

Fitoşelatinler ve Metallothioneinler: Moleküler Yaklaşımlar

Mustafa Yıldız, Süleyman Cencki ve Hakan Terzi

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 03200, Afyonkarahisar
e-posta: mustafa_yildizus@yahoo.com, scencki@aku.edu.tr ve biyolokum@yahoo.com

Geliş Tarihi:09 Şubat 2012; Kabul Tarihi: 21 Mart 2012

Özet

Anahtar kelimeler

Bitkiler;
Ağır metal stresi;
Fitoşelatinler;
Metallothioneinler;
Detoksifikasyon;
Tolerans

Fitoşelatinler (PC'ler) ve metallothioneinler (MT'ler), bitkilerde ve diğer organizmalarda bulunan sisteince zengin proteinlerdir. PC'ler enzimatik olarak fitoşelatin sentaz (PCS) ile glutatyondan sentezlenirken, MT'ler ise gen ürünü polipeptitlerdir. Bitkilerde, PC'ler ve MT'lerin metal iyonlarını bağlayabildiklerinden dolayı ağır metal toleransı ve homeostazisinde fonksiyon gördükleri ileri sürülmüştür. PC sentaz enzimi ve MT'leri kodlayan genler bitkilerde ve diğer organizmalarda teşhis edilmiştir. PC'ler ve MT'ler ile ilgili genlerin genetik düzenlenmesi, bitkilerde ağır metal toleransının geliştirilmesi için oldukça önemlidir. Bu derlemede, PC'ler ve MT'lerin biyosentezi ve ağır metal stresi koşullarında ifadesi, düzenlenmesi ve muhtemel fonksiyonları hakkında son gelişmeler tartışılmıştır.

Phytochelatin and Metallothioneins: Molecular Approaches

Abstract

Key words

Plants;
Heavy metal stress;
Phytochelatin;
Metallothioneins;
Detoxification;
Tolerance

Phytochelatin (PCs) and metallothioneins (MTs) are cysteine-rich proteins present in plants and other organisms. PCs are enzymatically synthesized from glutathione by PC synthase (PCS), whereas MTs are gene-encoded polypeptides. In plants, PCs and MTs are suggested to be involved in heavy metal tolerance or homeostasis, as they are able to bind metal ions. The genes encoding the enzyme PC synthase and MTs have been identified in plants and other organisms. Genetic manipulation of PCs and MTs related genes is crucial for developing heavy metal tolerance in plants. In this review, the recent advances in biosynthesis of PCs and MTs and their expression, regulation and possible functions under heavy metal stress are discussed.

© Afyon Kocatepe Üniversitesi

1. Giriş

Dünyanın birçok bölgesinde tarımsal alanlar Cd, Cu, Zn, Ni, Co, Cr ve Pb gibi ağır metal kirliliğine maruz kalmaktadır. Sulamada atık suların aşırı kullanımı, madencilik, pestisit kullanımı, arıtma çamuru, egzoz gazları ve endüstriyel gelişim bu metal iyonlarının önemli miktarlarda toprakta birikmesine neden olmaktadır (Li et al., 2009; Yang et al., 2009a). Organik kirleticilerin aksine ağır metaller toprakta parçalanmamaktadır (Wu et al., 2010). Birçok metalin topraktaki yüksek seviyeleri toprak kalitesinin bozulmasına, ürün kaybı ve kalitesinde azalmaya neden olarak ekosisteme zarar verebilmektedir (Blaylock and Huang, 2000). Bitkiler, topraktaki yüksek metal konsantrasyonlarına uyum sağlayabilmek için birçok mekanizma geliştirmişlerdir. Son yıllarda,

ağır metaller ile bitkiler arasındaki etkileşimlerin fizyolojik, moleküler ve genetik temelleri büyük ilgi çekmiştir. Fitoşelatinler (PC'ler), metallothioneinler (MT'ler), sıcaklık şoku proteinleri (HSP), glutasyon metabolizmasının proteinleri ve antioksidant enzimler gibi ağır metal teşvikli gen ve proteinlerin teşhisi ve fonksiyonel analizleri bitkilerde ağır metal toleransının mekanizmaları hakkında önemli bilgiler sağlamıştır (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Clemens, 2006). Bununla birlikte, bitkilerde PC'ler ve MT'lerin sistein kalıntılarındaki tiyol grupları ile metal iyonlarını bağlayabildiklerinden dolayı metal toleransı ve homeostazisinde fonksiyon gördükleri ileri sürülmüştür (Cobbett and Goldsbrough, 2002).

Fitoşelatinler (γ -Glu-Cys) n -Gly genel yapısına sahip küçük metal bağlayıcı peptitler olup; mantar, bitki ve diğer organizmalarda bulunmaktadır

(Cobbett and Goldsbrough, 2002). PC'ler birçok ağır metal tarafından aktive olan fitoşelatin sentaz (PCS) enzimi ile indirgenmiş glutatyondan (GSH) sentezlenmektedir (Clemens and Peršoh, 2009). PC'ler sistein sülfidril grupları aracılığıyla ağır metaller ile kompleksler oluşturmakta ve bu PC-metal kompleksleri vakuollere taşınmaktadır (Cobbett and Goldsbrough, 2002). Birçok çalışmada, PC'lerin bitkilerdeki metal ve metalloid toleransında önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Iglesia-Turiño et al., 2006; Guo et al., 2008). Zıt olarak, *Thlaspi caerulescens*, *Silene vulgaris*, *Salix viminalis* ve *Pteris vittata* gibi birkaç bitki türünün ağır metallere toleranslı genotiplerine göre hassas genotiplerinin daha yüksek PC seviyelerine sahip olmasından dolayı metal toleransı ve PC'lerin birikimi arasında korelasyon belirlenmemiştir (Ebbs et al., 2002; Arnetoli et al., 2008). Bununla birlikte, PC'lerin metal ve metalloidlerin detoksifikasyonu ile ilişkili olmasına rağmen, PC'ler için yeni fonksiyonlar ileri sürülmüştür. PC'lerin genellikle floemde Cd'un uzun mesafeli taşınımında (Mendoza-Cozatl et al., 2008) ve çinkonun içsel olarak alıkonulmasında (Tennstedt et al., 2009) fonksiyon gördüğü bildirilmiştir.

Metallothioneinler düşük moleküler ağırlıklı (4-14 kDa), sisteince zengin metal bağlayıcı bir protein ailesidir (Cobbett and Goldsbrough, 2002). MT'ler sistein kalıntılarının düzenlenişine göre üç sınıfa ayrılmaktadır. Bitki MT'lerinin çoğu sisteince zengin iki küçük işlevsel bölgeye sahip sınıf II metallothioneinlerdir ve sistein kalıntılarının pozisyonuna göre dört tipe ayrılmaktadır (Usha et al., 2009). Tip 1, 2 ve 3 MT'lerin Cu homeostazisi ve toleransında (Roosens et al., 2004; Guo et al., 2008), tip 4 MT'lerin ise Zn homeostazisinde fonksiyon gördüğü ileri sürülmüştür (Guo et al., 2008). Bununla birlikte, tüm MT'lerin esansiyel olmayan çeşitli metal iyonlarını bağlayabildiği belirtilmiştir (Cobbett and Goldsbrough, 2002). Bu nedenle, bitki MT'lerinin esansiyel metal homeostazisine ek olarak esansiyel olmayan metallerin detoksifikasyonunda fonksiyon gördüğü ileri sürülmüştür (Merrifield et al., 2006; Guo et al., 2008). Sınıf II MT'lerde, sistein kalıntıları tüm protein dizisinde dağınık olarak bulunmaktadır.

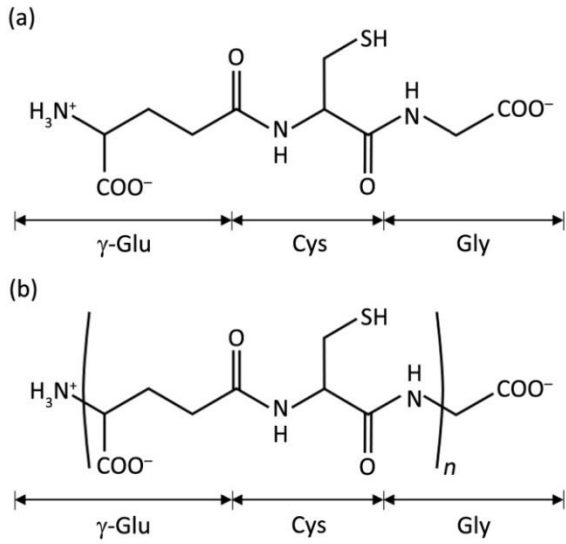
Sınıf III MT'ler ise sınıf I ve II MT'lerden belirgin şekilde farklılık göstermektedir. Sınıf III MT'ler enzimatik olarak sentezlenen fitoşelatinlerdir (Robinson et al., 1993). Birçok bitki türünde MT genlerinin varlığı belirlenmiş olmasına karşın, bu peptitlerin rolü ve fonksiyonu hakkındaki bilgiler nispeten azdır (Mir et al., 2004; Zhang et al., 2004). Bununla birlikte, bitki MT'lerinin hücrel metal homeostazisi veya tolerans mekanizmasında fonksiyon gördüğü belirlenmiştir (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Mir et al., 2004). Örneğin, ağır metallere maruz kalan bitkilerde MT transkriptlerinin teşvik edildiği gözlenmiştir (Schor-Fumbarov et al., 2005; Usha et al., 2007, Mendoza-Cozatl et al., 2007).

Bu derlemede, PC'ler ve MT'lerin yapısının yanı sıra onların ağır metal birikimi ve detoksifikasyonundaki muhtemel rolleri hakkında son gelişmeler tartışılmıştır.

2. Fitoşelatinler

2.1. Fitoşelatinlerin Biosentezi

Fitoşelatinler (PC'ler) sadece glutamin (Glu), sistein (Cys) ve glisin (Gly) amino asitlerinden oluşmakta ve sistein kalıntıları bir γ -karboksilamid bağı ile bağlanmaktadır. PC'ler tripeptit glutatyondan (GDH; γ -GluCysGly) enzimatik olarak sentezlenmektedir. PC'ler çok sayıda Glu-Cys dipeptit birimlerinin tekrarlarını takiben terminal bir glisin amino asidinden oluşmakta ve (γ -Glu-Cys) n -Gly veya (γ -EC) n -Gly ($n=2-11$) olarak formüle edilmektedir (Şekil 1) (Cobbett, 2000).



Şekil 1. Glutatyon (a) ve fitoşelatinin (b) kimyasal yapısı.

-Glu-Cys birimlerinin sayısına göre fitoşelatinler PC_2 , PC_3 , PC_4 , PC_5 ve PC_6 olarak sınıflandırılmaktadır (Grill et al., 1989). PC'ler birçok bitki türünde (Zhang et al., 2010; Diwan et al., 2010) ve bazı mikroorganizmalarda (Chaurasia et al., 2008) belirlenmiştir. Bununla birlikte, $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$, $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-Ser}$ ve $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-Glu}$ gibi yapısal formlar bazı bitki türlerinde teşhis edilmiştir (Rauser, 1999).

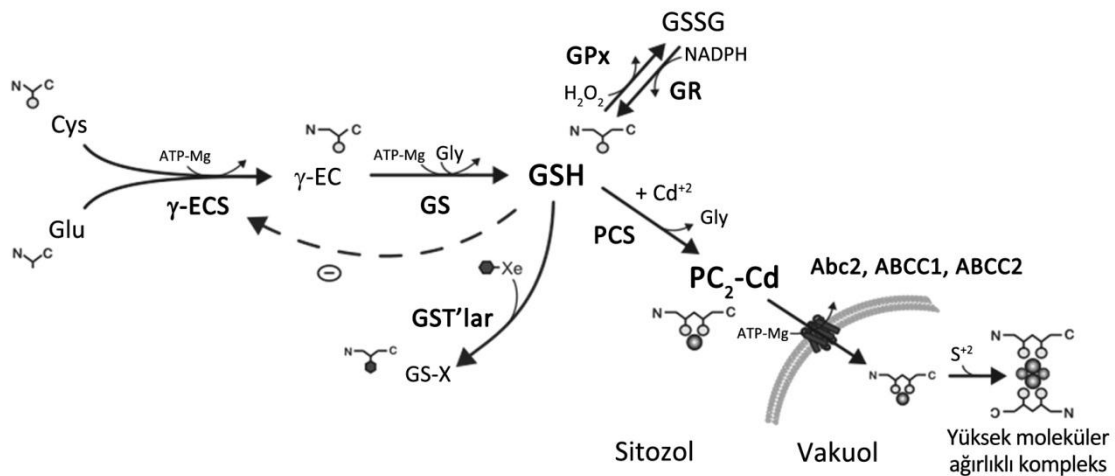
Glutatyon (GSH) ve fitoşelatin (PC); glutamin, sistein ve glisin öncü amino asitlerinden sentezlenmektedir (Şekil 2) (Mendoza-Cozatl et al., 2010). Fitoşelatin sentezinin Cd, Cu, Ag, Hg ve Pb gibi metal iyonlarının varlığında indirgenmiş glutatyondan (GSH) fitoşelatin sentaz (PCS) aracılığıyla gerçekleştiği belirlenmiştir (Grill et al.,

1989). Bitkilerde GSH reaktif oksijen türlerine karşı savunmada (Foyer and Noctor, 2005), ağır metallerin içsel olarak alıkonulmasında (Cobbett and Goldsbrough, 2002) ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda (Dixon et al., 1998) fonksiyon görmektedir. GSH, ATP bağımlı iki reaksiyonla sentezlenmektedir. İlk reaksiyonda, γ -glutamilsistein sentetaz (GSH1 veya $\gamma\text{-ECS}$) glutamatın karboksil grubu ve sisteinin amino grubu arasında bir peptit bağının oluşumunu kataliz ederek γ -glutamilsisteini ($\gamma\text{-EC}$) oluşturmaktadır. İkinci reaksiyonda, glutatyon sentetaz (GSH2 veya GS) GSH'u oluşturmak için bir glisin kalıntısı ile $\gamma\text{-EC}$ 'i birleştirmektedir. *Arabidopsis thaliana* ve *Brassica juncea* bitkilerinde GSH1 yalnızca plastidlerde bulunurken, GSH2 hem plastid hem de sitozolde bulunmaktadır (Wachter et al., 2005).

Serbest ağır metallerin varlığında PC sentaz iki farklı reaksiyonla PC sentezini kataliz etmektedir (Grill et al., 1989). İlk basamakta, GSH molekülündeki Cys-Gly peptit bağı $\gamma\text{-glutamilsistein}$ ($\gamma\text{-EC}$)'i oluşturmak için ayrılmaktadır. İkinci basamakta, $\gamma\text{-EC}$ birimleri bir transpeptidasyon reaksiyonu ile $PC_{(n-2)}$ 'i oluşturmak için ikinci bir GSH molekülüne veya PC_{n+1} 'i oluşturmak için daha önceden sentezlenmiş bir PC oligomerine (PC_n) transfer edilmektedir.

Basamak I : $\gamma\text{-EC-Gly} \rightarrow \gamma\text{-EC} + \text{Gly}$

Basamak II : $\gamma\text{-EC} + (\gamma\text{-EC})_n\text{-Gly} \rightarrow (\gamma\text{-EC})_{n+1}\text{-Gly}$



Şekil 2. GSH metabolizması ve Cd iyonlarının varlığında fitoşelatin sentezi (Mendoza-Cozatl et al., 2010'dan değiştirilerek).

Fitoşelatin sentaz aktivitesinin düzenlenmesi, PC biyosentez yolunun en önemli düzenleyici mekanizmalarından biridir. Fitoşelatin sentaz metal stresinin olmadığı durumlarda da hücrelerde bulunmakta (Ahner and Morel, 1999); fakat bu enzimin aktivasyonu için bir metal iyonuna gereksinim duyulmaktadır. Fitoşelatin sentazın C-ucu bölgesi, birbirine komşu veya oldukça yakın çiftler halinde bulunan çoklu sistein kalıntılarını içermektedir. C-ucu bölgesinin metal iyonlarını bağlayarak enzimin aktivasyonunda fonksiyon gördüğü kabul edilmekte ve bu nedenle metal algılama işlevsel bölgesi olarak adlandırılmaktadır (Ha et al., 1999). Buna karşın, oldukça korunmuş N-ucu bölgesi PC sentaz enziminin katalitik aktivite bölgesi olarak ileri sürülmüştür (Vatamaniuk et al., 2000). Sonuç olarak, C-ucu bölgesinde bulunan bazı glutamat kalıntıları ile birlikte daha az korunmuş sistein kalıntılarının ağır metalleri bağlayıcı bir rol oynadığı görülmektedir (Maier et al., 1993).

Fitoşelatin sentazın ağır metal teşvikli aktivasyonuna ek olarak hücre içi GSH seviyesi PC sentezini düzenlemektedir (Collin-Hansen et al., 2007). GSH sentezinin en önemli düzenleme mekanizması, GSH tarafından γ -glutamilsistein sentazın geri besleme inhibisyonudur (Şekil 2) (Noctor and Foyer, 1998). γ -ECS ve glutatyon sentaz aktivitelerinin modifiye edilmesi ile GSH seviyelerinin ve metal hassasiyetinin değiştiği bildirilmiştir (Mendoza-Cozatl et al., 2005). Glutatyon S-transferazlar ve PC sentaz GSH'ı tüketen reaksiyonları katalize etmekte ve sonuç olarak bu enzimlerin aktivasyonu γ -ECS'nin GSH ile geri besleme inhibisyonunun üstesinden gelerek biyosentetik yolda bir artışa neden olabilmektedir. Sistein ve glisin kullanılabilirliği de GSH sentezinin düzenlenmesine katkıda bulunabilmektedir (Mendoza-Cozatl et al., 2005). Bununla birlikte, GSH sentezinin oksidatif stres ile düzenlendiği bildirilmiştir (Liang et al., 2009). Xiang ve Oliver (1998), Cd stresinin PC sentazı aktive ederek GSH'dan PC'lerin sentezini teşvik ettiğini ve sadece GSH biyosentez yolunun transkripsiyonel aktivasyonu ile değil, aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin oluşumu tarafından da GSH sentezinin

teşvik edildiğini bildirmişlerdir. PC sentaz aktivitesinin düzenlenmesi PC sentezinin düzenlendiği birincil nokta olduğu düşünülmektedir (Cobbett, 2000). Çünkü bu enzim biyosentez yolundaki en yavaş enzimdir (Mendoza-Cozatl et al., 2005). Bazı türlerde PC sentaz aktivesi hem transkripsiyonel hem de post-translasyonel seviyede düzenlenmektedir (Cobbett and Goldsbrough, 2002). Genel olarak, GSH ve PC biyosentez yolundaki enzimleri kodlayan genlerin ifadelerinin sülfat eksikliğine ve Cd stresine bağlı olarak transkripsiyonel seviyede arttığı bildirilmiştir (Mendoza-Cozatl et al., 2005).

2.2. Fitoşelatinler ve Ağır Metal Toleransı

2.2.1. Fitoşelatinler ve Metallerin Vakuolde Alıkonulması

Ağır metallerin vakuollerde alıkonulması maya, mantar ve bitkilerde ağır metal toleransının önemli mekanizması olarak ortaya çıkmaktadır. Sitolde sentezlenen PC'ler, PC-metal kompleksleri oluşturarak vakuole taşınmakta ve böylece sitozolden toksik elementlerin uzaklaştırılması sağlanmaktadır (Mendoza-Cozatl et al., 2005; Verbruggen et al., 2009). Vakuollere taşınan PC-Cd kompleksleri, sülfid (S^{2-}) ve serbest Cd^{+2} iyonlarına bağlanarak Cd-sülfür kümelerinin etrafını saran yüksek moleküler ağırlıklı kompleksler oluşturmaktadır (Şekil 2) (Ortiz et al., 1995). Fitoşelatin-metal komplekslerinin tonoplastta bulunan ATP-bağlayıcı kaset taşıyıcılar (ABC taşıyıcıları) ile vakuole alındığı bilinmektedir (Ortiz et al., 1995; Salt and Rauser, 1995). Mayada ABC taşıyıcısı olan Hmt1 (Heavy metal tolerance 1)'in Cd toleransı için gerekli vakuolar PC taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir (Ortiz et al., 1995; Salt and Rauser, 1995). Hmt1'in Cd toleransını sağladığı bilinmekte birlikte, bitkilerde Hmt1-benzeri proteinlerin teşhisi gerçekleştirilememiştir (Rea, 2007). *Arabidopsis* genom projesi tamamlandıktan sonra, *Arabidopsis* bitkilerinin Hmt1 ortologlarından yoksun olduğu; fakat yüksek moleküler ağırlıklı kompleksler şeklinde PC'leri ve Cd iyonlarını vakuollerinde alıkoyabildiği gösterilmiştir (Sánchez-Fernández et al., 2001). *Arabidopsis* bitkilerinde Hmt1

homologlarının mitokondrielerde lokalize olmuş ATM (mitokondriyal ABC taşıyıcı) taşıyıcıları olduğu bildirilmiştir (Rea, 2007; Sooksa-Nguan et al., 2009). *Arabidopsis*'de aşırı ATM3 ifadesinin Cd toleransını arttırdığı belirtilmiştir (Kim et al., 2006). Az sayıda organizmada bulunan Hmt1-benzeri proteinlerin fonksiyonları tam olarak anlaşılamamıştır (Sooksa-Nguan et al., 2009). Hmt1'in Cd toleransını sağladığı; fakat arsenit veya arsenat toleransına katkıda bulunmadığı bildirilmiştir (Sooksa-Nguan et al., 2009; Preveral et al., 2009). Bununla birlikte, PC'lerden yoksun *E. coli* ve *S. cerevisiae*'de Hmt1'in heterolog ifadesinin Cd toleransını arttırmasının Hmt1'in PC-bağımsız bir yolla tolerans sağladığını göstermektedir (Mendoza-Cozatl et al., 2010). Ayrıca *S. pombe* *hmt1* mutantının vakuollerinin önemli miktarda PC'leri içermesinin ilave vakuolar PC taşıyıcılarının varlığını ileri sürmektedir (Sooksa-Nguan et al., 2009; Mendoza-Cozatl et al., 2010). Hmt1'in aksine ABCC2/Abc2-benzeri proteinler ile ilişkili genler birçok bitki türünde teşhis edilmiştir (Mendoza-Cozatl et al., 2011). *Arabidopsis* bitkilerinde iki ABC taşıyıcısının (MRP1/ABCC1 ve MRP2/ABCC2) vakuolar PC alınımına aracılık ettiği bildirilmiştir (Mendoza-Cozatl et al., 2010; Song et al., 2010). İki ABC-tip taşıyıcıdan (AtABCC1 ve AtABCC2) yoksun *Arabidopsis* mutantlarının arseniğe aşırı derecede duyarlı olduğu ve bu mutantlarda vakuolar PC-As alınımının belirgin şekilde azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca, bu ABCC taşıyıcılarının *S. cerevisiae*'de aşırı ifadesinin As toleransı ve birikimini arttırdığı bildirilmiştir (Song et al., 2010). Benzer olarak, *atabcc1* tek veya *atabcc1 atabcc2* çifte mutantların Cd ve Hg stresine karşı aşırı hassasiyet gösterdikleri belirtilmiştir. Bununla birlikte, AtABCC1 ve AtABCC2 taşıyıcılarının As detoksifikasyonuna ek olarak Cd ve Hg toleransına katkıda bulunan önemli vakuolar taşıyıcılar olduğu bildirilmiştir (Park et al., 2012).

AtABCC1 ve AtABCC2 taşıyıcıları As, Cd ve Hg toleransına katkıda bulunurken, aynı durumun Pb için geçerli olmadığı bildirilmiştir (Park et al., 2012). AtABCC1 ve AtABCC2 taşıyıcılarının substrat özgüllüğü, maya ve *Arabidopsis*'de Pb, As, Cd ve Hg toleransına katkıda bulunan ve bir ABCC taşıyıcısı olan ScYCF1'den farklılık göstermektedir (Gueldry

et al., 2003). ScYCF1 GS-bağlı metalleri taşıırken (Li et al., 1997), AtABCC1 ve AtABCC2 PC-metal komplekslerini taşımaktadır (Song et al., 2010). Bu bağlamda, PC eksik *cad1* mutantının Pb toleransında bir azalma göstermemesi *Arabidopsis*'de Pb toleransının PC'lerden bağımsız olduğunu göstermektedir (Park et al., 2012).

2.2.2. Ağır Metal Toleransında Fitoşelatin Genlerinin Genetik Düzenlenmesi

Bitkilerde glutasyon ve fitoşelatinlerin sentezi ile ilişkili genlerin genetik düzenlenmesi ağır metal toleransını arttırabilmektedir. Glutasyon ve PC seviyelerinin düzenlenmesini kontrol eden γ -glutamilsistein sentetaz (γ -ECS), glutasyon sentaz (GS) ve fitoşelatin sentaz (PCS) gibi enzimleri kodlayan genlerin ağır metal toleransının sağlanması için aday genler olduğu bildirilmiştir (Yadav, 2010). Birçok bitki türünde ve mayada bu enzimatik genlerin aşırı ifade edilmesi yüksek seviyelerde ağır metal birikimi ve toleransına neden olabilmektedir (Singh et al., 2008).

Arabidopsis thaliana (Ha et al., 1999), *Triticum aestivum* (Clemens et al., 1999), *Allium sativum* (Zhang et al., 2005) ve *Brassica juncea* (Heiss et al., 2003)'dan elde edilen PCS genlerinin farklı bitki türleri ve bazı mikroorganizmalarda aşırı ifade edilmesiyle metal-bağlayıcı peptitlerin seviyesi ve dolayısıyla ağır metal toleransı arttırılmıştır. *E. coli* (Sauge-Merle et al., 2003) ve *S. cerevisiae*'de (Singh et al., 2008) *Arabidopsis AtPCS1* geninin aşırı ifade edilmesinin Cd ve As toleransı ve birikimini arttırdığı belirtilmiştir. Mayada *Arabidopsis thaliana PCS* ve *Treponema denticola* sistein desülfidraz geninin birlikte ifadesinin As birikimini arttırdığı ve As birikiminde hidrojen sülfid ve PC'lerin birlikte fonksiyon gördüğü bildirilmiştir (Tsai et al., 2011). *Nicotiana glauca* bitkilerinde buğday *TaPCS1* geninin aşırı ifade edilmesinin önemli ölçüde Cd ve Pb toleransını arttırdığı bildirilmiştir (Gisbert et al., 2003; Martinez et al., 2006). Bununla birlikte, *AtPCS1* genini aşırı ifade eden *Nicotiana tabacum* bitkilerinin dışsal GSH sağlandığında yüksek Cd toleransı ve birikimi gösterdiği bildirilmiştir (Pomponi et al., 2006).

Diğer taraftan, *Brassica juncea*'da *AtPCS1* geninin Cd ve Zn toleransına neden olduğu, buna karşın kök ve gövde dokularında bu metallerin birikimini azalttığı belirtilmiştir (Gasic and Korban, 2007). *Thlaspi caerulescens* bitkilerinde aşırı *TcPCS1* ifadesinin kök ve gövde dokularında Cd birikimi ve toleransını arttırdığı, buna karşın Cd translokasyonunu etkilemediği bildirilmiştir (Liu et al., 2011). Benzer olarak, *Arabidopsis* köklerinde As ile PC'lerin kompleks oluşturması nedeniyle köklerden gövde dokusuna As'in taşınımının azaldığı gösterilmiştir (Liu et al., 2010). Bununla birlikte, arsenit-PC komplekslerinin yapraklarda alıkonulmasının floeme As'in hareketliliğini azalttığı bildirilmiştir (Duan et al., 2011). Diğer taraftan, *Arabidopsis* bitkilerinde *Allium sativum PCS1* ve *S. cerevisiae GSH1* genlerinin birlikte ifadesinin As toleransı ve birikiminde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Guo et al., 2008). Fitoşelatin sentaz 1 geninde (*AtPCS1*) mutasyona sahip *Arabidopsis cad1-7* mutantının As'e aşırı hassasiyet gösterdiği ve bu hassasiyetin yabancı tip *AtPCS1* geninin aktarılmasıyla ortadan kaldırıldığı bildirilmiştir (Kamiya and Fujiyama, 2011). Ayrıca PC sentezinin L-bütiyonin-sülfoksim (BSO; γ -glutamilsistein sentetaz inhibitörü) ile inhibisyonunun aşırı As hassasiyetine neden olduğu belirtilmiştir (Schat et al., 2002). Çeltik bitkilerinde *OsPCS1* gen ifadesinin RNA interferansı (RNAi) ile baskılanmasının herhangi bir toksisite semptomu göstermeksizin Cd birikiminde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Li et al., 2007).

Birçok bitki türünde PC üretimindeki artış metal toleransındaki artışla sonuçlanırken, bazı bitki türlerinde aksi durum saptanmıştır. Örneğin, *Arabidopsis* bitkilerinde aşırı *AtPCS1* ifadesinin PC üretiminin arttırmasına karşın aşırı Cd hassasiyetine neden olduğu belirtilmiştir (Lee et al., 2003; Li et al., 2004). Benzer olarak, *AtPCS1* genini aşırı ifade eden *N. tabacum* hatlarının dışsal GSH uygulamasının olmadığı durumda aşırı Cd hassasiyeti gösterdiği ve kontrol bitkilerine göre Cd birikiminde bir farklılık göstermediği bildirilmiştir (Wojas et al., 2008). Brunetti vd. (2011), düşük Cd konsantrasyonlarında *AtPCS1* genini aşırı ifade eden *Arabidopsis* hatlarında Cd toleransının yabancı

tip bitkilere göre daha düşük olmasına karşın, *AtPCS1* genini aşırı ifade eden bütün bitkilerinin yabancı tip bitkilere göre daha toleranslı olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, yüksek Cd konsantrasyonlarında ise tam tersi bir durum gözlemişlerdir. PC seviyesi ve Cd arasında optimum bir oran olduğunda, aşırı PC üretiminin Cd toleransını arttırabileceğini ileri sürülmüştür (Brunetti et al., 2011). Bununla birlikte, aşırı *AtPCS1* ifade eden hatlarda Cd hassasiyetinin *AtPCS1* proteininin toksisitesinden değil, GSH seviyeleri ile karşılaştırıldığında optimumun üzerindeki seviyelerde bulunan PC'lerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Li et al., 2004).

2.2.3. Hiperakümülatör Bitkilerde Fitoşelatinler

Fitoşelatinler ile ilgili önemli bir soru metal hipertoleransında rol oynayıp oynamadığıdır. Fitoşelatin sentezinin kalıtsal Cd ve As toleransı için önemli bir faktör olduğu (Clemens, 2006), buna karşın hipertoleranslı veya hiperakümülatör bitkiler için önemli rol oynamadığı bildirilmiştir (Ernst et al., 2008). Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, PC'lerin Cd hipertoleransında bir role sahip olmadığı yönündedir. Örneğin, Cd'a toleranslı *Silene vulgaris* genotiplerinin Cd'a hassas genotiplere göre daha düşük oranda PC'leri ürettiği bildirilmiştir (de Knecht et al., 1994). Benzer olarak, Cd-toleranslı *Thlaspi caerulescens*'in Cd-hassas *T. arvense*'ye göre daha düşük seviyede PC'leri ürettiği belirtilmiştir (Ebbs et al., 2002). Bununla birlikte, *T. caerulescens*'in farklı aksiyonlarında Cd ve Zn hipertoleransının GSH veya GSH'dan türetilen moleküllere bağlı olmadığı gösterilmiştir (Schat et al., 2002). Cd'a hipertoleranslı aksiyonların GSH biyosentez inhibitörü ile muamele edilmesinin aşırı Cd hassasiyetine neden olmaması, Cd hipertoleransında PC oluşumundan farklı bir mekanizmanın var olduğunu göstermektedir. Ernst vd. (2008), metallerce zengin kendi doğal çevrelerinde yetişen hipertoleranslı bitki türlerinde PC seviyelerinin düşük olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, Cd akümülatörü *Solanum nigrum* bitkilerindeki PC seviyesinin Cd uygulamasında artmış olmasına karşın, akümülatör olmayan *S. melongena* türünden daha düşük olduğu

bildirilmiştir (Sun et al., 2007). Bununla birlikte, *Sedum alfredii* bitkilerinde Pb detoksifikasyonunun PC'le değil, GSH ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Gupta et al., 2010).

3. Metalloitiyoneinler

3.1. Metalloitiyoneinlerin Sınıflandırılması

Metalloitiyoneinler (MT'ler) düşük moleküler ağırlıklı (4-14 kDa) ve sisteince zengin metal bağlayıcı proteinlerin bir sınıfı ve mRNA translasyon ürünleridir (Cobbett and Goldsbrough, 2002). MT proteinleri sistein kalıntılarının düzenlenişine göre sınıflandırılmaktadır (Cherian and Chan, 1993):

- Sınıf I MT'ler: Oldukça korunmuş 20 adet sistein kalıntısı içermekte ve omurgalılarda yaygın olarak bulunmaktadır.
- Sınıf II MT'ler: Genel karakteristik özelliklere sahip olmalarına karşın peptit boyunca sistein dağılımları onları Sınıf I MT'lerden ayırmaktadır. Sınıf II MT'ler omurgasız hayvanların yanı sıra bitki ve mantarlarda bulunmaktadır.
- Sınıf III MT'ler: Glutatyondan enzimatik olarak sentezlenen PC'leri kapsamaktadır.

Bitki MT'leri filogenetik ilişkileri ve dizi benzerliklerine göre sınıflandırılmaktadır (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Zimeri et al., 2005; Freisinger, 2009). Bitki MT'leri tip 1 (p1), tip 2 (p2), tip 3 (p3) ve tip 4 (pec) olmak üzere dört gruba ayrılabilir. MT'ler dokuya özgü biçimde ifade olmakla birlikte, MT transkriptleri farklı bitki türlerinin kök, gövde, yaprak, çiçek, meyve ve tohum gibi farklı dokularında belirlenmiştir. Tip 1 MT'lere ait genlerin çoğunlukla köklerde ifade olduğu (Guo et al., 2003; Kohler et al., 2004; Yang et al., 2009b), tip 2 MT'lere ait genlerin ise genellikle yapraklarda ifade olduğu bildirilmiştir (Huang and Wang, 2009, 2010). Bununla birlikte, tip 3 MT'ler olgunlaşan etli meyve ve yapraklarda (Guo et al., 2003; Kohler et al., 2004), buğday MT proteini (E_c-1) gibi tip 4 MT'ler ise gelişen tohumlarda ifade olmaktadır (Cobbett and Goldsbrough, 2002).

Bazı istisnalar hariç, tipik bir bitki MT proteini 60-85 amino asitten oluşmaktadır (Freisinger,

2009). Bitki tip 1, 2 ve 3 MT'lerin en önemli özelliği N- (amino) ve C-ucu (karboksil) bölgelerinde sistein kalıntılarının küme oluşturmasıdır. N-ucu bölgenin sistein profili bir tip içerisinde sıkı bir şekilde korunmuş ve MT tipleri arasında önemli bir ayırıcı özelliktir. Aksine, C-ucu bölgesindeki sistein kalıntılarının dağılımı üç tip MT tarafından paylaşılmaktadır. Bitkilerde sistein kalıntılarının sayısı 12 (tip 1), 14 (tip 2) ve 10 (tip 3) olarak belirlenmiştir. Bitki MT'lerinde, sisteince zengin iki bölge yaklaşık 40 amino asit uzunluğunda ve sistein içermeyen bağlayıcı bölge tarafından ayrılmıştır (Freisinger, 2009). Bu bağlayıcı bölgenin, MT proteininin lokalizasyonu ve kararlı hale getirilmesinde fonksiyon görmesinin yanı sıra protein katlanmasına ve böylece metal kümelerinin kararlı hale gelmesine yardımcı olabildiği ileri sürülmüştür (Domènech et al., 2007).

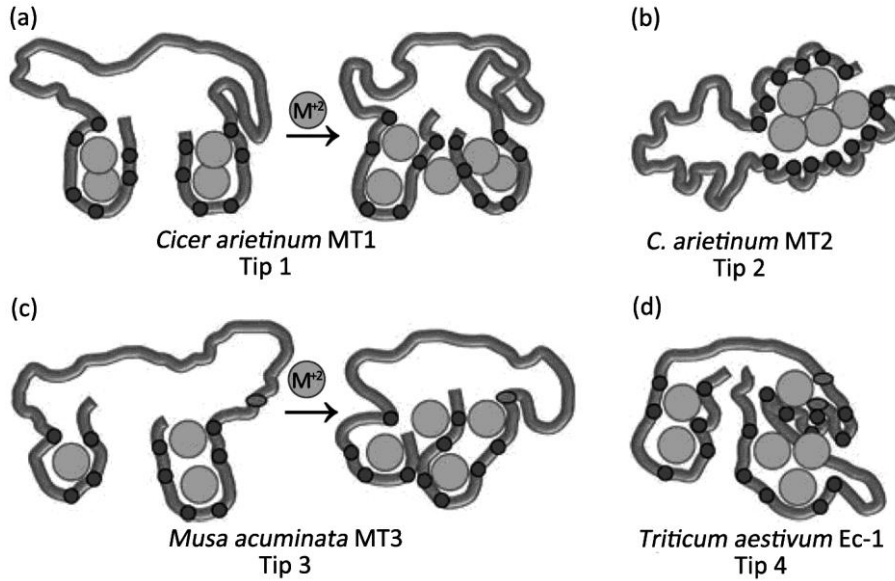
3.2. Metalloitiyoneinlerin Metal Bağlayıcı Özellikleri

Yüksek sistein içeriği ve sisteinin proteindeki düzenlenişi MT'lerin metal bağlayıcı özelliğini göstermektedir (Zhou and Goldsbrough, 1994). Bununla birlikte, MT proteinlerinin saflaştırılmasında karşılaşılan zorluklardan dolayı bitki MT'lerinin fonksiyonu üzerine yapılan çalışmalar eksik kalmıştır (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Mir et al., 2004). Bitki MT'lerinin yapısı son zamanlarda yapılan çalışmalar ile ortaya çıkarılmıştır (Freisinger, 2009; Huang and Wang, 2010; Huang et al., 2011). Dört MT alt ailesinin öngörülen yapıları Şekil 3'de gösterilmiştir. Bitki MT ailesinin çeşitliliği MT'lerin sadece yapısal olarak değil, aynı zamanda fonksiyonel olarak da farklı olduğunu göstermiştir (Hassinen et al., 2011). Bununla birlikte, sistein düzenlenişinin farklı MT'lere farklı metallerin bağlanması özelliklerini kazandırdığı ileri sürülmüştür (Roosens et al., 2005). Metal iyonları aynı zamanda histidin amino asitleri ile de koordine edilebilmekte; fakat MT'lerin metal bağlama özellikleri ve fonksiyonu üzerine sisteinin etkisi tam olarak bilinmemektedir (Blindauer, 2008).

Bitkilerde MT genlerinin teşhis edilmesine karşın, MT proteinlerinin saflaştırılması üzerine

birkaç çalışma bulunmaktadır. Buğdayda EcMT (Lane et al., 1987) ve *Arabidopsis*'de MT1, MT2 ve MT3 (Murphy and Zhou, 1997) saflaştırılan bitki MT proteinleridir. Bununla birlikte, MT proteinlerinin karakterize edilmesi ve metal bağlayıcı özelliklerinin belirlenmesi için bazı bitki MT genleri *E. coli*'de ifade edilmiştir (Mir et al., 2004; Bilecen et al., 2005; Usha et al., 2009; Huang and Wang, 2010; Huang et al., 2011). MT'lerin rekombinant üretimi, direkt izolasyonla ilişkili bazı problemlerin

üstesinden gelinmesine ve bir GST (glutasyon S-transferaz) füzyonu olarak MT'lerin ifadesi metal bağlayıcı özelliklerinin belirlenmesine yardımcı olmuştur (Bilecen et al., 2005). GST füzyon proteini olarak *Avicennia marina* AmMT2, *Bruguiera gymnorrhiza* BgMT2 ve *Prosopis juliflora* MT genleri *E. coli*'de ifade edildiğinde bu MT proteinlerinin Zn, Cu, Pb ve Cd için kuvvetli bir metal bağlayıcı afiniteye sahip olduğu gösterilmiştir (Usha et al., 2009; Huang and Wang, 2010; Huang et al., 2011).



Şekil 3. Farklı MT tipleri için öngörülen modeller. (a) *Cicer arietinum* MT1 (Schicht and Freisinger, 2009), (b) *C. arietinum* MT2 (Wan and Freisinger, 2009), (c) *Musa acuminata* MT3 (Freisinger, 2007), (d) *Triticum aestivum* Ec-1 (Freisinger, 2009; Peroza et al., 2009). Eğriler poplipeptit zincirini, büyük halkalar metal iyonlarını (M^{+2}), küçük halkalar sistein kalıntılarını ve oval yapılar ise histidin kalıntılarını göstermektedir (Hassinen et al., 2011'den değiştirilerek).

MT'ler ve diğer sisteince zengin peptitlerin metal-bağlama özelliklerinin bilinmesi, ağır metallerin detoksifikasyonunda bu peptitlerin rolünün anlaşılması için gereklidir. *Cicer arietinum* MT1 ve *Quercus suber* MT1 ve MT2 proteinlerinin dört Zn iyonunu bağlayabildiği, buna karşın *Triticum aestivum* Ec-1 proteinin altı Zn iyonunu bağlayabildiği belirtilmiştir (Freisinger, 2009). Cd içeren besin ortamında büyütülen *Q. suber* MT1'inin altı Cd iyonu, *C. arietinum* MT3'ün ise beş Cd iyonunu bağladığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, *Q. suber* MT2'si ve *Musa acuminata* MT3'ünün dört Cd iyonunu, *T. aestivum* Ec-1'in ise altı Cd iyonunu bağladığı bulunmuştur (Freisinger, 2009; Hassinen et al., 2011). Diğer taraftan, *Q. suber* MT2'sinin Zn iyonlarına göre daha fazla

sayıda Cd iyonuna bağlanabilmesi, MT'lerin ağır metal detoksifikasyonunda önemli bir rolü olduğunu desteklemektedir (Domènech et al., 2007).

3.3. Metalloitiyoneinler ve Ağır Metal Toleransı

Ağır metallerin plazma membranı aracılığıyla sitozolden atılması veya sitozolik metal bağlanmasını takiben vakuolde bu komplekslerin alıkonulması ağır metal toleransındaki temel mekanizmalardır. Hayvanlarda MT'ler Cd, Pb ve Hg gibi gerekli olmayan metallerin detoksifikasyonunu, Cu ve Zn gibi esansiyel metallerin homeostazisini ve serbest radikallerin temizlenmesini içeren birkaç işlevde rol oynamaktadır (Foley et al., 1997). Son yıllarda, çok sayıda çalışma bitki MT'lerinin de

hayvan ve mantarlardaki gibi önemli roller oynadığını göstermiştir (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Chiang et al., 2006; Zhigang et al., 2006; Huang et al., 2011). Ağır metallere maruz kalan bitkilerde MT transkriptlerinin seviyesi artmış olmasına rağmen genel bir sonuç ortaya konulamamıştır (Mendoza-Cozatl et al., 2007; Usha et al., 2007; Yang et al., 2009b). Bitkilerde MT'lerin kesin fonksiyonları tamamen anlaşılammış olmasına karşın, birkaç çalışma MT'lerin ağır metal toleransı ve homeostazisinde fonksiyon görebileceğini göstermiştir (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Jack et al., 2007). Örneğin, Cu'a toleranslı *Silene vulgaris* populasyonlarında yüksek seviyede *SvMT2b* gen transkriptlerinin bulunduğu ve hassas mayada aşırı *SvMT2b* ifadesinin Cu toleransını arttırdığı bildirilmiştir (van Hoof et al., 2001). Bununla birlikte, *Medicago sativa* bitkilerinde *MsMT2a* geninin hem kontrol ve hem de Cd stresi uygulamalarında, *MsMT2b* geninin ise sadece Cd stresi uygulamasında ifade olduğu bildirilmiştir. Bu bağlamda, *MsMT2a*'nın tüm gelişim evrelerinde yaygın olarak bulunabileceği, buna karşın *MsMT2b*'nin ağır metalle teşvik edilen bir gen olabileceği ileri sürülmüştür (Wang et al., 2011).

Bitki MT ifadesinin ağır metal toleransında fonksiyonlarının test edilmesi için bazı MT genleri *E. coli* (Bilecen et al., 2005; Huang and Wang, 2010; Huang et al., 2011), maya (Guo et al., 2008) veya bitkilere (Lee et al., 2004; Zhang et al., 2004; Yang et al., 2009b) aktarılmıştır. Bu metotlar, herhangi bir ağır metale toleransta bir MT proteininin rolünün belirlenmesinde oldukça önemlidir. *Avicennia marina* *AmMT2* ve *Bruguiera gymnorhiza* *BgMT2* genlerini aşırı ifade eden *E. coli* hatlarının yabancı tip kontrollere göre Zn, Cu, Pb ve Cd metallerine daha toleranslı olduğu ve dolayısıyla MT2 proteinlerinin ağır metal toleransında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Huang and Wang, 2010; Huang et al., 2011). Benzer olarak, *BjMT2* genini ifade eden *E. coli* hücrelerinin Cu ve Cd stresine daha toleranslı oldukları belirtilmiştir (Zhigang et al., 2006). Diğer taraftan, MT1 ailesinin devre dışı bırakıldığı ve MT1a ve MT1c seviyelerinin azaltıldığı *Arabidopsis*

hatlarının Cd'a aşırı duyarlı olması ve yabancı bitkiler ile karşılaştırıldığında, yapraklarında daha az As, Cd ve Zn biriktirmesi tip 1 MT'lerin Cd toleransını sağladığını ve belki de Zn homeostazisine katılabildiğini desteklemektedir (Zimeri et al., 2005). MT1a fonksiyon kaybına uğramış bitkilerin köklerinde azalmış Cu konsantrasyonu MT1a'nın köklerde Cu biriktirilmesinde önemli bir fonksiyona sahip olduğunu göstermektedir (Guo et al., 2008). Tütün bitkilerinde *AtMT2b* ve *AtHMA4* (ağır metal ATPaz 4) genlerinin birlikte ifadesinin Cd toleransını ve gövde dokularına Cd translokasyonunu arttırdığı, buna karşın tek gen aktarılmış bitkilerde önemli bir farklılığın belirlenmediği bildirilmiştir (Grispen et al., 2011). Benzer olarak, kloroplast genomuna fare *mt1* geni aktarılmış tütün bitkilerinde Hg toleransının ve birikiminin arttığı belirtilmiştir (Ruiz et al., 2011). İlginç olarak, *Arabidopsis*'in vejetatif dokularında tohuma özgü MT4a geninin ifadesi, Cu ve Zn toleransının artmasına neden olmuştur (Rodríguez-Llorente et al., 2010). *Arabidopsis* bitkilerinde aşırı *BjMT2* ifadesinin Cd ve Cu toleransını arttırdığı; fakat kontrol koşullarında *BjMT2* genini aşırı ifade eden transjenik bitkilerin kök büyümesinin yabancı tip bitkilere göre azaldığı bildirilmiştir (Zhigang et al., 2006). Benzer olarak, *Arabidopsis*'te aşırı *TcMT2* ifadesinin kontrol bitkilerinde kök büyümesini azalttığı bildirilmiştir (Hassinen et al., 2009). Bununla birlikte, tütün bitkilerinde *Arabidopsis AtMT2b* geninin ifadesinin As toleransını azalttığı; fakat gövdeye As translokasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Grispen et al., 2009).

3.4. Hiperakümülatör Bitkilerde Metallothioneinler

Ağır metallerce zengin topraklardaki bitki populasyonları, normal topraklardaki aynı populasyonlar ile karşılaştırıldığında metallere çok güçlü seviyede tolerans göstermektedirler. Bunların küçük bir kısmı olan hiperakümülatör bitkiler yapraklarında bir veya daha fazla ağır metali yüksek konsantrasyonlarda biriktirebilmektedir (Baker and Brooks, 1989). *Arabidopsis* bitkilerindeki MT genlerine homolog olan bazı genler hiperakümülatör *Thlaspi caerulescens*'den izole

edilmiştir (Roosens et al., 2005; Hassinen et al., 2009). Hiperakümülatör *T. caerulescens*'da *MT2a*, *MT2b* ve *MT3* gibi bazı genlerin ifade seviyeleri, metallofit ve hiperakümülatör olmayan referans türlerle karşılaştırıldığında çok fazla olduğu mikroarray analizleri ile gösterilmiştir. Örneğin, *Arabidopsis* ile karşılaştırıldığında *T. caerulescens* köklerindeki *MT2a* ve *MT2b* ifadesinin daha yüksek olduğu bulunmuştur (van de Mortel et al., 2006). *T. caerulescens*'in gövde dokularındaki *MT2a* ve *MT3* ifadelerinin *T. arvense*'den daha fazla olduğu belirlenmiştir (Hammond et al., 2006). Diğer bir Zn hiperakümülatörü *Arabidopsis halleri* fidelerinde *MT2a*, *MT2b* ve *MT3* genlerinin ifade seviyelerinin *A. thaliana* bitkilerine göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Chiang et al., 2006). Hiperakümülatör bitkilerde yüksek ifade seviyeleri, muhtemelen bu proteinlerin ağır metal homeostazisini veya toleransını sağlayarak bu bitkilerin metal adaptasyonuna katkıda bulunabildiği ileri sürülmüştür (Hassinen et al., 2011).

3.5. Reaktif Oksijen Türlerinin Uzaklaştırılmasında Metalloitiyoneinlerin Rolü

Metalloitiyoneinlerin ağır metal detoksifikasyonundaki fonksiyonlarına ek olarak bitki MT'lerinin oksidatif ve diğer stres koşullarına maruz kalan bitkilerin savunma sisteminde fonksiyon gördüğüne dair kanıtlar bulunmaktadır. Reaktif oksijen türlerini uzaklaştırma yeteneği ile ilişkili olarak metalloitiyoneinlerin ozmotik, tuz, soğuk ve ağır metal streslerinde bir savunma rolünün olduğu ileri sürülmüştür (Lee et al., 2004; Mir et al., 2004; Wong et al., 2004; Xue et al., 2009). Bununla birlikte, senesense uğrayan yapraklardan metal iyonlarının tekrar hareketini MT'lerin sağlayabildiği ileri sürülmüştür (Guo et al., 2003). Senesensle MT'lerin teşvik edilmesi, metal hareketliliği yerine ROT'ların uzaklaştırılması veya sinyalizasyonu ile ilişkili de olabilmektedir (Hassinen et al., 2011). Metallerle bağlanan sistein kalıntıları ROT'ların temizlenmesini de gerçekleştirebilmektedir. Alternatif olarak, senesens sırasında pigment ve diğer proteinlerin parçalanması ile ortaya çıkmış metallerin

temizlenmesinde MT'lerin görev almasının mümkün olabileceği bildirilmiştir (Hassinen et al., 2011). Kolza (*Brassica napus*) MT1 geni olan *LSC54* ifadesinin ROT üretimi ile teşvik edildiği ve yaprak senesensi sırasında ROT metabolizmasındaki dengesizlik ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (Navabpour et al., 2003). Bununla birlikte, *Tamarix hispida* metalloitiyonein-benzeri *ThMT3* genini ifade eden mayada H₂O₂ içeriği azalırken Cd, Zn ve Cu toleransının arttığı bildirilmiştir (Yang et al., 2011). *Casuarina glauca* *cgMT1* genini aşırı ifade eden transjenik *Arabidopsis* bitkilerinde H₂O₂ birikiminin azaldığı bildirilmiştir (Obertello et al., 2007). Pamuk fidelerinde *GhMT3a* mRNA seviyesinin yüksek tuzluluk, kuraklık, düşük sıcaklık, absisik asit, etilen, reaktif oksijen türleri, Zn ve Cu tarafından arttığı ve *GhMT3a*'nın etkili bir ROT temizleyicisi olabileceği bildirilmiştir (Xue et al., 2009). Kuraklık ve Zn stresi altında *OsMT1a* genini aşırı ifade eden çeltik bitkilerinin daha etkin bir antioksidant sisteme sahip olması, *OsMT1a*'nın doğrudan veya dolaylı olarak antioksidant sistemine katıldığını desteklemektedir (Yang et al., 2009b). Kuraklık ve oksidatif strese cevap olarak *Fagopyrum esculentum* *FeMT3* mRNA seviyesinin artması ve mayada *FeMT3* proteinin ROT temizleme yeteneğinin belirlenmesi, savunma sistemi ve ROT'la ilişkili hücresel işlevlerde bu proteinin muhtemel rollerini göstermektedir (Samardžić et al., 2010).

Metal bağlanması ve ROS temizlenmesi arasındaki karşılıklı etkileşim henüz açık değildir. ROT temizlenmesi sırasında, MT'lerin sistein kalıntılarına ROT bağlandığında metaller serbest kalabilmektedir. Sonuç olarak serbest kalmış metallerin birbirini tetikleyen sinyal iletimine katılabileceği ileri sürülmüştür (Hassinen et al., 2011).

4. Sonuç

Ağır metal stresi bitki verimliliğini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Ağır metal toleransında önemli rolleri olduğu ileri sürülen PC'ler ve MT'lerin biyosentezi, ifadesi, düzenlenmesi ve fonksiyonu üzerine moleküler düzeyde çalışmalar olmasına rağmen, bu proteinlerin fonksiyonları halen

tartışma konusudur. Ağır metallerle kirlenmiş alanların fitoremediasyonunda potansiyel kullanımlarından dolayı hipertoleranslı ve hiperakümülatör bitkiler büyük ilgi çekmektedir. Bu nedenle, PC sentezinde görev alan enzimleri kodlayan genler ve MT genlerinin ifadesindeki düzenlemeler ile bitkilerin fitoremediasyon kapasitelerinin artırılması önemli hedefler arasında yer almaya devam edecektir.

Kaynaklar

- Ahner, B. and Morel, F.M.M., 1999. Phytochelatin in microalgae. *Progress in Phycological Research*, **13**, 1-31.
- Arnetoli, M., Vooijs, R., ten Bookum, W., Galardi, F., Gonnelli, C., Gabbrielli, R., Schat, H. and Verkleij, J.A.C., 2008. Arsenate tolerance in *Silene paradoxa* does not rely on phytochelatin-dependent sequestration. *Environmental Pollution*, **152**, 585-591.
- Baker, A.J.M. and Brooks, R.R., 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements—a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, **1**, 81-126.
- Bilecen, K., Ozturk, U.H., Duru, A.D., Sutlu, T., Petoukhov, M.V., Svergun, D.I., Koch, M.H., Sezerman, U.O., Cakmak, I. and Sayers, Z., 2005. *Triticum durum* metallothionein: Isolation of the gene and structural characterization of the protein using solution scattering and molecular modeling. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 13701-13711.
- Blaylock, M.J. and Huang, J.W., 2000. Phytoextraction of Metals. In: Raskin, I. and Ensley, B.D. (eds.), *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean-up the Environment*. Wiley, New York, pp. 53-70.
- Blindauer, C.A., 2008. Metallothioneins with unusual residues: Histidines as modulators of zinc affinity and reactivity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **102**, 507-521.
- Brunetti, P., Zanella, L., Proia, A., De Paolis, A., Falasca, G., Altamura, M.M., di Toppi, L.S., Costantino, P. and Cardarelli, M., 2011. Cadmium tolerance and phytochelatin content of *Arabidopsis* seedlings over-expressing the phytochelatin synthase gene AtPCS1. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 5509-5519.
- Chaurasia, N., Mishra, Y. and Rai, L. C., 2008. Cloning expression and analysis of phytochelatin synthase (*pcs*) gene from *Anabaena* sp. PCC 7120 offering multiple stress tolerance in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **376**, 225-230.
- Cherian, G.M. and Chan, H.M., 1993. Biological Functions of Metallothioneins: A Review. In: Suzuki, K.T., Imura, N. and Kimura, M., (Eds.), *Metallothionein III Biological roles and medical implications (Advances in Life Sciences)*, Birkhäuser Verlag, pp. 87-109.
- Chiang, H.C., Lo, J.C., and Yeh, K.C., 2006. Genes associated with heavy metal tolerance and accumulation in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*: A genomic survey with cDNA Microarray. *Environmental Science and Technology*, **40**, 6792-6798.
- Clemens, S., Kim, E.J., Neumann, D. and Schroeder, J.I., 1999. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO Journal*, **18**, 3325-3333.
- Clemens, S., 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, **88**, 1707-1719.
- Clemens, S. and Peršoh, S., 2009. Multi-tasking phytochelatin synthases. *Plant Science*, **177**, 266-271.
- Cobbett, C.S., 2000. Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology*, **123**, 825-832.
- Cobbett, C. and Goldsbrough, P.B., 2002. Phytochelatin and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Reviews of Plant Biology*, **53**, 159-182.
- Collin-Hansen, C., Pedersen, S.A. and Andersan, R.A., 2007. First report of phytochelatin in a mushroom: Induction of phytochelatin by metal exposure in *Boletus edulis*. *Mycologia*, **99**, 161-174.
- De Knecht, J.A., Van Dillen, M., Koevoets, P., Schat, H., Verkleij, J. and Ernst, W., 1994. Phytochelatin in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris* (chain length distribution and sulfide incorporation). *Plant Physiology*, **104**, 255-261.
- Dixon, D.P., Cummins, L., Cole, D.J. and Edwards, R., 1998. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Current Opinions in Plant Biology*, **1**, 258-266.
- Diwan, H., Khan, I., Ahmad, A. and Iqbal, M., 2010. Induction of phytochelatin and antioxidant defence system in *Brassica juncea* and *Vigna radiata* in response to chromium treatments. *Plant Growth Regulation*, **61**, 97-107.
- Domènech, J., Orihuela, R., Mir, G., Molinas, M., Atrian,

- S. and Capdevila, M., 2007. The CdII-binding abilities of recombinant *Quercus suber* metallothionein: Bridging the gap between phytochelatin and metallothioneins. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **12**, 867-882.
- Duan, G.L., Hu, Y., Liu, W.J., Kneer, R., Zhao, F.J. and Zhu, Y.G., 2011. Evidence for a role of phytochelatin in regulating arsenic accumulation in rice grain. *Environmental and Experimental Botany*, **71**, 416-421.
- Ebbs, S., Lau, I., Ahner, B. and Kochian, L., 2002. Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (J & C. Presl). *Planta*, **214**, 635-640.
- Ernst, W.H., Krauss, G.J., Verkleij, J.A. and Wesenberg, D., 2008. Interaction of heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. *Plant Cell and Environment*, **31**, 123-143.
- Foley, R.C., Liang, Z.M. and Singh, K.B., 1997. Analysis of type 1 metallothionein cDNAs in *Vicia faba*. *Plant Molecular Biology*, **33**, 583-591.
- Foyer, C.H. and Noctor, G., 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, **17**, 1866-1875.
- Freisinger, E., 2007. Spectroscopic characterization of a fruit-specific metallothionein: *M. acuminata* MT3. *Inorganica Chimica Acta*, **360**, 369-380.
- Freisinger, E., 2009. Metallothioneins in plants. *Metal Ions in Life Sciences*, **5**, 107-153.
- Gasic, K. and Korban, S.S., 2007. Expression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase in indian mustard (*Brassica juncea*) plants enhances tolerance for Cd and Zn. *Planta*, **225**, 1277-1285.
- Gisbert, C., Ros, R., De Haro, A., Walker, D.J., Pilar Bernal, M., Serrano, R. and Navarro-Avino, J., 2003. A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **303**, 440-445.
- Grill, E., Löffler, S., Winnaker, E.L. and Zenk, M.H., 1989. Phytochelatin, the heavy metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **86**, 6838-9842.
- Grispen, V.M.J., Irtelli, B., Hakvoort, H.W.J., Vooijs, R., Bliet, T., ten Bookum, W.M., Verkleij, J.A.C. and Schat, H., 2009. Expression of the *Arabidopsis* metallothionein 2b enhances arsenite sensitivity and root to shoot translocation in tobacco. *Environmental and Experimental Botany*, **66**, 69-73.
- Grispen, V.M.J., Hakvoort, H.W.J. Bliet, T., Verkleij, J.A.C. and Schat, H., 2011. Combined expression of the *Arabidopsis* metallothionein mt2b and the heavy metal transporting ATPase HMA4 enhances cadmium tolerance and the root to shoot translocation of cadmium and zinc in tobacco. *Environmental and Experimental Botany*, **72**, 71-76.
- Gueldry, O., Lazard, M., Delort, F., Dauplais, M., Grigoras, I., Blanquet, S. and Plateau, P., 2003. Ycf1p dependent Hg(II) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, **270**, 2486-2496.
- Guo, W.-J., Bundithya, W. and Goldsbrough, P.B., 2003. Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: Tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytologist*, **159**, 369-381.
- Guo, J., Dai, X., Xu, W. and Ma, M., 2008. Overexpressing GSH1 and AsPCS1 simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*, **72**, 1020-1026.
- Gupta, D.K., Huang, H.G., Yang, X.E., Razafindrabe, B.H.N. and Inouhe, M., 2010. The detoxification of lead in *Sedum alfredii* H. is not related to phytochelatin but the glutathione. *Journal of Hazardous Materials*, **177**, 437-444.
- Ha, S.B., Smith, A.P., Howden, R., Dietrich, W.M., Bugg, S., O'Connell, M.J., Goldsbrough, P.B. and Cobbett, C.S., 1999. Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell*, **11**, 1153-1163.
- Hammond, J.P., Bowen, H.C., White, P.J., Mills, V., Pyke, K.A., Baker, A.J., Whiting, S.N., May, S.T. and Broadley, M.R., 2006. A comparison of the *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi arvense* shoot transcriptomes. *New Phytologist*, **170**, 239-260.
- Hassinen, V.H., Tuomainen, M., Peräniemi, S., Schat, H., Kärenlampi, S.O. and Tervahauta, A.I., 2009. Metallothioneins 2 and 3 contribute to metal-adapted phenotype but are not directly linked to Zn accumulation in metal hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 187-196.
- Hassinen, V.H., Tervahauta, A.I., Schat, H. and Kärenlampi, S.O., 2011. Plant metallothioneins – Metal chelators with ROS scavenging activity? *Plant Biology*, **13**, 225-232.
- Heiss, S., Wachter, A., Bogs, J., Cobbett, C. and Rausch, W., 2009. Overexpression of the metallothionein 2b gene in *Arabidopsis thaliana* increases tolerance to cadmium and zinc. *Plant Cell and Environment*, **32**, 1020-1026.

- T., 2003. Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure. *Journal of Experimental Botany*, **54**, 1833-1839.
- Huang, G.Y. and Wang, Y.S., 2009. Expression analysis of type 2 metallothionein gene in mangrove species (*Bruguiera gymnorhiza*) under heavy metal stress. *Chemosphere*, **77**, 1026-1029.
- Huang, G.Y. and Wang, Y.S., 2010. Expression and characterization analysis of type 2 metallothionein from grey mangrove species (*Avicennia marina*) in response to metal stress. *Aquatic Toxicology*, **99**, 86-92.
- Huang, G.Y., Wang, Y.S. and Ying, G.G., 2011. Cadmium-inducible BgMT2, a type 2 metallothionein gene from mangrove species (*Bruguiera gymnorhiza*), its encoding protein shows metal-binding ability. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **405**, 128-132.
- Iglesia-Turiño, S., Febrero, A., Jauregui, O., Caldelas, C., Araus, J.L. and Bort, J., 2006. Detection and quantification of unbound phytochelatin 2 in plant extracts of *Brassica napus* grown with different levels of mercury. *Plant Physiology*, **142**, 742-749.
- Jack, E., Hakvoort, H.W.J., Reumer, A., Verkleij, J.A.C., Schat H. and Ernst W.H.O., 2007. Real-time PCR analysis of metallothionein-2b expression in metalcoloured and non-metalcoloured populations of *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. *Environmental and Experimental Botany*, **59**, 84-91.
- Kamiya, T. and Fujiwara, T., 2011. A novel allele of the *Arabidopsis* phytochelatin synthase 1 gene conferring high sensitivity to arsenic and antimony. *Soil Science and Plant Nutrition*, **57**, 272-278.
- Kim, D.Y., Bovet, L., Kushnir, S., Noh, E.W., Martinoia, E. and Lee, Y., 2006. AtATM3 is involved in heavy metal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **140**, 922-932.
- Kohler, A., Blaudez, D., Chalot, M. and Martin, F., 2004. Cloning and expression of multiple metallothioneins from hybrid poplar. *New Phytologist*, **164**, 83-93.
- Lane, B., Kajioka, R. and Kennedy, T., 1987. The Wheat-Germ-Ec Protein is a zinc containing metallothionein. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire*, **65**, 1001-1005.
- Lee, S., Moon, J.S., Ko, T.S., Petros, D., Goldsbrough, P.B. and Korban, S.S., 2003. Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress. *Plant Physiology*, **131**, 656-663.
- Li, Z.S., Lu, Y.P., Zhen, R.G., Szczycka, M., Thiele, D.J. and Rea, P.A. 1997. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**, 42-47.
- Li, Y., Dhankher, O.M., Carreira, L., Lee, D., Chen, A., Schroeder, J.I., Balish, R.S. and Meagher, R.B., 2004. Overexpression of phytochelatin synthase in *Arabidopsis* leads to enhanced arsenic tolerance and cadmium hypersensitivity. *Plant and Cell Physiology*, **45**, 1787-1797.
- Li, J.C, Guo, J.B. Xu, W.Z. and Ma, M. 2007. RNA interference-mediated silencing of phytochelatin synthase gene reduce cadmium accumulation in rice seeds. *Journal of Integrative Biology*, **49**, 1032-1037.
- Li, H., Shi, W.Y., Shao, H.B. and Shao, M.A., 2009. The remediation of the lead-polluted garden soil by natural zeolite. *Journal of Hazardous Materials*, **169**, 1106-1111.
- Liang, G., Lia, X., Du, G. and Chen, J., 2009. A new strategy to enhance glutathione production by multiple H₂O₂-induced oxidative stresses in *Candida utilis*. *Bioresource Technology*, **100**, 350-355.
- Liu, W.J., Wood, B.A., Raab, A., McGrath, S.P., Zhao, F.J. and Feldmann, J., 2010. Complexation of arsenite with phytochelatin reduces arsenite efflux and translocation from roots to shoots in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **152**, 2211-2221.
- Liu, G.Y., Zhang, Y.X. and Chai, T.Y., 2011. Phytochelatin synthase of *Thlaspi caerulescens* enhanced tolerance and accumulation of heavy metals when expressed in yeast and tobacco. *Plant Cell Reports*, **30**, 1067-1076.
- Maier, T., Yu, C., Küllertz, G. and Clemens, S., 1993. Localization and functional characterization of metal-binding sites in phytochelatin synthases. *Planta*, **218**, 300-308.
- Martinez, M., Bernal, P., Almela, C., Velez, D., Garcia-Agustin, P., Serrano, R. and Navarro-Avino, J., 2006. An engineered plant that accumulates higher levels of heavy metals than *Thlaspi caerulescens*, with yields of 100 times more biomass in mine soils. *Chemosphere*, **64**, 478-485.
- Mendoza-Cozatl, D., Loza-Tavera, H., Hernández-Navarro, A. and Moreno-Sánchez, R., 2005. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, **29**, 653-671.
- Mendoza-Cozatl, D.G., Moreno, A.Q. and Zapata-Perez, O., 2007. Coordinated responses of phytochelatin synthase and metallothionein genes in black

- mangrove, *Avicennia germinans*, exposed to cadmium and copper. *Aquatic Toxicology*, **83**, 306-314.
- Mendoza-Cozatl, D.G., Butko, E., Springer, F., Torpey, J.W., Komives, E.A., Kehr, J. and Schroeder, J.I., 2008. Identification of high levels of phytochelatin, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *Plant Journal*, **54**, 249-259.
- Mendoza-Cozatl, D.G., Zhai, Z., Jobe, T.O., Akmakjian, G.Z., Song, W.Y., Limbo, O., Russell, M.R., Kozlovskyy, V.I., Martinoia, E., Vatamaniuk, O.K., Russell, P. and Schroeder J.I., 2010. Tonoplast-localized Abc2 transporter mediates phytochelatin accumulation in vacuoles and confers cadmium tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 40416-40426.
- Mendoza-Cozatl, D.G., Jobe, T.O., Hauser, F. and Schroeder, J.I., 2011. Long-distance transport, vacuolar sequestration, tolerance, and transcriptional responses induced by cadmium and arsenic. *Current Opinion in Plant Biology*, **14**, 554-562.
- Merrifield, M.E., Chaseley, J., Kille, P. and Stillman, M.J., 2006. Determination of the Cd/S cluster stoichiometry in *Fucus vesiculosus* metallothionein. *Chemical Research in Toxicology*, **19**, 365-375.
- Mir, G., Domenech, J., Huguet, G., Guo, W.J., Goldsbrough, P., Atrian, S. and Molinas, M., 2004. A plant type 2 mt from cork tissue responds to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, **55**, 2483-2493.
- Murphy, A. and Zhou, J., 1997. Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, **113**, 1293-1301.
- Navabpour, S., Morris, K., Allen, R., Harrison, E.A.H., Mackerness, S. and Buchanan-Wollaston, V., 2003. Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, **54**, 2285-2292.
- Noctor, G. and Foyer, C., 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **49**, 249-279.
- Obertello, M., Wall, L., Laplaze, L., Nicole, M., Auguy, F., Gherbi, H., Bogusz, D. and Franche, C., 2007. Functional Analysis of the metallothionein gene cgMT1 isolated from the actinorhizal tree *Casuarina glauca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **20**, 1231-1240.
- Ortiz, D.F., Ruscitti, T., McCue, K.F. and Ow, D.W., 1995. Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 4721-4728.
- Park, J., Song, W.Y., Ko, D., Eom, Y., Hansen, T.H., Schiller, M., Lee, T.G., Martinoia, E. and Lee, Y., 2012. The phytochelatin transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate tolerance to cadmium and mercury. *The Plant Journal*, **69**, 278-288.
- Peroza, E.A., Schmucki, R., Güntert, P., Freisinger, E. and Zerbe, O., 2009. The β_E -domain of wheat Ec-1 metallothionein: A metalbinding domain with a distinctive structure. *Journal of Molecular Biology*, **387**, 207-218.
- Pomponi, M., Censi, V., Di Girolamo, V., De Paolis, A., Di Toppi, L.S., Aromolo, R., Costantino, P. and Cardarelli, M., 2006. Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase in tobacco plants enhances Cd(2+) tolerance and accumulation but not translocation to the shoot. *Planta*, **223**, 180-190.
- Preveral, S., Gayet, L., Moldes, C., Hoffmann, J., Mounicou, S., Gruet, A., Reynaud, F., Lobinski, R., Verbavatz, J.M., Vavasseur, A. and Forestier, C., 2009. A common highly conserved cadmium detoxification mechanism from bacteria to humans: Heavy metal tolerance conferred by the ATP-binding cassette (ABC) transporter SpHMT1 requires glutathione but not metal-chelating phytochelatin peptides. *Journal Biological Chemistry*, **284**, 4936-4943.
- Rausser, W.E., 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochemistry and Biophysics*, **31**, 19-48.
- Rea, P.A., 2007. Plant ATP-binding cassette transporters. *Annual Reviews of Plant Biology*, **58**, 347-375.
- Robinson, N.J., Tommey, A.M., Kuske, C. and Jackson, P.J., 1993. Plant metallothioneins. *Biochemistry Journal*, **295**, 1-10.
- Rodríguez-Llorente, I.D., Pérez-Palacios, P., Doukkali, B., Caviedes, M.A. and Pajuelo, E., 2010. Expression of the seed-specific metallothionein mt4a in plant vegetative tissues increases Cu and Zn tolerance. *Plant Science*, **178**, 327-332.
- Roosens, N.H., Bernard, C., Leplae, R. and Verbruggen, N., 2004. Evidence for copper homeostasis function of metallothionein (MT3) in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *FEBS Letters*, **577**, 9-16.
- Roosens, N.H., Leplae, R., Bernard, C. and Verbruggen, N., 2005. Variations in plant metallothioneins: The

- heavy metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as a study case. *Planta*, **222**, 716-729.
- Ruiz, O.N., Alvarez, D., Torres, C., Roman, L. and Daniell, H. 2011. Metallothionein expression in chloroplasts enhances mercury accumulation and phytoremediation capability. *Plant Biotechnology Journal*, **9**, 609-617.
- Salt, D.E. and Rauser, W.E., 1995. MgATP-dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiology*, **107**, 1293-1301.
- Samardžić, J.T., Nikolić, D.B., Timotijević, G.S., Jovanović, Z.S., Milisavljević, M.G. and Maksimović, V.R., 2010. Tissue expression analysis of FeMT3, a drought and oxidative stress related metallothionein gene from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Journal of Plant Physiology*, **167**, 1407-1411.
- Sánchez-Fernández, R., Davies, T.G., Coleman, J. O. and Rea, P.A., 2001. The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 30231-30244.
- Sauge-Merle, S., Cuine, S., Carrier, P., Lecomte-Pradines, C., Luu, D.T. and Peltier, G., 2003. Enhanced toxic metal accumulation in engineered bacterial cells expressing *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 490-494.
- Schat, H., Llugany, M., Vooijs, R., Hartley-Whitaker, J. and Bleeker, P.M., 2002. The role of phytochelatin in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 2381-2392.
- Schicht, O. and Freisinger, E., 2009. Spectroscopic characterization of *Cicer arietinum* metallothionein 1. *Inorganica Chimica Acta*, **362**, 714-724.
- Schor-Fumbarov, T., Goldsbrough, P.B., Adam, Z. and Tel-Or, E., 2005. Characterization and expression of a metallothionein gene in the aquatic fern *Azolla filiculoides* under heavy metal stress. *Planta*, **223**, 69-76.
- Singh, S., Lee, W., Dasilva, N.A., Mulchandani, A. ve Chen, W., 2008. Enhanced arsenic accumulation by engineered yeast cells expressing *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase. *Biotechnology and Bioengineering*, **99**, 333-340.
- Song, W.Y., Park, J., Mendoza-Cozatl, D.G., Suter-Grotemeyer, M., Shim, D., Hortensteiner, S., Geisler, M., Weder, B., Rea, P.A., Rentsch, D., Schroeder, J.I., Lee, Y. and Martinoia, E., 2010. Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABCC-type phytochelatin transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **107**, 21187-21192.
- Sooksa-Nguan, T., Yakubov, B., Kozlovskyy, V.I., Barkume, C.M., Howe, K.J.H., Thannhauser, T.W., Rutzke, M.A., Hart, J.J., Kochian, L.V., Rea, P.A. and Vatamaniuk, O.K., 2009. *Drosophila* ABC transporter, DmHMT-1, confers tolerance to cadmium. DmHMT-1 and its yeast homolog, SpHMT-1, are not essential for vacuolar phytochelatin sequestration. *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 354-362.
- Sun, Q., Ye, Z.H., Wang, X.R. and Wong, M.H., 2007. Cadmium hyperaccumulation leads to an increase of glutathione rather than phytochelatin in the cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Journal of Plant Physiology*, **164**, 1489-1498.
- Tennstedt, P., Peisker, D., Bottcher, C., Trampczynska, A. and Clemens, S., 2009. Phytochelatin synthesis is essential for the detoxification of excess zinc and contributes significantly to the accumulation of zinc. *Plant Physiology*, **149**, 938-948.
- Tsai, S.L., Singh, S., DaSilva, N.A. and Chen, W., 2011. Co-expression of *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase and *Treponema denticola* cysteine desulfhydrase for enhanced arsenic accumulation. *Biotechnology and Bioengineering*, **109**, 605-608.
- Usha, B., Prashanth, S.R. and Parida, A., 2007. Differential expression of two metallothionein encoding genes during heavy metal stress in the mangrove species, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Current Science*, **93**, 1215-1219.
- Usha, B., Venkataraman, G. and Parida, A., 2009. Heavy metal and abiotic stress inducible metallothionein isoforms from *Prosopis juliflora* (SW) D.C. show differences in binding to heavy metals in vitro. *Molecular Genetics and Genomics*, **281**, 99-108.
- Xiang, C. and Oliver, D., 1998. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**, 1539-1550.
- Xue, T., Li, X., Zhu, W., Wu, C., Yang, G. and Zheng, C., 2009. Cotton metallothionein GhMT3a, a reactive oxygen species scavenger, increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 339-349.
- van de Mortel, J.E., Almar Villanueva, L., Schat, H., Kwekkeboom, J., Coughlan, S., Moerland, P.D., Ver Loren van Themaat, E., Koornneef, M. and Aarts, M.G.M., 2006. Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator

- Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology*, **142**, 1127-1147.
- van Hoof, N.A., Hassinen, V.H., Hakvoort, H.W., Ballintijn, K.F., Schat, H., Verkleij, J.A., Ernst, W.H., Kärenlampi, S.O. and Tervahauta, A.I., 2001. Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. *Plant Physiology*, **126**, 1519-1526.
- Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lu, Y.P. and Rea, P.A., 2000. Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase-blocked thiols are sufficient for pc synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 31451-31459.
- Verbruggen, N., Hermans, C. and Schat, H., 2009. Mechanisms to cope with arsenic or cd excess in plants. current opinion in plant biology, **12**, 364-372.
- Wachter, A., Wolf, S., Steininger, H., Bogs, J. and Rausch, T., 2005. Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae. *Plant Journal*, **41**, 15-30.
- Wan, X. and Freisinger, E., 2009. The plant metallothionein 2 from *Cicer arietinum* forms a single metal-thiolate cluster. *Metallomics*, **1**, 489-500.
- Wang, X., Song, Y., Mac, Y., Zhuo, R. and Jin, L., 2011. Screening of Cd tolerant genotypes and isolation of metallothionein genes in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental Pollution*, **159**, 3627-3633.
- Wojas, S., Clemens, S., Hennig, J., Skodowska, A., Kopera, E., Schat, H., Bal, W. and Antosiewicz, D.M., 2008. Overexpression of phytochelatin synthase in tobacco: Distinctive effects of AtPCS1 and CePCS genes on plant response to cadmium. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 2205-2219.
- Wong, H.L., Sakamoto, T., Kawasaki, T., Umemura, K. and Shimamoto, K., 2004. Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. *Plant Physiology*, **135**, 1447-1456.
- Wu, G., Kang, H.B., Zhang, X.Y., Shao, H.B., Chu, L.Y. and Ruan, C.J., 2010. A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: Issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. *Journal of Hazardous Materials*, **174**, 1-8.
- Yadav, S.K., 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, **76**, 167-179.
- Yang, P.G., Mao, R.Z., Shao, H.B. and Gao, Y.F., 2009a. An investigation on the distribution of eight hazardous heavy metals in the suburban farmland of China. *Journal of Hazardous Materials*, **167**, 1246-1251.
- Yang, Z., Wu, Y., Li, Y., Ling, H.Q. and Chu, C., 2009b. OsMT1a, a type 1 metallothionein, plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice. *Plant Molecular Biology*, **70**, 219-229.
- Yang, J.L., Wang, Y.C., Liu, G.F., Yang, C.P. and Li, C.H., 2011. *Tamarix hispida* metallothionein-like *ThMT3*, a reactive oxygen species scavenger, increases tolerance against Cd²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, and NaCl in transgenic yeast. *Molecular Biology Reports*, **38**, 1567-1574.
- Zhang, Y.W., Tam, N.F.Y. and Wong, Y.S., 2004. Cloning and characterization of type 2 metallothionein-like gene from a wetland plant *Typha latifolia*. *Plant Science*, **167**, 869-877.
- Zhang, H., Xu, W., Guo, J., He, Z. and Ma, M., 2005. Coordinated responses of phytochelatins and metallothioneins to heavy metals in garlic seedlings. *Plant Science*, **169**, 1059-1065.
- Zhang, Z.C., Chen, B.X. and Qiu, B.S., 2010. Phytochelatin synthesis plays a similar role in shoots of the cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii* as in non-resistant plants. *Plant, Cell and Environment*, **33**, 1248-1255.
- Zhigang, A., Cuijie, L., Yuangang, Z., Yejie, D., Wachter, A., Gromes, R. and Rausch, T., 2006. Expression of *BjMT2*, a metallothionein 2 from *Brassica juncea*, increases copper and cadmium tolerance in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*, but inhibits root elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 3575-3582.
- Zhou, J. and Goldsbrough, P.B., 1994. Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **6**, 875-884.
- Zimeri, A.M., Dhankher, O.P., McCaig, B. and Meagher R.B., 2005. The plant MT1 metallothioneins are stabilized by binding cadmium and are required for cadmium tolerance and accumulation. *Plant Molecular Biology*, **58**, 839-955.