

Untersuchungen zur assimilatorischen Sulfatreduktion in  
*Physcomitrella patens*: Analyse von Transkripten,  
Metaboliten und Enzymaktivitäten unter  
Schwermetallstress



## Dissertation

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

vorgelegt der

**Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von Diplom-Biochemiker Michael Rother

geb. am 19. April 1978

in Halle/Saale

Eingereicht: 18. Dezember 2006

Verteidigt: 03. Mai 2007

Gutachter: Prof. Dr. G.-J. Krauß  
Prof. Dr. R. Hell  
PD Dr. habil. S. Kopriva

**urn:nbn:de:gbv:3-000011752**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011752>]

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	i
Abkürzungsverzeichnis.....	iv
1 Vorwort.....	7
2 Einleitung.....	8
2.1 Schwermetalle/Cadmium.....	8
2.2 Mechanismen der Schwermetall-Detoxifikation.....	10
2.3 Reduktive Sulfatassimilation .....	13
2.4 Glutathion .....	17
2.5 Modellorganismus <i>Physcomitrella patens</i> .....	19
2.6 Zielstellung der Arbeit .....	21
3 Materialien und Methoden .....	23
3.1 Modellorganismus und Anzucht.....	23
3.1.1 Blasenmützenmoos <i>Physcomitrella patens</i> .....	23
3.1.2 ABC-Medium .....	23
3.1.3 Kultivierung .....	24
3.2 Biochemische und analytische Methoden.....	24
3.2.1 Zellaufschluss.....	24
3.2.2 Vitalitätsbestimmung.....	24
3.2.3 RP-HPLC-Analyse von Thiolen mittels Monobrombimanderivatisierung .....	25
3.2.4 Enzymatische Bestimmung von GSH und GSSG .....	26
3.2.5 Bestimmung der Biosorption und Akkumulation von Cd(II).....	28
3.2.6 Aufreinigung von OAS-TL-Protein .....	29
3.3 Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	32
3.3.1 O-Acetylserin(thiol)lyase.....	32
3.3.2 $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase und Glutathion-Synthetase .....	33
3.3.3 Glutathion-S-Transferasen (GST) .....	34
3.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford .....	34
3.4 Molekularbiologische Methoden .....	34
3.4.1 Datenbankrecherche .....	34
3.4.2 Primerdesign .....	35
3.4.3 RNA-Isolation .....	36
3.4.4 cDNA-Synthese .....	36
3.4.5 Real-time-PCR.....	36
3.4.6 Überprüfung der $\Delta apr$ -Mutanten.....	37
3.4.7 Agarose-Gelelektrophorese.....	37
3.4.8 DNA-Extraktion aus Agarosegelen .....	37
3.4.9 DNA-Sequenzierung.....	38

3.5	Statistik.....	38
3.6	Mikroskopische Dokumentation.....	39
3.6.1	Lichtmikroskopische Untersuchung.....	39
3.6.2	Fluoreszenzmikroskopie zur Lokalisierung von Cd(II).....	39
3.6.3	Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	39
4	Ergebnisse.....	41
4.1	Charakterisierung der Vitalität und des Phänotyps.....	41
4.1.1	Chlorophyllgehalt.....	41
4.1.2	Lichtmikroskopische Dokumentation.....	45
4.1.3	Elektronenmikroskopische Analysen.....	46
4.2	Untersuchungen zur Biosorption und Bioakkumulation von Cd(II).....	46
4.2.1	Biosorption und Bioakkumulation in herkömmlichen ABC-Medium.....	46
4.2.2	Bioakkumulation unter erhöhtem Sulfat-Gehalt.....	48
4.3	Datenbank-Recherche.....	49
4.4	Analysen zur Genexpression.....	50
4.4.1	Bestimmung eines Referenzgens.....	52
4.4.2	Gene der Sulfatassimilation und der Glutathionbiosynthese.....	53
4.4.3	Gene, deren Produkte an der Redox-Homöostase beteiligt sind.....	55
4.4.4	Glutathion-S-Transferasen.....	56
4.4.5	Metallothioneine.....	57
4.5	Untersuchungen zur Enzymaktivität.....	58
4.5.1	OAS-TL.....	58
4.5.2	$\gamma$ -ECS und GSHS.....	59
4.5.3	Glutathion-S-Transferasen.....	60
4.6	Untersuchungen der Thiolgehalte unter Cd(II)-Stress.....	61
4.6.1	Cystein und $\gamma$ -Glutamylcystein.....	61
4.6.2	Glutathion.....	62
4.6.3	Konzentrationen von Cys und GSH der $\Delta$ apr-Mutanten.....	66
4.6.4	Thiolkonzentrationen unter erhöhtem Sulfat-Gehalt.....	67
4.7	OAS-TL-Reinigung.....	70
5	Diskussion.....	75
5.1	Vitalität von <i>P. patens</i> nach Cd(II)-Exposition.....	76
5.1.1	Pigmentgehalt und Photosystem-II-Effizienz.....	76
5.1.2	Mikroskopische Untersuchungen.....	80
5.2	Biosorbtion und Bioakkumulation von Cd(II) in <i>P. patens</i> .....	81
5.3	Sequenzvergleiche.....	83
5.4	Einfluss von Cd(II) auf die Transkription.....	84
5.4.1	Referenzgen.....	84
5.4.2	Sulfatassimilation.....	84
5.4.3	Glutathion-Biosynthese.....	87
5.4.4	Metallothioneine.....	88
5.5	Verursacht Cd(II) oxidativen Stress in <i>P. patens</i> ?.....	89

5.6	Glutathion-S-Transferasen.....	90
5.7	Enzymaktivitäten unter Cd(II)-Stress .....	91
5.8	Thiolgehalte nach Cd(II)-Exposition.....	93
5.9	Beeinflussung der Cd(II)-Toleranz durch zusätzliches Sulfat .....	94
5.10	Glutathion als Cd(II)-Chelator in Moosen?.....	96
6	Zusammenfassung und Ausblick .....	98
7	Literatur.....	102
Anhang A - Rohdaten.....		i
	Chlorophyll- bzw. Carotinoid-Gehalte und Vitalität.....	i
	Biosorption und Bioakkumulation .....	iii
	Genexpression .....	v
	Enzymaktivitäten .....	vii
	Thiolgehalte.....	viii
Anhang B - Mikroskopische Dokumentation.....		xiii
	Lichtmikroskopie .....	xiii
	Fluoreszenzmikroskopie mit BTC-5N .....	xv
	Elektronenmikroskopie .....	xvi
Lebenslauf.....		xviii
Erklärung.....		xix

## Abkürzungsverzeichnis

---

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ABC-Transporter	<i>ATP-binding cassette transporter</i>
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AcOH	Essigsäure
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	<i>base pairs</i> (Basenpaare)
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
BSO	Buthioninsulfoximin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzen
CHES	2-(Cyclohexylamino)ethansulfonsäure
C-Terminus	Carboxyterminus, carboxylendständiger AS-Rest
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphat
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EST	<i>expressed sequence tag</i>
EtOH	Ethanol
FM	Frischmasse
GSSG	Glutathion (oxidiert)
GST	Glutathion-S-Transferase (Proteinfamilie)
GR	Glutathion-Reduktase, GSH-Reduktase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-3-propansulfonsäure
HMW	<i>high molecular weight</i>
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LMW	<i>low molecular weight</i>
mBBr	Monobrombiman
MeOH	Methanol

---

---

MES	N-Morpholinoethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MT	Metallothionein
MW	Mittelwert
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduziert)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduziert)
N-Terminus	Aminoterminus, aminoendständiger AS-Rest
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei x nm
PC	Phytochelatin
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PCS	Phytochelatinsynthase
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Photosystem
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RP-HPLC	<i>Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
Rubisco	Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
ssDNA	<i>single strand</i> DNA
SULTR	Sulfat-Transporter
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-HCl/EDTA
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Trockengewicht
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Vol.	Volumen
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
WT	Wildtyp
x g	-fache Erdbeschleunigung

---

---

Enzyme und Metabolite der reduktiven Sulfatassimilation  
und der Glutathion-Biosynthese

---

APK	Adenosin-5'-Phosphosulfat-Kinase, APS-Kinase
APR	Adenosin-5'-Phosphosulfat-Reduktase, APS-Reduktase
APS	Adenosin-5'-Phosphosulfat
ATPS	Adenosintriphosphat-Sulfurylase, ATP-Sulfurylase
Cys	Cystein
$\gamma$ -EC	$\gamma$ -Glutamylcystein, $\gamma$ -Glu-Cys
$\gamma$ -ECS	$\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase, $\gamma$ -EC-Synthetase
GSH	Glutathion (reduziert), $\gamma$ -Glu-Cys-Gly
GSHS	Glutathion-Synthetase, GSH-Synthetase
OAS	O-Acetylserin
OAS-TL	O-Acetylserin(thiol)lyase
PAPR	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat-Reduktase, PAPS-Reduktase
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
SAT	Serin-Acetyl-Transferase
SiR	Sulfit-Reduktase

---