

Zur Biochemie und Molekularbiologie der Schwermetallaufnahme und -speicherung bei höheren Pflanzen

FRIEDHELM MAYWALD und HANS JOACHIM WEIGEL

Institut für Produktions- und Ökotoxikologie

1 Einleitung

Als Schwermetalle bezeichnet man im allgemeinen eine Gruppe von etwa 40 Elementen, deren spezifische Dichte einen definierten Wert (ca. 6 g/cm^3) überschreitet und bei denen die typischen metallischen Eigenschaften wie „elektrische Leitfähigkeit“, „Ligandenspezifität“ sowie eine Kernladungs- bzw. Protonenzahl > 20 nachweisbar sind (Holle mann und Wi berg, 1985; Raskin et al., 1994). Nach der von der europäischen Kommission herausgegebenen Richtlinie werden hier u. a. die Metalle Cadmium (Cd), Chrom (Cr), Kupfer (Cu), Blei (Pb), Nickel (Ni), Thallium (Tl), Quecksilber (Hg), Zink (Zn) und Arsen (As) genannt. Spurenelemente wie Bor (B), Kupfer (Cu), Eisen (Fe), Molybdän (Mo), Mangan (Mn) und Zink (Zn) sind für die Pflanze essentiell und in allgemeine metabolische Prozesse (z. B. Cofaktoren und Aktivatoren bei Enzymreaktionen) involviert (Marschner, 1995; Lippard und Berg, 1995). Es ist bekannt, daß die Unter- oder Überschreitung des optimalen Versorgungsgrades an Spurenelementen in dem System „Boden-Pflanze“ zu Schäden der Bodenmikroflora und -fauna sowie zu Ertragseinbußen führt.

Schwermetalle sind natürliche Bestandteile von Ökosystemen. Ihre Anreicherung im Boden, im Wasser und in der Luft ist vor allem das Resultat anthropogener Aktivitäten (z. B. Bergbau, Erzgewinnung und Klärschlammdeponierung) (Seaward und Richardson, 1990; Davis, 1984). Aufgrund der negativen Umweltwirkungen vieler Schwermetalle ist es an „Problemstandorten“ (kontaminierte gartenbauliche und landwirtschaftliche Flächen sowie Altlastenstandorte) notwendig, Maßnahmen zur Reduzierung der Schwermetallbelastung des Bodens zu ergreifen.

Zu diesen Maßnahmen gehört u. a. auch die Sanierung schwermetallbelasteter Böden mit chemisch-physikalischen und biologischen Methoden. Seit vielen Jahren ist man auf der Suche nach „sanften“ Sanierungsmöglichkeiten, die einerseits eine kontinuierliche Nutzung des Bodens durch die Landwirtschaft ermöglichen und zum anderen keine Deponieräume für schwermetallhaltigen Abraum erforderlich machen. Zu den biologischen Methoden der Bodensanierung gehört auch das Konzept der Schwermetallentfernung mit Hilfe von höheren Pflanzen. Dieses ist bereits vor 17 Jahren für Cadmium vorgeschlagen worden (Utsunomiya, 1980) und wird heute aus den genannten Gründen als eine Bodensanierungstechnologie der Zukunft und Alternative zu den etablierten chemisch-physikalischen Verfahren betrachtet. Für die Biokonzentration von Schwermetallen mit höheren Pflanzen ist von Raskin der Begriff „Phytoremediation“ geprägt worden (I. Raskin, Grant Proposal # R81869, 1991, zitiert in Raskin et al., 1994). „Phytoremediation“ als eine moderne Form des „Environmental Cleanup“ muß auch insofern als neue Technologie des Umweltengineering angesehen wer-

den, als ein der jeweiligen Problematik angepaßtes Pflanzen-Design mit Hilfe gentechnologischer Methoden neue Möglichkeiten bieten wird, stark schwermetallbelastete Ökosysteme gezielt beeinflussen zu können bzw. zu einer Verbesserung der Belastungssituation beizutragen. Dabei werden weitere Erkenntnisse auf den beteiligten Teilgebieten der Pflanzenphysiologie, Bodenchemie, Bodenmikrobiologie als auch der Pflanzenmolekularbiologie eine entscheidende Rolle spielen. Voraussetzung für eine eventuelle praktische Umsetzung dieser neuen Technologie ist vor allem die Aufklärung und Charakterisierung von Metallaufnahme- und -speichereigenschaften, die sich je nach Pflanzenart und Metallspezifität zum Teil erheblich voneinander unterscheiden können. Der vorliegende Beitrag gibt einen Überblick über den derzeitigen Kenntnisstand zu den biochemisch-molekularbiologischen Grundlagen dieser unterschiedlichen Schwermetallaufnahmeeigenschaften von Kultur- und Wildpflanzenarten.

2 Unterschiede im Schwermetallaneignungsvermögen von höheren Pflanzen

Das Phänomen der Anpassung von Pflanzen an Böden, die mit Schwermetallen angereichert sind, wurde bereits in der Vergangenheit ausführlich dokumentiert (Baker und Brooks, 1989). Man erkannte, daß die Natur und der Grad der Schwermetallverträglichkeit im wesentlichen durch die Standortbedingungen für die Pflanze determiniert werden und in vielen Fällen metallspezifisch sind. In einigen Fällen wird jedoch eine multiple Metallresistenz, also eine Reaktion gegenüber mehr als einem Schwermetall beobachtet, wobei sogar Kreuzresistenzen oder Cotoleranzen auftreten können. Zum Beispiel wurde in *Silene vulgaris* eine Cotoleranz gegenüber Cd, Cu und sogar Zn nachgewiesen (Verkleij und Prast, 1989). Obwohl inzwischen viele genetische Untersuchungen zur Schwermetallresistenz vorliegen, ist bisher nicht eindeutig geklärt, ob diese Art der Resistenz nur durch ein Gen kontrolliert wird oder ob die Reaktion der Pflanze polygener Natur ist (Macnair, 1993).

2.1 Mechanismen der Schwermetalltoleranz

Heute unterscheidet man bei pro- und eukaryontischen Organismen im wesentlichen zwei grundsätzliche Mechanismen, die zu einer Toleranz gegenüber exzessiven Schwermetallkonzentrationen führen. Analog zu den allgemeinen Streß-Konzepten von Levitt (1980) wird eine Resistenz von höheren Pflanzen gegenüber Schwermetallen einmal durch das Prinzip der Vermeidung („Avoidance“-Mechanismen), das heißt z. B. durch die Exklusion oder Restriktion der Metallaufnahme (Taylor, 1987; Cumming und Taylor, 1990), zum anderen durch Akkumulation, Speicherung und Inaktivierung der Metalle auf-

grund ihrer Bindung an Aminosäuren, Peptide oder Proteine („Tolerance“-Mechanismen) erreicht (Verkleij und Schat, 1990).

Zu den "Avoidance"-Mechanismen gehören z. B.:

- (I) Immobilisierung von Metallen in der Zellwand,
- (II) Änderungen in der Membranpermeabilität aufgrund veränderter Membranstrukturen,
- (III) Bildung von Redox-Barrieren an der Plasmamembran,
- (IV) erhöhte Sekretion von metallbindenden Substanzen zur extrazellulären Präzipitation von Schwermetallkomplexen.

Zu den "Tolerance"-Mechanismen gehören z. B.:

- (I) Synthese von intrazellulär lokalisierten Substanzen, die als Bindungspartner für Schwermetalle zur Verfügung stehen (z. B. Metallothioneine, Phytochelatine oder organische Liganden),
- (II) Änderungen, die die subzelluläre Metallkompartimentierung betreffen,
- (III) Veränderungen im zellulären Metabolismus, z. B. durch Aktivierung alternativer Stoffwechselwege.

2.2 Klassifizierung von Pflanzen nach dem Grad der Schwermetallaneignung

Basierend auf unterschiedlichen Schwermetall-Akkumulations- bzw. Schwermetall-Vermeidungsstrategien haben Baker und Walker (1990) drei Typen unterschieden: die sogenannten Exkluder, Indikatoren und Akkumulatoren (vgl. auch Baker, 1981).

2.2.1 Exklusion von Schwermetallen

Unter Metallexklusion versteht man die Vermeidung bzw. die Restriktion der Metallaufnahme sowie des Metalltransports in das Cytoplasma. Aufgrund der bisherigen Untersuchungen kann man davon ausgehen, daß Metallexklusion in den meisten Fällen auf dem Mechanismus der Membranselektivität beruht. In diesem Zusammenhang sind entweder veränderte Ionentransportmechanismen oder Veränderungen der Membranzusammensetzung von Bedeutung (Cumming und Tomsett, 1992). Die Ursachen für eine Metallresistenz durch verminderte Metallionenaufnahme bzw. erhöhten Metallionenefflux ist bei Prokaryonten umfassend untersucht worden (Silver und Misra, 1988). Bei *Alcaligenes eutrophus* z. B. wird die effektive Metallexklusion durch eine plasmidcodierte (Plasmid - pMOL30), induzierbare "Effluxpumpe" für die Metallionen Cd^{2+} , Zn^{2+} und Co^{2+} erreicht (Nies und Silver, 1989). Die Kupfertoleranz in der einzelligen Alge, *Chlorella vulgaris* basiert ebenfalls auf einer Kupferexklusion. Hier führt die externe Bindung von Metallionen aufgrund der erhöhten Exudation metallchelatisierender Verbindungen zu einer Metallresistenz (Butler et al., 1980). Daß auch bei höheren Pflanzen veränderte Membrantransportsysteme als Ursache für die Entwicklung einer Metalltoleranz in Frage kommen können, zeigen Untersuchungen zur Kupfertoleranz in *Silene cucubalus*.

Hier ist die Kupfertoleranz ebenfalls mit einer reduzierten Cu^{2+} -Aufnahme in den Wurzeln verbunden (Lolkema und Voijs, 1986). Bei der „Kupferblume“ *Becium homblei* aus Zambia wurden sowohl im Wurzel- als auch im Sproßgewebe vergleichsweise niedrige Kupferkonzentrationen gefunden. Die nachgewiesene drastisch verminderte Metallaufnahmefähigkeit dieser Pflanze wird zumindest als eine der Ursachen für die beobachtete Kupfertoleranz betrachtet (Reilly, 1969). Man nimmt an, daß dies auch für die beobachtete Zinktoleranz in *Agrostis capillaris* (Mathys, 1973) und für die Kupfertoleranz in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke gilt (Lolkema et al., 1984; Lolkema et al., 1986).

Die Untersuchungen von Asher und Reay (1979) ergaben, daß die Aufnahme von Phosphat und Arsenat in Gerstenkeimlingen durch das gleiche Carriersystem erfolgt. Der jeweilige Phosphatstatus in der Pflanze nimmt entscheidenden Einfluß auf die Regulation des Transportsystems (Clarkson und Lüttge, 1991). Dieses besitzt normalerweise eine hohe Affinität für Phosphat, ist allerdings in arsenattoleranten *Holcus lanatus* - Pflanzen dahingehend verändert, daß eine deutlich geringere Affinität gegenüber Phosphat und Arsenat besteht. Das Metallaufnahmesystem ist supprimiert. Die Suppression beruht auf einer Anpassung (Adaptation) des Phosphataufnahmesystems an Phosphatstress. Da in der Vergangenheit veränderte V_{max} und K_m -Werte von Enzymen des supprimierten Phosphataufnahmesystems nachgewiesen werden konnten, war man der Ansicht, daß mutationsbedingte Konformationsänderungen von Transportproteinen und daraus resultierende verminderte Bindungsaffinitäten zu Metallionen die Ursache sein könnten (Jungk et al., 1990; Cogliatti und Clarkson, 1983; Macnair et al., 1992). Heute wird die Dominanz der Arsenattoleranz eher dahingehend interpretiert, daß es sich hierbei um Mutationen in regulatorisch wirksamen Genregionen des Phosphataufnahmesystems handelt (Macnair, 1993). Neuere Untersuchungen ergaben, daß in toleranten Pflanzen die Induktion des Phosphatcarriers bei niedrigen Ionenkonzentrationen offensichtlich ausbleibt. Immerhin ist im Falle eines supprimierten Phosphat-Transportsystems eine deutlich reduzierte Aufnahme von Arsenat in die Pflanzenwurzel zu beobachten (Meharg und Macnair, 1990; Meharg und Macnair, 1992), so daß sich durch mangelnde oder stark verminderte Induzierbarkeit des Transportsystems letztlich die beobachtete Arsenattoleranz ausbildet. Es wird angenommen, daß durch den geringeren Influx eine Detoxifikation von Arsenat innerhalb der Wurzelzellen ermöglicht wird.

Die Plasmamembranpermeabilität und -selektivität wird vor allem durch die Oberflächenladung, durch die am Membranaufbau beteiligten Fettsäuren sowie durch den Sterolgehalt bestimmt (Thibaud et al., 1984; Douglas und Sykes, 1985; Thompson, 1985). Veränderungen in der Struktur und Ionen-selektivität können durch die Interaktion zwischen Metallionen und Membranphospholipiden sowie durch die Verdrängung membrangebundenen Calciums durch Metallionen hervorgerufen werden (Green et al., 1980); immerhin stabilisiert die Gegenwart von Calcium als strukturelle Komponente der Membranphospholipide die selektive Membranpermeabilität (Körner et al., 1985). Unterschiede im Verhältnis „Sitosterol : Stigmasterol“ in *Glycine max.* - Suspensionen, die Cd^{2+} -Ionen ausgesetzt wurden,

wurden von Xu und Patterson (1985), Veränderungen im „Glycolipid : Phospholipid“-Verhältnis von Brown und Dupont (1989) beschrieben. Ob es sich hierbei um toxische Effekte handelt, die eine Konformationsänderung z. B. des Sterols, das die Phospholipidpackungsdichte sowie die Membranleitfähigkeit beeinflusst, zur Folge hat oder ob es sich wirklich um eine kontrollierte Antwort der Zelle auf Metallstress handelt, ist anhand der bisherigen Untersuchungen nicht definitiv zu entscheiden (Cumming und Tomsett, 1992).

Die Immobilisierung von Schwermetallen in der pflanzlichen Zellwand gilt nach den Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen als ein effektiver Exklusionsmechanismus, der für die Reduktion der Metallaufnahme bei ganz unterschiedlichen Pflanzenspezies verantwortlich zu sein scheint (Turner, 1970; Turner und Marshall, 1971; Turner und Marshall, 1972; Malone et al., 1974; Lane et al., 1978). Mit Hilfe mikroskopischer Techniken und unter Anwendung moderner Zellfraktionierungsmethoden wurde z. B. für Blei und Mangan bei Getreidepflanzen gezeigt, daß diese Metalle in der Zellwand angereichert werden (Lane et al., 1978; Malone et al., 1974). Zellwandfraktionen, die aus Wurzeln zinktoleranter Klone von *Agrostis tenuis* isoliert worden waren, hatten nachweislich eine größere Affinität für Zink als Fraktionen, die von zinksensitiven Klonen stammten (Turner, 1970; Turner und Marshall, 1971).

Metallexklusion bei höheren Pflanzen wird schließlich auch dadurch erreicht, daß durch die Exudation von Chelaten Metalle außerhalb des „Symplasmas“ gebunden und präzipitiert werden können (Taylor, 1987). Die reduzierte Aufnahme von Metallchelaten und die damit verbundene Abnahme der Metalltoxizität bei höheren Pflanzen aufgrund der verringerten Reaktivität mit unterschiedlichen Zellkomponenten wurde von mehreren Autoren nachgewiesen (Coombes et al., 1977; Taylor und Foy, 1985; Clarke et al., 1987). Es wird vermutet, daß die differentielle Metalltoleranz bei unterschiedlichen Genotypen höherer Pflanzen durch qualitative und quantitative Unterschiede in der Exudatproduktion beeinflusst wird. Hinzu kommt, daß durch die Chelatbildung die Speziation der Schwermetalle verändert wird und auch auf diese Weise die Aufnahme oder Exklusion des Metallkomplexes erhöht oder vermindert wird.

2.2.2 Akkumulation von Schwermetallen

2.2.2.1 Indikatoren

Bei diesen Pflanzen sind die Aufnahme der Schwermetalle und ihr Transport in den Sproß exakt reguliert und korreliert, d. h. die pflanzeninternen Konzentrationen reflektieren die externen Konzentrationen im Medium. Die Metalle werden aktiv angereichert und über den gesamten Bereich der vorgegebenen Bodenkonzentrationen im Pflanzengewebe konzentriert (bis zu einem gewissen Grad lineare Korrelation), was für eine hoch spezialisierte Physiologie spricht (Baker und Walker, 1990).

Indikatoren sind auf einen bestimmten Bodentyp oder den jeweils dazugehörigen Untergrund, aus dem der Boden entstanden ist, angepaßt. So ist z. B. die Kupferblume *Haumaniastrum katan-gense* ein klassischer geobotanischer Indikator für Kobalterze in Afrika (Brooks, 1977; Brooks et al., 1992).

2.2.2.2 Hyperakkumulatoren

Hyperakkumulation ist eine wichtige ökophysiologische Anpassung von Pflanzen an schwermetallreiche Substrate und damit eine Manifestation von Schwermetall-Resistenz (Baker und Brooks, 1989). Als Hyperakkumulatoren werden die Pflanzenarten bezeichnet, die mehr als 0,1 % (>1000 µg/g⁻¹ Trockengewicht) Nickel, Kobalt, Kupfer, Chrom und Blei oder auch 1 % Zink in ihren Blättern akkumulieren, unabhängig davon, welche Konzentrationen sich im Boden befinden (Brooks et al., 1977; Brooks et al., 1980; Baker und Walker, 1990).

Pflanzen, die Schwermetalle natürlicherweise hyperakkumulieren, gedeihen an extrem schwermetallhaltigen Standorten, und fast alle sind endemisch. Worauf die Spezifität der Metallaufnahme bei diesen Pflanzen beruht, ist bisher weder gut untersucht noch verstanden. Zur Erklärung ihrer Evolution und biologischen Bedeutung gibt es mehrere Hypothesen. So wurde vermutet, daß die Metallhyperakkumulation ein Abwehrmechanismus gegen Herbivoren und Pathogene darstellt (Ernst et al., 1990). Jüngste Untersuchungen scheinen einen von Pollard (1992) postulierten adaptiven Abwehrmechanismus für zinkhyperakkumulierende Pflanzen zu bestätigen (Pollard und Baker, 1997). Im Rahmen von Fütterungsversuchen mit 3 unterschiedlichen Herbivorenarten (*Schistocerca gregaria*, *Deroceras caruanae* und *Pieris brassicae*) stellte sich heraus, daß Pflanzen, die in zinkarmen Kulturlösungen angezogen worden waren, bevorzugt für die Nahrung ausgewählt wurden.

In einem umfassenden Review berichteten Baker und Brooks schon 1989 von 145 Nickel-Hyperakkumulatoren, die 22 verschiedenen Pflanzenfamilien zugeordnet werden konnten. Unter den Pflanzenarten sind sowohl Kräuter als auch Sträucher und Bäume zu finden, die sich sowohl in gemäßigten als auch in tropischen Zonen ansiedeln konnten (Baker und Brooks 1989). Nickel-Hyperakkumulatoren sind z. B. auf den Philippinen (Baker et al., 1993) und in bestimmten Gebieten Brasiliens verbreitet (Brooks et al., 1993). Während der Nickelgehalt von Pflanzen auf normalen Böden zwischen 0,1 - 1 µg/g Trockengewicht liegt (Pollard, 1983), zeigen auf Serpentin-Böden wachsende Pflanzen Werte, die den Normalbereich um mehr als das 100 - 1000fache überschreiten. So weist z. B. *Sebertia acuminata* aus Neu Caledonien mehr als 11 % Nickel (bezogen auf das Trockengewicht) in ihrem blaugrünen Milchsaft auf (Jaffré et al., 1976). Eine große Anzahl von Nickel-Hyperakkumulatoren gehört zu den Ordnungen *Alyssum* und *Thlaspi*. Manche dieser *Thlaspi*-Arten akkumulieren Blei (bis zu 1 % des Trockengewichts) und Zink (bis zu 3 % des Trockengewichts) (Baker und Brooks, 1989). Blei- und Zink-Akkumulatoren sind im Vergleich zu Nickel-Hyperakkumulatoren rar. Sie gehören überwiegend zur Familie der Brassicaceen und sind besonders in Zentral- und Südeuropa zu finden. Kupfer- und Kobalt-Hyperakkumulation scheint auf die Flora in bestimmten Gebieten Zaires („Zambian Copperbelt“ und „Shaban Copper Arc“) begrenzt zu sein. Man identifizierte 24 Hyperakkumulatoren für Kupfer und 26 für Kobalt, 9 von ihnen zeigen Spezifität für beide Schwermetalle (Baker und Walker, 1990).

Daß auch Kulturpflanzenarten wie Raps, Mais oder Riesenknötterich Schwermetalle anreichern können, soll nicht unerwähnt

bleiben (vgl. Helal und Padeken, 1995; Haase, 1988). Tabelle 1 und Abbildung 1 zeigen die Metallspezifität und das Anreicherungsvermögen von natürlich vorkommenden Hyperakkumulatoren (20 ausgewählte Arten) für Nickel, Blei, Kupfer, Kobalt, Zink, Chrom und Mangan.

3 Biochemie und Molekularbiologie der Aufnahme und Speicherung von Schwermetallen

3.1 Solubilisierung und Aufnahme von Schwermetallen im Wurzelbereich

Eine Zone erhöhter biologischer Aktivität ist der Wurzelraum von Pflanzen. Gegenüber dem wurzelfreien Boden bewirken Interaktionen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen eine Steigerung der Vielfalt und des metabolischen Potentials der Mikroorganismen. Diesen „Biofilm“ bezeichnet man im allgemeinen als Rhizosphäre (Curl und Truelove, 1986). Durch die Anwesenheit von Mikroorganismen wird die Oberfläche der Wurzeln und dadurch die Aufnahmekapazität für Nährstoffe und sonstige Ionen drastisch vergrößert. Die Konzentration von Schwermetallen in der Bodenlösung bestimmt hauptsächlich das Ausmaß der Ionenaufnahme an der Wurzeloberfläche. Am Beispiel des Eisens soll die Metallaufnahme in die Pflanzenwurzel näher beschrieben werden.

Es werden zwei unterschiedliche Strategien im Hinblick auf die Eisenaufnahme bei höheren Pflanzen unterschieden (Römheld und Marschner, 1986). Danach liegt die chemotaxonomische Grenze für beide Strategien nicht zwischen einkeimblättrigen und zweikeimblättrigen Pflanzen, wie früher postuliert wurde, sondern zwischen den meisten höheren Pflanzen - alle untersuchten Dicotyledonen und nichtgrasartigen Monocotyledonen - (Strategie I) und Gräsern (Strategie II). Der qualitative Unterschied besteht im eisenmangelinduzierten Adaptationsmechanismus (Römheld, 1987). Pflanzenarten, bei denen Strategie I verfolgt wird, zeigen 3 adaptive Komponenten: (1) eine eisenmangelinduzierte Verstärkung der Eisen(III)-Reduktion zu Eisen(II) an der Wurzeloberfläche mit bevorzugter Aufnahme von Eisen(II) (Chaney et al., 1972), (2) H⁺-Extrusion (Römheld et al., 1984), die die Reduktion von Eisen(III) zu Eisen(II) vorantreibt, (3) in bestimmten Fällen die Freisetzung von reduzierenden und/oder chelatisierenden Substanzen durch die Wurzeln (Hether et al., 1984). Das typische Merkmal der Strategie I ist also die verstärkte Eisen(III)-Reduktion unter Eisenmangelstress. Dagegen sind die Systeme, die der Strategie II zugeordnet werden, durch eisenmangelinduzierte Freisetzung spezifischer Eisen(III)-chelatisierender Verbindungen (Takagi et al., 1984) und ein Hochaffinitätsaufnahmesystem für Eisen(III)-Phytosiderophoren gekennzeichnet (Römheld und Marschner, 1986).

Bei der Aufnahme von Eisen scheiden Gräser sogenannte Eisenkomplexierer (Mugeinsäuren - „MAS“) aus, die schwerlösliche Eisen(III)-Verbindungen wie Fe(OH)₃ in der Rhizosphäre solubilisieren und auf diese Weise entstandene Eisen(III)-Mugeinsäure-Komplexe reabsorbieren können (Takagi, 1976). Unter Eisenmangelbedingungen erhöht sich die ausgeschiedene Menge an Mugeinsäuren und die Wurzelabsorptionsrate neu gebildeter Eisen(III)-MAS nimmt ebenfalls zu (Mihashi und Mori,

1989). Zur gleichen Zeit werden cysteinreiche Proteine in den Wurzeln angereichert (Irfune et al., 1991).

Nach Nakanishi et al. (1993) stellt man sich den hypothetischen Stoffwechselweg wie folgt vor: Eisenmangelbedingungen sind die Ursache für die induzierte Aktivität der Nicotianamin-(NA)-Synthetase, die die Umsetzung von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) zu Nicotianamin katalysiert. Danach wandelt vermutlich eine Nicotianamin-Desaminase Nicotianamin zur 3'-Ketoform um. Sodann katalysiert eine 2'-Desoxymugeinsäure-(DMA)-Synthetase die Umwandlung von der 3'-Ketoform zur 2'-Desoxymugeinsäure (Mori und Nishizawa, 1987).

Auch bei zweikeimblättrigen Pflanzen, die unter limitierenden Eisenkonzentrationen angezogen wurden, konnte beobachtet werden, daß Eisenionen aus dem Boden in erhöhtem Maß mobilisiert und absorbiert werden (Römheld und Marschner, 1986). Eine Charakterisierung des Mechanismus war mit Hilfe von selektierten Mutanten möglich. Es liegen inzwischen Untersuchungen bei zweikeimblättrigen Pflanzen vor, die einen Defekt bei der Regulation des Eisentransports zeigen. Zum Beispiel kann bei der Tomatenmutante (*Lycopersicon esculentum* Mill., cv T3820fer, Genotyp "fer") nicht die Synthese der Eisen(III)-Chelatreduktase, die in der Wurzelzellplasmamembran lokalisiert ist, induziert werden. Normalerweise reguliert eine Eisenchelatreduktase die Eisen(III)-Reduktion in der Wildtyp-Pflanze (*Lycopersicon esculentum*, cv Floradel, Genotyp "FER") (Brown et al., 1971). Man stellte fest, daß die rezessive Mutation das sogenannte FER-Gen (Wann und Hills, 1973) betrifft, das offensichtlich für einen essentiellen Transkriptionsfaktor codiert, der in die Regulation der Eisenmangelreaktionen involviert ist. Im Gegensatz zum "fur"-Protein (Fe uptake regulator) von *E. coli* (Hantke, 1981) ist das FER-Protein ein Aktivator. Die rezessive Mutation macht sich phänotypisch in der Weise bemerkbar, daß eine Antwort der Pflanze auf Eisenmangel unterbleibt. Zur weiteren Charakterisierung der funktionellen Bedeutung des FER-Proteins wurden Membranen aus Wurzeln von Wildtyp (FER) und mutierten (fer) Tomatenpflanzen, die unter Zugabe von hohen und niedrigen Eisenkonzentrationen angezogen worden waren, isoliert. Es zeigte sich, daß offensichtlich zwei Proteine unter der Kontrolle des FER-Gens synthetisiert werden. Unter Eisenmangelbedingungen bilden die Wildtyp-Pflanzen rhizodermale Transferzellen aus, in deren Plasmamembranen Protonentransport nach außen sowie Eisenreduktion stattfinden (Landsberg, 1986).

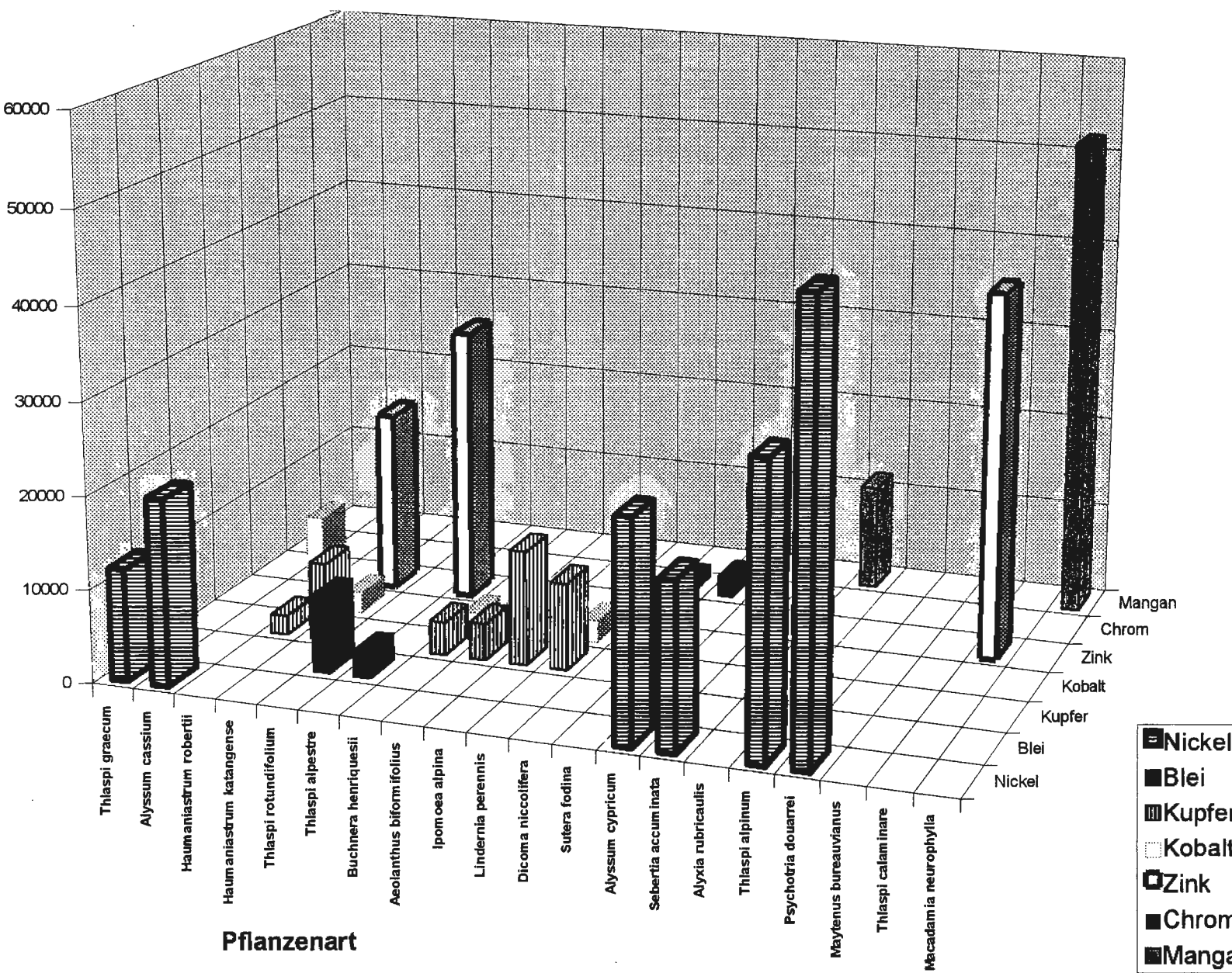
Nach einem Modell von Bienfait (1988) codiert das FER-Gen für ein regulatorisches Protein, das an Sequenzelemente der DNA binden kann und dadurch die Transkription induziert. Nach seiner Bindung an DNA-Sequenzen erfolgt die verstärkte Synthese von Transferzellen und Wurzelhaaren. Außerdem konnte die Aktivierung einer Protonenpumpe sowie eine erhöhte Eisenreduktase-Aktivität beobachtet werden.

Bei einer anderen Tomatenmutante (*Lycopersicon esculentum*, cv Bonner Beste, Genotyp „chloronerva“) sind ebenfalls Einschränkungen beim Eisentransport nachgewiesen worden (Scholz, 1983). Die Chloronerva-Mutante zeigt reduziertes Wachstum und Blattchlorose sowie die typischen Anzeichen eines Eisenmangelstresses, z. B. verstärkten Protonentransport nach außen, verdickte Wurzelspitzen mit Wurzelhaarbildung sowie eine

Tabelle 1: Metallaufnahme-spezifität und Anreicherungsvermögen von natürlich vorkommenden Hypeakkumulatoren

Pflanzenart	Nickel	Blei	Kupfer	Kobalt	Zink	Chrom	Mangan
(Trockengewicht)	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$
<i>Thlaspi graecum</i>	12000 (17)						
<i>Alyssum cassium</i>	20000 (7)						
<i>Haumaniastrum robertii</i>			2070 (10)	10200 (10)			
<i>Haumaniastrum katangense</i>			8356 (9,10)	2240 (9,10)	19800 (15)		
<i>Thlaspi rotundifolium</i>		8200 (8)					
<i>Thlaspi alpestre</i>		2740 (10)			30000 (16)		
<i>Buchnera henriquesii</i>			3520 (9,10)	2435 (9,10)			
<i>Aeolanthus biformifolius</i>			3920 (13)	2820 (13)			
<i>Ipomoea alpina</i>			12300 (12)				
<i>Lindernia perennis</i>			9322 (10,11)	2300 (10,11)			
<i>Dicoma niccolifera</i>						1500 (14)	
<i>Sutera fodina</i>						2400 (14)	
<i>Alyssum cypricum</i>	23600 (7)						
<i>Sebertia accuminata</i>	17750 (6,3)						
<i>Alyxia rubricaulis</i>							11500 (4,5)
<i>Thlaspi alpinum</i>	31000 (2)						
<i>Psychotria douarrei</i>	47500 (3)						
<i>Maytenus bureauvianus</i>							33800 (3,4)
<i>Thlaspi calaminare</i>					39600 (2)		
<i>Macadamia neurophylla</i>							51800 (1)

(1) Jaffré (1979); (2) Reeves und Brooks (1983a); (3) Jaffré (1980); (4) Jaffré (1977); (5) Brooks et al. (1981c); (6) Jaffré et al. (1976); (7) Brooks et al. (1979); (8) Reeves und Brooks (1983b); (9) Brooks et al. (1980); (10) Brooks et al. (1987); (11) Malaisse und Grégoire (1978); (12) Malaisse et al. (1979); (13) Brooks et al. (1978); (14) Wild (1974); (15) Baker und Brooks (1989); (16) Hajar (1987); (17) Reeves et al. (1983c)



erhöhte Aktivität der Eisen(III)-Reduktase in der Wurzelzellplasmamembran (Stephan und Grün, 1989). Die "Chloronerva"-Mutante ist nicht in der Lage, Nicotianamin zu synthetisieren. Nicotianamin ist eine Aminosäure (Siderophore), die an der Bildung stabiler Eisen(II)-Komplexe bei physiologischen pH-Werten beteiligt ist. Nicotianamin gilt seit den Untersuchungen von Scholz (1989) als intrazelluläres Transportmolekül von Eisen(II)-Verbindungen. Von Bedeutung ist, daß die Mutante „Chloronerva“ außerdem andere divalente Kationen wie Mn^{2+} und Zn^{2+} in ungewöhnlich hohen Konzentrationen in den Wurzeln akkumuliert (Stephan und Grün, 1989). Die von Kneen et al. (1990) isolierte Erbsen-Mutante E107 zeigt ebenfalls abnorme Eisentransporteigenschaften. Aufgrund der mangelnden Fähigkeit, die Eisenaufnahme zu regulieren, werden bei diesen Pflanzen toxische Eisenkonzentrationen in älteren Blättern hyperakkumuliert (Welch und LaRue, 1990).

Zur molekularbiologischen Charakterisierung von DNA-Bereichen und Proteinen, die bei der Eisenaufnahme regulierend wirken könnten, erstellte man ausgehend von induzierter mRNA aus Gerstenwurzeln, die von Pflanzen, angezogen unter Eisenmangelbedingungen, stammten, eine cDNA-Genbank und fand einen Klon (ids 1 = iron deficiency-specific clone 1) mit einer Länge von 503 Basen (Okumura et al., 1991). Die 5'-untranslatierte Region umfaßt 31 bp, es folgt ein offenes Leseraster von 222 bp mit einer 3'-nichtcodierenden Region von 250 bp. Das aus der Basensequenz abgeleitete offene Leseraster enthält 74 Aminosäuren, woraus sich ein Protein mit einem Molekulargewicht von ~7500 Dalton ableiten läßt. Dieses enthält zwei cysteinreiche Regionen. Ein Vergleich mit der NRBF Protein-Datenbank (DNASIS Software) zeigte, daß es sich um Domänen handelt, die eine große Ähnlichkeit mit denen animaler bzw. Pilz-Metalllothioneinsequenzen haben.

Jede Domäne umfaßt 6 Cysteine, die in Cys-X-Cys-Clustern aufgebaut ist, also eine Struktur, die für die metallbindende Eigenschaft von Metallothioneinen inzwischen gefordert wird (Berg, 1989). Wie weiter unten ausgeführt werden wird, sind in der Pflanzenwelt solche Domänen auch in den offenen Leserastern von cDNA-Klonen aus *Pisum sativum* (Evans et al., 1990), *Mimulus guttatus* (de Miranda et al., 1990) und im Weizenkeim E_c-Protein von *Triticum aestivum* (Hofmann et al., 1984; Lane et al., 1987; Kawashima et al., 1992), was bisher als das einzige Metallothionein in höheren Pflanzen bezeichnet wird, gefunden worden. Allerdings muß auch erwähnt werden, daß sich die Aminosäuresequenzen dieser aus Pflanzen isolierten Proteine zwischen den homologen cysteinreichen Domänen deutlich von den für Metallothioneine charakteristischen Zwischensequenzen unterscheiden, so daß verschiedene regulatorische Funktionen nicht ausgeschlossen werden können. So wird vermutet, daß das Genprodukt von Klon „ids1“ möglicherweise mit regulatorischen Regionen von Eisen(III)-MA-Transportergenen interagiert (Mori und Nishizawa, 1987; Shojima et al., 1990).

Andere Metalle können nach Eintritt in die Wurzel entweder sofort gespeichert oder in den Sproß transportiert werden. In der Sojabohne werden z. B. 98 % des aufgenommenen Cadmiums durch die Wurzeln zurückgehalten und nur etwa 2 % in den Sproß transportiert (Cataldo et al., 1983). Auch bei der Bohne (*Phaseolus vulgaris* L.) wurde eine Cd-Anreicherung vor allem in

der Wurzel und weniger im Sproß festgestellt (Patel et al., 1980). In Mais (*Zea mays* L.) dagegen können durchaus hohe Cd-Konzentrationen in den Sproß transportiert werden, wobei die Cd-Verteilung zwischen Wurzel und Sproß unabhängig vom Wachstumsstadium der Pflanzen ist (Florijn und van Beusichem, 1993a und 1993b). Der Transport von Metallionen zum Sproß verläuft den bisherigen Erkenntnissen nach im Xylem, eine Verteilung findet offensichtlich dann über das Phloem statt (Stephan und Scholz, 1993). Nach den Untersuchungen von Guo und Marschner (1996) ist die geringe Translokation des Cadmiums von der Wurzel in den Sproß bei der Bohne ein Resultat mehrerer Faktoren. Zu diesen gehören zum einen die vergleichsweise geringe Produktion von Phytochelatinen in der Wurzel, zum anderen die Bindung von Cadmium in Form von Hochmolekulargewichtskomponenten sowie die Retention des Schwermetalls in den Cortexzellen, im Xylem sowie im umgebenden Gewebe während des langen Transports von der Wurzel zum Sproß (Guo und Marschner, 1996). Es konnte gezeigt werden, daß der extrazelluläre Transport aufgrund der hohen Kationenaustauschkapazität der Zellwände limitiert ist, wenn das Metallion nicht als Metallchelatkomplex transportiert wird. Es wird außerdem angenommen, daß die Weiterleitung von Metallen in Form von Metall-Chelat-Komplexen wie z. B. Cd-Citrat im Transpirationsstrom erfolgt (Senden et al., 1992). Daß organische Säuren am Metalltransport im Xylemsaft von Hyperakkumulatoren beteiligt sind, konnte schon früher gezeigt werden (Baker und Brooks, 1989). Der Nachweis, daß (γEC)-Isopeptide an der Metallbindung im Xylemsaft beteiligt sind, gelang Przemek und Haase (1991). Die Beteiligung von Nicotianamin am Phloemtransport von Eisen wurde ebenfalls nachgewiesen. Da auch Zink, Cobalt, Nickel und Kupfer mit dieser Aminosäure eine Verbindung eingehen können, dient Nicotianamin möglicherweise als genereller Schwermetalltransporter im Phloem (Stephan und Scholz, 1993). Nach neueren Untersuchungen scheint für den Transport von Nickel im Phloem auch die Aminosäure Histidin von Bedeutung zu sein (Martens und Boyd, 1994).

3.2 Membrantransportmechanismen

Man unterscheidet eine Anzahl von Transportproteinen in pflanzlichen Membranen auf der Basis ihrer Mechanismen. Zu den bisher charakterisierten Transportproteinen, deren Gene isoliert wurden, gehören Typen wie ATPasen (Harper et al., 1989), "ATP-binding cassette type"-Transporter (Ortiz et al., 1992 und 1995) oder auch "P-type" ATPasen (Kanamaru et al., 1994; Harms et al., 1994) sowie andere am Ionentransport beteiligte Carrierproteine (Riesmeier et al., 1992). Sie sind natürlicherweise mit Membranen assoziiert und man nimmt an, daß z. B. eine veränderte Lipidzusammensetzung der Membran bei der Regulation der ATPase-Aktivität eine Rolle spielt (Carruthers und Melchior, 1986). So zeigen schwermetallbelastete Pflanzen eine vergleichsweise geringere Anreicherung des Ethylsterol-Precursors Δ-5-Avenasterol. Auch sind die prozentualen Anteile von verschiedenen Sterolen wie Campesterol und Sitosterol nach Schwermetallbelastung verändert, so daß hierdurch offensichtlich eine Modulation plasmamembrangebundener Enzymaktivitäten

die Folge ist (Ros et al., 1992). Daß die Aktivität von ATPasen, die mit Membranen assoziiert sind, durch die Struktur von Membranlipiden sogar reguliert werden kann, zeigen die Untersuchungen von Matsumoto et al. (1992) und Obata et al. (1996). Da die Protonenausschleusung durch Vanadat- und Cadmium-Verbindungen gehemmt wird, wird angenommen, daß Cadmium mit Komponenten der Plasmamembran eine Bindung eingeht und aufgrund dieser strukturellen Veränderung der Membran auch die Konformation und Transporteigenschaften der Protonen-ATPase beeinflusst werden (Obata et al., 1996).

Was den Transport von Schwermetallionen betrifft, ist bei höheren Pflanzen auf molekularer Ebene nur wenig bekannt. Von Kampfenkel et al. (1995) wurde eine *Arabidopsis thaliana*-cDNA durch Komplementation einer Mutante (ctr1-3) von *Saccharomyces cerevisiae*, die einen Defekt bezüglich ihrer Kupferaufnahme hatte, isoliert. Hefemutanten, die die isolierte cDNA aus *Arabidopsis* exprimierten, hatten nahezu Wildtypeigenschaften, d. h. sie waren unter anderem auch kupferresistent. Das isolierte Gen (COPT1) codiert für ein außerordentlich hydrophobes Protein mit 169 Aminosäuren. Die ersten 44 Reste zeigen eine signifikante Sequenzhomologie mit methionin- und histidinreichen Kupferbindungsdomänen von bakteriellen Proteinen, von denen eines eine kupfertransportierende ATPase ist (Kampfenkel et al., 1995). Die Aminosäuresequenz läßt auf drei potentielle transmembranale Helices schließen, so daß es sich hierbei höchst wahrscheinlich um ein integrales Cytoplasmamembranprotein handelt.

"ABC-Typ"-Proteine repräsentieren eine der größten Membrantransporter-Familien (Higgins, 1992). Ein sogenanntes ABC („ATP-binding cassette“)-Typ Protein, das Vakuolenmembranprotein HMT1, dessen Gen aus *Saccharomyces pombe* isoliert wurde, verdient in diesem Zusammenhang besondere Erwähnung, da im Rahmen von In-vitro-Versuchen gezeigt werden konnte, daß es sich um ein Protein für den Transport von Phytochelatin-Metallkomplexen handelt (Ortiz et al., 1995). HMT1 repräsentiert danach ein ABC-Typ-Transporterprotein, das zu einer Toleranzinduktion nach Schwermetallaufnahme beiträgt. Ortiz et al. (1992) isolierten eine Hefe-Mutante, deren Defekt für die Akkumulation sulfidhaltender Phytochelatin-Cd²⁺-Komplexe durch HMT1 komplementiert werden konnte. Am Beispiel des HMT1 wird deutlich, daß Transport und Bindung dieser Komplexe in bestimmten Kompartimenten offensichtlich durch ein einziges Transportprotein bewirkt werden können. Das offene Leseraster der isolierten cDNA läßt auf ein Protein schließen, das mit 830 Aminosäuren ein Molekulargewicht von 90500 Dalton aufweist. Es gibt zwei Hauptdomänen. Hinter der typischen eukaryontischen Signalsequenz am aminoterminalen Ende bilden die folgenden 500 Aminosäuren hydrophobe Regionen, die mehrere transmembranale Segmente (6 - 10 Helices) beinhalten. Durch Immunblot-Analysen von subzellulären Fraktionen war es möglich, nachzuweisen, daß das Protein mit der Membran der Vakuole assoziiert ist. Vakuolenvesikel, die HMT1 enthalten, können sowohl Apo-Phytochelatine als auch Phytochelatin-Cd²⁺-Komplexe transportieren. Vanadat wirkt aktivitätsinhibierend. Es wird jedoch nicht durch Inhibitoren beeinträchtigt, die die Aktivität der Vakuolen-Protonen-ATPase reduzieren.

Da die Akkumulation von metallgebundenen Phytochelatinen in den Vakuolen Cd²⁺-behandelter Pflanzenkeimlinge (Vogeli-Lange und Wagner, 1990) ebenfalls mit der Anwesenheit eines HMT1-ähnlichen Transportproteins erklärt werden kann (Salt und Rauser, 1995), soll hier folgendes Modell, welches für das Hefesystem vorgeschlagen wird, Erwähnung finden. Danach aktivieren zunächst Cd²⁺-Ionen, die in die Zelle aufgenommen werden, die Phytochelatinsynthese, die die Synthese von Phytochelatinen bewirkt. Diese Peptide chelatisieren cytoplasmatisches Cd²⁺, um kleinmolekulare PC-Cd²⁺-Komplexe (cytoplasmatische Carrier) zu bilden, die dann von HMT1 durch die Vakuolenmembran transportiert werden, wobei ATP zu ADP dephosphoryliert wird. Durch die Anlagerung von Sulfid an die Komplexe in der Vakuole wird eine hochmolekulare Verbindung gebildet, die zugleich die Lagerungsform des Metalls darstellt. Untersuchungen zur Charakterisierung eines Cd²⁺/H⁺-Transportsystems in Pflanzen sind bereits publiziert worden (Salt und Wagner, 1993). Die Klonierung eines pflanzlichen ABC-Typ-Transporters, der mit dem HMT1-Protein aus *Saccharomyces pombe* funktionell vergleichbar ist, steht noch aus (Ow, 1996).

Daß dieses Modell auch auf höhere Pflanzen übertragbar ist, wird ganz wesentlich dadurch gestützt, daß offensichtlich Cd-PC-Komplexe aktiv durch die Tonoplastenmembran von Haferwurzeln transportiert werden (Salt und Rauser, 1995). Die Autoren beschreiben einen Mg-ATP-abhängigen vanadatsensitiven Transport radioaktiv markierter PC₃- und PC₂-Moleküle in isolierte Tonoplastenvesikel. Die Energie wird durch die Hydrolyse von ATP bereitgestellt. Dadurch erhöht sich die PC₂-Konzentration im Vesikel gegenüber der in der Lösung um das 38fache. Diese Ergebnisse lassen die obige Schlußfolgerung zu, daß die Transportsysteme für Metall-PC-Komplexe im Hefe- und Pflanzensystem zumindest sehr ähnlich sein müssen.

3.3 Zellinterne Schwermetallkomplexierung und Schwermetallspeicherung

Die Bereitstellung von Metallothioneinen, Phytochelatinen und organischen Säuren gibt einer schwermetallbelasteten Zelle letztlich die Möglichkeit zur Komplexierung toxischer Metallionen in verschiedenen Zellkompartimenten.

3.3.1 Metallothioneine

Vor 40 Jahren entdeckten Margoshes und Vallee im Cortex der Pferdeniere ein cadmiumbindendes Protein, dem der Name "Metallothionein" (Mt) gegeben wurde und das für die natürliche Akkumulation von Cadmium in diesem Gewebe verantwortlich ist (Margoshes und Vallee, 1957). Nach weiteren Untersuchungen mußten auch Zink und Kupfer einbezogen werden (Kägi und Vallee, 1961; Pulido et al., 1966). Es zeigte sich, daß animale Metallothioneingene durch ein weites Spektrum endogener Faktoren wie Hormone, sekundäre Messenger, Wachstumsfaktoren, Cytokine sowie Schwermetalle induzierbar sind (Riordan und Vallee, 1991). Der extrem hohe Metall- und Schwefelgehalt dieses Proteins trug wesentlich zur Namensgebung bei. Es handelt sich um gencodierte Proteine mit Molekulargewichten zwischen 6000 und 7000 Dalton. Sie zeich-

nen sich durch hohe Cysteingehalte aus (23-33 Mol %), dagegen sind aromatische und hydrophobe Aminosäuren rar. Die in der reduzierten Form vorkommenden Cysteinreste sind mit dem Metallion durch Mercaptidbindungen koordiniert. Es resultieren charakteristische Metall-Thiolat-Komplexe und sogenannte Metall-Thiolat-Cluster, die typischerweise 4 - 12 Atome/Mol binden (Hamer, 1986). Animale Metallothioneine wurden in zwei Klassen (I und II) eingeteilt (Fowler et al., 1987; Kägi und Kojima, 1987; Robinson, 1990). Metallothioneine der Klasse I wie zum Beispiel das *Neurospora crassa*-Mt (Lerch, 1980) zeigen hohe Sequenzhomologie zum Metallothionein aus der Pferdeniere, insbesondere was die Position der Cysteine betrifft. Bei den Klasse II-Mts ist die Cysteinanordnung deutlich abweichend, aber immer noch ähnlich der von Klasse I-Mts. Klasse II-Mts wurden in Cyanobakterien, Hefe und dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Kägi, 1991) gefunden. Pflanzliche Metallothionein-ähnliche Gensequenzen zeigen zwar Ähnlichkeiten im Hinblick auf die Cysteinanordnung mit Klasse I- und Klasse II-Mts, sind aber unabhängig davon zwei verschiedenen Typen zugeordnet worden, da zwei sogenannte Isoformen des *Pisum*-Typ-Metallothioneins in *Arabidopsis* identifiziert werden konnten. Diese unterscheiden sich in der Struktur der aminoterminalen Mt-Domänen deutlich voneinander (Murphy und Taiz, 1995). Typ 1-Isoform enthält ausschließlich Cys-X-Cys-Motive, während Typ 2 sowohl Cys-Cys als auch Cys-X-X-Cys-Anordnungen in der aminoterminalen Domäne enthält (Abbildung 2). Es gibt Hinweise, daß die beiden Isoformen (Bezeichnung: MT-Typ1 und MT-Typ2 nach Zhou und Goldsbrough, 1994) von Multigen-Familien codiert werden (persönliche Mitteilung von R.B. Goldsbrough, zitiert in Murphy und Taiz (1995)).

Das Weizen-E_c-Protein gilt bis heute als das einzige echte pflanzliche Metallothionein (Hofmann et al., 1984; Lane et al., 1987; Kawashima et al., 1992). Hanley-Bowdoin und Lane konnten bereits 1983 zeigen, daß nach In-vitro-Translation isolierter mRNA aus Weizenembryonen bei Zugabe von ³⁵S-Cystein eine 20 - 25 %ige Einbaurate dieser Aminosäure in ein Protein gefunden werden konnte, das an der Bindung von Schwermetallen beteiligt zu sein schien (Hanley-Bowdoin und Lane, 1983). Inzwischen liegen Ergebnisse zur Charakterisierung des Genprodukts vor. Bereits 1987 wurde nachgewiesen, daß das E_c-Protein, isoliert aus vollentwickelten Weizenembryonen, 5 Moleküle Zink enthält (Lane et al., 1987). Das Weizen E_c-Gen wird offensichtlich ähnlich wie die animalen Zn²⁺-Metallothioneingene während der Embryogenese exprimiert (Kawashima et al., 1992). Die Autoren vermuten, daß die Funktion des E_c-Proteins darin besteht, die Verfügbarkeit von Zink während der Entwicklung des Weizenembryos zu modulieren. Im Rahmen verschiedener Publikationen zur Charakterisierung genomischer Weizen-E_c-Gene wurde festgestellt, daß ungleich animalen MT-Genen, die Teil einer Multigenfamilie sind (Karin und Richards, 1982), pflanzliche MT-Gene offensichtlich als Einzelkopien auf den langen Armen der Chromosomen 1A, 1B und 1D in hexaploidem Weizen vorliegen (persönliche Mitteilung von Gale, zitiert in Kawashima et al., 1992).

Ebenfalls anders als bei animalen Metallothioneingenen, die das MRE ("metal responsive element") TGCRNCX (N ist nicht A, X ist G oder C) (Palmiter, 1987) enthalten, zeigt das E_c-Genfragment keines dieser Motive. Es befindet sich ein Element in der 5'-flankierenden Region, das den „Abscisinsäure-Response-Elementen“ ähnlich ist, allerdings keiner metallregulatorischen Region eindeutig zugeordnet werden kann. Northern Blot-Analysen zeigen, daß E_c-Transkripte in unreifen Embryos akkumulieren. Bei Zugabe von Abscisinsäure zum Keimungsmedium kann eine Induktion erreicht werden, was durch die Zugabe von Zink nicht möglich ist. Diese Reaktion ist verständlich, da die Sequenz -608CACGTGGA-601 in der 5'-flankierenden Region des E_c-Gens vorkommt. CACGTGGC ist ein bekanntes „ABA-responsive element“ in Weizen- (Guiltinan et al., 1990) und Reis-Genen (Mundy et al., 1990). Daraus folgerte Kawashima, daß Weizen E_c-Gene wie animale Leber-Metallothioneingene offensichtlich nur während der Embryogenese in Antwort auf endogene Signale exprimiert werden (Kawashima et al., 1992). Das Fehlen einer Antwort auf exogene Metalle ließ die Autoren schließen, daß das E_c-Gen eher nicht an der Antwort auf Metalltoxizität und bei einer Toleranzinduktion beteiligt zu sein scheint. Das E_c-Gen zeigt kaum Homologie mit dem Pferde-MT-Gen, das der Klasse I zugeordnet wurde, aber wie im Pferde-MT-Gen gibt es vergleichbare Sequenzmotive in der mittleren Region, die möglicherweise für eine Metallbindung von Bedeutung ist (Robinson et al., 1993).

Inzwischen sind genomische Klone und weitere cDNAs von Metallothionein-ähnlichen Genen in vegetativen Geweben der folgenden Pflanzen gefunden wurden: *Mimulus guttatus* (de Miranda et al., 1990), *Pisum sativum* (Evans et al., 1990), *Glycine max.* (Kawashima et al., 1991) *Arabidopsis thaliana* (Takahashi et al., 1991) sowie *Hordeum vulgare* (Okumura et al., 1991; de Framond, 1991).

Die PsMT-Genfamilie von *Pisum sativum* umfaßt inzwischen mehrere charakterisierte Gene. Nach Isolierung der PsMT_A-cDNA konnte auch die Sequenz des genomischen Klons des PsMT_A-Gens aus der Erbse publiziert werden (Evans et al., 1990). Bis auf die Anwesenheit eines Introns von 634 Basenpaaren ist er mit der früher isolierten cDNA-Sequenz identisch. Zwei weitere PsMT-Gene, nämlich PsMT_B und PsMT_C konnten später durch PCR-vermittelte Klonierung identifiziert werden (Robinson et al., 1992). Die PsMT-Transkripte reichern sich besonders im Cortexgewebe der Wurzeln an, auch wenn die Pflanzen nicht übermäßig hohen Metallkonzentrationen ausgesetzt werden, so daß man annehmen kann, daß die Gene offensichtlich konstitutiv exprimiert werden. Die Menge angereicherter mRNA erhöht sich mit dem Alter der keimenden Sämlinge. Die Gene aus „*Pisum*“ und „*Mimulus*“ zeigen hohe Basensequenzhomologie. Ein Vergleich der 5'-flankierenden Sequenzen dieser Metallothionein-ähnlichen Gene mit den MREs aus animalen MT-Genen weisen in dieser Region ebenfalls eine Sequenzähnlichkeit (5'-TGCRNCX-3') auf, wobei R für G oder A, X für G oder C, N für alles außer A stehen kann (Palmiter, 1987). In der 6. Position, wo G, C oder T normale Regulation gewährleistet, bewirkt A einen Anstieg der Expression in Abwesenheit von Metallen. Die Sequenz 5'-TGCACACC-3' wird von nicht perfekten „inverted repeats“ flankiert und ist zwischen Posi-

tion -241 und -248 stromaufwärts der Translationsstartstelle lokalisiert. Die Funktionalität des Elements in dem Erbsen-Gen ist noch zu klären. Eine PsMT_A-Sequenz 5'-ATTAAGCATGCAACAATT-3' mit Homologie (unterstrichene Basen) zu einer Teilsequenz der 5'-flankierenden Region des *Neurospora crassa*-MT-Gens tritt zwischen Position -272 und -290 in PsMT_A auf. Im Gegensatz dazu gibt es keine Sequenz in der 5'-flankierenden Region des PsMT_A, die zu Kontrollsequenzen des CUP1-Gens (Klasse II-MT-Gen von *Sacharomyces cerevisiae*) signifikant homolog ist (Hammer, 1986).

Metallothioneingene unterschiedlicher Herkunft wurden zur Charakterisierung ihrer metallbindenden Eigenschaften in *Escherichia coli* exprimiert (Romeyer et al., 1988; Jacobs et al., 1989; Kille et al., 1991; Tommey et al., 1991; Hattori et al., 1994). Dabei zeigte sich sehr bald, daß die Ausbeute und Stabilität bzw. Halbwertszeit des exprimierten Genprodukts gesteigert werden kann, wenn das inklonierte Metallothioneingen als Hybridprotein (Translationsfusion) exprimiert wird (Romeyer et al., 1988).

Um die metallbindenden Eigenschaften des PsMT_A-Genprodukts genauer untersuchen zu können, exprimierten Kille und Mitarbeiter die PsMT_A-cDNA in *E. coli* und wiesen die Speicherung von intrazellulärem Cadmium nach (Kille et al., 1991). Dies war einer der ersten Beweise, daß das Genprodukt eines pflanzlichen Metallothioneingens in der Lage ist, die Cd-Aufnahme und zellinterne Bindung in Prokaryonten zu stimulieren. Allerdings wurde deutlich, daß das rekombinante Protein besonders in der "Spacer"-Region zwischen den terminalen Cysteindomänen gegenüber proteolytischem Abbau empfindlich zu sein scheint. Sollte sich bei zukünftigen Untersuchungen zeigen, daß in dieser Region potentielle Spaltstellen auch für pflanzliche Proteasen liegen, könnte das die bisher mit großen Schwierigkeiten verbundene Isolierung und Reinigung dieser Genprodukte erklären. Einige Autoren vermuten, daß kleinere metallbindende cysteinreiche Polypeptide durch posttranslationales Processing in der internen "Spacer"-Region gebildet werden könnten. Ein Beweis für diese Vermutung steht bisher aus. Die Assoziation mit Metallionen schützt das Protein vor proteolytischem Abbau, denn trotz der Spaltung werden die terminalen Cysteindomänen über Metall-Protein-Bindungen zusammengehalten (Kille et al., 1991). In einem anderen experimentellen Ansatz wurde das PsMT_A-Gen als carboxyterminale Extension der Glutathion-S-Transferase (GST) in *E. coli* exprimiert. Das aus Zellextrakten gereinigte Fusionsprotein zeigte signifikant höhere Bindung mit Zn, Cu und Cd als GST allein (Tommey et al., 1991; Robinson et al., 1992).

Die Expression des Metallothionein-ähnlichen Gens PsMT_A aus *Pisum sativum* wurde von Evans et al. (1992) sowohl in *Escherichia coli* als auch in *Arabidopsis thaliana* getestet. In *E. coli*-Zellen mit rekombinantem PsMT_A war die Cu-Akkumulation um das 8fache höher als in Kontrollzellen. Dabei fiel auf, daß im Hinblick auf die Zink- oder Cadmiumakkumulation keine signifikanten Effekte beobachtet werden konnten. Etwa 75 % der selektierten transgenen Jungpflanzen von *Arabidopsis thaliana*, die das PsMT_A-Gen unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors exprimierten, akkumulierten ein Mehrfaches an Kupfer als untransformierte Kontrollpflanzen. Die Wurzeln von *Pisum*

sativum-Pflanzen, die unter Bedingungen mit geringer Eisenverfügbarkeit angezogen wurden, zeigten eine erhöhte Aktivität der Eisen(III)-Reduktase im Wurzelbereich und akkumulierten mehr Kupfer als Pflanzen, die in Nährmedien mit ausreichenden Eisenkonzentrationen angezogen wurden. Danach sind Änderungen in der Eisenverfügbarkeit eng mit der Cu-Homöostase korreliert (vgl. auch Robinson et al., 1992).

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse zur Expression eines Typ 2 - Metallothionein-ähnlichen Gens (MT2) aus *Arabidopsis thaliana* in einem Zn²⁺-Metallothionein-defizienten *Synechococcus* PCC 7942-Stamm postulieren Robinson und Mitarbeiter, daß MT2-Genprodukte eine mögliche Rolle im Zn²⁺-Metabolismus spielen könnten (Robinson et al., 1996). Bei diesen Versuchen wurde das MT2-Gen unter der Kontrolle der Zn²⁺-abhängigen cyanobakteriellen Metallothionein-regulatorischen Region („smt“) exprimiert. Durch das Einbringen dieses pflanzlichen MT2-Gens konnte eine partielle Komplementation der Zn²⁺-Hypersensitivität von *Synechococcus* PCC 7942-Mutanten, deren endogenes Zn²⁺-Metallothioneingen („smtA“) funktionelle Defizienz zeigte, erreicht werden. Das MT2-Gen konnte auch als rekombinantes Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert werden. Nach seiner Reinigung konnte in In-vitro-Versuchungen Zn²⁺-Bindung gezeigt werden. In höheren Pflanzen ist nur wenig über Mechanismen der Zn-Homöostase bekannt. Sollten pflanzliche Metallothioneingene als potentielle Zn²⁺-Donoren für Transkriptionsfaktoren und Zn²⁺-abhängige DNA- und RNA-Polymerasen dienen, könnten sie eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression spielen (Robinson et al., 1996). Immerhin existiert seit längerer Zeit die Hypothese, daß animale Metallothioneine den Metallierungsstatus und damit die Aktivität von Zn²⁺-enthaltenden Proteinen in Abhängigkeit endogener Faktoren modulieren (Zeng et al., 1991a; Zeng et al., 1991b).

Es ist bekannt, daß Trichome als externe Blattgewebe Schwermetalle wie Mangan (Blamey et al., 1986) und Blei (Martell, 1974) einlagern. Es gibt Hinweise, daß die Cadmium-Akkumulation in den Blättern durch den Transpirationsstrom getrieben ist (Salt et al., 1995) und die Cadmium-Speicherung ebenfalls in den Trichomen der Blattoberfläche erfolgt (Foley und Singh, 1994). Möglicherweise dient hier ein pflanzliches Metallothionein auch für dieses Schwermetall als Bindungspartner. Immerhin konnte die Expression eines Gens für ein Typ-II-Metallothionein in Trichomen von Bohnenpflanzen nachgewiesen werden (Foley und Singh, 1994).

Abbildung 2 zeigt die aus der Basensequenz abgeleiteten Aminosäuresequenzen verschiedener aus höheren Pflanzen isolierter Metallothioneingene.

Abbildung 2

Aminosäuresequenz eines animalischen Metallothionein-Gens (zum Vergleich)

(1) MD***PNCSCPTGGSCTCA*GS*CKC**KE*****CRC*T*SCKKSCCCP*****G*****GCARCAQGCVCKGASDKCSCA

Aminosäuresequenzen von pflanzlichen Metallothionein-ähnlichen Genen (Typ 1)

(2) MS*S*G**CSC**GSGCKC**GDNCSC**SMYPDM*****ETNTTVTMIEGVAP*L*KM*YSEGSEKS*FGA*EGGN*****G*CKCGSNCKC****DPCNC*

(3) MS**G**CGC**GSSCNC**GDSCKC*NKRSSGLS****YS**EMETTETVILGVGP*A*KIQF*EGAEMS**AASEDG*****G*CKCGDNCTC****DPCNC*-

(4) MS*****CSC**GSSCGC**GSSCKC*GKYPDLEETS**TAAQ**PT**VVLGVAPEK*KA*APEFVEA***AA*ESGEAAH**G*CSCGSGCKC****DPCNC*-

(5) MSCSCGSSCGC**GSNCNC*****GKMPDLEEKSGAT*MQV**T*VIVLGVGS*A*KVQF*E**E***AA*EFGEAAH**G*CSCGANCKC****NPCNC*-

Aminosäuresequenzen von pflanzlichen Metallothionein-ähnlichen Genen (Typ 2)

(6) MS*CCGGNCGC**GSSCKC**GNGCGGC*KMPDLS****YT**ESTTTETLVMGVAP*V*KAQF*EGAEMG*VPA*END*****G*CKCGPNCSC****NPCTCK

(7) MS*CCGGNCGC**GSGCKC**GNGCGGC*KMPDLG****FS*GETTTTETFLVGVAP*AMKNQY*EASGES*NNA*BSD*****A*CKCGSDCKC****DPCTCK

(8) MS*CCGGKCGC**GSSCSC**GSGCGGC*GMPDLS****YS**EMTTTETLIVGVAP**QKTYF*EGSEMG*V*AAEN*****G*CKCGSDCKC****DPCTCK

(9) MS*CCGGNCGC**GSGCKC**GNGCGGC*KMPDMS****FS**EKTTTETLVLGVGAE**KAHF*EGGEMGVV*GAEE*****GGCKCGDNCTC****NPCTCK

(10) MG*C*DDKCGC**AVPCPG**GTGCR*CTSARSGAAAGEHTT**CGCG*EHCGCNPCAC****GREGTPSG*R**A*NRRAN*****CSCGAACNC**AS**CGSATA-

Abbildung 2: Aminosäure-Alignment pflanzlicher Metallothioneine
Abgeleitete Aminosäuresequenzen („predicted products“) von isolierten pflanzlichen Metallothionein-ähnlichen Genen (verändert nach Robinson et al., 1994)

Die aus der Nucleotidsequenz abgeleiteten sogenannten "predicted proteins" der pflanzlichen Metallothionein-ähnlichen Gene sind verschiedenen Typen zugeordnet worden. Basis für diese Einordnung ist das spezielle Arrangement der Cysteinreste im Molekül (Robinson et al., 1993). Typ I und Typ II - Sequenzen enthalten zwei cysteinreiche Metallothionein-ähnliche amino- und carboxyterminale Domänen, die durch eine zentrale Region von etwa 40 Aminosäureresten getrennt sind. Innerhalb dieser 40 Aminosäuren gibt es keine Cysteine (Ausnahme: Weizen E_c-Protein). Beim Typ I sind die Sequenzen der Cysteinreste ausschließlich in Cys-X-Cys-Motiven angeordnet. Es handelt sich hierbei um ein charakteristisches Metallbindungsmotiv, das auch in anderen bekannten, z. B. animalen Metallothioneinen gefunden wird. Typ II-Sequenzen enthalten zusätzlich ein Cysteinpaar (-Cys-Cys-) und -Cys-X-X-Cys-Motive innerhalb der aminoterminalen Domäne. Es wird angenommen, daß die feinen Unterschiede im Arrangement der Cysteinreste die Metallspezifitäten modulieren.

(1) *Equus equus* (Pferd) (Kojima und Kägi, 1978); (2) *Mimulus guttatus* (Gelbe Gauklerblume) (de Miranda et al., 1990); (3) *Pisum sativum* (Erbse) (Evans et al., 1990); (4) *Zea mays* (Mais) (de Framond, 1991); (5) *Hordeum vulgare* (Gerste) (Okumura et al., 1991); (6) *Glycine max.* (Soyabohne) (Kawashima et al., 1991); (7) *Arabidopsis thaliana* (Acker-Schmalwand) (Takahashi et al., 1991); (8) *Actinidia deliciosa* (Kiwifrukt) (Ledger und Gardner, 1994); (9) *Ricinus communis* (Rizinusbohne) (Klemsdal et al., 1991); (10) *Triticum aestivum* (Weizen) (Kawashima et al., 1992).

3.3.2 Phytochelatine

Phytochelatine sind keine primären Genprodukte und aus diesem Grund den Metallothioneinen der Klasse III zugeordnet worden (Fowler et al., 1987). Es handelt sich um schwermetallkomplexierende Peptide, deren Struktur von Kondo et al. (1984) und Grill et al. (1985) charakterisiert wurde. Cd²⁺ ist der effektivste Metallaktivator, gefolgt von Ag⁺, Bi³⁺, Pb²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺ und Au²⁺ (Grill et al., 1987). Sie sind funktionell analog zu Metallothioneinen der Klasse I und II. Als lineare Polymere können sie mit der allgemeinen Formel [(γ-Glu-Cys)_n-Gly] (n=2-11) beschrieben werden. Unter der Voraussetzung, daß entsprechende Vorstufen in der Zelle zur Verfügung stehen, sind für die Biosynthese von Phytochelatinen die Expression der sogenannten Phytochelatinsynthase, Glutathion und Schwermetallionen erforderlich, wobei stufenweise die Addition von Dipeptidyl-Einheiten erfolgt (Grill et al., 1989). Die Beteiligung von Glutathion an der Phytochelatinsynthese wurde durch die Inhibierung der Biosynthese von Glutathion nachgewiesen. Als inhibierendes Agens diente Buthioninsulfoximin, ein Inhibitor der γ-Glutamylcysteinyl-Synthetase (Griffith, 1979). Diese sogenannten Cd-Peptide bestehen zu 30-50 % aus Glutaminsäure-/Glutamin-, zu 30-40 % aus Cystein- und zu 10-15 % aus Glycinresten, wobei aromatische und basische Aminosäuren fehlen, so daß diese löslichen Peptide einen sauren Charakter zeigen (Rausser, 1984; Wagner, 1984).

Die Phytochelatinsynthese wurde aus Zellsuspensionskulturen von *Silene cucubalus* isoliert, gereinigt und charakterisiert. Es handelt sich um eine metallabhängige Transpeptidase, die aus 4 identischen Untereinheiten besteht und ein Molekulargewicht von 95000 Dalton aufweist. Während der Aufreinigung dissoziiert das Enzym in eine aktive dimere Form. Die Reaktion der Phytochelatinsynthese ist selbstreguliert, da das Endprodukt das enzymaktivierende Metall chelatisiert (Grill et al., 1989).

Außer den oben genannten linearen Polymeren sind weitere Phytochelatin-Moleküle mit abweichender Aminosäurezusammensetzung identifiziert worden. So wurden Homo-Phytochelatine [(γ-Glu-Cys)_n-β-Ala]: n=2-7) aus Bohnenpflanzen (Ordnung: *Fabales*) isoliert, die β-Alanin anstelle von Glycin enthalten

(Grill et al., 1986). Iso-Phytochelatine, die an der dritten Position Serin aufweisen, wurden in Species der Familie *Poaceae* gefunden (Klapheck et al., 1992). Es gibt sogar Iso-Phytochelatine, denen die C-terminale Aminosäure fehlt (Bernhard und Kägi, 1987) oder die an der dritten Position Glutaminsäure - entdeckt in Maiskeimlingen - statt Glycin aufweisen (Meuwly et al., 1993).

Den Untersuchungen von Howden et al. (1995) zufolge scheinen Pflanzenmetalothioneine keine Rolle bei der Induktion einer Cadmiumtoleranz in pflanzlichen Systemen zu spielen, da durch die Expression des "Cad1"-Gens, von dem angenommen wird, daß es für die Phytochelatinsynthese codiert, offensichtlich Cadmiumresistenz in *Arabidopsis* bewirkt wird. Ein "Screening-Verfahren" zur Identifizierung Cd-sensitiver Mutanten von *Arabidopsis thaliana* wurde bereits 1992 publiziert (Howden und Cobbett, 1992). Bei zwei Cd-sensitiven Mutanten fanden die Autoren voneinander unabhängige Mutationen (unabhängige Allele) im selben Locus, der als "Cad1" bezeichnet wurde. Die genetische Analyse zeigte, daß der sensitive Phänotyp gegenüber dem Wildtyp rezessiv ist und als sogenannter "Single Mendelian Locus" segregiert. Die Mutanten zeigten ebenfalls eine Sensitivität gegenüber Quecksilber-, Kupfer- und Zinkionen, während sie gegenüber Manganionen keine größere Sensitivität als der Wildtyp zeigten. Selbst undifferenziertes Kallusgewebe war Cd-sensitiv, so daß man davon ausgehen kann, daß der mutierte Phänotyp schon auf der zellulären Ebene zum Ausdruck kommt. Sowohl Wildtyp als auch Mutante zeigten erhöhte Sensitivität gegenüber Cd in Gegenwart von Buthioninsulfoximin, einem Inhibitor für die Biosynthese cadmiumbindender (γ-Glutamylcystein)_n-Glycin-Peptide, woraus man folgerte, daß die Mutante offensichtlich ebenfalls zur Synthese dieser Peptide fähig ist. Wie sich später herausstellte, war die "Sequestration" der Cd-PC-Komplexe deutlich beeinträchtigt. 3 Jahre später berichteten die gleichen Autoren, daß weitere Mutanten isoliert werden konnten, deren Fähigkeit zur Phytochelatinsynthese mit dem Grad der Sensitivität gegenüber Cd korrelierte. Die Mutanten zeigten Glutathionkonzentrationen wie der Wildtyp, obwohl jede von ihnen bezüglich ihrer Phytochelatinsynthaseaktivität defizient war. Nach diesen Ergebnissen wird den Phytochelatinen eine

essentielle Rolle im Cd-Detoxifikationsmechanismus, gezeigt am Beispiel *Arabidopsis*, zugeschrieben. Viele Studien metalltoleranter Pflanzenpopulationen bzw. selektierter metalltoleranter Zelllinien zeigen, daß trotz der Anreicherung hoher Konzentrationen an $(\gamma\text{-EC})_n\text{G}$ -Peptiden weitere "Faktoren" eine Rolle spielen, die letztlich zu einer Metallresistenz führen (R a u s e r, 1990; S t e f f e n s, 1990). Es wird nicht ausgeschlossen, daß zu diesen "Faktoren" möglicherweise auch Metallothionein-ähnliche Proteine gehören (H o w d e n und C o b e t t, 1992). Diese Ansicht wurde bereits 1989 von T o m s e t t und Mitarbeitern vertreten, die metallbindende Peptide partiell aufreinen konnten. Sie isolierten aus Wurzelextrakten von Cd- und Cu-behandelten *Mimulus guttatus*-Pflanzen sowohl Cd- als auch Cu-bindende Peptide durch HPLC, die sich nach Aminosäureanalyse deutlich voneinander unterschieden. Die Peptide zeigten zum einen den typischen Aminosäuregehalt der $(\gamma\text{-EC})_n\text{G}$ -Komponenten, zum anderen den von Metallothioneinsequenzen der Cu-MTs (Pilze - Klasse I). Obwohl durch die Zugabe von Buthioninsulfoximin (BSO) die $(\gamma\text{-EC})_n\text{G}$ -Synthese vollständig inhibiert wurde, d. h. Cu-tolerante *M. guttatus*-Pflanzen ihre Fähigkeit verloren, in Cu-haltigem Medium wie normale Pflanzen zu wachsen, wurde die Cu-Toleranz dieser Pflanzen nicht vollständig zerstört. Der experimentelle Ansatz verlief in der Weise, daß Cu-tolerante Pflanzen in Anwesenheit von 100 μM BSO im Wachstumsmedium für 20 Tage vor Zugabe des Metalls angezogen wurden. 4 Tage nach Zugabe von 5 μM Cu wurden die Pflanzen im Wachstum inhibiert, überlebten allerdings; wohingegen 4 Tage nach Zugabe von 5 μM Cd im Medium Pflanzen der gleichen Versuchsreihe starben (T o m s e t t et al., 1989). In der Literatur wird sehr deutlich darauf hingewiesen, daß nur durch die komplette Inhibierung der Phytochelatinsynthaseaktivität zu klären sein wird, ob die Induktion metallothionähnlicher Gene in höheren Pflanzen zu einer Schwermetalltoleranz führt oder nicht (vgl. Z e n k, 1996). An dieser Stelle sei bemerkt, daß zu dieser Problematik zur Zeit von den verschiedensten Autoren ohnehin recht konträre Meinungen vertreten werden.

3.3.3 Weitere intrazelluläre Schwermetallbindungskomponenten

Höhere Pflanzen besitzen noch andere Metallpuffersysteme als die oben erwähnten, um die intrazelluläre Verfügbarkeit essentieller Metalle innerhalb gewisser Grenzen zu halten und die Aufnahme nichtessentieller Metalle zu regulieren. Zu den im folgenden näher zu betrachtenden Verbindungen gehören vor allem Zitronensäure (L e e et al., 1977) und Apfelsäure bzw. Hydroxybernsteinsäure (B r o o k s et al., 1981a). Für Ni^{2+} -Ionen ist eine metallorganische Ligandenkomplexbildung in der Vakuole durch den Nachweis eines negativ geladenen Citratonickelat(II)-Komplexes gezeigt worden (L e e et al., 1977; B r o o k s et al., 1981b). Auch Senfölglycoside und Oxalate dienen offensichtlich als Bindungspartner für Schwermetallionen (M a t h y s, 1977). Oxalat scheint nicht nur für Zink-, sondern auch für Chromionen komplexierendes Agens zu sein (L y o n et al., 1969).

Die Vakuole ist der größte Speicherort für akkumulierte Metalle. Vor allem sind hier hohe Konzentrationen an organischen Liganden vorhanden, die Metalle in löslicher oder unlöslicher Form komplexieren können (M a r s c h n e r, 1995; G o d b o l d et al., 1984). So zeigten z. B. zinktolerante Klone von *Deschampsia caespitosa* bei hoher Citratanreicherung eine effektivere Zn^{2+} -Kompartimentierung in der Vakuole als nichttolerante Klone (B r o o k s et al., 1981a). Daß auch Phytinsäure als Bindungspartner für Zinkionen in Frage kommt, zeigten van S t e v e n i n c k et al. (1987) ebenfalls für *Deschampsia caespitosa*. Sie stellten einen ungewöhnlich hohen Zinkgehalt in kugelförmigen Ablagerungen von Wurzel-Cortikalzellen fest.

Erhöhte Malatkonzentrationen wurden in überirdischen Geweben bei zinktoleranten Ökotypen von *Silene cucubalus* und *Rumex acetosa* im Vergleich zu nichttoleranten Ökotypen gefunden. Besonders hohe Konzentrationen an Senfölglycosiden entdeckte man in *Thlaspi alpestre*. Hier produzierten zinkresistente Pflanzen im Vergleich zu sensitiven die zweifache Menge. M a t h y s (1977) geht davon aus, daß hohe Malatkonzentrationen in zinkresistenten Ökotypen hauptsächlich innerhalb des Cytoplasmas (T o r i i und L a t i e s, 1966) vorkommen. Für den Mechanismus der Zinktoleranz in *Silene cucubalus* schlägt er folgendes "Shuttle"-Modell vor: Zinkionen werden zunächst durch das Plasmalemma transportiert, was zu einer Anreicherung im Cytoplasma führt. Zinkresistente Pflanzen verfügen über höhere Malatkonzentrationen im Cytoplasma. Somit ist der Transport von komplexierten Zinkionen durch das Cytoplasma in die Vakuole effektiver als in sensitiven Typen. Durch die Oxalatsynthese in der Vakuole wird ein Konzentrationsgradient erzeugt, der einen unidirektionalen Transport für komplexierte Zinkionen zur Folge hat. Aufgrund der höheren Affinität von Oxalat zu Zink werden Zinkionen aus dem Malatkomplex in der Vakuole freigesetzt, und Malat kann zurück in das Cytoplasma diffundieren, wo es wieder mit Zinkionen reagiert. Durch die schnelle Weiterleitung wird die Zinkionenkonzentration im Cytoplasma relativ gering gehalten, die Aufnahme der Schwermetallionen jedoch nicht beeinträchtigt. Wird die Zinkkonzentration im Wachstumsmedium verringert, zeigt die Pflanze verringertes Wachstum und veränderte Enzymaktivitäten (M a t h y s, 1973 und 1975). Setzt man dem Wachstumsmedium Zink zu, wird die Oxalatsynthese in zinksensitiven Ökotypen inhibiert (bis zu 50 %), in zinkresistenten Ökotypen von *Silene cucubalus* und *Rumex acetosa* dagegen stimuliert. Die Hypothese wird auch dadurch gestützt, daß ein Anstieg der Carboanhydrase-Aktivität, die durch Zinkionen stimuliert wird, nur in zinkresistenten Ökotypen nach Zugabe von Zink zum Wachstumsmedium festzustellen ist. In *Silene cucubalus* sind die Blätter der Hauptort der Oxalatsynthese und -anreicherung. Der Oxalatgehalt in den Wurzeln und im Sproß ist vergleichsweise gering. Bei *Rumex acetosa* konnten auch im Sproß hohe Oxalatkonzentrationen gemessen werden. Die Oxalatkonzentration scheint offensichtlich vom Alter der Blätter abzuhängen. Ältere Blätter hatten einen deutlich höheren Gehalt. Dies trifft sowohl für resistente als auch für sensitive Pflanzen zu. Zwischen verschiedenen Ökotypen der oben genannten Species schwankt der Oxalatgehalt erheblich. Für Zinkionen in der Vakuole von *Thlaspi alpestre* scheinen Senfölglycoside als sogenannte "Terminale Akzeptoren" zu dienen (M a t h y s, 1977).

Eine Anzahl von Schwermetallionen (Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} und Mn^{2+}) induziert eine signifikant verstärkte Protonenausschleusung in Wurzelsegmenten von Mais. Die Folge ist eine Depolarisation des transmembranalen elektrischen Potentials (Morgutti et al., 1984). Mit der Akkumulation und Bildung von Metallkomplexen findet eine Protonenverdrängung statt, wodurch eine Ansäuerung im Plasma verursacht wird (Marré et al., 1983). Das wiederum hat den Anstieg der Malatkonzentration zur Folge.

3.4 Expression von unterschiedlichen Genen nach Schwermetalleinfluß

Aufgrund der Ergebnisse molekularbiologischer Untersuchungen konnte in den vergangenen Jahren gezeigt werden, daß bei höheren Pflanzen durch Schwermetallstreß die Induktion eines relativ weiten Spektrums von Genen erfolgt. Die Antwort ist mit einer allgemeinen Reaktion gegen Streß vergleichbar, da durch die Synthese oder Aktivierung von zahlreichen Enzymen ganz unterschiedliche Stoffwechselwege angeschaltet werden. Dies ist z. B. dann festzustellen, wenn Blätter von *Zea mays* L. cv. INRA für 6 Stunden mit Quecksilberchlorid behandelt werden und danach eine cDNA-Genbank von transkriptionell aktivierten mRNA-Spezies erstellt wird (cDNA-Klone im folgenden mit der Abkürzung „Chem“ = „chemically activated“ bezeichnet) (Didierjean et al., 1996). Werden Pflanzen Phytopathogenen wie Viren, Viroiden, Pilzen oder Bakterien ausgesetzt, sind ähnliche Stoffwechselreaktionen, z. B. die Synthese bzw. Aktivierung von sogenannten „pathogenesis-related proteins“ unterschiedlicher Typen wie β -1,3-Glucanasen (PR-2-Typ), Chitinasen (PR-3-Typ), thaumatinähnlichen Proteinen (PR-5-Typ) sowie die von Proteaseinhibitoren und glycinreichen Proteinen zu beobachten (Linthorst, 1991).

Wie sich schon 1987 herausstellte, wird in Bohnenblättern nach Schwermetallbehandlung eine Genexpression induziert, die mit der nach Pathogeneinfluß vergleichbar ist. Wenn diese Pflanzen mit Quecksilberchlorid behandelt oder mit Alfalfa-Mosaic-Virus infiziert werden, produzieren sie sogenannte „pathogenesis-related proteins“ (de Tapia et al., 1987). Während die Induktion funktioneller Bohnen-PR-4-Typ-mRNA nach Schwermetallbehandlung innerhalb von 2 - 3 Stunden erfolgt, kann diese mRNA nach Virusinfektion erst nach 2 Tagen nachgewiesen werden. Das PR-4-Typ-Protein ist außerhalb des Cytoplasmas, d. h. in der interzellulären Flüssigkeit lokalisiert, ist resistent gegenüber endogenen Pflanzenproteasen und enthält einen hohen Anteil an sauren Aminosäureresten (de Tapia et al., 1987). Die Funktion des Proteins bleibt zu klären.

Induzierte mRNAs von sogenannten glycinreichen Proteinen (GRPs) konnten isoliert werden, nachdem die Blätter von 12 Tage alten Maispflanzen mit 0,2 %iger Quecksilberchlorid-Lösung besprüht wurden. Die isolierten cDNA-Klone („Chem 1“ und „Chem 2“) wurden im Bluescript KS(+)-Plasmidvektor subkloniert und sequenziert (Didierjean et al., 1992). Die codierende Sequenz von Klon „Chem 2“ umfaßt 155 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 15,5 kDa. Das aus der Sequenz abgeleitete Protein zeigt eine glycinreiche Domäne in der zweiten Hälfte des Moleküls (Reste 88 - 155) mit einem hochrepetitiven GYGG-Motiv. Wie bei anderen GRPs aus Monocotyledonen

(Gomez et al., 1988) fehlt das Signalpeptid, das allerdings in GRPs aus dicotylen Pflanzen und im cytokeratinähnlichen GRP aus Gerste (Rohde et al., 1990) vorhanden ist. Zur Funktion dieser Proteine in der Zelle ist wenig bekannt. Frühere Untersuchungen zeigen, daß sie offensichtlich mit der Zellwand assoziiert sind (Keller et al., 1988). Die Expression einiger dieser Gene scheint organ- und entwicklungspezifisch reguliert zu sein (Oliveira et al., 1990). So wird ein glycinreiches Genprodukt auch nach viraler Infektion in Tabak gefunden. Dieses zeigt Sequenzähnlichkeiten mit der kleinen Untereinheit der Ribulosebiphosphatcarboxylase (Kan et al., 1988). Die Genbank von Didierjean et al. (1996) enthält einen weiteren cDNA-Klon („Chem 1“) mit der Sequenz für ein glycinreiches Protein, das im Nucleus lokalisiert ist (Albà et al., 1994) und dem eine Beteiligung an der Transkription zugeschrieben wird, da sich zwei mRNA-bindende Consensussequenzen am N-terminalen Ende befinden. Die Untersuchungen von Ludevold et al. (1992) stützen diese Hypothese, da gezeigt worden ist, daß das glycinreiche Protein bevorzugt an uridin- und guanosinreiche RNAs bindet. Die erwähnten Autoren gehen davon aus, daß das Protein, welches durch „Chem 2“ codiert wird und 75% Basensequenzhomologie mit „Chem 1“ zeigt, ebenfalls RNAs bindet.

Im Rahmen der Identifikation weiterer isolierter Klone (Didierjean et al., 1996) ergab sich, daß bei Klon („Chem 3“) Sequenzhomologien mit dem Hsp70-Gen aus Mais (vgl. Rochester et al., 1986) gefunden wurden.

Daß Schwermetalle die Synthese von Heatshock-Proteinen induzieren können, ist seit langem bekannt. In Petunien induzierten Kupfer, Zink und Cadmium die Hsp70-Transkription (Winter et al., 1988), allerdings im Gegensatz zu Cadmiumchlorid, beeinträchtigte Quecksilberchlorid nicht das Prozessieren des Hsp70-Transkriptes, indem mRNA-Splice-Reaktionen inhibiert wurden. Eine wesentliche Funktion von membrangebundenem Hsp70 ist die Wiederherstellung nicht korrekt gefalteter Proteine, die durch Anlagerung von Schwermetallen partiell denaturiert werden können. In Hefezellen scheint die Assoziation von Hsp30 mit Plasmamembranen essentiell für die Aufrechterhaltung der ATPase-Aktivität zu sein. Dies wirkt sich auf die Stabilisierung des pH-Wertes während bestimmter Streßperioden aus (Panaretou und Piper, 1992). Während Hitzestreß zur vollständigen Blockierung der ribosomalen RNA-Synthese führt, wird die Transkription dieser RNA-Spezies unter Metallstreß nicht beeinflusst (Wollgiehn und Neumann, 1995).

Offensichtlich gibt es eine komplexe Genregulation für die Antwort auf abiotischen Streß, zumal verschiedene Streßformen, denen die Pflanzen ausgesetzt werden, nicht immer mit gleichen Transkriptionsmustern beantwortet werden (Didierjean et al., 1996).

3.5 Gentechnische Beeinflussung der Schwermetallaufnahme

Bisher wurden Pflanzen mit besonderen Eigenschaften des Schwermetallhaushaltes meist durch herkömmliche Selektionsverfahren isoliert. Beim Screenen von Mutanten von *Pisum sativum* zeigte sich, daß eine selektierte Mutante in einem einzelnen Gen mutiert war und 10- bis 100-fach mehr Eisen akkumulierte als der Wild-Typ (Grusack et al., 1994). Eine ähnliche Beobachtung machte man bei einer rezessiven Mutation von *Arabidopsis thaliana*, die 10fach mehr Mangan akkumulierte als der Wildtyp (Delhaize et al., 1993).

Während das Auffinden von solchen Mutanten nicht unwesentlich vom Zufall bestimmt wird, bietet die Gentechnik heute Möglichkeiten, durch Gentransfer gezielt neue Eigenschaften in Pflanzen einzubringen. Herkömmlichen Mutations- und Selektionsverfahren stehen In-vitro-Mutagenese-Techniken gegenüber, die jede gewünschte Veränderung genetischen Materials zulassen.

So konnte in jüngster Zeit eine erhöhte Metalltoleranz für Quecksilber in höheren Pflanzen erhalten werden, nachdem man ein semisynthetisches Gen für die bakterielle Quecksilberreduktase, das MerA-Gen, in die Pflanze einführte (Meagher et al., 1995). Die transgene *Arabidopsis thaliana* tolerierte immerhin die sonst für die Pflanze letale Konzentration von 100 $\mu\text{Mol Hg}^{2+}$. Durch die genetische Transformation dieser Pflanze mit dem Gen der bakteriellen Hg^{2+} -Reduktase (merA) erreichte man, daß sie das toxische Kation durch die Wurzel aufnahm, quecksilberhaltige Verbindungen zu elementarem Quecksilber reduzierte und dann in geringen Konzentrationen, die für die Umwelt aufgrund des hohen Verdünnungseffektes tolerierbar waren, verflüchtigte ("Biovolatilisation") (Rugh et al., 1996). Zuvor waren allerdings Anpassungen des bakteriellen Gens an das pflanzliche System notwendig. Das isolierte Gen enthielt nämlich keine pflanzlichen Translationsinitiationssignale und wies außerdem einen viel zu hohen GC-Gehalt auf, so daß letztlich ein synthetisches Gen -merApe9 - mit einem geringeren GC-Gehalt und einer veränderten 5' - Region hergestellt werden mußte, bevor man eine Pflanzenzentransformation mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* vornehmen konnte. Es zeigte sich, daß sowohl Pflanzen als auch Bakterien, die merApe9 exprimierten, nicht nur Resistenz gegenüber Quecksilber sondern auch gegenüber toxischen Konzentrationen von Au^{2+} , einem Nachbar von Quecksilber im Periodensystem der Elemente, entwickelten.

Auch andere Strategien führten zum gewünschten Erfolg. Pflanzenzellen ließen nach Infektion durch den Wildtyp *Agrobacterium rhizogenes* eine verstärkte Proliferation der Wurzeln erkennen (Sinkar et al., 1987; Pythoud et al., 1987). Der Vorteil in der Vermehrung der Wurzelmasse wird darin gesehen, daß eine vergrößerte Rhizosphäre eine effektivere Metallaufnahme aufgrund der höheren Transpirationsrate zur Folge hat (Strobel und Nachmias, 1988). Bei dem Spaltpilz *Saccharomyces pombe* konnte nach Übertragung des Gens für eine Vakuolenmembran-Transportpumpe die Komplexierung des Peptid-Cd-Komplexes in der Vakuole beobachtet werden (Ortiz et al., 1992 und 1995). Die Überproduktion dieses Proteins in *Saccharomyces pombe* verstärkte die Toleranz und Akkumulation von Cadmium (Ow, 1993). Die genannten Autoren gehen davon

aus, daß in höheren Pflanzen der gleiche Effekt erzielt werden kann.

Es gibt inzwischen auch eine Anzahl von Untersuchungen zur Expression von Metallothioneinen animalen Ursprungs in höheren Pflanzen (Misra und Gedamu, 1989; Yeagan et al., 1992; Pan et al., 1994; Lefebvre et al., 1987). Die Autoren berichten für die untersuchten Pflanzen von unterschiedlich hohen Toleranzbereichen gegenüber Schwermetallen, die durch den Gentransfer erzielt wurden. Festzustellen bleibt jedoch, daß die Metallaufnahme selbst kaum drastisch erhöht wurde und hier offensichtlich keine direkte Korrelation besteht. Eine Ausnahme scheint das oben für Cadmium angeführte Beispiel im *Saccharomyces pombe*- System zu sein. Da landwirtschaftlich bedeutsame Kulturpflanzen zu mehr als 70 % der menschlichen Cadmiumaufnahme beitragen, ist eine Modifikation gerade dieser Pflanzen ein erstrebenswertes Ziel. Bereits vor 10 Jahren konnte durch die Expression des Chinese-Hamster-MTIII-Gens freies Cd in transfizierten Blättern von *Brassica campestris* drastisch reduziert werden (Lefebvre et al., 1987). In den folgenden Jahren wurde die Idee, höhere Pflanzen vor Cd-Belastungen durch die Übertragung animaler Metallothioneine zu schützen, konsequent verfolgt. Basierend auf den Arbeiten von Maiti et al. (1989) wurde gezeigt, daß nach Transfer des Maus-Metallothionein-I-Gens in Tabakpflanzen das Kultivar KY 14 von *Nicotiana tabacum* verglichen mit Kontrollkeimlingen eine um 24 % geringere Cd-Konzentration im Sproß sowie eine um 5 % höhere Cd-Konzentration in der Wurzel aufwies (Maiti et al., 1988, 1989, 1991; Yeagan et al., 1992). Dieser Effekt wird mit einer Cd-Sequestration in der Wurzel erklärt. Feldstudien mit Tabakpflanzen, die das Hamster-MTIII-Gen als Fusionsprotein mit der β -Glucuronidase (GUS) exprimierten, ergaben keine vergleichbare Reduktion in den Blättern (Brandle et al., 1993). Es gibt inzwischen Hinweise, daß die Translokation von Metallen in den Sproß durch eine wurzelspezifische Genexpression reguliert und kontrolliert wird (Wagner et al., 1988). Die transformierten Pflanzen waren meist kleinwüchsig und zeigten eine geringere Anzahl an Blättern. Als Erklärung hierfür geben Joshi und Joshi (1991) Positionseffekte nach Fremdgen-Insertion an. Larkin und Scowcroft (1981) machen dafür eine Beeinträchtigung der Cu-Homöostase verantwortlich, da sie erhöhte Cu-Konzentrationen in transformierten Pflanzen nachweisen konnten.

4 Fazit und Ausblick

Die wenigen in diesem Artikel gezeigten Beispiele verdeutlichen, daß die Aufklärung molekularer Mechanismen nach Schwermetalleinfluß bei höheren Pflanzen von großem Interesse ist, allerdings noch am Anfang steht. Nur die Kenntnis der Ursachen für die unterschiedlichen Aufnahme-, Verteilungs- und Speichermechanismen bietet einen Ansatzpunkt, Eigenschaften von einer Pflanze auf die andere gezielt übertragen zu können. Im Rahmen dieser Thematik wird die Gentechnik einen entscheidenden Beitrag leisten. Es eröffnen sich Möglichkeiten, nicht nur Problemstandorte durch geeignete „schwermetallauschließende“ Pflanzensorten zu nutzen, sondern auch die Schwermetallakkumulation von Pflanzen so zu erhöhen, daß sich daraus Anwendungsmöglichkeiten zur Sanierung schwermetallbelasteter Böden

etwa im Rahmen der angestrebten „Phytoremediation“ ergeben. Die von R u g h et al. (1996) publizierte Strategie, die hohe Toxizität aufgenommener Metallverbindungen durch Transfer von Genen, die für Reduktasen codieren, abzuschwächen und außerdem in höheren Konzentrationen anzureichern, ist ein möglicher Ansatz von vielen, gentechnische Methoden für ein Design von Pflanzen mit neuen Schwermetallakkumulationseigenschaften zu nutzen (vgl. R a s k i n , 1996).

Der gezielte Transfer geeigneter Eigenschaften auf Pflanzen mit hoher Biomassebildung könnte in Zukunft dazu beitragen, daß sich die „Phytoremediation“ als neue Technologie und echte Alternative zu den bisher praktizierten chemisch-physikalischen Verfahren der Bodensanierung etablieren kann.

Zusammenfassung

Schwermetalle wie Cd, Cu, Zn, Bi, Ni, Hg und Pb gehören zu einer in der Biosphäre weitverbreiteten Gruppe von Elementen, die man als "Spurenelemente" bezeichnet. Während "nicht-essentielle" Elemente wie Hg, Cd und Pb ohne biologische Funktion in pro- und eukaryontischen Organismen sind und bereits in niedrigen Konzentrationen toxisch wirken können, sind "essentielle" Spurenelemente wie die Metalle Cu, Zn sowie Ni in geringen Konzentrationen für ein normales Wachstum unentbehrlich, in übermäßigen Konzentrationen jedoch toxisch. Eine Schwermetallbelastung von Böden wirkt sich auf die Physiologie und damit auf das Wachstumsverhalten von Pflanzen aus, die damit eine entscheidende Rolle in den biogeochemischen Kreisläufen und für das Transferverhalten dieser Metalle entlang der Nahrungsketten spielen. Schwermetallakkumulierende Pflanzenarten wie die sogenannten "Hyperakkumulatoren" stellen eine ökophysiologische Anpassung an metallhaltige Böden dar und können aufgrund ihrer veränderten Physiologie hohe Metallkonzentrationen anreichern. Meist handelt es sich um kleinwüchsige Pflanzen mit relativ geringer Biomassebildung. Vor dem Hintergrund, die hyperakkumulierenden Eigenschaften solcher Pflanzen im Rahmen der sogenannten „Phytosanierung“ zu nutzen, wird zur Zeit daran gearbeitet, die Aufnahmefähigkeit für die Schadstoffe durch den Einsatz gentechnischer Methoden zu steigern. Die Mechanismen der Metallakkumulation sind vielfältig. Zu ihnen gehören sowohl die extrazelluläre Metallkomplexierung als auch intrazelluläre Transport- und Speicherstrategien, die sich im Laufe der Evolution dieser Pflanzen entwickelten und bisher auf molekularer Ebene kaum untersucht wurden. Es wird angenommen, daß metallbindende Proteine und Peptide wie Metallothioneine und Phytochelatine eine wesentliche Rolle bei der Speicherung und Detoxifikation von Metallionen wie Cd, Zn, Cu Pb und Hg spielen. Zur Zeit gilt das Weizen-E_c-Protein als das einzige echte pflanzliche Metallothionein, obwohl noch andere pflanzliche Gene isoliert worden sind, die für Metallothionein-ähnliche Proteine codieren. An der Reinigung und Charakterisierung ihrer Genprodukte wird zur Zeit intensiv gearbeitet. Außerdem ist die metallinduzierte Genexpression und Regulation bei höheren Pflanzen von großem Interesse und bisher weitgehend unerforscht. Eine erhöhte Metalltoleranz in höheren Pflanzen konnte z. B. dadurch erreicht werden, daß man das bakterielle Gen für die Hg-Reduktase einführte. In diesen Pflanzen wird aufgenommenes

HgCl₂ zu weniger giftigem elementarem Hg reduziert und in äußerst geringen Konzentrationen über die Blätter „verdampft“. Nur durch weitere Analysen zur Schwermetallaufnahme und -speicherung auf molekularer Ebene wird es in Zukunft möglich sein, Kulturpflanzen mit hyperakkumulierenden Eigenschaften unter Anwendung molekularbiologischer Methoden herstellen zu können. Durch den gezielten Transfer geeigneter Eigenschaften auf Pflanzen mit hoher Biomassebildung könnte die „Phytosanierung“ als eine moderne Technologie zur Entseuchung kontaminierter Böden gegenüber bereits etablierten Verfahren konkurrenzfähig werden.

Biochemistry and Molecular Biology of Heavy Metal Accumulation in Higher Plants

Heavy metals, such as Cd, Cu, Zn, Bi, Ni, Hg and Pb are ubiquitous components of the biosphere. They are either essential trace nutrients, but may be toxic, when present at concentrations higher than required for optimal growth conditions. Contamination of soils with toxic metal ions may have adverse effects on plants and soil biota and may impose a risk for humans along the food chain. Populations of a variety of higher plant species are able to colonize these environments. One of the best-known examples are metal-hyperaccumulating plants, which have evolved on these sites through natural selection. Hyperaccumulation is an ecophysiological adaptation to metalliferous soils. These plants often accumulate only a specific metal, they grow slowly and have a small biomass. Little is known about their agronomic characteristics, breeding potential and physiology. Interest in these metal-hyperaccumulating mechanisms has come from the developments in phytoremediation, a new technology, using high biomass metal-accumulating plants to extract toxic metals from contaminated soils. The mechanisms of metal accumulation, which involve extracellular and intracellular metal chelation, precipitation, compartmentalization and translocation in the vascular system are poorly understood. Well-known metal-binding proteins include metallothioneins, metalloenzymes and various metal storage, carrier and channel/transport proteins. In addition phytochelatins, low molecular weight γ -Glu-Cys-peptides with high affinity for certain metals are assumed to be involved in accumulation, detoxification and metabolism of metal ions such as Cd, Zn, Cu, Pb and Hg in plant cells. At present, the wheat E_c-protein is the only plant protein, that can be unequivocally designated as a metallothionein. Many metallothionein-like plant genes have been isolated from different species and the available data indicate, that these genes have a role in metal metabolism. Most of their translational products remain to be purified from plant material and sequenced. Metal-induced gene expression and regulation is a broad field for further investigations. Increased metal tolerance has already been obtained by the introduction of different metallothioneins into higher plants. Only by analysing the mechanisms of metal uptake and metal storage at the molecular level, it will be possible in future, to develop crop plants with hyperaccumulating tendencies and to establish phytoremediation as a modern technology of environmental cleanup.

Literatur

- Albà, M. M., Culiáñez-Macià, F. A., Goday, A., Freire, M. A., Nadal, B. und Pagès, M. (1994): The maize RNA-binding protein, MA 16, is a nucleolar protein located in the dense fibrillar component. - *The Plant Journal* 6, S. 825-834.
- Asher, C. J. und Reay, P. F. (1979): Arsenic uptake by barley seedlings. - *Australian Journal of Plant Physiology* 6, S. 459-466.
- Baker, A. J. M. (1981): Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy metals. - *Journal of Plant Nutrition* 3, S. 643-654.
- Baker, A. J. M. und Brooks, R. R. (1989): Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - A review of their distribution, ecology and phytochemistry. - *Biorecovery* 1, S. 81-126.
- Baker, A. J. M. und Walker, P. L. (1990): Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. - In: *Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects*, Chapter 11 (Shaw A.J. ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, S. 155-177.
- Baker, A. J. M., Proctor, J., van Balgooy, M. M. J. und Reeves, R. D. (1993): Hyperaccumulation of nickel by flora of the ultramafics of Palawan, Republic of the Philippines. - In: *The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils. Proceedings of the first International Conference on Serpentine Ecology*. Intercept Ltd, Andover, Hampshire, UK, S. 291-304.
- Berg, J. M. (1989): Searching for metal-binding domains. - In: *Metal-DNA Chemistry*, Chapter 6 (Tullius, T. D., ed.). ACS Symposium Series 402, S. 90-96.
- Bernhard, W. R. und Kägi, H. R. (1987): Purification and characterization of atypical cadmium-binding polypeptides from *Zea mays*. - *Experientia* 52 (Suppl.), S. 309-315.
- Bienfait, H. F. (1988): Proteins under the control of the gene for Fe efficiency in tomato. - *Plant Physiology* 88, S. 785-787.
- Blamey, F. P. C., Joyce, D. C., Edwards, D. G. und Asher, C. J. (1986): Role of trichomes in sunflower tolerance to manganese toxicity. - *Plant and Soil* 91, S. 171-180.
- Bollard, E. G. (1983): Involvement of unusual elements in plant growth and nutrition. - In: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series Vol. 15B, *Inorganic Plant Nutrition* (Lauchli A. & Bielecki R.L. eds.). Springer Verlag, Berlin, S. 695-744.
- Brandle, J. E., Labbé, H., Hattori, J. und Miki, B. L. (1993): Field performance and heavy metal concentrations of transgenic flue-cured tobacco expressing a mammalian metallothionein- β -glucuronidase gene fusion. - *Genome* 36, S. 255-260.
- Brooks, R. R. (1977): Copper and cobalt uptake by *Haumaniastrum* species. - *Plant and Soil* 48, S. 541-544.
- Brooks, R. R., Lee, J., Reeves, R. D. und Jaffré, T. (1977): Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. - *Journal of Geochemical Exploration* 7, S. 49-57.
- Brooks, R. R., Naidu, S. D., Malaisse, F. und Lee, J. (1987): The Elemental content of metallophytes from the copper/cobalt deposits of Central Africa. - *Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique* 119, S. 179-191.
- Brooks, R. R., Reeves, R. D., Morrison, R. S. und Malaisse, F. (1980): Hyperakkumulation of copper and cobalt - a review. - *Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique* 113, S. 166-172.
- Brooks, A., Collins, J. C. und Thurman, D. A. (1981a): The mechanism of zinc tolerance in grasses. - *Journal of Plant Nutrition* 3, S. 695-705.
- Brooks, R. R., Baker, A. J. M. und Malaisse, F. (1992): Copper flowers. - *Natural Geographic Research and Exploration* 8, S. 338-351.
- Brooks, R. R., Reeves, R. D. und Baker, A. J. M. (1993): The Serpentine Vegetation of Goiás State, Brazil. - In: *The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils. Proceedings of the First International Conference on Serpentine Ecology*. Intercept Ltd, Andover, Hampshire UK, S. 67-81.
- Brooks, R. R., Morrison, R. S., Reeves, R. D., Dudley, T. R. und Akman, Y. (1979): Hyperaccumulation of Nickel by *Alyssum Linnaeus* (*Cruciferae*). - *Proceedings of the Royal Society of London, Section B*, 203, S. 387-403.
- Brooks, R. R., Morrison, R. S., Reeves, R. D. und Malaisse, F. (1978): Copper and cobalt in African species of *Aeolanthus* Mart. (*Plectranthinae, Labiatae*). - *Plant and Soil* 50, S. 503-507.
- Brooks, R. R., Shaw, S. und Asensi Marfil, A. (1981b): The chemical form and physical function of nickel in some *Iberian Alyssum* species. - *Physiologia Plantarum* 51, S. 167-170.
- Brooks, R. R., Trow, J. M., Veillon, J.-M. und Jaffré, T. (1981c): Studies on manganese-accumulating *Alyxia* from New Caledonia. - *Taxon* 30, S. 420-423.
- Brown, D. J. und DuPont, F. M. (1989): Lipid composition of plasma membranes and endomembranes prepared from roots of barley (*Hordeum vulgare* L.). Effects of salt. - *Plant Physiology* 90, S. 955-961.
- Brown, J. C., Chaney, R. L. und Ambler, J. E. (1971): A new tomato mutant inefficient in the transport of iron. - *Physiologia Plantarum* 25, S. 48-53.
- Butler, M., Haskew, A. E. J. und Young, M. M. (1980): Copper tolerance in the green alga, *Chlorella vulgaris*. - *Plant, Cell and Environment* 3, S. 119-126.
- Carruthers, A. und Melchior, D. L. (1986): How bilayer lipids affect membrane protein activity. - *Trends in Biochemical Science* 11, S. 331-335.
- Cataldo, D. A., Garland, T. R. und Wildung, R. E. (1983): Cadmium uptake kinetics in intact soybean plants. - *Plant Physiology* 73, S. 844-848.
- Chaney, R. L., Brown, J. C. und Tiffin, L. O. (1972): Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. - *Plant Physiology* 50, S. 208-213.
- Clarke, S. E., Stuart, J. und Sanders-Loehr, J. (1987): Induction of siderophore activity in *Anabaena* spp. and its moderation of copper toxicity. - *Applied and Environmental Microbiology* 53, S. 917-922.
- Clarkson, D. T. und Hawkesford, M. J. (1993): Molecular biological approaches to plant nutrition. - *Plant and Soil* 155/156, S. 21-31.
- Clarkson, D. T. und Lüttge, U. (1991): II. Mineral nutrition: Inducible and repressible nutrient transport systems. - *Progress in Botany* 52, 61-83.

- Cogliatti, D. H. und Clarkson, D. T. (1983): Physiological changes in, and phosphate uptake by potato plants during development of, and recovery from phosphate deficiency. - *Physiologia Plantarum* 58, S. 287-294.
- Coombes, A. J., Phipps, D. A. und Lepp, N. W. (1977): Uptake patterns of free and complexed copper ions in excised roots of barley (*Hordeum vulgare* L. C.V. *Zephyr*). - *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 82, S. 435-439.
- Cumming, J. R. und Taylor, G. J. (1990): Mechanisms of metal tolerance in plants: Physiological adaptations for exclusion of metal ions from the cytoplasm. - In: *Stress responses in plants: Adaptation and acclimation mechanisms* (Alscher R.G. & Cumming, J.R. eds.). Wiley-Liss. Inc., New York, S. 329-356.
- Cumming, J. R. und Tomsett, A. B. (1992): Metal tolerance in plants: Signal transduction and acclimation mechanisms. In: *Biogeochemistry of trace metals*, Chapter 12 (Adriano, D., ed.). Lewis Publ. Chelsea. MI., S. 329-364.
- Curl, E. A. und Truelove, B. (1986): *The Rhizosphere*. - Springer-Verlag, Berlin.
- Davis, R. D. (1984): Cadmium in sludges used as fertilizer. - *Experientia* 40, S. 117-126.
- de Framond, A. J. (1991): A metallothionein-like gene from maize (*Zea mays*) - cloning and characterization. - *FEBS Letters* 290, S. 103-106.
- Delhaize, E., Randall, P. J., Wallace, P. A. und Pinkerton, A. (1993): Screening *Arabidopsis* for mutants in mineral nutrition. - *Plant and Soil* 155/156, S. 131-134.
- de Miranda, J. R., Thomas, M. A., Thurman, D. A. und Tomsett, A. B. (1990): Metallothionein genes from the flowering plant *Mimulus guttatus*. - *FEBS Letters* 260, S. 277-280.
- de Tapia, M., Dietrich, A. und Burkhard, G. (1987): In vitro synthesis and processing of a bean pathogenesis-related (PR4) protein. - *European Journal of Biochemistry* 166, S. 559-563.
- Didierjean, L., Frendo, P. und Burkhard, G. (1992): Stress responses in maize: Sequence analysis of cDNAs encoding glycine-rich proteins. - *Plant Molecular Biology* 18, S. 847-849.
- Didierjean, L., Frendo, P., Nasser, W., Genot, G. und Marivet, J. (1996): Heavy-metal-responsive genes in maize: identification and comparison of their expression upon various forms of abiotic stress. - *Planta* 199, S. 1-8.
- Douglas, T. J. und Sykes, S. R. (1985): Phospholipid, galactolipid and free sterol composition of fibrous roots from citrus genotypes differing in chloride exclusion ability. - *Plant, Cell and Environment* 8, S. 693-699.
- Ernst, W. H. O., Schat, H. und Verkleij, J. A. C. (1990): Evolutionary biology of metal resistance in *Silene vulgaris*. - *Evolutionary Trends in Plants* 4, S.45-51.
- Evans, K. M., Gatehouse, J. A., Lindsay, W. P., Shi, J., Tommey, A. M. und Robinson, N. J. (1992): Expression of the pea metallothionein-like gene PsMT_A in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace metal ion accumulation: Implications for PsMT_A function. - *Plant Molecular Biology* 20, S. 1019-1028.
- Evans, M., Gatehouse, L. N., Gatehouse, J. A., Robinson, N. J. und Croy, R. R. D. (1990): A gene from pea (*Pisum sativum* L.) with homology to metallothionein genes. - *FEBS Letters* 262, S. 29-32.
- Florijn, P. J. und van Beusichem, M. L. (1993a): Uptake and distribution of cadmium in maize inbred lines. - *Plant and Soil* 150, S. 25-32.
- Florijn, P. J. und van Beusichem, M. L. (1993b): Cadmium distribution in maize inbred lines: Effects of pH and level of Cd supply. - *Plant and Soil* 153, S. 79-84.
- Foley, R. C. und Singh, K. B. (1994): Isolation of a *Vicia faba* metallothionein-like gene: expression in foliar trichomes. - *Plant Molecular Biology* 26, 235-444.
- Fowler, B. A., Hildebrand, C. E., Kojima, Y. und Webb, M. (1987): Nomenclature of Metallothionein. - In: *Metallothionein II* (Kägi, J.H.R. & Kojima, Y., eds.). *Experientia Supplementum* Vol. 52, Birkhäuser Verlag, Basel, S. 19-22.
- Godbold, D. L., Horst, W. J., Collins, J. C., Thurman, D. A. und Marschner, H. (1984): Accumulation of zinc and organic acids in roots of Zn tolerant and nontolerant ecotypes of *Deschampsia caespitosa*. - *Journal of Plant Physiology* 116, S. 59-69.
- Gómez, J., Sánchez-Martínez, D., Stiefel, V., Rigau, J., Puigdomènech, P. und Pagès, M. (1988): A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. - *Nature* 334, S. 262-264.
- Green, D. E., Fry, M. und Blondin, G. A. (1980): Phospholipids as the molecular instruments of ion and solute transport in biological membranes. - *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 77, S. 257-261.
- Griffith, O. W. und Meister, A. (1979): Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (s-n-butyl homocysteine sulfoximine). - *The Journal of Biological Chemistry* 254, S. 7558-7560.
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E.-L. und Zenk, M. M. (1989): Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamyl-cysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). - *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86, S. 6838-6842.
- Grill, E., Winnacker, E.-L. und Zenk, M. H. (1985): Phytochelatins: The principle heavy-metal complexing peptides of higher plants. - *Science* 230, S. 674-676.
- Grill, E., Gekeler, W., Winnacker, E.-L. und Zenk, M. H. (1986): Homo-phytochelatins are heavy metal-binding peptides of homo-glutathione containing Fabales. - *FEBS Letters* 205, S. 47-50.
- Grill, E., Winnacker, E.-L. und Zenk, M. H. (1987): Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. - *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84, 439-443.
- Grusack, M. A. (1994): Iron transport to developing ovules of *Pisum sativum*. I. Seed import characteristics and phloem iron-loading capacity of source regions. - *Plant Physiology* 104, S. 649-655.
- Guiltinan, M. J., Marcotte, W. R. JR. und Quatrano, R. S. (1990): A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. - *Science* 250, S. 267-271.

- Guo, Y. und Marscher, H. (1996): Genotypic differences in uptake and translocation of cadmium in bean and maize inbred lines. - Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde 159, S. 55-60.
- Haase, E. (1988): Pflanzen reinigen Schwermetallböden. - Umwelt 7-8, S. 342-344.
- Hajar, A. R. M. (1987): Comparative ecological studies on *Minuartia verna* (L.) Hiern. and *Thlaspi alpestre* L. in the Southern Pennines, with particular reference to heavy metal tolerance. - Ph.D. thesis, University of Sheffield, Sheffield, U.K.
- Hamer, D. H. (1986): Metallothionein. - Annual Review of Biochemistry 55, S. 913-951.
- Hanley-Bowdoin, L. und Lane, B. G. (1983): A novel protein programmed by the mRNA conserved in dry wheat embryos. The principal site of cysteine incorporation during early germination. - European Journal of Biochemistry 135, S. 9-15.
- Hantke, K. (1981): Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12 - isolation of a constitutive mutant. - Molecular and General Genetics 182, S. 288-292.
- Harms, K., Wöhner, R. V., Schulz, B. und Frommer, W. B. (1994): Isolation and characterization of P-type H⁺-ATPase genes from potato. - Plant Molecular Biology 26, S. 979-988.
- Harper, J. F., Surowy, T. K. und Sussman, M. R. (1989): Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the plasma membrane proton pump (H⁺-ATPase) of *Arabidopsis thaliana*. - Proceedings of the National Academy of Sciences USA 86, S. 1234-1238.
- Hattori, J., Labbé, H. und Miki, B. L. (1994): Construction and expression of a metallothionein- β -glucuronidase gene fusion. - Genome 37, S. 508-512.
- Helal, H. M. und Padeken, K. (1995): Removal of heavy metals from polluted soils by non-food crops. Third International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements. - Symposium, Paris, Abstracts.
- Hether, N. H., Olsen, R. A. und Jackson, L. L. (1984): Chemical identification of iron reductants exuded by plant roots. - Journal of Plant Nutrition 7, S. 667-676.
- Higgins, C. F. (1992): ABC-transporters from microorganisms to man - Review. - Annual Review of Cell Biology 8, S. 67-113.
- Hofmann, T., Kells, D. I. C. und Lane, B. G. (1984): Partial amino acid sequence of the wheat germ E_C-Protein. Comparison with another protein very rich in half-cystine and glycine - wheat germ agglutinin. - Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology 62, S. 908-913.
- Holleman, A. F. und Wiberg, E. (1985): Lehrbuch der anorganischen Chemie. - Walter de Gruyter, Berlin, S. 868.
- Howden, R. und Cobbett, C. S. (1992): Cadmium-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. - Plant Physiology 99, S. 100-107.
- Howden, R., Goldsbrough, P. B., Andersen, C. R. und Cobbett, C. S. (1995): Cadmium-sensitive, cad1 mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. - Plant Physiology 107, S. 1059-1066.
- Irfune, T., Hirano, G., Umehara, Y., Nishizawa, N. und Mori, S. (1991): Partial amino acid sequence of a protein specifically appeared in the Fe-deficient barley roots. - Abstract of the 37th Meeting of Soil Science and Plant Nutrition (Japan), Part II, S. 272.
- Jacobs, F. A., Romeyer, F. M. Beauchemin, M. und Brousseau, R. (1989): Human metallothionein-II is synthesized as a stable membrane-localized fusion protein in *Escherichia coli*. - Gene 83, S. 95-103.
- Jaffré, T., Brooks, R. R., Lee, J. und Reeves, R. D. (1976): *Sebertia accuminata*: A hyperaccumulator of nickel from New Caledonia. - Science 193, S. 579-580.
- Jaffré, T. (1977): Accumulation du manganèse par les espèces associées aux terrains ultrabasiques de Nouvelle Calédonie. - Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, Série D, 284, S. 1573-1575.
- Jaffré, T. (1979): Accumulation du manganèse par les Protéacées de Nouvelle-Calédonie. - Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, Série D, 289, S. 425-428.
- Jaffré, T. (1980): Étude Écologique du Peuplement Végétale des Sols Dérivés de Roches Ultrabasiques en Nouvelle-Calédonie, Travaux et Documents de l'O.R.S.T.O.M., Paris, No. 124, S. 159-200.
- Joshi, R. L. und Joshi, V. (1991): Strategies for expression of foreign genes in plants. - FEBS Letters 281, S. 1-8.
- Jungk, A., Asher, C. J., Edwards, D. G. und Meyer, D. (1990): Influence of phosphate status on phosphate uptake kinetics of maize (*Zea mays*) and soybean (*Glycine max.*). - Plant and Soil 124, S. 175-182.
- Kägi, J. H. R. und Vallee, B. L. (1961): Metallothionein: a cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex. - The Journal of Biological Chemistry 236, S. 2435-2442.
- Kägi, J. H. R. und Kojima, Y. (1987): Chemistry and biochemistry of metallothionein. - In: Metallothionein II (Kägi, J. H. R. & Kojima, Y., eds.), Birkhäuser Verlag, Basel, Experientia Supplement 52, S. 25-61.
- Kägi, J. H. R. (1991): Overview of metallothionein. - Methods in Enzymology 205, S. 613-626.
- Kampfenkel, K., Kushnir, S., Babiychuk, E., Inzé, D. und Van Montagu, M. (1995): Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. - The Journal of Biological Chemistry 270, S. 28479-28486.
- Kanamaru, K., Kashiwagi, S. und Mizuno, T. (1994): A copper-transporting P-type ATPase found in the thylakoid membrane of the cyanobacterium *Synechococcus* species PCC7942. - Molecular Microbiology 13, S. 369-377.
- Kan, J. A. L., Cornelissen, B. J. C. und Bol, J. F. (1988): A virus-inducible tobacco gene encoding a glycine-rich protein shares putative elements with the ribulose biphosphate carboxylase small subunit gene. - Molecular Plant-Microbe Interactions 1, S. 107-112.
- Karin, M. und Richards, R. I. (1982): Human metallothionein genes - primary structure of the metallothionein-II gene and a related processed gene. - Nature 299, S. 797-802.
- Kawashima, I., Inokuchi, Y., Chino, M., Kimura, M. und Shimizu, N. (1991): Isolation of a gene for a metallothionein-like protein from soybean. - Plant and Cell Physiology 32, S. 913-916.

- Kawashima, I., Kennedy, T. D., Chino, M. und Lane, B. G. (1992): Wheat E_C metallothionein genes: Like mammalian Zn^{2+} metallothionein genes, wheat Zn^{2+} metallothionein genes are conspicuously expressed during embryogenesis. - *European Journal of Biochemistry* 209, S. 971-976.
- Keller, B., Sauer, N. und Lamb, C. J. (1988): Glycine-rich cell wall proteins in bean: gene structure and association of the protein with the vascular system. - *The EMBO Journal* 7, S. 3625-3633.
- Kille, P., Winge, D. R., Harwood, J. L. und Kay, J. (1991): A plant metallothionein produced in *E. coli*. - *FEBS Letters* 295, S. 171-175.
- Klapheck, S., Chrost, B., Starke, J. und Zimmermann, H. (1992): γ -Glutamylcysteinylserine - a new homologue of glutathione in plants of the family Poaceae. - *Botanica Acta* 105, S. 174-179.
- Klemsdal, S. S., Hughes, W., Lönneborg, A., Aalen, R. B. und Olsen, O.-A. (1991): Primary structure of a novel barley gene differentially expressed in immature aleurone layers. - *Molecular and General Genetics* 228, S. 9-16.
- Kneen, B. E., LaRue, T. A., Welch, R. M. und Weeden, N. F. (1990): Pleiotropic effects of *brz*: A mutation of *Pisum sativum* (L.) cv „sparkle“ conditioning decreased nodulation and increased iron uptake and leaf necrosis. - *Plant Physiology* 93, S. 717-722.
- Kojima, Y. und Kägi, J. H. R. (1978): Metallothionein. - *Trends in Biochemical Science* 3, S. 90-92;
- Kondo, N., Imai, K., Isobe, M., Goto, T., Murasugi, A., Wada-Nakagawa, C. und Hayashi, Y. (1984): Cadystin-A and B, major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced in fission yeast - separation, revision of structures and synthesis. - *Tetrahedron Letters* 25, S. 3869-3872.
- Körner, L. E., Kjellbom, P., Larsson, C. und Möller, I. M. (1985): Surface properties of right side-out plasma membrane vesicles isolated from barley roots and leaves. - *Plant Physiology* 79, S. 72-79.
- Landsberg, E.-C. (1986): Function of rhizodermal transfer cells in the Fe stress response mechanism of *Capsicum annum* L. - *Plant Physiology* 82, S. 511-517.
- Lane, B., Kajioka, R. und Kennedy, T. (1987): The wheat germ E_C protein is a zinc-containing metallothionein. - *Biochemistry and Cell Biology* 65, 1001-1005.
- Lane, S. D., Martin, E. S. und Garrod, J. F. (1978): Lead toxicity effects on indole-3-Y-acetic acid-induced cell elongation. - *Planta* 144, S. 79-84.
- Larkin, P. J. und Scowcroft, W. R. (1981): Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. - *Theoretical and Applied Genetics* 60, S. 197-214.
- Ledger, S. E. und Gardner, R. C. (1994): Cloning and characterization of five cDNAs for genes differentially expressed during fruit development of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*). - *Plant Molecular Biology* 25, S. 877-886.
- Lee, J., Reeves, R. D., Brooks, R. R. und Jaffré, T. (1977): Isolation and identification of a citrato-complex of nickel from nickel-accumulating plants. - *Phytochemistry* 16, S. 1503-1505.
- Lefebvre, D. D., Miki, B. L. und Laliberté, J.-F. (1987): Mammalian metallothionein functions in plants. - *Bio/Technology* 5, S. 1053-1056.
- Lerch, K. (1980): Copper metallothionein, a copper-binding protein from *Neurospora crassa*. - *Nature* 284, S. 368-370.
- Levitt, J. (1980): Responses of plants to environmental stresses, Vol. 2, 2nd ed., Academic Press, New York.
- Linthorst, H. J. M. (1991): Pathogenesis-related proteins of plants. - *Critical Reviews in Plant Sciences* 10, S. 123-150.
- Lippard, S. J. und Berg, J. M. (1995): *Bioanorganische Chemie*. - Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Lolkema, P. C., Donker, M. H., Schouten, A. J. und Ernst, W. H. O. (1984): The possible role of metallothioneins in copper tolerance of *Silene cucubalus*. - *Planta* 162, S. 174-179.
- Lolkema, P. C., Doornhof, M. und Ernst, W. H. O. (1986): Interaction between a copper-tolerant and a copper-sensitive population of *Silene cucubalus*. - *Physiologia Plantarum* 67, S. 654-658.
- Lolkema, P. C. und Vooijs, R. (1986): Copper tolerance in *Silene cucubalus*. Subcellular distribution of copper and its effects on chloroplasts and plastocyanin synthesis. - *Planta* 167, S. 30-36.
- Ludevid, M. D., Freire, M. A., Gomez, J., Burd, C. G., Albericio, F., Giralt, E., Dreyfuss, G. und Pagès, M. (1992): RNA binding characteristics of a 16 kDa glycine-rich protein from maize. - *The Plant Journal* 2, S. 999-1003.
- Lyon, G. L., Peterson, P. J. und Brooks, R. R. (1969): Chromium-51 distribution in tissues and extracts of *Leptospermum scoparium*. - *Planta* 88, S. 282-287.
- Macnair, M. R. (1993): The genetics of metal tolerance in vascular plants, *Tansley Review No. 49*. - *New Phytologist* 124, S. 541-559.
- Macnair, M. R., Cumbes, Q. J. und Meharg, A. A. (1992): The genetics of arsenate tolerance in Yorkshire fog *Holcus lanatus*. - *Heredity* 69, 325-335.
- Maiti, I. B., Hunt, A. G. und Wagner, G. J. (1988): Seed-transmissible expression of mammalian metallothionein in transgenic tobacco. - *Biochemical and Biophysical Research Communications* 150, S. 640-647.
- Maiti, I. B., Wagner, G. J. und Hunt, A. G. (1991): Light inducible and tissue-specific expression of a chimeric mouse metallothionein cDNA gene in tobacco. - *Plant Science* 76, S. 99-107.
- Maiti, I. B., Wagner, G. J., Yeargan, R. und Hunt, A. G. (1989): Inheritance and expression of the mouse metallothionein gene in tobacco. Impact on Cd tolerance and tissue Cd distribution in seedlings. - *Plant Physiology* 91, S. 1020-1024.
- Malaisse, F. und Grégoire, J. (1978): Contribution à la phytogéochimie de la Mine de l'Étoile (Shaba, Zaire). *Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique* 111, S. 252-260.
- Malaisse, F., Grégoire, J., Morrison, R. S., Brooks, R. R. und Reeves, R. D. (1979): Copper and cobalt in vegetation of Fungurume, Shaba Province, Zaire. - *Oikos* 33, S. 472-478.
- Malone, C., Koeppe, D. E. und Miller, R. J. (1974): Localisation of lead accumulated by corn plants. - *Plant*

Physiology 53, S. 388-394.

Margoshes, M. und Vallee, B. L. (1957): A cadmium protein from equine kidney cortex. - Journal of the American Chemical Society 79, S. 4813-4814.

Marré, M. T., Romani, G. und Marré, E. (1983): Transmembrane hyperpolarization and increase of K⁺ uptake in maize roots treated with permeant weak acids. - Plant, Cell and Environment 6, S. 617 - 623.

Marschner, H. (1995): Mineral nutrition of higher plants. First Edition: 1986, Second Edition: 1988, Academic Press, New York.

Martell, E. A. (1974): Radioactivity of tobacco trichomes and insoluble cigarette smoke particles. - Nature 249, 215-217.

Martens, S. N. und Boyd, R. S. (1994): The ecological significance of nickel hyperaccumulation: a plant chemical defense. - Oecologia 98, S. 379-384.

Mathys, W. (1973): Vergleichende Untersuchungen der Zinkaufnahme von resistenten und sensitiven Populationen von *Agrostis tenuis* Sibth. - Flora 162, S. 492-499.

Mathys, W. (1975): Enzymes of heavy-metal-resistant and non-resistant populations of *Silene cucubalus* and their interaction with some heavy metals in vitro and in vivo. - Physiologia Plantarum 33, S. 161-165.

Mathys, W. (1977): The role of malate, oxalate, and mustard oil glucosides in the evolution of zinc-resistance in herbage plants. - Physiologia Plantarum 40, S. 130-136.

Matsumoto, H., Yamamoto, Y. und Kasai, M. (1992): Changes of some properties of the plasma membrane-enriched fraction of barley roots related to aluminum stress: Membrane-associated ATPase, aluminum and calcium. - Soil Science and Plant Nutrition 38, S. 411-419.

Meagher, R. B., Rugh, C., Wilde, D., Wallace, M., Merkle, S. und Summers, A. O. (1995): Abstract of the 14th Annual Symposium: Current Topics of Plant Biochemistry, Physiology and Molecular Biology, University of Missouri, S. 29-30.

Meharg, A. A. und Macnair, M. R. (1990): An altered phosphate uptake system in arsenate-tolerant *Holcus lanatus* L. - New Phytologist 116, S. 29-35.

Meharg, A. A. und Macnair, M. R. (1992): Suppression of the high affinity phosphate uptake system: A mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. - Journal of Experimental Botany 43, S. 519-524.

Meuwly, P., Thibault, P. und Rauser, W. E. (1993): γ -Glutamylcysteinylglutamic acid - a new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium. - FEBS Letters 336, S. 472-476.

Mihashi, S. und Mori, S. (1989): Characterization of mugenic acid-Fe transporter in Fe-deficient barley roots using the multi-compartment transport box method. - Biology of Metals 2, S. 146-154.

Misra, S. und Gedamu, L. (1989): Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* L. and *Nicotiana tabacum* L. plants. - Theoretical and Applied Genetics 78, S. 161-168.

Morgutti, S., Sacchi, G. A. und Cocucci, S. M. (1984): Effects of Ni²⁺ on proton extrusion, dark CO₂ fixation and malate synthesis in maize roots. - Physiologia Plantarum 60, S. 70-74.

Mori, S. und Nishizawa, N. (1987): Methionine as a dominant precursor of phytosiderophores in Gramineae plants. - Plant and Cell Physiology 28, S. 1081-1092.

Mundy, J., Yamaguchi-Shinozaki, K. und Chua, N.-H. (1990): Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice rab gene. - Proceedings of the National Academy of Sciences USA 87, S. 1406-1410.

Murphy, A. und Taiz, L. (1995): Comparison of Metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten Arabidopsis ecotypes. Correlation with copper tolerance. - Plant Physiology 109, S. 945-954.

Nakanishi, H., Okumura, N., Umehara, Y., Nishizawa, N.-K., Chino, M. und Mori, S. (1993): Expression of a gene specific for iron deficiency (*ids3*) in the roots of *Hordeum vulgare*. - Plant and Cell Physiology 34, S. 401-410.

Nies, D. H. und Silver, S. (1989): Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. Journal of Bacteriology 171, S. 896-900.

Obata, H., Inoue, N. und Umehayashi, M. (1996): Effect of Cd on Plasma membrane ATPase from plant roots differing in tolerance to Cd. - Soil Science and Plant Nutrition 42, S. 361-366.

Okumura, N., Nishizawa, N.-K., Umehara, Y. und Mori, S. (1991): An iron deficiency-specific cDNA from barley roots having two homologous cysteine-rich MT domains. - Plant Molecular Biology 17, S. 531-533.

Oliveira, D. E., Seurinck, J., Inzé, D., van Montagu, M. und Botterman, J. (1990): Differential expression of five Arabidopsis genes encoding glycine-rich proteins. - The Plant Cell 2, S 427-436.

Ortiz, D. F., Kreppel, L., Speiser, D. M., Scheel, G., McDonald, G. und Ow, D. W. (1992): Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. - The EMBO Journal 11, S. 3491-3499.

Ortiz, D. F., Ruscitti, T., McCue, K. F. und Ow, D. W. (1995): Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. - The Journal of Biological Chemistry 270, S. 4721-4728.

Ow, D. W. (1996): Heavy metal tolerance genes: prospective tools for bioremediation. - Resources, Conservation and Recycling 18, S. 135-149.

Palmiter, R. D. (1987): Molecular Biology of metallothionein gene expression. In: Metallothionein II (Kägi, J.H.R. & Kojima, Y., eds.). Experimentia Supplementum Vol. 52, Birkhäuser Verlag, Basel, S. 63-80.

Pan, A., Yang, M., Tie, F., Li, L., Chen, Z. und Ru, B. (1994): Expression of mouse metallothionein-I gene confers cadmium resistance in transgenic tobacco plants. - Plant Molecular Biology 24, S. 341-351.

Panaretou, B. und Piper, P. W. (1992): The plasma membrane of yeast acquires a novel heat-shock protein (*hsp30*) and displays a decline in proton-pumping ATPase levels in response to both heat shock and the entry to stationary phase. - European Journal of Biochemistry 206, S. 635-640.

- Patel, P. M., Wallace, A. und Alexander, G. V. (1980): Transfer values to fruits of Li in tomato and Cd in bush beans. - *Journal of Plant Nutrition* 2, S. 87-91
- Pollard, A. J. (1992): The importance of deterrence: Responses of grazing animals to plant variation. - In: *Plant Resistance to herbivores and pathogens*, (Fritz, R.S., Simms, E.L. eds.). University of Chicago Press, Chicago, IL, USA, S. 216-239.
- Pollard, A. J. und Baker, A. J. M. (1997): Deterrence of herbivory by zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae). - *New Phytologist* 135, S. 655-658.
- Przemek, E. und Haase, N. U. (1991): On the bonding of manganese, copper and cadmium to peptides of the xylem sap of plant roots. - *Water, Air and Soil Pollution* 57-58, S. 569-577.
- Pulido, P., Kägi, J. H. R. und Vallee, B. L. (1966): Isolation and some properties of human metallothionein. - *Biochemistry* 5, S. 1768-1777.
- Pythoud, F., Sinkar, V. P., Nester, E. W. und Gordon, M. P. (1987): Increased virulence of *Agrobacterium rhizogenes* conferred by the vir region of PTIB 0542 - Application to genetic engineering of poplar. - *Bio/technology* 5, S. 1323-1327.
- Raskin, I. (1996): Plant genetic engineering may help with environmental cleanup. - *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, S. 3164-3166.
- Raskin, I., Nanda Kumar, P. B. A., Dushenkov, S. und Salt, D. E. (1994): Bioconcentration of heavy metals by plants. - *Current Opinion in Biotechnology* 5, S. 285-290.
- Rausser, W. E. (1990): Phytochelatins. - *Annual Review of Biochemistry* 59, S. 61-86.
- Rausser, W. E. (1984): Isolation and partial purification of cadmium-binding protein from roots of the grass *Agrostis gigantea*. - *Plant Physiology* 74, S. 1025-1029.
- Reeves, R. D. und Brooks, R. R. (1983a): European species of *Thlaspi* L. (*Cruciferae*) as indicators of nickel and zinc. - *Journal of Geochemical Exploration* 18, S. 275-283.
- Reeves, R. D. und Brooks, R. R. (1983b): Hyperaccumulation of lead and zinc by two metallophytes from mining areas in central Europe. - *Environmental Pollution (Series A)* 31, S. 277-285.
- Reeves, R. D., MacFarlane, R. M. und Brooks, R. R. (1983c): Accumulation of nickel and zinc by western North American genera containing serpentine-tolerant species. - *American Journal of Botany* 70, S. 1297-1303.
- Reilly, C. (1969): The uptake and accumulation of copper by *Becium homblei* (De Wild.) Duvig. & Plancke. - *New Phytologist* 68, S. 1081-1087.
- Riesmeier, J. W., Willmitzer, L. und Frommer, W. B. (1992): Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. - *The EMBO Journal* 11, S. 4705-4713.
- Riordan, J. F. und Vallee, B. L. (1991): Metallobiochemistry Part B, metallothionein and related molecules. - *Methods in Enzymology* Vol. 205, Academic Press Inc., San Diego.
- Robinson, N. J. (1990): Metal binding polypeptides in plants. - In: *Heavy metal tolerance in plants* (Shaw, A.J. ed.). CRC Press, Inc. Boca Raton, S. 195-214.
- Robinson, N. J., Evans, I. M., Mulcrone, J., Bryden, J. und Tommey, A. M. (1992): Genes with similarity to metallothionein genes and copper, zinc ligands in *Pisum sativum* L. - *Plant and Soil* 146, S. 291-298.
- Robinson, N. J., Tommey, A. M., Kuske, C. und Jackson, P. J. (1993): Plant metallothioneins. - *Biochemical Journal* 295, S. 1-10.
- Robinson, N. J., Urwin, P. E., Robinson, P. J. und Jackson, P. J. (1994): Gene expression in relation to metal toxicity and tolerance. - In: *Stress-induced gene expression in plants*, Chapter 9 (Amarjit Singh Basra ed.). Harwood Academic Publishers, Chur, S. 209-248.
- Robinson, N. J., Wilson, J. R. und Turner, J. S. (1996): Expression of the type 2 metallothionein-like MT2 from *Arabidopsis thaliana* in Zn²⁺-metallothionein-deficient *Synechococcus* PCC 7942: putative role for MT2 in Zn²⁺ metabolism. - *Plant Molecular Biology* 30, S. 1169-1179.
- Rochester, D. E., Winer, J. A. und Schah, D. M. (1986): The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, hsp 70. - *The EMBO Journal* 5, S. 451-458.
- Rohde, W., Rosch, K., Kröger, K. und Salamini, F. (1990): Nucleotide sequence of a *Hordeum vulgare* gene encoding a glycine-rich protein with homology to vertebrate cytokeratins. - *Plant Molecular Biology* 14, S. 1057-1059.
- Romeyer, F. M., Jacobs, F. A., Masson, L., Hanna, Z. und Brousseau, R. (1988): Bioaccumulation of heavy metals in *Escherichia coli* expressing an inducible synthetic human metallothionein gene. - *Journal of Biotechnology* 8, S. 207-220.
- Römheld, V., Müller, C. und Marschner, H. (1984): Localization and capacity of proton pumps in roots of intact sunflower plants. - *Plant Physiology* 76, S. 603-606.
- Römheld, V. (1987): Different strategies for iron acquisition in higher plants. - *Physiologia Plantarum* 70, S. 231-234.
- Römheld, V. und Marschner, H. (1986): Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. - *Advances in Plant Nutrition* 2, S. 155-204.
- Ros, R., Cooke, D. T., Martinez-Cortina, C. und Picazo, I. (1992): Nickel and cadmium-related changes in growth, plasma membrane lipid composition, ATPase hydrolytic activity and proton-pumping of rice (*Oryza sativa* L. cv. *Bahia*) shoots. - *Journal of Experimental Botany* 43, S. 1475-1481.
- Rugh, C. L., Wilde, H. D., Stack, N. M., Thompson, D. M., Summers, A. O. und Meagher, R. B. (1996): Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial merA gene. - *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, S. 3182-3187.
- Salt, D. E. und Wagner, G. J. (1993): Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a Cd²⁺/H⁺-antiport activity. - *The Journal of Biological Chemistry* 268, S. 12297-12302.
- Salt, D. E., Prince, R. C., Pickering, I. J. und Raskin, I. (1995): Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian Mustard. - *Plant Physiology* 109, S. 1427-1433.
- Salt, D. E. und Rausser, W. E. (1995): MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. - *Plant Physiology* 107, S. 1293-1301.
- Scholz, G. (1983): The amino acid nicotianamine, an effector

- of root elongation for the tomato mutant chloronerva (*Lycopersicon esculentum* Mill.). - *Plant Science Letters* 32, S. 327-332.
- Scholz, G. (1989): Effect of nicotianamine on iron re-mobilisation in de-rooted tomato seedlings. - *Biology of Metals* 2, S. 89-91.
- Seaward, M. R. D. und Richardson, D. H. S. (1990): Atmospheric sources of metal pollution and effects on vegetation. - In: *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*, Chapter 6 (Shaw, A.J., ed.). CRC Press, Boca Raton, S. 75-92.
- Senden, M. H. M. N., Van Paassen F. J. M., Van Der Meer, A. J. G. M. und Wolterbeek, H. Th. (1992): Cadmium - citric acid - xylem cell wall interactions in tomato plants. - *Plant, Cell and Environment* 15, S. 71-79.
- Shojima, S., Nishizawa, N.-K., Fushiya, S., Nozoe, S., Irfune, T. und Mori, S. (1990): Biosynthesis of Phytosiderophores. In-vitro biosynthesis of 2'-deoxymugineic acid from L-methionine and nicotianamine. - *Plant Physiology* 93, S. 1497-1503.
- Silver, S. und Misra, T. K. (1988): Plasmid-mediated heavy metal resistances. - *Annual Review of Microbiology* 42, S. 717-743.
- Sinkar, V. P., White, F. F. und Gordon, M. P. (1987): Molecular biology of Ri-Plasmid - A review. - *Journal of Bio-science* 11, S. 47-57.
- Steffens, J. C. (1990): The heavy metal-binding peptides of plants. - *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41, S. 553-575.
- Stephan, U. W. und Grün, M. (1989): Physiological disorders of the nicotianamine-auxotroph tomato mutant chloronerva at different levels of iron nutrition. II. Iron deficiency response and heavy metal metabolism. - *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 185, S. 189-200.
- Stephan, U. W. und Scholz, G. (1993): Nicotianamine: mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem? - *Physiologia Plantarum* 88, S. 522-529.
- Strobel, G. A., Nachmias, A. und Hess, W. M. (1988): Improvements in the growth and yield of olive trees by transformation with the Ri Plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. - *Canadian Journal of Botany* 66, S. 2581-2585.
- Takagi, S., Nomoto, K. und Takemoto, T. (1984): Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. - *Journal of Plant Nutrition* 7, S. 469-477.
- Takagi, S. (1976): Naturally occurring iron-chelating compounds in oat- and rice-root washings. - I. Activity measurement and preliminary characterization. - *Soil Science and Plant Nutrition* 22, S. 423-433.
- Takahashi, K., Kawashima, I. und Chino, M. (1991): Cloning of MT-like gene in *Arabidopsis*. - *Proceedings of the Annual Meeting and 31st Symposium, Japanese Society of Plant Physiologists, Okayama*, S. 263.
- Taylor, G. J. (1987): Exclusion of metals from the symplasm: a possible mechanism of metal tolerance in higher plants. *Journal of Plant Nutrition* 10, S. 1213-1222.
- Taylor, G. J. und Foy, C. D. (1985): Differential uptake and toxicity of ionic and chelated copper in *Triticum aestivum*. - *Canadian Journal of Botany* 63, S. 1271-1275.
- Thibaud, J.-B., Romieu, C., Gibrat, R., Grouzis, J.-P. und Grignon, C. (1984): Local ionic environment of plant membranes: Effects on membrane functions. - *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 114, S. 207-213.
- Thompson, G. A. JR. (1985): Mechanisms of membrane response to environmental stress. In: *Frontiers of membrane research* (St. John, J.B., Berlin, E., Jackson, P.C., eds.). Rowman and Allanheld, Totowa, New Jersey, S. 347-357.
- Tommey, A. M., Shi, J., Lindsay, W. P., Urwin, P. E. und Jackson, N. J. (1991): Expression of the pea gene PsMT_A in *E. coli*. Metal-binding properties of the expressed protein. - *FEBS Letters* 292, S. 48-52.
- Tomsett, A. B., Salt, D. E., de Miranda, J. und Thurman, D. A. (1989): Metallothioneins and metal tolerance. - *Aspects of Applied Biology* 22, S. 365-372.
- Torii, K. und Laties, G. H. (1966): Organic acid synthesis in response to excess cation absorption in vacuolate and non-vacuolate sections of corn and barley roots. - *Plant and Cell Physiology* 7, S. 395-403.
- Turner, R. G. (1970): The subcellular distribution of zinc and copper within the roots of metal-tolerant clones of *Agrostis tenuis Sibth.* - *New Phytologist* 69, S. 725-731.
- Turner, R. G. und Marshall, C. (1971): The accumulation of 65Zn by root homogenates of zinc-tolerant and non-tolerant clones of *Agrostis tenuis Sibth.* - *New Phytologist* 70, S. 539-545.
- Turner, R. G. und Marshall, C. (1972): The accumulation of zinc by subcellular fractions of roots of *Agrostis tenuis Sibth* in relation to zinc tolerance. - *New Phytologist* 71, S. 671-676.
- Utsunomiya, T. (1980): Japanese Patent Application No: 55-72959, Kokai, S. 57-190.
- van Steveninck, R. F. M., Van Steveninck, M. E., Fernando, D. R., Horst, W. J., Marschner, H. (1987): Deposition of zinc phytate in globular bodies in roots of *Deschampsia caespitosa* ecotypes; a detoxification mechanism? - *Journal of Plant Physiology* 131, S. 247-257.
- Verkleij, J. A. C. und Prast, J. E. (1989): Cadmium tolerance and co-tolerance in *Silene vulgaris* (Moench.) Garcke [= *S. cucubalus* (L.) Wib.], *New Phytologist* 111, S. 637-645.
- Verkleij, J. A. C. und Schat, H. (1990): Mechanisms of metal tolerance in higher plants. - In: *Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects*, Chapter 12 (Shaw, A.J., ed.). CRC-Press, Inc. Boca Raton, Florida, S. 179-193.
- Vögeli-Lange, R. und Wagner, G. J. (1990): Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves: Implication of a transport function for Cd-binding peptides. - *Plant Physiology* 92, S. 1086-1093.
- Wagner, G. J. (1984): Characterization of a Cadmium-binding complex of cabbage leaves. - *Plant Physiology* 76, S. 797-805.
- Wagner, G. J., Sutton, T. G. und Yeagan, R. (1988): Root control of leaf cadmium accumulation in tobacco. - *Tobacco Science* 190, S. 64-68.
- Wann, E. V. und Hills, W. A. (1973): The genetics of boron and iron transport in the tomato. - *Journal of Heredity* 64, S. 370-371.

- Welch, R. M. und LaRue, T. A. (1990): Physiological characteristics of Fe accumulation in the 'bronze' mutant of *Pisum sativum* L., cv 'sparkle E 107' (brz brz). - *Plant Physiology* 93, S. 723-729.
- Wild, H. (1974): Indigenous plants and chromium in Rhodesia. - *Kirkia* 9, S. 233-241.
- Winter, J., Wright, R., Duck, N., Gasser, C., Fraley, R. und Shah, D. (1988): The inhibition of petunia hsp70 mRNA processing during CdCl₂ stress. - *Molecular and General Genetics* 211, S. 315-319.
- Wollgiehn, R. und Neumann, D. (1995): Stress response of tomato cell cultures to toxic metals and heat shock: Differences and similarities. - *Journal of Plant Physiology* 146, S. 736-742.
- Xu, S. und Patterson, G. (1985): The biochemical effects of cadmium on sterol biosynthesis by soybean suspension culture. - *Current Topics of Plant Biochemistry and Physiology* 4, S. 245.
- Yeagan, R., Maiti, I.B., Nielsen, M. T., Hunt, A. G. und Wagner, G. J. (1992): Tissue partitioning of cadmium in transgenic tobacco seedlings and field grown plants expressing the mouse metallothionein I gene. - *Transgenic Research* 1, S. 261-267.
- Zenk, M. H. (1996): Heavy metal detoxification in higher plants - a review. - *Gene* 179, S. 21-30.
- Zeng, J., Heuchel, R., Schaffner, W. und Kägi, J. H. R. (1991a): Thionein (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by zinc finger containing factor Sp1. - *FEBS Letters* 279, S. 310-312.
- Zeng, J., Vallee, B. L. und Kägi, J. H. R. (1991b): Zinc transfer from transcription factor IIIa fingers to thionein clusters. - *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88, S. 9984-9988.
- Zhou, J. und Goldsbrough, P. B. (1994): Functional homologs of fungal metallothionein genes from Arabidopsis. - *The Plant Cell* 6, S. 875-884.

Verfasser: Maywald, Friedhelm, Dr. rer. nat., Institut für Produktions- und Ökotoxikologie der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Leiter: Dir. u. Prof. Dr. rer. nat. habil. Hans Joachim Weigel.