallaufnahme konnten nur für Zink ermittelt werden. Beide MT *knock-out* Stämme zeigen nur noch zwei Drittel des Zinkgehalts der MT-Wildtypstämme.

3.5.2. Bestimmung der medienabhängigen Metallaufnahme

Die Aufnahme von Metallionen in die Zelle hängt allerdings nicht nur von den Transportern und ihrer Regulierung oder chelatierenden Molekülen, sondern auch von der Verfügbarkeit der Ionen im jeweiligen umgebenden Medium ab. Es sollte daher überprüft werden, ob die Verfügbarkeit von Cadmium, Kupfer und Zink im EMM- und YE-Medium vergleichbar ist. Unterschiede in der Aufnahme zwischen Wildtyp und $\Delta zym1$ könnten eine mögliche Erklärung des besseren Wachstums der MT *knock-out* Stämme im EMM-Medium nach Metallzugabe darstellen.

Die einzelnen Stämme wurden wie unter 2.5.12 beschrieben behandelt und für die atomabsorptionsspektroskopischen Messungen eingesetzt.

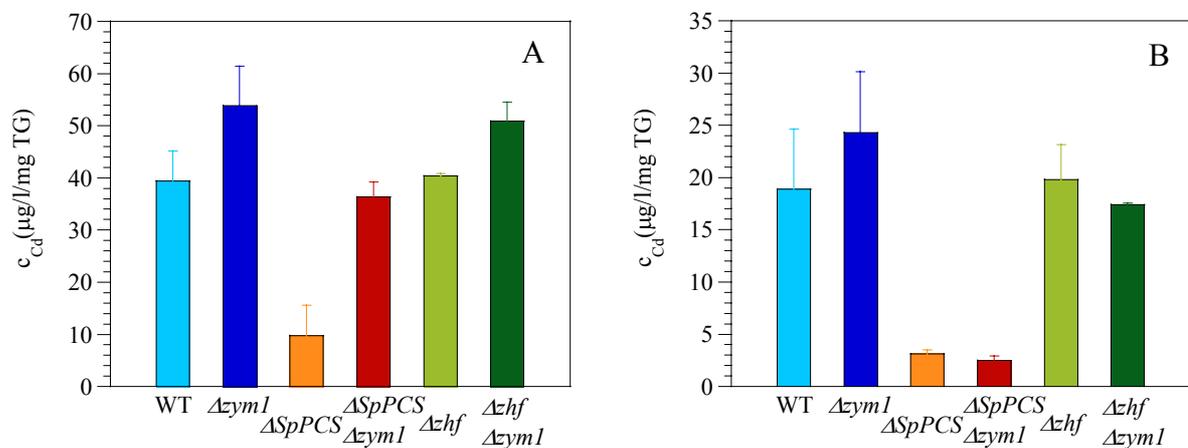


Abb. 3.5-2 Untersuchungen der medienspezifischen Cadmiumaufnahme: Hierfür wurden die Kulturen im EMM- (A) bzw. YE-Medium (B) bis in die frühe logarithmische Wachstumsphase wachsen gelassen und entsprechend ihrer IC_{50} -Werte (Tabelle 3.2-1) für zwei Stunden mit Cadmium behandelt. Nach Aufbereitung der Kulturen wurden die Metallgehalte mittels Atomabsorptionsspektroskopie gemessen. (n = 2)

In der Abb. 3.5-2 ist die Aufnahme von Cadmium in die Hefezellen in EMM- als auch YE-Medium gezeigt. Generell sind keine signifikanten Unterschiede der MT *knock-out* Stämme in Bezug auf die dazugehörenden MT-Wildtypstämme im YE-Medium zu verzeichnen (Abb. 3.5-2B). Für die PCS-Wildtypstämme konnten Cadmiumkonzentration von etwa 18 bis 24 $\mu\text{g/l/mg}$ Trockengewicht (TG) ermittelt werden. Eine weitaus geringere Cadmiumaufnahme von nur etwa 3 $\mu\text{g/l/mg}$ TG wurde in den beiden PCS *knock-out* Stämmen gemessen. Allerdings ist anzumerken, daß diese Kulturen nur mit 1/10 der CdCl_2 -Konzentration behandelt wurden, die für die anderen Stämme verwendet wurde (siehe Tabelle 3.2-1). Eine Reduktion der Cadmiumaufnahme der PCS *knock-out* Stämme konnte auch im MES-Aufnahmepuffer gezeigt werden.

Um dennoch vergleichende Aussagen treffen zu können, sind in Tabelle 3.5-1 die prozentualen Werte, die aus der aufgenommenen Ionenkonzentration im Verhältnis zur eingesetzten Metallionenkonzentration ermittelt wurde, aufgezeigt.

	Medium	WT	$\Delta zym1$	$\Delta SpPCS$	$\Delta SpPCS$ $\Delta zym1$	Δzhf	Δzhf $\Delta zym1$
c_{Cd} (% c'_{Cd})	EMM	2,3 $\pm 0,45$	0,19 $\pm 0,01$	17,4 $\pm 6,4$	13,0 $\pm 0,46$	0,29 $\pm 0,12$	0,14 $\pm 0,06$
	YE	33,6 $\pm 10,18$	43,3 $\pm 18,14$	54,6 $\pm 7,44$	43,9 $\pm 7,56$	35,2 $\pm 6,0$	30,9 $\pm 0,28$

Tabelle 3.5-1 Relative Cadmiumaufnahme: Die zellulären Konzentrationen des Cadmiums der einzelnen Stämme im EMM- und YE-Medium sind als Prozent der jeweiligen für die Streßapplikation eingesetzten Konzentration c' im Medium (siehe Tabelle 3.2-1) angegeben.

Auch unter Berücksichtigung der in Tabelle 3.5-1 dargestellten Werte ergibt sich nur ein marginaler Unterschied in der Aufnahme von Cadmium zwischen den einzelnen Stämmen im Komplexmedium. Der $\Delta SpPCS$ Stamm zeigte eine leichte, aber nicht signifikant erhöhte Aufnahme. Prinzipiell zeigen alle im YE-Medium angezogenen Stämme eine Aufnahme von 30 bis 50 % des eingesetzten Cadmiums.

Ein ganz anderes Bild ergibt sich für die Cadmiumaufnahme im EMM-Medium (Abb. 3.5-2A). Hier wurden die Kulturen, gemäß ihrer IC_{50} -Werte, mit zum Teil sehr unterschiedlichen Cd-Konzentrationen behandelt (siehe Tabelle 3.2-1). Diese Unterschiede zeigen sich auch in den Absolutwerten der Cadmiumaufnahme. Besonders groß ist der Unterschied zwischen $\Delta SpPCS$ und $\Delta SpPCS \Delta zym1$. Letzterer nimmt etwa viermal mehr Cadmium auf als $\Delta SpPCS$. Beachtet man aber, daß $\Delta SpPCS \Delta zym1$ mit dem Fünffachen an $CdCl_2$ behandelt wurde, ergibt sich auch für diese beiden Stämme eine vergleichbare Aufnahme (siehe Tabelle 3.5-1).

Interessant sind ebenfalls die Konzentrationsverhältnisse zwischen Wildtyp und $\Delta zym1$. Während der Wildtyp mit $30 \mu M CdCl_2$ behandelt wurde, wurde in die $\Delta zym1$ Kultur $500 \mu M CdCl_2$ gegeben. Trotz des wesentlich höheren Angebots an Cadmiumionen zeigte $\Delta zym1$ eine verhältnismäßig gering erhöhte Cadmiumaufnahme. Diese ist nur um etwa ein Drittel gesteigert. Laut Tabelle 3.5-1 nimmt $\Delta zym1$ etwa 0,2 % der eingesetzten Cadmiumionen auf und hat damit eine weitaus geringere relative Metallaufnahme als der Wildtyp. Trotzdem sind die Unterschiede der Metallaufnahme zwischen beiden Stämmen geringfügiger als es die eingesetzten Ionenkonzentrationen erwarten ließen.

Obwohl die im EMM-Medium eingesetzten Cadmiumkonzentrationen um 30- bis 500fach höher als im YE-Medium sind (siehe Tabelle 3.2-1), ist die Aufnahme von Cadmium in

EMM-Medium nur um den Faktor zwei bis drei gesteigert. Wie auch aus der Tabelle 3.5-1 ersichtlich wird, nehmen die im YE-Medium angezogenen Kulturen prozentual wesentlich mehr des eingesetzten Cadmiums auf.

Analoge Untersuchungen wurden auch für Kupfer durchgeführt. Hier ist generell anzumerken, daß sich die eingesetzten Kupferkonzentrationen in den beiden Medien und den verschiedenen *S. pombe* Stämmen weitaus weniger unterschieden, als es für Cadmium der Fall war (siehe Tabelle 3.2-1).

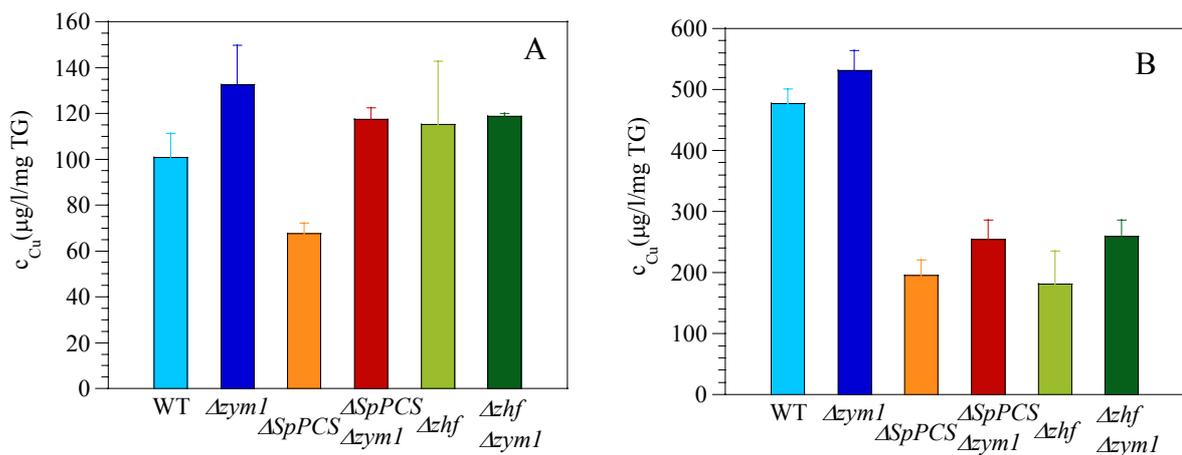


Abb. 3.5-3 Untersuchungen der mediumspezifischen Kupferaufnahme: Hierfür wurden die Kulturen im EMM- (A) bzw. YE-Medium (B) bis in die frühe logarithmische Wachstumsphase wachsen gelassen und entsprechend ihrer IC₅₀-Werte (Tabelle 3.2-1) für zwei Stunden mit Kupfer behandelt. Nach Aufbereitung der Kulturen wurden die Metallgehalte mittels Atomabsorptionsspektroskopie gemessen. (n = 2)

Die Aufnahme von Kupfer in die im EMM-Medium angezogenen Stämme zeigte nur geringe Unterschiede (Abb. 3.5-3A). Der Kupfergehalt des ΔSpPCS ist leicht reduziert. Berücksichtigt man aber auch hier die geringere Ausgangskonzentration des Kupfers in dieser Kultur, so ergibt sich für alle Stämme eine vergleichbare Aufnahmerate (Tabelle 3.5-2).

	Medium	WT	Δzym1	ΔSpPCS	ΔSpPCS Δzym1	Δzhf	Δzhf Δzym1
c _{Cu} (% c' Cu)	EMM	21,2 ± 2,2	16,7 ± 2,18	21,3 ± 1,44	18,5 ± 0,76	18,1 ± 4,33	17,4 ± 0,41
	YE	1,5 ± 0,08	1,7 ± 0,09	0,68 ± 0,10	0,9 ± 0,11	0,6 ± 0,19	0,9 ± 0,09

Tabelle 3.5-2 Relative Kupferaufnahme: Die zellulären Konzentrationen des Kupfers der einzelnen Stämme im EMM- und YE-Medium sind als Prozent der jeweiligen für die Streßapplikation eingesetzten Konzentration c' im Medium (siehe Tabelle 3.2-1) angegeben.

Für $\Delta SpPCS$, Δzhf und die beiden Doppel-*knock-out* Mutanten sind auch im YE-Medium keine signifikanten Unterschiede sowohl für die absolute als auch die relative Aufnahme von Kupfer zu finden. Für sie konnten Kupferkonzentrationen von 200 bis 250 $\mu\text{g/l/mg TG}$ ermittelt werden. Wildtyp bzw. $\Delta zym1$ akkumulieren etwa zwei- bis 2,5mal mehr Kupfer. Prinzipiell gibt es aber keine Unterschiede zwischen den MT *knock-out* und MT-Wildtypstämmen.

Auch im Falle des Kupfers unterscheiden sich die in den beiden Medien eingesetzten Kupferkonzentrationen um bis zu zwei Größenordnungen. Analog zum Cadmium resultiert eine erhöhte Ausgangskonzentration in einer verhältnismäßig gering gesteigerten Akkumulation von Kupfer. Für die meisten Stämme im YE-Medium konnte nur eine etwa zweifach, für Wildtyp und $\Delta zym1$ eine etwa fünffach erhöhte Aufnahme beobachtet werden.

Die Untersuchungen der medienunabhängigen Metallaufnahme zeigten Unterschiede in der Zinkakkumulation zwischen MT-Wildtyp- und MT *knock-out* Stämmen. Daher sollte die Zinkakkumulation auch im EMM- und YE-Medium auf mögliche Unterschiede untersucht werden.

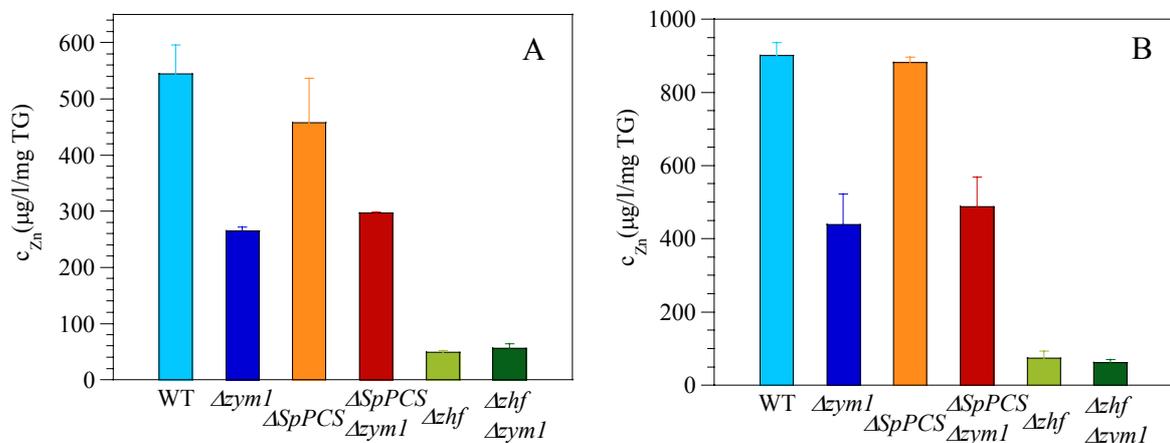


Abb. 3.5-4 Untersuchungen der medienspezifischen Zinkaufnahme: Hierfür wurden die Kulturen im EMM- (A) bzw. YE-Medium (B) bis in die frühe logarithmische Wachstumsphase wachsen gelassen und entsprechend ihrer IC_{50} -Werte (Tabelle 3.2-1) für zwei Stunden mit Zink behandelt. Nach Aufbereitung der Kulturen wurden die Metallgehalte mittels Atomabsorptionsspektroskopie gemessen. ($n = 2$)

Im Unterschied zu den Resultaten mit Cadmium und Kupfer scheint *Zym1* Einfluß auf die Aufnahme von Zink zu haben. $\Delta zym1$ und $\Delta SpPCS \Delta zym1$ akkumulieren, im Vergleich zum Wildtyp bzw. $\Delta SpPCS$, nur etwa die Hälfte an Zink. Dieses konnte für beide Medien in gleichem Maße beobachtet werden. Auch die relative Aufnahmerate dieser beiden Stämme ist um das Zwei- bis Dreifache reduziert.

	Medium	WT	$\Delta zym1$	$\Delta SpPCS$	$\Delta SpPCS$ $\Delta zym1$	Δzhf	Δzhf $\Delta zym1$
c_{Zn} (% c'_{Zn})	EMM	3,1 $\pm 0,29$	0,83 $\pm 0,22$	2,6 $\pm 0,47$	1,7 $\pm 0,8$	0,72 $\pm 0,13$	0,26 $\pm 0,01$
	YE	7,6 $\pm 0,42$	2,9 $\pm 0,9$	7,3 $\pm 0,3$	3,3 $\pm 0,6$	9,4 $\pm 4,87$	7,6 $\pm 3,16$

Tabelle 3.5-3 Relative Zinkaufnahme: Die zellulären Konzentrationen des Zinks der einzelnen Stämme im EMM- und YE-Medium sind als Prozent der jeweiligen für die Streßapplikation eingesetzten Konzentration c' im Medium (siehe Tabelle 3.2-1) angegeben.

Generell nehmen alle im YE-Medium angezogenen Stämme etwa das Doppelte an Zink in die Zelle auf. Dieses konnte selbst für Δzhf und $\Delta zhf \Delta zym1$ gezeigt werden. Diese Mutanten sind zinksensitiv und zeigen eine stark eingeschränkte Zinkaufnahme in beiden Medien. Sie weisen nur 1/10 der Aufnahme auf, die für den Wildtyp gezeigt wurde.

3.6. Untersuchungen zur Elementzusammensetzung in Wildtyp und $\Delta zym1$

Neben der Aufnahme von Cadmium, Kupfer und Zink sollten auch die Konzentrationen weiterer Elemente, wie Kalzium, Eisen, Mangan, Magnesium, Kalium, Schwefel und Phosphor, untersucht werden. Mögliche Unterschiede in der Elementzusammensetzung könnten Hinweise auf eine Funktion des Metallothioneins aus *S. pombe* liefern und somit das unterschiedliche Wachstumsverhalten erklären. Die Kulturen von Wildtyp und $\Delta zym1$ wurden analog zu 2.5.12 aufgearbeitet und die Konzentration der Elemente mittels ICP-AES bestimmt.

Die größten Konzentrationsunterschiede zwischen Wildtyp und $\Delta zym1$ waren für Kalzium zu verzeichnen (Abb. 3.6-1). Unter Kontrollbedingungen sowie nach Cadmium- und Zinkbehandlung konnten keine signifikanten Unterschiede in der Kalziumkonzentration zwischen beiden Stämmen im EMM- als auch YE-Medium gezeigt werden. Eine drastische Erhöhung des Kalziumgehalts ist in den kupferbehandelten Wildtypkulturen in beiden Medien zu verzeichnen. Der Gehalt an Kalzium steigt im Vergleich zur Kontrolle um das Zwei- bis Vierfache im YE- bzw. EMM-Medium. Für die MT *knock-out* Mutante konnte keine erhöhte Kalziumkonzentration nachgewiesen werden. Der Kalziumgehalt bleibt auch in den kupferbehandelten Kulturen auf Kontrollniveau. Die Kalziumkonzentrationen des $\Delta zym1$ nach Kupferzugabe sind etwa fünffach geringer als im Wildtyp.

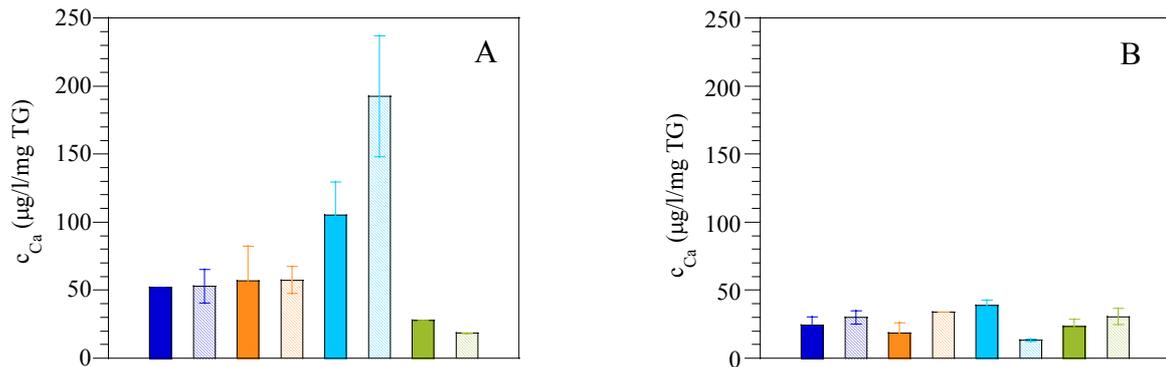


Abb. 3.6-1 Kalziumkonzentrationen in Wildtyp und MT *knock-out* Mutante: Kulturen des Wildtyps (A) und $\Delta zymI$ (B) wurden im EMM- bzw. YE-Medium (siehe Legende) bis zu einer optischen Dichte von 0,6 – 0,8 wachsen gelassen. Anschließend wurden sie mit den einzelnen Metalle unter Berücksichtigung der ermittelten IC₅₀-Werte (Tabelle 3.2-1) für zwei Stunden behandelt. Die Bestimmung der Kalziumkonzentrationen erfolgte mittels ICP-AES. (n = 2)



Für andere Elemente konnten keine drastischen Unterschiede zwischen Wildtyp und $\Delta zymI$ gezeigt werden (Abb 3.6-2). Die Konzentrationen aller untersuchten Elemente sind in Tabelle 3.6-1 und Tabelle 3.6-2 zusammengefasst.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede sowohl zwischen den Medien als auch zwischen den beiden untersuchten Stämmen für Magnesium, Kalium, Phosphor und Schwefel ermittelt werden. Die gesteigerte Zinkaufnahme des Wildtyps wurde bereits unter 3.5 gezeigt. Ein leicht erhöhter Eisengehalt ist für $\Delta zymI$ nach Metallzugabe zu erkennen. Dieser Anstieg konnte im Wildtyp nicht gezeigt werden. Eine geringe medienabhängige Variabilität konnte auch für Mangan ermittelt werden. Dieses wird in höheren Konzentrationen in dem im EMM-Medium angezogenem MT *knock-out* akkumuliert. Eine Ausnahme bildet hier die zinkbehandelte Kultur. Hier ergibt sich kein Unterschied zum Wildtyp.

	Kontrolle		Cd-Zugabe		Cu-Zugabe		Zn-Zugabe	
	YE	EMM	YE	EMM	YE	EMM	YE	EMM
Fe ($\mu\text{g/l/mg TG}$)	8,6 $\pm 1,92$	3,9 $\pm 0,04$	6,8 $\pm 0,44$	2,9 $\pm 0,64$	7,4 $\pm 0,16$	5,6 $\pm 2,44$	7,5 $\pm 1,68$	5,5 $\pm 0,63$
Mn ($\mu\text{g/l/mg TG}$)	4,0 $\pm 2,69$	3,3 $\pm 1,72$	2,1 $\pm 0,19$	4,9 $\pm 0,16$	1,74 $\pm 0,1$	5,4 $\pm 2,37$	2,0 $\pm 0,1$	4,84 $\pm 0,04$
Mg (mg/l/mg TG)	0,68 $\pm 0,05$	0,63 $\pm 0,03$	0,7 $\pm 0,17$	0,77 $\pm 0,08$	0,47 $\pm 0,06$	0,67 $\pm 0,24$	0,68 $\pm 0,14$	0,89 $\pm 0,04$
K (mg/l/mg TG)	2,8 $\pm 0,33$	3,0 $\pm 0,2$	3,0 $\pm 0,3$	3,0 $\pm 0,03$	2,2 $\pm 0,56$	3,1 $\pm 0,24$	3,3 $\pm 0,43$	3,5 $\pm 0,33$
Ca ($\mu\text{g/l/mg TG}$)	52,1 $\pm 0,61$	52,8 $\pm 12,39$	56,7 $\pm 25,53$	57,3 $\pm 9,91$	105,3 ± 24	192,3 $\pm 44,33$	27,7 $\pm 0,25$	18,3 $\pm 0,39$
P (mg/l/mg TG)	5,2 $\pm 0,73$	5,1 $\pm 0,66$	5,4 $\pm 1,17$	5,3 $\pm 0,1$	5,0 $\pm 0,34$	6,1 $\pm 0,48$	6,3 $\pm 0,46$	5,8 $\pm 0,92$
S (mg/l/mg TG)	0,71 $\pm 0,22$	0,78 $\pm 0,34$	0,75 $\pm 0,04$	0,77 $\pm 0,004$	1,08 $\pm 0,17$	0,53 $\pm 0,07$	0,7 $\pm 0,01$	0,2 $\pm 0,002$
Cd ($\mu\text{g/l/mg TG}$)	0	0	72,6 $\pm 10,29$	55,8 $\pm 6,02$	0	0	0	0
Cu ($\mu\text{g/l/mg TG}$)	3,8 $\pm 0,15$	5,3 $\pm 1,2$	2,3 $\pm 0,94$	4,2 $\pm 0,84$	446,7 $\pm 50,7$	107,6 $\pm 43,2$	3,9 $\pm 0,66$	5,1 $\pm 1,01$
Zn ($\mu\text{g/l/mg TG}$)	197,5 $\pm 10,45$	75,4 $\pm 7,29$	243,1 $\pm 27,34$	62,5 $\pm 6,23$	156,4 $\pm 27,43$	53,1 $\pm 17,0$	811,7 $\pm 115,4$	314,3 $\pm 74,5$

Tabelle 3.6-1 Elementkonzentrationen des Wildtyps

	Kontrolle		Cd-Zugabe		Cu-Zugabe		Zn-Zugabe	
	YE	EMM	YE	EMM	YE	EMM	YE	EMM
Fe ($\mu\text{g/l/mg TG}$)	6,9 $\pm 0,4$	7,3 $\pm 5,15$	14,5 $\pm 5,67$	14,1 $\pm 5,7$	11,8 $\pm 0,99$	9,6 $\pm 2,12$	11,1 $\pm 3,66$	15,9 $\pm 0,73$
Mn ($\mu\text{g/l/mg TG}$)	2,0 $\pm 0,12$	8,9 $\pm 2,93$	2,1 $\pm 0,16$	8,8 $\pm 3,02$	1,8 $\pm 0,05$	8,2 $\pm 3,59$	5,3 $\pm 2,92$	5,6 $\pm 2,26$
Mg (mg/l/mg TG)	0,75 $\pm 0,09$	0,71 $\pm 0,33$	0,77 $\pm 0,29$	0,75 $\pm 0,31$	0,61 $\pm 0,14$	0,9 $\pm 0,05$	0,97 $\pm 0,17$	1,02 $\pm 0,09$
K (mg/l/mg TG)	3,42 $\pm 0,08$	3,2 $\pm 1,61$	3,5 $\pm 1,0$	3,2 $\pm 0,45$	1,8 $\pm 0,37$	2,9 $\pm 0,13$	4,6 ± 1	3,6 $\pm 0,8$
Ca ($\mu\text{g/l/mg TG}$)	24,4 $\pm 5,87$	30 $\pm 4,71$	18,4 $\pm 7,46$	33,8 $\pm 0,2$	38,9 $\pm 3,89$	13,3 $\pm 1,01$	23,5 $\pm 5,03$	30,5 ± 6
P (mg/l/mg TG)	5,43 $\pm 0,17$	4,74 $\pm 1,69$	4,83 $\pm 0,86$	5,55 $\pm 0,77$	6,18 $\pm 0,79$	6,7 $\pm 0,22$	5,76 $\pm 0,55$	5,77 $\pm 1,23$
S (mg/l/mg TG)	0,4 $\pm 0,01$	0,5 $\pm 0,09$	0,72 $\pm 0,05$	0,86 $\pm 0,07$	0,88 $\pm 0,001$	0,3 $\pm 0,005$	0,53 $\pm 0,03$	0,2 $\pm 0,001$
Cd ($\mu\text{g/l/mg TG}$)	0	0	61,3 $\pm 3,57$	79,8 $\pm 23,2$	0	0	0	0
Cu ($\mu\text{g/l/mg TG}$)	2,0 $\pm 0,19$	8,1 $\pm 0,02$	4,5 $\pm 0,68$	10,5 $\pm 3,11$	551,0 $\pm 75,3$	236,2 $\pm 10,49$	4,84 $\pm 0,14$	6,7 $\pm 0,93$
Zn ($\mu\text{g/l/mg TG}$)	181,7 $\pm 16,28$	111,1 $\pm 11,61$	176,9 $\pm 8,61$	92,3 $\pm 15,18$	126,9 $\pm 5,56$	82,1 $\pm 10,05$	365,3 $\pm 42,67$	274,2 $\pm 5,64$

Tabelle 3.6-2 Elementkonzentrationen der ΔzymI Mutante

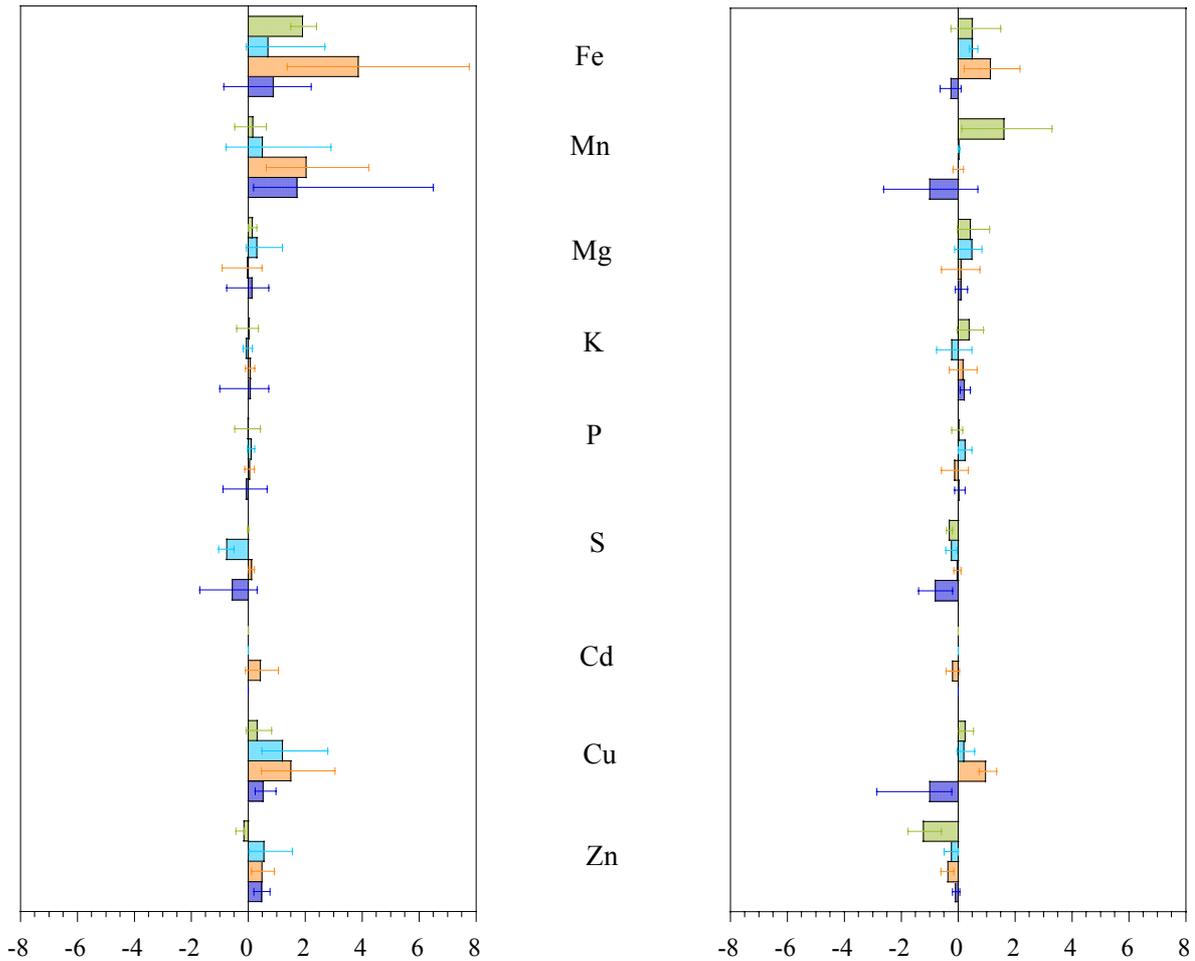


Abb. 3.6-2 Graphische Darstellung der Elementzusammensetzung: Der Wildtyp und die *zym1 knock-out* Mutante wurde im EMM- (A) bzw. im YE-Medium (B) angezogen. Die Konzentrationen der einzelnen Elemente im $\Delta zym1$ Stamm sind als x-faches der Konzentrationen, die für den Wildtyp bestimmt wurden, angegeben. Dabei stellen die positiven Werte eine x-fach erhöhte und die negativen Werte eine x-fach geringere Elementkonzentration in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp dar. (n = 2)



Um die Daten der Hefekulturen besser vergleichen und mögliche limitierende Faktoren in den einzelnen Medien aufzeigen zu können, wurden auch die Elementkonzentrationen in den beiden Medien bestimmt.

	Fe ($\mu\text{g/l}$)	Mn ($\mu\text{g/l}$)	Mg (mg/l)	K (mg/l)	Ca (mg/l)	P (mg/l)	S (mg/l)	Cd ($\mu\text{g/l}$)	Cu ($\mu\text{g/l}$)	Zn (mg/l)
YE	364,3	8,6	1,9	123,7	11,7	31,1	23,4	4,2	116	1,4
EMM	57,3	216,5	95,5	868,8	6,1	312,4	9,6	1,3	62,4	0,3

Tabelle 3.6-3 Elementkonzentrationen im YE- und EMM-Medium: Die Konzentration der Elemente wurde durch ICP-AES bestimmt. (n = 2)

Nimmt man an, daß die Verfügbarkeit essentieller Ionen im EMM-Medium herabgesetzt ist, könnten das eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Wachstum der MT *knock-out* Stämme im Vergleich zu MT-Wildtypstämmen darstellen. Andererseits könnten unterschiedliche Konzentrationen an Schwefelverbindungen und Phosphaten Einfluß auf die Löslichkeit und Verfügbarkeit von Metallionen haben.

Die Konzentrationen der einzelnen Elemente im EMM- und YE-Medium unterscheiden sich grundsätzlich. Während im Komplexmedium Eisen in höherer Konzentration vorkommt, hat das EMM-Medium mehr Mangan, Magnesium, Kalium und Phosphor. Diese Unterschiede in den Konzentrationen lassen allerdings keine Rückschlüsse auf die Elementgehalte der *S. pombe* Stämme in den beiden Medien zu. Diese waren unabhängig von der Ausgangskonzentration im Medium. Besonders deutlich wurde diese Beobachtung für die Elemente Kalium, Phosphor und Magnesium. Obwohl die Konzentrationen dieser Elemente im YE-Medium circa zehnmal geringer als im EMM-Medium sind, konnten keine intrazellulären Konzentrationsunterschiede für die in den unterschiedlichen Medien angezogenen Kulturen ermittelt werden.

Es konnte zwar gezeigt werden, daß die Medienzusammensetzung keinen Einfluß auf die Akkumulation innerhalb der Zelle hat, dennoch können die großen Unterschiede in den Konzentrationen besonders von Schwefel und Phosphor extrazellulär Wirkung zeigen. Phosphat z. B. kann die Löslichkeit von Cadmium und Zink als CdPO_4 und ZnPO_4 erheblich herabsetzen. Schwefelhaltige Verbindungen sind als gute Chelatoren, z. B. Glutathion und Phytochelatine, beschrieben.

Zusätzlich zu den aufgezeigten Elementen wurde daher der GSH-Gehalt in beiden Medien ermittelt. Im EMM-Medium konnte kein GSH nachgewiesen werden. Die Konzentration im YE-Medium betrug $9,45 \pm 1,32$ mg/l. Damit ist circa die Hälfte des Schwefels im Glutathion gespeichert.

3.7. Einfluß von Glutathion auf das Wachstum

Da die unterschiedliche Elementzusammensetzung der beiden Medien keinen Einfluß auf die intrazellulären Elementkonzentrationen von Wildtyp und Δzyl1 hat, ist auszuschließen, daß die untersuchten Elemente das unterschiedliche Wachstums- und Toleranzverhalten des Wildtyps und der MT *knock-out* Mutante verursachen. Daher sollten andere Komponenten der Medien untersucht werden. Besonders interessant erschien, daß GSH nur im YE-Medium mit einer Konzentration von etwa 10 mg/l nachgewiesen werden konnte. Glutathion ist sowohl als Schwermetallchelator als auch als Antioxidanz beschrieben. Beide Eigenschaften könnten

einen Wachstumsvorteil bzw. eine gesteigerte Toleranz gegenüber Schwermetallen hervorrufen. Um zu überprüfen, ob Glutathion in der Lage ist, die Sensitivität gegenüber Schwermetallionen zu vermindern bzw. positiv auf das Wachstum der Hefen wirkt, wurden 10 mg/l GSH zum EMM-Medium gegeben.

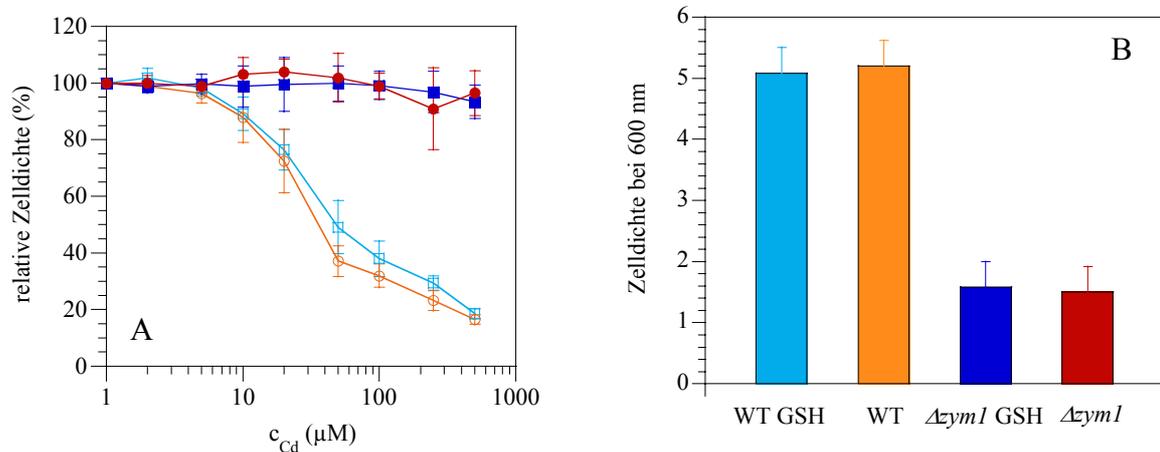


Abb. 3.7-1 Einfluß von GSH auf das Wachstum: Kulturen des *S. pombe* Wildtyp und der MT *knock-out* Mutante wurden im modifizierten EMM-Medium (EMM + 10 mg/l GSH) auf eine optische Dichte von 0,1 eingestellt und entweder mit Cadmium behandelt (A) oder ohne Metallzugabe (B) für 18 – 20 Stunden bei 30 °C und 150 rpm wachsen gelassen. Anschließend wurde die Zelldichte bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. (n = 3)



Die Zugabe von Glutathion beeinflusst die Toleranz des Wildtyps gegenüber Cadmium nur marginal (Abb. 3.7-1A). Eine geringe, aber nicht signifikante Toleranzsteigerung war bei Cadmiumkonzentrationen, die höher als 50 μM $CdCl_2$ waren, zu verzeichnen. Das Wachstum der $\Delta zym1$ Mutante im EMM-Medium mit und ohne Glutathion zeigte keine Unterschiede. Ein vergleichbares Wachstum wurde auch für die unbehandelten *S. pombe* Stämme erhalten (Abb. 3.7-1B). Glutathion hat keinen Einfluß auf das Wachstum unter Normalbedingungen. Auch im EMM-Medium mit Glutathion ist das Wachstum der MT *knock-out* Mutante um zwei Drittel reduziert.

3.8. Bestimmung der Phytochelatingehalte

Das Vorhandensein eines externen Chelators, wie Glutathion, konnte nicht als Ursache für das unterschiedliche Wachstums- und Toleranzverhalten des MT *knock-out* Stammes in Abhängigkeit vom Medium herangezogen werden. Daher sollte untersucht werden, ob die Konzentration von internen Chelatoren Auswirkungen auf das Wachstum und die Toleranz von Wildtyp und $\Delta zym1$ hat. In *S. pombe* stellen die Phytochelatine eine wichtigen Chelator

für Cadmium und auch Kupfer dar. Das Inaktivieren der Phytochelatinsynthese geht daher auch mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber Cadmium und Kupfer einher (Clemens *et al.*, 1999). Auch für die Hefe *C. glabrata* wurden PC als wichtige Cd-Chelatoren beschrieben. Kupfer wird jedoch durch Metallothioneine gebunden (Mehra *et al.*, 1988). Auch in *S. pombe* sind beide Chelatoren parallel vertreten. Es sollte daher zum einen untersucht werden, welche Auswirkungen die Inaktivierung des Zym1 auf die PC-Bildung hat. Diese Untersuchungen wurden besonders unter Berücksichtigung der Erkenntnisse, daß nicht nur „freie“ Metallionen, sofern sie innerhalb einer Zelle überhaupt vorkommen, sondern auch Metallthiolate an der Aktivierung der PCS beteiligt sind, vorgenommen (Vatamaniuk *et al.*, 2000). Neben Metall-Bisglutathionatkomplexen konnten auch Thiolate, die keine Substrate der PCS darstellen, eine Aktivierung dieser Enzyme bewirken (Oven *et al.*, 2002). Es sollte daher überprüft werden, ob auch Zym1 an der Aktivierung der Phytochelatinsynthese aus *S. pombe* beteiligt ist. Andererseits sollte überprüft werden, ob die PC-Bildung in den einzelnen Stämmen und Medien mit der Aufnahme von Cadmium und Kupfer korreliert und somit als indirekter Beweis für die Ionenaufnahme fungieren kann. Unterschiede in der PC-Bildung könnten Aufschluß über Defekte, z. B. im Schwefelstoffwechsel, geben

Die einzelnen *S. pombe* Stämme wurden in der logarithmischen Phase gemäß ihrer IC_{50} -Werte mit Cadmium und Kupfer behandelt (siehe Tabelle 3.2-1). Die derivatisierten Extrakte wurden, wie unter 2.5.7 und 2.5.8 beschrieben, erhalten und für die Umkehrphasen-HPLC eingesetzt (2.5.9). Zur Identifizierung von Glutathion, PC2 und PC3 wurden entsprechende Standards synthetisiert und die Retentionszeiten der jeweiligen Verbindung ermittelt.

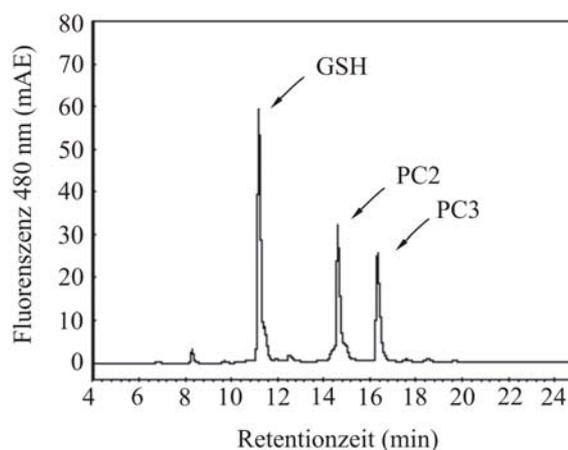


Abb. 3.8-1 Chromatogramm der Glutathion- (GSH-), PC2- und PC3-Standards: Die Thiolverbindungen wurden mit Monobrombiman konjugiert und mittels Umkehrphasen-HPLC getrennt. Die Anregung der derivatisierten Verbindungen erfolgte bei 380 nm, die Fluoreszenzdetektion der SH-Verbindungen bei 480 nm.

Die Derivatisierung von Thiolverbindungen mit Monobrombiman und ihre anschließende Detektion über Fluoreszenz ist eine geeignete und sensitive Methode für den Nachweis von Glutathion und Phytochelatinen. Im Chromatogramm (Abb. 3.8-1) sind deutlich GSH, PC2 und PC3 bei Retentionszeiten von ca. 11, 15 und 17 Minuten zu erkennen. Eine Quantifizierung der Phytochelatingehalte konnte über die Integrale der Peakflächen vorgenommen werden.

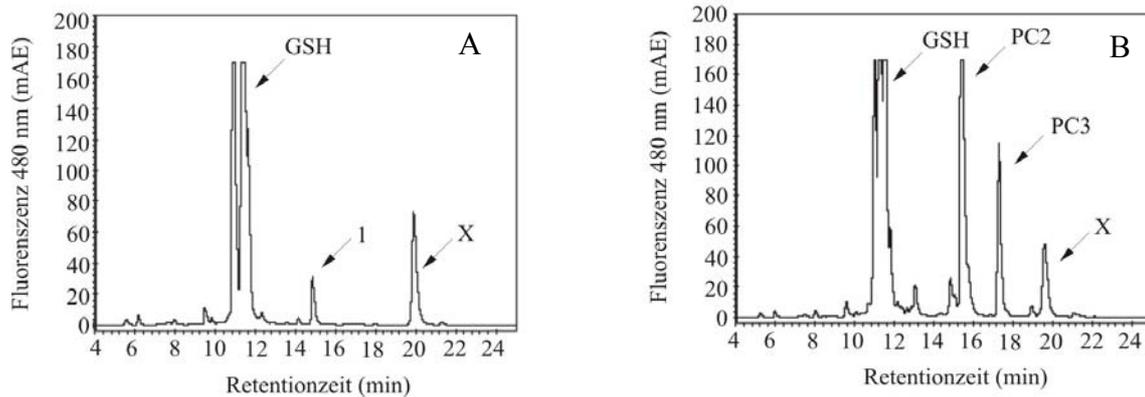


Abb. 3.8-2 Chromatogramm von *S. pombe* Wildtypextrakten: Die Proteinextrakte von unbehandelten (A) und mit 30 μM CdCl_2 (B) behandelten *S. pombe* Wildtypkulturen wurden mit Monobrombiman derivatisiert und mittels Umkehrphasen-HPLC getrennt. Die Anregung der derivatisierten Verbindungen erfolgte bei 380 nm, die Fluoreszenzdetektion der SH-Verbindungen bei 480 nm.

In der Abb. 3.8-2 ist deutlich zu erkennen, daß die Phytochelatinsynthese Metallionen für ihre Aktivierung benötigt. Während in den Kontrollextrakte (Abb. 3.8-2A) keine PCS vermittelte Synthese von PC2 bzw. PC3 zu beobachten ist, konnte in der mit 30 μM CdCl_2 behandelten Probe sowohl PC2 als auch PC3 detektiert werden (Abb. 3.8-2B). Die Retentionszeiten stimmen mit denen der synthetisierten Standards überein. Die Identität des Peaks bei ca. 15 Minuten in der Kontrollprobe (Peak 1) ist nicht geklärt. Er konnte bei fast allen unbehandelten Proben wie auch in den Extrakten von PCS *knock-out* Stämmen gezeigt werden. Da hier eine PC-Synthese durch die PCS ausgeschlossen werden kann, wird dieser Peak als *background*-Peak betrachtet. Da trotzdem nicht ausgeschlossen werden kann, daß es sich hierbei um PC handelt, werden die Integrale dieser Peaks in die Auswertung mit einbezogen.

Der in der unbehandelten und mit Cadmium behandelten Probe detektierte Peak X konnte als Monobrombimanderivat identifiziert werden.

3.8.1. Phytochelatinsynthese im EMM-Medium

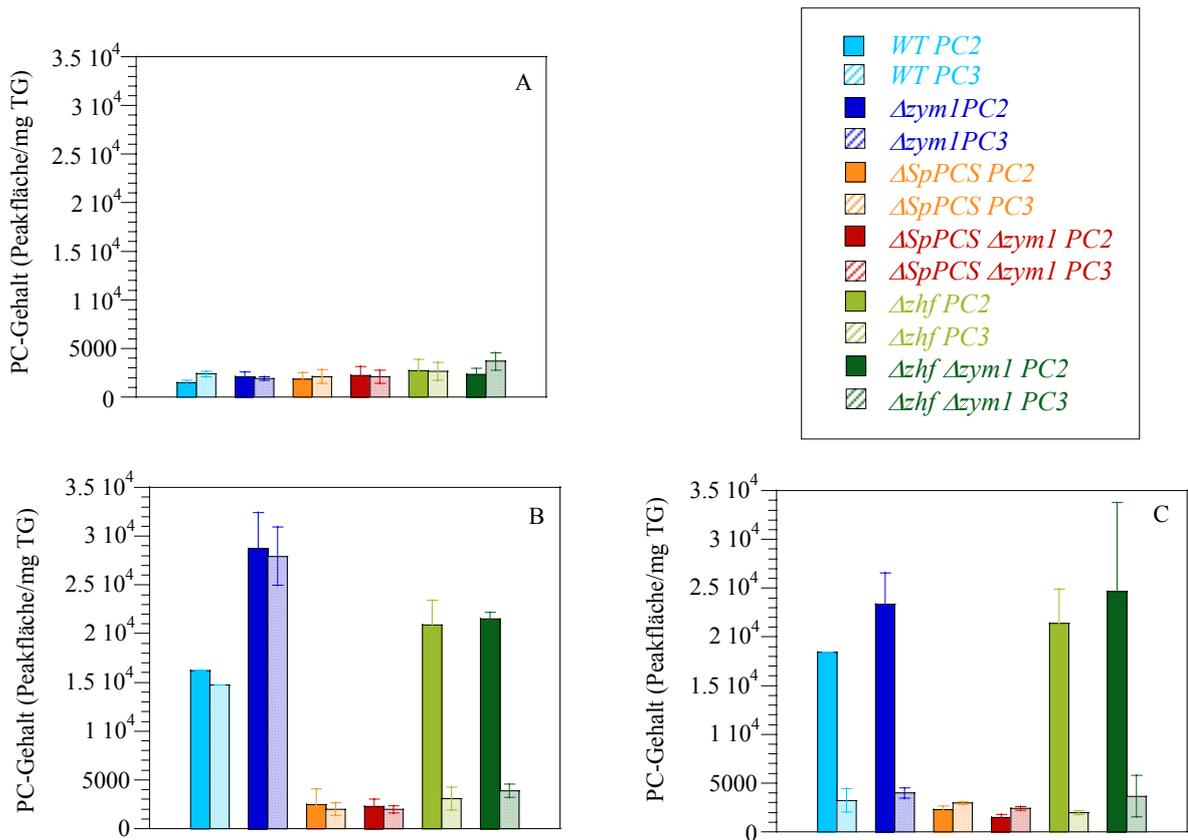


Abb. 3.8-3 PC2 und PC3-Gehalt der *S. pombe* Stämme im EMM-Medium: Die verschiedenen *S. pombe* Stämme wurden bis in die frühe logarithmische Wachstumsphase im EMM-Medium wachsen gelassen und für zwei weitere Stunden ohne Metallzugabe (A), mit Cadmium (B) oder mit Kupfer (C) inkubiert. Dabei wurden die einzelnen Stämme mit den für sie ermittelten IC_{50} -Werten behandelt (Tabelle 3.2-1). Die Proteinextrakte wurden mit Monobrombiman derivatisiert. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte nach der Umkehrphasen-HPLC bei einer Wellenlänge von 480 nm, wobei bei 380 nm angeregt wurde. (n = 2)

Für alle Stämme konnte auch in den nicht mit Metall behandelten Proben Peaks detektiert werden, die mit den ermittelten Retentionszeiten der PC übereinstimmten (Abb. 3.8-2A).

Eine deutlich gesteigerte PC-Bildung konnte für Wildtyp, $\Delta zym1$, Δzhf und $\Delta zhf \Delta zym1$ nach Cadmium- und Kupferzugabe gezeigt werden (Abb. 3.8-2B und Abb. 3.8-2C). Für beide PCS *knock-out* Stämme konnte auch hier nur das Hintergrundlevel an thiolhaltigen Verbindungen detektiert werden.

$\Delta zym1$ zeigte im Gegensatz zum Wildtyp eine um den Faktor zwei gesteigerte Synthese von PC2 und PC3 nach Cadmiumzugabe. Berücksichtigt man aber hier die unterschiedlichen Cadmiumkonzentrationen, die zu den jeweiligen Stämmen zugegeben wurden, und zieht die unter Kapitel 3.5.2 durchgeführten Untersuchungen hinzu, so korreliert diese Zunahme mit der erhöhten Cadmiumaufnahme der $\Delta zym1$ Mutante im EMM-Medium. Für die Stämme

Δzhf und $\Delta zhf \Delta zym1$ wurden vergleichbare Konzentrationen von PC2 und PC3 ermittelt. Allerdings zeigten diese Stämme eine sehr geringe PC3-Bildung.

Für die kupferbehandelten Kulturen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der PC-Bildung. In diesem Fall zeigt $\Delta zym1$ keine gesteigerte Syntheseleistung im Vergleich zum Wildtyp. Die Aktivität der PCS nach Kupferzugabe ist generell geringer. Der Gehalt an PC3 ist in allen vier Stämmen niedriger als nach Cadmiumbehandlung.

3.8.2. Phytochelatinsynthese im YE-Medium

Auch in den im YE-Medium angezogenen Kulturen ist die PCS ohne die Zugabe von Schwermetallionen inaktiv. Aber auch konnten *background*-Peaks detektiert werden (Abb. 3.8-4A).

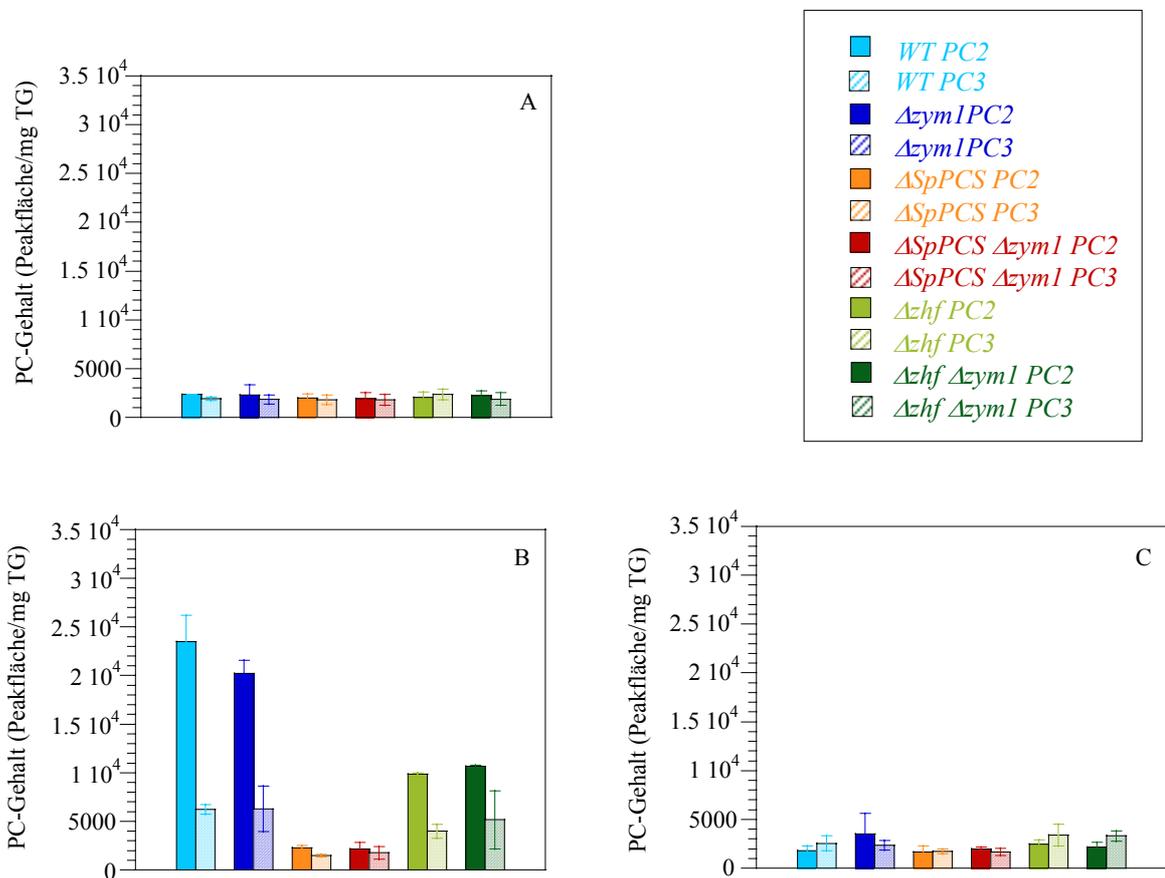


Abb. 3.8-4 PC2 und PC3-Gehalt der *S. pombe* Stämme im YE-Medium: Die verschiedenen *S. pombe* Stämme wurden bis in die frühe logarithmische Wachstumsphase im YE-Medium wachsen gelassen und für zwei weitere Stunden ohne Metallzugabe (A), mit Cadmium (B) oder mit Kupfer (C) inkubiert. Dabei wurden die einzelnen Stämme mit den für sie ermittelten IC₅₀-Werten behandelt (Tabelle 3.2-1). Die Proteinextrakte wurden mit Monobrombiman derivatisiert. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte nach der Umkehrphasen-HPLC bei einer Wellenlänge von 480 nm, wobei bei 380 nm angeregt wurde. (n = 2)

Eine Aktivierung der PCS war nur nach Cadmiumzugabe möglich (Abb. 3.8-4B). Hierbei wiesen Wildtyp und $\Delta zym1$ bzw. Δzhf und $\Delta zhf \Delta zym1$ eine vergleichbare Syntheserate von

PC2 und PC3 auf. Die PC3-Konzentrationen waren im Gegensatz zum EMM-Medium im Wildtyp und $\Delta zym1$ reduziert.

In den kupferbehandelten Kulturen konnte generell keine PC-Synthese beobachtet werden. Die Konzentration der Phytochelatine blieb unverändert zur unbehandelten Kontrolle.

3.9. Lokalisierung von Zym1

Schwermetallionen, die in die Zelle transportiert werden, werden sofort durch zytosolische Chelatoren komplexiert, wie durch die Arbeiten von Rae und Outten bestätigt wurde. Hier konnten weder freies Kupfer noch Zink in Mikroorganismen nachgewiesen werden (Rae *et al.*, 1999); (Outten & O'Halloran, 2001). Allerdings werden Schwermetalle beispielsweise als Metall-Kofaktoren für viele Enzyme benötigt. Es muß daher Komponenten geben, die Schwermetallionen binden und diese zu bestimmten Kompartimenten der Zelle bzw. zu definierten Proteinen transportieren können. Für Kupfer sind hierfür Metallochaperone beschrieben (siehe 1.6). Für Metallothioneine konnte sowohl die Bindung von essentiellen Metallen, wie Zink und Kupfer, als auch Translokationen zum Zellkern oder den Mitochondrien gezeigt werden (Beyersmann & Haase, 2001); (Ye *et al.*, 2001). Daher sollte untersucht werden, ob auch Zym1 neben dem Zytosol in anderen Zellkompartimenten nachgewiesen werden kann. Die Detektion des Zym1 außerhalb des Zytosols könnte auf eine Funktion des MT in der Schwermetallionenverteilung innerhalb der Zelle schließen lassen.

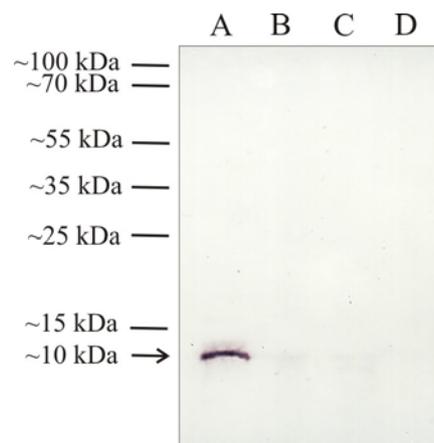


Abb. 3.9-1 Lokalisierung des Zym1-HA durch Western-Blotanalyse: Nach der Proteinextraktion und differentieller Zentrifugation wurden etwa 4 µg Protein auf das 14 %ige Shagger-Proteingel geladen. Dabei entsprechen die *Lanes* folgenden Proteinfractionen: **A)** zytosolische Fraktion und **B)** mikrosomale Fraktion des mit pSLF172/*zym1* transformierten *FY261 Δzym1*; **C)** zytosolische Fraktion und **D)** mikrosomale Fraktion des mit pSLF172 transformierten *FY261 Δzym1*. Die Detektion des Zym1-HA erfolgte durch Western-Blot mit einem HA-Antikörper.

Für die zelluläre Lokalisierung von Zym1 wurde die kodierende Gensequenz in pSLF172 kloniert und mit einem Hämagglutinin-Tag (HA-Tag) fusioniert. Die Transformation von pSLF172/*zym1* erfolgte in *FY261 Δzym1*.

Die Lokalisierung des Metallothioneins aus *S. pombe* konnte eindeutig als zytosolisch nachgewiesen werden (Abb. 3.9-1). Ein Signal in der mikrosomalen Fraktion konnte nicht gezeigt werden. Ebenfalls negativ war die Detektion eines Signals der Vektorkontrolle. Eine Kreuzreaktion des monoklonalen HA-Antikörpers mit anderen Proteinen aus *S. pombe* konnte ausgeschlossen werden.

3.10. Metallbindung des Zym1

Schwermetallionen haben eine große Affinität zu Thiolgruppen. Daher stellen thiolhaltige Chelatoren, wie Phytochelatine und Metallothioneine potentielle Bindungspartner für Zink, Cadmium und Kupfer dar. Etwa ein Drittel aller AS im MT sind Cysteine, die in Cys-X-Cys Clustern zusammengefaßt sind. MT wurden daher in vielen Organismen als metallbindende Proteine charakterisiert. Dabei wurden für die tierischen Organismen von Invertebraten bis Vertebraten hauptsächlich Cadmium- und Zinkbindung nachgewiesen (Stürzenbaum *et al.*, 2001); (Shaw *et al.*, 1991). Für alle bisher untersuchten Hefe-Metallothioneine, wie Cup1 aus *S. cerevisiae* oder MT-I und MT-II aus *C. glabrata*, wurde Kupferbindung gezeigt (Hamer *et al.*, 1985); (Mehra *et al.*, 1988). Um so überraschender war das Ergebnis der Arbeitsgruppe um Borrelly *et al.*, die Zinkbindung, aber keine Kupferbindung für Zym1 mittels eines spektrophotometrischen Tests nachwies (Borrelly *et al.*, 2002). In Hinblick auf die Wachstumsuntersuchungen im YE-Medium, die zu keiner erhöhten Sensitivität der MT *knock-out* Mutanten nach Zink-, Cadmium- oder Kupferbehandlung führten, sollte die Metallbindung des Zym1 untersucht werden. Hierfür wurden *S. pombe* Wildtyp Kulturen bis in die frühe logarithmische Wachstumsphase wachsen gelassen und anschließend mit Cadmium, Kupfer und Zink, gemäß den in Tabelle 3.2-1 aufgezeigten IC₅₀-Wertkonzentrationen, für zwei Stunden behandelt. Die Proteinextraktion und -präzipitation erfolgte wie unter 2.5.1 und 2.5.10 beschrieben. 50 µl des auf eine Konzentration von 5 mg/ml eingestellten Proteinextraktes wurden für die Gelfiltration (siehe 2.5.11) genutzt. Der Metallgehalt der einzelnen Fraktionen wurde, wie unter 2.5.13 beschrieben, vermessen.

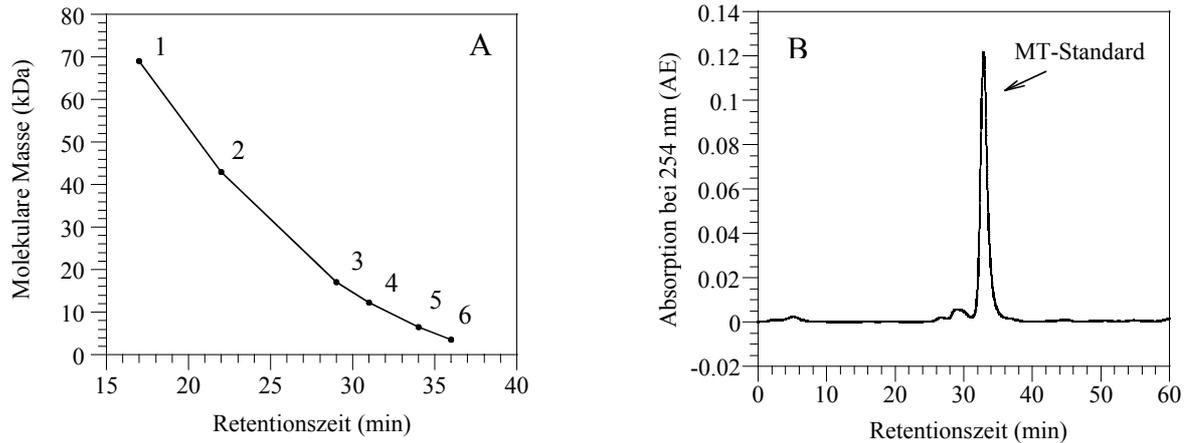
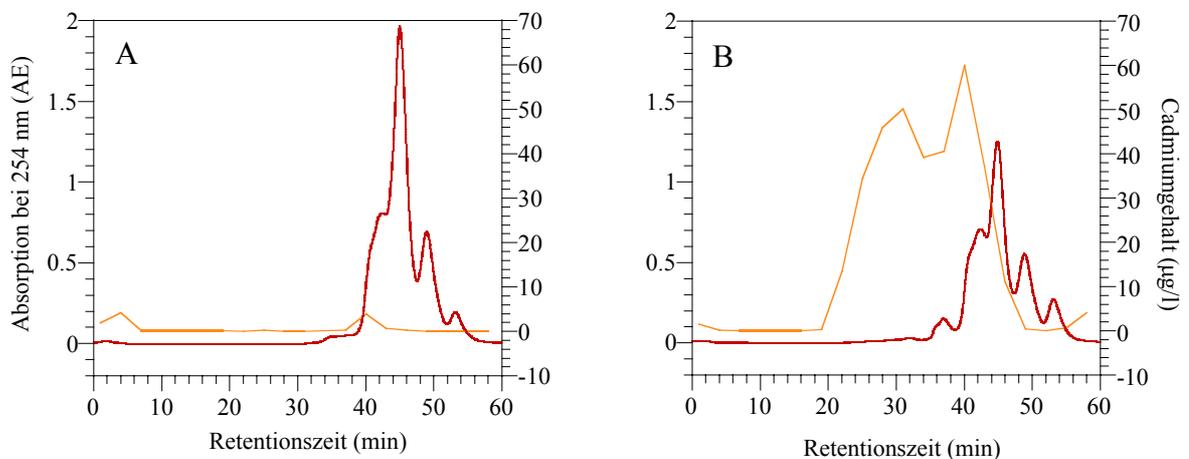


Abb. 3.10-1 Die Kalibrierung der Superdex 75: Die Kalibrierung erfolgte mit 300 μg eines Proteinstandardgemisches (A). Dieses bestand aus Humanem Serumalbumin (HSA) 69 kDa (1), Ovalbumin 43 kDa (2), Myoglobin 17 kDa (3), Cytochrom-c 12.3 kDa (4), Aprotinin 6.5 kDa (5), Insulin B 3.5 kDa (6). 100 μg eines Kaninchen MT-II-Standards wurden für die Gelfiltration genutzt (B). Die Elution erfolgte isokratisch mit 50 mM NH_4CO_3 , pH 8,0 und einem Fluß von 0,4 ml/min. Nach 34 min konnte ein Proteinpeak im Chromatogramm detektiert werden.

In der Abb. 3.10-1A ist die Kalibrierung der für die Gelfiltration verwendeten Superdex 75 gezeigt. Das Aprotinin und das Insulin mit Molekulargewichten von 6500 bzw. von 3500 wurde bei etwa 34 und 36 Minuten eluiert. Das 6 kDa schwere MT-II aus Kaninchen wurde bei circa 34 Minuten detektiert (Abb. 3.10-1B). Da Zym1 eine Molekulare Masse von 5,3 kDa besitzt, wird eine Detektion des Metallothioneins aus *S. pombe* bei einer Retentionszeit von ca. 34 Minuten erwartet.

3.10.1. Cadmiumbindungsstudien



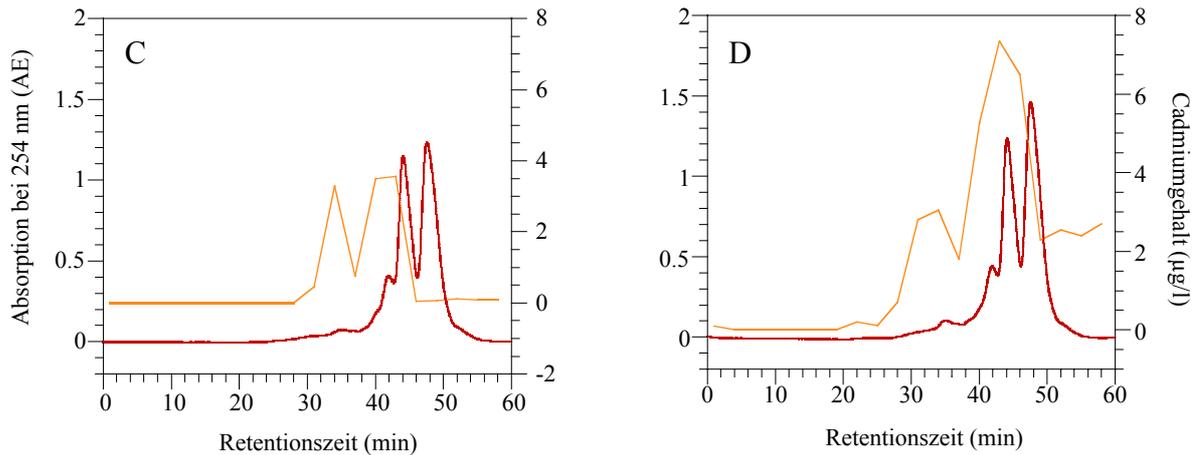


Abb. 3.10-2 Chromatogramm und Cd-Gehalt der Wildtypproben: Kulturen des *S. pombe* Wildtyps wurden im EMM- (A u. B) bzw. YE-Medium (C u. D) bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,6 – 0,8 bei 30 °C und 150 rpm wachsen gelassen. Zwei Stunden nach Zugabe von 30 μ M (B) bzw. 1 μ M (D) $CdCl_2$ wurden die Kulturen geerntet. Nach Proteinextraktion und –präzipitation wurden 250 μ g Protein für die Gelfiltration eingesetzt. Die Cadmiumkonzentrationen der einzelnen Fraktionen wurden über Atomabsorptionsspektroskopie ermittelt. Mit den unbehandelten Kontrollen (A u. C) wurde analog verfahren. (n = 2)



Für die cadmiumbehandelten Proben konnten weder für das EMM- noch für das YE-Medium Proteinpeaks bei circa 34 min detektiert werden. Cadmiumbindung erstreckte sich über ein großes Zeitintervall des Chromatogramms. So konnte Cadmium in Bereichen von etwa 40 kDa bis hin zu niedermolekularen Molekülen nachgewiesen werden. Im YE-Medium konnte im Vergleich zum EMM-Medium eine leichte Verschiebung des Cadmiumpeaks zu niedermolekularen Verbindungen beobachtet werden. Eine genaue Bestimmung dieser niedermolekularen Substanzen, wie beispielsweise Phytochelatine, Glutathion oder freier Aminosäuren, konnte mit der hier verwendeten Gelfiltrationssäule nicht vorgenommen werden.

Generell waren die Proteinextrakte aus den im EMM-Medium gewachsenen Kulturen stärker mit Cadmium angereichert. Diese waren auf Grund der höheren Toleranz allerdings auch mit der 30fachen Cadmiumkonzentration behandelt worden.

3.10.2. Zinkbindungsstudien

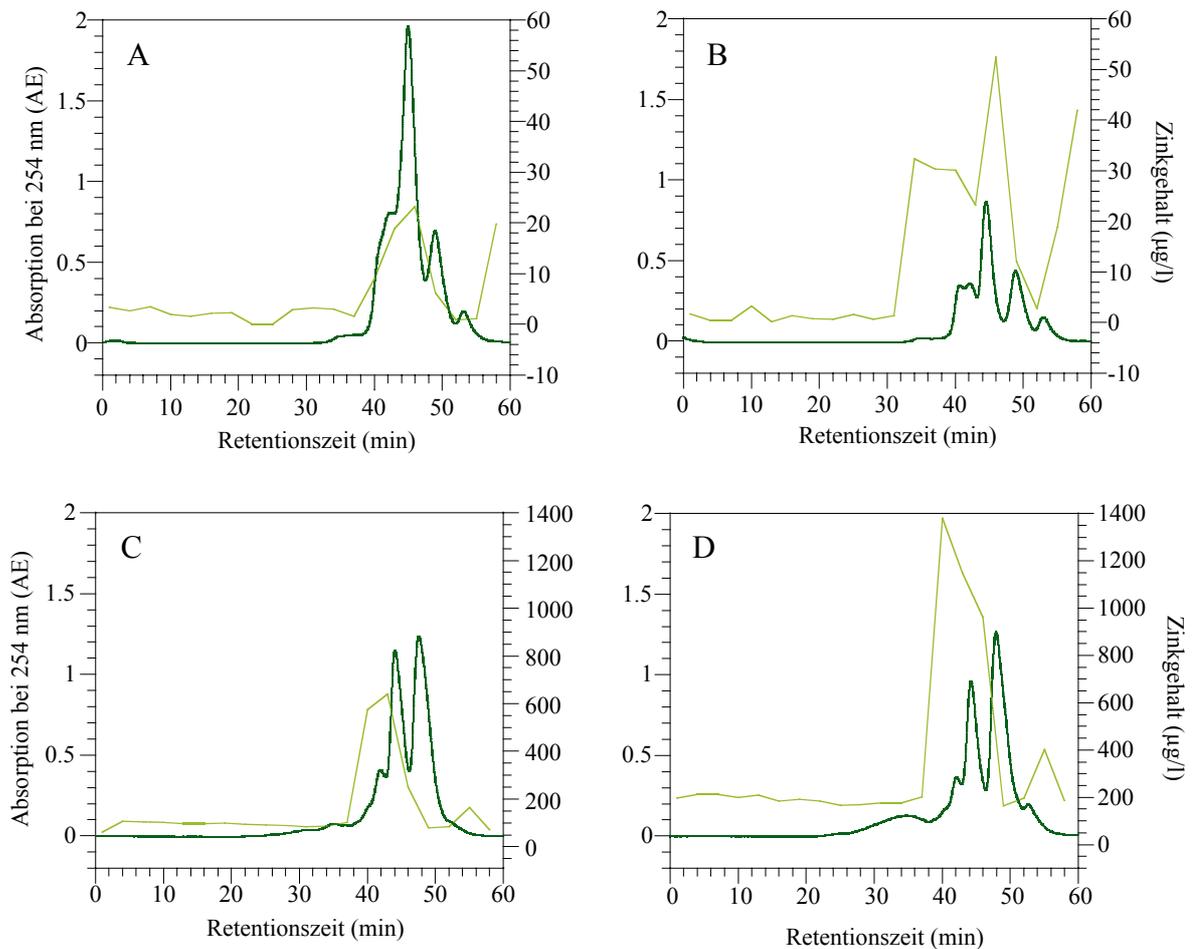
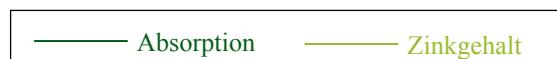


Abb. 3.10-3 Chromatogramm und Zn-Gehalt der Wildtypproben: Kulturen des *S. pombe* Wildtyps wurden im EMM- (A u. B) bzw. YE-Medium (C u. D) bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,6 – 0,8 bei 30 °C und 150 rpm wachsen gelassen. Zwei Stunden nach Zugabe von 500 µM (B) bzw. 300 µM (D) ZnCl₂ wurden die Kulturen geerntet. Nach Proteinextraktion und –präzipitation wurden 250 µg Protein für die Gelfiltration eingesetzt. Die Zinkkonzentrationen der einzelnen Fraktionen wurden über Atomabsorptionsspektroskopie ermittelt. Mit den unbehandelten Kontrollen (A u. C) wurde analog verfahren. (n = 2)



Auch für die mit Zink behandelten Kulturen beider Medien konnte weder das Auftreten eines Proteinpeaks noch Zinkbindung in der Fraktion bei 34 min gezeigt werden. Die Bindung des Zinks verhält sich ähnlich, wie es bereits für Cadmium beschrieben wurde. Der größte Teil des Zinks wird an niedermolekulare Verbindungen gebunden.

Obwohl die verwendeten Zinkkonzentrationen in beiden Medien etwa gleich waren, ergaben sich große Unterschiede in den Metallgehalten der einzelnen Proteinfractionen für das EMM- und YE-Medium. Teilweise konnte in den Fraktionen der Proteinextrakte der YE-Kulturen mehr als 25mal mehr Zink nachgewiesen werden.

3.10.3. Kupferbindungsstudien

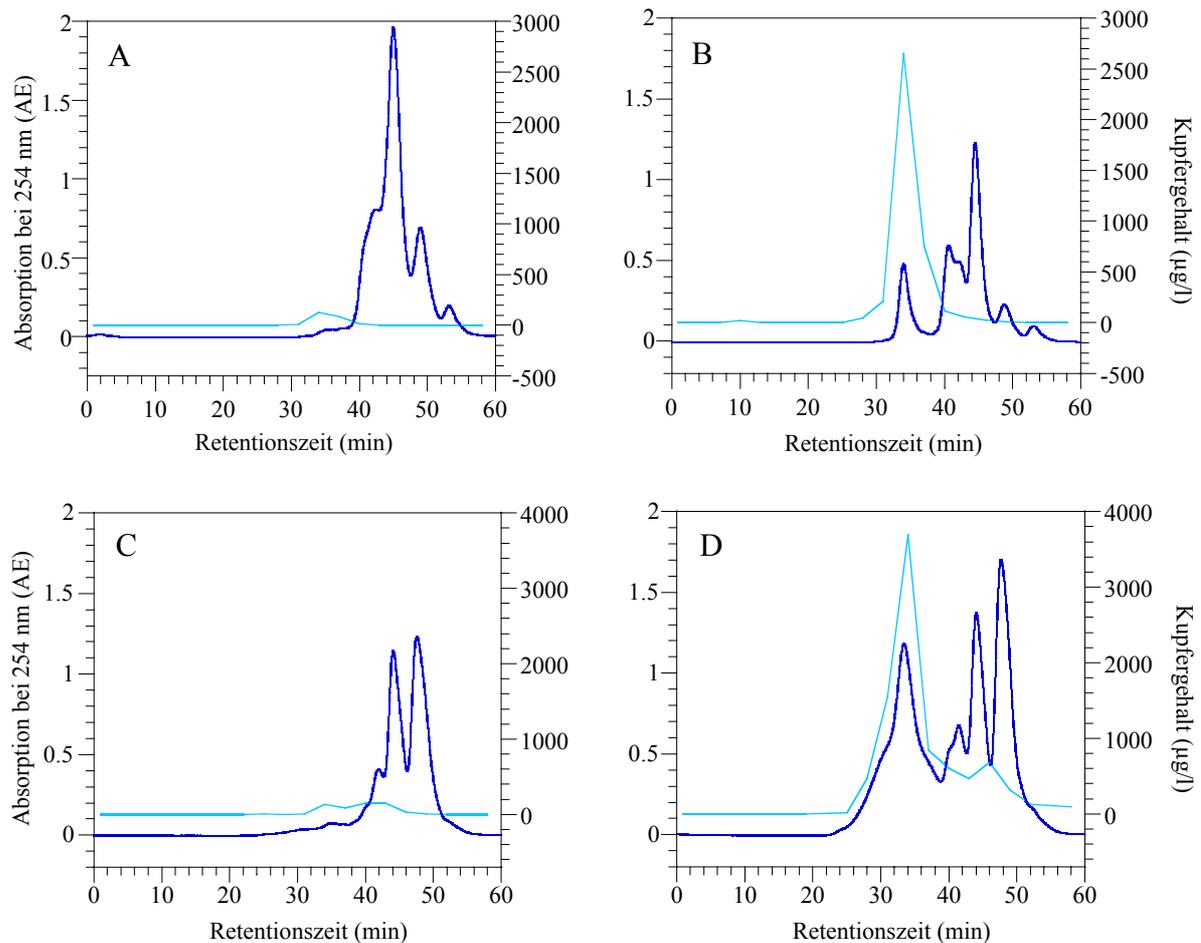


Abb. 3.10-4 Chromatogramm und Cu-Gehalt der Wildtypproben: Kulturen des *S. pombe* Wildtyps wurden im EMM- (A u. B) bzw. YE-Medium (C u. D) bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,6 – 0,8 bei 30 °C und 150 rpm wachsen gelassen. Zwei Stunden nach Zugabe von 15 μ M (B) bzw. 1 mM (D) $CuCl_2$ wurden die Kulturen geerntet. Nach Proteinextraktion und –präzipitation wurden 250 μ g Protein für die Gelfiltration eingesetzt. Die Kupferkonzentrationen der einzelnen Fraktionen wurden über Atomabsorptionsspektroskopie ermittelt. Mit den unbehandelten Kontrollen (A u. C) wurde analog verfahren. (n = 2)

— Absorption — Kupfergehalt

Die Proteinextrakte der mit Kupfer behandelten Wildtyp-Kulturen zeigten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle einen Proteinpeak bei etwa 34 min. Nahezu das gesamte Kupfer konnte in den dazugehörigen Proteinfraktionen nachgewiesen werden. Diese Kupferbindung wurde für beide Medium beobachtet.

Um auszuschließen, daß es sich bei dem durch Kupfer induzierten Peak um ein anderes Protein als Zym1 handelt, wurden auch die Proteinextrakte der $\Delta zym1$ Mutante untersucht.

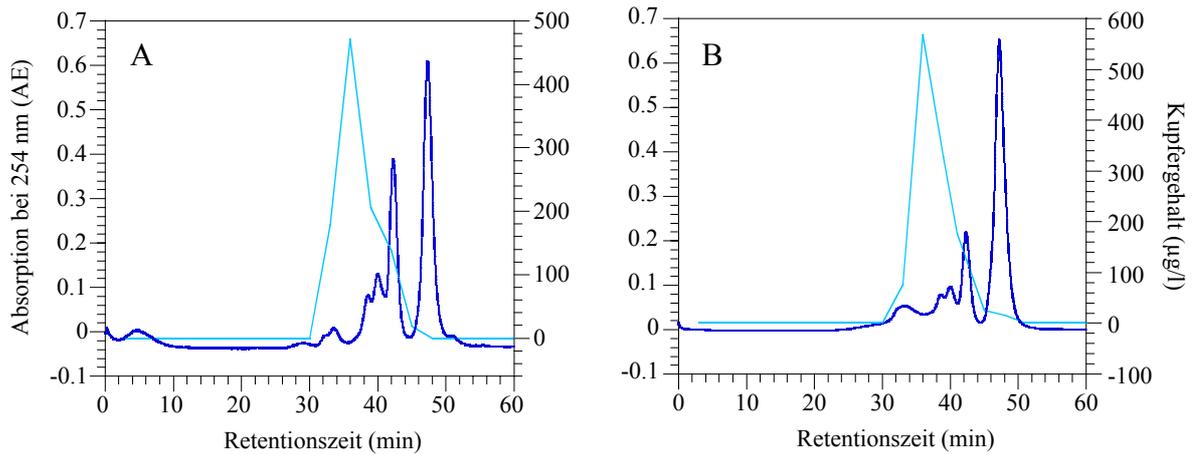


Abb. 3.10-5 Chromatogramm und Cu-Gehalt des MT *knock-out* Stammes: Kulturen des *S. pombe* MT *knock-out* wurden im EMM- (A) bzw. YE-Medium (B) bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,6 – 0,8 bei 30 °C und 150 rpm wachsen gelassen. Zwei Stunden nach Zugabe von 25 µM (A) bzw. 1 mM (B) $CuCl_2$ wurden die Kulturen geerntet. Nach Proteinextraktion und –präzipitation wurden 250 µg Protein für die Gelfiltration eingesetzt. Die Kupferkonzentrationen der einzelnen Fraktionen wurden über Atomabsorptionsspektroskopie ermittelt. (n = 2)



In den Kulturen des MT *knock-out* Stammes beider Medien konnte kein Peak bei 34 min detektiert werden. Allerdings konnte trotzdem auch hier nahezu das gesamte Kupfer in diesem Zeitintervall detektiert werden. Im Unterschied zu den Wildtypkulturen, bei denen Kupfer in den Fraktionen zwischen 28 bis 36 Minuten nachgewiesen wurde, erstreckte sich die Kupferbindung in $\Delta zym1$ von 28 bis 45 Minuten.

3.10.4. Metallbindungsstudien am rekombinanten Zym1

Für weiterführende Metallbindungsstudien wurde *zym1* in den Vektor pSLF172 kloniert und unter der Kontrolle des starken, konstitutiven *nmt*-Promotors exprimiert. Zym1 wurde mit einem HA-Tag fusioniert, so daß die Gelfiltrationsfraktionen, in denen das MT enthalten ist, leicht mittels Dot-Blot nachgewiesen werden konnten.

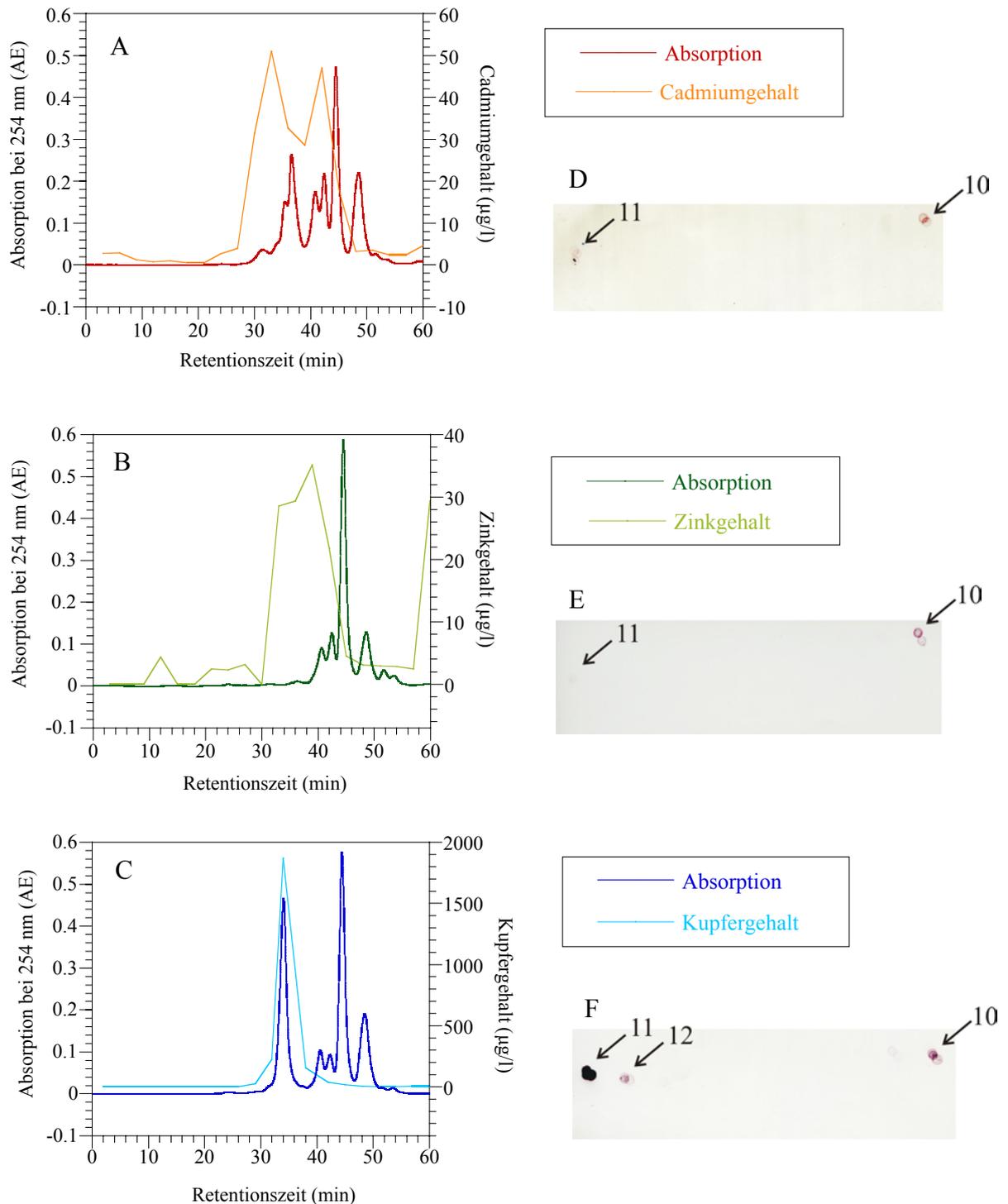


Abb. 3.10-6 Untersuchungen der Metallbindung und die Detektion des Zym1-HA mittels Dot-Blot: Kulturen des mit pSLF172/*zym1* transformierten *FY261 Δzym1* wurden im EMM-Medium bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,6 – 0,8 bei 30 °C und 150 rpm wachsen gelassen. Zwei Stunden nach Zugabe von 500 μM CdCl_2 (A), 300 μM ZnCl_2 (B) bzw. 20 μM CuCl_2 (C) wurden die Kulturen geerntet. Nach Proteinextraktion und -präzipitation wurden 250 μg Protein für die Gelfiltration eingesetzt. Die Metallkonzentrationen der einzelnen Fraktionen wurden über Atomabsorptionsspektroskopie ermittelt. Für die Dot-Blotanalyse wurden 2 μl der Gelfiltrationsfraktionen auf eine Nitrozellulosemembran gespottet (D, E, F). Zym1-HA konnte mittels eines HA-Antikörpers nachgewiesen werden. Die Fraktionen 10–12 entsprechen den Retentionszeiten von 29–37 Minuten. (n = 2)

Obwohl die Expression des *zym1* konstitutiv und metallunabhängig exprimiert sein sollte, wurde das Genprodukt unterschiedlich stark in den metallbehandelten Proteinextrakten detektiert. Die Gelfiltrationsfraktionen 10 und 11 (29 – 34 min) der mit Cadmium bzw. Zink behandelten Kulturen zeigten nur ein sehr schwaches Signal im Dot-Blot (Abb. 3.10-6D u. E). Für die mit Kupfer behandelte Kultur konnte eine teilweise recht starke Antikörperfärbung in den Fraktionen 10, 11 und 12 (29 – 37 min) nachgewiesen werden (Abb. 3.10-6F). Die Spezifität des Antikörpers konnte bereits in Abb. 3.9-1 nachgewiesen werden. Eine Kreuzreaktion des HA-Antikörpers mit anderen Proteinen konnte ausgeschlossen werden. Im Chromatogramm der Kupferprobe ist ein induzierter Peak, in dem nahezu das gesamte Kupfer akkumuliert wird, zu erkennen (Abb. 3.10-6C). Dieser Peak korreliert mit den im Dot-Blot detektierten Fraktionen 10 bis 12. Weder in der mit Cadmium noch in der mit Zink behandelten Kultur konnte in der Gelfiltration ein Proteinpeak bei 34 Minuten gezeigt werden (Abb. 3.10-6A u. B). Zink und Cadmium werden, wie schon für den Wildtyp beschrieben, über einen großen Molekulargewichtsbereich verteilt gebunden.

3.11. Untersuchungen zur Stabilität von Zym1

Die in Kapitel 3.10.4 dargestellten Untersuchungen zeigten, daß Zym1-HA unterschiedlich stark in den Cadmium-, Kupfer- und Zinkproben detektiert wurde, obwohl sein Strukturgen unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors exprimiert ist. Es konnte allerdings bereits nachgewiesen werden, daß MT, die Kupfer, Zink, Cadmium oder Silber gebunden hatte, gegenüber dem Apothionein, der metallfreien Form, stabilisiert und gegen Proteolyse geschützt waren. Diese Resultate wurden für Säuger-MT wie auch für das Cup1 aus der Bäckerhefe analog gezeigt (Nielson & Winge, 1985); (Winge *et al.*, 1985). Sollte Zym1 Kupfer binden, so ließe sich die gegenüber den Zink- und Cadmiumproben erhöhte Proteinmenge durch einen stärkeren Proteolyseschutz erklären. Um dieses zu überprüfen, sollte die Stabilität des Zym1 mit und ohne Metallzugabe sowie unter oxidativem Streß untersucht werden.

Der mit pSLF172/*zym1* transformierte *FY261 Δzym1* wurde in der frühen logarithmischen Wachstumsphase mit 300 µM CdCl₂, 300 µM ZnCl₂, 20 µM CuCl₂ oder 2 mM H₂O₂ behandelt. Die Proteine wurden, wie unter 2.5.1 beschrieben, extrahiert und für die Western-Blotanalyse eingesetzt.

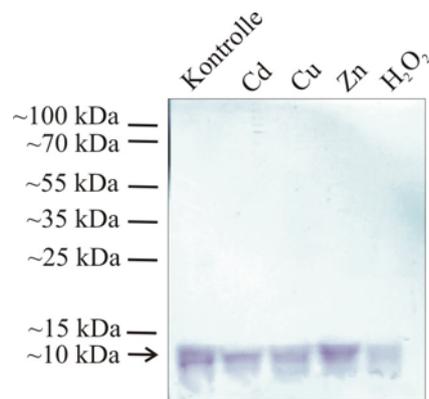


Abb. 3.11-1 Untersuchung der Stabilität des Zym1-HA mittels Western-Blot: Hierfür wurde *FY261 Δzym1* mit pSLF172/*zym1* transformiert und in der frühen logarithmischen Wachstumsphase mit 300 μM CdCl₂, 300 μM ZnCl₂, 20 μM CuCl₂ oder 2 mM H₂O₂ behandelt. 5 μg des Proteinextraktes wurden für die SDS-PAGE eingesetzt. Die Detektion des Zym1-HA erfolgte mittels eines HA-Antikörpers. (n = 2)

Das MT-Gen aus *S. pombe* wurde unter der Kontrolle eines starken, konstitutiven und metallunabhängig regulierten Promotors exprimiert. Auch sein Genprodukte Zym1-HA sollte unabhängig von Metallbehandlung und H₂O₂-Zugabe nachzuweisen sein. In der Abb. 3.11-1 ist zu erkennen, daß Zym1-HA nach Metallzugabe wie auch unter Kontrollbedingungen detektiert werden konnte. Der Einsatz von Metallionen bzw. von H₂O₂ scheint, unter Berücksichtigung der Extraktionsmethode, keinen Einfluß auf die Stabilität des Proteins zu haben. Eine Stabilisierung des metallgesättigten Zym1-HA konnte nicht direkt nachgewiesen werden. Eine Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen kann auch hier auf Grund der unter 3.9 durchgeführten Untersuchung ausgeschlossen werden.

3.12. Komplementation des *Δcup1* und *Δzym1* durch Zym1

Metallothioneine aus den unterschiedlichsten Organismenklassen wurden als effiziente Metallchelatoren beschrieben. Die Generierung von MT *knock-out* Mutanten geht daher oftmals mit einer gesteigerten Metallsensitivität einher. Für Säuger-MT *knock-out* Mutanten wurde eine Erhöhung der Sensitivität gegenüber Cadmium gezeigt (Masters *et al.*, 1994). Das Metallothionein Cup1 aus *S. cerevisiae* vermittelt Kupfertoleranz (Hamer *et al.*, 1985). Die *Δcup1* Mutante reagiert sensitiv auf erhöhte Kupferkonzentrationen. Da das Inaktivieren des Zym1 nicht mit einer verringerten Toleranz gegenüber Cadmium, Kupfer und auch Zink einhergeht, soll überprüft werden, ob Zym1 überhaupt detoxifizierend wirken kann. Besonders die Tatsache, daß in *S. pombe* weitere effiziente Chelatoren, die Phytochelatine, vorhanden sind und das Fehlen eines metallsensitiven Phänotyps, läßt eine detoxifizierende Funktion fraglich erscheinen.

Durch die Transformation des Metallothioneins aus *S. pombe* in den $\Delta cup1$ Stamm sollte untersucht werden, ob Zym1 in der Lage ist, Kupfer zu binden und den kupfersensitiven Phänotyp der MT *knock-out* Mutante aus *S. cerevisiae* zu komplementieren.

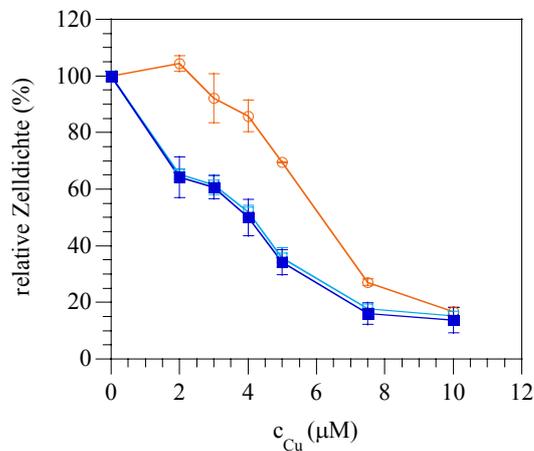
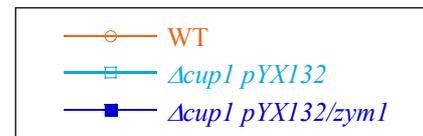


Abb. 3.12-1 Komplementation des $\Delta cup1$ mit *zym1*: *S. cerevisiae* Wildtyp und die mit pYX132 bzw. mit pYX132/*zym1* transformierte $\Delta cup1$ Mutante (siehe Legende) wurden im YNB-Medium bei einer optischen Dichte von 0,1 mit Kupfer behandelt. Nach 18 – 20 Stunden bei 30 °C und 150 rpm wurde die Zelldichte bei 600 nm bestimmt. (n = 5)



In der Abb. 3.12-1 ist das Wachstum des Wildtyps und der transformierten MT *knock-out* Mutante aus *S. cerevisiae* gezeigt. Die Expression des *zym1* erfolgte unter dem stark konstitutiven TPI-Promotor des Plasmids pYX132. Für den mit dem leeren Vektor pYX132 und mit pYX132/*zym1* transformierten $\Delta cup1$ konnte ein analoges Wachstum gezeigt werden. Zym1 scheint nicht in der Lage zu sein, den kupfersensitiven Phänotyp zu komplementieren. Um zu überprüfen, ob das MT aus *S. pombe* in *S. cerevisiae* exprimiert wird, sollte Zym1, das mit einem HA-Tag fusioniert ist, mittels Western-Blotanalyse nachgewiesen. Hier konnte kein Signal im Western-Blot detektiert werden. Eine Mutation des *zym1* oder in den für den HA-Tag kodierenden Sequenzbereichen konnte nach Sequenzierung ausgeschlossen werden (Anhang V).

Zusätzlich soll bemerkt werden, daß die Transformation des $\Delta cup1$ mit pYX132/*zym1* eine geringe Effizienz aufwies und viele Transformanden nach dem Überimpfen von der Transformationsplatte auf eine frische YNB-Kulturplatte nicht wieder wuchsen. Nur durch die Zugabe nicht-toxischer Kupferkonzentrationen konnte die Transformationsrate und die Anzahl der überlebenden Transformanden erhöht werden. Die Transformanden wurden in allen Schritten unter Selektionsdruck angezogen. Ein Verlust des Plasmids ist daher fraglich. Dennoch konnte durch dieses Experiment nicht gezeigt werden, ob Zym1 in der Lage ist, die $\Delta cup1$ Mutante zu komplementieren.

In einem weiteren Experiment sollte das Wachstumsverhalten des mit pSLF172/*zym1* transformierten *FY261* $\Delta zym1$ analysiert werden. Hierbei sollte untersucht werden, inwiefern

die Expression des rekombinanten Proteins Einfluß auf die Toleranz der MT *knock-out* Mutante gegenüber Cadmium hat.

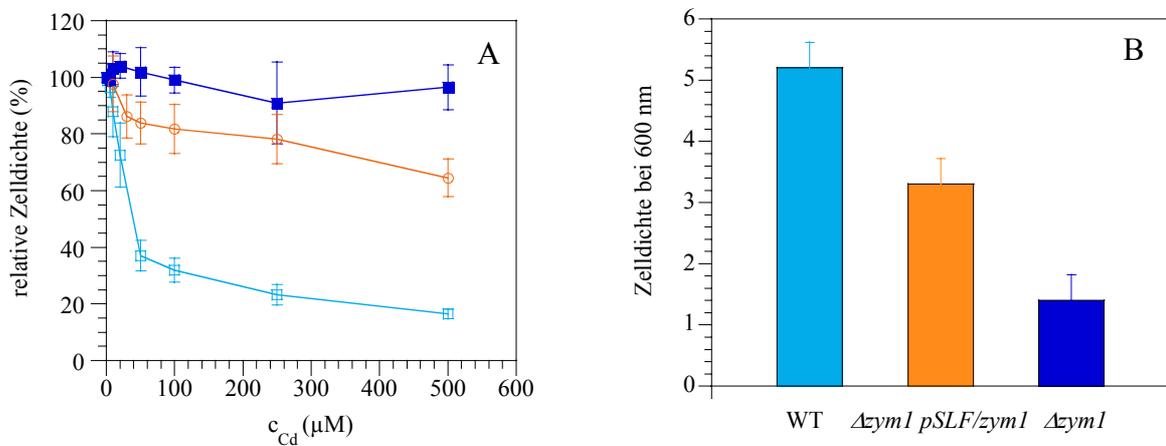
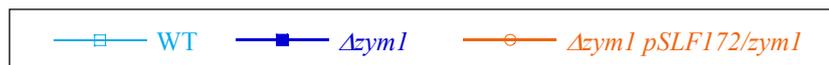


Abb. 3.12-2 Komplementation des $\Delta zym1$ mit *zym1*: Die verschiedenen *S. pombe* Stämme und Transformanten (siehe Legende) wurden auf eine Start-OD von 0,1 im EMM-Medium eingestellt und mit (A) oder ohne Cadmiumzugabe (B) für 18 – 20 Stunden bei 30 °C und 150 rpm wachsen gelassen. Anschließend wurde die Zelldichte bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. (n = 5)



Die Expression von *Zym1* in der MT *knock-out* Mutante führte zu einer verminderten Toleranz gegenüber Cadmium (Abb. 3.12-2A). Im Gegensatz zu $\Delta zym1$ zeigten die Transformanten ein inhibiertes Wachstum bei Cadmiumkonzentrationen ab 10 μM . Allerdings sind die Transformanten immer noch cadmiumtoleranter als der Wildtyp. Dieser zeigte eine 50 %ige Wachstumsinhibierung bei 30 μM CdCl₂, während der IC₅₀-Wert für die Transformanten auch durch das Einsetzen von 500 μM nicht ermittelt werden konnte.

Die Expression des *Zym1* in *FY261* $\Delta zym1$ resultierte weiterhin in einem verbesserten Wachstum unter Normalbedingungen (Abb. 3.12-2B). Während $\Delta zym1$ nur etwa ein Drittel des Wachstums aufweist, das für den Wildtyp gezeigt wurde, erreichten die Transformanten etwa zwei Drittel des Wildtypniveaus.

3.13. Vergleich der Atmung von Wildtyp und $\Delta zym1$

Die Atmung kann durch mehrere Faktoren beeinflusst werden. So konnte für Zink eine Inhibierung aller vier in der Elektronentransportkette enthaltenen Komplexe gezeigt werden (Ye *et al.*, 2001). Auf der anderen Seite ist Kupfer für die Funktion der Cytochrom-c Oxidase essentiell. Die Translokation von Cu-MT wie auch Zn-MT in die Mitochondrien konnte für Säuger-MT nachgewiesen werden (Sakurai *et al.*, 1993); (Ye *et al.*, 2001). Da

Metallothioneine sowohl an der Inhibierung der Atmung durch den Transport von Zink als auch an der Aktivierung der Cytochrom-c Oxidase durch Kupfer beteiligt sein könnten, sollte die Atmungsaktivität von Wildtyp und MT *knock-out* Mutante verglichen werden.

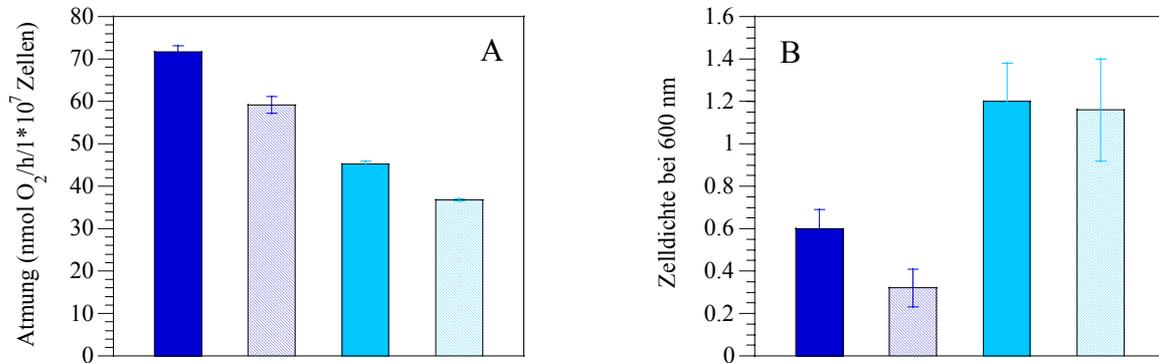


Abb. 3.13-1 Untersuchungen der Atmungsaktivität und des Wachstums in nicht-fermentierbaren Medien:

Für die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs durch Atmung wurden *S. pombe* Wildtyp und $\Delta zym1$ im EMM- und YE-Medium bis in die frühe logarithmische Wachstumsphase wachsen gelassen und mit dem für die Kalibrierung benutzten Medium auf eine Zelldichte von $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml eingestellt (A). Anschließend erfolgte die Messung in der *Clark-type* Sauerstoffmesselektrode. (n = 3) Wildtyp und $\Delta zym1$ wurden auf eine Start-OD von 0,2 im EMM bzw. YE mit 3 % (v/v) Glycerin und 2 % (v/v) Ethanol als Kohlenstoffquelle eingestellt (B). Nach zwei Tagen Wachstum bei 30 °C und 150 rpm wurde die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. (n = 3)



In beiden Medien ist die Atmungsaktivität des Wildtyps im Vergleich zur MT *knock-out* Mutante etwa 10 bis 15 % erhöht (Abb. 3.13-1A). Ein generell höherer Sauerstoffverbrauch wurde im Minimalmedium EMM festgestellt. Verglichen mit den im EMM-Medium angezogenen Stämmen zeigten der Wildtyp wie auch die $\Delta zym1$ Mutante eine um ein Drittel reduzierte Atmung im YE-Medium.

Um zu überprüfen, ob die im Wildtyp leicht erhöhte Atmungsaktivität Einfluß auf das Wachstum hat, wurden die Stämme im EMM- bzw. YE-Medium angezogen, in dem 3 % (v/v) Glycerin und 2 % (v/v) Ethanol anstelle von Glukose als Kohlenstoffquelle eingesetzt wurden. Die Wahl dieser C-Quelle verhindert die Gärung. Glycerin kann, nachdem es in ein Zwischenprodukt der Glykolyse umgewandelt wurde, nur durch oxidative Phosphorylierung (Zellatmung) metabolisiert werden. Ein besseres Wachstum des Wildtyp unter Verwendung dieser nicht-fermentierbaren C-Quelle könnte die Signifikanz der um ca. 10 bis 15 % erhöhten Atmungsaktivität bestätigen.

Die Wachstumsuntersuchungen im $\text{EMM}_{\text{Gly/EtOH}}$ und $\text{YE}_{\text{Gly/EtOH}}$ zeigten ein generell sehr langsames Wachstum des Wildtyps und der $\Delta zym1$ Mutante (Abb. 3.13-1B). Im Vergleich

zum EMM_{Gly/EtOH}-Medium wies YE_{Gly/EtOH} etwas bessere Wachstumsraten auf. Während der Wildtyp nach zwei Tagen eine Zelldichte von 1,2 im YE_{Gly/EtOH} erreichte, war diese im EMM_{Gly/EtOH} etwa um die Hälfte reduziert. Tendenziell verhält sich das Wachstum jedoch wie es für EMM- und YE-Medium mit Glukose beobachtet wurde. Wildtyp und $\Delta zym1$ zeigten ein analoges Wachstum in YE_{Gly/EtOH}, während der MT *knock-out* ein um ca. 50 % reduziertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp im EMM_{Gly/EtOH}-Medium aufwies.

3.14. Untersuchungen zur Transkriptakkumulation von *zym1*

Die Induktion von MT-Genen wird durch eine Vielzahl von Stimuli, so z. B. durch Hormone, Wachstumsfaktoren, Hitzeschock und viele weitere Streßbedingungen oder Wirkstoffe, erreicht (Kägi, 1991). Auch Metallionen zeigen eine schnelle und transiente Transkriptakkumulation von MT-Genen. Dabei wird die MT Expression in Säugern und anderen Eukaryoten meist durch Cadmium, Zink und Kupfer induziert, während MT aus Hefen die stärkste Transkriptakkumulation nach Kupferbehandlung zeigen (Andrews, 2000); (Fürst *et al.*, 1988). Allerdings konnte für das *CUP1* aus *S. cerevisiae* neben einer Induktion durch Silber auch eine Transkriptakkumulation durch Kobalt gezeigt werden, obwohl Co^{2+} *in vivo* nicht an MT gebunden wird (Butt *et al.*, 1984); (Tohoyama *et al.*, 2001). Außerdem wurden auch MT charakterisiert, deren mRNA-Level nicht durch die Zugabe toxischer Metallionenkonzentrationen beeinflusst werden konnte. Das MT-III aus Mäusen beispielsweise zeigt keine Induktion nach Zink und Cadmium und unterscheidet sich damit grundlegend von allen anderen bisher charakterisierten MT-Genen (Palmiter *et al.*, 1992).

Da für alle bisher beschriebenen MT-I und MT-II aus tierischen Organismen und für alle Hefe-MT die Induktion der MT-Gene häufig mit einer Toleranz gegen das induzierende Metall einherging, sollte auch die Transkriptakkumulation von *zym1* nach Behandlung mit verschiedenen Stressoren untersucht werden. Die Untersuchungen könnten Hinweise auf die Funktion wie auch die Metallbindung des Zym1 liefern. Außerdem sollte die Induktion des *zym1* auf medienabhängige Unterschiede analysiert werden. Für die Transkriptakkumulationsuntersuchungen wurden *S. pombe* Wildtypkulturen im EMM- und YE-Medium bis in die frühe logarithmische Wachstumsphase wachsen gelassen und mit den verschiedenen Stressoren für zwei Stunden behandelt.

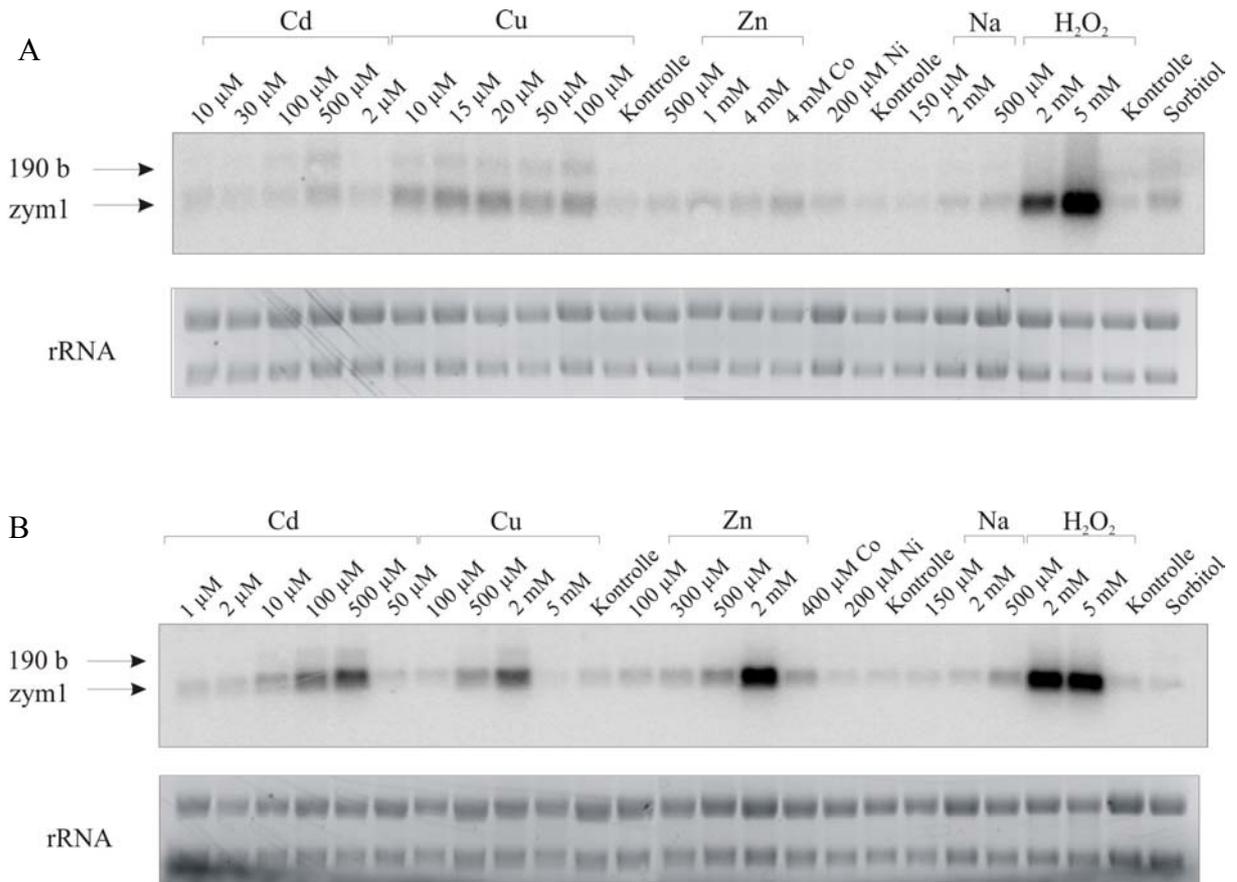


Abb. 3.14-1 Untersuchungen der Transkriptakkumulation von *zym1* durch Northern-Blotanalyse: Hierfür wurden die Wildtypkulturen im EMM- (A) oder YE-Medium (B) in der frühen logarithmischen Wachstumsphase mit den jeweiligen Stressoren für zwei Stunden inkubiert. 10 μ g Gesamt-RNA wurde für die Northern-Blotanalyse eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte mittels einer α^{32} P-dATP markierten *zym1*-Sonde. Die gleiche Beladung wurde durch die Signale der ribosomalen RNA im ethidiumbromidgefärbten Agarosegel bestätigt. Neben *zym1* konnte ein zweites, größeres Transkript detektiert werden. (n = 2)

Generell zeigte die Transkriptakkumulation des *zym1* große Unterschiede zwischen den Kulturen, die im EMM- oder YE-Medium angezogen wurden. Eine analoge Induktion des *zym1* in Kulturen beider Medien war nur unter oxidativem Streß, verursacht durch H₂O₂, zu verzeichnen. Während der Wildtyp im Minimalmedium nur eine geringe Transkriptakkumulation des *zym1* nach Kupferbehandlung und 500 μ M CdCl₂ aufwies, verursachten im YE-Medium mehrere Metalle ein erhöhtes *zym1* mRNA-Level. Deutlich gesteigerte Transkriptakkumulationen waren hier ab Konzentrationen von 100 μ M CdCl₂, 500 μ M CuCl₂ und 2 mM ZnCl₂ zu verzeichnen. Für Nickel und osmotischen Streß konnte keine Induktion des *zym1* gezeigt werden. Interessanterweise konnten geringe Transkriptakkumulationen nach Kobaltbehandlung in den Wildtypkulturen beider Medien nachgewiesen werden.

Um eine Induktion durch Salzstreß bzw. durch das Gegenanion Chlorid auszuschließen, wurden mit NaCl₂ behandelte Kulturen analog untersucht. Hierbei konnte keine erhöhte *zym1* Transkriptmenge gezeigt werden.

Die Behandlung des *S. pombe* Wildtyps mit Kupfer und Cadmium hatte die Induktion eines zweiten, etwa 190 Basen großen Transkripts zur Folge. Die im EMM-Medium angezogenen Kulturen zeigten dieses Transkript bei Cadmiumkonzentrationen ab 30 µM CdCl₂ und allen getesteten Kupferkonzentrationen. Ab 10 µM CdCl₂ und 500 µM CuCl₂ war es auch in den YE-Kulturen nachzuweisen. Der Nachweis des zweiten Transkripts ist für Kupfer und Cadmium spezifisch und generell unabhängig von der Stärke der Transkriptakkumulation des *zym1*. Obwohl die Signalstärken im Northern-Blot für die mit H₂O₂ bzw. mit 2 mM ZnCl₂ im YE-Medium behandelten Kulturen am stärksten waren, konnte hier die 190 Basen große Bande nicht detektiert werden.

3.15. Wachstum unter oxidativem Streß

Die Northern-Blotanalysen zeigten eine starke Transkriptakkumulation nach oxidativem Streß unabhängig vom verwendeten Medium. Metallothioneine sind nicht nur als potentielle Chelatoren für Schwermetalle beschrieben, sondern können auf Grund ihres hohen Cysteinanteils auch als Antioxidantien wirksam werden (Viarengo *et al.*, 2000). Daher sollte untersucht werden, ob Zym1 Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies vermitteln kann. Für die Wachstumsuntersuchungen unter oxidativem Streß wurden Kulturen des Wildtyps und der Δ *zym1* Mutante im EMM- und YE-Medium in der frühen logarithmischen Wachstumsphase für eine Stunde mit H₂O₂ behandelt. Von einer 1:100 Verdünnung der Kulturen wurde 100 µl auf EMM- bzw. YE-Kulturplatten ausplattiert und für 2 bis 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien gezählt.

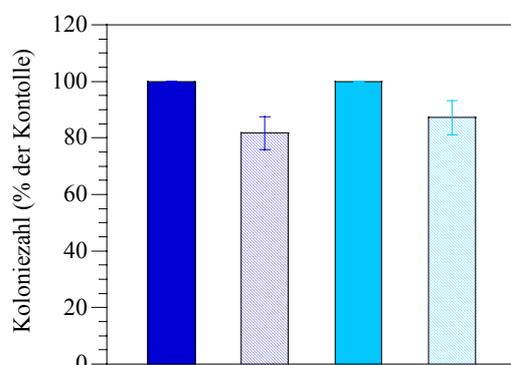


Abb. 3.15-1 Wachstumsuntersuchungen nach oxidativem Streß: Kulturen des *S. pombe* Wildtyps und der MT *knock-out* Mutante wurden bis in die frühe logarithmische Wachstumsphase im EMM-Medium bei 30 °C und 150 rpm wachsen gelassen. Anschließend wurden die Kulturen geteilt und eine Hälfte für eine Stunden mit 2 mM H₂O₂ behandelt. Die Zellen wurden 100fach verdünnt und 100 µl auf Kulturplatten ausplattiert. Nach 2 bis 3 Tagen Inkubation bei 30 °C wurden die Kolonien gezählt. (n = 3)



Die Abb. 3.15-1 zeigt, daß sowohl der Wildtyp als auch $\Delta zym1$ ein um ca. 15 % reduziertes Wachstum nach oxidativem Streß, verursacht durch H_2O_2 , aufweisen. Es konnte kein Unterschied im Wachstum zwischen Wildtyp und $\Delta zym1$ nach H_2O_2 Behandlung im EMM-Medium ermittelt werden. Ein analoges Ergebnis wurde für die Wachstumsuntersuchungen im YE-Medium erhalten (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Versuch sollte das Wachstum unter oxidativem Streß durch den Einsatz von Menadion untersucht werden. Die menadionabhängige Streßantwort ist von den Signaltransduktionswegen des H_2O_2 unabhängig und verschieden. Der Einsatz von 100 μM Menadion führte jedoch zu keinerlei Beeinflussung des Wachstums (Daten nicht gezeigt).

3.16. Macroarray

Die bis hier gezeigten Experimente wurden auf Grund der in dieser Arbeit ermittelten Daten bzw. nach den in der Literatur erwähnten Phänotypen von MT *knock-out* Organismen oder beschriebenen Funktionen von MT durchgeführt. Für das Zym1 ist es nahezu ausgeschlossen, daß es an der Metalldetoxifizierung beteiligt ist. Auch eine Regulierung der Atmung bzw. Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies ist sehr unwahrscheinlich. Des weiteren konnten alle durchgeführten Experimente keine eindeutige Erklärung für den Phänotyp der $\Delta zym1$ Mutante im EMM-Medium liefern. Das unterschiedliche Wachstum in beiden Medien gibt weiter Rätsel auf. Hinzu kommt, daß die Metallbindung nicht eindeutig geklärt werden konnte und daß die Untersuchungen der Transkriptakkumulation keinen Hinweis auf eine mögliche Funktion erbrachten. Die einzigen Anhaltspunkte für die Klärung der Funktion des Zym1 stammen aus den Untersuchungen der Elementzusammensetzung von Wildtyp und MT *knock-out* Mutante. Allerdings konnte bisher keine Erklärung für den Kalziuminflux, der nur im Wildtyp nicht aber in der $\Delta zym1$ Mutante gezeigt werden konnte, gefunden werden. Einen Zusammenhang von Metallothioneinen und der Kalziumhomöostase wurde bisher noch nicht beschrieben.

Um weitere Hinweise auf eine mögliche Funktion des Zym1 zu erhalten, sollten die Transkriptakkumulationen einiger ausgewählter Gene untersucht werden. Hierfür wurden metallresponsive bzw. zellzyklusregulierende Gene kloniert und gemäß 2.4.12 analysiert. Es sollten die Unterschiede zwischen Wildtyp und MT *knock-out* nach Cadmium-, Kupfer- und Zinkbehandlung sowohl im EMM- als auch im YE-Medium untersucht werden.

Die Induktion bzw. Repression der einzelnen Gene wurde durch die Kalkulation der Signalstärken der metallbehandelten Proben und den Kontroll-Proben ermittelt. Dieses wurde mit Hilfe des Programms *AIDA compare* (Raytest, Straubenhardt) durchgeführt. Vorher

wurden die Daten unter Berücksichtigung der konstitutiven Kontrollen mit *AIDA analyser* normalisiert.

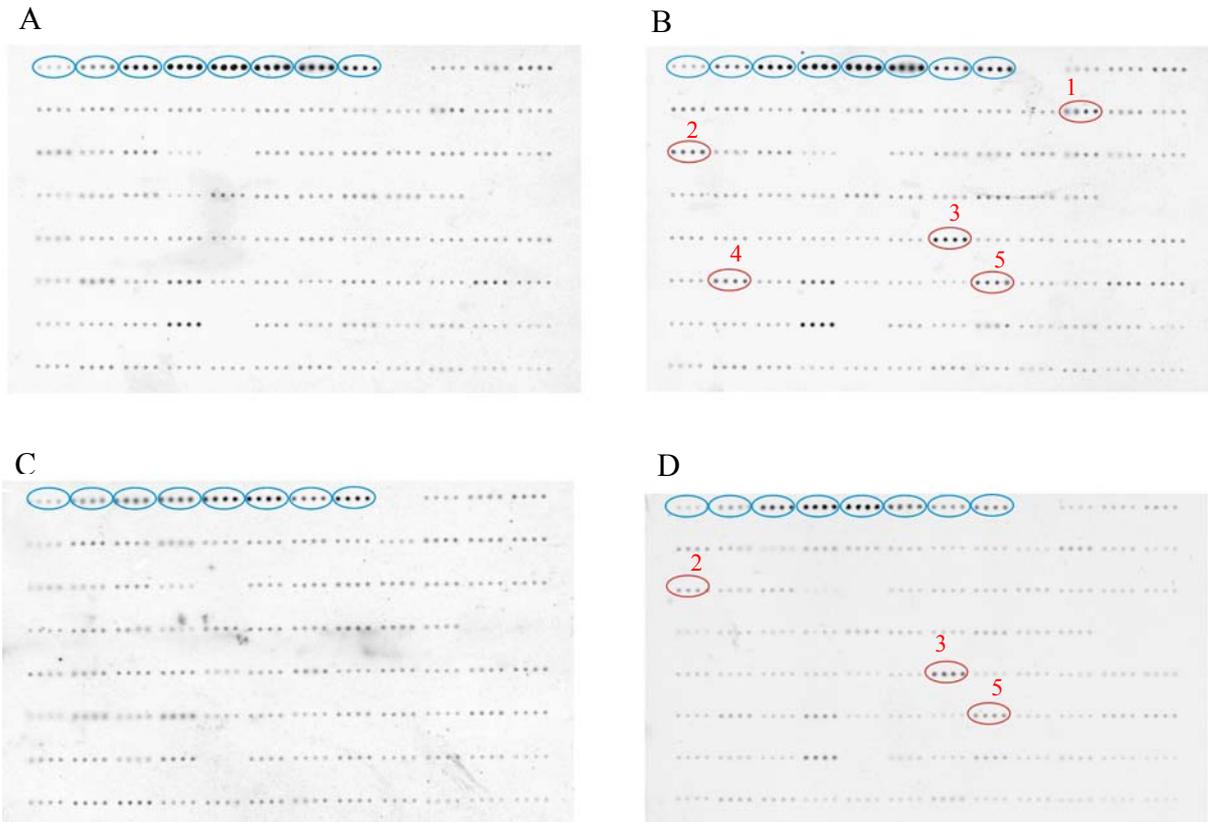


Abb. 3.16-1 Macroarrays unbehandelter und mit Cadmium behandelter *S. pombe* Stämme im YE-Medium: Vergleich der Genexpression des Wildtyp unter Kontrollbedingungen (A) bzw. mit 1 μM CdCl_2 (B) und der ΔzymI Mutante unter Kontrollbedingungen (C) bzw. mit 1 μM CdCl_2 (D) behandelt. Die Anordnung der Gene ist im Anhang II gezeigt. Die blau gekennzeichneten Spots repräsentieren die konstitutiven Kontrollen. Die mit einer roten Markierung versehenen Gene zeigen einige durch Cadmium induzierte Gene. **1)** Cysteinsynthase; **2)** Sulfitreduktase; **3)** ZIP Transporter; **4)** Cu,Zn Superoxiddismutase; **5)** Sulfidquinon-Reduktase. (n = 2)

In Abb. 3.16-1 ist ein Beispiel für die Induktion verschiedener Gene nach Cadmiumbehandlung im YE-Medium gezeigt.

In der mit 1 μM CdCl_2 behandelten Wildtypkultur ist ohne computergestützte Auswertung die Induktion von fünf Genen zu erkennen (Abb. 3.16-1B). Hierbei repräsentieren die Gene 1 bis 5 eine Cysteinsynthase, eine Sulphitreduktase, einen ZIP-Transporter, eine Cu,Zn-SOD und eine Sulfidquinon-Reduktase. Auch in dem Macroarray der cadmiumbehandelten MT *knock-out* Mutante zeigten einige dieser Gene eine erhöhte Signalstärke (Abb. 3.16-1D). Die unterschiedliche Hybridisierungsstärke suggeriert hier allerdings die Induktion von nur drei Genen. Für die Quantifizierung wurde daher mit den oben genannten AIDA-Programmen gearbeitet.

Die für die einzelnen Arrays erhaltenen Expressionslevel sind im Anhang III zu finden. Dabei geben die negativen und positiven Werte die in der Mutante reprimierten bzw. induzierten

Gene an. Als signifikant wurde hierbei eine Repression oder Induktion, die kleiner -2 bzw. größer als 2 war, gewertet. Diese sind orange unterlegt (siehe Anhang III). Hierbei zeigten die zinkbehandelten Proben in beiden Fällen die meisten Unterschiede zwischen den Proben. Als interessant wurden Gene der Proteine eingestuft, die entweder am Metalltransport beteiligt sind, die regulierend auf die Zellteilung wirken oder als metallresponsive Transkriptionsfaktoren beschrieben wurden. Vor allem die unterschiedliche Expression eines Ca^+/H^+ -Austauscher könnte Erklärungen für den erhöhten Kalziuminflux und Hinweise auf die Funktion des MT liefern. Bevor die ermittelten Induktionen oder Repressionen für die Klärung der Funktion des *Zym1* herangezogen wurden, sollten bestätigende RT-PCR Experimente durchgeführt werden (siehe 3.18).

3.17. Microarray

Die unter 3.16 beschriebenen Vergleiche der Genexpression beziehen sich nur auf eine begrenzte Anzahl von Genen. Um Unterschiede in der Genexpression zwischen Wildtyp und Δzym1 vollständig zu analysieren, wurden Microarrayanalysen durchgeführt (siehe 2.4.10). Da ein starker Phänotyp der Δzym1 Mutante im EMM-Medium bereits unter Normalbedingungen nachgewiesen werden konnte und um Aufschluß über das unterschiedliche Wachstumsverhalten zu erlangen, wurde sich auf den Vergleich von Wildtyp und Δzym1 unter Normalbedingungen im jeweiligen Medium beschränkt.

Die zu vergleichenden cDNAs wurden mit den Farbstoffen Cy3 und Cy5 markiert und für die Hybridisierung der *S. pombe full genome chips* eingesetzt. Durch das Übereinanderlegen der einzelnen Farben ergibt sich für eine induzierte Expression in einer der beiden Proben ein roter bzw. grüner Spot. Eine vergleichbare Expression in beiden Stämmen resultiert in einem gelben Spot. Ein Auszug aus dem *S. pombe full genome chips* ist in Abb. 3.17-1 gezeigt.

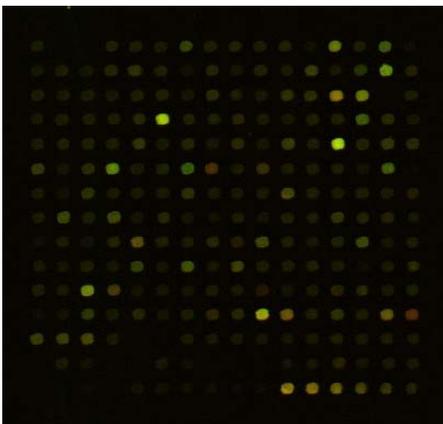


Abb. 3.17-1 Teilausschnitt aus dem *S. pombe full genome chip*: Die Wildtyp cDNA wurde mit Cy3 und die der MT *knock-out* Mutante mit Cy5 gelabelt. Damit ergibt sich für eine Induktion eines Wildtypgens eine grüne Farbe, während die der Mutante rot erscheint. Die gelben Spots repräsentieren Gene, die eine vergleichbare Expression in beiden Stämmen aufweisen.

Im Anhang IV sind die für die Microarray ermittelten Genexpressionen dargestellt. Neben einem *cut-off* Wert von zwei wurden die Daten auch unter Berücksichtigungen von Normalisierungen und internen Qualitätskontrollen ausgewertet. Dabei konnte die Anzahl der unterschiedlich exprimierten Gene im EMM- und im YE-Medium auf jeweils sieben reduziert werden. Dabei markieren die negativen bzw. positiven Werte eine Reprimierung bzw. Induktion der Gene in der $\Delta zym1$ Mutante.

Besonders interessant erschien hier eine P-Typ Kalzium-ATPase. Aber auch hier sollte die Signifikanz der Daten durch RT-PCR überprüft werden (siehe 3.18).

3.18. Überprüfung der Macro- und Microarrayresultate durch RT-PCR

Um die unter 3.16 und 3.17 ermittelten Daten auf Signifikanz zu überprüfen, wurden RT-PCR Experimente durchgeführt. Hierfür wurden 3 μg RNA der Kontrollen und mit Metall behandelten Kulturen für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die cDNA wurde unter Verwendung der in Tabelle 2.4-2 angegebenen Primer für die PCR unter Standardbedingungen verwendet.

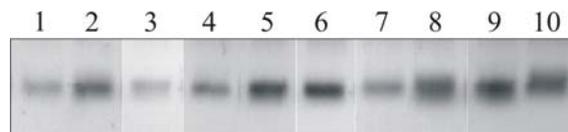


Abb. 3.18-1 RT-PCR zur Verifizierung der Arraydaten: Für die cDNA-Synthese wurden 3 μg Gesamt-RNA verwendet. Anschließend wurde 1 μl cDNA für die PCR nach Standardbedingungen eingesetzt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.4-2 aufgelistet. Die untersuchten Gene sind **1)** Aktin als konstitutive Kontrolle; **2)** *cdc23*; **3)** *cuf1*; **4)** *SPAC6G10.12c*; **5)** *zhf*; **6)** *SPCC126.09*; **7)** *SPBC16D10.06*; **8)** *nic1*; **9)** *SPCC1795.02c*; **10)** *pgak2*. (n = 3)

Generell konnte gezeigt werden, daß für alle verwendeten Oligonukleotide ein PCR-Produkt der gewünschten Größe erhalten werden konnte (Abb. 3.18-1). Des weiteren konnte für alle Oligonukleotide Spezifität ermittelt werden. Unter den gewählten PCR-Bedingungen wurde nur ein PCR-Produkt detektiert.

Die Untersuchungen der Kontroll- und metallbehandelten Proben ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und $\Delta zym1$. Die in den Arrays gezeigten Unterschiede in der Genexpression konnten mittels RT-PCR nicht bestätigt werden. Generell muß aber angemerkt werden, daß die Unterschiede der Transkriptmengen zwischen Wildtyp und der MT *knock-out* Mutante mit zwei- bis maximal vierfach sehr gering ausfielen. Hierbei kann die RT-PCR als Methode limitierend wirken. Eine zwei- oder vierfache Induktion oder Repression ist durch

diese Methode schwer nachweisbar. Die Anwendung von *real time* PCR könnte zu besseren Resultaten führen.

3.19. Vergleich der Proteinexpression

Die in den Kapiteln 3.16 bis 3.18 durchgeführten Experimente sollten Unterschiede in der Transkriptakkumulation verschiedener Gene aufzeigen. Da eine gesteigerte Transkriptmenge nicht zwangsläufig eine größerer Menge des Genproduktes zur Folge haben muß, sollte auch die Expression der Proteine untersucht werden. Hierfür wurden Wildtyp und $\Delta zym1$ Kulturen unter Normalbedingungen im EMM- bzw. YE-Medium wachsen gelassen. Die verschiedenen Proteinextrakte wurden anschließend über 2D-Gelanalyse miteinander verglichen (siehe Abb. 3.19-1).

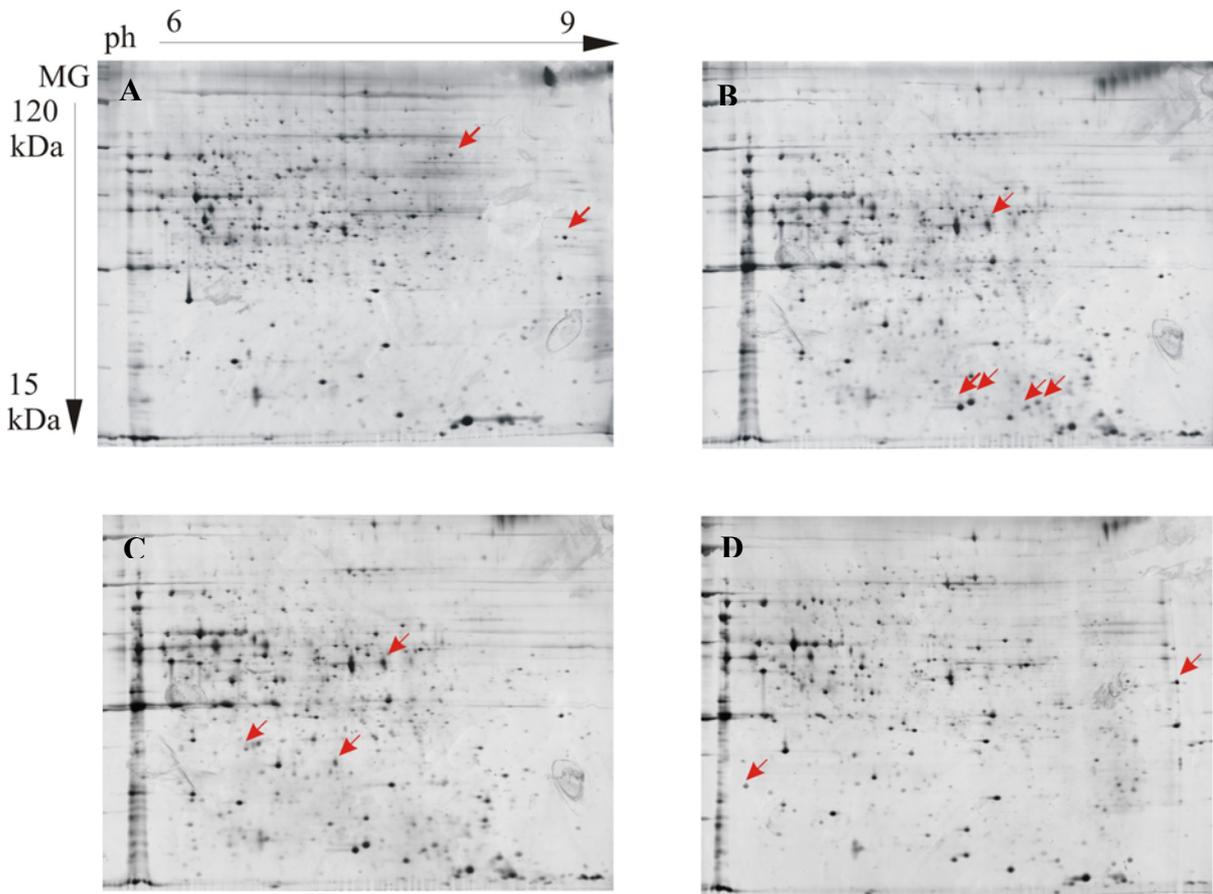


Abb. 3.19-1 2D-Gelanalyse von Wildtyp und Mutante: Für die Isoelektrische Fokussierung wurden 100 μ g Rohextrakt auf die 24 cm IEF-Steifen, pH 6–9, aufgetragen. Diese wurden anschließend für die Auftrennung über eine SDS-PAGE verwendet. Die oberen Gele zeigen die Unterschiede der medienabhängigen Proteinexpression. Hier werden $\Delta zym1$ EMM (A) und $\Delta zym1$ YE (B) miteinander verglichen. Die unteren Abb. zeigen die unterschiedliche Expression zwischen den beiden Stämmen. Hier sind $\Delta zym1$ YE (C) und WT YE (D) dargestellt. (n = 3)

Die in Abb. 3.19-1 dargestellten Unterschiede in der Proteinexpression sind in wenigsten zwei der drei Replikate nachgewiesen worden. Hierbei zeigten die Vergleiche der verschiedenen Proteinextrakte generell mehr Unterschiede zwischen WT YE und WT EMM bzw. zwischen $\Delta zym1$ YE und $\Delta zym1$ EMM als zwischen den beiden *S. pombe* Stämmen, die im gleichen Medium angezogen wurden. Die Wahl des Mediums hat daher mehr Einfluß auf die Proteinexpression als die Inaktivierung des Zym1. Viele Unterschiede konnten hier sowohl für die in den unterschiedlichen Medien angezogene MT *knock-out* Mutante (Abb. 3.19-1A u. B) als auch für den Wildtyp detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Für die medienabhängigen Untersuchungen waren repräsentative Veränderungen vermehrt im Bereich der kleinen Molaren Massen zu verzeichnen, aber auch Unterschiede in anderen Proteingewichtsbereichen waren zu finden. Die ermittelten Unterschiede sind auch über verschiedene pH-Bereiche verteilt. Eine ähnliche Verteilung konnte für die Unterschiede der Proteinexpression zwischen den beiden Stämmen im gleichen Medium beobachtet werden (Abb. 3.19-1C u. D)

Für eine genaue Analyse der Proteine müßten die silber- oder comassiegefärbten Proteinspots aus den Gelen ausgeschnitten und über Massenspektrometrie sequenziert werden. Zusammen mit weiteren intensiven Untersuchungen der Transkriptakkumulation mittels der Arraytechnik bzw. *real time* PCR könnten diese Methoden zur Klärung der Funktion des Zym1 aus *S. pombe* beitragen. Der Einsatz globaler Techniken wie 2D und Arrays und die Durchführung weiterer Experimente sollen im Ausblick dieser Arbeit unter Kapitel 4.10 diskutiert werden.

4. Diskussion

Seit der Entdeckung der Metallothioneine (MT) im Jahre 1957 stehen Untersuchungen zur Funktion im Mittelpunkt (Margoshes & Vallee, 1957). Trotz umfangreicher Studien konnte diese noch nicht im Detail geklärt werden (Palmiter, 1998). Die Vielzahl von Faktoren, wie Metalle, Hormone, Onkogene, Hitze oder oxidativer Streß, die zu einer erhöhten Transkriptakkumulation der MT Gene führen, erschwert die funktionelle Charakterisierung (Kägi, 1991). Wichtige Hinweise zur Klärung der funktionellen Bedeutung der MT wurden in den vergangenen Jahrzehnten durch die Generierung von MT *knock-out* Mutanten erhalten. Auf Grund des Vorkommens der MT in Multigenfamilien sind solche Mutanten auf wenige Organismen und Zelllinien beschränkt. So konnte bis heute noch keine MT *knock-out* Pflanze generiert werden. Die vorhandenen Informationen zu möglichen Funktionen der MT stammen vor allem von Säugern und Hefen. Hierbei spielen MT Nullmäuse eine große Rolle (Masters *et al.*, 1994). Untersuchungen dieser MT-I und MT-II defizienten Organismen zeigten, daß diese MT nicht essentiell für Wachstum und Entwicklung sind, aber die Toleranz gegenüber Cadmium deutlich erhöhen können. Dennoch scheint es eher ausgeschlossen, daß eine Detoxifizierung von Metallen die „natürliche“ Funktion der Metallothioneine darstellt. Eine Entgiftung des Cadmiums als einzige Funktion der MT scheint unter Berücksichtigung des Selektionsdrucks ausgeschlossen (Palmiter, 1998). Die Cadmiumkonzentrationen sind generell zu gering als das sie toxische Effekte auslösen könnten. Erst durch die zunehmende Industrialisierung wurde die Cadmiumkonzentration der Biosphäre zum Teil drastisch erhöht. Viel wahrscheinlicher ist die Hypothese, daß MT an der Metallhomöostase, so z. B. als metallchaperon-ähnliches Protein oder aber an vollkommen anderen Stoffwechselprozessen beteiligt sind. Gestützt wird diese These durch die Erkenntnis, daß neben MT-I und MT-II noch mindestens ein weiteres MT in Mäusen exprimiert ist (Palmiter *et al.*, 1992). Dieses als MT-III bezeichnete und im Gehirn lokalisierte MT trägt nicht zur Metalltoleranz bei. Das MT-III Gen zeigt keine Transkriptakkumulation nach Cadmium- oder Zinkzugabe und unterscheidet sich damit von den beiden anderen MT Isoformen.

Die Untersuchungen zur Funktion der MT in Hefen ist durch das Fehlen einer gewebsspezifischen Expression, durch das Vorhandensein umfangreicher Sequenzinformationen und der einfachen Handhabung und genetischen Manipulation erleichtert. Viele Erkenntnisse über Metallothioneine stammen daher von MT *knock-out* Mutanten aus den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida glabrata*. Während die Bäckerhefe nicht in der Lage ist Phytochelatine (PC), katalysiert durch die Phytochelatinsynthase (PCS), zu bilden,

werden Cadmiumionen in *C. glabrata* durch diese Peptide chelatiert (Hamer *et al.*, 1985; Mehra *et al.*, 1992). Kupferionen werden hier durch MT komplexiert. Die Generierung von MT *knock-out* Mutanten geht in beiden Hefen mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber Kupfer einher. Obwohl für die Phytochelatine verschiedener Organismen Kupferbindung und -detoxifizierung gezeigt werden konnte, ist die MT *knock-out* Mutante aus *C. glabrata* nicht in der Lage, PC nach Kupferbehandlung zu synthetisieren. Die Bildung von MT und PC erfolgt in dieser Hefe in Abhängigkeit vom jeweiligen Metall und setzt eine unterschiedliche Regulation der beiden Synthesewege voraus.

Auch die Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* verfügt über eine phytochelatinabhängige Detoxifizierung von Cadmium und, wenn auch weniger ausgeprägt, von Kupfer. Mit der Entdeckung des Metallothioneins Zym1 aus *S. pombe* gibt es einen weiteren gut charakterisierten und leicht zu handhabenden eukaryotischen Modellorganismus, an dem die Funktion dieses Proteins und die Interaktion von Phytochelatinen und Metallothioneinen erforscht werden kann. Weiterhin sollte das Toleranz- und Wachstumsverhalten von $\Delta zym1$ Mutanten untersucht werden. Neben Untersuchungen zur Metallbindung und der Atmungsaktivität standen außerdem globale Charakterisierungen des MT durch 2D-Gel- und Arraytechniken im Vordergrund

4.1. Wachstumsuntersuchungen

4.1.1. Das Inaktivieren des Zym1 hat keine Erhöhung der Metallsensitivität zur Folge

Das Generieren von MT *knock-out* Linien bzw. Stämmen und deren Charakterisierung hinsichtlich ihres Wachstums unter verschiedenen Bedingungen ist ein initialer Schritt zur Untersuchung der Funktion von Metallothioneinen. In der vorliegenden Arbeit wurde das MT aus *S. pombe* in mehreren Stämmen und Mutanten inaktiviert (Abb. 3.1-2). Anschließend wurde das Wachstumsverhalten untersucht. Dabei konnten für alle im Minimalmedium (EMM-Medium) angezogenen MT *knock-out* Mutanten eine Erhöhung der Toleranz gegenüber Cadmium, Kupfer, Zink, Nickel und Kobalt ermittelt werden (siehe Kapitel 3.2). Die Mutante $\Delta zym1$ zeigte selbst bei Cadmiumkonzentrationen, die höher als 500 μM CdCl_2 waren, keine Wachstumsinhibierung (Abb. 3.2-2A). Der IC_{50} -Wert des Wildtyps hingegen lag bei 30 μM CdCl_2 . Die Toleranz der $\Delta zym1$ Mutante waren für Kupfer und Zink etwa 1,5fach bzw. circa 2,5fach gesteigert (Abb. 3.2-3A u. Abb. 3.2-4A).

Durch die Transformation von pSLF172/*zym1* konnte ausgeschlossen werden, daß die ermittelten Toleranzsteigerungen unabhängig vom inaktivierten Zym1 sind. Die

Transformanden sind zwar immer noch cadmiumtoleranter als der Wildtyp, zeigen aber gegenüber der $\Delta zym1$ Mutante eine geringere Toleranzsteigerung (Abb. 3.12-2).

Die eben beschriebenen Resultate stehen im klaren Widerspruch zu allen bisher veröffentlichten Daten von MT *knock-out* Mutanten. In keiner dieser Mutanten verursachte das Inaktivieren eines MT, als potentiellen Chelators, eine Steigerung in der Toleranz gegenüber Schwermetallen. Vielmehr resultierte das Fehlen eines funktionellen MT in einer erhöhten Schwermetallsensitivität. Untersuchungen des *S. cerevisiae* MT *knock-out* $\Delta cup1$ ergaben eine drastisch erhöhte Kupfersensitivität im Vergleich zum Wildtyp (Hamer *et al.*, 1985). Während der Wildtyp nur eine leichte Wachstumsinhibierung bei 60 μM CuCl_2 zeigte, ist $\Delta cup1$ bei solchen Konzentrationen nicht mehr in der Lage zu wachsen. Diese MT *knock-out* Mutante erfährt eine 50 %ige Inhibierung des Wachstums bei etwa 15 μM CuCl_2 (Jensen *et al.*, 1996). Auch für Säuger konnte eine verminderte Toleranz vor allem für Cadmium beobachtet werden. *MT-I* und *MT-II* Null-Mäuse reagierten sensitiver auf die toxischen Effekte des Cadmiums als Kontrollmäuse (Masters *et al.*, 1994). Auf der anderen Seite konnte durch die Überexpression von *MT-I* in Mäusen bzw. *MT-II* in menschlichen Fibroblastzellen eine Toleranz gegenüber höheren Konzentrationen an Cadmium erreicht werden (Liu *et al.*, 1995); (Karin *et al.*, 1983). Auch Borrelly und Ko-Autoren zeigten, daß die Überexpression des *zym1*, den zinksensitiven Phänotyp der Δzhf Mutante im EMM-Medium zu komplementieren vermag (Borrelly *et al.*, 2002). Jedoch wurden bei diesen Untersuchungen Zinkkonzentrationen gewählt, bei denen ein Wachstum der zinksensitiven Stämme überhaupt gar nicht mehr möglich war. Die eingesetzten Zinkkonzentrationen waren mehr als zehnmal höher als die in der vorliegenden Arbeit ermittelten IC_{50} -Wertkonzentrationen. Zusätzlich dazu ist es nicht möglich im EMM-Medium mit millimolaren Zinkkonzentrationen zu arbeiten, da Zink, vermutlich durch die hohe Konzentration an Phosphat im Medium (Tabelle 3.6-3), schon bei 600 μM ZnCl_2 ausfällt. Die Aussagekraft dieser Daten ist daher stark anzuzweifeln.

Während eine Zunahme der Toleranz gegenüber Übergangsmetallen bei Anzucht im Minimalmedium beobachtet wurde, konnte im Komplexmedium (YE-Medium) ein solches Wachstumsverhalten nicht gezeigt werden (Abb. 3.2-2B, Abb. 3.2-3B u. Abb. 3.2-4B). In diesem Fall verhält sich das Wachstum der MT *knock-out* Stämme wie das der MT-Wildtypstämme. Das Metallothionein trägt demnach nicht zu einer Erhöhung der Schwermetalltoleranz bei und ist nicht an Detoxifizierungsprozessen beteiligt. Allerdings wurden von Borrelly und Ko-Autoren für den $\Delta zym1$ sowohl eine verringerte Toleranz

gegenüber Cadmium als auch Zink im Komplexmedium gezeigt (Borrelly *et al.*, 2002). Beides konnte durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht bestätigt werden. Es ergaben sich keine Unterschiede im Wachstum zwischen MT *knock-out* und Wildtyp nach Zink- und Cadmiumbehandlung im YE-Medium. Zusätzlich dazu konnten die Untersuchungen von $\Delta SpPCS$ und $\Delta SpPCS \Delta zym1$ herangezogen werden. Hier konnte ebenfalls keine unterschiedliche Toleranz ermittelt werden. Phytochelatine stellen einen Hauptentgiftungsmechanismus für Cadmium und Kupfer in *S. pombe* dar (Abb. 3.2-2). Ein Inaktivieren der Phytochelatinsynthese erhöht drastisch die Sensitivität gegenüber Cadmium und, wenn auch in geringerem Maße, gegenüber Kupfer (Clemens *et al.*, 1999). Das Generieren einer $\Delta zym1$ *knock-out* Mutante in $\Delta SpPCS$ resultiert ebenfalls nicht in einem geringeren Wachstum. Während man für den im Wildtyp generierten MT *knock-out* annehmen könnte, daß der Verlust des Zym1 durch die Bildung von Phytochelatinen kompensiert werden kann, ist das für $\Delta SpPCS \Delta zym1$ ausgeschlossen. Die in dieser Arbeit ermittelten Daten zeigen, im Unterschied zu Borrelly *et al.*, eine unveränderte Toleranz gegenüber Cadmium in zwei verschiedenen genetischen *backgrounds*, dem cadmiumtoleranten Wildtyp und der cadmiumsensitiven $\Delta SpPCS$ Mutante. Auch die Generierung einer *zym1 knock-out* Mutante im zinksensitiven Δzhf Stamm ermöglichte verlässlichere Wachstumsuntersuchungen im Vergleich zur oben benannten Publikation. In dieser wurde das Wachstum des Wildtyps und der $\Delta zym1$ Mutante in Zinkkonzentrationen verglichen, die keinen oder nur wenig Einfluß auf das Wachstumsverhalten der Stämme zeigten. Aussagekräftigere Daten sind auch in diesem Fall durch die Untersuchungen sensitiver Mutanten, wie Δzhf und $\Delta zhf \Delta zym1$ zu erwarten. Weiterhin muß angemerkt werden, daß auch die in der Publikation verwendeten Zink- bzw. Cadmiumkonzentrationen zu keinen mit der vorliegenden Arbeit vergleichbaren Ergebnissen führten.

Da Cadmium, Kupfer und Zink im EMM-Medium mit einer Erhöhung der Toleranz der MT *knock-out* Mutanten einherging und dieses im YE-Medium nicht gezeigt werden konnte, sollte überprüft werden, ob die Metallbindung durch Zym1 Einfluß auf das Wachstum hat. Daher wurden auch Kobalt und Nickel für die Wachstumsuntersuchungen eingesetzt. Für beide Metalle wurde die Bindung an MT bisher nur *in vitro*, aber nicht *in vivo* gezeigt.

Auch nach Kobalt- und Nickelbehandlung zeigten die MT *knock-out* Mutanten ein gegenüber den MT-Wildtypstämmen gesteigertes Wachstum im Minimalmedium (Abb. 3.2-5). Es ist allerdings nahezu ausgeschlossen, daß Kobalt und Nickel durch Zym1 gebunden und somit detoxifiziert werden. Die nach Metallbehandlung gesteigerte Toleranz der MT *knock-out*

Mutanten ist demnach gänzlich unabhängig von der Art der Metallionen. Auf Grund der gesteigerten Toleranz der MT *knock-out* Mutanten nach Metallbehandlung ist eine Beteiligung des Zym1 an der Detoxifizierung von Metallen auszuschließen. Der von der Art des Metalls unabhängige Phänotyp der Mutanten läßt weiterhin eine Assoziation der erhöhten Toleranz mit einer Metallbindung durch Zym1 bezweifeln. Vielmehr könnten Komponenten des Minimalmediums als Ursache für die gezeigten Phänotypen der *zym1* defizienten Stämme herangezogen werden. Auf diesen Aspekt wird in einigen Abschnitten der Diskussion eingegangen werden. Auf der anderen Seite waren für alle MT *knock-out* Mutanten ein wesentlich geringeres Wachstum auch unter Normalbedingungen ermittelt worden. Dieser Aspekt wird unter 4.1.3 genauer diskutiert. Auch das stark verlangsamte Wachstum kann Einfluß auf die Ausprägung des Phänotyps haben. Hier könnte man die Wirkung des Penicillins als Beispiel heranziehen. Dieses β -Laktam-Antibiotikum verhindert die Vernetzung der Peptidoglykane in der Mureinschicht wachsender Zellen (Hänsel & Hölz, 1996). Daher wirkt dieses Antibiotikum toxisch nur auf sich teilende Zellen. Die Toxizität von Penicillin erscheint daher höher in wachsenden Zellen als in stationären. Nimmt man also an, daß besonders sich teilende Zellen von den toxischen Effekten der Metalle betroffen sind, so könnte das die erhöhte Toleranz der MT *knock-out* Mutanten im EMM-Medium erklären. Alle MT-Wildtypstämme wiesen eine circa zweifach erhöhte Verdopplungszeit im Vergleich zu den Δ *zym1* Mutanten auf (Abb. 3.2-1A; Abb. 3.4-1A). Die verminderte Toleranz aller MT-Wildtypen könnte daher wirklich durch das bessere Wachstum und die dadurch verstärkten Effekte von Schwermetallionen erklärt werden.

4.1.2. Glutathion als extrazellulärer Chelator hat keinen Einfluß auf das Wachstums- und Toleranzverhalten

Da die Ursachen für das unterschiedliche Wachstums- und Toleranzverhalten der Δ *zym1* Mutanten vermutlich in der Zusammensetzung der Medien zu suchen sind, wurden diese näher untersucht. Dabei wurden keine genauen Konzentrationsangaben für das Komplexmedium gefunden. Allerdings konnte in diesem Medium der Gehalt an Glutathion bestimmt werden. Während im EMM-Medium kein GSH nachzuweisen war, war im YE-Medium eine Konzentration von ca. 10 mg/l GSH ermittelt worden (3.6).

Intrazelluläres Glutathion ist als effektiver Chelator für Schwermetalle beschrieben (siehe 1.3). Die Sensitivität gegenüber Schwermetallen nimmt in GSH defizienten Organismen stark zu. So konnte für GSH-Defizienzmutanten in *S. pombe* eine bis zu 50fach bzw. circa vierfach erhöhte Sensitivität gegenüber Cadmium bzw. Kupfer ermittelt werden (Coblenz & Wolf,

1994). Weniger Daten gibt es jedoch zur Rolle des extrazellulären Glutathions für die Schwermetallbindung und Detoxifizierung. Es konnte allerdings gezeigt werden, daß die Zugabe von GSH zum umgebenden Medium die Cadmiumaufnahme in Fibroblastzellen aus Rattenleber erheblich herabsetzte und damit den Zellen ein Überleben in höheren Metallkonzentrationen ermöglichte (Kang, 1992).

Durch die Zugabe von Glutathion in das Minimalmedium sollte überprüft werden, ob sich die Toleranz gegenüber Schwermetallionen verändert. Es sollte untersucht werden, ob die vermutlich durch die höhere Teilungsrate der MT-Wildtypen verursachte geringere Toleranz durch die Zugabe eines externen Chelators gesteigert werden kann. Glutathion könnte durch Bindung von Metallionen die Effektivkonzentrationen der Metalle im Medium herabsetzen. Die Zugabe von 10 mg/l Glutathion in das Minimalmedium ergab jedoch keine Veränderung in der Toleranz zwischen Wildtyp- und MT *knock-out* Kulturen (Abb. 3.7-1A). Es konnte somit ausgeschlossen werden, daß die Effektivkonzentrationen von Cadmium, Kupfer und Zink im YE-Medium durch Komplexierung dieser Metalle mit Glutathion herabgesetzt und dadurch die unterschiedliche Toleranz verursacht wurde.

Auch auf das Wachstum unter Normalbedingungen hat die Zugabe von GSH keinen Einfluß. Es kann daher ausgeschlossen werden, daß die ermittelten Phänotypen der MT *knock-out* Mutanten mit der Abwesenheit von Glutathion im EMM-Medium in Verbindung stehen.

4.1.3. Die MT *knock-out* Mutanten zeigen ein reduziertes Wachstum unter Normalbedingungen nur im Minimalmedium

Metallothioneine wurden zwar in ihrer Eigenschaft als Metallchelatoren entdeckt, dennoch wurde ihnen ein wesentlich breiteres Spektrum an Funktionen zugeschrieben. Auffällig ist außerdem, daß für MT bisher keine essentielle Funktion unter Normalbedingungen nachgewiesen werden konnte. Um so überraschender war es, daß die Kontrollkulturen der *Δzym1* Mutanten in den Metallwachstumsassays im EMM-Medium ein stark reduziertes Wachstum aufwiesen (Abb. 3.2-1A). Diese nicht mit Metall behandelten Kulturen zeigten nur etwa ein Drittel des Wachstums, das für die unbehandelten MT-Wildtypstämme ermittelt werden konnte (Abb. 3.3-1A). Dieses Phänomen konnte für die im YE-Medium angezogenen Stämme nicht beobachtet werden (Abb. 3.3-1B). Hier zeigten alle Stämme ein analoges Wachstum. Warum das Wachstum der MT *knock-out* Stämme nur im EMM-Medium reduziert ist, konnte nicht geklärt werden. Auch konnten keine Publikationen herangezogen werden, in denen ähnliches beobachtet wurde. Vielmehr konnte in verschiedenen Organismenklassen gezeigt werden, daß das MT unter Normalbedingungen keine essentielle

Funktion hat. Das Wachstum von *S. cerevisiae* Wildtyp und $\Delta cup1$ zeigte keinerlei Unterschiede in Abwesenheit erhöhter Kupferkonzentrationen (Thiele *et al.*, 1987). Auch für MT Null Mäuse war kein Phänotyp unter Normalbedingungen zu beobachten (Masters *et al.*, 1994). Sie wiesen ein normales Wachstum und eine unveränderte Fertilität auf.

Eine Funktion der Metallothioneine unter Normalbedingungen könnte die Aktivierung von Enzymen darstellen. Hierbei würde das Apothionein, die metallfreie Form des MT, regulierend wirksam werden. Für viele Enzyme der Glykolyse und Komponenten der Signaltransduktion konnte bewiesen werden, daß Apothioneine eine wichtige Funktion in der Aktivierung dieser Proteine darstellen (Maret *et al.*, 1999). So binden sie spezifisch Zinkatome der *inhibitory binding sites* und aktivieren die Stoffwechsel- bzw. Signaltransduktionswege. Diese These könnte eine mögliche Erklärung für das verringerte Wachstum unter Minimalmedium darstellen. Allerdings wäre zu erwarten, daß der Verlust des funktionellen MT auch in den im Komplexmedium angezogenen Kulturen mit einer ähnlichen Wachstumsinhibierung einhergehen sollte.

Darüber hinaus wären Defizienzbedingungen im EMM-Medium als Ursache für das geringere Wachstum der MT *knock-out* Mutanten denkbar. Untersuchungen der Elementzusammensetzung der Medien zeigten jedoch, daß anorganische Komponenten das Wachstum wenig beeinflussen. Trotz unterschiedlicher Ausgangskonzentrationen in den beiden Medien waren die intrazellulären Konzentrationen der Elemente annähernd gleich (siehe auch 4.3). Daher wurde alle Aminosäuren zum Minimalmedium gegeben. Dieses zeigte kein verändertes Wachstum (Daten nicht gezeigt). Die Mutanten sind in der AS-Biosynthese nicht beeinflusst. Zusätzlich zu diesen Untersuchungen wurden die Medien in bestimmten Verhältnissen gemischt. Die Zugabe von 1/10 YE- in das EMM-Medium ist ausreichend, um ein gleiches Wachstum aller Stämme zu verursachen (Daten nicht gezeigt). Es muß davon ausgegangen werden, daß Spuren einer Komponente im YE-Medium ausreichend sind, um die Wachstumsdefizienz der Mutanten im EMM-Medium zu kompensieren. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung des YE-Mediums war es mir nicht möglich diese Komponente/Komponenten zu charakterisieren. Es wurde sich daher nur auf die Untersuchungen anorganischer Elemente, des Glutathions und der Aminosäuren beschränkt. Die Charakterisierung der für den Phänotyp verantwortlichen Substanz könnte Erkenntnisse über die Funktion des MT liefern. Welche Mangelbedingungen das sein könnten und welche Gene, die möglicherweise durch das MT reguliert werden, als Ursache für das schlechtere Wachstum im EMM-Medium zu nennen sind, sollte durch die Anwendung der Array und 2D-Technik ermittelt werden (siehe 4.10).

4.1.4. Zym1 ist nicht an der Kupferhomöostase unter Kupferdefizienzbedingungen beteiligt

Erstaunlich sind auch die Ergebnisse des Wachstums unter Kupferdefizienzbedingungen (siehe 3.4). Die in der Abb. 3.4-1A dargestellten Daten zeigen für das Minimalmedium ein zu den unter Normalbedingungen erhaltenen Ergebnissen inverses Wachstumsverhalten. Hier zeigten alle MT *knock-out* Stämme ein um 75 % gesteigertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp. Im YE-Medium sind auch hier keine signifikanten Unterschiede ermittelt worden (Abb. 3.4-1B). Allerdings muß, wie auch schon bei den Untersuchungen nach Schwermetallbehandlung angemerkt werden, daß die $\Delta zym1$ Mutanten ein generell schlechteres Wachstum unter Normalbedingungen im Minimalmedium zeigen. Gilt auch hier die Annahme, daß sich Kupferdefizienz in erhöhtem Maße in sich schneller teilenden Zellen auswirkt, könnte dies die Erklärung für den Phänotyp unter Kupferdefizienz darstellen.

Um dieses weiter zu verdeutlichen, wurde das Wachstum unter Kupfermangel nicht nur als Prozentwert der Normalkontrolle angegeben, sondern auch die absoluten Zelldichten analysiert. Hier ergeben sich für die im YE-Medium angezogenen Stämme wiederum keine Unterschiede (Abb. 3.4-2B). Betrachtet man die im EMM-Medium angezogenen Kulturen ist auch deren Wachstum vergleichbar (Abb. 3.4-2A). Für alle Stämme konnten Zelldichten von etwa 0,6 Absorptionseinheiten ermittelt werden. Zwar erreichen die Wildtypkulturen damit wirklich nur 25 % ihres eigentlichen Wachstums, während die Mutanten nahe zu unbeeinflusst wachsen. Jedoch ist zu beachten, daß eine ohnehin schon geringe Wachstumsrate als Bezugspunkt für die unter Kupferdefizienzbedingungen ermittelte Werte der $\Delta zym1$ Mutante zu einer Verzerrung der Daten führen kann, wie es für die Metallassays gezeigt wurde.

Eine erhöhte Sensitivität in sich schneller teilenden Zellen ist weniger durch die An- oder Abwesenheit eines Metallothioneins als vielmehr durch den höheren Bedarf an Kupfer, z. B. in neu entstehenden Zellen zu erklären.

Auf Grund des stark reduzierten Wachstums der MT-Wildtypstämme ist es nahezu ausgeschlossen, daß Zym1 für die Aufrechterhaltung der Kupferhomöostase nützlich ist. Gerade unter Defizienzbedingungen konnte gezeigt werden, daß MT die Belieferung bestimmter Kompartimente und Proteine mit Kupfer und Zink gewährleisten können. In Publikationen konnte gezeigt werden, daß MT die Bereitstellung von Kupfer und Zink unter extremen Mangelbedingungen gewährleisten. In *low zinc adapted* (LZA-LTK⁻) Fibroblastzellen aus Mäusen, die in zinkdefizientem Medium angezogen wurden, wurde eine nahezu vergleichbare Menge an Zink wie in Kontrollzellen gemessen (Suhy *et al.*, 1999). Die LZA-LTK⁻ Zelllinie zeigte sowohl eine konstitutiv höhere Transkriptmenge als auch eine

gesteigerte Proteinmenge an MT. Außerdem wurde das Zink fast ausschließlich an MT gebunden nachgewiesen. Die erhöhte Menge an Metallothioneinen gewährleistet eine wesentlich effizientere Zinkaufnahme unter Mangelbedingungen im Vergleich zu den Kontrollzellen.

Mäuse, die unter Kupferdefizienzbedingungen angezogen wurden, zeigten eine große Menge an Cu-MT (Suzuki *et al.*, 2002). Es wird vermutet, daß das Metallothionein das gesamte Kupfer degradierter Kupferproteine bindet, um es für Cu-Chaperone bereitzustellen. Diese gewährleisten ihrerseits eine Neusynthese von Cu-Proteinen. Durch die Komplexierung des Kupfers an MT wird ein Efflux der Kupferionen gerade unter Mangelbedingungen verhindert. Der Verlust eines solchen Proteins in *S. pombe* müßte daher eher mit einem noch schlechteren Wachstum der Mutanten unter Mangelbedingungen einhergehen, während MT-Wildtypstämme zwar ein reduziertes, aber nicht in dem gezeigten Maße geschwächtes Wachstum aufweisen sollten. Eine Funktion in der Kupferhomöostase bleibt nicht zuletzt in Hinblick auf das Wachstum der *S. pombe* Stämme im Komplexmedium, die kein verändertes Wachstum unter Kupferdefizienzbedingungen zeigen, äußerst unwahrscheinlich.

Interessant wären auch Untersuchungen zur Zinkdefizienz gewesen. Jedoch ist es weitaus schwieriger, Zinkmangelbedingungen in einem Medium zu generieren, ohne die Stoffwechselwege in ihrer Gesamtheit zu beeinflussen. Der Zinkchelator 1,10-Phenanthrolin (Phen) hat eine sehr hohe Affinität zu Zink. Mit Komplexbildungskonstanten von $10^{12,2}/M$ für $Zn(Phen)_2$ und $10^{17,1}/M$ für $Zn(Phen)_3$ ist die Zinkbindung eher irreversibel (Bird *et al.*, 2003). Eine Inhibierung der Aktivität wichtiger Zinkenzyme oder Transkriptionsfaktoren mit Zinkfingermotiven auf Grund der hochaffinen Bindung durch Phen kann zu Wachstumsinhibierungen führen. Diese würden aber nicht im Zusammenhang mit *Zym1* stehen. Die Zugabe von *N,N,N,N*-tetra(2-pyridylmethyl)-ethylendiamin (TPEN) wurde zwar für die Zinkdefizienzuntersuchungen in Säugerzell- jedoch nicht für Hefekulturen beschrieben. Das Einsetzen des unspezifischen Metallchelators EDTA hätte eine Komplexierung aller zweiwertigen Ionen, so z. B. auch Ca^{2+} und Mg^{2+} , zur Folge. Wachstumsinhibierungen ließen sich daher nicht ausschließlich durch eine Zinkdefizienz interpretieren.

4.2. *Δzym1* Mutanten nehmen weniger Zink auf

Die regulierte Aufnahme von Schwermetallionen ist ein Kontrollmechanismus, um toxischen Effekten dieser Ionen entgegenzuwirken. Generell zeigt eine an die Bedürfnisse der Zelle modulierte Aufnahme von Metallen die geringsten zelltoxischen bzw. wachstumshemmenden

Effekte. Die Regulation kann über die transkriptionelle Aktivierung verschiedener Transportsysteme geschehen. Für mehrere Organismen ist das parallele Vorhandensein von *low* und *high affinity* Aufnahmesystemen beschrieben wurden (siehe auch 1.2). Diese werden je nach Konzentration des jeweiligen Ions unterschiedlich aktiviert.

Aber nicht nur die Regulation von Transportern und die Konzentrationsverhältnisse der verschiedenen Ionen innerhalb und außerhalb der Zelle haben Einfluß auf die Aufnahme. Vielmehr spielen erste potentielle Chelatoren und deren Konzentrationen eine entscheidende Rolle. Die Abgabe der Schwermetallionen an intrazelluläre Bindungspartner scheint essentiell. Die Bindung von Metallionen an initiale Chelatormoleküle resultiert in freien Bindungsstellen der Transportproteine. Des weiteren wird durch die Komplexbildung der Metalle ein Einstellen eines Konzentrationsgleichgewichts auf beiden Seiten der Diffusionsbarriere verhindert. Dieses kann zusätzlich durch den Transport von Metall-Chelatorkomplexen in Kompartimente erreicht werden. Ob Metallionen jemals als freie Ionen in einer Zelle vorkommen ist fraglich. In Hefezellen konnte kein freies Kupferion detektiert werden (Rae *et al.*, 1999). Weniger als ein freies Atom bzw. Ion Zink pro Zelle konnte für *E. coli* gemessen werden (Outten & O'Halloran, 2001). Ähnliches konnte für eukaryotische Zellen gezeigt werden (Sensi *et al.*, 1997). Diese Beobachtungen unterstreichen die Wichtigkeit von intrazellulären Bindungspartnern.

Die wichtigsten zytosolischen Chelatoren für Cadmiumionen in *S. pombe* sind die Phytochelatine, die durch die Phytochelatinsynthase synthetisiert werden. Inaktiviert man dieses Enzym, so ist die Spaltheife nicht mehr in Lage, PC zu bilden und ist stark cadmiumsensitiv (Clemens *et al.*, 1999). Andererseits konnte gezeigt werden, daß die Überexpression der PCS die Cadmiumakkumulation um mehr als 30 % steigern kann. Hierbei wird angenommen, daß Phytochelatine die Antriebskraft für die Cadmiumaufnahme darstellen.

Der Vergleich der Aufnahme von MT-Wildtyp und MT *knock-out* Stämmen sollte zeigen, ob Zym1 ebenfalls als Bindungspartner für Schwermetallionen fungieren kann und Einfluß auf die Metallaufnahme hat. Die dafür notwendigen Untersuchungen wurden abhängig und unabhängig vom Kulturmedium durchgeführt. Für letztere Untersuchungen wurde, wie in der Publikation Lin und Kaplan beschrieben, verfahren (Lin & Kosman, 1990). Hier wurde die Aufnahmerate des Wildtyps mit der des MT *knock-out* $\Delta cup1$ aus *S. cerevisiae* verglichen. Es konnten keine Unterschiede in der Kupferaufnahme zwischen diesen beiden Stämmen beobachtet werden. Eine Metallaufnahme scheint in diesem Fall unabhängig von der Expression des Cup1 zu sein. Ähnliches konnte auch für *S. pombe* Stämme gezeigt werden

(Abb. 3.5-1A u. B). Die verschiedenen Stämme wurden mit gleichen nicht-toxischen Konzentrationen von Kupfer- und Cadmiumionen im MES-Aufnahmepuffer behandelt. Für beide Metalle konnte auch hier keine veränderte Aufnahme zwischen MT-Wildtyp und *zym1 knock-out* Mutanten ermittelt werden. Die verringerte Akkumulation von Cadmiumionen des Doppel-*knock-out* $\Delta SpPCS \Delta zym1$ und $\Delta SpPCS$ ist, wie bereits diskutiert, einzig auf das Fehlen von Phytochelatinen als Cd-Chelatoren zurückzuführen.

Für die Untersuchungen der medienabhängigen Metallaufnahme wurden die einzelnen *S. pombe* Stämme mit dem für das jeweilige Medium ermittelte IC_{50} -Wert behandelt (siehe Tabelle 3.2-1). Hierbei waren die Werte des MT-Wildtyps und des dazugehörigen MT *knock-out* Stammes im YE-Medium identisch, während es für die im EMM-Medium angezogenen Stämme große Unterschiede gab. Die Untersuchungen im EMM-Medium waren in Hinblick auf die unterschiedlichen Toleranzen der einzelnen Stämme nur unter erschwerten Bedingungen durchführbar. Hierbei mußte zwischen den für alle Stämme gleichen nicht-toxischen Konzentrationen oder der Verwendung der IC_{50} -Wertkonzentrationen entschieden werden. Da die IC_{50} -Werte für das Cadmium im EMM-Medium so weit auseinanderlagen und anzuzweifeln ist, das Effekte bei $1 \mu M$ $CdCl_2$ für den Wildtyp bzw. für die $\Delta zym1$ Mutante zu erwarten sind, aber auch in Hinblick auf alle weiteren Experimente, die unter Verwendung der IC_{50} -Konzentrationen durchgeführt wurden, wurden alle Kulturen mit diesen Konzentrationen behandelt. Um die erhaltenen Ergebnisse aber dennoch vergleichen zu können, sollten speziell für die im EMM-Medium durchgeführten Untersuchungen die relativen Aufnahmeherangezogen werden.

Prinzipiell wurden auch für die medienabhängigen Aufnahmeuntersuchungen keine Unterschiede in der Cadmium- oder Kupferaufnahme ermittelt. Die Akkumulation der Metalle durch Wildtyp und $\Delta zym1$ bzw. $\Delta SpPCS$ und dem Doppel-*knock-out* $\Delta SpPCS \Delta zym1$ ist vergleichbar (Abb. 3.5-3 u. Tabelle 3.5-2). Die Kupferaufnahme in den PCS defizienten Stämmen im Komplexmedium ist reduziert. Beide $\Delta SpPCS$ Mutante zeigen eine 50 %ige Reduktion in der absoluten wie auch in der relativen Aufnahme von Kupferionen. Diese konnte weder für die medienunabhängige noch für die im EMM-Medium durchgeführten Untersuchungen gezeigt werden. Da dieses Resultat nicht im Zusammenhang mit Zym1 steht, wurde der Klärung dieser Aufnahmeinhibierung nicht weiter nachgegangen.

Die Cadmiumaufnahme zwischen Wildtyp und $\Delta zym1$ bzw. $\Delta SpPCS$ und $\Delta SpPCS \Delta zym1$ im YE-Medium unterscheiden sich nicht. Damit konnten die in der Publikation von Borrelly und Ko-Autoren gezeigten Daten bestätigt werden (Borrelly *et al.*, 2002). Auch hier konnten keine

Unterschiede in der Cadmiumakkumulation zwischen Wildtyp und dem *zym1 knock-out* gezeigt werden.

Anders verhält es sich jedoch mit der Zinkaufnahme. Hier konnte eine etwa 50 %ige Reduktion ermittelt werden. Dieses konnte sowohl für die medienabhängigen als auch medienunabhängigen Untersuchungen gezeigt werden (Abb. 3.5-4 u. Abb. 3.5-1C). Da sowohl in allen drei Aufnahmemedien als auch in zwei verschiedenen genetischen *backgrounds*, Wildtyp und $\Delta SpPCS$, der Verlust des funktionellen Metallothioneins Zym1 mit einer verringerten Zinkaufnahme einhergeht, scheint es sicher, daß dieses MT direkt oder indirekt an der Aufnahme des Zinks beteiligt ist. Auch in den von Borrelly und Ko-Autoren durchgeführten Untersuchungen wurde eine reduzierte Zinkaufnahme ermittelt (Borrelly *et al.*, 2002).

Zym1 könnte als Chelator für Zink fungieren und somit die Zinkaufnahme positiv regulieren. Daß MT den Zinktransport in die Zelle modulieren können, konnte anhand von Fibroblastzellen (LZA-LTK⁻) aus Mäusen, die unter zinklimitierenden Bedingungen angezogen wurden, bewiesen werden (Suhy *et al.*, 1999). Obwohl die Ausgangskonzentration an Zink in den LZA-LTK⁻ um das 50fache geringer war als in den Kontrollkulturen, war kein signifikanter Unterschied in der Zinkaufnahme zu verzeichnen. Das MT stellte hier die treibende Kraft für die Aufnahme dar. Dieses konnte anhand des höheren mRNA- und Proteingehaltes des MT als auch durch die Tatsache, daß Zink fast ausschließlich an das MT gebundene ist, bestätigt werden.

Widersprüchlich dazu sind allerdings die unter 3.10 gezeigten Ergebnisse. Hier konnte Zinkbindung des Zym1 nicht nachgewiesen werden. Auf der anderen Seite wurde Zym1 als *zinc yeast metallothionein* beschrieben (Borrelly *et al.*, 2002). Die Metallbindung des Zym1 soll jedoch in Kapitel 4.5 genauer diskutiert werden.

4.3. Wildtyp und $\Delta zym1$ zeigen unterschiedliche Kalziumakkumulation nach Kupferzugabe

Neben den Untersuchungen zur Metallaufnahme wurden auch die Konzentrationen anderer essentieller Elemente in $\Delta zym1$ und Wildtyp unter Berücksichtigung der verschiedenen Kulturbedingungen verglichen (siehe 3.6).

Sollte das MT Einfluß auf die Akkumulation eines dieser Elemente haben, könnte dieses als Ursache für den unter Minimalmedium ermittelten Phänotyp gelten.

Trotz der teilweise recht unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen der Elemente in den verschiedenen Medien (Tabelle 3.6-3) sind ihre ermittelten zellulären Konzentrationen vergleichbar. Defizienzbedingungen und eine mögliche verminderte Aufnahmeleistung der $\Delta zym1$ Mutanten im EMM-Medium können demnach als Ursache des stark verringerten Wachstums ausgeschlossen werden.

Des weiteren deutet die analoge Aufnahme auf eine strikte Regulierung der Aufnahme, selbst für essentielle und eher nicht-toxische Elemente hin. Obwohl beispielsweise die Phosphatkonzentration im EMM-Medium um eine Größenordnung höher ist, sind die zellulären Konzentrationen in den Kulturen beider Medien gleich (Tabelle 3.6-1 u. Tabelle 3.6-2). Noch viel drastischer sind die Unterschiede für Mangan. Eine 25fach höhere Konzentration im EMM-Medium resultiert auch hier in einer annähernd gleichen Akkumulation in den Kulturen beider Medien. Der Stoffwechsel der Hefezelle erfordert demnach genaue Elementkonzentrationen.

Unter allen getesteten Elementen ergaben sich signifikante Unterschiede nur im Kalziumgehalt (Abb. 3.6-1). In den *S. pombe* Wildtypkulturen konnte eine Erhöhung der Kalziumkonzentration um das Vier- bis Zweifache im EMM- bzw. YE-Medium im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen werden. Diese Konzentrationssteigerung war nur nach Kupfer-, nicht aber nach Cadmium- und Zinkbehandlung zu verzeichnen. Interaktionen zwischen hohen Kupferkonzentrationen und Kalziuminflux sind aber kaum beschrieben.

Dennoch konnte dieses Phänomen auch in *S. cerevisiae* beobachtet werden. Hier sollten die kompetitiven Effekte verschiedener Metalle auf den als Kalziumtransporter beschriebenen Transporter LCT1 untersucht werden (Clemens *et al.*, 1998). Die Kalziumaufnahme wurde durch kompetitierende Ionen wie Cadmium, Zink und Blei herabgesetzt. Die Zugabe von Kupfer verursachte jedoch auch hier einen massiven Kalziumeinstrom. Auch für die Bäckerhefe konnte keine Erklärung für diesen Influx gefunden werden.

Eine mögliche Theorie könnte jedoch die protektive Rolle des Kalziums gegen Kupferionen darstellen (Karamushka & Gadd, 1994). Eine erhöhte Konzentration an Kalziumionen bewirkt eine Konkurrenz mit den Kupferionen und kann daher zelltoxische Reaktionen hemmen. Warum auf toxische Konzentrationen von Cadmiumionen bzw. nicht-physiologischen Zinkmengen nicht ebenfalls mit einem Kalziuminflux geantwortet wird, liegt an der inhibierenden Wirkung dieser Metalle auf Kalziumkanäle. Besonders Cadmium ist als Kalziumionenkanalblocker bekannte und vermindert die Kalziumakkumulation in Pflanzen

wie auch Säugern (Zhu, 1999); (Alshuaib *et al.*, 2003). Aber auch Zink bedingt eine reduzierte Kalziumaufnahme (Clemens *et al.*, 1998).

Interessant ist besonders, daß ein gesteigerter Kalziuminflux nur im Wildtyp, aber nicht in der $\Delta zym1$ Mutante zu finden ist. Hier verhalten sich die Kalziumkonzentrationen der kupferbehandelten Kulturen wie die der Kontrollkulturen, obwohl annähernd gleiche Mengen an Kupferionen auch von der Mutante aufgenommen werden. Eine durch Lipidoxidation verursachte verstärkte Durchlässigkeit von Kupferionen kann daher ausgeschlossen werden. Ein analoger Effekt wäre auch in $\Delta zym1$ zu erwarten. Es kann demnach postuliert werden, daß Zym1 direkt oder indirekt in den Kalziummetabolismus involviert ist.

Bemerkenswert ist außerdem, daß, obwohl alle Wachstumsuntersuchungen unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Verwendung der Medien lieferten, die Konzentrationseffekte für das Kalzium in beiden Medien vergleichbar waren.

Aus der Literatur ist bekannt, daß Kalzium zu einer Transkriptakkumulation von MT-Genen führen kann (Miyahara *et al.*, 1986). Weiterhin ist es ein für mehrere zellphysiologische Prozesse benötigtes Element. Es fungiert als *second messenger* und reguliert den Zellzyklus (Anraku *et al.*, 1991).

Allerdings sind die Unterschiede der Kalziumgehalte in den Kontrollkulturen zu geringfügig, um beispielsweise das Wachstumsverhalten zwischen Wildtyp und Mutante unter Normalbedingungen zu erklären. Der Kalziumgehalt der Mutante ist zwar um 50 % im Vergleich zum Wildtyp reduziert und könnte das langsamere Wachstum im EMM-Medium erklären. Allein die Betrachtung des Wachstum im Komplexmedium läßt diese Hypothese abwegig erscheinen. Auch hier ist der Ca-Gehalt um die Hälfte reduziert, resultiert aber nicht in einer verminderten Wachstumsrate.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die mögliche Interaktion des MT und des Kalziuminfluxes keinen Einfluß auf die Zellteilung hat.

Prinzipiell scheint das MT gemeinsam mit dem Kalzium nur unter Kupfer im Zusammenhang zu stehen. Dieses stützt die These, daß Hefe-MT und auch Zym1 kupferbindende MT sind.

Generell kann aber im Komplexmedium kein Phänotyp der MT *knock-out* Mutanten nach Kupferbehandlung beobachtet werden. Zusätzlich dazu ist die Toleranzsteigerung des $\Delta zym1$ gegenüber Kupfer im EMM-Medium am geringsten.

Welche Rolle der höchstwahrscheinlich durch das MT vermittelte Kalziuminflux für die Zelle spielt, konnte nicht eindeutig geklärt werden.

4.4. Es gibt keine Interaktionen zwischen Metallothioneinen und Phytochelatinen in *S. pombe*

Yu und Ko-Autoren postulierten für Organismen, die sowohl über Phytochelatine als auch Metallothioneine verfügen, daß die MT den Hauptmechanismus der Detoxifizierung darstellen (Yu *et al.*, 1994). Weiterhin konnte eine metallabhängige Aktivierung der MT bzw. PC beobachtet werden. In *Candida glabrata* wurde die Synthese von PC durch Cadmium induziert (Mehra *et al.*, 1988). Während Cd^{2+} durch PC chelatiert vorlag, wurde Kupfer über MT gebunden. Interessant ist außerdem die Tatsache, daß beim Verlust des funktionellen MT aus *C. glabrata* Phytochelatine keinen alternativen Mechanismus der Kupferdetoxifizierung darstellen (Mehra *et al.*, 1992).

Auch *S. pombe* besitzt sowohl PC als auch MT. Ob der Verlust des Zym1 Einfluß auf die PC-Bildungsrate hat und ob diese im Zusammenhang mit den in die Zelle aufgenommenen Metallionen steht, sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden.

In den im EMM-Medium angezogenen Kulturen war sowohl eine cadmium- als auch kupferinduzierte PC-Synthese zu beobachten (Abb. 3.8-3B u. C).

Hierbei korrelierte die PC-Bildung mit der Metallaufnahme. Eine vergleichbare Kupferaufnahme resultierte in einer analogen PC-Bildung sowohl in Wildtyp als auch der MT *knock-out* Mutante. Nach Cadmiumzugabe konnte für den Wildtyp und Δzym1 eine Verbindung zur Aufnahme gezeigt werden. Die um etwa ein Drittel erhöhte Cadmiumkonzentration des Δzym1 geht mit einer um 33 % gesteigerten PC-Bildung einher. Signifikante Unterschiede in der PC-Bildung zwischen den MT-Wildtyp und MT *knock-out* Stämmen konnten nicht gezeigt werden.

Nicht zu erklären ist allerdings, warum Δzhf und $\Delta\text{zhf } \Delta\text{zym1}$ trotz einer dem Wildtyp bzw. Δzym1 vergleichbaren Cadmiumaufnahme eine deutlich reduzierte PC₃-Konzentration zeigten. Da dieses Phänomen eher mit dem Inaktivieren des Zhf als mit dem Zym1 in Verbindung steht, wurde hierauf nicht weiter eingegangen.

Ein komplett anderes Bild ergab sich für die im Komplexmedium angezogenen Kulturen. Hier korrelierte die Cadmiumaufnahme zwar mit der PC-Bildung, allerdings konnte keine PC-Synthese nach Kupferbehandlung beobachtet werden (Abb. 3.8-4B u. C). Zwar ist Kupfer ein weitaus schwächerer Induktor der Phytochelatinbiosynthese als Cadmium, aber auch dieses Metall ist in der Lage, PC-Bildung zu induzieren (Grill *et al.*, 1989). Dieses konnte in den im EMM-Medium angezogenen Kulturen auch gezeigt werden. Auch in Hinblick auf die Aufnahmeuntersuchungen scheint die fehlende PC-Bildung ungewöhnlich. Die unter 3.5.2 dargestellten Ergebnisse zeigen eine circa fünffach höhere Kupferakkumulation in den YE-

Kulturen. D. h., daß ausreichende Konzentrationen an Kupferionen für die Aktivierung der Phytochelatinsynthese in den Hefezellen vorhanden sein müßten. Ausgeschlossen werden muß, daß die erhöhte Konzentration an Kupfer zum Zelltod geführt hat. Bei den für die Kupferbehandlung eingesetzten Konzentrationen handelte es sich um subletale Konzentrationen, wie aus den Wachstumsassays hervorgeht (siehe Abb. 3.2-3).

Da sowohl in der MT-Wildtyp- als auch den MT *knock-out* Stämmen keine PC-Synthese gezeigt werden konnte, wird darauf in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen. Dieses Resultat steht nicht im Zusammenhang mit dem Zym1.

Prinzipiell konnte festgestellt werden, daß die PC-Rate mit der Metallaufnahme korreliert und das Zym1 keinen Einfluß auf die PC-Bildung hat.

4.5. Ist Zym1 ein zinkbindendes Metallothionein?

Metallothioneine nehmen eine Sonderstellung unter den metallbindenden Proteinen ein. Bis zu 30 % der Aminosäuren sind Cysteine, aromatische AS-Reste fehlen völlig und Histidine sind äußerst selten in den Primärsequenzen von MT zu finden (Hamer, 1986). Das Fehlen aromatischer Aminosäuren ermöglicht erleichterte Untersuchungen der Metallbindung unter Verwendung spektroskopischer Methoden wie Lumineszenz, UV-Absorptionsspektroskopie und Circular dichroismus. So kann die Bindung von Metallen einfach durch die erwähnten spektroskopischen Techniken verfolgt werden. Hierbei verursacht der Übergang vom freien zum metallbindenden Thiol eine Wellenlängenverschiebung, die in den Bereichen zwischen 220 nm bis 350 nm liegt (Stillman, 1995). Beim Vorhandensein aromatischer AS wäre dieser Bereich komplett maskiert und könnten nicht für Analysen herangezogen werden.

Generell konnte die Bindung an Metallothioneine *in vivo* nur für die Metalle Cadmium, Kupfer, Zink gezeigt werden. Dabei konnte für die MT tierischer Organismen von Invertebraten bis hin zu Säugern hauptsächlich Zink- und Cadmiumbindung beschrieben werden (Shaw *et al.*, 1991). Dieses spiegelt sich auch in der Toleranz dieser Organismen wieder. Generiert man MT Null Mäuse, so resultiert dieses in einer erhöhten Cadmiumsensitivität. Cadmiumbindung wurde neben Säuger-MT beispielsweise auch am MT des Anneliden *Lumbricus rubellus* nachgewiesen (Stürzenbaum *et al.*, 2001).

Alle bisher untersuchten Hefen zeigten hauptsächlich Kupferbindung. So ist das MT aus *S. cerevisiae* ursprünglich als **Cu** *proteine* bezeichnet worden (Hamer *et al.*, 1985). Für eine weitere Hefe *C. glabrata* konnte ein kupferbindendes MT nachgewiesen werden, während Cadmium durch Phytochelatine gebunden wird (Mehra *et al.*, 1988).

Das von Borrelly und Ko-Autoren als *Zym1* für *zinc yeast metallothionein* bezeichnete MT aus *S. pombe* würde somit das erste zinkbindende Hefe-MT darstellen (Borrelly *et al.*, 2002). Da Zinkbindung für diese Klasse von MT untypisch ist, keine erhöhte Sensitivität nach Zinkbehandlung ermittelt wurde und Veränderungen der Elementzusammensetzung des Wildtyps nur nach Kupferzugabe nachgewiesen wurde, sollte die Metallbindung nochmals näher untersucht werden. Während in der erwähnten Publikation das MT gereinigt und Zinkbindung spektrophotometrisch nachgewiesen wurde, sollte in der vorliegenden Arbeit Metallbindung auf dem klassischen Weg untersucht werden. Auf Grund der großen Instabilität des MT wurde auf eine Reinigung dieses Proteins verzichtet. Die erhaltenen Proteinextrakte wurden nur durch Azetonfällung behandelt, um die Proteine höherer Molekulargewichte zu entfernen und das Proteinmuster der chromatographische Trennung auf niedermolekulare Proteine zu reduzieren. Direkt nach der Fällung wurden die Extrakte durch Gelfiltration nach Molekulargewichten getrennt und die Metallgehalte mittels Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt. Hierbei konnte weder für Cadmium noch für Zink ein erhöhter Ionengehalt in den durch vorherige Kalibrierung bestimmten Fraktionen ermittelt werden (Abb. 3.10-2B u. D und Abb. 3.10-3B u. D). Für die mit Kupfer behandelten Kulturen wurde die Induktion eines Proteinpeaks, in dem fast das gesamte Kupfer akkumulierte, gezeigt (Abb. 3.10-4B u. D). Dieses Ergebnis wurde für beide Medien analog erhalten.

Um sicher zu gehen, daß es sich nicht um ein anderes Protein handelt, wurde auch der MT *knock-out* untersucht. Erstaunlicherweise wurde auch hier ein Kupferpeak ohne das Vorhandensein des Proteinpeaks detektiert (Abb. 3.10-5A u. B). Allerdings erstreckte sich die Kupferbindung über einen größeren Molekulargewichtsbereich als beim Wildtyp zu beobachten war. Es kann also angenommen werden, daß speziell im $\Delta zym1$ andere Proteine an der Kupferbindung beteiligt sein können. Da die massenspektrometrischen Untersuchungen der putativen MT-haltigen Gelfiltrationsfraktionen keine Ergebnisse lieferten, sollte der MT *knock-out* *FY261* $\Delta zym1$ mit pSLF172/*zym1* transformiert werden. Im Plasmid pSLF172 wird *zym1* mit einem Hämagglutinin-Tag (HA-Tag) fusioniert, so daß die Detektion des *zym1-HA* Genproduktes leicht mit dem für den Tag spezifischen HA-Antikörper vorgenommen werden konnte.

Die Dot-Blotanalyse zeigte deutliche Signale nur in der kupferbehandelten Probe (Abb. 3.10-6F). Die Antikörperfärbung korrelierte hier mit den Fraktionen der Kupferakkumulation (Abb. 3.10-6E). Für die mit Zink und Cadmium behandelten Kulturen konnte *Zym1-HA* nur schwach detektiert werde (Abb. 3.10-6B u. D). Im Chromatogramm ist kein Proteinpeak zu

erkennen (Abb. 3.10-6Au. C). Allerdings ist die Verteilung der Metalle wie schon bei den Wildtypkulturen über ein breites Molekulargewichtsspektrum verteilt.

Welche der beiden für die Metallbindung herangezogene Methode die bessere ist, bleibt zu diskutieren. Die Reinigung des MT birgt die Gefahr der Degradierung des Proteins. Des weiteren ist es sehr schwierig, eine hochreine homogene Proteinpräparation zu erhalten. Bei einem Anteil von mehr als 3 % Zinkproteine im Proteinrohextrakt ist die Wahrscheinlichkeit einer Verunreinigung durch ein zinkbindendes Protein sehr hoch und kann zu artifiziellen Messungen führen. Allerdings wurde die Reinheit der Proteinpräparation mittels SDS-PAGE bestätigt und das Protein aminoterminal ansequenziert (Borrelly *et al.*, 2002).

Auf der anderen Seite bergen auch die hier gezeigten Daten Risiken. Dadurch, daß mit dem Proteinrohextrakt, in dem nur höhermolekulare Proteinen präzipitiert wurden, gearbeitet wurde, muß für eine eindeutige und verlässliche Aussage zur Metallbindung das Protein in den kupferhaltigen Fraktionen sequenziert werden. Gerade hier sind im Vergleich mit der in Borrelly *et al.* verwendeten Methode Verunreinigungen durch andere Proteine der gleichen Molekularen Masse möglich. Besonders die Existenz eines nahezu vergleichbaren Kupferpeaks in der MT *knock-out* Mutante läßt keine verlässliche Aussage über die tatsächliche Metallbindung des MT zu. Eindeutig hingegen sind die Daten des transformierten $\Delta zym1$. Ein Zym1-HA Peak konnte nur nach Kupferbehandlung detektiert werden. In diesem Peak ist nahezu das gesamte Kupfer akkumuliert. Erstaunlich sind die Daten, wenn man in Betracht zieht, daß das Plasmid pSLF172 über einen starken, konstitutiven und metallunabhängig regulierten Promotor, den *nmt*-Promotor, verfügt. Die Expression des *zym1* und die Akkumulation seines Genproduktes sollten somit konstitutiv und unabhängig von der Metallbehandlung sein. Trotzdem konnte Zym1-HA nach Zink- und Cadmiumbehandlung der Kulturen kaum detektiert werden. Eine Ursache hierfür könnte die unterschiedliche Stabilität der metallbindenden MT sein. Aus der Literatur ist bekannt, daß Metallothioneine gegenüber Apothioneinen, der metallfreien Form der MT, stabilisiert und gegen Proteolyse geschützt sind (Winge *et al.*, 1985). Sollte Zym1 Kupfer binden, so könnte dieses die Erklärung für die wesentlich stärkere Detektion des Proteins unter Kupferbedingungen sein.

Um diese Stabilisierungstheorie zu beweisen, wurden einfache Stabilitätsassays durchgeführt. Hierbei wurde der *turnover* des Proteins unter verschiedenen Streß- und Normalbedingungen verglichen. Die Proteinextraktion und Azetonpräzipitation erfolgte analog zu den für die Gelfiltration eingesetzten Proben. Mittels Western-Blot sollte die Stabilität untersucht werden. Eine reduzierte Signalstärke, der auf eine gleiche Proteinkonzentration eingestellten Proben, sollte als Maß für die Stabilität gelten.

Entgegen der in den Gelfiltrationsexperimenten erhaltenen Ergebnisse konnte Zym1-HA in allen metallbehandelten Proben annähernd gleich stark detektiert werden (Abb. 3.11-1). Eine leichte Reduktion war nur in der H₂O₂ behandelten Probe zu verzeichnen. Die Komplexierung von Metallionen scheint entweder keinen Einfluß auf die Stabilität zu haben oder die Behandlung der Proben ist essentiell für den Verlust der Metallbindung. Für eine Vielzahl von Säulenmaterialien ist eine Affinität zu Schwermetallionen beschrieben. Sollte Zym1 Cadmium, Zink und Kupfer mit unterschiedlichen Komplexbildungskonstanten binden, so könnte dies die unterschiedlichen Ergebnisse erklären. Wenn die Komplexierung des Kupfers stärker als die des Cadmiums und Zinks wären, so könnte die Bindung der letzten beiden Metalle zum MT leicht gelöst werden und die Metalle auf der Säule verbleiben. Dieser Verlust des Metalls durch die chromatographische Methode könnte somit zu einer verringerten Stabilität führen und die Erklärung für das Fehlen der Proteinfractionen, die Zym1-HA enthalten, darstellen.

4.6. Zym1 ist hauptsächlich zytosolisch lokalisiert

In der Literatur sind MT oft als zytosolisch vorkommend beschrieben. Allerdings können sie unter bestimmten Bedingungen in andere Zellkompartimente transportiert werden. So konnte das unter Normalbedingungen zytosolisch lokalisierte MT des Erdwurms *Lumbricus rubellus* nach Cadmiumbehandlung hauptsächlich in Vesikel detektiert werden (Stürzenbaum *et al.*, 2001). Auf Grund der Ko-Lokalisierung des MT und des Cadmiums wurde angenommen, daß das Metallothionein an der Exkretion des Cd beteiligt ist. Als weiteres Beispiel soll die Translokation von MT in den Zellkern genannt werden. Es konnte beobachtet werden, daß in Säugerzellen MT wie auch Zink während der frühen S-Phase des Zellzyklus' in den Kern transportiert werden (Tsujikawa *et al.*, 1991). Es wurde postuliert, daß das MT hierbei als Transportprotein für die Zinkionen fungiert. Zink wird im Zellkern, z. B. für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren mit Zinkfingerdomänen, benötigt. Nach Beendigung der S-Phase wird das MT wieder zurück in das Zytosol transportiert (Beyersmann & Haase, 2001). Des weiteren konnte auch ein Transport von MT in die Mitochondrien nachgewiesen werden (Ye *et al.*, 2001). Auf diesen Aspekt wird in Kapitel 4.7 genauer eingegangen.

Auch in der vorliegenden Arbeit sollte die Lokalisierung des Zym1 untersucht werden. Hierfür wurde wiederum der mit pSLF172/*zym1* transformierte *FY261 Δzym1* verwendet. Die Lokalisierung wurde unter Normal- und Metallstreßbedingungen untersucht. Dabei ergaben sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Kulturbedingungen. Die Lokalisierung des MT konnte als zytosolisch nachgewiesen werden (Abb. 3.9-1). Allerdings muß angemerkt

werden, daß die Zellen nicht synchronisiert vorlagen. D. h. die Hefekultur repräsentierte einen Durchschnitt aller Zellteilungs- und Wachstumsphasen. Sollte eine Translokation nur zu einem bestimmten Zeitpunkt im Zellzyklus zu verzeichnen sein, so würde dieses durch Zellen anderer Stadien überlagert werden. Des weiteren muß beachtet werden, daß die Expression des MT nicht unter dem natürlichen, sondern unter dem stark konstitutiven metallunabhängigen nmt-Promotor stand. Eine falsche Lokalisierung auf Grund der Überexpression kann nicht ausgeschlossen werden. Prinzipiell läßt sich aber sagen, daß Zym1-HA hauptsächlich zytosolisch vorliegt und daß eine Metallzugabe bzw. -bindung keinen Einfluß auf die Lokalisierung hat.

4.7. Die Atmungsaktivität des MT *knock-out* ist nur leicht reduziert

Obwohl in Abb. 3.9-1 nur ein Signal in der zytosolischen Fraktion des Proteinextraktes detektiert wurde, sollte, wie in Kapitel 4.6 diskutiert, eine Lokalisation in anderen Organellen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Neben Translokationen der MT in den Zellkern und in Vesikel konnte mehrfach ein Transport dieser Proteine in die Mitochondrien gezeigt werden. In Rattenleberzellen wurden MT nach Kupferbehandlung in den Mitochondrien als Cu-MT nachgewiesen (Sakurai *et al.*, 1993). Aber auch Zink kann von Metallothioneinen in dieses Zellkompartiment transportiert werden (Ye *et al.*, 2001).

Wie der Transport durch die mitochondrialen Membranen vonstatten geht, konnte noch nicht geklärt werden. Dem MT fehlt ein für die Mitochondrien spezifisches Signalpeptid, welches den Transport zu diesem Zellorganell dirigiert. Auch dem Cox17 fehlt ein solches Signalpeptid. Cox17 ist ein Kupferchaperon, das Kupfer für die Cytochrom-c Oxidase zur Verfügung stellt (siehe 1.6). Es hat ebenfalls kein mitochondriales Signalpeptid und auch der Mechanismus des Transports ist nicht bekannt. Dennoch ist eindeutig bewiesen, daß Cox17 in die Mitochondrien transportiert wird. Interessant ist außerdem die Tatsache, daß Metallothioneine Homologie zu diesem Kupferchaperon aufweisen (Ye *et al.*, 2001). Diese Homologie bezieht sich nicht nur auf das Molekulargewicht, sondern auch auf die Verteilung der Cystein- und Lysinreste. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, daß neben Cox17 auch die Metallothioneine an der Rekonstitution der Cytochrom-c Oxidase mit Kupfer beteiligt sind. Auf der anderen Seite könnten MT aber auch Zink in die Mitochondrien transportieren und die Atmungsaktivität modulieren. So konnte bewiesen werden, daß Zink alle vier Komplexe der Atmungskette hemmen kann (Skulachev *et al.*, 1967).

In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob Zym1 in der Lage ist, in die Mitochondrien zu gelangen und Einfluß auf die Atmungsaktivität hat. Dieses sollte durch den

Vergleich des Sauerstoffverbrauchs von Wildtyp und $\Delta zym1$ ermittelt werden. Dabei wurde die Atmung dieser beiden Stämme auch unter Berücksichtigung der verschiedenen Medien miteinander verglichen. Hierbei konnte in beiden Medien eine Erhöhung der Atmungsaktivität des Wildtyps um etwa 10 bis 15 % ermittelt werden (Abb. 3.13-1). Postuliert man, daß die Rekonstitution der Cytochrom-c Oxidase mit Kupfer hauptsächlich durch Cox17 gewährleistet wird und Zym1 nur eine zusätzliche Bereitstellung dieses Ions vermittelt, könnte die leichte Reduktion des Sauerstoffverbrauchs der Mutante mit dem Fehlen des funktionellen MT erklärt werden.

Daß die leicht reduzierte Atmungsaktivität der $\Delta zym1$ Mutante auch das langsamere Wachstum im EMM-Medium erklärt, ist eher auszuschließen (siehe Abb. 3.3-1A). Eine vergleichbare Reduktion der Atmungsaktivität ist auch im YE-Medium zu verzeichnen. Hier konnte allerdings kein reduziertes Wachstum unter Normalbedingungen beobachtet werden (siehe Abb. 3.3-1B). Weitere Indizien, die diese These widerlegen, sind die Wachstumsuntersuchungen unter Verwendung nicht-fermentativer Kohlenstoffquellen im Medium. Durch die Zugabe von 3 % (w/v) Glycerin und 2 % (v/v) Ethanol in das EMM- und YE-Medium ist *S. pombe* nicht mehr in der Lage, diese C-Quellen zu vergären. Sie können nur durch oxidative Phosphorylierung (Atmung) metabolisiert werden. Die Wachstumsuntersuchungen unter nicht-fermentativen Bedingungen ähneln denen, die in glukosehaltigen Medien durchgeführt wurden. Auch hier gibt es keine Unterschiede im Wachstum zwischen Wildtyp und $\Delta zym1$ im YE_{Gly/EtOH} (Abb. 3.13-1). Im EMM_{Gly/EtOH} zeigt die Mutante erneut ein reduziertes Wachstum. Sie erreicht hier etwa 50 % des Wachstums, das für den Wildtyp erreicht wird. Da es nahezu keine Unterschiede im Wachstumsverhalten der Stämme in Medien mit fermentativen und nicht-fermentativen C-Quellen gibt, ist anzunehmen, daß es andere limitierende Faktoren im EMM-Medium gibt, die ein verringertes Wachstum der MT *knock-out* Mutanten hervorrufen. Die C-Quelle und die davon abhängige Atmungsrate kann als Ursache nicht herangezogen werden.

Auch eine Beteiligung des Zym1 an der Regulation der Atmung in der unbehandelten Hefezelle konnte nicht nachgewiesen werden. Der Transport von Zinkionen in die Mitochondrien könnte die Atmungsaktivität des Wildtyps gegenüber der MT *knock-out* Mutante reduzieren. Ein reduzierter Sauerstoffverbrauch konnte in den Mitochondrien von Rattenleberzellen nach Zugabe von Zink oder Zn₇-MT gezeigt werden (Ye *et al.*, 2001). Die Zugabe von Apothonineine hingegen führte zu einem Anstieg der Atmung. Die in Abb. 3.13-1 dargestellten Ergebnisse zeigen keine erhöhte Atmungsaktivität der Mutante. Ein Einstrom von inhibierenden Konzentrationen an Zinkionen durch Zn-MT kann somit ausgeschlossen

werden. Inwiefern das Apothoniein die Erhöhung der Atmung des Wildtyps beeinflusst, konnte nicht gezeigt werden.

In weiterführenden Experimenten könnte die Atmung der mit Zink und Kupfer behandelten Kulturen untersucht werden. Bei einem Überangebot an Zink konnte sich dieses Metall durch den MT-vermittelten Transport in den Mitochondrien anreichern und die Atmungsaktivität herabsetzen, was Auswirkungen auf das Wachstum haben kann. Ob eine Überschuß an Zink allerdings mit einer reduzierten Atmung des Wildtyps einhergeht, bleibt unter Betrachtung der Wachstumsassays fraglich. In den im Komplexmedium angezogenen Wildtypkulturen konnte keine Wachstumsinhibierung im Vergleich zur MT *knock-out* Mutante gezeigt werden.

Zusätzliche Informationen könnten auch Untersuchungen der Atmung unter Kupfermangelbedingungen liefern. Wie bereits erwähnt, konnte für kupferdefiziente Mäuse eine erhöhte Konzentration an Cu-MT nachgewiesen werden (Suzuki *et al.*, 2002). Die Metallothioneine stellen Kupferionen für Cu-Chaperone bereit. Sollte die Expression des Zym1 in ähnlicher Weise wirken, so könnte dieses in einer im Vergleich zur MT *knock-out* Mutante gesteigerten Atmung resultieren. Widersprüchlich zu dieser These sind allerdings die unter Abb. 3.4-1 und Abb. 3.4-2 dargestellten Wachstumsuntersuchungen unter Defizienzbedingungen. Hier stellt der Verlust des funktionellen MT einen Wachstumsvorteil dar bzw. zeigte keine Beeinflussung des Wachstums. Eine Beteiligung des Zym1 an der Bereitstellung des Kupfers für Cu-Chaperone der Cytochrom-c Oxidase scheint unwahrscheinlich.

4.8. Die stärkste Transkriptakkumulation des *zym1* erfolgt nach oxidativem Streß

Die Bildung des MT unterliegt einer starken transkriptionellen Regulation. Für die meisten beschriebenen Säuger-MT ist eine erhöhte Transkriptakkumulation nach Zink- oder Cadmiumzugabe zu verzeichnen (Andrews, 2000). Für die Hefe-MT ist Kupfer der stärkste transkriptionelle Aktivator (Fürst *et al.*, 1988). Außerdem ist auch oxidativer Streß ein Induktor der MT Expression.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Transkriptakkumulation des *zym1* nach verschiedenen Streßapplikationen untersucht werden. Eine starke Induktion war hier nach Behandlung mit H₂O₂ zu verzeichnen. Hierauf wird im nächsten Kapitel näher eingegangen werden. Prinzipiell konnte ein unterschiedliches Induktionsmuster zwischen den im EMM- und den im YE-Medium angezogenen Wildtypkulturen beobachtet werden (Abb. 3.14-1A). Die Behandlung mit Kupfer ergab nur eine leichte Erhöhung der Transkriptmenge. Unter YE-Bedingungen konnten eine Transkriptakkumulation nach hohen Konzentrationen von Cadmium, Kupfer und Zink ermittelt werden (Abb. 3.14-1B). Hierbei war die Induktion nach

2 mM Zink besonders stark. Beachtet man die in Tabelle 3.2-1 aufgelisteten IC_{50} -Werte, so erkennt man, daß abgesehen vom Kupfer die Transkriptakkumulation des *zymI* bei Konzentrationen stattfindet, die weit höher als die ermittelten IC_{50} -Werte liegen. Die Zellen zeigten in den Wachstumsassays schon ein sehr stark eingeschränktes Wachstum. Die Werte ab 100 μ M $CdCl_2$, 5 mM $CuCl_2$ und 2 mM $ZnCl_2$ wurden nur gewählt, um sie mit den von Borrelly *et al.* ermittelten Daten zu vergleichen (Borrelly *et al.*, 2002). Ein Wachstum des Wildtyps unter diesen Bedingungen war kaum noch möglich. Speziell die Behandlung mit 5 mM $CuCl_2$ zeigte schon erste zelltoxische Effekte. Die Interpretation der Transkriptakkumulation besonders unter YE-Bedingungen ist daher erschwert. Auf Grund der zelltoxischen Wirkung der Metalle der eben diskutierten Konzentrationen kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Induktion des *zymI* eher durch sekundäre Effekte als durch Metallionen ausgelöst wird. Eine metallabhängige, da in subletalen Konzentrationen zu beobachtende Transkriptakkumulation, kann nur für das Kupfer angenommen werden. Diese Induktion konnte in beiden Medien in Konzentrationen um den IC_{50} -Wert beobachtet werden. Interessanterweise konnte eine leichte Transkriptakkumulation auch nach Kobaltbehandlung ermittelt werden. Diese tritt im EMM-Medium nur sehr leicht, im YE-Medium aber etwas stärker auf. Eine *in vivo* Kobaltbindung an MT ist nicht bekannt. Allerdings konnte eine Induktion des MT durch Kobalt schon an anderer Stelle gezeigt werden (Tohoyama *et al.*, 2001). In *S. cerevisiae* wurde die Expression von *CUP1* durch Kobalt aktiviert. Diese Induktion wurde allerdings nicht durch den Transkriptionsfaktor ACE1 vermittelt. Nach Kupferzugabe und hohen Konzentrationen an Cadmiumionen konnte ein zweites Transkript mit einer Größe von ca. 190 Basen detektiert werden. Dieses Transkript ist unabhängig von der Expressionsstärke des *zymI*. Obwohl H_2O_2 und 2 mM $ZnCl_2$ die höchsten Transkriptakkumulationen aufweisen, konnte das zweite Transkript hier nicht detektiert werden. Eine mögliche Erklärung für dieses Transkript könnte in einem zweiten Transkriptionsstart liegen. Ein zweites ATG und eine 5 bp stromaufwärts gelegene TATA-Box konnten in der nicht kodierenden Sequenz gefunden werden. Allerdings müßte das zweite Transkript noch etwa 80 Basen größer sein als ermittelt. Jedoch soll hier ein Fehler bei der Größenbestimmung der generell schon sehr kleinen Transkripte nicht ausgeschlossen werden.

4.9. Δ *zymI* ist nicht sensitiver gegenüber oxidativem Streß

Metallothioneine vieler Organismen wurden als Antioxidantien beschrieben. Dabei sind die antioxidativen Eigenschaften nicht nur auf das Vorhandensein von einer Vielzahl von

Sulfhydrylgruppen, die reaktive Sauerstoffspezies reduzieren können, sondern auch auf die Metallbindung zurückzuführen. MT können den zytosolischen Gehalt redoxaktiver Metalle verringern und auch so die Synthese reaktiver Sauerstoffspezies mindern. Wie für metallbehandelte Kulturen mehrfach gezeigt werden konnte, wird auch die Expression der MT transkriptionell reguliert. Neben *metal response elements* (MRE) besitzt der Promotor von MT-Genen der Vertebraten auch *antioxidant response elements* (ARE) (Viarengo *et al.*, 2000). Auch *S. pombe* zeigte eine verstärkte Transkriptakkumulation nach H₂O₂-Behandlung (Abb. 3.14-1). Dieses Ergebnis konnte auch durch die von Chen und Ko-Autoren durchgeführten Microarrayuntersuchungen bestätigt werden (Chen *et al.*, 2003); (<http://www.sanger.ac.uk/perl/SPGE/geexview?group=2&q=SPAC22H10.13>). Hier konnte eine etwa 60fache Transkriptakkumulation des *zym1* nach H₂O₂-Behandlung gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob die verstärkte Transkriptakkumulation auch mit einer erhöhten Synthese des Genproduktes einhergeht. Zym1 könnte die toxischen Effekte reaktiver Sauerstoffspezies mindern. Daher sollte untersucht werden, ob Δ *zym1* sensitiver gegenüber oxidativen Streß reagiert. Die Kulturen von Wildtyp und Δ *zym1* wurden mit H₂O₂ behandelt und ihr Wachstum nach Streßapplikation ermittelt.

Wildtyp und Δ *zym1* Mutante zeigten beide ein um ca. 15 % reduziertes Wachstum nach H₂O₂-Behandlung (Abb. 3.15-1). Es konnten demnach keine Unterschiede zwischen den beiden Stämmen ermittelt werden. Beide Stämme reagierten vergleichbar sensitiv auf den oxidativen Streß. Eine Funktion des MT innerhalb der Streßantwort kann daher ausgeschlossen werden. Unklar bleibt allerdings, warum H₂O₂ die höchste Induktion auf mRNA-Ebene hervorruft (Abb. 3.14-1). Inwiefern die *zym1* Transkriptakkumulation Einfluß auf die Synthese von Zym1 hat, konnte ebenfalls nicht geklärt werden. Die Expression des Zym1-HA zeigte eine leichte Reduktion gegenüber Kontroll- und metallbehandelten Proteinextrakten (Abb. 3.11-1). Allerdings ist pSLF172/*zym1* unter der Kontrolle eines starken konstitutiven Promotors, der nicht durch oxidativen Streß induziert wird, exprimiert. Die unter Kapitel 3.11 durchgeführten Untersuchungen könnten höchstens Aufschluß über den *turnover* des Proteins geben. Da *zym1* eine 60fach gesteigerte Transkriptakkumulation aufweist, aber kein verändertes Wachstum der Δ *zym1* Mutante im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden konnte, kann spekuliert werden, daß Zym1 einem schnellen Abbau unterliegt.

Eine weitere Erklärung könnte in der Metallbindung des Zym1 liegen. Es konnte nachgewiesen werden, daß in Hefen Cu-gesättigte MT mehr als Zn- und Cd-bindende MT an der Detoxifizierung reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt sind (Tamai *et al.*, 1993). Da nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, ob Zym1 ein Cu-MT ist und da es Hinweise auf

Zinkbindung gibt, soll diese Möglichkeit der Interpretation der Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden (Borrelly *et al.*, 2002). Sollte Zym1 wirklich ein zinkbindendes MT sein, so könnte diese mit einem starkem Verlust der antioxidativen Wirkung einhergehen.

4.10. Weiterführende Experimente und Ausblick

In den vorangegangenen Kapiteln wurde versucht, unter Berücksichtigung der umfangreichen Literatur zur Funktion von MT, Experimente zu konzipieren, die eine Klärung der Funktion von Zym1 ermöglichen. Durch die durchgeführten Experimente konnten aber letztendlich nur Funktionen ausgeschlossen werden. So kann ein Beitrag des Zym1 in der Detoxifizierung von Metallen und reaktiven Sauerstoffspezies, in der Modulation der Atmung und der Aufrechterhaltung der Metallhomöostase unter Defizienzbedingungen als eher unwahrscheinlich angesehen werden. Das stark reduzierte Wachstum im Minimalmedium unter Normalbedingungen konnte bisher in keinem anderen Organismus gezeigt werden und weist auf eine essentielle Funktion des Zym1 hin. Auch der offenbar Zym1-vermittelte Kalziumeinstrom nach Kupferbehandlung gibt Rätsel auf. Daher sollten globale transkriptionelle Untersuchungen mittels Arraytechnik durchgeführt werden. Die erhaltenen Veränderungen der Genexpression sollten, so weit möglich, mit der Expression der Proteine durch 2D-Gele verglichen werden.

Letzteres beschränkte sich auf die Untersuchungen der Proteinexpression zwischen Wildtyp und MT *knock-out* Mutante unter Normalbedingungen in beiden Medien. Hierbei wurden weitaus weniger Veränderung zwischen den beiden Stämmen in einem Medium nachgewiesen als zwischen dem mediumabhängigen Wachstum eines Stammes (Abb. 3.19-1). Die Auswertung der 2D-Gele erwies sich jedoch als unlösbares Problem. Das von uns genutzte und für die Analyse von Arabidopsis-Extrakten genutzte Programm Protein Weaver konnte die drei Replikagele nicht alignen. Die erwähnten Veränderungen in der Proteinexpression beziehen sich daher auf Unterschiede, die repräsentativ, mit bloßem Auge sichtbar und in wenigstens zwei von drei Gelen erhalten waren. Da kein Mastergel generiert werden konnte, war eine weitere computergestützte Bearbeitung nicht möglich. Daher mußte auch auf weitere Analysen und die massenspektrometrischen Untersuchungen verzichtet werden.

Im Vordergrund der Untersuchungen mittels Microarray stand die Klärung des unterschiedlichen medienabhängigen Wachstums der $\Delta zym1$ Mutanten. Hierbei wurden *S. pombe full genome chips* verwendet. Die unterschiedliche Expression der Gene könnte hier Aufschluß über die Ursachen des unterschiedlichen Wachstumsverhalten bringen und

Hinweise auf eine Funktion des Zym1 liefern. Die Auswertung der Daten ergab nur eine kleine Zahl an unterschiedlich exprimierten Genen zwischen Wildtyp und der Mutante in den verschiedenen Medien (siehe Anhang IV).

Für Microarrays dieser Art konnte gezeigt werden, daß etwa 80 – 90 % aller Gene von Kulturen der exponentiellen Wachstumsphase detektierbar sind (Lyne *et al.*, 2003). In den von Lyne und Ko-Autoren vorgenommenen Untersuchungen wurden Expressionsprofile von *S. pombe* Stämmen erstellt, die ebenfalls in Minimal- und Komplexmedium angezogen wurden. Auch wenn hier nicht die $\Delta zym1$ Mutante zum Einsatz kam, wurden auch unter den hier verwendeten Stämmen keine signifikanten Unterschiede, verursacht durch das Medium, nachgewiesen. Es ist daher nicht ausgeschlossen, daß die Transkriptakkumulation auch in der Mutante nahezu unverändert bleibt, unabhängig davon welches Medium verwendet wurde. Um aber konkrete Aussagen treffen zu können, sollte wenigstens eine Zweifachbestimmung dieser leider sehr kostenintensiven Methode vorgenommen werden. Sinnvoller wären, auf Grund der Ergebnisse der eben zitierten Publikation, wahrscheinlich auch Untersuchungen der Genexpression nach Metallbehandlung. Hier würde sich vor allem auf Kupfer beschränkt werden. Um dennoch globalere Untersuchungen gerade nach Metallzugabe durchführen zu können, wurde ein Metallarray generiert. Hierbei mußte sich allerdings auf die Analyse von einer begrenzten Anzahl von Genen beschränkt werden. Dabei wurde sich vor allem auf Gene, die für Genprodukte des Ionentransports, des Schwefelstoffwechsels oder der Zellzykluskontrolle kodieren, konzentriert.

Zwar konnten mittels der Macroarraytechnik Unterschiede ermittelt werden, diese konnten jedoch nicht in den anschließenden RT-PCR Experimenten bestätigt werden. Generell waren die Veränderung der Genexpression mit ca. zwei- bis maximal vierfach gering. Daher kann die Methode der RT-PCR als limitierender Faktor angesehen werden. Die Verwendung von *real time* PCR für die Detektion geringer Unterschiede könnte bestätigende Ergebnisse liefern. Des weiteren erfolgte die Fertigstellung der Metallarrays, bevor die Experimente zur Elementzusammensetzung in Wildtyp und $\Delta zym1$ durchgeführt wurden. Das Wissen über die unterschiedliche Kalziumakkumulation nach Kupferbehandlung hätte die Genauswahl erheblich verändert. Hier hätte man beispielsweise die Expression von Serin/Threonin- bzw. Tyrosin-Proteinkinasen untersuchen können. In Säugerzellen konnte ein Zusammenhang zwischen oxidativem Streß, MT, zellregulatorischen Prozessen und Kalzium hergestellt werden (Suzuki *et al.*, 1997). Das unter oxidativem Streß induzierte MT war in der Lage, in die Signaltransduktion durch die Aktivierung von kalziumabhängigen Tyrosinkinasen einzugreifen. Die Aktivierung von Serin/Threonin- bzw. Tyrosin-Proteinkinasen kann

beispielweise das Zellwachstum beeinflussen. Auch für das Zym1 ist eine Funktion innerhalb der Signaltransduktion nicht ausgeschlossen.

Zusätzlich zu diesen Untersuchungen sollten weitere vergleichende Untersuchungen der Medien durchgeführt werden. Die Charakterisierung der Komponente, die für das unterschiedliche Wachstum verantwortlich ist, kann hilfreich für die Aufklärung der Funktion des Zym1 sein. Außerdem sollte sich weiter mit den Unterschieden in der Kalziumakkumulation auseinandergesetzt werden. Da der *S. cerevisiae* Wildtyp ebenfalls einen massiven Kalziuminflux nach Kupferzugabe zeigte, wären Untersuchungen der $\Delta cup1$ Mutante aufschlußreich. Sollten auch diese eine unveränderte Kalziumaufnahme aufweisen, könnte man postulieren, daß MT in die Kalziumakkumulation involviert sind.

Die Reinigung des MT könnte umfangreichere Analysen zur Metallbindung des MT und dessen Stabilität zulassen. Diese Aspekte könnten auch durch die Herstellung eines Zym1-Antikörpers näher untersucht werden. Dieser Antikörper könnte außerdem für die Lokalisierungsuntersuchungen unter der Kontrolle des nativen Promotors eingesetzt werden. Hier könnten mögliche metallabhängige Translokationen mittels Western-Blot oder elektronenmikroskopischen Aufnahmen nach Immuno-Gold-Labeling sichtbar gemacht werden. Darüberhinaus dürfen die globalen Techniken wie 2D-Gele und Arrays nicht vergessen werden. Diese Untersuchungen sollten weiter intensiviert werden, um dem Zym1 eine oder mehrere Funktionen zuzuordnen zu können.

5. Zusammenfassung

1957 wurden Metallothioneine aus der Pferdeniere als cadmiumbindendes Protein isoliert (Margoshes & Vallee, 1957). In den folgenden Jahrzehnten konnten für weitere Säuger-MT wie auch MT von Invertebraten die Bindung und Detoxifizierung von Cadmium nachgewiesen werden. Untersuchungen des Metallothionein Cup1 aus *Saccharomyces cerevisiae* lieferten Beweise für einen Beitrag des MT an der Detoxifizierung von Kupferionen (Hamer *et al.*, 1985). Trotz dieser Untersuchungen wird angezweifelt, daß die Funktion des MT in der Detoxifizierung von Metallen liegt (Palmiter, 1998). Des weiteren konnten immer mehr Beweise für andere Funktionen gefunden werden. Für keine dieser Resultate gibt es jedoch allgemeingültige Beweise. Im Gegensatz dazu ist die detoxifizierende Funktion der Phytochelatine unumstritten (Grill *et al.*, 1985); (Clemens *et al.*, 1999). Mit *Candida glabrata* wurde erstmals ein Organismus untersucht, der sowohl über MT als auch PC verfügte (Mehra *et al.*, 1988). Hier erfolgt die Bindung von Cadmium über Phytochelatine und Kupfer wird durch Metallothioneine komplexiert. Auch *Schizosaccharomyces pombe* besitzt beide Chelatoren. Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion des Metallothioneins Zym1 und ein mögliches Zusammenspiel mit den Phytochelatinen zu charakterisieren und Zusammenhänge zwischen beiden aufzuzeigen.

1. Das Metallothionein Zym1 trägt nicht zur Schwermetalltoleranz bei. Untersuchungen von $\Delta zym1$ Mutanten zeigten keine erhöhte Sensitivität gegenüber Cadmium, Kupfer und Zink. Im Komplexmedium wuchsen der Wildtyp und $\Delta zym1$ vergleichbar. Auch ein zusätzliches Inaktivieren von Zym1 im PCS *knock-out* zeigte ein analoges Wachstum von $\Delta SpPCS$ und $\Delta SpPCS \Delta zym1$
2. Die Toleranz der $\Delta zym1$ Mutanten im Minimalmedium scheint erhöht. Alle Mutanten zeigten ein gegenüber den MT-Wildtypstämmen gesteigertes Wachstum nach Cadmium, Kupfer, Zink, Kobalt und Nickel. Da die letzten beiden Metalle *in vivo* nicht an MT gebunden vorliegen, wird die erhöhte Toleranz nicht mit einer Metallbindung in Verbindung gebracht.
3. Alle $\Delta zym1$ *knock-out* Mutanten, die im Minimalmedium ohne Metallbehandlung angezogen wurden, zeigten ein um zwei Drittel reduziertes Wachstum im Vergleich zu

- MT-Wildtypkulturen. Die im Komplexmedium angezogenen Mutanten zeigten keinen Phänotyp unter Normalbedingungen. Sie zeigten ein den MT-Wildtypstämmen analoges Wachstum.
4. Zym1 ist nicht an der Metallhomöostase unter Kupfermangelbedingungen beteiligt. Im Komplexmedium sind Wildtyp und MT *knock-out* Stämme im gleichen Maße vom Kupfermangel beeinflusst. MT-Wildtypstämme im EMM-Medium zeigten eine zu starke Reduktion des Wachstums unter Kupferdefizienz, als daß ein Wachstumsvorteil durch das Vorhandensein des MT ersichtlich wäre.
 5. Glutathion als extrazellulärer Chelator hat keinen Einfluß auf die Toleranz von Wildtyp und $\Delta zym1$ Mutanten. Das Wachstum der Kulturen mit und ohne GSH ist unverändert.
 6. Die Aufnahme von Cadmium und Kupfer zwischen Wildtyp- und MT *knock-out* Stämmen war vergleichbar. Die Zinkakkumulation war in allen $\Delta zym1$ Mutanten um etwa 50 – 60 % reduziert.
 7. Die Elementzusammensetzung von Wildtyp und $\Delta zym1$ zeigte wenig Unterschiede. Nur die Akkumulation von Kalzium war verschieden. Während die Wildtypkulturen einen massiven Kalziuminflux nach Kupferbehandlung zeigten, konnte dieser für die $\Delta zym1$ Mutante nicht ermittelt werden.
 8. Es konnten keine Interaktionen von Phytochelatinen und dem Metallothionein Zym1 gezeigt werden. Die Bildung von Phytochelatinen ist im Vergleich zum Wildtyp in den $\Delta zym1$ Mutanten unverändert.
 9. Die Untersuchungen zur Metallbindung konnten nicht klar beweisen, ob Zym1 kupferbindend oder, wie bereits in der Publikation von Borrelly und Ko-Autoren gezeigt, zinkbindend ist (Borrelly *et al.*, 2002). Nur die Auftrennung von Proteinextrakten kupferbehandelter Proben durch Gelfiltration zeigte einen induzierten Proteinpeak, der der Größe des MT entspricht. Durch atomabsorptionsspektroskopische Messung konnte gezeigt werden, daß in diesem Peak fast das gesamte Kupfer akkumuliert. Für Zink und

Cadmium wurden keine analogen Ergebnisse erhalten. Eine massenspektrometrische Analysierung des Proteinpeaks schlug jedoch fehl.

10. Das Metallothionein Zym1 ist hauptsächlich zytosolisch lokalisiert.
11. Zym1 hat nur einen marginalen Einfluß auf die Atmung. Untersuchungen der Atmungsaktivität von Wildtyp und Mutante zeigten nur eine geringe Reduktion des Sauerstoffverbrauchs in der Mutante. Diese verbraucht etwa 10 – 15 % weniger Sauerstoff.
12. Die reduzierte Atmungsaktivität hat keinen Einfluß auf das Wachstum. Wachstumsuntersuchungen von Wildtyp und $\Delta zym1$ Mutante in Medien mit nicht-fermentativen Kohlenstoffquellen zeigten keine Unterschiede zu Medien mit fermentativen C-Quellen.
13. Die stärkste Induktion des *zym1* erfolgt nach oxidativem Streß. Im Minimalmedium konnte nur eine sehr schwache Transkriptakkumulation nach Kupferbehandlung nachgewiesen werden. Im Komplexmedium wird *zym1* nur unter Verwendung toxischer Konzentrationen von Cadmium, Kupfer und Zink induziert. Die Zugabe von Kupfer und hohen Konzentrationen von Cadmium verursacht die Induktion eines zweiten, größeren Transkripts.
14. Die $\Delta zym1$ Mutante ist nicht sensitiver gegenüber oxidativem Streß. Das Wachstum von Wildtyp und Mutante nach H₂O₂-Behandlung ist vergleichbar.
15. Die globale transkriptionelle Streßantwort zwischen Wildtyp und Mutante zeigte keine signifikanten Unterschiede. Die Expression verschiedener meist metallresponsiven Gene wurden mittels eines Metallarrays untersucht. Dabei wiesen Wildtyp und $\Delta zym1$ ein nahezu analoges Expressionsmuster auf.
16. Das Expressionsprofil verschiedener Gene unter Normalbedingungen ist in Wildtyp und $\Delta zym1$ Mutante nicht wesentlich verändert. Auch die Wahl des Mediums zeigte wenig Einfluß auf die Transkriptakkumulation.

17. Die Proteinexpression von Wildtyp und $\Delta zymI$ unter Normalbedingungen in einem Medium zeigte nur geringe Veränderungen. Größerer Unterschiede wurden beim Vergleich von Wildtyp bzw. $\Delta zymI$ in den verschiedenen Medien beobachtet.

6. Literaturverzeichnis

- Abdel-Mageed, A., and Agrawal, K. C. (1997). Antisense down-regulation of metallothionein induces growth arrest and apoptosis in human breast carcinoma cells. *Cancer Gene Ther* **4**, 199-207.
- Abdel-Mageed, A. B., and Agrawal, K. C. (1998). Activation of nuclear factor kappaB: potential role in metallothionein-mediated mitogenic response. *Cancer Res* **58**, 2335-2338.
- Alshuaib, W. B., Cherian, S. P., Hasan, M. Y., and Fahim, M. A. (2003). Drug effects on calcium homeostasis in mouse CA1 hippocampal neurons. *Int J Neurosci* **113**, 1317-1332.
- Andrews, G. K. (2000). Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol* **59**, 95-104.
- Anraku, Y., Ohya, Y., and Iida, H. (1991). Cell cycle control by calcium and calmodulin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1093**, 169-177.
- Askwith, C., and Kaplan, J. (1997). An oxidase-permease-based iron transport system in *Schizosaccharomyces pombe* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272**, 401-405.
- Avery, S. V. (2001). Metal toxicity in yeasts and the role of oxidative stress. *Adv Appl Microbiol* **49**, 111-142.
- Bähler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie, A., 3rd, Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**, 943-951.
- Bellemare, D. R., Shaner, L., Morano, K. A., Beaudoin, J., Langlois, R., and Labbe, S. (2002). Ctr6, a vacuolar membrane copper transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **277**, 46676-46686.
- Beyersmann, D., and Haase, H. (2001). Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals* **14**, 331-341.
- Bird, A. J., McCall, K., Kramer, M., Blankman, E., Winge, D. R., and Eide, D. J. (2003). Zinc fingers can act as Zn²⁺ sensors to regulate transcriptional activation domain function. *Embo J* **22**, 5137-5146.
- Borrelly, G. P., Harrison, M. D., Robinson, A. K., Cox, S. G., Robinson, N. J., and Whitehall, S. K. (2002). Surplus zinc is handled by Zym1 metallothionein and Zhf endoplasmic reticulum transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **277**, 30394-30400.

- Briat, J. F., FobisLoisy, I., Grignon, N., Lobreaux, S., Pascal, N., Savino, G., Thoiron, S., von Wiren, N., and Van Wuytswinkel, O. (1995). Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *BIOLOGY OF THE CELL* **84**, 69-81.
- Buchman, C., Skroch, P., Welch, J., Fogel, S., and Karin, M. (1989). The CUP2 gene product, regulator of yeast metallothionein expression, is a copper-activated DNA-binding protein. *Mol Cell Biol* **9**, 4091-4095.
- Bush, A. I. (2000). Metals and neuroscience. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 184-191.
- Butt, T. R., Sternberg, E. J., Gorman, J. A., Clark, P., Hamer, D., Rosenberg, M., and Crooke, S. T. (1984). Copper metallothionein of yeast, structure of the gene, and regulation of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 3332-3336.
- Chang, E. C., Barr, M., Wang, Y., Jung, V., Xu, H. P., and Wigler, M. H. (1994). Cooperative interaction of *S. pombe* proteins required for mating and morphogenesis. *Cell* **79**, 131-141.
- Chen, D., Toone, W. M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., and Bahler, J. (2003). Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* **14**, 214-229.
- Clemens, S., Antosiewicz, D. M., Ward, J. M., Schachtman, D. P., and Schroeder, J. I. (1998). The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12043-12048.
- Clemens, S., Bloss, T., Vess, C., Neumann, D., Nies, D. H., and Zur Nieden, U. (2002). A transporter in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells mediates zinc storage and differentially affects transition metal tolerance. *J Biol Chem* **277**, 18215-18221.
- 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.
- 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. (1999). A family of phytochelatin synthase genes from plant, fungal and animal species. *Trends Plant Sci* **4**, 335-337.
- Cobbett, C. S. (2000). Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 211-216.
- Coblentz, A., and Wolf, K. (1994). The role of glutathione biosynthesis in heavy metal resistance in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol Rev* **14**, 303-308.

- Cohen, A., Nelson, H., and Nelson, N. (2000). The family of SMF metal ion transporters in yeast cells. *J Biol Chem* **275**, 33388-33394.
- Coleman, J. E. (1998). Zinc enzymes. *Curr Opin Chem Biol* **2**, 222-234.
- Coleman, P. L., and Weiner, H. (1973). Growth, isolation, and characterization of a yeast manganese alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **12**, 3466-3472.
- Conklin, D. S., Culbertson, M. R., and Kung, C. (1994). Interactions between gene products involved in divalent cation transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **244**, 303-311.
- Conklin, D. S., McMaster, J. A., Culbertson, M. R., and Kung, C. (1992). COT1, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **12**, 3678-3688.
- Connolly, E. L., Fett, J. P., and Guerinot, M. L. (2002). Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* **14**, 1347-1357.
- Culotta, V. C., Klomp, L. W., Strain, J., Casareno, R. L., Krems, B., and Gitlin, J. D. (1997). The copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem* **272**, 23469-23472.
- Dameron, C. T., Winge, D. R., George, G. N., Sansone, M., Hu, S., and Hamer, D. (1991). A copper-thiolate polynuclear cluster in the ACE1 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 6127-6131.
- Dancis, A., Yuan, D. S., Haile, D., Askwith, C., Eide, D., Moehle, C., Kaplan, J., and Klausner, R. D. (1994). Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell* **76**, 393-402.
- Dehal, P., Satou, Y., Campbell, R. K., Chapman, J., Degnan, B., De Tomaso, A., Davidson, B., Di Gregorio, A., Gelpke, M., Goodstein, D. M., Harafuji, N., Hastings, K. E., Ho, I., Hotta, K., Huang, W., Kawashima, T., Lemaire, P., Martinez, D., Meinertzhagen, I. A., Nacula, S., Nonaka, M., Putnam, N., Rash, S., Saiga, H., Satake, M., Terry, A., Yamada, L., Wang, H. G., Awazu, S., Azumi, K., Boore, J., Branno, M., Chin-Bow, S., DeSantis, R., Doyle, S., Francino, P., Keys, D. N., Haga, S., Hayashi, H., Hino, K., Imai, K. S., Inaba, K., Kano, S., Kobayashi, K., Kobayashi, M., Lee, B. I., Makabe, K. W., Manohar, C., Matassi, G., Medina, M., Mochizuki, Y., Mount, S., Morishita, T., Miura, S., Nakayama, A., Nishizaka, S., Nomoto, H., Ohta, F., Oishi, K., Rigoutsos, I., Sano, M., Sasaki, A., Sasakura, Y., Shoguchi, E., Shin-i, T., Spagnuolo, A., Stainier, D., Suzuki, M. M., Tassy, O., Takatori, N., Tokuoka, M., Yagi, K., Yoshizaki, F., Wada, S., Zhang, C., Hyatt, P. D., Larimer, F., Detter, C., Doggett, N., Glavina, T., Hawkins, T., Richardson, P., Lucas, S., Kohara, Y., Levine, M., Satoh, N., and Rokhsar, D. S. (2002). The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* **298**, 2157-2167.
- Dix, D. R., Bridgham, J. T., Broderius, M. A., Byersdorfer, C. A., and Eide, D. J. (1994). The FET4 gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**, 26092-26099.

- Dix, D. R., Bridgham, J. T., Broderius, M. A., and Eide, D. J. (1997). Characterization of the FET4 protein of yeast. Evidence for a direct role in the transport of iron. *J Biol Chem* **272**, 11770-11777.
- Drewke, C., and Ciriacy, M. (1988). Overexpression, purification and properties of alcohol dehydrogenase IV from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **950**, 54-60.
- Eide, D. J. (1998). The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Nutr* **18**, 441-469.
- Eide, D. J., Bridgham, J. T., Zhao, Z., and Mattoon, J. R. (1993). The vacuolar H(+)-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for efficient copper detoxification, mitochondrial function, and iron metabolism. *Mol Gen Genet* **241**, 447-456.
- Fahey, R. C., and Newton, G. L. (1987). Determination of low-molecular-weight thiols using monobromobimane fluorescent labeling and high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* **143**, 85-96.
- Fowler, B. A., Hildebrand, C. E., Kojima, Y., and Webb, M. (1987). Nomenclature of metallothionein. *Experientia Suppl* **52**, 19-22.
- Frausto da Silva, J. J. R., and Williams, R. J. P. (2001). *The biological chemistry of the elements - The inorganic chemistry of life*. Oxford University Press, Oxford.
- Furey, W. F., Robbins, A. H., Clancy, L. L., Winge, D. R., Wang, B. C., and Stout, C. D. (1986). Crystal structure of Cd,Zn metallothionein. *Science* **231**, 704-710.
- Fürst, P., Hu, S., Hackett, R., and Hamer, D. (1988). Copper activates metallothionein gene transcription by altering the conformation of a specific DNA binding protein. *Cell* **55**, 705-717.
- Galiazzo, F., Schiesser, A., and Rotilio, G. (1988). Oxygen-independent induction of enzyme activities related to oxygen metabolism in yeast by copper. *Biochim Biophys Acta* **965**, 46-51.
- Gerkeler, W., Grill, E., Winnacker, E.-L., and Zenk, M. H. (1989). Survey of plant kingdom for the ability to bind heavy metals through phytochelatins. *Z. Naturforsch.* **44c**, 361-369.
- Gitan, R. S., Luo, H., Rodgers, J., Broderius, M., and Eide, D. (1998). Zinc-induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. *J Biol Chem* **273**, 28617-28624.
- Gitan, R. S., Shababi, M., Kramer, M., and Eide, D. J. (2003). A cytosolic domain of the yeast Zrt1 zinc transporter is required for its post-translational inactivation in response to zinc and cadmium. *J Biol Chem* **278**, 39558-39564.
- Glerum, D. M., Shtanko, A., and Tzagoloff, A. (1996). Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* **271**, 14504-14509.

- Griffith, O. W., and Meister, A. (1979). Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem* **254**, 7558-7560.
- 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 specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **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., Winnacker, E.-L., and Zenk, M. H. (1987). Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 439-443.
- 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.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* **219**, 1-14.
- Hamer, D. H. (1986). Metallothionein. *Annu Rev Biochem* **55**, 913-951.
- Hamer, D. H., Thiele, D. J., and Lemontt, J. E. (1985). Function and autoregulation of yeast copperthionein. *Science* **228**, 685-690.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hänsel, R., and Hölz, J. (1996). *Lehrbuch der pharmazeutischen Biologie*. Springer, Hamburg.
- Hassett, R., and Kosman, D. J. (1995). Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **270**, 128-134.
- Hell, R., and Bergmann, L. (1990). γ -Glutamylcysteine synthetase in higher plants: Catalytic properties and subcellular localization. *Planta* **180**, 603-612.
- Hoffman, C. S., and Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Holleman, A. F., and Wiberg, E. (1985). *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. Walter de Gruyter Verlag, Berlin.
- Jacob, C., Maret, W., and Vallee, B. L. (1998). Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3489-3494.

- Jensen, L. T., Howard, W. R., Strain, J. J., Winge, D. R., and Culotta, V. C. (1996). Enhanced effectiveness of copper ion buffering by CUP1 metallothionein compared with CRS5 metallothionein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**, 18514-18519.
- Johnson, B. L., and DeRosa, C. T. (1995). Chemical mixtures released from hazardous waste sites: implications for health risk assessment. *Toxicology* **105**, 145-156.
- Jung, H. I., Lee, Y. Y., Lim, H. W., Ahn, K. S., Park, E. H., and Lim, C. J. (2002). Regulation of the manganese-containing superoxide dismutase gene from fission yeast. *Mol Cells* **14**, 300-304.
- Kägi, J. H. (1991). Overview of metallothionein. *Methods Enzymol* **205**, 613-626.
- Kägi, J. H., and Kojima, Y. (1979). Nomenclature of metallothionein: a proposal. *Experientia Suppl* **34**, 141-142.
- Kägi, J. H., and Schaffer, A. (1988). Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* **27**, 8509-8515.
- Kamizono, A., Nishizawa, M., Teranishi, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1989). Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **219**, 161-167.
- Kampfenkel, K., Kushnir, S., Babiychuk, E., Inze, D., and Van Montagu, M. (1995). Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *J Biol Chem* **270**, 28479-28486.
- Kang, Y. J. (1992). Exogenous glutathione decreases cellular cadmium uptake and toxicity. *Drug Metab Dispos* **20**, 714-718.
- Karamushka, V. I., and Gadd, G. M. (1994). Influence of copper on proton efflux from *Saccharomyces cerevisiae* and the protective effect of calcium and magnesium. *FEMS Microbiol Lett* **122**, 33-38.
- Karin, M., Cathala, G., and Nguyen-Huu, M. C. (1983). Expression and regulation of a human metallothionein gene carried on an autonomously replicating shuttle vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4040-4044.
- Keleti, T. (1966). Zn in yeast D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* **22**, 640-643.
- Kim, S. J., Shin, Y. H., Kim, K., Park, E. H., Sa, J. H., and Lim, C. J. (2003). Regulation of the gene encoding glutathione synthetase from the fission yeast. *J Biochem Mol Biol* **36**, 326-331.
- Kojima, Y., Berger, C., Vallee, B. L., and Kägi, J. H. (1976). Amino-acid sequence of equine renal metallothionein-1B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 3413-3417.
- Kojima, Y., Binz, P.-A., and Kägi, J. H. (1999). *Nomenclature of metallothionein: proposal for a revision*. Birkhäuser Verlag, Basel.

- Kondo, N., Isobe, M., Imai, K., Goto, T., Murasugi, A., and Hayashi, Y. (1983). Structure of cadystin, the unit-peptide of cadmium-binding peptides induced in a fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Tetrahedron Lett.* **24**, 925-928.
- Korshunova, Y. O., Eide, D. J., Clark, W. G., Guerinot, M. L., and Pakrasi, H. B. (1999). The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol* **40**, 37-44.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**, 203-209.
- Labbe, S., Zhu, Z., and Thiele, D. J. (1997). Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *J Biol Chem* **272**, 15951-15958.
- Lane, T. W., and Morel, F. M. (2000). A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4627-4631.
- Larsen, K. S., and Auld, D. S. (1991). Characterization of an inhibitory metal binding site in carboxypeptidase A. *Biochemistry* **30**, 2613-2618.
- Lee, Y. Y., Jung, H. I., Park, E. H., Sa, J. H., and Lim, C. J. (2002). Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding copper/zinc superoxide dismutase. *Mol Cells* **14**, 43-49.
- Lehmann, S. (2002). Metal ions and prion diseases. *Curr Opin Chem Biol* **6**, 187-192.
- Lesuisse, E., Blaiseau, P. L., Dancis, A., and Camadro, J. M. (2001). Siderophore uptake and use by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **147**, 289-298.
- Li, L., and Kaplan, J. (1998). Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity. *J Biol Chem* **273**, 22181-22187.
- Li, L., and Kaplan, J. (2001). The yeast gene MSC2, a member of the cation diffusion facilitator family, affects the cellular distribution of zinc. *J Biol Chem* **276**, 5036-5043.
- Li, Z. S., Lu, Y. P., Zhen, R. G., Szczypka, M., Thiele, D. J., and Rea, P. A. (1997). A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 42-47.
- Lin, C. M., and Kosman, D. J. (1990). Copper uptake in wild type and copper metallothionein-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. Kinetics and mechanism. *J Biol Chem* **265**, 9194-9200.
- Lin, S. J., Pufahl, R. A., Dancis, A., O'Halloran, T. V., and Culotta, V. C. (1997). A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 gene in copper trafficking and iron transport. *J Biol Chem* **272**, 9215-9220.

- Liu, Y., Liu, J., Iszard, M. B., Andrews, G. K., Palmiter, R. D., and Klaassen, C. D. (1995). Transgenic mice that overexpress metallothionein-I are protected from cadmium lethality and hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **135**, 222-228.
- Löffler, S., Hochberger, A., Grill, E., Winnacker, E.-L., and Zenk, M. H. (1989). Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of heavy metals by the reaction products. *FEBS Lett.* **258**, 42-46.
- Lyne, R., Burns, G., Mata, J., Penkett, C. J., Rustici, G., Chen, D., Langford, C., Vetrie, D., and Bahler, J. (2003). Whole-genome microarrays of fission yeast: characteristics, accuracy, reproducibility, and processing of array data. *BMC Genomics* **4**, 27.
- MacDiarmid, C. W., Gaither, L. A., and Eide, D. (2000). Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **19**, 2845-2855.
- Maitani, T., Kubota, H., Sato, K., and Yamada, T. (1996). The Composition of Metals Bound to Class III Metallothionein (Phytochelatin and Its Desglycyl Peptide) Induced by Various Metals in Root Cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol* **110**, 1145-1150.
- Maret, W., Jacob, C., Vallee, B. L., and Fischer, E. H. (1999). Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1936-1940.
- Margoshes, M., and Vallee, B. L. (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4813 - 4814.
- Masters, B. A., Kelly, E. J., Quaife, C. J., Brinster, R. L., and Palmiter, R. D. (1994). Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 584-588.
- Mehra, R. K., Tarbet, E. B., Gray, W. R., and Winge, D. R. (1988). Metal-specific synthesis of two metallothioneins and gamma-glutamyl peptides in *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8815-8819.
- Mehra, R. K., Thorvaldsen, J. L., Macreadie, I. G., and Winge, D. R. (1992). Disruption analysis of metallothionein-encoding genes in *Candida glabrata*. *Gene* **114**, 75-80.
- Meister, A., and Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 711-760.
- Mitchinson, M. (1970). *Methods in Cell Physiology*. Academic Press, New York.
- Miyahara, T., Nemoto, S., Kaji, T., Yamada, H., Takeuchi, M., Mori, M., and Kozuka, H. (1986). The synthesis of metallothionein-like protein containing zinc in liver of rat after administration of calcium and calcitonin. *Toxicol Lett* **31**, 113-123.
- Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **194**, 795-823.
- Mulrooney, S. B., and Hausinger, R. P. (2003). Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 239-261.

- Murasugi, A., Wada, C., and Hayashi, Y. (1981). Cadmium-binding peptide induced in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biochem (Tokyo)* **90**, 1561-1564.
- Murasugi, A., Wada, C., and Hayashi, Y. (1983). Occurrence of acid-labile sulfide in cadmium-binding peptide 1 from fission yeast. *J Biochem (Tokyo)* **93**, 661-664.
- Neilands, J. B. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* **270**, 26723-26726.
- Nielson, K. B., and Winge, D. R. (1983). Order of metal binding in metallothionein. *J Biol Chem* **258**, 13063-13069.
- Nielson, K. B., and Winge, D. R. (1984). Preferential binding of copper to the beta domain of metallothionein. *J Biol Chem* **259**, 4941-4946.
- Nielson, K. B., and Winge, D. R. (1985). Independence of the domains of metallothionein in metal binding. *J Biol Chem* **260**, 8698-8701.
- Nies, D. H., and Silver, S. (1995). Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J Ind Microbiol* **14**, 186-199.
- 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.
- 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.
- Nugent, J. H., Rich, A. M., and Evans, M. C. (2001). Photosynthetic water oxidation: towards a mechanism. *Biochim Biophys Acta* **1503**, 138-146.
- Nurse, P. (1975). Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature* **256**, 547-551.
- Obata, H., Hayashi, A., Toda, T., and Umebayashi, M. (1996). Effects of zinc deficiency on the growth, proteins, and other constituents of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, cells. *Soil Science and Plant Nutrition* **42**, 147-154.
- O'Halloran, T. V., and Culotta, V. C. (2000). Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J Biol Chem* **275**, 25057-25060.
- Ooi, C. E., Rabinovich, E., Dancis, A., Bonifacino, J. S., & Klausner, R. D. (1996). Copper-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis. *Embo J* **15**, 3515-3523.
- Ortiz, D. F., Kreppel, L., Speiser, D. M., Scheel, G., McDonald, G., and Ow, D. W. (1992). Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *Embo J* **11**, 3491-3499.
- Ortiz, D. F., Ruscitti, T., McCue, K. F., and Ow, D. W. (1995). Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J Biol Chem* **270**, 4721-4728.

- Otvos, J. D., and Armitage, I. M. (1980). Structure of the metal clusters in rabbit liver metallothionein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 7094-7098.
- Outten, C. E., and O'Halloran, T. V. (2001). Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* **292**, 2488-2492.
- 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.
- Ozturk, L., Karanlik, S., Ozkutlu, F., Cakmak, I., and Kochian, L. V. (2003). Shoot biomass and zinc/cadmium uptake for hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species in response to growth on a zinc-deficient calcareous soil. *PLANT SCIENCE* **164**, 1095-1101.
- Palmiter, R. D. (1987). Molecular biology of metallothionein gene expression. *Experientia Suppl* **52**, 63-80.
- Palmiter, R. D. (1998). The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8428-8430.
- Palmiter, R. D., Findley, S. D., Whitmore, T. E., and Durnam, D. M. (1992). MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6333-6337.
- Pena, M. M., Puig, S., and Thiele, D. J. (2000). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J Biol Chem* **275**, 33244-33251.
- Peterson, C. W., Narula, S. S., and Armitage, I. M. (1996). 3D solution structure of copper and silver-substituted yeast metallothioneins. *FEBS Lett* **379**, 85-93.
- Pufahl, R. A., Singer, C. P., Peariso, K. L., Lin, S. J., Schmidt, P. J., Fahrni, C. J., Culotta, V. C., Penner-Hahn, J. E., and O'Halloran, T. V. (1997). Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science* **278**, 853-856.
- Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C., and O'Halloran, T. V. (1999). Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **284**, 805-808.
- Rauser, W. E. (1995). Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol* **109**, 1141-1149.
- Rauser, W. E. (1999). Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys* **31**, 19-48.
- Rhodes, D., and Klug, A. (1993). Zinc fingers. *Sci Am* **268**, 56-59, 62-55.
- Rogers, E. E., Eide, D. J., and Guerinot, M. L. (2000). Altered selectivity in an Arabidopsis metal transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12356-12360.

- Roman, D. G., Dancis, A., Anderson, G. J., and Klausner, R. D. (1993). The fission yeast ferric reductase gene *frp1+* is required for ferric iron uptake and encodes a protein that is homologous to the gp91-phox subunit of the human NADPH phagocyte oxidoreductase. *Mol Cell Biol* **13**, 4342-4350.
- Sakurai, H., Nakajima, K., Kamada, H., Satoh, H., Otaki, N., Kimura, M., Kawano, K., and Hagino, T. (1993). Copper-metallothionein distribution in the liver of Long-Evans cinnamon rats: studies on immunohistochemical staining, metal determination, gel filtration and electron spin resonance spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun* **192**, 893-898.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- Schagger, H., and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-379.
- Schellenberger, A. (1989). *Enzymkatalyse*. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Scheller, H. V., Huang, B., Hatch, E., and Goldsbrough, P. B. (1987). Phytochelatin synthesis and glutathione levels in response to heavy metals in Tomato cells. *Plant Physiol.* **85**, 1031-1035.
- Schmöger, M. E., Oven, M., and Grill, E. (2000). Detoxification of arsenic by phytochelatin in plants. *Plant Physiol* **122**, 793-801.
- Sensi, S. L., Canzoniero, L. M., Yu, S. P., Ying, H. S., Koh, J. Y., Kerchner, G. A., and Choi, D. W. (1997). Measurement of intracellular free zinc in living cortical neurons: routes of entry. *J Neurosci* **17**, 9554-9564.
- Shaw, C. F., 3rd, Savas, M. M., and Petering, D. H. (1991). Ligand substitution and sulfhydryl reactivity of metallothionein. *Methods Enzymol* **205**, 401-414.
- Sirko, A., and Brodzik, R. (2000). Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochim Pol* **47**, 1189-1195.
- Skulachev, V. P., Chistyakov, V. V., Jasaitis, A. A., and Smirnova, E. G. (1967). Inhibition of the respiratory chain by zinc ions. *Biochem Biophys Res Commun* **26**, 1-6.
- Stillman, M. J. (1995). Metallothioneins. *Coord. Chem. Rev.* **144**, 461-571.
- Stürzenbaum, S. R., Winters, C., Galay, M., Morgan, A. J., and Kille, P. (2001). Metal ion trafficking in earthworms. Identification of a cadmium-specific metallothionein. *J Biol Chem* **276**, 34013-34018.
- Suhy, D. A., Simon, K. D., Linzer, D. I., and O'Halloran, T. V. (1999). Metallothionein is part of a zinc-scavenging mechanism for cell survival under conditions of extreme zinc deprivation. *J Biol Chem* **274**, 9183-9192.

- Suzuki, K. T., Someya, A., Komada, Y., and Ogra, Y. (2002). Roles of metallothionein in copper homeostasis: responses to Cu-deficient diets in mice. *J Inorg Biochem* **88**, 173-182.
- Suzuki, Y. J., Forman, H. J., and Sevanian, A. (1997). Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* **22**, 269-285.
- Tamai, K. T., Gralla, E. B., Ellerby, L. M., Valentine, J. S., and Thiele, D. J. (1993). Yeast and mammalian metallothioneins functionally substitute for yeast copper-zinc superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8013-8017.
- Thiele, D. J. (1988). ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. *Mol Cell Biol* **8**, 2745-2752.
- Thiele, D. J., Wright, C. F., Walling, M. J., and Hamer, D. H. (1987). Function and regulation of yeast copperthionein. *Experientia Suppl* **52**, 423-429.
- Thornalley, P. J., and Vasak, M. (1985). Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim Biophys Acta* **827**, 36-44.
- Thumann, J., Grill, E., Winnacker, E. L., and Zenk, M. H. (1991). Reactivation of metal-requiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes. *FEBS Lett* **284**, 66-69.
- Tohoyama, H., Kadota, H., Shiraishi, E., Inouhe, M., and Joho, M. (2001). Induction for the expression of yeast metallothionein gene, CUP1, by cobalt. *Microbios* **104**, 99-104.
- Tsujikawa, K., Imai, T., Kakutani, M., Kayamori, Y., Mimura, T., Otaki, N., Kimura, M., Fukuyama, R., and Shimizu, N. (1991). Localization of metallothionein in nuclei of growing primary cultured adult rat hepatocytes. *FEBS Lett* **283**, 239-242.
- Udom, A. O., and Brady, F. O. (1980). Reactivation in vitro of zinc-requiring apo-enzymes by rat liver zinc-thionein. *Biochem J* **187**, 329-335.
- Van Assche, F., and Clijster, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* **13**, 195-206.
- Vasak, M., and Hasler, D. W. (2000). Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 177-183.
- 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., 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.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., and Panfoli, I. (2000). Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **46**, 407-417.
- Winge, D. R. (2002). Copper metalloregulation of gene expression. *Adv Protein Chem* **60**, 51-92.
- Winge, D. R., Nielson, K. B., Gray, W. R., and Hamer, D. H. (1985). Yeast metallothionein. Sequence and metal-binding properties. *J Biol Chem* **260**, 14464-14470.
- Wolff, R., and Glaum, E. (1985). *Allgemeine und Physikalische Chemie*. Dümmlers Verlag, Bonn.
- Wood, V., and Bähler, J. (2002). How to get the best from fission yeast genome data. *Comp. Funct. Genom.* **3**, 282-288.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., Goble, A., Hamlin, N., Harris, D., Hidalgo, J., Hodgson, G., Holroyd, S., Hornsby, T., Howarth, S., Huckle, E. J., Hunt, S., Jagels, K., James, K., Jones, L., Jones, M., Leather, S., McDonald, S., McLean, J., Mooney, P., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Niblett, D., Odell, C., Oliver, K., O'Neil, S., Pearson, D., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, R. G., Tivey, A., Walsh, S., Warren, T., Whitehead, S., Woodward, J., Volckaert, G., Aert, R., Robben, J., Grymonprez, B., Weltjens, I., Vanstreels, E., Rieger, M., Schafer, M., Muller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Dusterhoft, A., Fritzc, C., Holzer, E., Moestl, D., Hilbert, H., Borzym, K., Langer, I., Beck, A., Lehrach, H., Reinhardt, R., Pohl, T. M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., et al. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**, 871-880.
- Wright, C. F., Hamer, D. H., and McKenney, K. (1988). Autoregulation of the yeast copper metallothionein gene depends on metal binding. *J Biol Chem* **263**, 1570-1574.
- Wysocki, R., Clemens, S., Augustyniak, D., Golik, P., Maciaszczyk, E., Tamas, M. J., and Dziadkowiec, D. (2003). Metalloid tolerance based on phytochelatin is not functionally equivalent to the arsenite transporter Acr3p. *Biochem Biophys Res Commun* **304**, 293-300.
- Xiang, C., and Oliver, D. J. (1998). Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1539-1550.

-
- Ye, B., Maret, W., and Vallee, B. L. (2001). Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2317-2322.
- Yu, W., Santhanagopalan, V., Sewell, A. K., Jensen, L. T., and Winge, D. R. (1994). Dominance of metallothionein in metal ion buffering in yeast capable of synthesis of (gamma EC)nG isopeptides. *J Biol Chem* **269**, 21010-21015.
- Yuan, D. S., Stearman, R., Dancis, A., Dunn, T., Beeler, T., and Klausner, R. D. (1995). The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2632-2636.
- Zangger, K., Oz, G., Otvos, J. D., and Armitage, I. M. (1999). Three-dimensional solution structure of mouse [Cd7]-metallothionein-1 by homonuclear and heteronuclear NMR spectroscopy. *Protein Sci* **8**, 2630-2638.
- Zeng, J., Heuchel, R., Schaffner, W., and Kagi, J. H. (1991). Thionein (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by zinc finger containing factor Sp1. *FEBS Lett* **279**, 310-312.
- Zhao, H., Butler, E., Rodgers, J., Spizzo, T., Duesterhoeft, S., and Eide, D. (1998). Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the ZAP1 transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements. *J Biol Chem* **273**, 28713-28720.
- Zhao, H., and Eide, D. (1996a). The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2454-2458.
- Zhao, H., and Eide, D. (1996b). The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**, 23203-23210.
- Zhou, H., and Thiele, D. J. (2001). Identification of a novel high affinity copper transport complex in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **276**, 20529-20535.
- Zhu, Y. L., Pilon-Smits, E. A. H., Jouanin, L. and Terry, N. (1999). Overexpression of Glutathione Synthetase in Indian Mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol.* **119**, 73-79.

ID	Protein	Gen	Primer Position	5'Primer	3'Primer
SPAC1805.15c	Ubiquitin-Protein Ligase	pub2	A 1	CCCTTTGGCTTTGTCTGTTC	CTTCCAATCTTGAACGTCGAT
SPBC26H8.07c	β -Tubulin	nda3	A 2	ATGCCGTGAAGTCAGGAAAG	AAACTCCATTTCTCCATGC
SPBC32H8.12c	Actin	act1	A 3	AAATCGCAGCGTTGGTTATT	ATTTACGCTCAGGAGGAGCA
SPBC354.12	GAPDH	gpd3	A 4	GTATCAACGGITTCGGTCGT	TCAACAAACCGTGGGAGTA
SPBC32F12.11	GAPDH	gpd1	A 5	TGGCAATTCCTAAGGTGGT	TGTAGGCCAACCAAGTCAACG
SPCP31B10.07	Elongationsfaktor 2	eft2-2	A 6	TGCCCAACAATGAAGGTTA	ATCACAGACATGGGAGACC
SPCC1450.04	Elongationsfaktor 1B	tef5	A 7	ATCTCACCTCTGACGCTGGT	GGCGATATCGGTAGATTGGA
SPBC28F2.03	Cyclophilin-2	ppil	A 8	TTTTGACGTTATTGCCAACG	GACAATGCGAGCACGAGTAG
SPAC3H1.10	Phytochelatinsynthase	SpPCS	A 10		
SPAC3F10.04	Glutathionsynthetase	gsa1	A 11	GCGAAGCTGTTGCTCACTTA	TTGTGATGGAAACGGCATTTA
SPBC17A3.07	Glutathionreduktase	pgr	A 12	CGCAAAGATGAAAACAGCAA	GTGGGACCTTGTCTTCTTG
SPCC965.07c	Glutathion S-Transferase	gst2	B 1	ATACTCGACTGCTGGAGGAC	TTGGCCTTTGCCAATCTT
SPCC1281.07c	Glutathion S-Transferase		B 2	GATTGGAGCTCAAAGGATGG	GGAAATGGGTCCAAGAGGAGT
SPCC191.09c	put. Glutathion S-Transferase		B 3	CACITTAATGGTCGCAATGCTC	TCTTCGAAGGTAGCCTTGCT
SPAC688.04c	Glutathion S-Transferase		B 4	ATGGATGCTCGAAGAACTCA	ATTCATCAGAGCGAACTTGC
SPBC32F12.03c	Glutathionperoxidase	gpx1	B 5	TTGGCTCCTAAGGCAAGGA	CGAGATGTTCAAGCTTGCTA
SPAC22F3.10c	γ -ECS	gcs1	B 6	GGTGACGCTTAGACAATCA	TGAAATTGCGTATCCACGAA
SPAC664.09	put. γ -Glutamyltranspeptidase		B 7	TACGCCATCCAAATGGTACA	CCTGGAGAAAGCAAAATCGTC
SPAC56E4.06c	γ -Glutamyltranspeptidase		B 8	GAGGCTTGGAAGAGTCATGG	AGCGGTGACAAATACGGCTAC
SPCC737.06c	put. Glutamat-Cystein Ligase		B 9	GTCTGGCATTGGAAATGCTT	CGGCAGTATGCCTTGTCAG
SPBC36.04	put. Cysteinsynthase		B 10	AGCGTATTCAAACGAAGGTT	TTCAAAGGAATGAGCGACTGA
SPAC3A12.17c	put. Cysteinsynthase		B 11	CCGATTCGTTGGAAGAAGAC	TTTGAAAAATGGCGAGATCC
SPAC1039.08	put. Serinacetyltransferase		B 12	CAGACACGGAGAGGACAA	TAAGGGCACCGAAGTATTGC
SPAC10F6.01c	put. Sulfitreduktase		C 1	CCCGAACCTGTCGAAAAGAG	GACCGTAAAAATCCTCCACCA
SPBC409.10	SAICAR	ade7	C 2	CGTTGGATGCTCCATTCAC	GACATCTTCGGGCAAAAGAAA
SPAC144.03	Adenylsuccinatsynthetase	ade2	C 3	GATGGAATAACCGTCGTCCTT	AGGCATCCAAAAATGTCGAAGC
SPAC22H10.13	Metallothionein	zym	C 4		
SPAC17A2.14	Metallionentransporter	MIT	C 6	AAATGGCCGTTATCGTGTTC	CCCATAAACCGGTAACCAAG
SPBC27B12.12c	Metallionentransporter	ALR1	C 7	CGCACCACTATTCCAAAA	ATACCACGGATCAACGGAAC
SPCC825.01	ABC Transporter		C 8	AAGTGGTGGTTGGAGAATGC	TGTTCAAGCATCAGCAAGG
SPAC30.04c	ABC Transporter		C 9	ATTTGTGGGTTGCTTTTTGG	TACCAGTACGACCGACCACA
SPCC1393.10	Kupfertransporter	ctr4	C 10	TCTTCTTCTCCGCTGCAAA	CGGTTGTAGGTGTTGTGTCTG
SPAP8A3.03	Zinktransporter	ZIP	C 11	TAAAGCACGCGAAGATTTGA	TCCGGAAATACGCTAGGTA

ID	Protein	Gen	Primer Position	5'Primer	3'Primer
SPAC4G8.08	MC Transporter		C 12	CATGGCTGCTAGTGCAGGT	GCGTAAAAAGCCACGAGTA
SPAC17D4.03c	put. Metalltransporter		D 1	TTAGTTGCTACGACGCTTGC	ATTGTTTGCCGTTCAAGATT
SPBC3B8.04c	DASS Transporter		D 2	TTGCTAAAAGGTTGGCGACT	TGGCAGGAATACCAAGCTTTT
SPAC1142.05	Kupfertransporter	ctr3	D 3	AGTGGCATGGGTATGGGTAG	CTATCTTGATTGCGAGCATCC
SPCC320.05	Sulfattransporter		D 4	GTCTCGATTCTGACGAGT	GGATACGCTGAAAAGCAAAA
SPBC3H7.02	Sulfattransporter		D 5	TCTCCGATCTGCCATTAAC	GGCTTCTTCTCGTCAAATG
SPAC27F1.08	Nramp Transporter		D 6	GGCCCTGGATTCTTATAGC	GCCAAGGACGTAAATCCAA
SPBC18H10.16	Na-K-Cl Transporter		D 7	GTTGGTTCGGTGGACGTTAT	TGGATTAATGCACAAGGAGGT
SPAC23C11.14	CDF Metalltransporter	zhf1	D 8	GGTCGCTCTCTGGGCTACT	TGGTCACATAAAAAGCGGATG
SPAC3F10.11	Metallioneneffluxtransporter		D 9	CCATTCGTCGCTTGTGTTTG	ACGGTAAAACATCGCTGGAAA
SPCC737.09c	HMT1 ABC Transporter	hmt1	D 10	TTAATAGCTGGCGCAGAGT	CGGCCAGATGCAAGTCTATT
SPAC15A10.01	mitochondr. ABC Transporter		D 12	CTGATTCGTCGTCAGCA	TCTCAATAGTGGCGTTCAG
SPAC3F10.02c	Kaliumtransporter	trk1	E 1	ATTGCTGCCTTTGTGACCTT	AGGAAGAAGGATGGCTCGAT
SPCC1827.07c	DASS Transporter		E 2	TGGACTCTTGTTGGTGCAG	TCTCAGCAAGGTCACAAAA
SPCC1020.03	CDF Metalltransporter		E 3	ACCATGGATCGGACAAAAGAA	GATGCGAATGTTCAACAGAA
SPCC1884.02	NiCoT Transporter	nic1	E 4	ACCAAAAGTTAGCGTGCCTA	TCCTACTTGCACTGGAGGTGT
SPBC359.05	put. ABC Transporter		E 5	AAACAAAGATTCCCCTCCA	CACAGTGGTCCTCAAGAAA
SPCC126.09	ZIP Zinktransporter		E 6	TGCTTTTGGCFATTTGGTG	CCGAAGAACCAATACCTCCA
SPBC16D10.06	ZIP Zinktransporter		E 7	TCGTAATGGTGCCATCTTTG	CGAGCATGCCAAAAGGTAA
SPBC23G7.16	Kupfertransporter	ctr2	E 8	ATCACGGCGGTAATTCTACG	CTCCTATAGCCAAAAGCAGCA
SPAC521.04c	Calciumpermease		E 9	GACGGCTGATAGACCAGAA	CTTGCAATGGAACGAAAAA
SPBC29A3.01	P-Typ CuATPase		E 10	GAGCGTGGAGACCTCATCT	TCCATACAGCCCAAGAAAAC
SPBP26C9.03c	put. Metalltransporter		E 11	GATTTGGCTGGCACAAGTTTT	ACTAAGCGAACCTCCGAATG
SPCC1795.02c	H/Ca Exchanger		E 12	AGGATGGTTGAATGGAACG	GCGAGAACAACAATCGCATA
SPAC1F5.08c	Calciumkanal	yam8	F 1	CGCGAACGATTTGATGTTAT	TCTTTATAGGGGCCTGGTTG
SPAC821.10c	Cu,Zn Superoxiddismutase	sod1	F 2	GCTGTAGCAGTTCTTCGTGGT	GACACCACAAGCGTTACGTG
SPAC8C9.14	Hitzeschock Transcriptionsfaktor	prf1	F 3	GTTCCCTCTCATCTCTCCA	TGCTTGAATGGGATCCTGTA
SPBC3F6.03	Thioredoxinreduktase	trr1	F 4	GCCATACTGCAGCCATCTAT	TCGGTATCTTCCAATTCTTCA
SPCC830.11c	oxidat. Streßantwortprotein		F 5	TGGTACACCTGGTACTGGAAA	TTCCAGTTTGTAACCCATTGA
SPAC23A1.06c	Serin/Threonin Proteinkinase	cmk2	F 6	CTTGCTGCCAAAATGTCAA	GGGATAATTTCCGTCCACCT
SPAPYUG7.02c	MAP Kinase interacting Protein	sin1	F 7	TGCTGGGGTCAAGTTAATC	ATGCCGAATATGCGTTTTGT
SPBC2G5.06c	Sulfidquinon Reduktase	cad1	F 8	TGGTGCTGGAATTGATTCG	GCGACGAGGTACAGTTTGGT
SPBC839.06	P-Typ Kationen ATPase	cta3	F 9	GTTGTAAAAGCGAGCCAAC	ATTGGGAACACGGAAGATG

ID	Protein	Gen	Primer Position	5'Primer	3'Primer
SPCC188.02	Proteinphosphatase PP2A	par1	F 10	AAGGCTCCGAAAGAGTCTCC	GCCCAAGACAACCTCTTCTG
SPAC4D7.05	Translationsinitiationsfaktor	tif34	F 11	GGTCATGAGCGTCCTTTGAC	GAAGAAGTGCACCCGAACAT
SPAC7D4.07c	Thioredoxin	trx2	F 12	ATGGTGAAACAAGTCTCCGA	TTAGAGGTTCGCCTTAATAG
SPBC3B8.10c	Membranphosphatase		G 1	AGGAATGAAAAACCGAAGCA	CGACAAGTGCAAGTGTGA
SPBC29B5.01	Transkriptionsfaktor	atf1	G 2	AA CCCCTACTGGAGCTGGAT	AGCAGCCGAATTACTCTTGG
SPBC30D10.10c	Kinase	tor1	G 3	CATTGGCTCGGATTTATTT	AGCCCTAAACCGAAGCGTAT
SPAC664.11	HSP70	ssc1	G 4	CAGTTTTCGATTTGGGTGGT	CCATGTCACCTGGCACGATAC
SPBC409.07c	Serin/Threonin Proteinkinase	wis1	G 6	CACCACCTGGAAAACTCGAT	ATGATAATCGGGACGCAAAG
SPBC119.08	Serin/Threonin Proteinkinase	pmk1	G 7	GTGAAGGAGTTGGGTCAAAG	GTCGGACTTTCTGACGGAAG
SPCC1322.08	Serin/Threonin Proteinkinase	srk	G 8	TCGTTTCGCCTCACCTATTTT	CTTATTCGCGACCTTTGAG
SPBPJ4664.06	UDP_GLC-Glycoprotein	gpt1	G 9	CGGACGGATGATTTGTCTT	ATGTCGGCAGACTCAAACC
SPAC21E11.03c	bZIP Transkriptionsfaktor	pcr1	G 10	CGAATTCTGGAGCGCAATC	CCCACCAAGGGATCTAGGAA
SPAC22E12.04	Kupferchaperon		G 11	GAATACCCTCGAGCAGGAAT	CAGACAGTCGATTTCCGTTA
SPBC26H8.14c	Kupferchaperon	cox17	G 12	ATGTCGTCGCTACTGAACC	TTATACCTCGTAACCGTATTG
SPCC1739.12	Serin/Threonin Proteinkinase	ppe1	H 12	TGACTTGATGAATGGATCG	CGCTTCTTTTTCTGCTAGGG
SPAC23E2.01	Eisentransportregulator	fep1	H 2	ATCGTCCCGTTACCATGAAG	GAGGACCTCAGCCATTCATC
SPAC57A10.02	Serin/Threonin Proteinkinase	cdr2	H 3	CTCTCCTCAAGCCCAACATC	GTTGCAATTTGCGTATGGTTG
SPBC11B10.09	Serin/Threonin Proteinkinase	cdc2	H 4	AAAAATTGGGGAAGGAACCTA	AATTTTGTGCAAAGCTCGTT
SPBC14C8.07c	Zellteilungsprotein	cdc18	H 5	TCCATTTGCTACTCGCCTTT	TGAGCAATTGATGCTCTTGG
SPBC1347.10	Zellteilungsprotein	cdc23	H 6	AAATGGCAACTGGAGTGCTT	AAGTCCAGTCGCTGTGGAGT
SPBC21D10.12	Zellteilungsprotein	hob1	H 7	GGATGCTGGAAGACGGTTTA	TAACTGGAGGGGGAGGAAAG
SPAC31A2.11c	metallregul. Transkriptionsfaktor	cuf1	H 8	TCTTCATCTGCTTCCAACCTCA	AGGAGGAACTACTGCTTGAAG
SPAC6G10.12c	Zinkfingerprotein, MT-Regul.		H 9	ATGACGCAATTTTCCTTGACC	GGTCGCTCAGATGTGTTTGA
SPAC3A12.14	Calmodulin	cam1	H 10	ATGACTACCCGTAACCTTAC	CTACTTGGAAAGAAATGACAC

pub2	nda3	act1	gpd3	gpd1	eff2-2	tef5	ppil	Vektor	SpPCS	gsa1	pgr1
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	pGEM-T	A10	A11	A12
gst2	gstA	gstB	gstC	gpx1	gcs1	gtpA	gtpB	putgcs	csA	csB	sat
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
MET5	ade7	ade2	zym1	Wasser	MIT	ALR1	ABC1	ABC2	ctr4	ZIP	MRS3
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
flux	DASS	ctr3	SulP1	SulP2	Nramp	CCC	Zhf1	YCF1	hmt1	Leer	ABC3
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
trk1	SYG1	MMT	nic1	ABC4	ZRT3	ZRT1	ctr2	CaP	CuATPase	FET4	HCaP
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
yam8	sod1	prr1	trr1	FAP7	cmk2	sin1	cad1	cta3	par1	tif34	trx2
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
PSR1	atf1	tor1	ssc1	Primer	wis1	pmk1	srk1	gpt1	pcr1	LYS1	cox17
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
ppe1	fep1	cdr2	cdc2	cdc18	cdc23	hob1	cuf1	zfzym	caml	K1	K2
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

$\Delta zym1$ - WT

Gene	Expression	STABW
cam1	-1,15	0,862
zfzym	-1,9	1,044
cuf1	-2,9	1,037
hob1	-1,25	1,015
cdc23	-3,9	0,673
cdc18	-2,2	1,094
cdc2	-2,5	1,174
cdr2	-2,9	0,958
fep1	-1,43	0,521
ppe1	-1,03	0,739
cox17	-0,68	0,542
LYS1	-1,3	1,134
pcr1	-1,33	1,224
gpt1	-0,8	0,934
srk1	0,35	0,764
pmk1	-0,75	0,551
wis1	-2,55	1,05
ssc1	0,27	0,43
tor1	-0,7	0,539
atf1	-1,4	0,581
PSR1	-0,9	0,977
trx2	0,55	0,471
tif34	-0,7	0,581
par1	0,05	0,397
cta3	-2,2	0,822
cad1	0,6	0,25
sin1	-1,35	0,502
cmk2	-1,6	0,404
FAP7	-1,85	0,487
trr1	-0,5	0,291
prr1	0,17	0,524
sod1	-0,7	0,222
yam8	0,5	0,668
HCaP	-3	0,74

 $\Delta zym1$ - WT

Gene	Expression	STABW
FET4	-0,75	0,668
CuATPase	-0,8	0,702
CaP	-1,75	0,682
ctr2	-2,53	0,517
ZRT1	0,45	0,395
ZRT3	-1,8	0,596
ABC4	-1,4	0,493
nic1	-2,8	0,183
MMT	-1,8	0,809
SYG1	-1,75	1,016
trk1	-0,2	0,815
ABC3	-1,65	1,127
hmt1	0,5	0,62
YCF1	-1,9	1,442
Zhfl	-2,1	0,565
CCC	-0,95	0,709
Nramp	-0,8	0,57
SulP2	-0,6	0,471
SulP1	-0,3	2,062
ctr3	-1,6	1,025
DASS	-1,5	0,76
flux	-1,9	1,035
MRS3	-0,85	0,429
ZIP	0,05	0,501
ctr4	0,5	0,395
ABC2	0,2	0,651
ABC1	-1,7	0,491
ALR1	-0,3	0,775
MIT	-1,25	0,335
zym1	-2	0,321
ade2	-0,65	0,628
ade7	-0,3	0,639
MET5	0,5	0,431
sat	-2,1	2,053

 $\Delta zym1$ - WT

Gene	Expression	STABW
csB	-0,3	1,585
csA	-0,53	0,526
putgcs	-0,325	0,774
gtpB	-0,7	1,297
gtpA	-2,1	0,612
gcs1	-1,15	0,538
gpx1	0,5	0,458
gstC	1	0,286
gstB	-3,3	2,528
gstA	-2	1,58
gst2	0,9	0,583
pgr1	-0,7	0,556
gsa1	-0,6	0,856
SpPCS	-0,8	0,386
ppil	-1,2	0,201
tef5	-0,2	0,391
eft2-2	0,2	0,378
gpd1	0,45	0,373
gpd3	1,27	0,199
act1	0,1	0,211
nda3	-0,03	0,831
pub2	0,2	0,91

Arraydaten der in EMM-Medium angezogenen und mit Cadmium behandelten Wildtyp- und $\Delta zym1$ Mutantenkulturen.

Die eingesetzten Cadmiumkonzentrationen richteten sich nach den IC_{50} -Werten (Tabelle 3.2-1) der beiden Stämme. Dabei repräsentieren die negativen bzw. positiven Werte eine Repression bzw. Induktion der Gene in der Mutante. Die orange unterlegten Gene zeigen die, unter Berücksichtigung der Standardabweichung (STABW) und des *cut off* Wertes von 2, signifikant veränderte Genexpression, die gelb unterlegten Gene zeigen weisen eine nicht-signifikante Veränderung auf.

$\Delta zym1$ - WT

Gene	Expression	STABW
cam1	0,67	0,358
zfzym	0,62	0,588
cuf1	-0,1	0,572
hob1	0,4	0,666
cdc23	0,2	1,054
cdc18	-0,3	0,808
cdc2	0,2	0,438
cdr2	-0,6	0,54
fep1	-2,8	0,849
ppe1	0,05	0,507
cox17	0,5	0,244
LYS1	0,1	0,229
pcr1	0,2	0,491
gpt1	0,4	0,476
srk1	0	0,344
pmk1	0,4	0,297
wis1	-0,05	0,667
ssc1	0,5	0,237
tor1	-0,2	0,266
atf1	0,25	0,317
PSR1	0	0,332
trx2	0,5	0,332
tif34	0	0,341
par1	0,6	0,222
cta3	-0,3	0,332
cad1	0,15	0,513
sin1	0,5	0,258
cmk2	0,35	0,513
FAP7	0,6	0,377
trr1	-0,2	0,398
prr1	0,5	0,182
sod1	-1,2	0,615
yam8	0,3	0,601
HCaP	0,05	0,368

 $\Delta zym1$ - WT

Gene	Expression	STABW
FET4	0,07	0,734
CuATPase	0,25	0,303
CaP	0	0,733
ctr2	-0,4	0,318
ZRT1	-0,1	0,562
ZRT3	0,1	0,377
ABC4	0,6	0,402
nic1	-0,7	0,28
MMT	0,1	0,701
SYG1	0,55	0,583
trk1	0,75	0,391
ABC3	0,7	0,405
hmt1	0,25	0,423
YCF1	-0,3	0,979
Zhfl	-1,35	0,67
CCC	0,17	0,199
Nramp	0,3	0,389
SulP2	0,6	0,65
SulP1	0,6	0,129
ctr3	0,15	0,575
DASS	-0,1	0,537
flux	0,1	0,466
MRS3	0,4	0,332
ZIP	0,2	0,3457
ctr4	-0,3	0,203
ABC2	-0,1	0,38
ABC1	-0,5	0,516
ALR1	0,5	0,398
MIT	0,2	0,255
zym1	0,4	0,191
ade2	-0,9	0,416
ade7	0	0,402
MET5	-0,2	0,391
sat	1	0,231

 $\Delta zym1$ - WT

Gene	Expression	STABW
csB	-0,75	0,89
csA	-0,6	0,211
putgs	0,4	0,332
gtpB	0	0,536
gtpA	-0,3	0,357
gs1	-0,1	0,321
gpx1	0,65	0,381
gstC	0,9	0,348
gstB	-0,1	0,316
gstA	-0,6	0,532
gst2	-2,9	1,382
pgr1	0,5	0,552
gsa1	-0,55	0,724
SpPCS	-0,1	0,146
ppil	-1	0,725
tef5	-0,4	0,186
eft2-2	-0,4	0,37
gpd1	-1,4	0,557
gpd3	-0,8	0,638
act1	-0,2	0,392
nda3	-0,2	0,794
pub2	0,5	0,614

Arraydaten der in EMM-Medium angezogenen und mit Kupfer behandelten Wildtyp- und $\Delta zym1$ Mutantenkulturen.

Die eingesetzten Kupferkonzentrationen richteten sich nach den IC_{50} -Werten (Tabelle 3.2-1) der beiden Stämme. Dabei repräsentieren die negativen bzw. positiven Werte eine Repression bzw. Induktion der Gene in der Mutante. Die gelb unterlegten Gene zeigen die, unter Berücksichtigung der Standardabweichung (STABW) und des *cut off* Wertes von 2, nicht-signifikant veränderte Gen-Expression.

$\Delta zym1$ - WT

Gene	Expression	STABW
cam1	-0,6	0,785
zfzym	-1,6	0,651
cuf1	-3,4	1,07
hob1	-1,4	0,305
cdc23	-4,3	1,152
cdc18	-3,9	0,697
cdc2	-2,9	0,649
cdr2	-4,4	1,611
fep1	-2,8	1,292
ppe1	-1,2	1,023
cox17	-1,6	0,354
LYS1	-1,8	0,278
per1	-1,4	0,38
gpt1	-2	0,523
srk1	-2,8	0,34
pmk1	-2	0,506
wis1	-2,3	0,821
ssc1	-0,5	0,51
tor1	-1,8	0,6
atf1	-2,8	0,507
PSR1	-1,6	1,583
trx2	-2,05	0,9808
tif34	-0,5	0,633
par1	-0,988	0,31
cta3	-2,2	0,869
cad1	-1,1	0,354
sin1	-2,25	0,397
cmk2	-2,7	0,563
FAP7	-2,2	0,369
trr1	0,025	0,281
prr1	-1,4	0,907
sod1	-0,4	0,599
yam8	0,35	0,491
HCaP	-1	0,379

 $\Delta zym1$ - WT

Gene	Expression	STABW
FET4	-0,8	1,039
CuATPase	-0,6	0,559
CaP	-1,3	0,853
ctr2	-2,225	0,227
ZRT1	-4,1	0,573
ZRT3	-2,85	0,313
ABC4	-1,7	0,444
nic1	-3,4	0,922
MMT	-2,2	0,673
SYG1	-2,2	0,857
trk1	-0,7	0,601
ABC3	0,1	0,234
hmt1	-1,2	0,355
YCF1	-2	1,252
Zhf1	-3,1	0,464
CCC	-2,2	0,807
Nramp	-3,1	0,572
SulP2	-4	1,402
SulP1	-0,9	0,233
ctr3	-1,3	0,965
DASS	-2	1,419
flux	-0,9	0,585
MRS3	-0,6	0,459
ZIP	-0,9	0,62
ctr4	-1,2	0,298
ABC2	-0,5	0,572
ABC1	-1,8	0,404
ALR1	-2	0,512
MIT	-1,5	0,606
zym1	-0,8	0,309
ade2	-1,4	0,618
ade7	-0,6	0,73
MET5	0,5	0,144
sat	-0,1	0,389

 $\Delta zym1$ - WT

Gene	Expression	STABW
csB	-0,7	0,795
csA	-0,7	0,614
putgcs	0	0,644
gtpB	-1,6	0,798
gtpA	-2,4	0,81
gcs1	-2	0,541
gpx1	-1	0,443
gstC	-0,1	0,642
gstB	-2,9	1,186
gstA	-3,9	0,913
gst2	-0,3	0,871
pgr1	1,3	0,525
gsa1	-1,1	0,288
SpPCS	-0,8	0,471
ppil	-1,3	0,534
tef5	0,5	0,506
eft2-2	-0,5	0,241
gpd1	0,6	0,129
gpd3	-0,3	0,202
act1	0	0,509
nda3	-1	0,284
pub2	-0,7	0,62

Arraydaten der in EMM-Medium angezogenen und mit Zink behandelten Wildtyp- und $\Delta zym1$ Mutantenkulturen.

Die eingesetzten Zinkkonzentrationen richteten sich nach den IC_{50} -Werten (Tabelle 3.2-1) der beiden Stämme. Dabei repräsentieren die negativen bzw. positiven Werte eine Repression bzw. Induktion der Gene in der Mutante. Die orange unterlegten Gene zeigen die, unter Berücksichtigung der Standardabweichung (STABW) und des *cut off* Wertes von 2, signifikant veränderte Genexpression, die gelb unterlegten Gene zeigen weisen eine nicht-signifikante Veränderung auf.

$\Delta zym1$ - WT

Gene	Expression	STABW
cam1	-1,1	0,541
zfzym	-1,5	0,374
cuf1	-1,9	0,765
hob1	-1,15	0,515
cdc23	-2,7	0,132
cdc18	-3,3	0,684
cdc2	-2,1	0,769
cdr2	-1,9	0,599
fep1	0,76	0,327
ppe1	-1,02	0,402
cox17	-0,87	0,427
LYS1	0,96	0,706
per1	1,3	0,785
gpt1	1,02	0,787
srk1	1,45	0,826
pmk1	-0,15	0,264
wis1	-1,85	0,515
ssc1	-0,03	0,426
tor1	-0,86	0,295
atf1	-1,2	0,559
PSR1	1,2	0,165
trx2	-1,86	0,29
tif34	0,7	1,576
par1	-0,76	0,364
cta3	-0,8	1,784
cad1	1,9	0,389
sin1	1,2	0,287
cmk2	-0,9	0,359
FAP7	-0,8	0,323
trr1	-0,3	0,2
prr1	1,47	0,557
sod1	-1	0,222
yam8	0,6	0,668
HCaP	2,6	0,632

 $\Delta zym1$ - WT

Gene	Expression	STABW
FET4	1,02	0,415
CuATPase	-0,045	0,694
CaP	2,1	0,231
ctr2	-1,8	0,206
ZRT1	0,7	0,524
ZRT3	0,3	0,154
ABC4	1,5	0,277
nic1	-3,3	0,15
MMT	-1,2	0,267
SYG1	-1,67	0,396
trk1	1	0,356
ABC3	0,4	0,315
hmt1	2,3	0,594
YCF1	1,6	0,465
Zhf1	1,2	0,461
CCC	1	0,401
Nramp	-1,8	0,465
SulP2	1,5	0,471
SulP1	0,7	0,481
ctr3	-1,3	0,401
DASS	-1,7	0,602
flux	-1,1	0,726
MRS3	0,8	0,361
ZIP	0,95	0,576
ctr4	-0,8	0,288
ABC2	1,1	0,604
ABC1	-1,7	0,39
ALR1	0,6	0,541
MIT	1,4	0,302
zym1	1,5	0,232
ade2	-2,05	0,47
ade7	0,8	0,537
MET5	-1	0,42
sat	-1,8	0,726

 $\Delta zym1$ - WT

Gene	Expression	STABW
csB	-0,7	1,341
csA	-0,03	0,347
putgcs	-0,8	0,499
gtpB	-0,8	0,897
gtpA	-1,5	0,23
ges1	-2,2	0,426
gpx1	0,8	0,413
gstC	1	0,3
gstB	-1,4	0,267
gstA	1,1	0,362
gst2	-0,1	0,632
pgr1	-0,6	1,256
gsa1	-1,5	0,357
SpPCS	1,2	0,15
ppil	0,3	0,233
tef5	-0,3	0,312
eft2-2	-0,3	0,42
gpd1	-0,15	0,341
gpd3	1,03	0,058
act1	-0,45	0,235
nda3	0,37	0,503
pub2	0,4	0,518

Arraydaten der in YE-Medium angezogenen und mit Cadmium behandelten Wildtyp- und $\Delta zym1$ Mutantenkulturen.

Die eingesetzten Cadmiumkonzentrationen richteten sich nach den IC_{50} -Werten (Tabelle 3.2-1) der beiden Stämme. Dabei repräsentieren die negativen bzw. positiven Werte eine Repression bzw. Induktion der Gene in der Mutante. Die orange unterlegten Gene zeigen die, unter Berücksichtigung der Standardabweichung (STABW) und des *cut off* Wertes von 2, signifikant veränderte Genexpression, die gelb unterlegten Gene zeigen weisen eine nicht-signifikante Veränderung auf.

Δzym1 - WT

Gene	Expression	STABW
cam1	-0,5	0,516
zfyym	-0,1	0,38
cuf1	0,7	0,405
hob1	0,6	0,402
cdc23	-0,2	0,392
cdc18	-0,9	0,416
cdc2	0	0,402
cdr2	0,5	0,398
fep1	0,25	0,317
ppe1	0,15	0,513
cox17	0,67	0,358
LYS1	0	0,733
per1	0,17	0,199
gpt1	-0,3	0,808
srk1	0,2	0,438
pmk1	0,2	1,054
wis1	-0,6	0,54
ssc1	0,35	0,513
tor1	0,5	0,244
atf1	-0,6	0,211
PSR1	-0,75	0,89
trx2	-0,3	0,332
tif34	-0,4	0,318
par1	0,15	0,575
cta3	-0,3	0,203
cad1	0,25	0,303
sin1	-0,1	0,572
cmk2	-0,1	0,537
FAP7	-0,4	0,37
tr1	0,6	0,377
pr1	-2,8	0,849
sod1	0,07	0,734
yam8	0,1	0,466
HCaP	-0,1	0,321

Δzym1 - WT

Gene	Expression	STABW
FET4	-1,4	0,557
CuATPase	-0,8	0,638
CaP	0,4	0,476
ctr2	0,65	0,381
ZRT1	-0,55	0,724
ZRT3	-0,9	0,384
ABC4	-0,6	0,532
nic1	-0,1	0,316
MMT	0,9	0,348
SYG1	-0,3	0,357
trk1	0	0,536
ABC3	0,05	0,368
hmt1	0,25	0,423
YCF1	0,4	0,666
Zhf1	0,1	0,229
CCC	-0,2	0,391
Nramp	0,2	0,255
SulP2	0,1	0,701
SulP1	0,4	0,332
ctr3	-0,2	0,794
DASS	-0,7	0,28
flux	0,3	0,389
MRS3	0,6	0,222
ZIP	0,2	0,491
ctr4	0,5	0,552
ABC2	0,4	0,297
ABC1	0,05	0,507
ALR1	-1	0,725
MIT	0,5	0,182
zym1	0	0,332
ade2	0,5	0,614
ade7	0,4	0,332
MET5	1	0,231
sat	0,5	0,258

Δzym1 - WT

Gene	Expression	STABW
csB	-1,2	0,615
csA	-0,1	0,146
putgs	0	0,344
gtpB	0,5	0,237
gtpA	0,6	0,129
gcs1	0,6	0,65
gpx1	0,55	0,583
gstC	-0,4	0,186
gstB	0	0,341
gstA	-0,2	0,266
gst2	0,75	0,391
pgr1	-0,2	0,398
gsa1	0,5	0,332
SpPCS	-0,05	0,667
ppil	0,3	0,601
tef5	-0,3	0,979
eft2-2	0,62	0,588
gpd1	-0,35	0,67
gpd3	0,2	0,3457
act1	-0,1	0,562
nda3	0,1	0,377
pub2	0,4	0,191

Arraydaten der in YE-Medium angezogenen und mit Kupfer behandelten Wildtyp- und *Δzym1* Mutantenkulturen.

Die eingesetzten Kupferkonzentrationen richteten sich nach den IC₅₀-Werten (Tabelle 3.2-1) der beiden Stämme. Dabei repräsentieren die negativen bzw. positiven Werte eine Repression bzw. Induktion der Gene in der Mutante. Die gelb unterlegten Gene zeigen die, unter Berücksichtigung der Standardabweichung (STABW) und des *cut off* Wertes von 2, nicht-signifikant veränderte Gen-Expression.

$\Delta zym1$ - WT

Gene	Expression	STABW
cam1	-0,75	0,508
zfyym	-1,1	0,474
cuf1	-4,3	0,833
hob1	-3,55	0,561
cdc23	-3,9	0,14
cdc18	-4,4	0,743
cdc2	-4	0,736
cdr2	-3,4	0,603
fep1	-0,27	0,399
ppe1	-1,67	0,378
cox17	-2,12	0,427
LYS1	-1,9	0,86
per1	-2,745	2,027
gpt1	-2	0,734
srk1	-1,45	0,664
pmk1	-4,25	0,322
wis1	-3,35	0,523
ssc1	0,13	0,412
tor1	-2	0,341
atf1	-1,9	0,417
PSR1	-1,4	0,269
trx2	-0,65	0,379
tif34	-0,9	0,474
par1	-0,55	0,241
cta3	-4,1	0,865
cad1	0,1	0,329
sin1	-3,85	0,191
cmk2	-3,8	0,321
FAP7	-3,75	0,365
tr1	0,2	0,291
prr1	-1,5	0,744
sod1	-1,5	0,285
yam8	1	0,579
HCaP	-1,6	0,506

 $\Delta zym1$ - WT

Gene	Expression	STABW
FET4	-1,3	0,508
CuATPase	-0,8	0,45
CaP	-4,2	0,289
ctr2	-1,5	0,264
ZRT1	-1,7	0,323
ZRT3	-3,4	0,246
ABC4	-3,8	0,471
nic1	-3,2	0,171
MMT	-1,9	0,126
SYG1	-2,2	0,358
trk1	-1,6	0,339
ABC3	-1,1	0,265
hmt1	-1,4	0,575
YCF1	-1,9	0,907
Zhf1	-1,8	0,547
CCC	-2,3	0,478
Nramp	-4,05	0,288
SulP2	-4,2	0,772
SulP1	-0,8	0,481
ctr3	-0,8	0,425
DASS	-1,9	0,531
flux	-2,75	1,698
MRS3	-0,4	0,279
ZIP	-0,95	0,592
ctr4	-1,8	0,481
ABC2	-0,2	0,509
ABC1	-1,8	0,371
ALR1	-2,1	0,513
MIT	-4,2	0,264
zym1	-0,8	0,246
ade2	-3,25	0,516
ade7	-0,9	0,487
MET5	-0,3	0,252
sat	-0,5	0,839

 $\Delta zym1$ - WT

Gene	Expression	STABW
csB	-0,5	0,416
csA	-0,07	0,604
putgcs	-2	0,549
gtpB	-2,1	0,841
gtpA	-2,1	0,306
gcs1	-2,3	0,388
gpx1	-1,4	0,345
gstC	-1,8	0,267
gstB	-1,8	0,297
gstA	-2,2	0,344
gst2	-0,7	0,673
pgr1	1,1	0,211
gsa1	-1,6	0,37
SpPCS	-1,6	0,2
ppil	-0,4	0,156
tef5	0,9	0,624
eft2-2	0,6	0,23
gpd1	0,3	0,353
gpd3	-0,07	0,108
act1	0,6	0,235
nda3	-0,77	0,492
pub2	-0,3	0,374

Arraydaten der in YE-Medium angezogenen und mit Zink behandelten Wildtyp- und $\Delta zym1$ Mutantenkulturen.

Die eingesetzten Zinkkonzentrationen richteten sich nach den IC_{50} -Werten (Tabelle 3.2-1) der beiden Stämme. Dabei repräsentieren die negativen bzw. positiven Werte eine Repression bzw. Induktion der Gene in der Mutante. Die orange unterlegten Gene zeigen die, unter Berücksichtigung der Standardabweichung (STABW) und des *cut off* Wertes von 2, signifikant veränderte Genexpression, die gelb unterlegten Gene zeigen weisen eine nicht-signifikante Veränderung auf.

EMM-Medium

ID	Expression	Gen	Bemerkung
SPBC31E1.02c	-2.773	pgak2	(P-Typ Kalzium ATPase) (EC 3.6.1.38)
SPAC17G8.14c	-2.514	pck1	Serin/Threonin Proteinkinase
SPAC1F8.01	2.482	ght3	Hexosetransporter
SPBC1D7.05	2.453	byr2	Serin/Threonin Proteinkinase ste8 (MAPK Kinase Kinase)
SPBC1718.07c	2.237	zfs1	Zinkfingerprotein zfs1
SPBC32F12.05c	2.144	cwf12	Zellzyklus kontrollierendes Protein cwf12
SPCC11E10.07c	2.064		Translationsinitiationsfaktor eif-2b alpha subunit

YE-Medium

ID	Expression	Gen	Bemerkung
SPAC105.01c	-3.261	kha1	Kalium/Protonen Antiporter
SPAC1F12.07	3.115		Phosphoserinaminotransferase (EC 2.6.1.52) (PSAT).
SPAC1687.14c	-3.009		Kalzium-bindendes Protein
SPBC1683.08	-2.585	ght4	Hexosetransporter
SPCC1884.02	2.268	nic1	NiCo-Transporter
SPBC119.10	-2.167		(Glutamin abhängige Asparaginsynthetase) (EC 6.3.5.4)
SPAC19G12.02c	-2.138	pms1	involviert in die DNA-Reparatur

Die in den Tabellen dargestellten Werte zeigen die nach Korrelation mit den Qualitätsstandards und unter Berücksichtigung des *cut off* Wertes von 2 unterschiedlich exprimierten Gene. Dabei repräsentieren die negativen bzw. positiven Werte eine Repression bzw. Induktion der Gene in der Mutante.

	10	20	30	40	50
	CTCGAGATGGAACACACTACCCAATGTAAGAGCAAACAAGGCAAGCCTTG				
SpMT-pYX3-31.SEQ (1>163)	CTCGAGATGGAACACACTACCCAATGTAAGAGCAAACAAGGCAAGCCTTG				
SpMT-pYX2-51.SEQ (1>153)	GAGATGGAACACACTACCCAATGTAAGAGCAAACAAGGCAAGCCTTG				
SpMTg.SEQ (1>153)	ATGGAACACACTACCCAATGTAAGAGCAAACAAGGCAAGCCTTG				
	60	70	80	90	100
	CGACTGCCAATCCAAGTGCGGTTGCCAAGATTGCAAAGAGTCTTGTGGTT				
SpMT-pYX3-31.SEQ (1>163)	CGACTGCCAATCCAAGTGCGGTTGCCAAGATTGCAAAGAGTCTTGTGGTT				
SpMT-pYX2-51.SEQ (1>153)	CGACTGCCAATCCAAGTGCGGTTGCCAAGATTGCAAAGAGTCTTGTGGTT				
SpMTg.SEQ (1>153)	CGACTGCCAATCCAAGTGCGGTTGCCAAGATTGCAAAGAGTCTTGTGGTT				
	110	120	130	140	150
	GCAAAGAGCAGCGCTGTTGATAACTGCAAGTGCTCTTCTTGCAAATGTGCT				
SpMT-pYX3-31.SEQ (1>163)	GCAAAGAGCAGCGCTGTTGATAACTGCAAGTGCTCTTCTTGCAAATGTGCT				
SpMT-pYX2-51.SEQ (1>153)	GCAAAGAGCAGCGCTGTTGATAACTGCAAGTGCTCTTCTTGCAAATGTGCT				
SpMTg.SEQ (1>153)	GCAAAGAGCAGCGCTGTTGATAACTGCAAGTGCTCTTCTTGCAAATGTGCT				
	160				
	TCGAAGGGCGGCCGC				
SpMT-pYX3-31.SEQ (1>163)	TCGAAGGGCGGCCGC				
SpMT-pYX2-51.SEQ (1>153)	TCGAAGGGC				
SpMTg.SEQ (1>153)	TCGAAGGGC				

	10	20	30	40	50
	CTCGAGATGGAACACACTACCCAATGTAAGAGCAAACAAGGCAAGCCTTG				
SpMT-PSLF6-5.seq (1>165)	CTCGAGATGGAACACACTACCCAATGTAAGAGCAAACAAGGCAAGCCTTG				
SpMT-pSLF6-3.SEQ (1>165)	CTCGAGATGGAACACACTACCCAATGTAAGAGCAAACAAGGCAAGCCTTG				
SpMTg.SEQ (1>153)	a t g g a a c a c a c t a c c c a a t g t a a g a g c a a a c a a g g c a a g c c t t g				
	60	70	80	90	100
	CGACTGCCAATCCAAGTGCGGTTGCCAAGATTGCAAAGAGTCTTGTGGTT				
SpMT-PSLF6-5.seq (1>165)	CGACTGCCAATCCAAGTGCGGTTGCCAAGATTGCAAAGAGTCTTGTGGTT				
SpMT-pSLF6-3.SEQ (1>165)	CGACTGCCAATCCAAGTGCGGTTGCCAAGATTGCAAAGAGTCTTGTGGTT				
SpMTg.SEQ (1>153)	c g a c t g c c a a t c c a a g t g c g g t t g c c a a g a t t g c a a a g a g t c t t g t g g t t				
	110	120	130	140	150
	GCAAAGAGCAGCGCTGTTGATAACTGCAAGTGCTCTTCTTGCAAATGTGCT				
SpMT-PSLF6-5.seq (1>165)	GCAAAGAGCAGCGCTGTTGATAACTGCAAGTGCTCTTCTTGCAAATGTGCT				
SpMT-pSLF6-3.SEQ (1>165)	GCAAAGAGCAGCGCTGTTGATAACTGCAAGTGCTCTTCTTGCAAATGTGCT				
SpMTg.SEQ (1>153)	g c a a g a g c a g c g c t g t t g a t a a c t g c a a g t g c t c t t c t t g c a a a t g t g c t				
	160				
	TCGAAGGGCGGCCGC				
SpMT-PSLF6-5.seq (1>165)	TCGAAGGGCGGCCGC				
SpMT-pSLF6-3.SEQ (1>165)	TCGAAGGGCGGCCGC				
SpMTg.SEQ (1>153)	t c g a a g t a a				

Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit zur Seite standen.

Mein erster Dank gilt Dr. Stephan Clemens für das in mich gesetzte Vertrauen und die Möglichkeit meine wissenschaftlichen Ideen selbstständig in die Tat umzusetzen. Ich bedanke mich für die Diskussionsbereitschaft und das Interesse am Fortgang der Arbeit.

Des weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. D. Scheel für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und die herzliche Aufnahme in die Abteilung Streß- und Entwicklungsbiologie bedanken.

Herrn Prof. G.-J. Krauß danke ich für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg, dessen Name ich mir wohl nie merken werde, und für die jahrelange finanzielle Unterstützung.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei der gesamten „Heavy Metal“ Arbeitsgruppe, auch bei Christoph, für das angenehme Arbeitsklima. Mein besonderer Dank gilt besonders Thomas Maier, dessen Lachen unverwechselbar und dessen Tips und Ratschläge unbezahlbar waren.

Bei Dr. Ute Krämer und ihrer Arbeitsgruppe möchte ich mich für die intensiven Diskussionen während unserer Arbeitsgruppentreffen und für die Möglichkeit das ICP-AES nutzen zu dürfen bedanken. Hierbei möchte ich besonders Astrid Schröder danken, die mich bei den ICP-AES-Messungen sehr unterstützte.

Für die Bestimmung der Glutathiongehalte und die große Unterstützung bei den Gelfiltrationsexperimenten möchte ich mich bei Bianca Braha und Issam (Eschnu) ElGhazi bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt außerdem der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Johanningmeier für die Möglichkeit, die Messungen zum Sauerstoffverbrauch durchführen zu können.

Udo Roth und Jörg Ziegler danke ich für die Einführung in die 2D-Gel- bzw. Macroarray-technik.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Streß- und Entwicklungsbiologie danke ich für die vielen schönen Jahre und die harmonische Arbeitsatmosphäre.

Meinen Eltern möchte ich danken, daß sie es mir ermöglichten diesen Weg zu gehen. Meiner Mutter möchte ich danken, daß sie den von mir formulierten Sätzen wieder zu einem deutschen Satzbau verholfen hat. Meinem „kleinen“ Bruder danke ich, daß er mir einen so schnellen Rechner zusammengebastelt hat und auch sonst bei Computerproblemen Tag und Nacht erreichbar war.

Meinen Großeltern danke ich für die Unterstützung und ihre Liebe all die Jahre. Ihr habt immer an mich geglaubt, auch in schlechten Zeiten, und es verstanden mich wieder aufzubauen.

Bei Kai und seinen Eltern möchte ich mich ganz herzlich für die vielen aufmunternden Worte und die Unterstützung bedanken.

Last but not least I like to thank Len for the inspiration of the „cunning plan“ which worked out in every respect.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Dissertation wurde an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht. Ich habe keinen Dokortitel in dieser noch einer anderen Fachrichtung erworben.

Halle (Saale), Februar 2004

Claudia Simm