

## 9. ANHANG

### 9.1. Abkürzungsverzeichnis

#### 9.1.1. Allgemein

Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
Bidest.	bidestilliertes Wasser
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderalbuminserum
bzw	beziehungsweise
ca.	cirka
CAM	Crassulaceensäure-Stoffwechsel
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus "Cauliflower Mosaic Virus"
cDNA	komplementäre DNA
Chl	Chlorophyll
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DTT	1,4-Dithiothreitol
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient
EC	EC-Nummer (Enzymnomenklatur)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycolbis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure
engl.	Englisch
<i>et al.</i>	und Andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FG	Frischgewicht
FSB-Puffer	"frozen storage buffer"
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
IAA	Isoamylalkohol
IgG	Immunglobuline Gamma
K	Kontrolle
Kann'	Kanamycin-Resistenz
KOH	Kaliumhydroxid
L.	Linneo
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
L-LDH	L-Lactat-Dehydrogenase
L-MDH	L-Malat-Dehydrogenase
LSU	"large subunit"
MEN	MOPS-EDTA-NaOAc-Puffer
MeOH	Methanol
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MS-Medium	Medium nach Murashige und Skoog

n	Anzahl der Einzelbestimmung
N	Stickstoffatom
NAD <sup>+</sup>	β-Nicotinamid-adenindinucleotid
NADH <sup>+</sup>	β-Nicotinamid-adenindinucleotid
NADH <sub>2</sub>	reduziertes β-Nicotinamid-adenindinucleotid
NAD-MDH	β-Nicotinamid-adenindinucleotid- Malat-Dehydrogenase
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	4-Nitroblautetrazodiumchlorid
NCBI	„National Center for Biotechnology Information“
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
OAA	Oxalessigsäure
ocs poly A	Polyadenylierungssignal des Octopinsynthesegens von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<sup>32</sup> P	radioaktives Phosphoratom
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
p. a.	"pro analysi,, (Synonym für Analysenqualität)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPC	Phosphoenol Pyruvat Carboxilase
Pi	Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPDK	Pyruvat, Phosphat Dikinase
PPi	Pyrophosphat
PVP-40	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RUBISCO	Ribulose 1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
s.	siehe
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Lösung
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Lösung
TBS	Tris-gepufferte-Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte-Salzlösung + Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton-X	Octylphenol-polyethylenglycolether
Tween20	Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
var.	Varietät
v/v	Volumenanteil pro Volumen (volume per volume)
w	Gewicht
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen (weight per volume)
WT	Wildtyp
YEB-Medium	Yeast Extract Broth Medium
—	
x	Mittelwert

## 9.1.2. Einheiten

%	Prozent
bp	Basenpaare
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde
IU	International Units (Enzymeinheit)
Kbp	Kilobasenpaare
KDa	Kilodalton
M	Molar
min	Minuten
mL	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
s	Sekunden
V	Volt

## 9.1.3. Abkürzungen für Artnamen

<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>M. crystallinum</i>	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>

## 9.2. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### 9.2.1. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1-1:</b>	Chemische Schritte der PPK-Katalyse.
<b>Abb. 1-2:</b>	Glukoneogenetische Rolle der PPK in Bakterien.
<b>Abb. 1-3:</b>	Darstellung der Rolle des Enzyms PPK in C <sub>4</sub> -Pflanzen.
<b>Abb. 1-4:</b>	PPK-Rolle in Pflanzen mit CAM-Stoffwechsel.
<b>Abb. 1-5:</b>	Beitragung der PPK in der Refixierung von Kohlendioxid durch die PEPC-Aktivität.
<b>Abb. 3-1:</b>	Schematische Darstellung der cDNA-Konstrukte der PPK.
<b>Abb. 3-2:</b>	Organ und Zellkompartiment spezifisches „targeting“ der PPK.
<b>Abb. 3-3:</b>	Aufarbeitungsschema zur Untersuchung von Chlorophyll und freien Aminosäuren.
<b>Abb. 3-4:</b>	Mechanismus der Ninhydrin Reaktion.
<b>Abb. 3-5:</b>	Schematische Darstellung der Kulturmethode zur Gewinnung von Wurzelexsudaten.
<b>Abb. 3-6:</b>	Reaktionen zur enzymatischen Bestimmung der Zitronensäure.
<b>Abb. 3-7:</b>	Reaktionen zur enzymatischen Bestimmung der Äpfelsäure.

- Abb. 4-1:** Expressionsniveau des *M. crystallinum ppdk*-Gens in transgenen Tabakpflanzen (transkriptional und translational).
- Abb. 4-2:** Länge des Sprosses von WT-Tabakpflanzen in Abhängigkeit von der N-Zusammensetzung in den Nährmedien.
- Abb. 4-3:** Entwicklung des Sprosses bei den WT-Tabakpflanzen in Abhängigkeit von der Stickstoffform.
- Abb. 4-4:** Länge des Sprosses von transgenen Tabakpflanzen, die die PPDK mit dem 35S-Promotor überexprimieren, bei unterschiedlichen Stickstoffformen in der Nährmedien.
- Abb. 4-5:** Entwicklung des Sprosses bei transgenen Tabakpflanzen mit PPDK-Überexpression mit dem 35S-Promotor in Abhängigkeit von der Stickstoffquelle.
- Abb. 4-6:** Länge der Sprosse von transgenen Tabakpflanzen, die die PPDK mit dem B33-Promotor überexprimieren, bei unterschiedlichen Stickstoffformen in den Nährmedien.
- Abb. 4-7:** Entwicklung der Sprosse bei den transgenen Tabakpflanzen mit PPDK-Überexpression mit dem B33-Promotor in Abhängigkeit von der Stickstoffquelle.
- Abb. 4-8:** Frischgewichte der Sprosse in Abhängigkeit vom Stickstoffangebot im Nährmedium.
- Abb. 4-9:** Blattfläche der Tabakpflanzen nach Behandlung mit unterschiedlichen Stickstoffquellen.
- Abb. 4-10:** Gehalt von Chlorophyll a in Blättern von transgenen Tabakpflanzen bei Düngung mit unterschiedlichen Stickstoffformen.
- Abb. 4-11:** Gehalt von Chlorophyll b in Blättern von transgenen Tabakpflanzen bei Düngung mit unterschiedlichen Stickstoffformen.
- Abb. 4-12:** Verhältnisse von Chlorophyll a/b in Blättern transgener Tabakpflanzen bei Behandlung mit Nährmedien mit unterschiedlichen Stickstoffquellen.
- Abb. 4-13:** Einfluss der Stickstoffform auf die freien Aminosäuren von Tabakblättern.
- Abb. 4-14:** Einfluss der Stickstoffquelle auf die freien Aminosäuren in den Tabakwurzeln.
- Abb. 4-15:** Proteinkonzentration in den Blättern von Tabakpflanzen bei Düngung mit Nährlösung mit unterschiedlichen N-Quellen.
- Abb. 4-16:** Proteinkonzentration in den Wurzeln von Tabakpflanzen bei Düngung mit Nährlösung mit unterschiedlichen Stickstoffquellen.
- Abb. 4-17:** PEPC-Proteinspiegel (ca. 100 kDa) in Blättern von transgenen Tabakpflanzen.
- Abb. 4-18:** Densitometrisches Signal der PEPC in Tabakblättern.
- Abb. 4-19:** RUBISCO-Proteinspiegel (LSU 50-55 kDa) in Blättern von transgenen Tabakpflanzen.
- Abb. 4-20:** Densitometrisches Signal der RUBISCO (LSU) in Tabakblättern.
- Abb. 4-21:** Verhältnis zwischen Proteinsignalen von RUBISCO und PEPC (RUBISCO/PEPC) in transgenen Tabakpflanzen mit unterschiedlichen Stickstoffbehandlungen.
- Abb. 4-22:** Anzahl der Tage bis zum Blühbeginn der Tabakpflanzen in Abhängigkeit von der Stickstoffquelle im Nährmedium.
- Abb. 4-23:** Anzahl der Kapseln pro Tabakpflanze nach unterschiedlichen Stickstoffbehandlungen.
- Abb. 4-24:** Tausendsgewicht in Tabakpflanzen in Abhängigkeit von der Stickstoffbehandlung.
- Abb. 4-25:** Einfluss der Stickstoffquelle auf den Samenertrag von Tabakpflanzen.
- Abb. 4-26:** Löslichkeit von Al-Oxiden und -Hydroxiden in Abhängigkeit vom pH-Wert.
- Abb. 4-27:** Entwicklung des Sprosses der WT- und der transgenen Tabakpflanzen in Abhängigkeit der Aluminium-Behandlungen.
- Abb. 4-28:** Proteinkonzentration in Wurzeln von Tabakpflanzen bei Inkubation mit unterschiedlichen Aluminium-Konzentrationen.
- Abb. 4-29:** Wurzelwachstum von Keimlingen der WT-Tabakpflanzen in MS-Medium ohne Al-Behandlung und mit 100  $\mu$ M Al-Behandlung.
- Abb. 4-30:** Einfluss der Al-Behandlung auf das Wurzelwachstum in Keimlingen von WT-Tabakpflanzen.
- Abb. 4-31:** Einfluss der Al-Behandlung auf das Wurzelwachstum in transgenen Tabakkeimlingen, die die PPDK mit dem B33-Promotor überexprimieren.

- Abb. 4-32:** Einfluss der Al-Behandlung auf das Wurzelwachstum in Keimlingen von transgenen Tabakpflanzen, die die PPDK mit den 35S-Promotor überexprimieren.
- Abb. 4-33:** Relatives Wurzelwachstums von transgenen und WT-Tabakpflanzen mit Behandlung mit 100  $\mu$ M Al-Behandlung.
- Abb. 4-34:** Ausscheidung von Zitronensäure aus Tabakwurzeln mit und ohne Aluminium-Inkubation.
- Abb. 4-35:** Ausscheidung von Äpfelsäure aus Tabakwurzeln mit und ohne Aluminium-Inkubation.
- Abb. 4-36:** Färbung mit Eriochrome Cyanine-R von Al-behandelten Tabakwurzeln.
- Abb. 4.37:** Anteil von gefärbten Wurzeln mit ECR in den transgenen und WT-Tabakpflanzen.
- Abb. 5-1:** Physiologische Antwort der Wurzel auf das Angebot von Ammonium oder Nitrat als Hauptstickstoffquelle.
- Abb. 5-2:** C<sub>4</sub>-Weg in C<sub>3</sub>-Pflanzen (ohne Kranzanatomie) durch Überexpression von C<sub>4</sub>-Enzymen.
- Abb. 5-3:** Stoffwechselschema für eine cytosolisch überexprimierte PPDK.
- Abb. 5-4:** Mögliche Beteiligung des Enzyms PPDK in der externen Al-Entgiftung in transgenen Tabakpflanzen mit PPDK-Überexpression in Wurzeln.
- Abb. 5-5:** PPDK-Reaktion in Pflanzen.

### 9.2.2. Tabellenverzeichnis

- Tab. 3-1:** Salzkonzentrationen der verschiedenen Nährlösungen.
- Tab. 3-2:** Mikronährstoffe.
- Tab. 3-3:** Aluminium-Behandlungen.
- Tab. 3-4:** MS-Medium.
- Tab. 3-5:** Definition der Signifikanz und deren Symbol.
- Tab. 4-1:** Wachstumsparameter in Abhängigkeit von Mutanten und Behandlungen.

### 9.3. Chemikalienliste

Acrylamid (Protogel: 30:0,8 AA/Bis-AA)	Roth, Karlsruhe
Aqua-Phenol	Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Aluminiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Amidoschwarz 10B extra	Serva, Heidelberg
$\epsilon$ -Amino-n-Caprinsäure (6-Amino-n-Hexansäure)	Sigma, Deisenhof
Ammoniumacetat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumdihydrogenphosphat	Sigma, Deisenhof
Ammoniumhydroxid	Sigma, Deisenhof
Ammoniumnitrat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ascorbinsäure	Sigma, Deisenhof
Benzamidin	Sigma, Deisenhof
Bidestilliertes Wasser (Bidest.)	eigene Herstellung
Borsäure	AppliChem, Darmstadt
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	AppliChem, Darmstadt

Bromphenolblau (BPB)	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Calciumnitrat-Tetrahydrat	Roth, Karlsruhe
Calciumsulfat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Chloroform p.a.	Roth, Karlsruhe
Citratpuffer Lösung	Sigma, Deisenhof
Cobaltchlorid-Hexahydrat	AppliChem, Darmstadt
Coomasie Brilliant Blau G250	Sigma, Deisenhof
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
1,4-Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt
N,N'-Dimethylformamid (DMF)	Roth, Karlsruhe
Eisensulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Entwicklerlösung	Afga Vertrieb durch Bepmabode, Berlin
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Ethylenglycolbis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	AppliChem, Darmstadt
Eriochrome Cyanine-R	Sigma, Deisenhof
Fixierlösung	Afga Vertrieb durch Bepmabode, Berlin
Fleischextrakt	Merck, Darmstadt
Formaldehyd 37%	Roth, Karlsruhe
Formamid	AppliChem, Darmstadt
D(+)-Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerin wasserfrei	Roth, Karlsruhe
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol (IAA)	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Jodacetamid	Sigma, Deisenhof
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumnitrat	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Kaliumsulfat	Merck, Darmstadt
Kaliumjodid	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma, Deisenhof
Kupfersulfat-Pentahydrat	Merck, Darmstadt
L-Leucine	Sigma, Deisenhof

Leupeptin	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Manganchlorid-Dihydrat	AppliChem, Darmstadt
Mangansulfat	Sigma, Deisenhof
Methanol p. a.	Roth, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Molybdänoxid	Sigma, Deisenhof
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
Myo-Inositol	Sigma, Deisenhof
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdithionit	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydroxyd	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natrium-Laurosylsarcosin	Fluka, Taufkirchen
Natriummolybdat-Dihydrat	AppliChem, Darmstadt
Natriumhypochloridlösung	Roth, Karlsruhe
Nicotinsäure	Sigma, Deisenhof
Ninhydrin	Merck, Darmstadt
4-Nitroblautetrazodiumchlorid (NBT)	AppliChem, Darmstadt
Pepton	Roth, Karlsruhe
Phenol, TE gesättigt	AppliChem, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhof
Polyvinylpyrrolidon (PVP-40)	Sigma, Deisenhof
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Pyridoxal/Hydrochlorid	Sigma, Deisenhof
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure >25% p. a.	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, 37%	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin p. a. (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Thiamin-Hydrochlorid	Sigma, Deisenhof
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Tricin	Sigma, Deisenhof
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Trypton	Appllichem, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Tween 20® (Polyethylensorbitan Monolaurat)	AppliChem, Darmstadt
Zinksulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe

## 9.4. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Trejo-Téllez
Vorname	Libia Iris
Geburtsdatum	15.12.1973
Geburtsort	Texcoco, Mexiko

### Schule/Berufsausbildung

09/1978 – 07/1984	Grundschule „Justo Sierra“ Tamán, S. L.P., México.
09/1984 – 07/1987	Mittelschule „Justo Sierra“ Tamazunchale, S. L. P., Mexiko
08/1987 – 07/1990	Oberschule „Marte R. Gómez“ Chapingo, Mexiko
08/1990 – 07/1995	Hochschule „Universidad Autónoma Chapingo“ Chapingo, Mexiko. Abschluss: Agraringenieur.
23/06/1995	Verteidigung der Diplomarbeit „Establecimiento del cultivo de lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> en estiércol bovino“ (Etablierung der Erdwurmkultur <i>Eisenia foetida</i> im Rinderdung).
01/1998 – 01/2000	Masterstudium „Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas“ Montecillo, Mexiko. Abschluss: Master of Science.
14/01/2000	Verteidigung der Magisterarbeit „Fertilización foliar específica en tres tipos de suelos“ (Spezifische Blattdüngung bei Pflanzen auf drei unterschiedlichen Böden).

### Beruflicher Werdegang

03/1996 – 12/1997	Forschungsassistentin Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas Montecillo, Mexiko
02/2000 – 05/2001	Forschung- und Lehrassistentin Colegio de Potsgraduados en Ciencias Agrícolas Montecillo, Mexiko
Seit 10/2001	Doktorandin in Rahmen eines DAAD-Stipendiums bei Prof. Schmitt. Institut für Pflanzenphysiologie und Mikrobiologie. FU-Berlin. Berlin, Deutschland.



### **9.5. Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt. Zitate sind als solche gekennzeichnet. Weiterhin erkläre ich, dass ich diese in der jetzigen oder einer ähnlichen Form bei noch keiner anderen Fakultät eingereicht habe.

Berlin, November, 2004

---

Libia I. Trejo-Télez