

**Regulation von Faktoren der Metallhomöostase und der Metalldetoxifikation  
unter Schwermetallstress und während der Blattseneszenz in Gerste**

***(Hordeum vulgare)***



**Dissertation**

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

**vorgelegt der**

**Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg**

**von Herrn Dipl.-Biol. Jan Heise  
geb. am 03.08.71 in Flensburg**

**Gutachter:**

**1: Prof. Dr. K. Humbeck (Inst. f. Pflanzenphysiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)**

**2: Prof. Dr. G.J. Krauss (Inst. f. Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)**

**3: Prof. Dr. D. Tomos (School of Biological Sciences, University of Wales, Bangor, UK)**

**Halle (Saale), 20.02.04**

**Die Dissertation wurde am 23.06.04 erfolgreich verteidigt.**

**urn:nbn:de:gbv:3-000006909**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006909>]

# **Inhaltsverzeichnis**

## **Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen**

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Schwermetalle: Definition, natürliche Vorkommen und Verfügbarkeit.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Schwermetalle als Lebensnotwendigkeit und als Gefahrenpotenzial.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3</b>	<b>Vom Boden in die Zelle: Metallaufnahme und Distribution.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3.1</b>	<b>Metallaufnahme in die Wurzel.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Xylem-Transport.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3.3</b>	<b>Aufnahme von Cadmium.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3.4</b>	<b>Zelluläre Metallaufnahme und Distribution.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4.</b>	<b>Zelluläre metallbindende Faktoren in Pflanzen.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4.1</b>	<b>Metallothioneine.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Phytochelatine.....</b>	<b>13</b>
<b>1.5</b>	<b>Blattseneszenz und Schwermetallstress.....</b>	<b>14</b>
<b>1.5.1</b>	<b>Allgemeine Aspekte der Blattseneszenz.....</b>	<b>14</b>
<b>1.5.2</b>	<b>Regulation der Blattseneszenz.....</b>	<b>16</b>

<b>2.</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>18</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.</b>	<b>Pflanzenanzucht und Exposition mit Schwermetallen.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2</b>	<b>Bestimmung des Chlorophyllgehaltes.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3</b>	<b>Bestimmung der Photosystem II Effizienz.....</b>	<b>22</b>
<b>3.4.</b>	<b>RT-PCR / PCR Reaktionen / Primer.....</b>	<b>22</b>
<b>3.5</b>	<b>Bakterienstämme und Vektoren.....</b>	<b>24</b>
<b>3.6</b>	<b>DNA / RNA Größenstandards.....</b>	<b>25</b>
<b>3.7</b>	<b>DNA-Isolation.....</b>	<b>25</b>
<b>3.8</b>	<b>Isolierung von Gesamt-RNA.....</b>	<b>26</b>
<b>3.9</b>	<b>Isolierung von poly(A)<sup>+</sup>-RNA.....</b>	<b>28</b>
<b>3.10</b>	<b>Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese.....</b>	<b>28</b>
<b>3.11</b>	<b>Northern-Blotting.....</b>	<b>29</b>
<b>3.12</b>	<b>RFDD-PCR (Restriction Fragment Differential Display – PCR).....</b>	<b>30</b>
<b>3.12.1</b>	<b>cDNA Synthese.....</b>	<b>32</b>

<b>3.12.2</b>	<b>Template Herstellung.....</b>	<b>33</b>
<b>3.12.3</b>	<b><sup>33</sup>P-Endmarkierung, Vervielfältigung der cDNA-Fragmente und Detektion.....</b>	<b>35</b>
<b>3.12.4</b>	<b>Herstellung von cDNA-Sonden.....</b>	<b>37</b>
<b>3.13</b>	<b>DNA-Agarosegelelektrophorese.....</b>	<b>38</b>
<b>3.14</b>	<b>Reinigung von DNA aus Agarosegelen.....</b>	<b>38</b>
<b>3.15</b>	<b>Ligation von DNA-Fragmenten.....</b>	<b>38</b>
<b>3.16</b>	<b>Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i>-Zellen und Transformation von Vektoren.....</b>	<b>39</b>
<b>3.17</b>	<b>Kolonie-PCR.....</b>	<b>40</b>
<b>3.18</b>	<b>Herstellung von <i>E. coli</i>-Gefrierkulturen.....</b>	<b>41</b>
<b>3.19</b>	<b>Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>3.20</b>	<b>DNA-Sequenzierung.....</b>	<b>41</b>
<b>3.21</b>	<b>Protein-Isolation.....</b>	<b>42</b>
<b>3.22</b>	<b>SEC (Size-Exclusion-Chromatography).....</b>	<b>42</b>
<b>3.23</b>	<b>GF-AAS (Graphit-Furnace-Atomic-Absorbance-Spectroscopy).....</b>	<b>43</b>
<b>3.24</b>	<b>CZE (Capillary-Zone-Electrophoresis).....</b>	<b>43</b>

<b>3.25</b>	<b>ESI-MS (Electrospray-Ionisation-Mass-Spectrometry).....</b>	<b>44</b>
<b>3.26</b>	<b>Phytochelatin-Isolation, Derivatisierung und Nachweis.....</b>	<b>44</b>
<b>3.27</b>	<b>Tocopherol-Bestimmung.....</b>	<b>45</b>
<b>3.28</b>	<b>Medien, Puffer, Lösungen und Stammlösungen.....</b>	<b>46</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>52</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Etablierung des Versuchssystems und physiologische Charakterisierung von Primärblättern der Gerste während der natürlichen Blatt- seneszenz und nach Exposition der Pflanzen mit den Schwermetallen Cadmium und Kupfer.....</b>	<b>52</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Charakterisierung des Schwermetallstress.....</b>	<b>54</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Einfluss von Kupfer- und Cadmium auf die <math>\alpha</math>-und <math>\gamma</math>-Tocopherolsynthese.....</b>	<b>57</b>
<b>4.2.</b>	<b>Metallothioneine.....</b>	<b>59</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Isolation von Gersten Metallothionein cDNAs und Charakterisierung der Genexpression.....</b>	<b>59</b>
<b>4.2.1.1</b>	<b>Isolation von Gersten Metallothionein cDNAs.....</b>	<b>59</b>

4.2.1.2 Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen der isolierten Gersten MTs mit bekannten MTs der Familie der Poaceen.....	63
4.2.1.2 Expressionsanalysen der identifizierten MTs in Primärblättern nach Schwermetallexposition und während der natürlichen Blattseneszenz.....	67
4.2.1.3 Vergleich der Genexpression von <i>HvMT-1a</i> und <i>HvMT-2a</i> bei 48h Exposition mit einer 2,5mM Kupferchloridkonzentration.....	71
4.2.1.4 Vergleich der Genexpression von <i>HvMT-1a</i> und <i>Ids-1</i> in Wurzeln und Primärblättern nach 48h Cd-Exposition.....	72
4.2.1.5 Genexpression von <i>HvMT-1a</i> nach längerer Cd-Exposition (0-96h).....	73
4.2.1.7 Metallothionein-Expression nach Exposition mit anderen Schwermetallen....	75
4.2.2 Nachweis von Metallothioneinen auf Proteinebene.....	77
4.2.2.1 Auftrennung von cysteinreichen Proteinen mittels Gelchromato- graphie .....	77
4.2.2.2 Bestimmung des Cadmiumgehaltes der durch SEC aufgetrennten Protein- fraktionen mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie (GF-AAS).....	79
4.2.2.3 Sensitive Auftrennung der mutmaßlichen MT-Proteinfraktion mittels Kapillar-Zonen-Elektrophorese .....	80
4.3. Phytochelatin-Synthase /Phytochelatine.....	83
4.3.1 Isolation von cDNA-Fragmenten der Phytochelatin-Synthase (PCS) aus Primärblättern der Gerste.....	83

4.3.2	Analyse zur Genexpression der PCS.....	84
4.3.3	Isolation und Identifikation von Phytochelatinen mittels HPLC.....	87
4.4	Faktoren der Kupferhomöostase: <i>CCH</i> und <i>BCB</i> .....	88
4.4.1	Isolation von cDNAs codierend für mögliche Faktoren der Kupferhomöostase: <i>CCH</i> und <i>BCB</i> .....	88
4.4.2	Expressionsanalysen von <i>HvBCB</i> und <i>HvCCH</i> in Primärblättern nach Schwermetallexposition und während der natürlichen Blattseneszenz...	91
4.5	Identifikation von cadmiuminduzierten Genen.....	92
4.5.1	Isolation von cDNAs nach 48 h Cadmiumexposition mittels Restriction Fragment Differential Display-PCR (RFDD-PCR).....	92
4.5.2	Sequenzvergleiche der mittels RFDD-PCR erhaltenen cDNA-Fragmente.....	94
4.5.3	Expressionsanalysen von isolierten cDNA-Fragmenten mittels RFDD-PCR in Primärblättern nach Schwermetallexposition und während der natürlichen Blattseneszenz.....	97
5.	Diskussion.....	98
5.1	Allgemeine Betrachtung.....	98
5.2	Physiologische Charakterisierung.....	99
5.3	Tocopherole.....	100

<b>5.4</b>	<b>Phytochelatine.....</b>	<b>103</b>
<b>5.5</b>	<b>Metallothioneine.....</b>	<b>106</b>
<b>5.5.1</b>	<b>Identifikation / Genexpressionsmuster.....</b>	<b>106</b>
<b>5.5.1.1</b>	<b>Typ 1 Metallothioneine.....</b>	<b>108</b>
<b>5.5.1.2</b>	<b>Typ 2 Metallothioneine.....</b>	<b>112</b>
<b>5.5.1.3</b>	<b>Typ 3 Metallothioneine.....</b>	<b>114</b>
<b>5.5.1.4</b>	<b>Typ 4 Metallothioneine.....</b>	<b>117</b>
<b>5.5.2</b>	<b>Metallothioneine: Klassifizierung und Nomenklatur.....</b>	<b>118</b>
<b>5.5.3</b>	<b>Metallothioneine auf Proteinebene.....</b>	<b>120</b>
<b>5.5.4</b>	<b>Zusammenfassung der MT-Ergebnisse.....</b>	<b>122</b>
<b>5.6</b>	<b>Kupferbindende Proteine CCH und BCB.....</b>	<b>124</b>
<b>5.6.1</b>	<b>Copper Chaperon (CCH).....</b>	<b>124</b>
<b>5.6.2</b>	<b>Blue-Copper-Binding-Protein (BCB).....</b>	<b>125</b>
<b>5.7</b>	<b>Cadmiuminduzierte RFDD-PCR cDNA-Fragmente.....</b>	<b>126</b>
<b>5.7.1</b>	<b><i>Cdi1</i>.....</b>	<b>127</b>
<b>5.7.2</b>	<b><i>Cdi2</i>.....</b>	<b>129</b>



<b>5.7.3</b>	<b><i>Bsi1</i></b> .....	<b>129</b>
<b>5.7.4</b>	<b><i>Cdi4</i></b> .....	<b>130</b>
<b>5.7.5</b>	<b><i>Cdi5</i></b> .....	<b>131</b>
<b>5.7.6</b>	<b><i>Cdi6</i></b> .....	<b>132</b>
<b>5.7.7</b>	<b><i>Cdi7</i></b> .....	<b>133</b>
<b>5.7.8</b>	<b>Zusammenfassung der mittels RFDD-PCR isolierten cDNA-Fragmente.....</b>	<b>133</b>
<b>5.8</b>	<b>Cadmiumstress, oxidativer Stress, Seneszenz.....</b>	<b>134</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>137</b>
<b>6.</b>	<b>Summary.....</b>	<b>140</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>143</b>

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Verwendete Abkürzungen werden in der Regel im Text nachfolgend erklärt. Die hier aufgeführten Abkürzungen wurden im Text i.d.R. nicht weiter erläutert. Außerdem wurde auf die Erklärung von „dudenkonformen“ Abkürzungen, sowie Maßeinheiten, die auf dem SI-System beruhen, verzichtet.

Englische Termini, für welche es keine gebräuchlichen deutschen Ausdrücke gibt und die mittlerweile Eingang in die deutschsprachige Fachliteratur gefunden haben, wurden als solche beibehalten. So wird zum Beispiel für den Begriff Oligonukleotid das gebräuchlichere englische Wort *Primer* verwendet.

Abkürzungen für Gene sind kursiv geschrieben (z.B. *CCH*), die Abkürzungen der Proteine hingegen aufrecht (z.B. CCH). Die Groß- und Kleinschreibung dieser Abkürzungen erfolgte in Anlehnung an die Originalliteratur und ist daher nicht einheitlich (z.B. *Atx1*, *OsMT-2*).

aa	Aminosäure(n)
AAS	Atomic Absorbance Spectroscopy
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
cDNA	"copy DNA" (DNA, welche aus RNA durch reverse Transkription entsteht)
CZE	Capillary Zone Electrophoresis
d	day(s) (Tag(e))
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dUTP	desoxyUridin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-Essigsäure
ESI-MS	Electrospray Ionisation –Mass Spectrometry
EST	cDNA-Fragment (" <u>e</u> xpressed <u>s</u> equen <u>ce</u> <u>t</u> ag")
et al.	<i>et alii</i> (lateinisch für "und andere")
FW	fresh weight (Frischmasse)

GFP	Green Fluorescent Protein
GSH	Glutathion
h	hour(s) (Stunde(n))
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICP-MS	Inductively-Coupled-Plasma Mass-Spectrometry
LHC	Light Harvesting Complex
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
MT	Metallothionein
NCBI	National Center for Biotechnology Information ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> )
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von X nm
OEC	Oxygen Evolving Complex
PC	Phytochelatin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PS	Photosystem
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	Reversed Phased High Performance Liquid Chromatography
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Size Exclusion Chromatography
UE	Untereinheit
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
UV	ultraviolett
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
VT	Volumenteil
w/v	Masse pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid
xg	~faches der Erdbeschleunigung $g = 9,81 \text{ m s}^{-1}$