

Diss. ETH No. 15413

**MOLECULAR INSIGHT INTO TRANSITION METAL
TRANSPORT IN THE GREEN MICROALGA
*CHLAMYDOMONAS REINHARDTII***

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

ALEXANDRA ROSAKIS
Dipl. Biol., University of Konstanz

born 23. 08. 1976
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Alexander J. B. Zehnder, examiner
PD Dr. Wolfgang Köster, co-examiner
Prof. Dr. Thomas Buckhout, co-examiner

Zurich, 2004

Summary

Trace amounts of certain transition metals often referred to as “heavy metals” act as cofactors for proteins involved in vital cellular processes. The very same metals as well as others with no essential function can be harmful to the cell if they exceed physiological concentrations. Consequently, mechanisms preserving a stable metal environment within the cell are of outstanding importance. In this context, a decisive role is played by systems which enable the passage of these micronutrients across biological membranes. Supply of the cell with the necessary amounts of metals is guaranteed by uptake systems or systems which release metal stores from intracellular compartments, and metal resistance can be achieved by systems serving the reverse function. The molecular background of these transport processes in algae is not as extensively studied as in other organisms. We chose the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* as a model organism in order to identify systems which are used by algae to facilitate metal transport. *C. reinhardtii* is suitable for such a study since there are some sequence data available and it is established as a laboratory organism. In the *C. reinhardtii* EST (expressed sequence tags) database I was able to identify a sequence which on the amino acid level showed high similarity to members of the Nramp family. Nramps (natural resistance associated macrophage proteins) constitute a group of proteins acting in the transport of divalent metal cations. They occur in a great number of organisms sharing remarkable sequence similarity and displaying broad substrate specificity. We reasoned that the wide distribution and the high degree of conservation of these proteins underscore their importance to cell survival. Therefore, the main part of this work concentrates on the cloning and functional characterization of the *C. reinhardtii* Nramp homologue, which was named DMT1 in the present study.

To study DMT1 function, I performed yeast complementation assays with three different yeast mutant strains deficient in manganese (*smf1*), zinc (*zrt1/zrt2*) or iron uptake (*fet3/fet4*). After transforming the strains with a plasmid moderately expressing DMT1, I monitored the effect of expression of the foreign gene in growth experiments. For this, maximal growth rates of each yeast mutant strain in minimal medium (control) and in minimal medium with the metal chelators EGTA or EDTA (metal deficient conditions) were compared. The DMT1 expressing mutant strains were compared to the control strain (mutant transformed with the empty vector) in terms of change in growth rate under the different

conditions. In the case of the manganese and iron uptake deficient strains, stable expression of DMT1 (verified by western blotting) improved growth under metal limitation conditions compared to the control cells. These results clearly demonstrated that DMT1 is capable of metal transport.

To further investigate the specificity of the transport protein, I performed growth experiments – in a reverse fashion than above – and checked whether expression of DMT1 limits growth by conferring increased sensitivity to elevated metal concentrations. I tested growth of the *smf1* yeast strain, which is an Nramp knockout, under different culture conditions and showed that DMT1 expression rendered the *smf1* mutant sensitive to manganese, copper and the non-essential metal cadmium, suggesting that these metals are transported by DMT1. Thus, the broad specificity described for Nramps was also confirmed for the *C. reinhardtii* homologue. In the case of zinc, the growth rate under metal limiting conditions did not change when DMT1 was expressed. However, addition of zinc reduced sensitivity of the *smf1* strain to increased manganese concentrations. This might indicate that zinc can compete with manganese for binding sites on the DMT1 protein even if it is not transported.

In further experiments, I tested mutants of the DMT1 protein on expression and function, gaining information on the essentiality of individual amino acid residues. Only one of the three mutated protein versions was functional in a yeast complementation assay although an absolutely conserved amino acid was substituted in this protein.

Recently, a first draft of the *C. reinhardtii* genome was made available (Doe Joint Genome Institute, California, <http://genome.jgi-psf.org/chlre1/chlre1.home.html> [52]). I conducted a thorough search in the genomic sequence which allowed a more general insight into the metal transport systems the alga possesses. By this search I identified several putative transport systems belonging to different protein families and a total of five Nramp homologues in the genome.

Zusammenfassung

Bestimmte Elemente, die zu der Gruppe der Übergangsmetalle gehören und oft als “Schwermetalle” bezeichnet werden, spielen eine wichtige Rolle als Protein-Kofaktoren in lebensnotwendigen zellulären Prozessen. Überschreitet die intrazelluläre Konzentration dieser Übergangsmetalle die physiologische Grenze, kann das negative Auswirkungen für die Zelle haben. Folglich sind Mechanismen, die für ein stabiles Gleichgewicht der Metallkonzentrationen innerhalb der Zelle sorgen, von ausserordentlicher Bedeutung. Eine ausschlaggebende Rolle dabei spielen Systeme, die für den Durchtritt von Metallionen durch biologische Membranen sorgen. Eine Versorgung der Zelle mit der nötigen Menge an Metallen wird durch Aufnahmesysteme gewährleistet oder durch Systeme, die Metallvorräte aus intrazellulären Kompartimenten zur Verfügung stellen. Metallresistenz kann mit Systemen erreicht werden, die die entgegengesetzte Funktion erfüllen. Der molekulare Hintergrund dieser Transportprozesse in Algen ist weniger umfassend untersucht worden als in anderen Organismen. Wir wählten die grüne einzellige Alge *Chlamydomonas reinhardtii* als einen Modellorganismus, um Systeme zu identifizieren, die in Algen dem Metalltransport dienen. *C. reinhardtii* ist für diese Studie geeignet, weil Sequenzierdaten zum Teil vorhanden sind und weil die Alge als Labororganismus schon etabliert ist. In der *C. reinhardtii* EST (expressed sequence tag) Datenbank identifizierte ich eine Sequenz, die auf Aminosäure-Ebene eine hohe Ähnlichkeit zu Proteinen der Nramp Familie aufweist. Proteine die zu der Gruppe der Nramps (natural resistance associated macrophage proteins) gehören, agieren als Transporter für divalente Metallionen. Sie kommen in einer grossen Anzahl von Organismen vor, zeigen eine hohe Sequenzähnlichkeit untereinander und besitzen eine breite Substratspezifität. Die weite Verbreitung und der hohe Grad der Konservierung dieser Proteine unterstreicht ihre Bedeutung für die Zelle. Aus diesem Grund konzentrierte sich der Hauptteil dieser Arbeit auf die Klonierung und funktionelle Charakterisierung des *C. reinhardtii* Nramp-Homologs, welches in der vorliegenden Arbeit als DMT1 bezeichnet wurde.

Um die Funktion von DMT1 zu untersuchen, benutzte ich drei verschiedene Hefe-Mutantenstämme, bei denen die Transportaktivität für Mangan (*smf1*), Zink (*zrt1/zrt3*) und Eisen (*fet3/fet4*) stark beeinträchtigt ist. Nachdem ich die Stämme mit einem Plasmid transformiert hatte, das eine moderate Expression von DMT1 erlaubte, verfolgte ich die Auswirkung der Expression des Fremdgens mittels Wachstumstests. Dafür wurden die

maximalen Wachstumsraten jedes Hefestammes in Minimalmedium (Kontrolle) und in Minimalmedium mit den Metallchelatoren EGTA oder EDTA (Metallmangel) verglichen. Die Mutanten, die DMT1 exprimierten, wurden mit dem Kontrollstamm (Mutante transformiert mit leerem Vektor) hinsichtlich einer Veränderung der Wachstumsrate unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen verglichen. Stabile Expression von DMT1 (bestätigt mittels western blots) verbesserte das Wachstum der *smf1* und *fet3/fet4* Mutanten unter Metallmangel-Bedingungen, im Vergleich zur Kontrollkultur. Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass DMT1 Metallionen transportierte.

Um die Frage der Spezifität des Transporters weiter zu untersuchen, führte ich Wachstumstests durch, und untersuchte ob die Expression von DMT1 eine erhöhte Sensitivität gegenüber hohen Metallkonzentrationen bewirken und somit das Wachstum der Zellen beeinträchtigen kann. Ich testete das Wachstum der *smf1* Mutante, welche ein Nramp Knockout ist, unter verschiedenen Metallbedingungen und zeigte, dass DMT1 Mangan-, Kupfer- und Cadmium-Ionen transportieren kann. Somit wurde die breite Spezifität, die für andere Nramps beschrieben wurde, auch für das *C. reinhardtii* Homolog bestätigt. Was die *zrt1/zrt3* Mutante betrifft, bewirkte die DMT1 Expression keine Veränderung im Wachstum unter Metallmangelbedingungen. Jedoch verminderte die Zugabe von Zink die Sensitivität eines *smf1* Stammes gegenüber erhöhten Mangankonzentrationen. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass Zink mit Mangan um die Bindestellen auf dem DMT1 Protein konkurrieren kann, auch wenn Zink nicht transportiert wird.

Ferner untersuchte ich Mutationen im DMT1 Protein, um Informationen bezüglich der Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Expression und die Funktion des Proteins zu bekommen. Nur eines der drei mutierten Proteinderivate war funktionell in einem Hefe-Komplementierungssystem, obwohl in diesem Protein eine absolut konservierte Aminosäure ersetzt war.

Unlängst wurde im Internet eine erste Version der genomischen Sequenz von *C. reinhardtii* aufgeschaltet (Doe Joint Genome Institute, California, <http://genome.jgi-psf.org/chlre1/chlre1.home.html>, [52]). Eine gründliche Recherche in der genomischen Sequenz erlaubte Einsicht in verschiedene Metallsysteme, die die Alge besitzt. Ich identifizierte mehrere mutmassliche Transportsysteme, die zu verschiedenen Proteinfamilien gehören, sowie fünf Nramp-Homologe im Genom der Alge.